

サンゴ HSP70 様 mRNA を用いた環境モニタリング法について

大城洋平, 金城孝一, 仲宗根一哉, 宮城俊彦

Environmental Monitoring Method for Coral Reefs with HSP70 mRNA of Coral

Yohei OSHIRO, Koichi KINJO, Kazuya NAKASONE, Toshihiko MIYAGI

要旨 : サンゴ礁海域中の様々な環境因子の負荷程度について評価するため, 枝状コモンサンゴ *Montipora.spp* の HSP70 様 mRNA を用いた環境モニタリング法について検討した. HSP70 様 mRNA の生産量は地域によって違い, また, 大度浜海域の一年を通じた調査結果では夏季により多く生産する傾向を示していた. HSP70 mRNA 応答は高温ストレスのほか人為的要因及び他の自然的要因など複合的な作用により応答したものと推察される.

Key words : 環境モニタリング法, 枝状コモンサンゴ, ストレス, HSP70 様 mRNA, リアルタイム PCR, 定量

I はじめに

健全なサンゴ礁生態系を保全する上で, サンゴの生息環境の変化を早期に察知することは重要なテーマである. そこで, 筆者らは, 環境の変化に対しサンゴが生産するストレス応答物質に着目した. サンゴは生息環境の変化に伴い, 様々なストレス応答物質を生産することによって順応していることが知られている. したがって, ストレス応答物質の動態を知ることにより, 環境負荷の状態を把握し, 早期に原因ストレスに対して有効な対策を講じることが可能となる. しかし, ストレス応答物質の定量は, 微量分析であるため, 技術的に困難な場合が多い. 一方, 生物の生理応答の研究に関する手法として, 近年遺伝子レベルの研究が広く展開しつつあり, ストレス応答物質の生産量を間接的に把握することが可能となっている. そこで今回, 枝状コモンサンゴですでに報告しているリストレス応答物質 HSP70 様 mRNA を定量し,

その mRNA を用いた環境モニタリング法について検討したので報告する.

II 方法

1. 材料

沖縄本島周辺海域(糸満市大度, 本部町瀬底), 阿嘉島(慶良間諸島)周辺海域(図 1)にて海域環境調査を実施し, 供試サンゴを採取した. 対象は枝状コモンサンゴ(図 2)とし, サンゴ片 5mm 程度を採取し現場で直接 ISOGEN(1ml)に入れ, 瞬時に生物機能を停止させた.

2. 方法

ISOGEN で固定したサンプルを AGPC 法にて全 RNA 抽出を行った(図 3). 次に, 混在する DNA を除去するため DNase 処理を行う. 抽出した全 RNA 5 μ g に 1U(ユニット)DNase 1 μ l, 10 \times Buffer 5 μ l を加え, 50 μ l のスケールに RNase free water で調整して図 4 のとおり処理を行った.



図 1. 沖縄本島(右), 阿嘉島周辺海域(左)



図 2. 枝状コモンサンゴ *Montipora.spp*

そして得られた全 RNA 0.1 μg を用いて、5×PrimeScript Buffer 2 μl, PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5 μl, 50 μM Oligo dT Primer 0.5 μl, 100 μM Random 6 mers 0.5 μl, RNase free water でスケール 10 μl とし、37°C・15 分、99°C・5 分の条件で cDNA を作製する(PrimeScript RT reagent Kit TaKaRa 社). 合成した cDNA 2 μl に、2×SYBR Premix EX Taq 25 μl, 10 μM Forward Primer 1 μl, 10 μM Reverse Primer 1 μl, 50×ROX Reference Dye 1 μl, DNase free water でスケール 50 μl とし、95°C・10 秒を 1 サイクル、95°C・5 秒、60°C・30 秒を 40 サイクル行う(SYBR Premix EX Taq TaKaRa 社). Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System(Applied Biosystems 社)を使用し て HSP70 様 mRNA 生産量の定量解析を行った。



図 3. 全 RNA 抽出方法

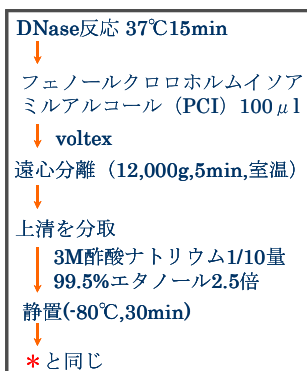


図 4. DNase 処理

定量法は細胞内に一定量存在しているとされているハウスキープ遺伝子(elongation factor 1-α 及び β-tubulin) を内在性コントロールとして用いた相対定量法を採用し、HSP70 様 mRNA 量を比較 Ct 法²⁾により求めた。

