

## F-5 サンゴ礁生態系の攪乱と回復促進に関する研究

### (1) サンゴ礁の攪乱、回復の評価とそれに基づく管理手法に関する研究

#### ④ 環境ストレス応答の向上によるサンゴ礁管理手法の開発

独立行政法人農業生物資源研究所

企画調整部 技術移転科

萱野暁明

<研究協力者> 独立行政法人水産総合研究センター 西海区水産研究所  
石垣支所 亜熱帯生態系研究室 渋谷拓郎・橋本和正

平成12～14年度合計予算額 7,600千円  
(うち、平成14年度予算額 2,600千円)

#### [要旨]

赤土等の各種のストレスがサンゴに与える影響を分子レベルで明らかにするため、種の特異性が容易で扱いやすいハナヤサイサンゴを材料とし、ストレス条件下で特異的に発現する遺伝子の探索を行った。500ppmの赤土を加えた試験区と加えない試験区のアナヤサイサンゴからRNAを抽出し、一本鎖の相補的DNA(cDNA)を合成した。このDNAを鋳型として非特異的なPCR反応を行い、ゲル電気泳動によって分離すると(これをディファレンシャル・ディスプレイ法と言う)、赤土を加えた試験区由来の試料にのみ検出される数種類のDNAバンドを確認した。これらのDNAをクローニングして塩基配列を決定すると、その中にアメフラシのヒートショックタンパク質の1種(Hsp70)と高い相同性を有するクローンが見出された。

この遺伝子の配列をもとにプライマーを設計し、RT-PCR法による発現解析を行ったところ、高温のストレス条件下においてはこの遺伝子の発現は誘導されたが、低塩分のストレス条件下において遺伝子発現は誘導されないことが確認された。このことは各種のストレスによって、発現する遺伝子が異なることを示唆している。

この部分的cDNAの配列を用いて全長cDNAを取得するために、5'側に延びるcDNAと3'側に延びるcDNAをRACE法によりクローニングした。その結果、全体で約2500塩基対の全長cDNAが同定され、669残基のアミノ酸配列が推定された。この遺伝子はストレスタンパクHsp70に良く似た配列を有しており、アミノ酸レベルでのアメフラシ、ヒト、ショウガサンゴのHsp70に対する相同性はそれぞれ78.2%、80.9%、57.2%であった。このことから、赤土によって誘導されるハナヤサイサンゴの遺伝子は他の生物のHsp70と同じ仲間であることが明らかとなった。

[キーワード] ストレス応答, Hsp70, ディファレンシャル・ディスプレイ, cDNAクローニング, ハナヤサイサンゴ

#### 1. はじめに

サンゴ礁は南西日本の沿岸域を代表する生態系の一つである。サンゴ、魚類、貝類、甲殻類な

ど多様な生物が生息していることから、サンゴ礁は観光資源として重要であると同時に、漁場としても重要な地位を占めている。しかし近年は、陸から赤土が海に流入するなど、サンゴ礁を取り巻く環境は悪化しつつある。サンゴ礁の環境悪化は、当然、漁業にも悪影響を及ぼすと予想されるため、その保全対策が求められているところである。保全方法の策定にあたり、まず重要となるのは、現状のモニタリングである。サンゴはサンゴ礁生態系の中で中心的な役割を担っている。このサンゴの生理状態を評価する方法が開発できれば、サンゴ礁の環境評価につながるものと期待される。

1990年代以降、分子生物学の発展に伴い、遺伝子発現によって生物の生理状態を把握し、周辺環境のモニタリングへ応用する研究が盛んに行われるようになった。海洋生物では、海綿動物などで研究が進んでいる。例えば、Schröderら<sup>1)</sup>は重金属に結合するタンパク質のcDNAを海綿からクローニングし、この遺伝子の発現量と体内に蓄積されたカドミウムの量に相関があることを示した。しかしサンゴではこのような研究例は乏しく、特に沖縄で問題となっている赤土と遺伝子発現の関連を調べた例は皆無である。

## 2. 研究目的

我々は本研究課題において、赤土等のストレスによってその発現が誘導/抑制されるサンゴ遺伝子のクローニングを試みた。サンゴからストレス応答特異的遺伝子がクローニングされれば、

- (1) サンゴが受けているストレスの種類を遺伝子から見分けられる
- (2) 遺伝子の発現量から、ストレスの度合いが推定できる
- (3) ストレスがサンゴに影響を及ぼすメカニズムが理解できる
- (4) さらに、サンゴのストレス応答向上の方法が推測できる

などが期待されるからである。

ストレス条件下などにおいて特異的に発現する遺伝子の解析方法として、最近ではマイクロアレイがよく用いられているが、そのためには、アレイに貼り付けるための塩基配列情報が必須である。サンゴのように塩基配列情報が極めて限られている生物においては、1992年に最初の報告が行われたディファレンシャル・ディスプレイ法が有効であると考えられる。

ディファレンシャル・ディスプレイ法(DD法)は、1992年にLiangとPardee<sup>2)</sup>によって報告されて以来、特定条件下で特異的に発現する遺伝子を同定する方法として利用されてきた。ランダムな配列を持つプライマーを利用して、緩やかな条件下でPCRを行う点が特徴である。今回は、赤土を加えた場合と対照の条件下でサンゴからRNAを抽出し、cDNA合成を行い、そのcDNAを鋳型として10塩基のプライマーを用いてPCRを行い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりPCR産物を分離することを試みた。このような試みは、世界に先駆けて行われるものであり、サンゴ礁のストレス応答の分子基盤を解明しようとする斬新な研究である。これらの結果を踏まえ、サンゴが環境ストレスを受けた際の管理手法を考案していくことを本課題の目的とする。

## 3. 研究方法

(1) ディファレンシャル・ディスプレイ解析：赤土によって誘導される遺伝子の探索

### ①飼育条件

実験には石垣島浦底湾で採集したハナヤサイサンゴ 2 群体を用いた。負荷実験の 3 日前に、各群体から長さ 4cm 程度の枝を 2 本ずつ切り取り、次の作業までの間、流水下で飼育した。容積約 18l の水槽を 2 つ用意し、一方には赤土を 500ppm 含む海水を、もう一方には濾過海水を入れ（コントロール）、それぞれの水槽に切り取ったサンゴ枝を移した（図 1）。4 時間後、サンゴ枝を水槽から取り出し、Tris バッファー（Tris 0.05M、NaCl 0.1M、EDTA 0.01M）で軽くすすいだ後、液体窒素で急速凍結した。

