

サンゴ-褐虫藻共生系に関わる褐虫藻遺伝子の網羅的解析

宇川 尚登 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 湯山 育子 (筑波大学 生命環境系)

【研究の背景と目的】

褐虫藻とは渦鞭毛藻のグループのひとつであり、二枚貝、ウミウシ、イソギンチャク、有孔虫、サンゴなど様々な海産無脊椎動物に共生する。その中でも褐虫藻と刺胞動物の共生関係は、サンゴの白化現象と関連していることもあり、注目を集めている。

サンゴと褐虫藻の共生関係で判明していることとしては、次のような例がある。1) 褐虫藻はサンゴに共生する時、symbiosome という膜に包まれて存在し、サンゴからは窒素やリン等を受け取り、一方で光合成産物を提供すること (Yellowlees et al., 2008; Davy et al., 2012)、2) サンゴ組織の抽出液を単離した褐虫藻に掛けると、褐虫藻の炭素固定量が增大すること (Davy et al., 2001)、3) 褐虫藻が共生する際のサンゴの遺伝子発現解析を行い、宿主側の変化 (グルタミン酸、糖代謝が活発化) を示すトランスクリプトームデータが報告されていること (Yuyama et al., 2018) 等が挙げられる。

しかし、共生時に褐虫藻側でどのような変化が起きているのかは、まだ研究途上にある。褐虫藻側の変化を知るためには、褐虫藻の共生状態と非共生状態 (サンゴ等の宿主に共生していない状態) での大規模分子データの比較が有効な手法である。本研究では、褐虫藻単離培養株をサンゴに共生させる実験系を確立しており、サンゴ-褐虫藻共生体のトランスクリプトームデータが取得済みである。一方で、褐虫藻単体のトランスクリプトームデータが不足していたため、褐虫藻側の遺伝子発現解析はできていなかった。

そこで本研究では、共生過程における褐虫藻側の変化を明らかにすることを目的とし、褐虫藻単離培養株由来のトランスクリプトームデータを新たに取得した。そして、褐虫藻単離培養株のトランスクリプトームデータと、サンゴ-褐虫藻共生体のトランスクリプトームデータを比較することで、共生時における遺伝子発現の変化を褐虫藻側から分析した。

【手法】

(1) 褐虫藻のリファレンス配列の作成

褐虫藻タイプ C (*Cladocopium goreaui*) およびタイプ D (*Durusdinium trenchii*) の単離培養株から RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作成した後、RNA-seq (HiSeq4000) によりトランスクリプトームデータを取得した。なお、同様の条件で RNA-seq を行ったデータをそれぞれ 2 つ準備した。RNA-seq で得た短い配列断片 (リード) それぞれでクオリティ調整を行い、Trinity を使ってタイプごとにアセンブルを実施し、リードを繋げた。続いて、Transdecoder を使い、アセンブルで得た配列 (コンティグ) のうちタンパク質コード領域を含む配列を抽出した。次に、抽出したコンティグから褐虫藻由来の配列を推定するために、既存の褐虫藻種のトランスクリプトームデータまたはゲノムデータに対し BLASTn による相同性検索を行い、E-value が $1e^{-20}$ より小さい値となった配列を褐虫藻由来のコンティグとした。最後に、配列の類似したコンティグを排除し、褐

虫藻由来のタンパク質コード領域を含む遺伝子セット (リファレンス配列) を作成した。

(2) 発現変動解析

Bowtie2 を利用し、両タイプのリファレンス配列に、単離培養株、褐虫藻共生 10 日後ならびに 20 日後の *Acropora tenuis* (ウスエダミドリイシ、造礁性サンゴ) 由来のリードをそれぞれマッピングした。タイプ C に限り、*A. tenuis* 共生 2 ヶ月後の褐虫藻由来のトランスクリプトームデータも利用した。マッピング結果をカウントして得た発現量データについて、R の TCC パッケージで単離培養株とサンゴ共生体との二群間で比較し、褐虫藻内で発現変動する遺伝子を同定した。

(3) アノテーションと GO (Gene ontology) enrichment 解析

共生により発現変動する遺伝子の機能を推定するため、まず Swiss-Prot protein データベースを参照元にして、相同性検索 (nBLASTx, E-value $\leq 1e^{-4}$) を行った。さらに GO enrichment 解析を行い、発現変動する遺伝子群に多く含まれる分子プロセス等を推定した。なお、有意に出現していると判定された GO term を抽出し、考察の対象とした。

【結果と考察】

RNA-seq の結果、褐虫藻培養株 1 サンプルあたり約 37 M ~ 41 M リードのデータが得られている。ここから褐虫藻由来として同定したコンティグの数 (リファレンス配列の大きさ)、また非共生状態と比べて共生状態で発現変動している遺伝子の数は、以下の表の通りである。

	タイプ C	タイプ D	
リファレンス配列	50,497 contigs	25,068 contigs	
発現変動遺伝子	共生 2 ヶ月	共生 10 日後	共生 20 日後
	上昇: 1,212 減少: 2,397	上昇: 339 減少: 655	上昇: 395 減少: 1,108

GO enrichment 解析においては、両タイプに共通して protein folding や RNA processing 関連といった Biological process に関連する遺伝子が発現の減少する遺伝子で多く検出され、nitrogen compound transport、transmembrane transport に関連する遺伝子が発現の上昇する遺伝子に多く存在することが分かった。

共生によって褐虫藻は、サンゴの細胞内という外界と比べると安定した環境に移る。それにより掛かるストレスが少なくなるため、protein folding に関与する遺伝子が発現減少していると考えられる。RNA processing 関連の発現減少は、共生により褐虫藻での遺伝子発現が不活発になることを示唆する。窒素輸送や膜間輸送の発現上昇は、宿主であるサンゴとの栄養等のやり取りを多くして、共生関係を強めていると考えられる。これらを踏まえると、褐虫藻はサンゴに共生すると、不必要になった遺伝子発現を抑えていく一方、宿主側との繋がりを強化する、宿主側にとってはオルガネラ化とでも表現できるような変化を起していると思予想する。