

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22938

研究課題名(和文) サンゴエクソソーム研究への挑戦

研究課題名(英文) Challenge for coral exposome studies

研究代表者

井口 亮(Iguchi, Akira)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・地質調査総合センター・主任研究員

研究者番号：50547502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、サンゴ体内外の代謝産物を網羅的に把握し、ストレス耐性を特徴づける要因を浮き彫りにすることを目的としている。ストレス耐性が異なるサンゴ系統でRNA-seqとメタボロームデータの統合解析を実施し、ストレス耐性と関連があると思われる機能遺伝子・代謝産物群の抽出に成功した。ハイスループットかつ直接メタボローム解析が可能な新規の分析プラットフォーム、"PiTMaP"を確立し、リアルタイム・メタボローム計測の基盤を構築した。一斉産卵時にサンゴポリプを取得して栄養塩負荷実験を行い、PiTMaPで解析した結果、褐虫藻有無・ストレス有無で顕著に異なる代謝産物を数十同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、今後ストレス耐性の異なるサンゴ系統の選抜や、ストレスを受けた際のサンゴの状態を把握するためのマーカー作成につながり、サンゴ群集の回復・保全技術の高度化につながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to comprehensively understand the metabolites inside and outside the coral and to highlight the factors that characterize stress tolerance. We conducted an integrated analysis of RNA-seq and metabolomic data from coral strains with different stress tolerance, and successfully extracted a group of functional genes and metabolites that may be related to stress tolerance. We established a new analytical platform, "PiTMaP", which enables high-throughput and direct metabolome analysis, and built a foundation for real-time metabolome measurement. As a result of nutrient loading experiments using coral polyps acquired during simultaneous mass spawning event and analyzed by PiTMaP, dozens of metabolites were identified that differed significantly depending on the presence or absence of zooxanthellae or stress.

研究分野：生態学

キーワード：サンゴ ストレス耐性 メタボローム エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

地球的規模、地域的規模の環境変化によって、サンゴ礁生態系の基盤構成種・サンゴが世界的に衰退していることが知られている。特にサンゴ体内に共生している褐虫藻との共生関係が崩壊してサンゴが死滅する、サンゴ白化現象が世界的に頻発しており、問題視されている。サンゴ白化現象は主に夏季の高水温ストレスによって引き起こされるが、高水温ストレスに対しては、種間・種内でその応答に幅広い変異が見られることが知られている。特に近年注目されているのは、サンゴ種内における高水温ストレスに対する変異である。大規模なサンゴ白化現象が起きた際に野外調査を実施すると、図1のように同じ種の群体がほぼ同所的