### ② RNA 抽出、cDNA 合成およびディファレンシャル・ディスプレイ

乳鉢と乳棒を用い、液体窒素を注ぎながらサンゴ枝を粉末状になるまですりつぶした。グアニジン・フェノール法（ニッポンジーン社、ISOGEN）により、このサンゴ粉末から全 RNA を抽出した。アマシャム・ファルマシア社の First Strand cDNA Synthesis Kit と、Kit に添付されている NotI-d(T) プライマーを用いて mRNA の選択的逆転写を行い、cDNA を得た。この cDNA を鋳型とし、10 塩基のランダムプライマー（Operon Technologies 社）を用いて、比較的弱いハイブリダイゼーションの条件下（94°C 1 分・40°C 4 分・72°C 1 分を 1 回行い、次いで、94°C 45 秒・60°C 2 分・72°C 1 分を 35 回繰り返す）で PCR を行った。この PCR 産物を 6% 変性ポリアクリルアミドゲルで分離し、UV 照射下で特異的な DNA バンドを切り出した。切り出したゲル片から DNA を抽出し pGEM-T easy ベクター（プロメガ社）に組み込み、大腸菌 JM109 株に形質転換した。ALF express DNA Sequencer（アマシャム・ファルマシア社）を用いて塩基配列を決定し、BLAST アルゴリズムを用いて DNA データベースと照合することにより相同性検索を行った<sup>3)</sup>。

### ③ RT-PCR

ディファレンシャル・ディスプレイで得られた DNA 断片は、ある程度の率で偽陽性を含むことが指摘されている<sup>4)</sup>。そこで、②の解析で得られた DNA 断片の 1 つ（pPd9-1 と命名）の両端にプライマーを設計し（pPd9-1F 及び R）、RT-PCR による発現の確認を行った。鋳型には②で作成した cDNA を用いた。RT-PCR のプログラムは、95°C 5 分ののち、95°C 30 秒、50°C 1 分、72°C 45 秒を 23 サイクル、とした。得られた PCR 産物は 6% 変性ポリアクリルアミドゲルで分離した。

### （2）赤土の濃度及び暴露時間と pPd9-1 の発現

pPd9-1 の発現量が赤土の濃度や暴露時間とどのような関係があるのかを調べるための実験を行った。赤土濃度 0ppm（コントロール）、10ppm、50ppm 及び 200ppm の水槽に、（1）①と同様に準備したハナヤサイサンゴの枝を入れ、2 時間飼育した。また、赤土濃度 200ppm の水槽に、ハナヤサイサンゴを 30 分、60 分及び 2 時間飼育した。いずれも終了後ただちに枝を取り出し、（1）①と同じ処理を行った。続いて（1）②、③と同じ方法により RNA 抽出と cDNA 合成を行い、RT-PCR を行った。

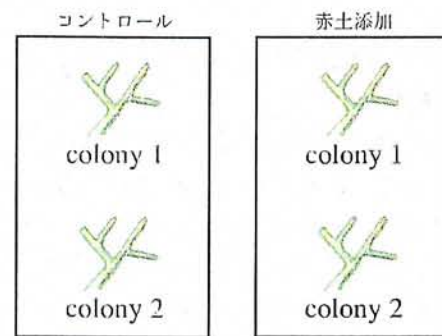


図1 飼育実験におけるサンゴの配置

ハナヤサイサンゴ 2 群体から枝を取り、上図のように配置。4 時間後、サンゴ枝を取り出し、液体窒素で凍結。

### (3) 高水温及び低塩分ストレス負荷実験

#### ①飼育条件

pPd9-1 が高水温及び低塩分ストレスによっても誘導されるかどうかを確認するための実験を行った。容積 18l の水槽を 3 つ用意し、1 つをコントロール (濾過海水、水温 22°C)、1 つを高水温条件 (濾過海水、石英ヒーターで 30°C に加熱)、もう 1 つを低塩分条件 (濾過海水を蒸留水で 26ppt に希釈) とした。(1) ①と同様に準備したハナヤサイサンゴの枝をそれぞれの水槽に入れ、4 時間飼育した後に取りだし、(1) ①と同じ処理を行った。

#### ② RNA 抽出、cDNA 合成および RT-PCR

(1) ②、③と同じ方法により、RNA 抽出、cDNA 及び RT-PCR 合成を行った。RT-PCR のプログラムは、95°C 5 分ののち、95°C 30 秒、50°C 1 分、72°C 45 秒を 26 サイクル、とした。得られた PCR 産物は 6% 変性ポリアクリルアミドゲルで分離した。

### (4) 全長 cDNA クローニング

pPd9-1 は、ある遺伝子の一部に過ぎない。その遺伝子の性質を理解するためには、全長に渡る塩基配列の決定が不可欠である。そこで RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法による全長 cDNA クローニングを行った。

#### ① 5' RACE

赤土 200ppm を含む海水中でハナヤサイサンゴを 2 時間飼育したのち、(1) ②と同様の手法でサンゴ組織から全 RNA を抽出した。この全 RNA を鋳型とし、クロンテック社の SMART RACE cDNA Amplification Kit を用いて、5' 末端に特殊な配列 (Smart II A Oligonucleotide) を有する完全長 cDNA を合成した。この完全長 cDNA を鋳型とし、キット添付の Nested Universal Primer A (Smart II A Oligonucleotide に対応した配列を持つ) と pPd9-1R プライマーを用いて、pPd9-1 の上流部分の PCR を行った。この PCR で得られた約 1700bp の断片を制限酵素 PstI で処理したところ、3 つの断片に分かれたので、それらの断片をクローニングベクターにライゲーションした。大腸菌 JM109 株に形質転換後、ALF express DNA Sequencer (アマシャム・ファルマシア社) を用いて塩基配列を決定した。

#### ② 3' RACE

①で得た全 RNA から、(1) ②と同様の手法で cDNA を得た。この cDNA を鋳型とし、pPd9-1F プライマーと EcoRI/NotI プライマー (NotI-d(T) プライマーから poly-T 部位を除去したもの) により、pPd9-1 の下流部分の PCR を行った。この PCR で得られた約 1100bp の断片を、制限酵素 HindIII で処理したところ、2 つの断片に分かれたので、①と同様の方法で塩基配列決定を行った。

#### ③塩基配列解析

①及び②で得られた配列を、遺伝情報処理ソフト GENETYX-MAC により結合し、BLAST による相同性検索を行った。

### (5) ハナヤサイサンゴのもう一つの Hsp70 のクローニング

(1) で得られた pPd9-1 は、その配列から Hsp70 ファミリーのの一つであると推察されたもの

の、すでに Tom らが報告している ショウガサンゴ Hsp70<sup>5)</sup> とは異なる 遺伝子であることが、BLAST 解析の結果から示唆された。そこで、2 つの遺伝子を比較するために、ショウガサンゴ Hsp70 の塩基配列を参考にして、ハナヤサイサンゴ Hsp70 のクローニングを試みた。(1) ② で得た cDNA をテンプレートとし、1 対のプライマー (5' -ATGG TAAAGTTGAGATCATCGC-3' と 5' -CAACACGTTCTTTTCACCG-3') を用いて、PCR (94°C 3 分ののち、94°C 1 分、60°C 1 分、72°C 1 分のサイクルを 35 回行い、72°C 5 分) を行った。得られた PCR 産物を精製後、pGEM-T easy ベクター (プロメガ社) に組み込み、(1) ② と同じ方法で塩基配列を決定した。この配列を元に、(4) ① と同じ方法で 5' RACE を行い、5' 側の 731bp の配列を決定した。

