

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82708

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660164

研究課題名(和文) シャコガイ種苗生産の安定化を目指した共生褐虫藻の生態学的特性と遺伝的多様性の把握

研究課題名(英文) Understanding of the ecological characteristics and genetic variation of symbiotic zooxanthellae within giant clam for stable seed production of giant clam species

研究代表者

山下 洋 (Yamashita, Hiroshi)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・西海区水産研究所・研究員

研究者番号：00583147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シャコガイ類に共生する褐虫藻の遺伝子型組成を把握したところ、ヒメジャコは clade A の褐虫藻を単独で共生させる場合が多かった。一方でヒレジャコは複数の clade の褐虫藻を同時に共生させる場合が多く、またその多様性は殻長が小さいほど高い傾向があった。また、ヒレジャコ幼生は褐虫藻を餌としても利用している可能性が示唆された。これらの情報を基に、小型ヒレジャコ由来の遺伝的多様性が高いと思われる褐虫藻群を頻繁にヒレジャコ幼生に与えたところ、従来よりも高い共生成立率を得た。

研究成果の概要(英文)：We investigated Symbiodinium clade compositions within two giant clam species, *Tridacna crocea* and *Tridacna squamosa*, maintained in the same outdoor pond. Most of *T. crocea* harbored only clade A Symbiodinium, whereas multiple clades were detected within most of *T. squamosa*. In the case of *T. squamosa*, along with increasing the clam size, the main dominant clade shift clade A to C, and decreases in Symbiodinium genetic diversity. In the laboratory experiment using *T. squamosa* larvae, there is an increased mortality rate of the larvae when stopped Symbiodinium cell supply. We then introduced these information to seed production of *T. squamosa*. Namely, Symbiodinium that is considered to have high genetic diversity squeezed out from small *T. squamosa* was supplied constantly to *T. squamosa* larvae. The symbiosis rate of this method was about two times higher than that of traditional method.

研究分野：微細藻類学・共生生物学・生物海洋学

キーワード：増養殖 水産学 生態学 共生生物学 生物圏現象 褐虫藻 シャコガイ 種苗生産

1. 研究開始当初の背景

シャコガイ類は熱帯・亜熱帯のサンゴ礁海域に生息する大型の二枚貝であり、当該海域に暮らす人々に古くから利用されてきた重要な水産資源である。しかし近年、天然のシャコガイ類の資源量は著しい減少傾向にある。そのため、沖縄県ではシャコガイ類の種苗生産が実施されているが、種苗の安定供給には至っておらず、安定的効率的な種苗生産技術の開発が求められている。シャコガイ類は体内に褐虫藻と呼ばれる *Symbiodinium* 属の渦鞭毛藻を共生させ、自身の生存・成長に利用している。したがって、シャコガイ類にとって褐虫藻は必須の存在であるが、シャコガイ類は生まれた直後は褐虫藻を持たない。そのため、シャコガイ類は幼生期に環境中から褐虫藻を獲得して共生関係をスタートする。種苗生産現場においては人工的に両者の共生関係を成立させる必要があるため、主に成体のシャコガイから褐虫藻を絞り出して幼生に与えている。しかし共生成立率は極めて低く、この時点で多くの幼生が死滅してしまう。ここで、成体の持つ褐虫藻が幼生にも有用なのか、飼育下での共生不成立の原因は幼生に有用な褐虫藻が供給できていないからではないか、といった疑問がわくがシャコガイ類と褐虫藻との共生関係に関する知見は著しく不足していたため、これらの疑問に答えることはできなかった。そこで、まずシャコガイ類にどのような褐虫藻が共生しているのかを理解し、その結果を基に種苗生産現場で使用する褐虫藻を特定できれば、高い共生成立率の達成と安定化につながるのではないかと、という着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、シャコガイ類種苗生産の安定化・効率化の最大の障壁となっているシャコガイ類と褐虫藻との共生不成立による極めて高い初期減耗を解消するため、シャコガイ類と褐虫藻の共生関係を正しく理解し、飼育下で効率よくシャコガイ幼生に共生する褐虫藻を特定することを目的としている。具体的には、まずシャコガイ類にはどのような遺伝子型の褐虫藻が共生しているのか、またその組成はシャコガイの種やサイズにより変化するのか、などを明らかにする。さらにその情報を基に、シャコガイ類から単離培養した褐虫藻培養株を用いた室内実験を実施し、シャコガイ類幼生に共生しやすい褐虫藻の特定を目指す。

3. 研究の方法

(1) シャコガイ類にはどのような褐虫藻が共生しているのか? (H26年度)