比較 Ct 法では、PCR 増幅サイクルによる 1 サイクルの検出の違いで、2 倍量の差であるという理論を使用するため、下記式にしたがって、相対定量を行った。

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3. 計算方法

上記式を求めるには、
 $\Delta Ct = \text{ターゲット遺伝子} \div \text{内在性コントロール遺伝子}$ (乗数の割り算は引き算)

$$\therefore \Delta Ct = \text{ターゲット遺伝子 Ct} - \text{内在性コントロール Ct}$$

$\Delta \Delta Ct = \text{各サンプル} \div \text{キャリブレーションサンプル}$ (乗数の割り算は引き算)

$$\therefore \Delta \Delta Ct = \text{各サンプル} \Delta Ct - \text{キャリブレーションサンプル} \Delta Ct$$

キャリブレーションサンプルは ΔCt 値の最も低いサンプルを選び、それを 1 とした濃度比で他サンプルの mRNA 量を表した。

III 結果および考察

各調査海域の環境状況を表 1, 2 に、サンゴの HSP70 様 mRNA 生産量の比を図 5 に示した。なお、elongation factor 1-α (EF1-α), β-tubulin の 2 つの内在性コントロール遺伝子を用いて HSP70 様 mRNA 生産量を解析した。

1. 大度浜海域

2006 年 6 月—2007 年 5 月の間、調査を実施した。大度浜海域で優占して見られたサンゴはミドリイシ科 *Acroporidae* やヒラフキサンゴ科 *Agariciidae* 等である。HSP70 様 mRNA 生産量の調査結果では、年間を通して夏季により多く生産する傾向を示していた。

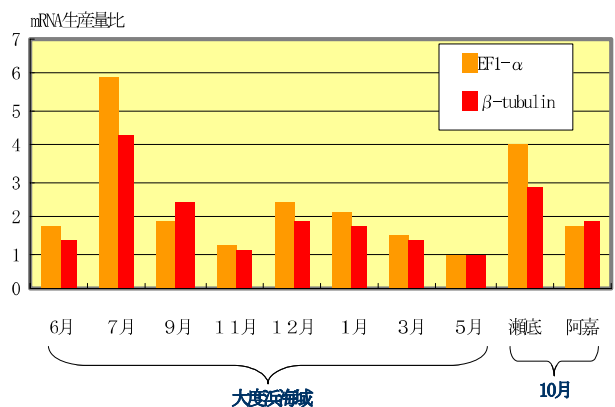


図 5. 海域環境中の枝状コモンサンゴ HSP70 様 mRNA 生産量の比

各サンプルの HSP70 様 mRNA 生産量比は、大度浜海域における 5 月を基準として示した。サンプルの詳細は、表 1 に示す。

2. 瀬底海域

2006年の10月3日に調査を実施した。瀬底海域の生サンゴはほとんどなくソフトコーラルが優占していた。HSP70様 mRNA 生産量は、他海域の同時期の生産量に比べ、若干多く生産していた。

3. 阿嘉島周辺海域

阿嘉島のヤカラハマ海域にて、2006年10月に調査を実施した。ヤカラハマ海域では浅瀬に枝状コモンサンゴが優占して見られた。HSP70様 mRNA 生産量は、瀬底海域に比べて少なく、大度浜海域の秋～春の生産量と同程度であった。ヤカラハマ海域は、陸側からのアクセスが難しいことから人為的攪乱等も少なく、陸起源の汚濁負荷の影響も少ないためと考えられる。

サンゴ礁海域中の様々な環境因子の負荷程度が、HSP70様 mRNA の生産量に反映されることを利用した環境モニタリングでは、地域により HSP70 様 mRNA の生産量に違いが見られた。また、大度浜海域については、一年を通じた調査によって夏季により多く HSP70 様 mRNA を生産していた。HSP70 mRNA は高温ストレスによって生産されること

は知られているが、大度浜海域の場合、人為的要因および他の自然的要因によっても影響を受けていることから、HSP70 様 mRNA はこうした要因の複合的な作用により応答したものと推察される。