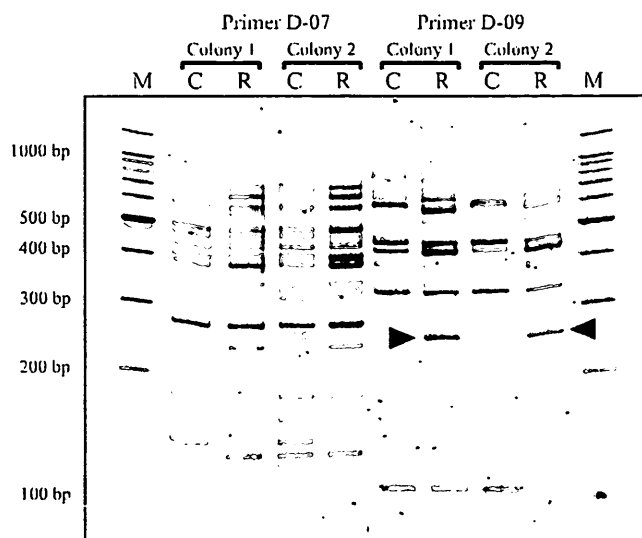


図2 ディファレンシャル・ディスプレイ

PCRに用いたランダムプライマー D-07及びD-09の配列はそれぞれ 5' -TTGGCACGGG -3'、5' -CTCTGGAGAC -3' である。Mは分子量マーカー、Cはコントロール、Rは赤土処理を示す。矢印で示したバンドがpPd9-1 (250bp)である。

#### 4. 結果

##### (1) ディファレンシャル・ディスプレイ解析：赤土によって誘導される遺伝子の探索

我々はディファレンシャル・ディスプレイの原報<sup>6)</sup>を改変し、一本鎖 cDNA に対して、数種の 10 塩基対のプライマーを用いて条件の緩い PCR を行うことにより、特異的に発現する遺伝子を同定する方法を以前に確立していた<sup>7)</sup>。そこで今回も、懸濁赤土に暴露させたハナヤサイサンゴから RNA を抽出し、一本鎖 cDNA を合成し、12 種類のプライマーを用いて PCR を行い、そのバンドパターンをコントロールのそれと比較した。その結果、いずれのプライマーにおいても、赤土暴露区とコントロールとの間に明瞭なバンドパターンの差異が認められた (図 2)。このことは赤土が遺伝子発現のレベルでサンゴに影響を与えることを示している。また、これらのバンドパターンは 2 群体とも同じような差異を示したため、その再現性は極めて高いことが推察された。

赤土暴露区にのみ見られるバンドをゲルから切り出し、プラスミドベクターにクローニングし、計 31 クローンが得られた。それぞれの塩基配列を決定し、その BLAST 解析を行ったところ、既知の遺伝子との相同性が認められたのはそのうちの 1 クローンのみであった。これはプライマー D-09 によって得られた PCR 産物に含まれていた長さ 250 塩基対の遺伝子断片であり (図 2 の矢印、pPd9-1 と命名)、ヒートショックタンパク (Hsp) 70 ファミリーと非常に高い相同性を有していた (ショウガサンゴとは 72% の相同性；文献 5)。

この pPd9-1 の発現が、本当に赤土添加によって誘導されているのかどうかを明らかにするため、RT-PCR を行った。これは、得られた配列を元に 1 対のプライマーを設計し (図 3)、PCR

により mRNA を定量的に解析するものである。その結果を図 4 に示す。この結果から明らかのように、R (赤土暴露) のレーンにおいて想定される大きさのバンドが C (コントロール) のレーンに比べて濃くなっており、pPd9-1 の発現が赤土によって誘導されたことを示している。

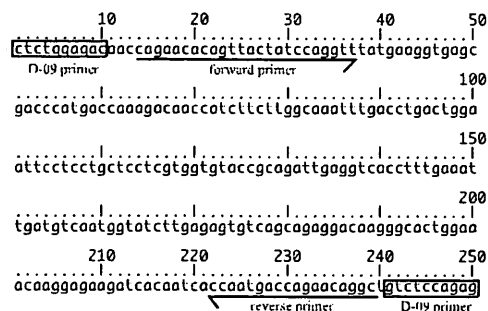


図3 pPd9-1の塩基配列と、RT-PCR用プライマーの設計部位

ディファレンシャル・ディスプレイで用いたプライマーの内側に新たにプライマーを設計した。このプライマーによって増幅される DNA断片の長さは227bpである。

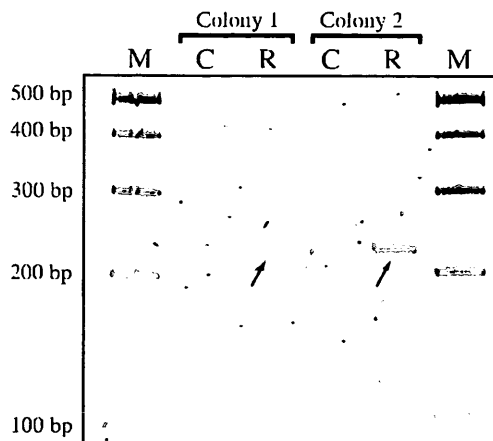


図4 RT-PCRによるpPd9-1の発現確認

ハナヤサイサンゴ2群体を用い、コントロールと赤土添加処理との間でpPd9-1の発現量を比較した。矢印はRT-PCRで増幅された227bpのバンド、Mは分子量マーカー、Cはコントロール、Rは赤土添加を示す。

## (2) 赤土の濃度及び暴露時間と pPd9-1 の発現

図 5 に赤土の濃度別の RT-PCR 泳動像を示す。コントロールではバンドが認められないのに対し、赤土濃度 10ppm 以上でバンドが認められた。このことから、pPd9-1 は赤土濃度 10ppm 以上でその発現が誘導されることが示された。図 6 に赤土暴露時間別の RT-PCR 泳動像を示す。こちらもコントロールではバンドが認められなかったが、30分以降でバンドが認められた。また、30分後と2時間後のバンドは薄かったが、60分後のバンドは濃く、発現量が時間とともに変化することが示された。

