

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：38005

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660172

研究課題名(和文) サンゴの「個性」がストレス耐性の鍵? -ゲノム科学による解明-

研究課題名(英文) Is coral "personality" important for stress tolerance?

研究代表者

新里 宙也 (Shinzato, Chuya)

沖縄科学技術大学院大学・その他の研究科・研究員

研究者番号：70524726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：地球規模の環境変動により、サンゴ礁が危機的な状況にある。サンゴのストレス耐性には共生する藻類が重要だと考えられているが、ストレス耐性は個体により著しく異なるのではないかと、という仮説のもと、ストレスに耐性がある個体と敏感な個体を複数選別し、そのゲノム上の一塩基多型(SNP: Single Nucleotide Polymorphism)を比較することで、ストレス耐性に関わる遺伝子やゲノム領域の特定を目指した研究である。

研究成果の概要(英文)：Coral reefs worldwide are declining due to climate change. It has been widely believed that coral stress tolerance is related with their symbiont type. In this project, based on a hypothesis that coral "personality" is more important for stress tolerance than their symbiont type, we aimed to identify genomic regions or genes that are important for stress response of corals using whole genome SNP (Single Nucleotide Polymorphism) analyses.

研究分野：ゲノム科学・サンゴ礁生物学

キーワード：ゲノム サンゴ礁 SNP ストレス

1. 研究開始当初の背景

近年の地球温暖化に伴う環境変動によって、世界のサンゴの約三分の一の種が絶滅の危機にあり、70%のサンゴ礁が消失の危機に曝されていると言われている (Carpenter et al., 2008)。サンゴは光合成を行う微細藻類、褐虫藻 (*Symbiodinium*) と共生し、栄養の大部分を依存している。しかしほんの僅かな海水温の上昇が、共生関係の崩壊「白化現象」を引き起こす。サンゴは栄養の大部分を褐虫藻に依存しているので、最悪の場合死に至る。

これまでのサンゴの生物学的研究は生態学が中心で、分子メカニズムの詳細はほとんど分かっておらず、遺伝子レベルでの研究の推進が強く求められていた。そこで申請者らはサンゴ礁の優占種であるココビミドリイシ (*Acropora digitifera*) の全ゲノムを世界で初めて解読した (Shinzato et al., 2011, Nature 476:320-323)。さらに褐虫藻の一種、*S. minutum* の全ゲノムも世界で初めて報告した (Shoguchi et al., 2013, Current Biology 23:1399-408)。このように、分子レベルでサンゴの研究を推進できる基盤が整ってきた。

サンゴのストレス耐性には、共生する褐虫藻のタイプが大きな影響を与えているという考えが一般的に広く信じられている (例えば Sampayo et al., 2008, PNAS 105:10444-9)。一方で、サンゴの種によってストレス耐性が異なることも報告されている (Loya et al., 2001 Ecol. Lett. 4:122-31; Negri et al., 2007 Coral Reefs 4: 759-63)。このようにサンゴのストレス耐性についての詳細は、未だに不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、共生している褐虫藻がストレス耐性に重要であるというこれまでの考えと異なり、サンゴの「個体差」が大きな役割を果たしているのではないかと、という視点から研究を行う。サンゴのストレス耐性は個体により著しく異なるという仮説のもと、ストレスに耐性がある個体と敏感な個体を複数選別し、そのゲノム上の一塩基多型 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) を比較することで、ストレス耐性に関わる遺伝子やゲノム領域の特定を目指している。

失われたサンゴ礁を回復させるため、養殖したサンゴ片を移植する事業が盛んに行われている。これまでのサンゴ片を用いた無性生殖による移植は、移植後の生存率が低いことが問題であった。高温ストレス耐性を調べられる分子マーカーが見つければ、的確にストレスに強い個体を選別し、養殖・移植することが可能になる。そして移植後の生存率を向上させることに繋がる。このように本研究は、将来の効果的なサンゴ礁の再生技術への応用を目指して行った。

