

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14479

研究課題名（和文）サンゴ種間での感染率の違いに着目したブラックバンド病大発生メカニズムの解明

研究課題名（英文）Research on the mechanisms of black band disease outbreak focusing on the difference in infection rate among coral species

研究代表者

高木 俊幸 (Takagi, Toshiyuki)

東京大学・大気海洋研究所・助教

研究者番号：00814526

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：サンゴ礁には全海洋生物の30%が生息しており、生物多様性の保全上、極めて重要な生態系である。しかし、地球規模での海水温上昇により、サンゴの免疫力が低下することや、病原細菌の毒性が強くなることで、病気が急増しサンゴ礁の減少を加速していることが報告されている。本研究は、BBDを構成する細菌の一つであることが報告されている病原細菌 *Vibrio coralliilyticus* を用いた感染実験をモデルケースとして設定し、RNA-Seqによる網羅的なトランスクリプトーム解析を実施し、*V. coralliilyticus* に対するサンゴ自然免疫応答の分子基盤を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

V. coralliilyticus に対するサンゴの免疫応答を明らかにするために、サンゴ礁を形成する代表的なサンゴである *Acropora digitifera* への感染実験とそのトランスクリプトーム解析を行った。*V. coralliilyticus* は BBD を構成することが報告されており、単独でもサンゴに対して病原性を示すことが知られている。本研究により、*V. coralliilyticus* を熱ストレス条件下でサンゴに感染させると、微生物感染を認識する受容体や細胞内シグナル伝達などのサンゴ自然免疫応答に関わる遺伝子の発現が抑制されることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Coral reefs only occupy 0.1% of the area of the sea but harbor approximately 30% of all marine species on the planet. Therefore, they are extremely important ecosystems for the conservation of biodiversity. However, many species of corals are on the verge of extinction because of increasing anthropogenic disturbances, including global warming. Rising sea surface temperature associated with global climate change is a serious threat to coral reefs and is linked to an increasing prevalence of infectious coral diseases. In this study, we carried out infection experiments using pathogenic bacterium *Vibrio coralliilyticus*, which has been reported to be a member of the black band disease community. To elucidate the mechanisms of coral immune response against *V. coralliilyticus*, we performed transcriptome analysis of the reef-building coral *Acropora digitifera* after bacterial challenge.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：サンゴ *Vibrio coralliilyticus* 自然免疫機構 トランスクリプトーム解析 免疫抑制

1. 研究開始当初の背景

サンゴ礁には全海洋生物の 30%が生息しており、生物多様性の保全上、極めて重要な生態系である。しかし、地球規模での海水温上昇により、サンゴの免疫力が低下することや、病原細菌の毒性が強くなることで、病気が急増しサンゴ礁の減少を加速していることが報告されている (Rosenberg et al. Nat Rev Microbiol, 2007)。その中でも感染してしまうと確実に死に至るブラックバンド病 (Black Band Disease; BBD) は、近年沖縄県を中心に毎年のように大発生を繰り返している。

BBD はシアノバクテリア、硫黄還元細菌、硫黄酸化細菌、従属栄養細菌などが集まって複雑な細菌叢 (BBD 細菌叢) を構築し、サンゴ組織上に特徴的な数ミリほどのブラックバンドを形成する。同心円状に進行し、1日当たり最大で 2cm 程度の速度でサンゴを侵食し、死滅させる。研究協力者である琉球大学・熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設の山城秀之教授のこれまでの観測により、同じ海域に多様なサンゴが生息しているにも関わらず、種類ごとに BBD 発生率が大きく異なることがわかっている。しかし、「なぜ BBD はコモンサンゴで大発生するのか」は明らかになっていない。また、太平洋全体では約 60 種類ものサンゴで感染が確認されており、今後沖縄県でも様々なサンゴへ感染拡大していくことが予測されている。そのためコモンサンゴに大発生が限定されている今のうちに、緊急対策を講じる必要がある。

