

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14611

研究課題名(和文) サンゴと褐虫藻との種特異的な共生関係を生み出す因子の特定

研究課題名(英文) Identification of factors regulating the species specificity in coral-algae symbiosis

研究代表者

高橋 俊一 (TAKAHASHI, Shunichi)

基礎生物学研究所・環境光生物学研究部門・准教授

研究者番号：80620153

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)：渦鞭毛藻の中にはサンゴなどの海産無脊椎動物の細胞の中に共生できる種(Symbiodinium)が存在する。Symbiodiniumは遺伝的に異なる9つのグループ(Clade)に分かれ、それぞれのグループにはさらに異なるタイプが存在する。それぞれのタイプの褐虫藻は、任意のサンゴ種とのみ共生関係を結ぶことが知られているが、その種特異性を決める因子は不明であった。本研究では、細胞サイズの異なる褐虫藻種を用いて実験を行い、共生の可否は「褐虫藻の細胞サイズ」と「サンゴの許容褐虫藻サイズ」とで決まることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Many cnidarians, including reef-building corals and sea anemones, harbor endosymbiotic dinoflagellate (genus Symbiodinium), and each host species typically associates with specific Symbiodinium phylotypes. Here we propose a new model to explain the symbiont specificity for the host in cnidarian-dinoflagellate symbiosis.

We examined the relationship between infectivity and cell size of different cultured Symbiodinium strains using a model cnidarian host, sea anemone Aiptasia. Results showed that, of the fifteen Symbiodinium strains tested, the largest four strains failed to infect. Further experiments using two different coral species demonstrated that the acceptability of large-sized Symbiodinium strains differs between coral species. These results demonstrate that species specificity is determined by the cell size (symbiont) and the maximum threshold for symbiont cell size (host).

研究分野：生物学

キーワード：共生 種特異性 サンゴ 褐虫藻

1. 研究開始当初の背景  
造礁サンゴには渦鞭毛藻の一種の褐虫藻 (*Symbiodinium*) が細胞内共生しており、この共生関係により生物多様性に富んだサンゴ礁生態系が支えられている。褐虫藻には遺伝的に異なるタイプ(種)が多く存在し、その違いで生理的特徴が異なっている。そのため、生育環境に適した褐虫藻種を取り込むことは宿主のサンゴにとって重要である。しかし、サンゴと褐虫藻との共生関係には種特異性があり、それぞれのサンゴ種は任意の褐虫藻種とのみ共生関係を結ぶことができる。種特異性の現象に関しては多くのデータがある一方、何がこの特異性を生み出すのかに関しては全く分かっていなかった。

2. 研究の目的  
本研究では、イソギンチャク - 褐虫藻のモデル共生系を用いて種特異性に関わる因子を特定した後、サンゴでの検証研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法  
(1) **褐虫藻サイズと感染速度 (感染の可否を含む) との関係。**カルチャーコレクションより入手した褐虫藻株 (15 株) の細胞サイズを自動セルカウンター (Cellometer Auto X4, Nexcelom 社製) で測定し、それぞれの褐虫藻が宿主 (イソギンチャク: *Aiptasia*) に感染するまでの日数を調べた。感染実験は、褐虫藻を持たない状態のイソギンチャクに、それぞれの褐虫藻株を加えて行った。共生の成立は、実体蛍光顕微鏡 (MZ FLIII, Leica) を用いて、褐虫藻から出るクロロフィル蛍光を指標に確認した。褐虫藻を加えて 40 日後にも共生が確認できなかった場合、共生が起こらなかったと判断した。

(2) **ビーズのサイズが食作用 (宿主細胞内への取込み速度) に与える影響。**異なるサイズの蛍光ビーズ (直径が 6.3 と 10.4 と 11.4  $\mu\text{m}$  のもの) を用い、蛍光ビーズが宿主細胞に取り込まれる速度を調べた。実験には褐虫藻を共生させたイソギンチャクを用いた (ビーズが褐虫藻と同じ場所の細胞に取り込まれたかを確認するため)。蛍光ビーズの取り込み速度は、蛍光実態顕微鏡を用い、ビーズから出る蛍光を指標に行った。また、ビーズが褐虫藻と同様に細胞内に取り込まれたかを確認するために、共焦点蛍光顕微鏡 (LSM780, Zeiss) を用いて、褐虫藻由来のクロロフィル蛍光とビーズ由来の蛍光が触手の同じ組織に存在するかを調べた。

