

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03026

研究課題名(和文) サンゴ-褐虫藻共生成立・不成立に関わる遺伝子発現ネットワーク情報の構築

研究課題名(英文) Construction of gene expression network information related to coral-zooxanthellae symbiosis establishment/ breakdown

研究代表者

湯山 育子 (Yuyama, Ikuko)

山口大学・大学研究推進機構・助教

研究者番号：80565995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,700,000円

研究成果の概要(和文)：サンゴと褐虫藻の共生成立過程で発現変動する遺伝子とタンパク質の同定をおこない、褐虫藻の共生の進行によってサンゴ体内で起きる主な現象を明らかにすることを試みた。その結果、脂質代謝に関わるタンパク質やER膜タンパク質、ATP合成に関するタンパク質が、褐虫藻の共生に伴い、発現が増加するタンパク質として同定された。加えてサンゴの白化現象に関連するサンゴ-褐虫藻遺伝子の同定を行い論文としてまとめた。また、RNAiにより共生関連遺伝子のノックダウンを行い、共生時に特異的な発現応答をする一部の遺伝子が共生の進行に影響を与えることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サンゴ-褐虫藻の共生関連遺伝子や白化関連遺伝子の応答は進んでいるものの、情報量が多く共生や白化に主に関わる分子の同定には至っていなかった。本研究でプロテオーム解析やRNAiにより、共生時の主な変化や共生に影響する遺伝子の特定を行うことができ、今後の研究を進める上でのターゲット遺伝子を明確にできた。共生をコントロールする遺伝子の同定はサンゴ-褐虫藻以外にも他の細胞内共生系の解明にも関わる。また解析結果の詳細を調べる過程で、細胞内共生時に起きる主な生理学的応答を調べることができ、共生時の宿主の詳細な応答を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：We identified the genes and proteins whose expression changes during the symbiotic process of coral and zooxanthellae, and attempted to clarify the main phenomena occurring in the corals as the symbiosis progresses. As a result, proteins related to lipid metabolism, ER membrane proteins, and proteins related to ATP synthesis were identified as proteins whose expression increased with the symbiosis establishment. A part of these genes were used for gene knockdown experiment by RNAi, and clarified that some symbiotically up-regulated genes affect the progress of symbiosis. In addition, we investigated genes related to coral bleaching, and summarize them in a paper.

研究分野：Molecular marine biology

キーワード：coral Symbiodiniaceae symbiosis coral bleaching RNAi stress response proteomics transcriptome

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

サンゴの粘液は様々な生物の餌となり、サンゴ礁は稚魚や多様な生物の生息の場にもなる。また、サンゴ礁の観光利用価値は年間 2399 億円と見積もられており、水産資源確保や観光資源の面から重要な生態系といえる。サンゴ礁は単位面積当たりの生態系サービスとしての価値がすべての生態系の中で最高額の生態系である。一方で、サンゴは地球温暖化の影響を受けやすく、海水温が上昇すると白化現象を起こし、死滅することが問題になる。サンゴの生存の鍵となるのは、サンゴ細胞内に共生する褐虫藻である。サンゴは褐虫藻の光合成産物を利用するため、高水温によるストレスで体内の褐虫藻が減少するとサンゴは白化・衰弱して死亡する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「共生・白化に直結する遺伝子の同定と、それらを取り巻く遺伝子発現ネットワークの構築」とする。共生成立・白化に関わる分子プロセスを明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

実験 1) 共生成立、白化過程で変動するタンパク質、遺伝子の同定

1. ミドリイシ属のサンゴの幼生を人工的に変態させ、褐虫藻が共生していない成長初期のポリプを調整する。
2. 培養褐虫藻をサンゴに共生させ、数日おきに固定し、プロテオミクス解析に用いる。コントロール処理群として褐虫藻を共生させないサンゴを使い、コントロールと比較して優位に発現変動しているタンパク質を同定する。

実験 2) 共生成立に関わる遺伝子のノックダウン(RNAi)

