

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651267

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子解析による褐虫藻動態解明～「サンゴ-褐虫藻」共生系研究の新戦略提案～

研究課題名(英文) Dynamics elucidation of zooxanthellae in scleractinian coral by comprehensive genetic analysis

研究代表者

久保田 賢 (KUBOTA, SATOSHI)

高知大学・教育研究部総合科学系・准教授

研究者番号：00314980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：網羅的な塩基配列分析が可能な次世代シーケンサーを用いて、造礁サンゴに共生する褐虫藻の組成分析を試みた。従来型のRFLP分析により、Clade CおよびClade Fの褐虫藻が検出されたが、次世代シーケンサー解析では複数のClade Cの褐虫藻は検出されたが、Clade Fの褐虫藻はほとんど配列を見出すことができなかった。RFLP分析で検出された褐虫藻が次世代シーケンサー解析により優占種であることが示されたことから、次世代シーケンサー解析により褐虫藻組成はおおよそ把握できると思われた。しかし、Cladeの異なる褐虫藻の組成を含めて把握するためには、より詳細な条件検討が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to know the availability of next generation sequencer (NGS) for elucidation of zooxanthellae composition in scleractinian coral. Ribosomal RNA sequences of 28S region (LSU) was amplified and RFLP analysis and NGS analysis were applied. RFLP analysis showed several types of clade C and one clade F zooxanthellae in coral DNA. NGS analysis indicated major Clade C zooxanthellae species had identical sequences with analyzed by RFLP. This result supports that NGS must be powerful tool for elucidation of zooxanthella composition in scleractinian coral.

研究分野：水族生化学

キーワード：褐虫藻 クレード 網羅的解析 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

(1) クラゲやイソギンチャクなどの刺胞動物、シヤコガイ等の軟体動物や有孔虫のような原生動物などの多様な種において、褐虫藻と呼ばれる微細藻類が細胞内に観察される。熱帯・亜熱帯に広く分布する造礁サンゴは、その代表的な生物群として知られている。動物である造礁サンゴと光合成能力を持つ褐虫藻はそれぞれの代謝により排出されたものを栄養分として利用するなど、相利共生の関係にある。

(2) 造礁サンゴは、海水中の二酸化炭素やカルシウムを材料として骨格をつくるイソギンチャクのような形状をしており、それ自体は無色であるが、褐虫藻の共生により褐色や緑褐色等の色彩を放っている。海水温の著しい上昇といった環境負荷が高い状況下において、褐虫藻が劇的に減少し、造礁サンゴの退色、いわゆる「白化」が生じることが知られている。造礁サンゴの生存に必要な光合成産物の供給不足を招くことから、この白化した状態が続くと造礁サンゴを斃死に至らしめると考えられている。

(3) 造礁サンゴの細胞内に共生する代表的な褐虫藻は、Symbiodinium 属であることが知られている。1990年代に rDNA の塩基配列に基づく分子分類が試みられて以来、形態的に区別が難しい褐虫藻が Clade A から I の 9 種類に大別さ

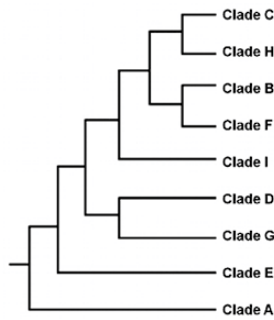


図1 褐虫藻の分子系統樹 (BiosciReviews, 2013 より転用)

れている (図1)。このうち造礁サンゴへの共生が確認されているのは、Clade A-D, Clade F の 5 種類である。各 Clade の褐虫藻の分類対象配列の詳細な分析により、さらにそれ以下のレベルの Subclade として分類に用いられている。分子分類の対象配列は、必ずしも生理機能に直接関与しないものの、異なった Clade の褐虫藻の共生が造礁サンゴの環境耐性に寄与することなどが示されている。