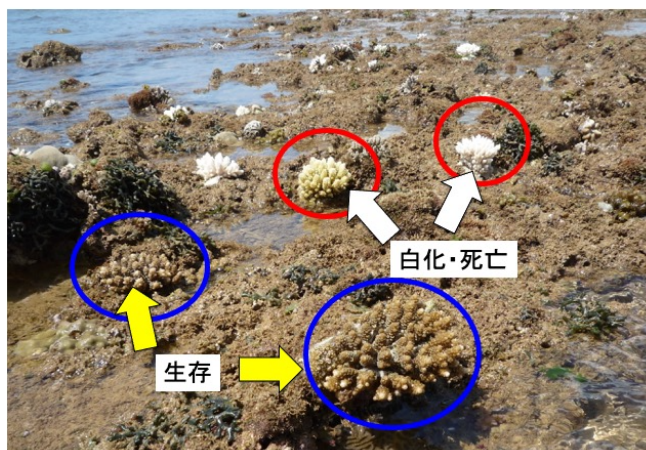


図1 サンゴ白化時に見られる高温耐性の種内変異

に分布していても、ストレス耐性に明確な差が見られることがよく観察される。しかしこの種内のストレス応答を特徴づける生物要因はまだ未解明の部分が多い。褐虫藻を対象とした遺伝子解析によって、褐虫藻の遺伝子型の違いで高水温耐性が異なることが知られてきたが、同じ遺伝子型の褐虫藻を持つサンゴでも白化の度合いが異なることも次第に明らかとなってきた。そのため、ホストであるサンゴ側の要因を探っていく必要がある。サンゴ種内のストレス応答変異を説明する要因を特定する主要な手法としては、網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq) と、アミノ酸や脂肪酸、糖類などの代謝物を網羅的に把握できるメタボローム解析があるが、後者のメタボローム解析は、サンゴにおいてははまだ適用例が少ないのが現状である。メタボローム解析は、現在技術的な高度化が進んでおり、分担者の財津の研究チームではメタボロームの連続的な測定も可能になっている (Zaitzu et al. Anal Chem 2018 他)。時系列でのメタボロームデータが取得できれば、非線形時系列解析による各要素の因果関係の把握も可能となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、飼育実験で得られたサンゴサンプルを対象に網羅的にメタボロームデータを取得し、ストレス耐性を特徴づけるコアとなる要因・要因群に着目して、ストレス耐性と関連のある生物要因を特定することである。

3. 研究の方法

代表者らが選別した、ストレス耐性が異なるサンゴ系統を、琉球列島で多く見られるココビミドリイシを対象に選別し、液体窒素で粉末にした後、メタノールを用いて代謝産物の抽出を行った。メタノール溶液から一定の抽出処理を行い、凍結乾燥および誘導体化処理を行った後、ガスクロマトグラフィー・タンデム質量分析を用いて代謝産物の同定を行った。一方、1 ポリプのメタボローム解析を実施するために、質量分析計によるデータ採取から、ソフトウェア R を用いたデータパイプラインによる自動解析を組み込んだ新たな代謝解析用プラットフォーム PiTMaP を開発した (Zaitzu et al. Anal Chem 2020)。PiTMaP によるメタボローム解析には、PESI イオン源を設置したタンデム型質量分析計を用いた (図2)。質量分析計の測定モードを「Scheduled SRM 法 (分析対象を次々と切り替えるモード)」に設定し、多成分の検出条件を最適化した。イオン化は PESI ポジティブモードおよび PESI ネガティブモードで行った。対象成分は、解糖系、クエン酸回路、尿素回路、ペントースリン酸経路などを構成する 72 成分を対象とした。質量分析計の取り込み時間と PESI の探針駆動周期の最適化を実施した。多変量解析・時系列解析手法の開発: 統計解析言語 R を用いて、得られたデータの時系列解析手法の構築を試みた。サンゴの幼生 (ポリプ) は凍結した試料を氷上で融解したのち、専用のサンプルプレートにセットして PiTMaP を実施した。

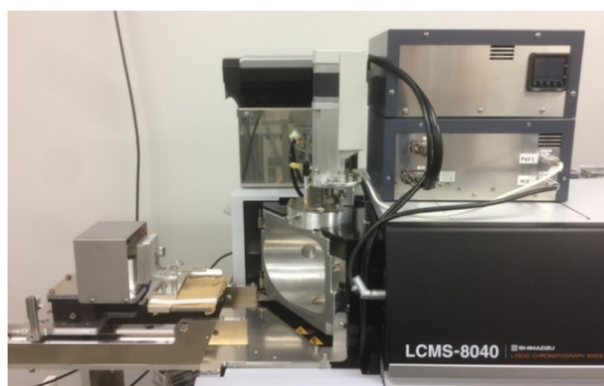


図2 本研究で用いた PiTMaP 用質量分析計

4. 研究成果

琉球列島のサンゴ礁域に優占するサンゴ種、コビミドリイシを対象に、ストレス耐性が異なるサンゴ系統を選抜し、メタボローム解析を行った。その結果、ストレス耐性が異なる系統間でメタボロームの組成が明確に異なることが確認された(図3)。さらに RNA-seq とメタボロームデータの統合解析を実施し、ネットワーク解析によるコミュニティ抽出を行った結果、ストレス耐性と関連があると思われる機能遺伝子・代謝産物群のモジュールの抽出に成功した(図4)。しかしこの時得られたメタボロームの結果は、ホストであるサンゴと褐虫藻の両方が混在しているため、分離して解析するのが困難であった。

