

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18744

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文)Application of RNA interference in Scleractinian corals.

研究代表者

湯山 育子(YUYAMA, Ikuko)

筑波大学・生命環境系・特任助教

研究者番号：80565995

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)：造礁性サンゴでは、遺伝子ノックダウンなどの技術があまり適用されていないため、本研究では遺伝子ノックダウン技術サンゴに適用させ、その効果を検証することを目的に実験を行った。その結果、遺伝子ノックダウン技術がサンゴの特定の遺伝子の発現を低下させる効果があること、またこの技術により、サンゴのストレス耐性、褐虫藻との細胞内共生などの仕組みを明らかにできる可能性があることが示された。

研究成果の概要(英文)：To date, only few studies have used RNA interference technology to Scleractinian corals. The aimed of this research is optimization and establishment of RNAi interference mediated gene knockdown in Scleractinian corals. The results demonstrated that RNAi causes down-regulation of expression of target genes and indicated that RNAi is an effective method for screening for gene function involved in coral-algal endosymbiosis and coral stress response.

研究分野：分子生物学

キーワード：造礁性サンゴ 遺伝子ノックダウン 細胞内共生

1. 研究開始当初の背景

造礁性サンゴは細胞内に褐虫藻を共生させており、褐虫藻の光合成産物を利用している。遺伝子発現解析により、サンゴ-褐虫藻の細胞内共生に關与する遺伝子が同定されつつあるものの、細胞内共生機構については未解明な部分が多い。その理由の一つとしては、サンゴでは RNA interference (RNAi) による遺伝子ノックダウン等、遺伝子発現を操作した実験が行われていないことが挙げられている。そこで本研究ではサンゴにおいて RNAi 法を適用させることを目的に実験を行った

2. 研究の目的

サンゴにおける RNAi 技術を確立させること。また、褐虫藻-サンゴの細胞内共生に關わる遺伝子を用いて RNAi を行うことで、細胞内共生におけるそれぞれの遺伝子の役割を明らかにすること。である。

3. 研究の方法

ウスエダミドリイシのチオレドキシシや、サンゴ-褐虫藻の細胞内共生關連の配列をもとに RNAi に使用する二本鎖 RNA を作成、もしくは、siRNA を作成する。これを lipofection 法によりサンゴのプラヌラ幼生に導入し、ターゲットの遺伝子の発現量が低下するかをリアルタイム PCR, whole mount in situ hybridization により確認する。

また、RNAi 処理によりサンゴと褐虫藻の共生状況や骨格形成、サンゴのストレス耐性に影響があるかを調べた。

4. 研究成果

プラヌラ幼生に上記遺伝子の RNAi 処理を行った後、Real-time PCR, whole-mount in situ hybridization により各遺伝子の発現量が低下することを確認している。これまでの結果から、プラヌラ幼生においては RNAi 処理が有効であることがわかっている。チオレドキシシをターゲットに RNAi 処理をしたサンゴでは、高温時の生存率が著しく低下することから、チオレドキシシがサンゴのストレス耐性に重要なタンパク質であることがわ

図:サンゴGFPのノックダウンの結果!
サンゴGFPをターゲットにしたRNAiにより!
GFP(緑色蛍光タンパク質)の発現量が低下!

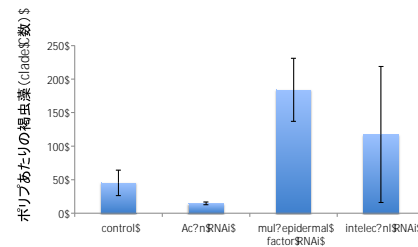


ウスエダミドリイシの幼ポリプ(白く明るい部分がGFP)!

かった。また2本鎖 RNA を用いた RNAi 処理よりも、siRNA を使用したほうが、実験期間中のサンゴプラヌラ幼生生存率が高いことから、本研究では、siRNA を使用することにした。

GFPをターゲットにした RNAi 処理については、プラヌラ幼生、ポリプにおいて、その発現量が低下し、蛍光顕微鏡下で観察できる GFP の量が減少ことが明らかになった(上図)。また、また、サンゴと褐虫藻の細胞内共生に關わる遺伝子 (multiepidermal factor RNAi, intelectin)、サンゴの骨格形成に關わる遺伝子 (Galaxin) をターゲットに RNAi 処理を行いその効果を検証した。その結果、 multiepidermal factor RNAi と intellect をターゲットにした RNAi では、褐虫藻がサンゴ体内で増加する速度が速くなることが明らかになった(下図)。