研究開始当初においてはフィールドで BBD に感染したサンゴを採集し、サンゴ種間での BBD 感染率の比較とそのトランスクリプトーム解析を中心として研究を展開していく予定であった。しかし、サンゴの自然免疫機構がほとんど未解明であることが判明し、また新型コロナウイルス感染症の影響によりサンプリングポイントである沖縄県瀬底島への出張が困難な時期が継続したため、サンゴの病原細菌の中でも、単培養に成功しており、実験室内でも感染実験が容易に実施できる *Vibrio coralliilyticus* (以下「VC」と称する) を用いたココビミドリイシに対する感染実験とそのトランスクリプトーム解析を中心として研究を実施した。BBD は複雑な細菌叢によって構成されるサンゴの感染症であるが、一方で VC を用いたよりシンプルな感染実験の結果をトランスクリプトームにより解析することで、サンゴ自然免疫機構を詳細に明らかにすることができる。さらに、VC は BBD 細菌叢を構成する細菌の一つであることが報告されており、本菌が生産するプロテアーゼが BBD を進行促進する可能性が考えられている (Astsker et al. FEMS Microbiol Ecol, 2009)。

2. 研究の目的

BBD がサンゴで大発生する分子基盤を明らかにするために、サンゴ自然免疫機構の全容解明を試みる。本研究では、BBD 細菌叢を構成する細菌の一つであることが報告されている VC を用いた感染実験をモデルケースとして設定し、RNA-Seq による網羅的なトランスクリプトーム解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 蛍光標識した VC を用いたサンゴ初期ポリプへの感染実験

VC のサンゴへの感染経路を明らかにするために、蛍光顕微鏡によりバイオイメーキングを行った。赤色蛍光タンパク質 DsRed 発現プラスミドを Conjugation 法により VC へ導入し、蛍光標識した VC をココビミドリイシの初期ポリプに対して感染させた。

(2) RNA-Seq を用いた VC 感染に対するサンゴ免疫応答の解析

VC 感染に対するサンゴの免疫応答を明らかにするために、サンゴ礁を形成する代表的なサンゴであるココビミドリイシ (*Acropora digitifera*) への感染実験とそのトランスクリプトーム解析を行った。VC 感染前後のココビミドリイシから抽出した全 RNA を用いてライブラリ調製したのち、次世代シーケンサー Illumina HiSeq4000 によって RNA-Seq 解析を行った。RNA-Seq 解析用の Kallisto-Sleuth パイプラインにより参照ゲノム配列へのマッピングおよび統計解析後、VC 感染時に発現変動した免疫応答遺伝子群を特定した。

(3) 発現変動遺伝子の GO エンリッチメント解析

発現変動遺伝子数が 1000 を超えていた VC 感染 30 分後、60 分後の両条件において、サンゴが VC 感染に対してどのような遺伝子発現応答をしていたかを生物学的に解釈するために、機能解析ウェブツール DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) を用いた Gene ontology (GO) エンリッチメント解析を行った。解析には、GO Biological Process (GO-BP) および GO Cellular Component (GO-CC) を選択した。

4. 研究成果

(1) 蛍光標識した VC を用いたサンゴ初期ポリプへの感染実験

VC のサンゴへの感染経路を明らかにするために、蛍光顕微鏡によりバイオイメーキングを行った。蛍光標識した VC をココビミドリイシの初期ポリプに対して感染させることで、感染過程をリアルタイムに観察することに成功した。VC は主に、初期ポリプの口周辺に集まった後、胃

腔内に侵入していく様子が観察された。また、サンゴポリプへ接着し、表面に張り付く VC も観察された。本実験は、当初の研究計画には含まれていなかったが、VC のサンゴへの感染機構が全くわかっていなかったため行なった。VC のサンゴへの感染をリアルタイムで動画撮影に成功したのは、本研究が世界で初めてである。