ハイスループットかつ直接メタボローム解析が可能な PESI/MS/MS と、ソフトウェア R によるデータ処理を合わせた新規の分析プラットフォーム、“PiTMap”を確立し、リアルタイム・メタボローム計測の基盤を構築した。マウスを対象に予備的に得られたリアルタイムメタボロームデータを用いて、非線形時系列解析を実施し、各種メタボロームの因果関係の把握を行うための解析パイプラインを構築した。しかし上記のサンゴ片は硬い炭酸カルシウム骨格があることや、サンプルの輸送の問題から、ストレス暴露して PESI/MS/MS によるデータ取得は進まなかった。そこで初夏のサンゴ一斉産卵期にサンゴ幼生を確保して、褐虫藻のいないサンゴポリプと、人為的に褐虫藻を添加し共生させたサンゴポリプを取得して、代表的な栄養塩である硝酸とアンモニアを加えた負荷実験を行った。そして得られたポリプサンプルを用いて、PiTMap による網羅的なメタボロームデータの取得を行い解析した。その結果、褐虫藻有無・ストレス有無で顕著に異なる代謝産物を数十同定することに成功した。褐虫藻を含まないサンゴポリプにおいては、各処理間でのクラスタリングのパターンがより顕著であり(図5)、周辺環境の物質の変化とサンゴ体内の代謝産物の変化がより強く関連していることが示唆された。PiTMap を用いたサンゴを対象としたメタボロームデータ取得・解析手法の確立に成功し、さらには一次代謝物以外の化合物も取り入れつつある。室内実験で扱いやすいサンゴポリプを用いることで、ストレス暴露を実施して網羅的に代謝産物を取得してエクスポソーム解析として評価していく下地も整えることができた。また、LC-Q-TOFMS による網羅的解析に向けた拡張のための装置の立ち上げと予備試料を用いた条件検討も進めた。今回の研究で確立しつつあるリアルタイムメタボローム解析を継続して行うことで、サンゴのストレス耐性を特徴づける生物要因の詳細がさらに明らかになることが期待される。