褐虫藻は形態的特徴に乏しいが、遺伝的には極めて多様な藻類である。褐虫藻は現在、clade A-I の9つの大きなグループに分けられ、それぞれの clade は type と呼ばれる 100 を超えるさらに細かな遺伝子系統群で構成

される。過去のシャコガイ類に関する研究や我々の予備調査の結果から、シャコガイ類には clade A, C, D の褐虫藻が共生することが明らかとなっている。本研究では、シャコガイ類と褐虫藻との共生関係の詳細を明らかにする一環として、まずシャコガイ類の種やサイズによって共生する褐虫藻組成が変化するのか、遺伝子解析により明らかにする。ここでは、周辺環境変化の影響を除外するため、同じ場所で長期間飼育されていた様々な大きさの2種のシャコガイ類(ヒレジャコとヒメジャコ)を対象とした。両種ともに約100個体の殻長を計測した後、外套膜の一部を切り取りホモジナイズすることで体内に共生していた褐虫藻の試料を得た。褐虫藻試料からDNAを抽出し、共生していた褐虫藻の遺伝子型組成をシャコガイ個体ごとに明らかにした。

(2) シャコガイ類は取り込み時に褐虫藻を選ぶか? (H27年度)

前年度の調査結果から、ヒレジャコには clade A, C, D の褐虫藻が共生するが、殻長が小さい方が共生する褐虫藻の遺伝子型組成が多様であることを明らかにした。そこで、clade A, C, D の褐虫藻培養株をヒレジャコ幼生に与え、それぞれの取り込みの違いや生残率などを室内実験で観察した。

(3) ヒレジャコ種苗生産現場での実証試験 (H28年度)

平成26年度および平成27年度に実施したヒレジャコを用いた本研究の成果から、ヒレジャコは殻長が小さいほど多様な褐虫藻を共生させること、幼生は褐虫藻を餌としても利用している可能性があることを明らかにした。そこで、本来平成27年度で終了予定であった本研究を平成28年度まで延長し、得られた成果をシャコガイ種苗生産の現場に応用して実証試験を試みた。すなわち、褐虫藻の遺伝的多様性が高いと考えられる殻長の小さなヒレジャコから褐虫藻を絞り出し、これをヒレジャコ幼生が飢餓とならないように何度も繰り返し与える新手法と従来の方法で飼育したヒレジャコ幼生の生残率(共生成立率)を比較した。

4. 研究成果

(1) シャコガイ類にはどのような褐虫藻が共生しているのか? (H26年度)

ヒメジャコ・ヒレジャコそれぞれ93個体ずつに共生する褐虫藻の遺伝子型組成を調べたところ、シャコガイ類の種によって共生する褐虫藻の組成に差異が見られた。すなわち、ヒメジャコにおいては clade A のみを共生させる個体が61個体、Cのみを共生させる個体が17個体、AとCを同時に共生させる個体が15個体であったが、ヒレジャコの場合、Aのみが10個体、Cのみが17個体、AとCを同時に共生させるのが39個体、C

と D を共生させるのが 5 個体, A と C と D を同時に共生させるのが 22 個体となった。ヒメジャコの場合, A を単独で共生させる個体が最も多い一方で, ヒレジャコは複数の clade の褐虫藻を同時に共生させる個体が多かった。それぞれの種のシャコガイ 1 個体中の褐虫藻組成とシャコガイ類の殻長の関係は図 1 のようになった。

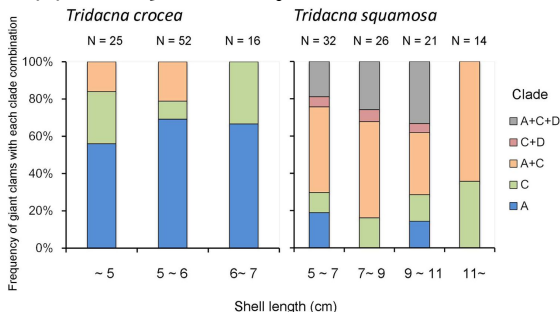


図1. *Tridacna crocea*(ヒメジャコ)と*Tridacna squamosa*(ヒレジャコ)の殻長とそれぞれの遺伝子型組成の褐虫藻をもつ個体の出現割合 (doi:10.1371/journal.pone.0172285.g002)

これを見ると, ヒレジャコにおいては殻長が大きくなるにつれて褐虫藻の遺伝子型組成の多様度が失われていくようにみえた。これをより詳細に明らかにするために, 解析したヒレジャコの全ての個体に関して, 体内で最も優占していた clade をヒレジャコの殻長ごとにプロットし, データを基に各 clade の出現の期待値に関するロジスティック曲線を得た (図 2)。

