

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15871

研究課題名（和文）新規サンゴ共生藻遺伝子操作技術の確立と共生関連遺伝子の機能解析

研究課題名（英文）Establishment of coral symbiotic algae transformation technology and functional analysis of symbiosis-related genes

研究代表者

石井 悠（Ishii, Yuu）

京都大学・農学研究科・特別研究員（RPD）

研究者番号：40770813

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）：単細胞藻類である褐虫藻は、サンゴなどの刺胞動物と細胞内共生し、この共生関係は環境変動により変化する。この共生関係の分子メカニズム解明では、褐虫藻の遺伝子操作技術が未確立であることが解析の障壁となっている。本研究では、再現性が高い褐虫藻の遺伝子導入法の確立と、共生に関わる候補遺伝子を探索と機能解析を目的とした。遺伝子導入法の検討では、遺伝子導入機器であるNEPAによる導入効率の高い条件を決定することに成功した。共生に関わる候補遺伝子を探索と機能解析では、デンプン合成酵素が共生性の進化に関わっており、細胞内でのデンプン合成酵素の局在変化が共生性の進化に関わった可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、熱帯・亜熱帯海域の生態系を一次生産者として支える、刺胞動物と褐虫藻の細胞内共生の分子メカニズム解明のために必要な、褐虫藻の再現性の高い遺伝子導入法開発を大きく前進させることができた。さらに、共生に関わる候補遺伝子を特定し、その機能を推定できたことから、刺胞動物と褐虫藻の共生関係がどのように進化してきたのかを明らかにする手がかりが得られた。これらのことは、地球温暖化や海洋酸性化といった環境問題に対して、共生の崩壊（いわゆるサンゴの白化現象）にどのように対処することができるか、といった応用研究の基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Symbiodiniaceae, unicellular algae, construct endosymbiosis with corals and other cnidarians, and this symbiotic relationship changes with environmental changes. To understand the molecular mechanisms of this symbiotic relationship, the lack of established genetic engineering techniques for Symbiodiniaceae is a barrier to analysis. In this study, I aimed to establish a highly reproducible gene transformation method for Symbiodiniaceae, search for candidate genes involved in symbiosis, and analyze their molecular functions. In examining the gene transfer method, I determined the conditions for high transfer efficiency by the gene transfer equipment, NEPA. The search for candidate genes involved in symbiosis and functional analysis suggested that starch synthase was involved in the evolution of symbiosis, and that changes in the localization of starch synthase in cytoplasm might have been involved in the evolution of symbiosis.

研究分野：進化生態学

キーワード：褐虫藻 細胞内共生 進化 遺伝子導入 サンゴ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

単細胞藻類である褐虫藻は、サンゴやイソギンチャクなどの刺胞動物と細胞内共生し、この共生関係は環境変動により変化する (Hughes et al., 2017)。褐虫藻と刺胞動物の共生は褐虫藻が光合成産物を、刺胞動物がすみかや無機塩類を提供し合う相利共生の一つとされており (Trench, 1993) 共生が成立した状態で褐虫藻から刺胞動物へ渡される光合成産物について多くの研究がなされてきた (Burriesci et al., 2012)。しかし、共生の成立や崩壊といった共生の状態自体を決定する褐虫藻と刺胞動物の間の相互作用は学術的に重要であるにもかかわらず、そのような相互作用については研究が進んでいない。

これまで我々は共生の状態を人為的に操作可能な褐虫藻とセイタカイソギンチャクの共生モデル系を用いて、共生の状態を決定する分子メカニズムの探索に取り組んできた。共生不可能な高温条件と共生の有無条件を設定し、高温による白化プロセスを考慮してデータ解析を行うことで、温度変化と共生状態変化に起因する遺伝子の発現変動を区別し、共生に重要な白化時誘導・抑制遺伝子を 123 個検出した。褐虫藻ではゴルジ体の糖タンパク質合成が、セイタカイソギンチャクではリソソームでの糖類の分解酵素・輸送体が検出されたことから、褐虫藻の細胞表面に存在する糖タンパク質の代謝を介した宿主と褐虫藻の相互作用が共生の状態が決定する「共生シグナル」として働く可能性を示した (Ishii et al., 2019)。

2. 研究の目的

本研究はこれまでの研究から示唆された、共生の状態を決定する共生シグナルを *in vivo* での機能解析するため褐虫藻の遺伝子導入法を確立すること、さらに共生に関わる候補遺伝子を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

遺伝子導入条件の検討

共生関係の分子メカニズムを解明する上で、褐虫藻・宿主共に遺伝子操作技術の確立が重要であるが未だ実現されていない。褐虫藻の遺伝子導入法は過去に 2 つのグループから報告 (ten Lohuis & Miller, 1998; Ortiz-Matamoros et al., 2015) があるが、実験の再現性が得られていないこと、遺伝子導入した細胞が増殖できないことなどから遺伝子の機能解析まで至っていない。そこで、再現性の高い遺伝子導入条件の開発を行うこととした。遺伝子導入条件を確立するためには、遺伝子導入成功個体の表現型がわかりやすい遺伝子をマーカーとして用いることで効率的に検討できるが、褐虫藻は微細藻類であるため目視による遺伝子導入成功個体の単離が困難である。我々はこれまでにプレート培養による薬剤スクリーニングでウラシル合成酵素 (URA3) が機能しない自然変異株を単離することに成功した (Ishii et al., 2018)。同様の薬剤スクリーニングを URA3 遺伝子の CRISPR/Cas9 によるゲノム編集に応用することで、URA3 遺伝子をマーカー遺伝子として効率的に遺伝子導入法を検討した。また、研究期間の途中でドイツのグループから新たに遺伝子導入に成功した (Gronik et al., 2022) と発表されたため、そこで使用された GFP の発現ベクターを入手し、遺伝子導入条件の検討に使用した。