(4) 造礁サンゴに共生する褐虫藻は Clade C が圧倒的に多く、その分布域は広範囲にわたるのに対して、その他の Clade の褐虫藻の分布海域に特徴があることが知られている。また、同種の造礁サンゴでも、生息海域や環境により、異なった Clade の褐虫藻が共生している。さらに、近年では単一群体内に複数の褐虫藻が共存していることも明らかにされている。しかしながら、細胞内に無数に存在する褐虫藻の Clade や Subclade の組成について、網羅的に調べられた例は本研究開始時点では見当たらなかった。

2. 研究の目的

網羅的な塩基配列分析が可能な次世代シーケンサーを用いて、造礁サンゴに共生する褐虫藻の組成分析を試み、従来法で得られた結果との比較により、優位性や問題点等を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究に用いた造礁サンゴ試料は、公益財団法人黒潮生物研究所の協力により、採捕許可等の手続きを経た上で、高知県大月町西泊で採取した。エンタクミドリイシ、クシハダミドリイシおよびカワラサンゴの 3 種の小片を切り取り、海中から取り出した後ただちに DNA 可溶化液 (4M Guanidine thiocyanate, 0.5% N-Lauroylsarcosine sodium salt, 0.1M 2-mercaptoethanol, 25mM Tris-HCl, pH 8.0) へ浸漬した。可溶化液中の DNA は、Phenol/Chloroform 法により精製した。

(2) 分子分類の対象配列として 28SrRNA (LSU) を選択した (Zardoya et al., J.Mol. Evol, 1995 参照)。増幅した対象領域の PCR 断片の制限酵素 Taq I による制限酵素断片長多型分析 (RFLP), Dye-terminator 法を用いた塩基配列分析ならびに次世代シーケンサーを用いてタグ配列を付加した PCR アンプリコンの網羅的解析を行なった。得られた塩基配列については、公共データベース上の褐虫藻の LSU 配列を含めた解析により、分子系統樹を作成し、採取した造礁サンゴにどの Clade の褐虫藻が共生するか確認した。

4. 研究成果

(1) PCR 反応により単一のバンドの増幅が確認された (図2)。RFLP 分析や Dye-terminator 法による塩基配列分析用の PCR プライマーの場合の想定サイズ (645bp, 図2a) および次世代シーケンサー解析の場合の想定サイズ (731bp, 図2b) に相当する位置にバンドが確認された。

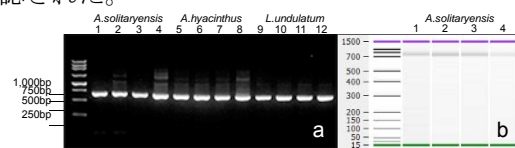


図2 単一の PCR 産物

a: RFLP 分析用プライマー, b: 次世代シーケンサー解析用プライマー
A. solitaryensis: エンタクミドリイシ, A. hyacinthus: クシハダミドリイシ, L. undulatum: カワラサンゴ

(2) PCR 産物の RFLP 分析により、4 塩基認識制限酵素である Taq I による切断により生じた 2 つの断片が検出された (図3a)。クシハダミドリイシの 4 試料について、300bp 付近に観察されたバンドのサイズが他の 2 種のそれよりわずかに大きく、種により異なる褐虫藻の共生が推測された。この 12 試料について、全く同じ条件で RFLP 分析を再度実施した結果、全く異なるパターンが観察された (図3b, PCR 反応は別ロット)。

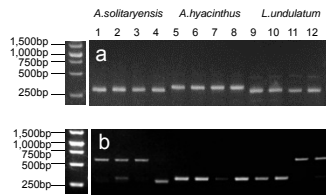


図3 RFLP分析
a, b: 同一DNA試料の分析結果
A. solitariaensis: エンタクミドリイシ,
A. hyacinthus: クシハダミドリイシ,
L. undulatum: カワラサンゴ

(3) 同じ環境に生息する造礁サンゴ種間、群体間および実験ロット間で RFLP 分析パターンに変動が認められたことから、それぞれの PCR 増幅断片の DNA シーケンス分析を実施した (図4)。その結果、少なくとも種類の配列の存在が認められた。全ての配列について、図4aのような100%一致する座位は約85%