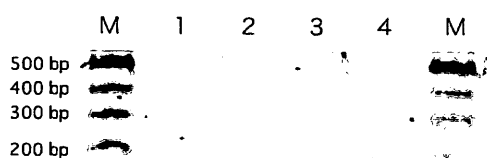


図5 赤土の濃度とpPd9-1の発現量

M: 分子量マーカー  
1: コントロール  
2: 赤土 10ppm  
3: 赤土 50ppm  
4: 赤土 200ppm

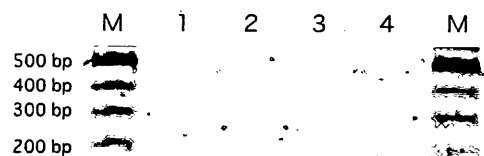


図6 赤土の暴露時間とpPd9-1の発現量

M: 分子量マーカー  
1: コントロール  
2: 赤土添加 30分  
3: 赤土添加 60分  
4: 赤土添加 120分

## (3) 高水温及び低塩分ストレス負荷実験

高水温および低塩分の条件下で飼育したハナヤサイサンゴの pPd9-1 の発現量を調べるため、

RT-PCRを行った(図7)。高水温区においては、矢印で示すように想定される大きさのDNAバンドが検出された。一方、低塩分區においては、同じ条件でPCRを行っても、DNAバンドは検出されなかった。このことは、pPd9-1の遺伝子は、赤土処理や高水温のストレスには応答して発現するが、低塩分のストレスには応答しないことを示している。

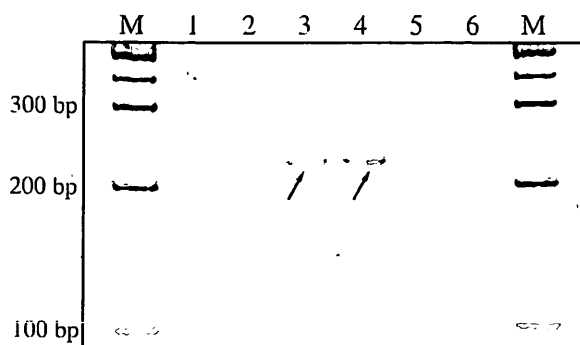


図7 RT-PCRによるpPd9-1の発現確認

M: 分子量マーカー  
 1: コントロール(群体1)  
 2: コントロール(群体2)  
 3: 高水温(群体1)  
 4: 高水温(群体2)  
 5: 低塩分(群体1)  
 6: 低塩分(群体2)

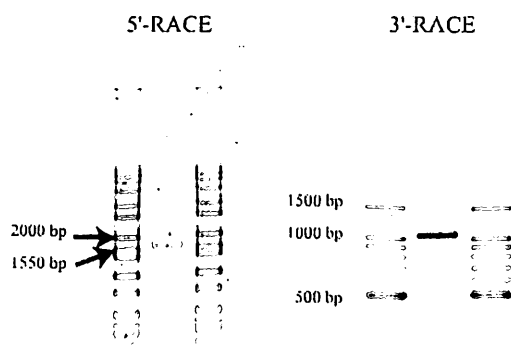


図8 pPd9-1の5'及び3'RACE

#### (4) 全長 cDNA のクローニング

図3の部分配列の情報を用いて、RACE法により全長cDNAのクローニングを試みた。図8に示すように、5'RACEと3'RACEの結果、それぞれ、ほぼ単一のDNAバンドが得られた。このバンドを切り出してクローニングを行い、塩基配列を決定したところ、ハナヤサイサングのHsp70の全長cDNAの塩基配列が明らかとなった(図9)。

今回得られた全長cDNAは約2500塩基対からなり、669アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしていることが推定された。3'非翻訳部分には、典型的なポリA付加シグナルが存在した(図9に枠で囲んで示す)。BLASTによる解析の結果、この全長cDNAに最も高い相同性を有するのはアメフラシのHsp70であることが明らかとなった。それぞれのアミノ酸配列を比較したのが図10である。この結果から、ハナヤサイサングHsp70はアメフラシHsp70と構造上極めて良く似ており、機能的にも同様の働きをしていることが推測される。ハナヤサイサングHsp70のカルボキシル末端には小胞体滞留シグナルであるRDEL配列が見出され、細胞内において、他のタンパク質の分泌に関与していることが推定された。一方、同じサングの仲間でありながら、報告されているショウガサングHsp70との相同性は意外と低いため、機能的には別の働きをしていることが考えられる。

ハナヤサイサングのHsp70におけるコドンの使用頻度をまとめたものが図11である。コドンの使用頻度は、ゲノムのGC含量や対応するtRNAの相対的含量と関連してくる。それぞれのアミノ酸においてまとめてみると、6種のコドンからなるアミノ酸(Leu, Arg, Ser)においては多少の偏りがみられる。特に、LeuのCTC, CTAが少ないのが顕著である。4種のコドンからなるアミノ酸(Val, Pro, Thr, Ala, Gly)においては、4種のうち、特定の1つのコドン