3. 研究の方法

沖縄県瀬底島周辺で採捕したサンゴ、ココ

ビミドリイシ 20 群体に熱ストレスを与えて一ヶ月程度飼育し、成長率を調べることで、ストレスに強いサンゴ個体の特定を行った。さらに、沖縄県恩納村漁協でサンゴの移植株として長期間飼育され、これまでの飼育の実績などからストレスに強い株が確認されており、それらも解析に使用した。

イルミナ社の次世代シーケンサー、GA IIx と HiSeq を用いて、単離したゲノム DNA の解読を行った。次世代シーケンサーで十分に解読できるゲノム DNA の量と質を確保するため、サンゴの枝を CHAOS 溶液で固定し (Fukami et al., 2000 Zool. Sci. 17:689-96)、そこから DNA を抽出した。DNA 解読の際にバイアスがかからないように、抽出した DNA は PCR-free の手法でライブラリを作成した。それぞれの個体から推定ゲノムサイズ (約 420Mbp) の 5~10 倍、3~5 Gbp の配列データを得た (ゲノム・リシーケンス)。得られた DNA 配列は、解読されている参照ゲノム配列にマッピングして、ゲノム上に存在する SNP を各個体ごとに特定した。共生している褐虫藻のタイプの確認は、データベースに登録されている ITS-2 領域の配列に対して、得られた DNA 配列を比べることで特定した。

4. 研究成果

サンゴの枝から抽出した DNA には、サンゴと褐虫藻の塩基配列が混ざりあっている。複数の生物由来の膨大なデータから、サンゴと褐虫藻の配列を区別し、さらに共生している褐虫藻のタイプを見分けるコンピュータの解析法の開発も行い、その成果の一部を論文として発表した。さらに遺伝子マーカー (マイクロサテライト) を用いて、簡単にサンゴの個体を識別する DNA 鑑定の手法も開発した。ココビミドリイシの参照ゲノム配列の質を、新たなソフトウェアの使用と解析法の改善により向上させることに成功した。これにより、一個体からより多くの SNP の特定が可能になった。

そしてココビミドリイシの成体から高品質の DNA 抽出方法を確立し、次世代シーケンサーを用いたそれぞれの個体のゲノムの再解読、ゲノム・リシーケンスを行った。リシーケンスによって得られる膨大な DNA 配列データの参照ゲノムへのマッピング (SNP 探索) と、膨大な量の SNP データから高品質で信頼性が高い SNP データを選抜する手法をパイプライン化し、信頼性の高いデータを得る解析手法を確立することが出来た。

高温ストレスを与えた飼育実験により、高温ストレスを与えても成長に影響が少ない個体の特定に成功したが、2013 年夏に沖縄本島周辺で高海水温が確認され、サンゴの白化現象が起こった。琉球大学瀬底実験施設の水槽で飼育していたサンゴの死滅も確認された。そこで、漁業者から情報提供のあった、ストレスに強いサンゴ (ウスエダミドリイシ) について解析を行った。実際の観察と飼

育実績の情報から、通常のストレス耐性を示す4個体と、ストレスに強い1個体を選抜した。それぞれからゲノムDNAを抽出、次世代シーケンサーでDNAを解読した。まず共生している褐虫藻のタイプを調べたところ、5つの個体でほぼ同一の褐虫藻タイプのみが検出された。このことから、これら個体のストレス耐性の差は褐虫藻のタイプの違いではないことが示唆された。そして各個体から約3-400万ヶ所のSNP情報が得られた。ストレスに強い個体だけに確認されたSNPは約35万箇所であった。そのうち表現形に大きな影響を与えると考えられる、遺伝子領域の終止コドンの生成やアミノ酸の置換を引き起こすSNP、約1600個の特定に成功した。これらがサンゴのストレス耐性に関わっているSNPの可能性があると考えている。しかしながら、このうちのSNPが特に重要かというところまでの特定には至らなかった。今後さらに個体数を増やして解析する必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