1. 実験 1 で同定されたタンパク質をコードする遺伝子や過去 RNA-seq により同定された遺伝子の中から特に、サンゴ内の褐虫藻の数と正の相関を示す遺伝子をターゲットにし、siRNA(21-23 塩基対から成る低分子二本鎖 RNA)を合成する。  
siRNA を成長初期のサンゴに導入しターゲット遺伝子のノックダウン(RNAi)処理を行う。
2. サンゴに RNAi 処理を行った後、褐虫藻を共生させ、サンゴ内部の褐虫藻の増加率への影響を調べる。これにより、増加率を優位に減少させる、すなわち共生成立に影響すると考えられる遺伝子を同定する。
3. ターゲット遺伝子の発現が低下しているか否かの確認を、定量 PCR により行う。

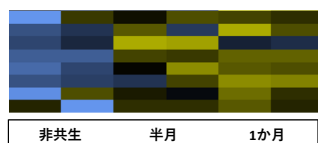
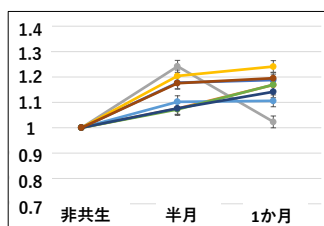
実験 3) 共生に関連するタンパク質、遺伝子の共発現ネットワーク解析の検討

- 実験 1,2 の結果で得たタンパク質や遺伝子と協調して発現変動する遺伝子群を検出し、共生・白化に関わる遺伝子発現のネットワークを作る。
1. 実験 1 実験 2 で同定した遺伝子、タンパク質と相関して発現変動する遺伝子群を、これまでの共生・白化時の RNA-seq データ から検出。

実験 4) 共生に関連する現象を上記結果から推定。特に共生に伴う資質や消化応答変化を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

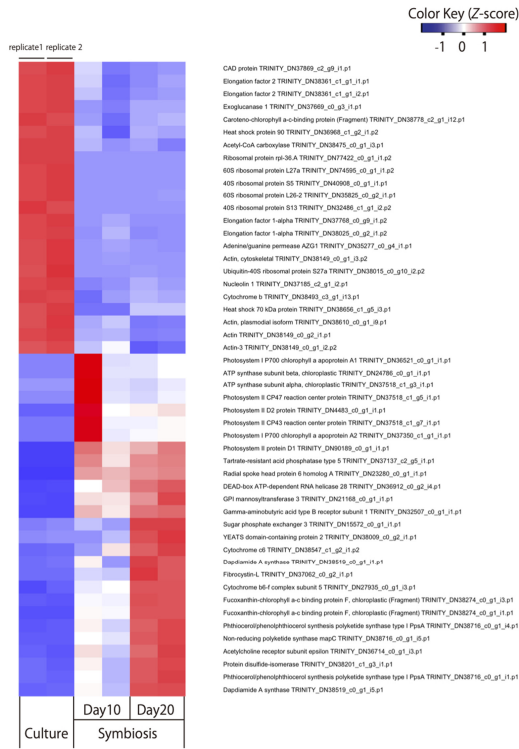
共生成立過程で発現変動するサンゴと褐虫藻の遺伝子とタンパク質の同定を行なった(下図)。Clade Dタイプの褐虫藻が共生したサンゴにおいて、共生開始から半月後、1ヶ月後のタンパク質をSWATH acquisition 解析システムにより解析した。また同様のサンゴを用い、RNA-seq解析



Ras-related protein ORAB-1  
Reticulon-1  
Actin, cytoplasmic  
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial  
NA  
Pancreatic triacylglycerol lipase  
NA  
Myosin regulatory light chain 12A

ER膜タンパク質  
細胞質アクチン  
ATP合成酵素αサブユニット  
トリアシルグリセロールリパーゼ  
ミオシン軽鎖

を実施した。その結果、脂質代謝に関わるタンパク質やER膜タンパク質、ATP合成に関するタンパク質が、褐虫藻の共生に伴い、発現が増加するタンパク質として同定された。また、緑色蛍光タンパク質、小胞のPH調整に関連するタンパク質、ヘキソサミン合成系に関