10	20	30	40	50	60	70	80
<u>AAGCAGTGGT</u>	<u>ATCAACGCAG</u>	<u>ASTACGCGG</u>	GAATTTTGTG	TAGTTTTCTG	AGAGTTTGAA	CTGTATCAGA	GTTGTCGGAA
Smart II A Oligonucleotide							
90	100	110	120	130	140	150	160
GAAAAATCA	ACTAGATTTC	AAAG <u>ATG</u> GAGA	TCAATTTGCA	CATTCTGTGC	BTAGCCTTA	GCTAGCAGTT	TAATTTTAST
		Met					
170	180	190	200	210	220	230	240
GATCGCAGAA	GAAGCAAAAA	AGGAAGAAAA	AGACGGCAAA	AAGGATGTAG	GAACGTGAAT	TGGTATCGAT	CTTGGAAACA
250	260	270	280	290	300	310	320
CTTATTCTTG	TGTTGGTGTA	TTTAAAAATG	GCAGAGTTGA	GATCATCGCA	AACGAACAGG	GAAACCGAAT	TACCCCATCT
330	340	350	360	370	380	390	400
TACGTGGCCT	TCACTCCAGA	GAACGAGCGT	CTCATTGGTG	ATGGAGCGAA	AAATCAGCTG	ACTACAAATC	CAGAAAAATC
410	420	430	440	450	460	470	480
TGTTTTTGAC	GCGAAACGGT	TGATCGGTAG	GACATGGGAT	GATAAAGCTG	TTCAAGGCGA	CATCAAGTTC	TTCCCATTCA
490	500	510	520	530	540	550	560
AAGTTATCGA	AAAGAACAAG	AAGCCACACA	TTCAGATTTC	GGTGAAGGGA	GAACGAAAAA	CATTTCAGCG	TGAGGAAATC
570	580	590	600	610	620	630	640
AGTGCATATG	TTTTAACGAA	AATGAAGGAA	ATTGCGGAAG	CCTACTTGTG	AAAGAAAGTT	ACACATGCTG	TCGTTACTGT
650	660	670	680	690	700	710	720
CCCTGCCTAC	TTCAATGATG	CTCAGCGTCA	GGCTCCCAAG	GATGCTGSA	CCATTGCTGG	CCTTAATGTG	GTGAGAAACA
730	740	750	760	770	780	790	800
TCAATGAGCC	AACAGCTGCT	GCCATTGCTT	ACGGTCTTGA	CAAAAAGAG	GGAGAAAAGA	ACATCTTAGT	GTTTGATCTA
810	820	830	840	850	860	870	880
GGAGGTGGAA	CCTTTGATGT	GTCTCTTCTG	ACTATTGACA	ATGGAGTTTT	TGAGGTGGTA	GCCACCAATG	GTGACACTCA
890	900	910	920	930	940	950	960
TCTTGGTGGT	GAAGACTTTG	ATCAGAAAAT	CATGGAATAC	TTCATCAAGA	TGTACAAGAA	GAAGAAGGGC	AAGGACATTC
970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
GCAAGGACAA	CAGAGCTGTT	CAGAACTGCG	GTCGTGAAGT	TGAGAAAGCT	AAACGTGCCC	TTAGTACACA	GCACCAGGCT
1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
AGAATTGAAA	TTGAATCATT	CTTTGATGGA	GAGGACTTCT	CAGAGACTTT	GACAAGAGCC	CGCTTTGAGC	AGGAAAATAA
1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
TGATGCTTTC	AAATCCACAC	TGAAGCCAGT	GAAGAAGGTT	TTGGAAGATG	CTGAC <u>CTGCA</u>	GAAGAAAGAC	ATTCATGAAA
					Pst I		
1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280
TTGTTCTTGT	TGTTGGCTCC	ACCCGTATCC	CAAAAATCCA	ACAGCTTGTG	AAGGAGTTCT	TTGAGGGTAA	AGAGCCGAGC
1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350	1360
CGTGGCATCA	ACCCTGACGA	GGCTGTAGCT	TATGGAGCAG	CTGTTCCAGC	CGGAGTATTG	GSTGGAGAAG	AAGATACTGG
1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440
AGAAGTAGTG	CTTCTTGATG	TTAATCCCTT	TACTTTGGGT	ATCGAGACTG	TGGGTGGAGT	TATGACCAAG	CTCATTAAACA
1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520
GAAACTCCGT	CATTCCAACA	AAGAAGGCAC	AGGTATTCTC	CACAG <u>CTGCA</u>	GACAA <u>CAGA</u>	<u>ACACAGTTAC</u>	<u>TATCCAGGTT</u>
				Pst I		pPd9-IR primer	
1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
TATGAAGGTG	AGCGACCCAT	GACCAAAGAC	AACCATCTTC	TTGGCAAATT	TGACCTGACT	GGAATTCCTC	CTGTCCTCG
1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
TGGTGTACCG	CAGATTGAGG	TCACCTTTGA	AATTGATGTC	AATGGTATCT	TGAGAGTGTC	AGCAGAGGAC	AAGGGCACTG
1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760
GAAACAAGGA	GAAGATCACA	ATC <u>CCAATG</u>	<u>ACCGAAGCAG</u>	<u>GCT</u> GTCTCCA	GAAGATATTG	AACGTATGGT	AAATGATGCA
				pPd9-IR primer			
1770	1780	1790	1800	1810	1820	1830	1840
GAGAAGTTTG	CTGACGACGA	CAAGAAAGTT	AAAGAACCTG	TGGAAGCACG	GAATGAGTTG	GAGAGCTACA	CATACTCATT

図9 ハナヤサイサングHsp70のc全長DNA配列



1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920
GAAGAACCCAG GTTGGTGATA AAGAAAGCT TGGTGGAAAA CTTTCCGAAG AAGACAAAGA AACAAATCAAC AAAGCTGTAG							
Hind III							
1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000
AGGACAAGAT TTCCTGGCTT GATAAGAATG CTGATGCTGA GGCAGAAGAT TACAAAAAGC AAAAGAAAAGA GCTTGAAGAC							
2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080
ATTGTTCAAC CTCITGTTAG TAAGTTGTAC CAAGGACAAG GAGGCCCAGG TGGGGAGGGA GCTCCTCCAC CTGAGGAGAA							
2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160
GCCTGAAGAG GAGCAAGATA GAGATGAGCT TTTAATTGGC ATATGGTAGA AAAAGAGACT TAAACAATTT GTACCCTTAA							
stop codon							
2170	2180	2190	2200	2210	2220	2230	2240
ACAATCGGGG CACTCTCTT TTACAATTCT AAAAAGCACT TTGAAAAAAT GGTGATCATT GCTTGGTGGT TATGTTGTTA							
2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310	2320
ATCACTTTGA TCAATGAAAT GTCTGTGCTG CTAATGGACA TGAAACAGAA AGGAAAGTAT AATATAGTGT GTACAGCTTG							
2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400
TTGGTAAATC AGTTGATTAT TCTCTCGCTC TTTTCATCCA TTGTAAAAC CTCAATAGTT TGGGTTCTTG GAGGGCATCA							
2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480
GACTACAAAC AATTCCTTTT ATTTATCCCT TTACCCTCTC AATTTGAATT TCAAGAGAGC TAGAAAATTT TTTCATTAAT							
Poly-A signal							
2490	2500	2510	2520				
AAAATAAATAC TACATGTAAA AAAAAAAAAA AAAT							
Poly-A signal		Poly-A region					

。 図9 前項からの続き

Pd-Hsp	1'	MRSICTFCALALASSLILVIAEEAKKEEKDGKK-DVGTVIGIDLGTTYSCVGVFKNGRV * * * * * *
Aplysia-Hsp	1"	MDRFTPFLLVILFSSNLLVRADGDEEDEGDKKSEVGTVIGIDLGTTYSCVGVFKNGRV
Pd-Hsp	59'	EIIANEQGNRITPSYVAFTPENERLIGDGAKNQLTNPENTVFDAKRLIGRTWDDKAVQC . * * * . * * * * * * * . *
Aplysia-Hsp	61"	DIIANDQGNRITPSYVAFTADGERLIGDAAKNQLTSNPENTIFDVKRLIGRTFDDKSVQH
Pd-Hsp	119'	DIKFFPFKVEKNKKPHIQISVKGEQKTFAAEEISAMVLTMKKEIAEAYLSKQVTHAVVT *
Aplysia-Hsp	121"	DIKFYFPKVTNANNKPHIQAATGEGDRSFAPEEISAMVLSKMRDIAEAYLGKKITNAVVT
Pd-Hsp	179'	VPAYFNDAQRQAPKDAGTIAGLNVVRIINEPTAAAIAYGLDKKEGEKKNILVFDLGGGTFD *
Aplysia-Hsp	181"	VPAYFNDAQRQATKDAGTIAGLNMVRIINEPTAAAIAYGLDKKEGEKKNILVFDLGGGTFD
Pd-Hsp	239'	VSLLTIDNGVFEVVATNGDTHLGGEDFDQKIMEYFIKMYKKKDKDIRKDNRAVQKLRRRE *
Aplysia-Hsp	241"	VSLLTIDNGVFEVVSNTGDTHLGGEDFDQVMHEFIKLYKKKDKDIRKDNRAVQKLRRRE
Pd-Hsp	299'	VEKAKRALSTQHQAIEIESFFDGEDFSETLTRARFEQENNDAFKSTLKPVKVLEDADL *
Aplysia-Hsp	301"	VEKAKRALSSAHQVRLEIESFFDGEDFSESLTRAKFEELNMDLFRSTMKPVKQVLEDADL
Pd-Hsp	359'	QKKDIHEIVLVGGSTRIPKIQQLVKEFFEGKEPSRGINPDEAVAYGAQVAGVLGGGTFD *
Aplysia-Hsp	361"	KTDDIDEIVLVGGSTRIPKVQQLVKEYFNGKEPSRGINPDEAVAYGAQVAGVLSGGGTFD