宿主との共生能に関わる遺伝子の探索

褐虫藻の多くは共生能力が高く、単細胞から多細胞生物まで多くの生物と細胞内外で共生す

る (Mies et al., 2017)。そのため、共生性の褐虫藻とその他の単細胞藻類の比較ゲノム解析により、高い共生能力を実現する遺伝的基盤を明らかにする研究がなされてきた (Aranda et al., 2016)。一方、褐虫藻内に着目すると、共生・非共生性の褐虫藻が混在し (González-Pech et al., 2021)、多様性が維持されている。申請者はこれまで着目されなかった、褐虫藻の共生・非共生性の多様性に着目し、属内で共生性が進化する上で自然選択を受けた遺伝子を、枝サイトモデルを用いて検出した。

4. 研究成果

遺伝子導入条件の検討

CRISPR/Cas9 による褐虫藻のゲノム編集では、遺伝子配列情報を得て、オフターゲット効果を防ぐために、遺伝子導入に使用する株のゲノム配列情報を、新学術領域研究「学術研究支援基盤形成」の「先進ゲノム支援」の課題として実施していただいた。得られたデータからゲノムサイズと配列の構築を行った。得られた配列情報を用いて、CRISPR/Cas9 に使用するガイド RNA の配列を決定した。合成 Cas9 タンパク質とガイド RNA を遺伝子導入装置である NEPAgene を用いて導入した。16 の遺伝子導入条件を試し、その結果成功候補として 464 コロニーを得た。遺伝子導入成功個体であるかを簡便に確認するため、MultiNA を用いたヘテロ二本鎖移動度分析による成功個体の判別法を開発し、応用した。さらに、Gronik et al., 2022 で報告された褐虫藻の GFP 発現ベクターを入手し、先行研究とは異なる遺伝子導入機器である NEPAgene による遺伝子導入方法の検討を行った。CRISPR/Cas9 タンパク質とガイド RNA を用いた導入条件の安定性の検討結果と、GFP 発現ベクターを用いた導入個体のフローサイトメーターを用いた成功個体の割合を算出することで、導入効率の高い条件を決定することに成功した。本結果は、褐虫藻の遺伝子機能解析方法の確立に応用される。

宿主との共生能に関わる遺伝子の探索

褐虫藻の中でも共生種と非共生種が混在する系統である Symbiodinium 属のゲノム配列を用いて、共生性が進化する過程で自然選択を受けた遺伝子の探索を行った (図 1)。その結果 35 遺伝子を検出し、その中にはデンブン合成酵素やコレステロール輸送体、ステロール糖転移酵素

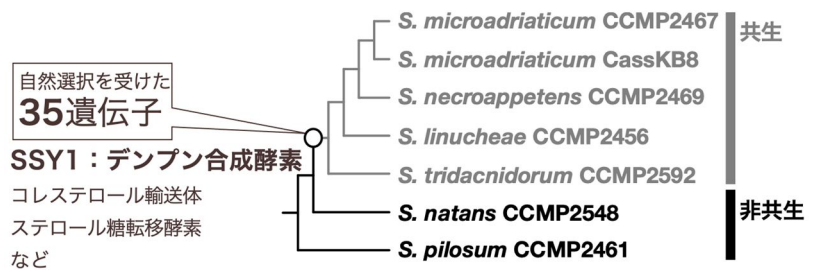


図 1 共生・非共生褐虫藻の種間で自然選択を受けた遺伝子

ル糖転移酵素が含まれた。中でもデンブン合成酵素遺伝子に着目し、関連する表現型解析と立体構造解析を行った。デンブンの鎖長解析、顆粒サイズの測定、デンブン量の測定を行ったところ、共生・非共生種で大きな差は見られなかった。一方立体構造解析では、天然変性領域に自然選択を受けたアミノ酸サイトが多いことが明らかになった。天然変性領域は細胞質内の液-液層分離に関わることから、細胞内でのデンブン合成酵素の局在変化が共生性の進化に関わった可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井悠
2. 発表標題 共生のトレードオフ-糖代謝からみる刺胞動物と褐虫藻の細胞内共生
3. 学会等名 第39回 原生成物・寄生虫・進化セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井悠、金森駿介、出口竜作、河田雅圭、丸山真一郎
2. 発表標題 褐虫藻が共生様式を進化させる過程で選択を受けた遺伝子の解析
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井悠、金森駿介、出口竜作、河田雅圭、丸山真一郎
2. 発表標題 褐虫藻の共生様式の違いを生み出す遺伝要因と表現型との関係
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石井悠、金森駿介、出口竜作、河田雅圭、丸山真一郎、吉田天士、神川龍馬
2. 発表標題 サンゴ共生藻の光合成産物の資源分配を介した生活スタイルの多様化
3. 学会等名 日本共生生物学会第7回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石井悠、金森駿介、出口竜作、河田雅圭、丸山真一郎、吉田天土、神川龍馬
2. 発表標題 褐虫藻の生活様式が進化する過程で変化した栄養代謝系の多様化メカニズム
3. 学会等名 日本藻類学会第48回大会
4. 発表年 2024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

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