

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650087

研究課題名(和文) イソギンチャク-褐虫藻共生実験系の確立：サンゴ共生のモデル化を目指して

研究課題名(英文) Development of methodologies to study Aiptasia-Symbiodinium symbiosis

## 研究代表者

上野 直人 (UENO, Naoto)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・教授

研究者番号：40221105

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)：イソギンチャクと褐虫藻の共生のメカニズムを解明するために、それらへの遺伝子導入法の確立を目指した。セイタカイソギンチャクの育成条件(成熟度、光周期)を調整することなどにより放卵放精を人為的に誘導することが可能となった。この放出された卵へDNAコンストラクトの注入を試みたが、その後、発生が進まず死滅してしまった為、遺伝子導入の成否を確認することができなかった。一方で、エレクトロポレーション法においては、イソギンチャク個体全体を覆う粘液を取り除き、同時に、麻酔状態にして遺伝子導入を行った。至適導入条件(緩衝液、電圧、電気容量)を検討し進めたが、残念ながら今のところポジティブな結果を得られていない。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish a method of gene transfer to Aiptasia to elucidate the symbiotic mechanisms of Aiptasia-Symbiodinium. It has become possible to artificially induce spawning by adjusting the growth condition (maturity, photoperiod, etc.) of Aiptasia. We tried to inject DNA construct into the eggs. However, the development of eggs did not proceed after injection. This may be attributed to either that the eggs received a strong damage during injection or that the injected unfertilized egg could not be fertilized after injection. Therefore we could not confirm the success of the gene transfer. On the other hand, we also tried the transfection by electroporation. We first removed the mucus that covers the whole of Aiptasia with bromhexine hydrochloride and anesthetize it with magnesium chloride. We also examined an optimal condition (buffer solution, the voltage, electric capacity, etc.) of the DNA introduction and after all, we have not obtained a positive result so far.

研究分野：発生生物学

キーワード：胚葉形成 原腸形成

## 1. 研究開始当初の背景

サンゴ内胚葉細胞内には褐虫藻 (zooxanthellae) が共生し、正常な環境ではその関係は安定であるが、水温上昇などでストレスを受けるとその共生関係は破綻し白化 (bleaching) に繋がることが知られている。このサンゴ成育の本質とも言える共生のメカニズムを解明するためには、実験室内でその共生関係を維持し、また環境変化における応答を分子、細胞レベルで解析することが必須であるが、サンゴは成長が遅いことから、実験室内での繁殖・飼育や人為的環境コントロールが困難であることが研究進展の障害となっている。イソギンチャク目 (Actiniaria)、セイタカイソギンチャク科に属する、*Aiptasia pallida*、*Aiptasia pulchella* も、サンゴと同様に褐虫藻と相利共生関係にあり、褐虫藻は光合成によって得たグルコースなどの産物を栄養源としてイソギンチャクに供給し、逆に褐虫藻はイソギンチャクの細胞内に取り込まれることによって外界と隔離され物理的に保護され、またサンゴから CO<sub>2</sub> などを供給されている。このようにイソギンチャク-褐虫藻の共生関係はサンゴ-褐虫藻の共生関係を模していると考えられ、実験室内で飼育し野生における生態を再現することが困難なサンゴの生理学研究の良いモデルであると考えられるようになってきた。同イソギンチャクは成長も早く、水槽のコントロールによって白化を誘導することも可能である。特に 2007 年に Virginia Weis らのグループは *Aiptasia pallida* を用いて、熱ショックによる白化誘導実験を行い、それぞれアポトーシス経路、オートファジー経路を阻害する化合物を用いて、褐虫藻の離脱 (白化) には両方の細胞死の経路が必要であることを示した (Proc R.Soc. Lond B.274)。

## 2. 研究の目的

沖縄など南方に生息する刺胞動物サンゴは温暖化による水温上昇に伴い白化 (褐虫藻

の離脱) を引き起こし死に至るため、造礁および魚類の生態系の維持などに大きな影響を及ぼす。この現象の把握に向けた海岸生態学研究は進んでいるものの、サンゴ 褐虫藻の細胞内共生メカニズムや一斉産卵のメカニズムなど、基礎生物学的に極めて興味深く重要な課題は手つかずのまま残されているのが現状である。最近、サンゴはゲノムが解読されたことにより遺伝子レベルでの生物学の対象となりつつあるが、実験室内での飼育の最適化がいまだに困難であり、研究を進めるためには早急にモデル生物を確率することが求められている。これらを背景に、本研究では刺胞動物 *Aiptasia pallida* (和名: セイタカイソギンチャク) のモデル生物化を試みる。

## 3. 研究の方法

実験に用いるセイタカイソギンチャクの個体数を定常的に確保するため飼育・増殖方法を最適化による系統の確率、遺伝子導入および遺伝子破壊 (ノックアウト) 法の確率を目指して本研究を行う。遺伝子導入方法は現在、エレクトロポレーション法を想定して準備を進めている。遺伝子破壊法は現在、エレクトロポレーション法を想定して準備を進めている。遺伝子破壊法は最近、ZFN (Zinc Finger Nuclease) 法に変わる高効率のゲノム編集技術として急速に注目を集めている TALEN 法を用いる。

## 4. 研究成果

H25 年度

サンゴを含む刺胞動物のモデル生物としてのセイタカイソギンチャク (*Aiptasia pallida*) を飼育・繁殖し、研究に用いるために十分な個体数を確保するための条件検討を行った。水質、水温などの条件検討を行った結果、無性生殖によって実験室内で効率良く増殖させることが可能になった。餌につ