- ・ Shinzato C, Mungpakdee S, Arakaki N, Satoh N. Genome-wide SNP analysis explains coral diversity and recovery in the Ryukyu Archipelago. (2015). Scientific Reports. 5: 18211. doi: 10.1038/srep18211
- ・ Shinzato C, Yasuoka Y, Mungpakdee S, Arakaki N, Fujie M, Nakajima Y, Satoh N. Development of novel, cross-species microsatellite markers for *Acropora* corals using next-generation sequencing technology. (2014). Front. Mar. Sci. 1:11. doi: 10.3389/fmars.2014.00011
- ・ Bosch T, Adamska M, Augustin R, Domazet-Loso T, Foret S, Fraune S, Funayama N, Grasis J, Hamada M, Hatta M, Hobmayer B, Kawai K, Klimovich A, Manuel M, Shinzato C, Technau U, Yum S, Miller DJ. How do environmental factors influence life cycles and development? An experimental framework for early-diverging metazoans. (2014). BioEssays. 36:1185-94. doi: 10.1002/bies.201400065
- ・ Nakajima Y, Shinzato C, Khalturina M, Watanabe H, Inagaki F, Satoh N, Mitarai S. Cross-species,

amplifiable microsatellite markers for neoverrucid barnacles from deep-sea hydrothermal vents developed using next-generation sequencing. (2014). Int. J. Mol. Sci. 15(8): 14364-71. doi:10.3390/ijms150814364

- ・ Shinzato C, Mungpakdee S, Satoh N, Shoguchi E. A genomic approach to coral-dinoflagellate symbiosis: studies of *Acropora digitifera* and *Symbiodinium minutum*. (2014). Front. Microbiol. 5:336. doi: 10.3389/fmicb.2014.00336
- ・ Shinzato C, Inoue M, Kusakabe M. A snapshot of a coral "holobiont": a transcriptome assembly of the scleractinian coral, *Porites*, captures a wide variety of genes from both the host and symbiotic zooxanthellae. (2014). PLoS One, e85182. doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0085182

[学会発表](計9件)

- ・ 新里宙也、ゲノムデータを用いた沖縄のコクビミドリイシサンゴの集団解析、日本水産学会春季大会、2016年3月28日、東京海洋大学(東京都)
- ・ 新里宙也、全ゲノムSNPデータを用いた沖縄のサンゴの集団ゲノム学解析、日本進化学会、2015年8月20~22日、中央大学後楽園キャンパス(東京都)
- ・ 新里宙也、サンゴ礁生態系の保全・再生へのゲノミクス技術の活用、日本生物工学会大会、2015年10月27日、城山観光ホテル(鹿児島県)
- ・ 新里宙也、次世代シーケンサーを用いたミドリイシ属サンゴに広く使用できるマイクロサテライトマーカーの開発、日本サンゴ礁学会、2014年11月29日、高知城ホール(高知県)
- ・ 新里宙也、次世代シーケンサーを用いたミドリイシ属サンゴに広く使用できるマイクロサテライトマーカーの開発、日本動物学会、2014年9月11日、東北大学(宮城県)
- ・ 新里宙也、造礁サンゴ(*Porites australiensis*) "holobiont" のトランスクリプトーム解析、マリンバイオテクノロジー学会、2014年5月31日、三重大学(三重県)
- ・ Chuya Shinzato, Decoding whole genomes of a coral *Acropora digitifera* and a dinoflagellates *Symbiodinium minutum*, 日本サンゴ礁学会、2013年12月15日、沖縄科

学技術大学院大学(沖縄県)

- ・ 新里宙也、「サンゴらしさ」をゲノムからみる：GFP と石灰化、日本動物学会、2013年9月26日、岡山大学(岡山県)
- ・ Chuya Shinzato, Sequencing the genomes of complex communities: transcriptome assembly of a coral “holobiont”, Aidling workshop, 2013年9月21日、Aidling(ドイツ)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称 : Cross-species microsatellite markers for Acropora corals.

発明者 : 新里宙也、スタダ ムンパッティ、中島祐一

権利者 : 同上

種類 : 特許

番号 : 特願 2014-93062

出願年月日 : 2014年4月28日

国内外の別 : 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

新里 宙也 (SHINZATO, Chuya)

沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミクスユニット・研究員

研究者番号 : 70524726

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

酒井 一彦 (SAKAI, Kazuhiko)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号 : 50153838

(3)研究協力者

井口 亮 (IGUCHI, Akira)

沖縄工業高等専門学校・生物資源工学科・助教

研究者番号 : 50547502