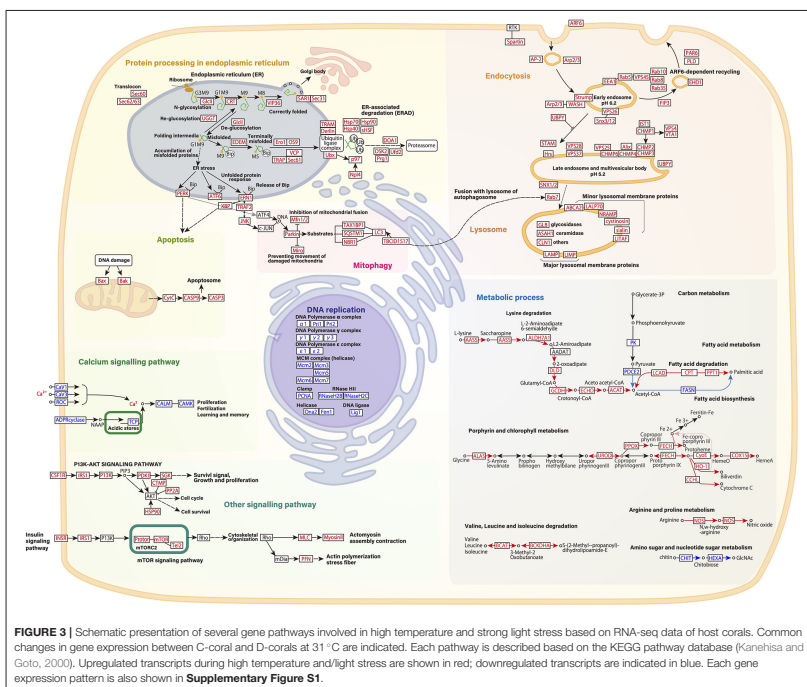


**Figure 1** Heat map of RNA-seq analysis for 50 selected genes showing different gene expression pattern in free-living and symbiotic *Durusdinium* at 10 and 20 days post-inoculation ( $n = 2$ ). Among the 1214 DEGs shown in Figure S1, the 50 genes with the lowest false discovery rate are summarized in the heatmap.

合成に関わるエネルギーを縮小させる傾向になることを示唆している。

また、抗菌剤合成に関わる蛋白質 (Dapdiamide A synthase) が共生時に発現上昇していることがわかった。配列を同定し、系統解析を実施したところ、このタンパク質は原核生物由来のものであり、特定の褐虫藻タイプのみが有する可能性が示唆された。また、このDapdiamide A合成系を持つ褐虫藻は特に共生時にDapdiamide Aの合成を行い、ストレス抵抗性を持つ可能性が示唆された。

また、サンゴを高温・強光ストレスに暴露し、人工的に白化させた際のサンゴと褐虫藻の遺伝子発現応答を調べ、論文としてまとめた(下図)。遺伝子発現変化を見ると、ERストレスに関連するタンパク質がサンゴで多く発現変化しており、ERストレスがアポトーシスを誘発し、サンゴの白化現象を起こしている可能性が示唆された。



また、褐虫藻の遺伝子発現応答を調べたところ、タンパク質の修復に関わる **heat shock protein**、光合成系のタンパク質が発現変動していた。これらの遺伝子発現変動は共生する褐虫藻のタイプにより異なり、ストレス耐性のある褐虫藻では光合成系のタンパク質の多くが発現低下し、**heat shock protein**の一部が発現上昇する。一方で、ストレス耐性の低い褐虫藻では一部のタンパク質が発現低下し、**shat shock protein**は発現低下する傾向が検出された。

共生に関連する遺伝子としてlectin関連タンパク質やGFPに着目し、複数のLectin関連遺伝子のノックダウンを行い、褐虫藻共生への影響を調べた。GFPをターゲットにリポフェクション法による遺伝子ノックダウンの検討をまず行なったところ、変態直後のサンゴにおいてGFPの遺伝子発現低下とGFPの発色の変化が見られた。そこで、interlectin, lectinをターゲットに遺伝子ノックダウンを行なったところ、各遺伝子の発現低下が確認され、さらに共生の促進、もしくは遅延が観察された。このことから、lectinやlectin関連タンパク質の一部が共生をもともと阻害する作用があることがわかった。