図4 DNA配列分析
a: 100%配列が一致した座位 (一部)
b: 著しく配列が異なった座位 (特に配列4)
数字は増幅用プライマーの配列を除いた613bpの断片の5'末端からの位置(521/613)であった一方で、特に配列1-配列3と配列4の間で著しく配列が異なる座位も観察された。これらの LSU 配列がどの Clade に由来するか確認するため、公共データベースに登録された300を超える既知の褐虫藻の LSU 配列を加えて最尤法で分子系統樹を作成したところ、配列1-配列3は造礁サンゴに共生する最もポピュラーな褐虫藻である Clade C の配列であったが、配列4については Clade F と類似した配列を示した (図5)。

(4) 造礁サンゴより調製した DNA 試料に複数の褐虫藻配列が観察されたことから、次世代シーケンサーを用いた褐虫藻組成の分析を試みた。RFLP 分析対象とした増幅断片長613bpは、本研究で実施した分析モードの検出限界を超えていたことから、5'側および3'側のそれぞれから解読した配列のうち、約240bpの重複部分を対象にした。その結果、3種の造礁サンゴのうちエンタクミドリイシおよびクシハダミドリイシの2種については、2種の褐虫藻が90%を占め、その割合も比較的似通っていた (図6)。一方、カワラサンゴについては、群体間および群体内で褐虫藻の割合が著しく異なるとともに、ミドリイシ属サンゴ2種と比較して、多くの種類の褐虫藻配列が検出された。次世代シーケンサー解析により、存在比が大きいと判断された Seq. 1-Seq. 3は、従来法の RFLP 分析で検出された配列1-配列3と100%一致した配列を示した。一方、分子系統樹解析で Clade F と判断された配列4については次世代シーケンサー解析により得られた多量の配列中にほとんど見当たらなかった (1配列のみ)。