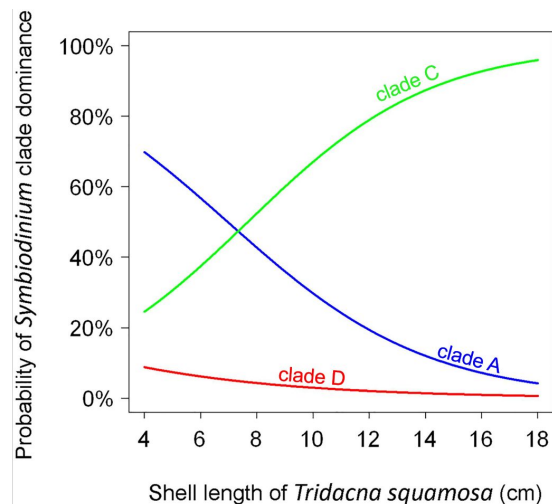


図2. *Tridacna squamosa*(ヒレジャコ)の殻長とそれぞれのcladeの褐虫藻が優占する期待値のロジスティック曲線 (doi:10.1371/journal.pone.0172285.g004)

これを見ると, ヒレジャコの場合は殻長が小さいうちは多様な褐虫藻をもつ可能性が高いが, 殻長が大きくなるにつれてその多様性は失われ, clade C が優占する個体が多くなると考えられる。

本研究により, シャコガイ類は種によって共生させる褐虫藻の clade 組成が異なり, またヒレジャコにおいては殻長によってもその組成が異なることが明らかとなった。これらの結果は雑誌論文の 1 ですでに公表済みである。また, ここで得られた結果は高感度で褐虫藻の clade を検出可能な定量 PCR によ

り得られたものだが, より簡便にシャコガイ類内の褐虫藻 clade 組成を調べることが可能なマルチプレックス PCR 用のプライマーも開発し, ヒレジャコ試料から clade A, C, D の褐虫藻を検出可能であることを雑誌論文の 2 で公表済みである。

(2) シャコガイ類は取り込み時に褐虫藻を選ぶか? (H27 年度)

ヒレジャコは殻長が小さいと多様な褐虫藻(clade A, C, D)を持つことが明らかとなった。次に, ヒレジャコからよく検出される clade A のうち type A3 と A6 の培養株, 及び clade C と D の培養株の 4 株をそれぞれヒレジャコ幼生に添加し, その取り込みを観察した。その結果, 各培養株の褐虫藻細胞を取り込んだ幼生の割合は, A3 添加区で 15.9±8.8%, A6 添加区で 26.0±14.6%, C 添加区で 34.3±28.9%, D 添加区で 25.2±14.8% となり, 全ての培養株で取り込みが確認されたため, ヒレジャコは取り込み時に褐虫藻を選んでいる可能性は低いと考えられた。一方で, 各培養株添加区及び褐虫藻を添加しなかった区の幼生の死亡率は図 3 のようになった。

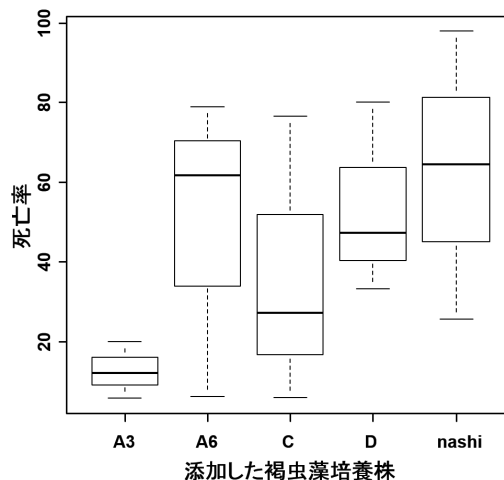


図3. ヒレジャコ幼生に遺伝子型A3, A6, C, Dの褐虫藻培養株を添加した場合と褐虫藻の添加を行わなかった場合の幼生の死亡率

褐虫藻を添加しない区でやや死亡率が高い様に見えるが統計的な有意差は見られなかった。一方で, その後褐虫藻の添加をストップしたところ, 全ての実験区で死亡率が高くなったため, ヒレジャコ幼生は褐虫藻を餌としても利用していることが示唆された。

(3) ヒレジャコ種苗生産現場での実証試験 (H28 年度)