図10 アミノ酸配列の比較

Pd-Hspは赤土によって誘導されたハナヤサイソングの遺伝子、  
Aplysia-Hspはアメフラシの遺伝子である。



を使わないという特徴がみられる。ValのGTC、ProのCCG、ThrのACG、AlaのGCG、GlyのGGGである。Val以外は、最後の塩基がGとなっているのが共通している。3種のコドンからなるIleにおいては、ATAが使われていない。2種のコドンからなるアミノ酸においては、2種のコドンをほぼ均等に使っているPhe、Asn、Lys、Asp、Gluと、偏りがみられるTyr、His、Gln、Cysとに区別される。1種のコドンからなるMetとTrpについては議論の対象ではない。これらのコドンの使用頻度の特徴は、ハナヤサイサンゴの他の遺伝子の情報を集積することによって、より精度の高い解析が可能となる。

#### (4) ハナヤサイサンゴのもう一つのHsp70のクローニング

ディファレンシャル・ディスプレイ法により同定したcDNAとショウガサンゴHsp70の相同性が、アメフラシとの相同性ほど高くなかったこと、および、他の生物種ではHsp70は遺伝子ファミリーを形成し、複数のHsp70の遺伝子が存在することを踏まえ、ハナヤサイサンゴの異なるHsp70の単離を試みた。

ショウガサンゴのHsp70の配列<sup>5)</sup>を参考にしてプライマーを合成し、ショウガサンゴのHsp70に相当するハナヤサイサンゴのHsp70のクローニングを行った。その結果、約480塩基対の部分cDNAが単離された。塩基配列を決定したところ、その部分において、約90%の非常に高い相同性が見出された。

この部分配列を用いて、5' RACEを行ったところ、図12に示すようなほぼ単一のバンドが得られた。このバンドをクローニングして塩基配列の決定を行い、前述の480塩基対の配列と合わせることで、ハナヤサイサンゴのもう一つのHsp70の5'側731塩基対(非翻訳領域を含む)が明らかとなった。このうちエキソン部分の575塩基対についてショウガサンゴHsp70と比較を行ったところ、その相同性は91.6%であった(図13)。

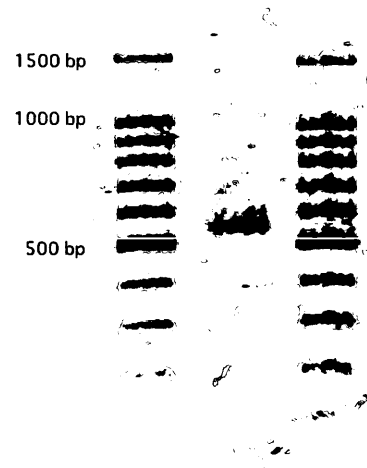


図12 ハナヤサイサンゴHSP70の5'RACEの泳動像

## 5. 考察

### (1) 実験結果の考察

図2のディファレンシャル・ディスプレイ法において、矢印で示すバンドが極めてクリアーであり、このバンドがHsp70の遺伝子ファミリーに属するという結果が得られたのは、主に以下の2つの理由によると考えている。

- 1) Hsp70 遺伝子の発現の変化が極めて大きかった。
- 2) 通常のPCRの条件に加えて、40°C 4分1回という比較的弱いハイブリダイゼーションの条件を最初に設定することにより、微細な遺伝子発現の変化を増幅できたこと。

LiangとPardeeの原報<sup>6)</sup>及び我々の以前の報告<sup>7)</sup>のディファレンシャル・ディスプレイにおいては、感度の高いアイソトープ実験により、微細な遺伝子発現の変化を捉えることに成功した。

Pocillopora	1'	ATGTCAGACG	AGTTGGCTCT	CCCGATTGGT	ATCGACCTTG	GAACAACCTTA	CTCCTGCGTT
		*****	* *****	* *****	*****	*****	*****
Stylophora	1"	ATGTCAGACG	AATTGGCTCT	CCCGATTGGT	ATCGACCTTG	GAACAACCTTA	TTCTGTGTT
Pocillopora	61'	GGAGTATTTT	AACACGGTAA	AGTTGAGATT	ATCGCCAACG	ATCAAGGAAA	CCGACGACC
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
Stylophora	61"	GGAGTCTTTC	AACATGGTAA	AGTTGAGATC	ATCGCGAACG	ACCAAGGAAA	TGGAACGACC
Pocillopora	121'	CCGAGCTATG	TCGCCTTCAA	TGAAACGGAG	CGCTTGAATAG	GAGATGCGGC	CAAGAAATCAA
		** *****	*****	*****	*****	** *****	*****
Stylophora	121"	CCTAGCTATG	TCGCCTTCAG	TGAAGAGGAG	CGCTTGATAG	GCGATGCAGC	CAAGAAATCAG
Pocillopora	181'	GCAACTCTTA	ACCCAAACAA	TACAATCTTT	GATGCCAAGA	GACTTATTGG	TAGGAAATTC
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
Stylophora	181"	GCAACTCTCA	ACCCAAACAA	TACAATCTTT	GATGCCAAGA	GACTTATTGG	TAGGAAATTC
Pocillopora	241'	AACGACCCCC	TGGTTCAATC	CGACAGAAA	AATTGGCCCT	TCGAAGTAGT	CAGCGAGAAT
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
Stylophora	241"	AACGACCCCC	TGGTTCAATC	CGACAGAAA	AATTGGCCCT	TCGAAGTAGT	CAACGAGGST
Pocillopora	301'	GGGAAACCCA	AAATCCGCGT	GCAGTATAAA	GGCGCGGCGA	AAAATTTTAC	GCCGGAGGAA
		*****	** *****	*****	*****	*****	*****
Stylophora	301"	GGGAAACCAA	AAGTGC GCGT	GCAGTACAAA	GGCTCGGGGA	AAAATTTTAC	ACCAGAAGAG
Pocillopora	361'	ATCAGTGCCA	TGGTCCTAAC	CAAGATGAAA	GAGATAGCTG	AAGCTTACCT	GGGCCAGACC
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
Stylophora	361"	ATCAGTGCCA	TGGTCCTGAC	CAAGATGAAA	GAGGTAGCCG	AAGCTTACCT	GGGACAGACT
Pocillopora	421'	GTTTCATGATG	CTGTTGTAC	AGTACCAGCA	TACTTCAACG	ATTCACAGCG	ACAGGCCACC
		** * *****	*****	*****	*****	*****	*****
Stylophora	421"	ATTAAGGATG	CTGTTGTTAC	AGTACCAGCT	TACTTCAACG	ATTCACAGCG	ACAGGCCACC
Pocillopora	481'	AAAGATGCTG	GAACAATAGC	AGGGCTGAAT	GTC AAGAGAA	TCATTAATGA	GCCCACTGCC
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
Stylophora	481"	AAAGATGCTG	GAACAATAGC	AGGGCTGAAT	GTCATAAGAA	TCATTAATGA	GCCCACTGCC
Pocillopora	541'	GCCGCCCTCG	CGTACGGTTT	GGAGAAAAC	CTCAG		
		*****	*****	*****	*****		
Stylophora	541"	GCCGCCCTCG	CGTACGGTTT	GGAGAGAAAAC	CTCAT		