クレードCの初期共生時に発現が上昇する遺伝子のノックダウン(RNAi) 変態直後のポリプに書く遺伝子のRNAi処理をし、3共生する褐虫藻の数を数えた。\$



また、サンゴの骨格形成に關与する遺伝子 (Galaxin) をターゲットに RNAi 処理を行ったところ、ポリプになったサンゴの骨格形成にはあまり影響がないことがわかった。プラヌラ幼生時期に RNAi 処理をした後、変態させた場合は、すべてのサンゴが変態できずに死亡した。

これまでの結果から、RNAi 処理が細胞内共生の解明にも有効であることが示唆された。また一方で、RNAi 処理の効果に個体差があり、プラヌラ幼生から変態後成長が進むにつれて、この処理の効果が薄れることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- 1) **湯山育子** (in press) Genome and transcriptome analysis reveals the detail of cnidarian-algalendosymbiosis relationship ゲノム、トランスクリプトームデータから

- 明らかにされる刺胞動物-藻類の細胞内共生, 農文協「生物科学」, 査読有
- 2) Higuchi Tomihiko, Shirai Kotaro, Mezaki Takuma, **Ikuko Yuyama** (2017) *Temperature dependence of aragonite and calcite skeleton formation by a scleractinian coral in low mMg/Ca seawater*. *Geology*, 査読有, Vol. 45, pp. 1087-1090.
 - 3) **Yuyama Ikuko**, Tomihiko Higuchi, Takuma Mezaki (2016) *Symbiodinium kawagutii (clade F) coats the surface of Acropora solitaryensis, resulting in the formation of a sheet-like crust*. *Proceedings of the 13th International Coral Reef Symposium*, 査読有, 2016-12.
 - 4) **Ikuko Yuyama**, Tomihiko Higuchi, Yoshio Takei (2016) *Sulfur utilization of corals is enhanced by endosymbiotic algae*. *Biology Open* 査読有, Vol. 5, pp.1299-1304.
 - 5) Masakazu Ishikawa, **Ikuko Yuyama**, Hiroshi Shimizu, Masafumi Nozawa, Kazuho Ikeo, Takashi Gojobori (2016) *Different Endosymbiotic Interactions in Two Hydra Species Reflect the Evolutionary History of Endosymbiosis*. *Genome Biology and Evolution*, 査読有, Vol. 8, pp. 2155-2163.
 - 6) **Ikuko Yuyama**, Takashi Nakamura, Tomihiko Higuchi, Michio Hidaka (2016) *Different stress tolerances of juvenile polyps of the coral *Acropora tenuis* associated with clades C1 and D *Symbiodinium**. *Zoological studies*, 査読有, 55 NO. 19.
 - 7) Tomihiko Higuchi, Sylvain Agostini, Beatriz Estela Casareto, Yoshimi Suzuki, **Ikuko Yuyama** (2015) *The northern limit of corals of the genus *Acropora* in temperate zone is determined by their resilience to cold bleaching*. *Scientific Reports*, 査読有, Vol 5: 18467 doi: [10.1038/srep18467](https://doi.org/10.1038/srep18467).
- 〔学会発表〕(計 8 件)
- 1) 造礁性サンゴ-褐虫藻の細胞内共生に關与する研究, 湯山育子, (2017) 第 20 回日本サンゴ礁学会
 - 2) サンゴ-褐虫藻の細胞内共生關係の破綻にはサンゴ免疫系の暴走が關係する, 湯山育子, (2017) 第 50 回日本原生生物学会大会-第 1 回日本共生生物学会大会
 - 3) Identification of genes related to aragonite/calcite crystal growth in corals. **Ikuko Yuyama**, Tomihiko Higuchi (2017) *The 14th International Symposium on Biomineralization (BIOMIN XIV)*
 - 4) サンゴ-褐虫藻の細胞内共生成立時に見られるダイナミックな遺伝子発現変動, 湯山育子 (2017) 第 19 回マリンバイオテクノロジー学会大会
 - 5) Dynamic changes in gene expression during early stage of coral-algal symbiosis. **Ikuko Yuyama**, Kazuho Ikeo, (2016) *13th international coral reef symposium*
 - 6) 造礁サンゴにおける RNAi 法の確立 湯山育子, 池尾一穂 (2016) 第 38 回日本分子生物学会
 - 7) サンゴ-褐虫藻の細胞内共生成立時に見られるダイナミックな遺伝子発現変動, 湯山育子, 野澤昌文, 石川昌和, 池尾一穂 (2016) 日本サンゴ礁学会第 18 回大会
 - 8) サンゴ-褐虫藻の細胞内共生成立時に見られるダイナミックな遺伝子発現変動, 湯山育子, 野澤昌文, 石川昌和, 池尾一穂 (2016) 第 86 回日本動物学会
- 〔その他〕
ホームページ等
<http://www.trios.tsukuba.ac.jp/researcher/0000003962>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

湯山 育子 (YUYAMA, Ikuko)
筑波大学・生命環境系・特任助教
研究者番号：80565995