本来であれば, 本研究は平成 27 年度で終了の予定であったが, 上記(1)と(2)の結果から当初考えていた特定の遺伝子型の褐虫藻を添加するよりも, 様々な遺伝子型の褐虫藻を絶え間なく与え続けることにより, ヒレジャコ幼生の初期生残率が向上する可能性がある。これを確かめるため, 平成 28 年度まで補助事業期間を延長し, 実証試験を試みた。すなわち, 褐虫藻の遺伝的多様性が高いと考

えられる殻長の小さなヒレジャコから褐虫藻を絞り出し、これをヒレジャコ幼生が飢餓とならないように繰り返し何度も与える新手法と殻長が中型のヒレジャコ由来の褐虫藻のみを使用する従来の方法で飼育したヒレジャコ幼生の生残率（褐虫藻との共生成立率）を実際の種苗生産時と同様の規模（5kL水槽）で比較した。その結果、図4に示すように従来法に比べて新手法の方が2週間後の生残率が2倍程度高くなった。

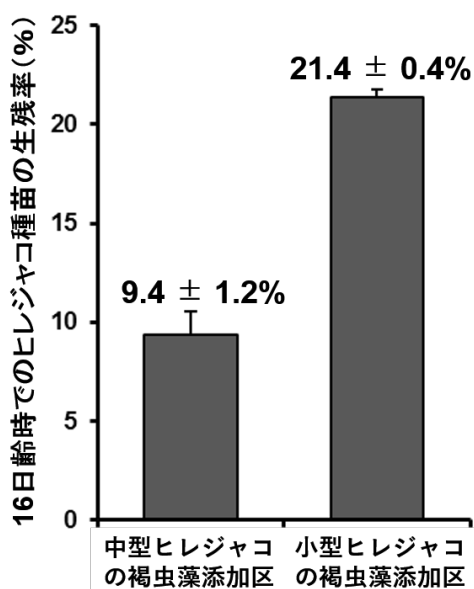


図4. ヒレジャコ幼生に中型のヒレジャコ由来の褐虫藻を添加する従来法と小型のヒレジャコ由来の褐虫藻を添加する新手法の幼生の生残率(初期は111万個体/水槽で幼生を収容)

以上、本研究の実施により、シャコガイ類と褐虫藻との共生関係に関する知見が蓄積され、さらにその結果をシャコガイ類種苗生産時に効果的な褐虫藻添加手法に活用することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Shota Ikeda, Hiroshi Yamashita, Shi-nobu Kondo, Ken Inoue, Shin-ya Morishima, Kazuhiko Koike (2017) Zooxanthellal genetic varieties in giant clams are partially determined by species-intrinsic and growth-related characteristics. PLoS ONE. 12(2):e0172285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172285>. 査読有.
2. Shota Ikeda, Hiroshi Yamashita, Lawrence M. Liao, Kazuhiko Koike (2016) A simple and rapid determination method for zooxanthellal genetic diversity in giant clams using multiplex

PCR. Fisheries Science. 82:747-753. 10.1007/s12562-016-1004-x. 査読有.

〔学会発表〕(計3件)

1. 山下洋, 南洋一, 近藤忍, 井上顕, 小池一彦. 効率的なヒレジャコ種苗生産のための褐虫藻添加手法. 平成29年度日本水産学会春季大会. 2017年03月27日. 東京海洋大学品川キャンパス(東京都港区)
2. 森島慎也, 向井春摩, 池田正太, 小池一彦, 近藤忍, 南洋一, 山下洋. シャコガイの「種」と「成長」が、共生する褐虫藻の遺伝的多様性を左右する. 平成28年度日本水産学会春季大会. 2016年03月28日. 東京海洋大学品川キャンパス(東京都港区)
3. 池田正太, 山下洋, 近藤忍, 小池一彦. シャコガイに共生する褐虫藻の多様性. 第17回日本サンゴ礁学会. 2014年11月27日. 高知城ホール(高知県高知市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 洋 (Hiroshi Yamashita)
国立研究開発法人 水産研究・教育機構・西海区水産研究所・研究員
研究者番号: 00583147

(2)研究分担者

小池 一彦 (Kazuhiko Koike)
広島大学・生物圏科学研究科・教授
研究者番号: 30265722

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

近藤 忍 (Shi-nobu Kondo)

沖縄県水産海洋技術センター

南 洋一 (Yoichi Minami)

沖縄県水産海洋技術センター

井上 顕 (Ken Inoue)

沖縄県水産海洋技術センター

池田 正太 (Shota Ikeda)

広島大学

長田 大輝 (Hiroki Osada)

広島大学

森島 慎也 (Shin-ya Morishima)

広島大学

向井 春摩 (Kazuma Mukai)

広島大学