図13 Hsp70遺伝子の一部の塩基配列

Pocilloporaはハナヤサイサンゴ、Stylophoraは  
ショウガサンゴである。

しかしながら、本研究においては、アイソトープを使わずとも、PCRの条件を工夫することにより、微細な遺伝子発現の変化を捉えられることを示している。

また、赤土の濃度として500ppmが適当であったかどうかについては議論のあるところである。後半のRT-PCRの実験により、50ppmにおいても、Hsp70の遺伝子発現は誘導されている。しかしながら、最初にディファレンシャル・ディスプレイ法によって遺伝子をクローニングする場合には、細胞に対して急性毒性がない程度に厳しい条件を設定する方がよいと考えている。

次に全長cDNAクローニングについて考察する。ディファレンシャル・ディスプレイ法においては、クローニングの原理からして、部分cDNAしか同定できない。したがって、全長cDNAをクローニングするためには、cDNAライブラリーを構築してスクリーニングするか、RACE法を利用することになる。以前はPCR法によって得たcDNAクローンの配列における正確性に疑問を呈する研究者も多かったが、PCRや逆転写に用いる酵素の信頼性が高まったために、RACE法による遺伝子クローニングに対しても信頼性が高くなった。そのため、本研究で得た全長cDNAの塩基配列の信頼性は極めて高いと考えている。

最後に RT-PCR 法の再現性について考察する。図 4～図 7 が RT-PCR 法の結果である。ディファレンシャル・ディスプレイ法によってクローニングした遺伝子の発現については、RT-PCR 法あるいはノザン法により、遺伝子発現の差異を確認する必要がある。そのため、部分 cDNA の配列をもとにしてプライマーを合成し、図 4 においては、対象 (C) と赤土添加 (R) 処理後の組織から RNA を抽出し、RT-PCR 法により、Hsp70 の遺伝子発現の差を確認したものである。図 4 の実験によって差異を確認する PCR 条件が確立したので、この条件を用いて、他のストレス条件、すなわち、高水温や低塩分の条件において同様の実験を行った結果が図 7 である。さらに、赤土の濃度を下げた実験 (図 5) や赤土の暴露時間を変えた実験 (図 6) も同様に行った。この場合、赤土 10ppm においても Hsp70 の遺伝子発現は誘導されているが、200ppm における誘導ははっきりとしない。また、赤土暴露実験においても、30 分で薄いバンドが観察され、60 分において、より濃いバンドが検出されているが、120 分においてははっきりとしない。現在のところ、はっきりとしないバンドの原因は定かではないが、別途ノザン法などを試みて、今後さらに検討する予定である。

## (2) 本研究全体の考察

サンゴに影響を及ぼす環境要因としては、堆積物 (赤土など)、高水温、低塩分、紫外線、などが考えられる。例えば 1998 年に世界的に観察されたサンゴの白化現象は、異常な高水温によるものであった。また沖縄においては、陸域からサンゴ礁への赤土の流入が深刻な問題を引き起こしている。しかしながら、これら環境要因がサンゴに対し、どのような生理学的影響を与えているかについての研究例は少ない。サンゴ礁回復への戦略を立てるためには、サンゴの生理学的・生化学的な検討が重要である。そこで我々は遺伝子に着目し、環境ストレスを実験室内で再現し、ストレス条件下において特異的に発現する一群の遺伝子を網羅的に解析する手法を選択した。

ディファレンシャル・ディスプレイ法によって Hsp70 遺伝子が同定できたのは、結果的には幸運であった。ディファレンシャル・ディスプレイ法によって網羅的に遺伝子を同定しても、既知の遺伝子との相同性を見いだせないケースがほとんどだからである。実際、本課題では赤土によって誘導される遺伝子を 31 クローン得たが、このうち 30 クローンについては既知遺伝子との相同性は認められず、その機能も全く不明のままである。

Hsp70 遺伝子は多くの生物において同定され、その機能も明らかになっているとはいえ、各生物ごとに同定された条件は様々であり、多くの場合は栄養分の乏しい条件で特異的に発現する遺伝子として (グルコース調節タンパク: GRP) 同定されている。したがって、赤土の環境ストレスによって Hsp70 の遺伝子が誘導されたこと自体、生物学的にも貴重な知見である。

さて、Hsp70 遺伝子が同定され、定法である RACE 法により全長 cDNA が単離された結果として、何が明らかになったのであろうか。全長 cDNA の結果に加えて、RT-PCR 解析によって、ストレスごとに Hsp70 の発現が異なる結果をどのように評価できるのであろうか。「1. はじめに」の中でとりあげた 4 項目の各々に対して、今回の結果は回答を与えたであろうか。

### (1) サンゴが受けているストレスの種類を遺伝子から見分けられるか

これについては Yes である。RT-PCR の結果は、赤土ストレスおよび高水温ストレスには反応したが、低塩分のストレスには反応しなかった。

### (2) 遺伝子の発現量から、ストレスの度合いが推定できるか

これについては、予備的な結果から Yes であろう。赤土の濃度を変えて行ったときに、Hsp70 の発現量は変化していった。また、赤土に曝露した時間を変えた場合にも、発現量は変化していた。しかし、今回得られた結果はあまり明瞭なものとは言えず、今後詳細な検討が必要である。