(3) **褐虫藻サイズと感染速度 (感染の可否を含む) との関係をサンゴで確認。**実験には、褐虫藻をもたない状態の *Acropora tenuis* と *Cyphastrea serailia* の幼ポリプを用いた。それぞれの幼ポリプは、放卵直

後に回収した受精卵から変態させた。感染実験は、イソギンチャクを用いた場合と同じで、感染までの日数を実体蛍光顕微鏡を用いて調べた。

(4) **網羅的なデータ収集。**カルチャーコレクションよりさらに 36 株の褐虫藻を入手し、遺伝型と細胞サイズの間を調べた。細胞サイズは自動セルカウンターで測定した。

4. 研究成果  
(1) **褐虫藻サイズと感染速度 (感染の可否を含む) との関係。**入手した 15 株の褐虫藻の細胞サイズ (直径) を測定したところ、株ごとにサイズの平均が 6.7 から 11.0  $\mu\text{m}$  までの範囲で異なっていた。次に、それぞれの株の感染速度を調べた結果、15 株中 11 株で感染が確認され、感染が確認された褐虫藻株間で感染速度に違いが見られた (図 1)。細胞サイズと感染速度との関係を調べた結果 (図 1)、感染できた 11 株はいずれも細胞サイズが 10  $\mu\text{m}$  以下で、感染できなかった 4 株はいずれも細胞サイズが 10  $\mu\text{m}$  以上であった。また、細胞サイズが小さい株はいずれも早い段階で感染が成立し、細胞サイズがやや大きい株では、感染速度が細胞サイズの小さい株に比べ遅く、さらに速度のばらつきがみられた。これらの結果は、褐虫藻の細胞サイズが「感染の可否」や「感染速度」に影響する可能性を示唆する。

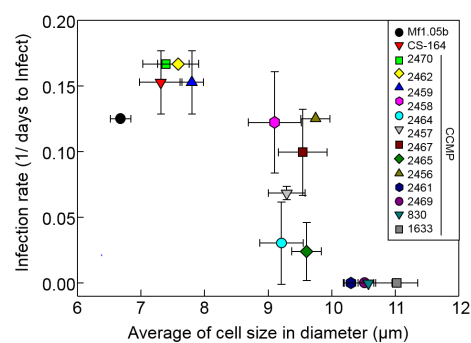


図 1 褐虫藻サイズと感染速度との関係。

(2) **ビーズのサイズが食作用 (宿主細胞内への取込み速度) に与える影響。**サイズが宿主細胞内への取り込みに与える影響をサイズの異なる蛍光ビーズで調べた。その結果 (図 2)、小さな蛍光ビーズ (6.3  $\mu\text{m}$ ) は 6 時間後に取り込みが見られ、2 日後には触手全体が蛍光ビーズで緑に光っているのが観察された。やや大きめのビーズ (10.4  $\mu\text{m}$ ) では、取り込みは確認できたが、小さいビーズに比べて取り込み速度が遅く、2 日後に取り込まれたビーズの数も少なかった。一方、大きいビーズ (11.4  $\mu\text{m}$ ) では、ビーズの取り込みはほとんどみられなかった。

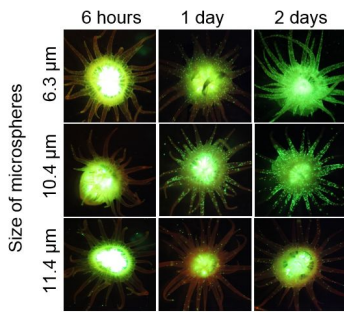


図2 サイズが取り込み速度に与える影響。

次に、実験に用いた蛍光ビーズが実際に宿主の細胞内に取り込まれていることを確認するために、共焦点蛍光顕微鏡を用いて、蛍光ビーズの局在を調べた。その結果、触手の内側の褐虫藻が共生している細胞の層に蛍光ビーズ(6.3 μm)が存在していることが確認できた(図3)。この結果は、蛍光ビーズが褐虫藻と同様に宿主細胞に取り込まれていることを示している。