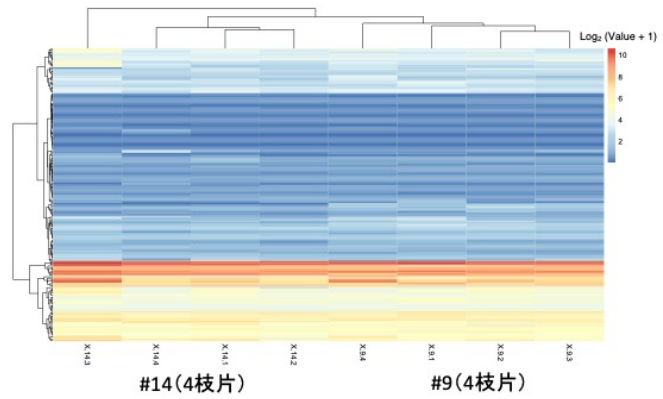


図3 ストレス耐性の異なるサンゴ系統間のメタボローム解析のヒートマップ図

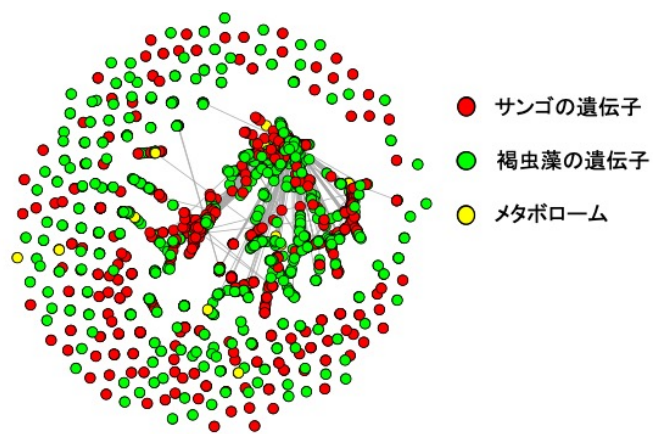


図4 ストレス耐性の異なるサンゴ系統の RNA-seq データとメタボロームデータをまとめたネットワーク図

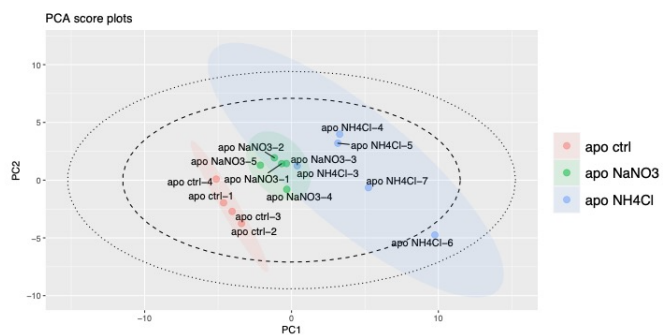


図5 褐虫藻を含まないサンゴポリプを用いて海水中の栄養塩濃度を変えて行ったメタボローム解析の主成分分析の結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Zaitso Kei, Eguchi Seiichiro, Ohara Tomomi, Kondo Kenta, Ishii Akira, Tsuchihashi Hitoshi, Kawamata Takakazu, Iguchi Akira | 4. 巻 92 |
| 2. 論文標題 PiTMAP: A New Analytical Platform for High-Throughput Direct Metabolome Analysis by Probe Electrospray Ionization/Tandem Mass Spectrometry Using an R Software-Based Data Pipeline | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Analytical Chemistry | 6. 最初と最後の頁 8514 ~ 8522 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.0c01271 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kei Zaitso, Yumi Hayashi, Tasuku Murata, Kazumi Yokota, Tomomi Ohara, Hitoshi Tsuchihashi, Akira Ishii, Koretsugu Ogata, Hiroshi Tanihata |
| 2. 発表標題 Repeatability and practicality of PESI/MS/MS-based in vivo real-time monitoring system for hepatic/brain metabolites in living mice |
| 3. 学会等名 67th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大原 倫美、深山 雄大、近藤 健太、村田 匡、船津 慎治、土橋 均、石井 晃、緒方 是嗣、財津 桂 |
| 2. 発表標題 PESI/MS/MSを用いた内因性代謝物40成分のリアルタイム・モニタリング法の構築 |
| 3. 学会等名 第44回日本医用マスペクトル学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 財津 桂、林 由美、村田 匡 |
| 2. 発表標題 Probe electrospray ionization/tandem mass spectrometry(PESI/MS/MS) を用いた intact metabolome analysis および in vivo リアルタイム分析法の構築 |
| 3. 学会等名 第44回日本医用マスペクトル学会年会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大原 倫美、野田 沙樹、村田 匡、井口 亮、財津 桂 |
| 2. 発表標題 GC/MS/MSを用いたメタボローム解析におけるバッチ間補正法の検討 |
| 3. 学会等名 第13回メタボロームシンポジウム |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 井口亮、飯島真理子、ベル智子、西島美由紀、中村崇、酒井一彦、鈴木淳、安元純、水澤奈々美、安元剛 |
| 2. 発表標題 底質リン酸塩によるサンゴ石灰化阻害とそのメカニズム解明 |
| 3. 学会等名 2020年度日本プランクトン・ベントス学会合同大会オンライン大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 井口亮、飯島真理子、ベル智子、西島美由紀、中村崇、酒井一彦、鈴木淳、安元純、水澤奈々美、安元剛、熊谷直喜 |
| 2. 発表標題 地球的規模・地域的規模の環境変化がサンゴ石灰化に及ぼす影響ーサンゴポリプ実験系による検証ー |
| 3. 学会等名 第15回バイオミネラリゼーションワークショップ（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 財津桂 |
| 2. 発表標題 PESI/MS/MSを用いたリアルタイム・メタボローム解析とBioinformaticsを融合したHigh-throughput platform: PiTMAPによる代謝プロファイリング |
| 3. 学会等名 第166回 質量分析関西談話会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 安元剛、井口亮、飯島真理子、安元純、窪田梓、財津桂、神保充、渡部終五 |
| 2. 発表標題 サンゴの石灰化と温度耐性に対する生体ポリアミンの関与 |
| 3. 学会等名 2020年度日本サンゴ礁学会大会第23回大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 財津 桂 (Zaitso Kei) (30700546) | 名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|