(3) ストレスがサンゴに影響を及ぼすメカニズムが理解できるか

今回の赤土添加実験で得られたハナヤサイサンゴの Hsp70 は、カルボキシル末端に小胞体への輸送シグナルである RDEL 配列を有していた。小胞体はタンパク分泌の場である。赤土添加によって RDEL 配列を有する遺伝子が誘導されたということは、小胞体において何らかのタンパクの分泌量が増加したことを示唆している。つまり、サンゴは赤土に対抗するために、あるタンパクの分泌を増やす必要があり、それに伴って Hsp70 の量も増えた、ということである。もちろんこれだけでは、赤土がサンゴに影響を及ぼすメカニズムを解明したとは言えないが、今後検討を重ねていくことにより、そうしたメカニズムの理解は少しずつ進んでいくものと思われる。

(4) さらに、サンゴのストレス応答向上の方法が推測されるか

フィールドで最も求められることではあるが、現段階での回答はむずかしい。しかしながら、上記の(2)(3)で考察したような議論を踏まえると、例えば、ストレス反応性の高いサンゴ種を選択して集中的に増殖させ、サンゴ礁の回復を図る、などの方法が考えられる。そのためにも、他のサンゴ種における Hsp70 の解析も重要となろう。

本研究のような分子生態学的研究は、これまでサンゴについてはほとんど行われていなかった。しかし他の分野においては既に一般的な手法となっており、サンゴ礁研究においても将来的には主要な実験手法になるものと確信している。

## 6. 本研究により得られた成果

- ・ディファレンシャル・ディスプレイ法によるストレス特異的遺伝子のクローニング手法を確立した。
- ・沖縄で問題となっている赤土が、遺伝子レベルでサンゴに影響を及ぼすことを明確に示した。
- ・赤土に対して発現が誘導される遺伝子の部分 cDNA を 31 クローン得た。このうち既知の遺伝子配列との相同性が認められたのは 1 つ (pPd9-1) で、それはストレスタンパク Hsp70 に極めて良く似た配列を有していた。
- ・RACE 法により、赤土によって誘導される遺伝子 pPd9-1 の全長を決定することができた。

## 7. 引用文献

- 1) Schröder HC, Shostak K, Gamulin V, Lacorn M, Skorokhod A, Kavsan V, Müller WEG (2000) Purification, cDNA cloning and expression of a cadmium-inducible cysteine-rich metallothionein-like protein from the marine sponge *Suberites domuncula*. Mar Ecol Prog Ser 200:149-157
- 2) Fang LS, Huang SP, Lim KL (1997) High temperature induces the synthesis of heat-shock proteins and the elevation of intracellular calcium in the coral *Acropora grandis*. Coral Reefs 16:127-131

- 3) Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410
- 4) Martin KJ, Kwan C-P, O' Hare MJ, Pardee AB, Sager R (1998) Identification and verification of differential display cDNAs using gene-specific primers and hybridization arrays. *BioTechniques* 24:1018-1026
- 5) Tom M, Douek J, Yankelevich I, Bosch TCG, Rinkevich B (1999) Molecular characterization of the first heat shock protein 70 from a reef coral. *Biochem Biophys Res Commun* 262:103-108
- 6) Liang P, Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971
- 7) Momiyama T, Afele JC, Saito T, Kayano T, Tabei Y, Takaiwa F, Takayanagi K, Nishimura S (1995) Differential display identifies developmentally regulated genes during somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Biochem Biophys Res Commun* 213:376-382

#### 8. 国際共同研究等の状況

なし

#### 9. 研究成果の発表状況

##### (1) 誌上発表 (学術誌・書籍)

<学術誌 (査読あり)>

なし

<学術誌 (査読なし)>

- ①橋本和正、萱野暁明：バイオサイエンスとインダストリー、61、6、371-372(2003)

「ハナヤサイサングのストレス応答」

<書籍>

なし

<報告書類等>

- ①西海区水産研究所主要研究成果集第5号、p14-15(2002)

「赤土がサンゴの遺伝子発現に与える影響 (橋本和正、渋谷拓郎、阿部寧、高田宜武)」

##### (2) 口頭発表

- ①橋本和正、萱野英子、萱野暁明、渋谷拓郎、阿部寧、高田宜武：平成12年度日本水産学会春季大会 (2000)

「造礁サンゴの遺伝子発現に及ぼす赤土の影響」

- ②橋本和正、萱野英子、萱野暁明、渋谷拓郎、阿部寧、高田宜武：日本サンゴ礁学会第3回大会 (2000)

「赤土がハナヤサイサングの遺伝子発現に及ぼす影響」

- ③ K. Hashimoto, E. Kayano, T. Kayano, T. Shibuno, O. Abe and Y. Takada : 9th International Coral Reef Symposium, Bali Island, Indonesia, 2000

"Effects of sedimentation on gene expression of the scleractinian coral *Pocillopora damicornis*"

④橋本和正、萱野英子、萱野暁明、渋谷拓郎、阿部寧、高田宜武：日本サンゴ礁学会第4回大会（2001）

「赤土によって影響を受けるサンゴの遺伝子発現 ～そのクローニングと発現様式～」

⑤橋本和正、渋谷拓郎、阿部寧、高田宜武、萱野英子、田中行司、萱野暁明：第6回マリンバイオテクノロジー学会大会（2002）

「赤土はサンゴ hsp70 遺伝子の発現を誘導する」

⑥橋本和正、渋谷拓郎、阿部寧、高田宜武、萱野英子、田中行司、萱野暁明：日本生態学会第50回大会（2003）

「赤土によって誘導されるサンゴの遺伝子」

⑦ K. Hashimoto, T. Shibuno, O. Ahe, Y. Takada, E. Maruyama-Kayano, H. Tanaka and T. Kayano, 7th International Conference on Coelenterate Biology, Kansas, USA, 2003

"Gene expression analysis on the coral *Pocillopora damicornis*: characterization of mRNA induced by red soil"

(3) 出願特許

なし

(4) 受賞等

なし

(5) 一般への公表・報道等

なし

## 10. 成果の政策的な寄与・貢献について

サンゴ礁へ流入する赤土の問題は、沖縄の農林水産業における重要課題の一つである。本課題では赤土によって誘導されるサンゴの遺伝子を多数得ることができた。今後、これら遺伝子の発現特性の解析が進めば、それらは現場のサンゴのストレス状態を測る分子マーカーとして利用が期待される。つまり、海域ごとにサンゴのストレス状態を定量的に評価することができ、サンゴ礁への赤土対策を凶る上で有効な情報提供が可能となる。また本課題で開発した手法は、赤土以外の環境要因に対しても応用できる。したがって、赤土だけでなく様々な環境要因について、それに関連した政策決定に貢献することができる。