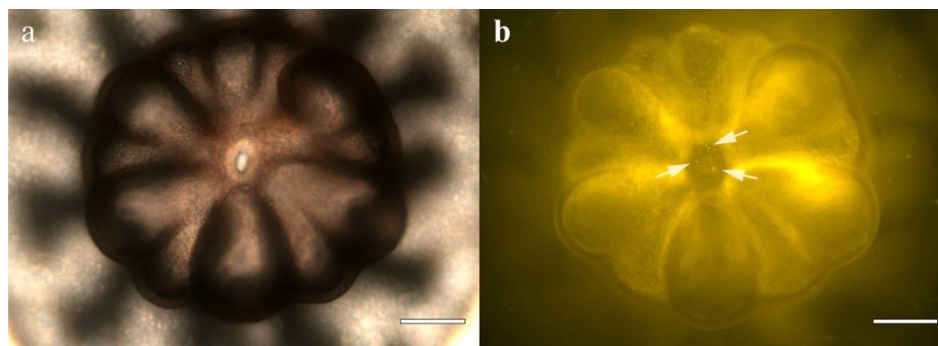


図1 蛍光顕微鏡を用いた VC 感染の観察 (a) DIC イメージ (b) サンゴ初期ポリプ及び DsRed ラベルした VC の蛍光イメージング
矢印はサンゴ初期ポリプの口付近に集まる VC を示している。

(2) RNA-Seq を用いた VC 感染に対するサンゴ免疫応答の解析

VC 感染 5 分後、30 分後、60 分後、180 分後の各条件において発現変動した遺伝子を抽出した。感染 30 分後においては 1960 遺伝子、60 分後においては 2061 遺伝子の発現変動を確認した (図 2)。一方で、感染 5 分後および 180 分後においては、遺伝子発現の変動がほとんど確認されなかった (5 分後は 69 遺伝子のみ、180 分後は 1 遺伝子のみ)。

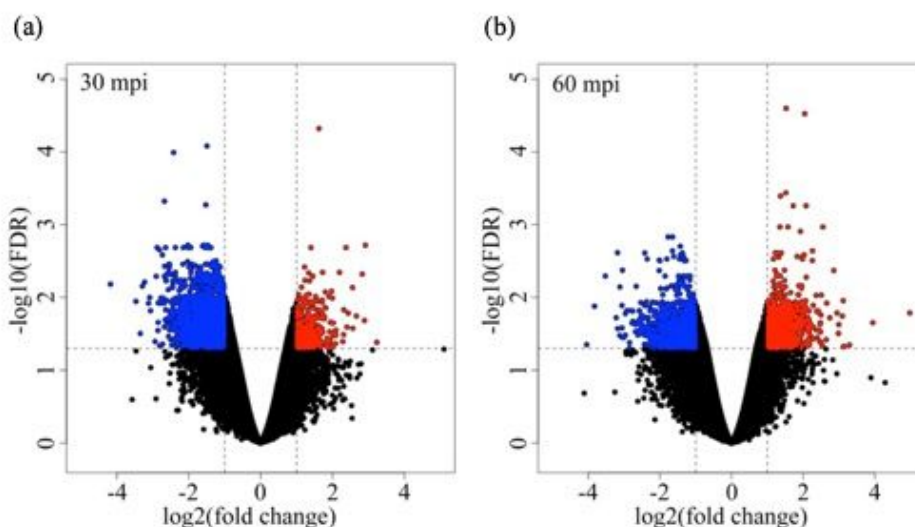


図2 VC 感染後の遺伝子発現変動 (a) 30 分後 (b) 60 分後
赤字は発現量が上昇した遺伝子、青字は発現量が低下した遺伝子を示している。

(3) 発現変動遺伝子の GO エンリッチメント解析

次に発現変動遺伝子数が 1000 を超えていた VC 感染 30 分後、60 分後の両条件において、サンゴが VC 感染に対してどのような遺伝子発現応答をしていたかを生物学的に解釈するために、機能解析ウェブツール DAVID を用いた Gene ontology (GO) エンリッチメント解析を行った。

