

研究助成 令和 5年度 報告書

公益財団法人 黒潮生物研究所
理事長 深田 純子 殿

作成日のみ記入して下さい

作成日 令和 6年 6月 27日
受領日 令和 6年 6月 30日

貴財団の研究助成により、下記の成果を上げましたので報告いたします

助成者対象者氏名	名村 有史
----------	-------

学生の方はこちらに記入してください

学校名	高知大学 大学院	学部 学科 講座 等	総合人間自然科学研究科 農林海洋科学専攻
学 年	修士 2年	区 分	修士研究
指導教官 氏 名	久保田 賢	指導教官の所属・職	高知大学 黒潮圏総合科学専攻・教授

一般の研究者の方はこちらに記入してください

所属		職名	
最終学歴		学位等	

研究課題名	タンパク質分析を用いた造礁性サンゴの熱ストレス指標の作成
助成を受けた研究内容について、学会等での発表、学術誌等への公表を行った場合には、下欄にその内容（講演の場合：学会名、期日、タイトル、発表者名等、著作の場合：著者、発行年月、タイトル、雑誌名等）を記入して下さい 第26回日本サンゴ礁学会（仙台）、2023年11月23-26日、「四国西南部に生息するクシハダミドリイシ（ <i>Acropora hyacinthus</i> ）の熱ストレスにより増減するタンパク質の検出」、名村有史、高木さくら、上井誠也、齋藤滉海、Sam Edward Manalili、目崎拓真、久保田 賢、ポスター発表 第26回日本サンゴ礁学会（仙台）、2023年11月23-26日、「Temporal variability of gene expression for HIF-1 α and its target genes in <i>Acropora hyacinthus</i> : a qPCR study under ramping heat stress」、Sam Edward Manalili、名村有史、高木さくら、齋藤滉海、上井誠也、目崎拓真、久保田 賢、口頭発表	

研究の内容(研究成果)報告書の作成要領

- ・別途研究成果をA4の用紙1枚にまとめて下さい。
- ・言語は日本語とします
- ・1行目に研究課題名、2行目に研究の実施者名(助成対象者名に○印をつける)を記入してください
- ・本文は図表、テキスト等、自由にレイアウトして結構です
- ・報告書は、Word、Excel、PowerPoint
Adobe-Photoshop、Adobe-Illustratorなどで表示可能なファイル形式で作成してください
- ・標準フォント以外のフォントは埋め込んで下さい
- ・成果報告書は当財団のホームページ等に公表しますので、著作権やデータの取り扱い等には十分ご注意下さい
- ・報告書(この紙と成果報告書の2枚)は、メールにて助成金担当の伊勢(ise@kuroshio.or.jp)までお送り下さい
- ・提出期限は2024年4月末日とする

タンパク質分析を用いた造礁性サンゴの熱ストレス指標の作成
○名村 有史, 久保田 賢 (高知大学 大学院 総合人間自然科学研究科)

【背景と目的】熱帯・亜熱帯に生息する造礁性サンゴ（以下サンゴ）は海の生態系を支える上で重要な役割を担っている。近年海水温上昇によるサンゴの大規模白化後の大量死滅が問題となっている。これまでこれらを再現する熱ストレス実験が多く行われてきた。サンゴのストレス応答は主に網羅的な mRNA 発現などに基づいて議論されていることが多い。これらはアノテーションが行われているものの、タンパク質の機能までは調べられていないものは少ない。そこで本研究では温帯に生息するクシハダミドリイシ (*Acropora hyacinthus*) の熱ストレスによるタンパク質の網羅的な発現検出を行い、熱ストレス応答関連タンパク質の性質について調べた。

【材料と方法】高知県大月町西泊で 5 群体のクシハダミドリイシを採取した。群体を枝分けし、計 2 週間馴化させた。対照区を 20°C に設定し、実験区は 1°C/日と 2°C/日で温度を上げ、その後 32°C を維持した。0, 2, 4, 6, 9, 12, 15 日目に枝の採取を行った。枝は液体窒素で瞬間冷凍または TRIzol 溶液に浸した。写真と Junior-PAM を用いて、明度を示す L*値と Fv/Fm を測定した。サンゴ断片重量の 4 倍量の“50 mM pH 6.8 Tris-HCl (未変性条件)”で抽出し、その沈殿を等量の“6% SDS, 6M 尿素, 50 mM pH 6.8 Tris-HCl (変性条件)”を用いて再抽出した。SDS-PAGE で分離後、CBB 染色で増減がみられたバンドの質量分析を行い、アミノ酸配列に基づくタンパク質の推定を行った。そのうち、他生物においてストレス時のバイオマーカーとして期待されている allene oxide synthase lipoxygenase protein (AOS-LOX) に注目した。アミノ酸配列と RNA-Seq で得られたコンティグを参考に AOS-LOX 様の特異的プライマーを設計した。TRIzol 溶液から全量 mRNA を精製し、cDNA を合成した。増幅断片を pGEM-T easy Vector に組み込み、AOS-LOX 様の全長のクローニングを行い、1 次構造の比較を行った。

【結果および考察】対照区と比較して、L*値の増加および Fv/Fm の減少が 1°C/日は 12 日目以降、2°C/日では 6 日目以降に観察された。未変性試料では、対照区と比較して 2°C/日のみ 25 kDa のバンドが 4 日目までに減少し、質量分析により、“cyan および green fluorescent protein (蛍光タンパク質)”の配列との類似が示された。変性試料の 20 kDa のバンドは 1°C/日で、35 kDa 以上の複数のバンドについては両実験区で、4 日目をピークに増加した。これらからは、それぞれ“ α -actinin1-like (細胞骨格)”と“AOS-LOX 様 (ストレス応答)” (20 kDa), “nuclear anchorage protein like-1 (核の固定)”と“golgin subfamily A-member4-like (小胞体輸送)” (35 kDa 以上) と似た配列が検出された。20 kDa の位置には、対照区のみ 15 日目に濃いバンドも見られ、“myosin regulatory light polypeptide 9-like (細胞骨格),” “Histone H2A (クロマチン)”の類似配列を示した。熱ストレスに伴い発現が増加した AOS-LOX 様は、クシハダミドリイシの RNA-Seq 解析によるコンティグおよびハイマツミドリイシの EST 解析で得られた塩基配列と類似配列を示した。

水槽実験では、実験区では 32°C に達する前に白化と光合成活性の低下が始まったと思われる。25 kDa の蛍光タンパク質は、急激な熱ストレスで発現の減少が促進されたと思われる。クローニングを行った AOS-LOX 様は Blast 検索からミドリイシ属で共通して発現していると思われた。機能の報告があるソフトコーラルの AOS-LOX とは多くの部分で配列に不一致がみられたが、ウェブサイト等の結果から LOX ドメインであると推測された。そのうち動物 LOX ではなく、植物 9-LOX と類似したことから褐虫藻由来であると思われた。LOX は多くの動植物で報告がありストレス応答、細胞死、老化などに関わっている。今後 9-LOX 様の機能を明らかにすることで、サンゴのストレス応答に関与していることを示すことができ、新たな熱ストレス指標として用いることができると考える。