いても検討し、小型魚類の飼育に用いられているブラインシュリンプ（アルテミア）が適当であるとの結論に至った。遺伝子導入については、電気穿孔法（エレクトロポレーション）を試みているがまだ成功に至っていない。遺伝子発現を制御するプロモーターを脊椎動物由来のものから、刺胞動物由来のものに入れ替えるなどの検討を行っているところであり、また、イソギンチャクの褐虫藻の取り込み（共生）、離脱誘導（白化）を人為的に再現することが可能になった。これら共生株、白化株を用いて、トランスクリプトーム解析とメタボローム解析を実施しており、環境（温度）変化による白化に伴うイソギンチャクの遺伝子発現、代謝状態について興味深い結果を得つつある。また、トランスクリプトーム解析から得られた *vasa*、*nanos* など生殖細胞特異的遺伝子のイソギンチャクにおける局所的発現パターンについては whole-mount in situ hybridization (WISH) や個体の凍結切片を用いた in situ hybridization を行っており、とくに *vasa* については生殖細胞以外の広い領域での発現を確認しており、同遺伝子の今後の機能解析に興味を持たれる。

#### H26 年度

刺胞動物（サンゴ、イソギンチャク）と褐虫藻の共生のメカニズムを解明するために、それらへの遺伝子導入法の確立を目指して研究を進めた。コビミドリイシの卵あるいは受精卵へ、このサンゴの遺伝子由来のプロモーターを組み込んだプラスミドをマイクロインジェクションした。その結果、プラヌラ幼生期に導入した遺伝子由来の発現が確認できた。また、セイタカイソギンチャクへの遺伝子導入法として、マイクロインジェクション法とエレクトロポレーション法を予定していた。残念ながら、現在までこのイソギンチャクの卵は得られておらず、マイクロ

インジェクション法を進めることはできていない。一方で、エレクトロポレーション法においては、前処理を工夫することで結果が得られ始めている。イソギンチャク個体全体を覆う粘液（ムコ多糖）をブロムヘキシン塩酸塩の作用により取り除き、同時に、実験操作などの外部刺激によって新たに粘液が産生されるのを防ぐために塩化マグネシウムの作用により麻酔状態にして遺伝子導入を行った。その結果、イソギンチャク個体への遺伝子導入が確認された。また、イソギンチャク底部に存在する足盤から切離して生じる全能性をもった細胞塊に直接遺伝子導入を行うことも試みている。しかし、エレクトロポレーション後のこの細胞塊の生存率が非常に低く、これを改善するさらなる条件検討が必須であると考えている。

また、ゲノム解析の結果から、褐虫藻と共生しない刺胞動物に比べ、ミドリイシ属のサンゴは複雑な自然免疫系の遺伝子を持つことが報告されている。これに着目し、褐虫藻との共生と自然免疫系の関係を調べるため、これらに対する阻害剤を用いた実験を行った。その結果、NF- $\kappa$ B の転写活性の阻害が、コビミドリイシ、セイタカイソギンチャク共に、褐虫藻との共生維持に影響するという結果が得られた。

#### H27 年度

刺胞動物（サンゴ、イソギンチャク）と褐虫藻の共生のメカニズムを解明するために、それらへの遺伝子導入法の確立を目指して研究を進めた。セイタカイソギンチャクへの遺伝子導入法として、マイクロインジェクション法あるいはエレクトロポレーション法を試みた。前年度までは当研究室でこのイソギンチャクの放卵放精を誘導することはできなかったが、体を一定以上の大きさに育てて十分な成熟状態にすることや雌雄を同一環境で飼育すること、また光周期を調整する

ことなどにより研究室で放卵放精を人為的に誘導することが可能となった。この放出されたイソギンチャクの卵へ DNA コンストラクトの注入を試みた。しかし、その後、発生が進まず死滅してしまった為、遺伝子導入の成否を確認することができなかった。これはインジェクション操作時に卵が強いダメージを受けてしまった、あるいは使用した卵が未受精の状態であり、インジェクション操作後にあらためて受精することができなかったなどが原因と考えている。これを解消するために、受精後少し発生が進んだ胚(2細胞胚)にマイクロインジェクションを行うことを考えている。一方で、エレクトロポレーション法においては、前処理を工夫することで結果が得られ始めている。イソギンチャク個体全体を覆う粘液(ムコ多糖)をブロムヘキシン塩酸塩の作用により取り除き、同時に、実験操作などの外部刺激によって新たに粘液が産生されるのを防ぐために塩化マグネシウムの作用により麻酔状態にして遺伝子導入を行った。また、イソギンチャク底部に存在する足盤から切離して生じる全能性をもった細胞塊に直接遺伝子導入を行うことも試みた。これらを材料として至適導入条件(緩衝液、電圧、電気容量)を検討し進めたが、ポジティブな結果を得ることはできなかった。

#### 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)

日本動物学会第86回大会

山口剛史、高橋弘樹、上野直人

「サンゴ胚への遺伝子導入法の確立」

2016年9月17日

朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター  
(新潟市中央区万代島)

日本動物学会第85回大会

山口剛史、高橋弘樹、上野直人

「サンゴ、イソギンチャクと褐虫藻の共生メカニズムの解析」

2015年9月13日

東北大学川内北キャンパス

(宮城県仙台市)

[図書](計 0件)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

上野 直人 (UENO, Naoto)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・  
教授

研究者番号: 40221105

##### (2)研究分担者

高橋 弘樹 (TAKAHASHI, Hiroki)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・  
助教

研究者番号: 40283585

##### (3)連携研究者

皆川 純 (MINAGAWA, Jun)

基礎生物学研究所・

環境光生物学研究部門・教授

研究者番号: 80280725