感染 30 分後に発現上昇した遺伝子群は、4 GO-BP タームおよび 7 GO-CC タームにエンリッチメントされた (表 1)。一方で、発現低下した遺伝子群は、73 GO-BP タームおよび 48 GO-CC タームにエンリッチメントされていた。感染 60 分後に発現上昇した遺伝子群は、5 GO-BP タームおよび 14 GO-CC タームにエンリッチメントされた。発現低下した遺伝子群は、36 GO-BP タームおよび 16 GO-CC タームにエンリッチメントされていた。

アップレギュレーションされた GO カテゴリには、感染 30 分後および 60 分後に共通してタンパク質翻訳に関連する GO ターム (“translation” [GO:0006412], “cytoplasmic translation” [GO:0002181], “cytosolic large ribosomal subunit” [GO:0022625], “ribosome” [GO:0005840], “cytosolic small ribosomal subunit” [GO:0022627]) が多く含まれていた (表 1)。さらに感染 60 分後には GO-BP において “proteolysis involved in cellular protein catabolic process” [GO:0051603] がエンリッチメントされていたことからサンゴは VC 感染に応答してタンパク質の新規合成や代謝を亢進していると考えられた。

VC 感染は様々な分子機能に関連する GO タームにおいてネガティブな影響 (発現低下) をサンゴに与えていた。感染 60 分後において発現低下した遺伝子群は、GO-BP ターム “innate immune

response” [GO:0045087]にエンリッチメントされていたことから、サンゴの自然免疫応答を抑制していると考えられた。エンリッチメントされた“innate immune response” [GO:0045087]には、Toll-like receptorやNod-like receptorなどの微生物感染を認識する受容体の遺伝子が含まれていた。さらにMyeloid differentiation primary response protein (MyD88)などの微生物感染を核内へ情報伝達するシグナリングパスウェイに関わる遺伝子も含まれていた。自然免疫機構は「病原細菌の認識」、「細胞内シグナル伝達」、「抗菌ペプチド生産などの免疫応答」の三つの段階に分けることができる。本解析結果はVC感染が の段階に関わる遺伝子の発現を抑制することを示していた。これらの結果は、高水温になる夏場にサンゴの病気が急増することと深く関わっていると考えられた。この研究費助成事業で得られた成果を基にして、自然免疫機構における主要なエフェクターであり、サンゴにおいてはほとんど研究例が存在しない抗菌ペプチドの特定や、感染症などの病気を予防するためのプロバイオティクス開発などへ研究を展開していく予定である。

表1 アップレギュレーションされたGOカテゴリー

	アノテーションターム	GO ID	遺伝子数	Fold Enrichment
アップレギュレーションされたGO-BP (感染30分後)				
	Translation	GO:0006412	21	7.29
	G-protein coupled receptor signaling pathway	GO:0007186	8	2.42
	Cytoplasmic translation	GO:0002181	5	14.18
	Neuropeptide signaling pathway	GO:0007218	5	6.54
アップレギュレーションされたGO-CC (感染30分後)				
	Integral component of membrane	GO:0016021	68	1.51
	Extracellular exosome	GO:0070062	40	1.84
	Integral component of plasma membrane	GO:0005887	24	2.31
	Cytosolic large ribosomal subunit	GO:0022625	12	19.14
	Ribosome	GO:0005840	11	7.25
	Cytosolic small ribosomal subunit	GO:0022627	7	20.36
	Extracellular matrix	GO:0031012	7	2.77
アップレギュレーションされたGO-BP (感染60分後)				
	Translation	GO:0006412	45	6.14
	Oxidation-reduction process	GO:0055114	27	1.51
	Cytoplasmic translation	GO:0002181	9	10.40
	Cholesterol metabolic process	GO:0008203	7	3.52
	Proteolysis involved in cellular protein catabolic process	GO:0051603	6	3.57
アップレギュレーションされたGO-CC (感染60分後)				
	Extracellular exosome	GO:0070062	83	1.52
	Mitochondrion	GO:0005739	62	1.51
	Extracellular region	GO:0005576	34	1.52
	Endoplasmic reticulum membrane	GO:0005789	33	1.53
	Ribosome	GO:0005840	29	7.72
	Mitochondrial inner membrane	GO:0005743	29	2.49
	Cytosolic large ribosomal subunit	GO:0022625	18	11.81
	Extracellular matrix	GO:0031012	13	2.06
	Cytosolic small ribosomal subunit	GO:0022627	12	15.75
	Endoplasmic reticulum lumen	GO:0005788	10	2.34
	Myelin sheath	GO:0043209	9	2.36
	Mitochondrial respiratory chain complex I	GO:0005747	8	8.75
	Collagen trimer	GO:0005581	7	2.93
	Organelle membrane	GO:0031090	6	3.19