これまでのタンパク質発現や遺伝子発現の結果から、共生時にサンゴの脂質代謝が上がることが確認されており、さらにサンゴの消化酵素が発現変動することがわかっている。そのため、共生時のサンゴの脂質や消化酵素について調べ、共生に伴うサンゴ側の変化を明らかにすることを試みた。その結果褐虫藻が共生したサンゴ細胞では褐虫藻由来と見られる油滴が確認され、共生時に褐虫藻から多くの油滴が得られていることがわかった。また、共生の初期にはサンゴの消化酵素活性が検出されることがわかり、この消化応答は安定した共生関係が維持される場合のみ強く検出された。このことからこうした消化応答が共生関係が成立する初期において重要であることがわかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 4件）

1. 著者名 Yuyama Ikuko, Ugawa Naoto, Hashimoto Tetsuo	4. 巻 9
2. 論文標題 Transcriptome Analysis of Durusdinium Associated with the Transition from Free-Living to Symbiotic	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1560 ~ 1560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms9081560	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 Yuyama Ikuko, Higuchi Tomihiko, Hidaka Michio	4. 巻 8
2. 論文標題 Application of RNA Interference Technology to Acroporid Juvenile Corals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Marine Science	6. 最初と最後の頁 688876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmars.2021.688876	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 Yuyama Ikuko, Higuchi Tomihiko, Mezaki Takuma, Tashiro Hisako, Ikeo Kazuho	4. 巻 13
2. 論文標題 Metatranscriptomic Analysis of Corals Inoculated With Tolerant and Non-Tolerant Symbiont Exposed to High Temperature and Light Stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 806171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2022.806171	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 Ikuko Yuyama, Tomihiko Higuchi	4. 巻 e7241
2. 論文標題 Differential gene expression in skeletal organic matrix proteins of scleractinian corals associated with mixed aragonite/calcite skeletons under low mMg/Ca conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PeerJ	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) 10.7717/peerj.7241	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 湯山 育子	4. 巻 4
2. 論文標題 サンゴ-褐虫藻の共生関係/サンゴの白化現象の解明を目指した研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物の科学 遺伝	6. 最初と最後の頁 426-423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 湯山育子
2. 発表標題 褐虫藻に秘められたサンゴ-褐虫藻共生の仕組み
3. 学会等名 原生生物・寄生虫・進化セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湯山育子, 樋口富彦, 日高道雄
2. 発表標題 造礁性サンゴにおける遺伝子ノックダウン技術の確立と応用
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神保充, 神谷直輝, 湯山育子, 山下洋, 鈴木豪, 波利井佐紀, 天野春菜, 安元剛
2. 発表標題 サンゴのレクチンAtTL-2 は, 褐虫藻の細胞内への貪食に関与している
3. 学会等名 水産学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湯山育子、宇川 尚登、橋本 哲男
2. 発表標題 サンゴに共生する褐虫藻は、サンゴ内でどのように変化するのか
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 湯山育子、宇川 尚登、橋本 哲男
2. 発表標題 RNA - seq データが示す共生状態への移行に伴う褐虫藻の変化 - 光合成・アンモニア 利用効率UP -
3. 学会等名 日本原生生物学会第52会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神保 充、湯山 育子、山下洋、鈴木豪、波利井佐紀、服田昌之、新里宙也、天野春菜、安元剛
2. 発表標題 RNAi による <i>Acropora tenuis</i> レクチン遺伝子の発現抑制と褐虫藻獲得
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第22回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 湯山育子
2. 発表標題 サンゴと褐虫藻の共生関係を褐虫藻の増減からとらえる
3. 学会等名 共生起源研究
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 分担者	神保 充  (Jimbo Mitsuru)  (10291650)	北里大学・海洋生命科学部・教授   (32607)	
研究 分担者	橋本 哲男  (Hashimoto Tetsuo)  (50208451)	筑波大学・生命環境系・教授   (12102)	

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