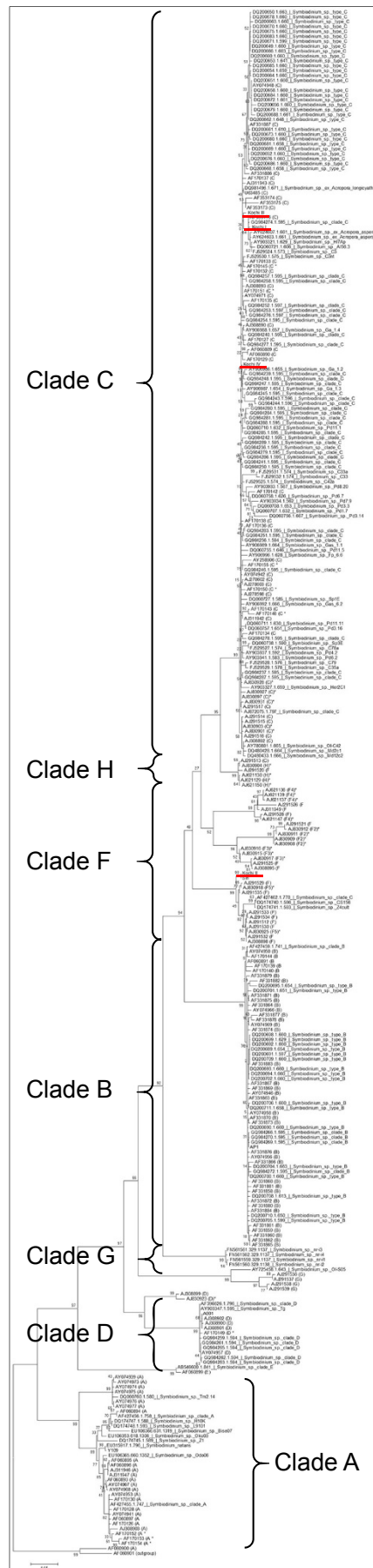


図5 解析配列の分子系統樹
配列1-3: Clade C, 配列4: Clade F

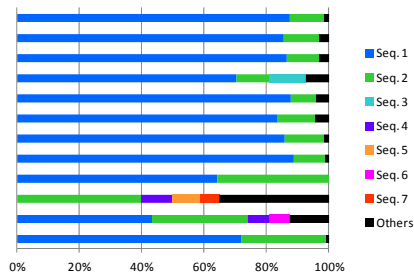


図 6 褐虫藻組成
Seq. 1 : 配列 1, Seq. 2 : 配列 2, Seq. 3 : 配列 3

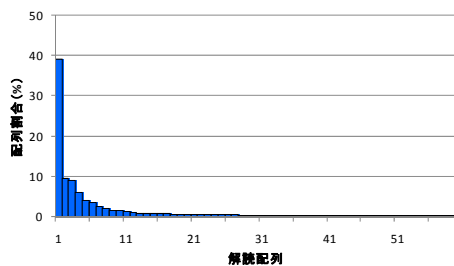


図 7 解読配列の存在割合

次世代シーケンサー解析により得られた全配列について、割合が高い順に並べた (図 7)。10%を超える配列は 1 種のみであったが、1%以上になると 10 を超え、存在比の低いものも含めると約 60 に上ることが明らかとなった (解析時点で 100%一致した配列が 20 以下のものは削除している)。

(5) 次世代シーケンサーで検出された主な配列について、公共データベースの検索により、100%一致する配列について情報を得た (表 1)。

表 1 主な次世代シーケンサー解析配列の性質

配列	該当数	採取地	RFLP 分析該当配列
Seq. 1	56	台湾, オーストラリア	図 3a ; 5-8, 図 3b ; 2, 5-10
Seq. 2	54	ポリネシア, 台湾, 紅海, オーストラリア, 中国	図 3a ; 1-4, 図 3b ; 1, 4
Seq. 3	2	オーストラリア, 沖縄	図 3a ; 9-12
Seq. 4	1	オーストラリア	該当なし
Seq. 5	1	沖縄	該当なし
Seq. 6	1	レユニオン (インド洋)	該当なし
Seq. 7	5	台湾, グアム, 奄美, オーストラリア	該当なし

次世代シーケンサー解析により、ほとんどの造礁サンゴで多数を占めた褐虫藻 (Seq. および Seq. 2) と 100%一致する配列はすでに多数報告されていることが明らかとなった。特に Seq. 2 については、西方太平洋に限らず、南太平洋や紅海でも観察された配列である。一方、次世代シーケンサー解析の結果、比較的割合が少ないという結果が得られた配列については、公共データベースの登録配列数も、1-5 と情報が限られていた。この配列についても、西方太平洋のみならず、西方インド洋で採取されたもののみ報告されているものが含まれ

ていた。rRNA 配列を用いた分子分類は、形態だけでは区別ができない褐虫藻の分類にとって「違うものを見分ける」ための極めてパワフルなツールではあるが、「同じものを同種とする」ことに使えるかについての検証はない。塩基配列の特定の座位で 2 回置換が生じて同じ配列に戻る多重置換や配列解析に至る過程で生じる DNA の置換や読み間違い等の可能性がある。このような実験上の問題点を克服するためには、試料ごとに多数の増幅断片の塩基配列解析を行なうことが望まれるが、塩基配列分析にはコストがかかることから、多くの場合その実現は困難である。本研究で適用を試みた次世代シーケンサーは、1 分析で 10 万リードを解析することが可能であり、1 つの配列を知るためのコストは 2 円を切っている。このことから、造礁サンゴに共生する褐虫藻組成を知るために、次世代シーケンサーは非常にパワフルなツールであると考えられた。しかしながら、RFLP 分析で検出された Clade F の配列がほとんど検出されなかったことから、次世代シーケンサー解析における重要なステップである PCR アンプリコンの作成にかかる PCR 増幅について、より詳細な条件設定が必要であると考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ①久保田 賢、造礁サンゴに共生する褐虫藻のポピュレーションに関する解析の取り組み、NGS 現場の会第三回研究会、平成 25 年 9 月 4 日、神戸国際会議場 (神戸市)
- ②久保田 賢、目崎 拓真、次世代シーケンサーを用いた造礁サンゴに共生する褐虫藻の網羅的解析の試み、日本サンゴ礁学会第 15 回大会、平成 24 年 11 月 22 日、東京大学 (東京都)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 賢 (KUBOTA, Satoshi)

高知大学・教育研究部総合科学系・准教授

研究者番号 : 00314980