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Motone Keisuke, Takagi Toshiyuki, Aburaya Shunsuke, Miura Natsuko, Aoki Wataru, Ueda Mitsuyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 A Zeaxanthin-Producing Bacterium Isolated from the Algal Phycosphere Protects Coral Endosymbionts from Environmental Stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.01019-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kitamura Ruriko, Miura Natsuko, Okada Keiko, Motone Keisuke, Takagi Toshiyuki, Ueda Mitsuyoshi, Kataoka Michihiko	4. 巻 84
2. 論文標題 Design of novel primer sets for easy detection of Ruegeria species from seawater	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 854~864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1700776	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 -
1. 著者名 Miura Natsuko, Motone Keisuke, Takagi Toshiyuki, Aburaya Shunsuke, Watanabe Sho, Aoki Wataru, Ueda Mitsuyoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Ruegeria sp. Strains Isolated from the Reef-Building Coral <i>Galaxea fascicularis</i> Inhibit Growth of the Temperature-Dependent Pathogen <i>Vibrio coralliilyticus</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Marine Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10126-018-9853-1	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 -
1. 著者名 Toshiyuki Takagi, Yuki Yoshioka, Yuna Zayasu, Noriyuki Satoh, Chuya Shinzato	4. 巻 22
2. 論文標題 Transcriptome Analyses of Immune System Behaviors in Primary Polyp of Coral <i>Acropora digitifera</i> Exposed to the Bacterial Pathogen <i>Vibrio coralliilyticus</i> under Thermal Loading	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Biotechnology	6. 最初と最後の頁 748-759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10126-020-09984-1	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Toshiyuki Takagi, Yuki Yoshioka, Yuna Zayasu, Noriyuki Satoh, Chuya Shinzato
2. 発表標題 Transcriptome analysis of innate immunity in the coral <i>Acropora digitifera</i> exposed to the bacterial pathogen <i>Vibrio coralliilyticus</i> under thermal stress
3. 学会等名 Joint Conference of the 12th International Marine Biotechnology Conference and the 12th Asia Pacific Marine Biotechnology Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiyuki Takagi, Yuki Yoshioka, Yoshikazu Ohno, Yuna Zayasu, Noriyuki Satoh, Chuya Shinzato
2. 発表標題 Transcriptome analysis of immune response in the coral <i>Acropora digitifera</i> against infection of pathogenic bacterium <i>Vibrio coralliilyticus</i>
3. 学会等名 2018 JSME annual meeting & 10th ASME (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高木俊幸, 善岡祐輝, 座安佑奈, 佐藤矩行, 新里宙也
2. 発表標題 RNA-Seqを用いた病原細菌 <i>Vibrio coralliilyticus</i> 感染に対するサンゴ免疫応答の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北村瑠璃子, 三浦 夏子, 岡田圭以子, 元根啓佑, 高木俊幸, 植田充美, 片岡道彦
2. 発表標題 サンゴに共生する <i>Ruegeria</i> 属細菌の分布調査を目的とした新規プライマーの設計
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦 夏子, 岡田圭以子, 元根啓佑, 北村瑠璃子, 高木俊幸, 植田充美, 片岡道彦
2. 発表標題 アザミサンゴ <i>Galaxea fascicularis</i> から単離した <i>Ruegeria</i> 属細菌の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019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
研究協力者	山城 秀之 (Yamashiro Hideyuki) (80341676)	琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授	

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
---------	---------