今後は、ストレス要因を特定できるような指標を抽出する必要がある。しかし、HSP70 様 mRNA は高温ストレスや赤土ストレス³⁾など種々の環境因子に応答するため、本調査の結果では、ストレス因子を判別することは難しい。各種ストレスに対し、特異的に発現する遺伝子の検索も進めて行く必要がある。また、試験操作においても検討すべき事項が多々残されており、今後、分析精度の向上と基礎データの収集を継続していく必要がある。サンゴのストレス応答を用いた環境評価の手法は、将来的にはサンゴ礁のモニタリングの中で、サンゴの健全度を示す項目として利用され、サンゴ礁生態系の保全に効果的に役立つものと期待できる。

IV まとめ

1. elongation factor 1- α (EF1- α), β -tubulin の2つの内在性コントロール遺伝子を用いて海域環境中の枝状コモンサンゴ HSP70 様 mRNA の生産量を解析した。

表 1. サンプル採取海域の環境状況

海域	環境の詳細	SPSS ^{*)} kg/m ³	全窒素mg/L
大度	赤土等および湧水の影響(栄養塩負荷)を受ける。	6月 19.9 10月 3.4	2006.6月 0.12-0.19 2005.5月-2006.3月 0.08-0.16(参考)
瀬底	干潮時に湧水の影響(栄養塩負荷)を受ける。		0.05-0.11
阿嘉	人為的影響がほとんどない。	4.3-7.1	0.03

^{*)} SPSS : 海域における底質中懸濁物質含量(赤土堆積の目安)

表 2. サンプル採取時の気象

海域	採取日	水温(°C) ^{**)}	外洋水温(°C) ^{***)}	気温(°C) ^{§)}	天気等の詳細	日照時間(hr) ^{§)}
大度	2006.6.30	-	29	29.7	6.20に梅雨が明け、その後高気圧の範囲内で晴れが続いた。	9.9
	7.31	31.5	30-31	31.7	7月上旬に台風到来、下旬の1週間は晴れが続いた。	9.0
	9.12	29.8	29	30.1	9月上旬は前線の影響を受け、雨や曇りの天気が続いた。	7.2
	11.16	23.6	26	21.2	11月上旬は気圧の谷の影響を受けるが、晴れる日もあった。	1.7
	12.12	24.3	24	22.6	12月上旬は気圧の谷の影響を受け、雨の多い天気であった。	5.7
	2007.1.23	20	22	18.3	1月上旬に強い寒気や前線の影響を受けた。	4.2
	3.23	-	23	25.8	3月上旬は前線の影響を受け、雨の多い天気であったが後半は晴れる日もあった。	4.3
	5.9	24	25	23.0	4月下旬に前線の影響を受け雨の多い天気であったが5月に入り晴れの多い天気が続いた。	11.0
瀬底	2006.10.3	27.8	29	26.9	9月中旬に台風が到来した。	1.3
阿嘉	2006.10.25	-	27	25.2	10月中旬は高気圧の範囲内で晴れが続いた。	7.5

^{**)} サンプル採取時の水温

^{***)} 月単位の外洋水温の平均^{§)}

2. 地域により HSP70 様 mRNA の生産量に違いが見られた。また、大度浜海域については、一年を通した調査によって夏季により多く HSP70 様 mRNA を生産していた。
3. HSP70 様 mRNA は複合的な作用により応答したものと推察される。

<謝辞>

本調査を遂行するにあたりご助言頂きました橋本和正氏(農林水産省), 故渡邊俊樹准教授(東京大学海洋研究所)に心より感謝申し上げます。

本調査は、内閣府事業「亜熱帯島嶼域における統合的沿岸・流域・森林管理に関する研究」の一部である。

V 参考文献

- 1) 大城洋平, 金城孝一, 仲宗根一哉, 宮城俊彦(2007)赤土等負荷によるエダコモンサンゴのストレス応答の確認. 沖縄県衛生環境研究所報, 41 : 123-126
- 2) アプライドバイオシステムズ「今だからこそリアルタイム PCR」
<http://www.appliedbiosystems.co.jp/website/jp/home/index.jsp>
- 3) Hashimoto K., Shibuno T., Murayama-Kayano E., Tanaka H and kayano T(2004)Isolation and characterization of stress-responsive genes from the scleractinian coral Pocillopora damicornis. Coral Reefs 23:485-491
- 4) 海況案内人
http://www.esl.co.jp/webgis/on_kaikyo/
- 5) 気象庁
<http://www.okinawa-jma.go.jp/>