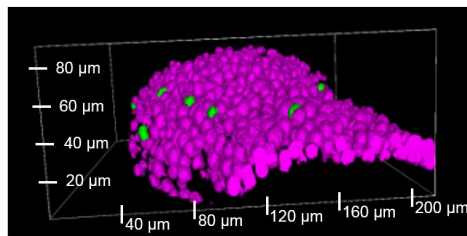


図3 取り込まれたビーズの局在。紫: 褐虫藻からのクロロフィル蛍光。緑: ビーズからの蛍光。

(3) 褐虫藻サイズと感染速度(感染の可否を含む)との関係をサンゴで確認。細胞サイズの異なる褐虫藻(11株)を用い、イソギンチャクと同様な感染実験をサンゴ(2種)で行った。*A. tenuis* では、イソギンチャクの結果同様、感染が成立した褐虫藻株はいずれも細胞サイズが10 μm以下で、それ以上のサイズの褐虫藻株では感染は確認できなかった。一方、*C. serailia* では、感染速度が遅かったが大きな細胞サイズの褐虫藻株でも感染が確認できた。これらの結果は、サンゴ種によって取り込める褐虫藻サイズが異なることを示している。つまり、サンゴと褐虫藻の種特異性は、サンゴ側の「許容褐虫藻サイズ」と褐虫藻側の「細

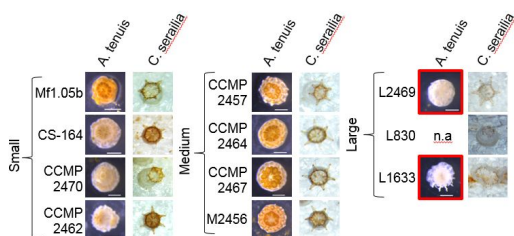


図4 褐虫藻サイズと感染との関係(サンゴ)。感染が確認できなかった写真を赤枠で表示。

胞サイズ」とで決まっていることが示唆された。

(4) 網羅的なデータ収集。本研究で、褐虫藻の細胞サイズが種特異性に大きくかわることが示された。そこで、褐虫藻の細胞サイズをより多くの株で測定し、褐虫藻の遺伝子型と細胞サイズとの関係を調べることとした。遺伝子型はIST2領域の配列を用いた。その結果、クレードAの褐虫藻株の細胞サイズは、クレードBの褐虫藻株に比べ顕著に大きかった。このことは、クレードBの褐虫藻はクレードAの褐虫藻に比べより多くのサンゴ種と共生関係を結べることを示唆している。このことから、クレードBの褐虫藻種が豊富な環境では、新たな褐虫藻の取り込みによる環境適応が起こりやすいことが考えられる。

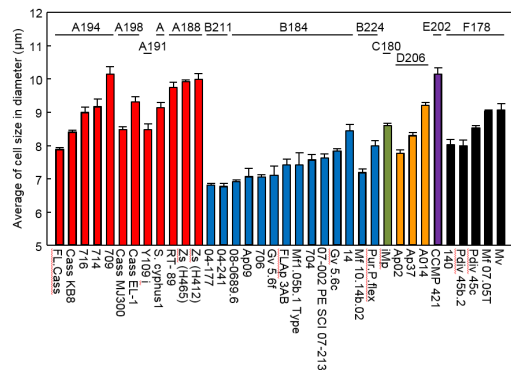


図4 褐虫藻の遺伝型と細胞サイズとの関係。褐虫藻のクレードごとに異なる色で表示。赤:クレードA、青:クレードB、緑:クレードC、黄:クレードD、紫:クレードE、黒:クレードF。

## 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7件)

Biquand E, Okubo N, Aihara Y, Rolland V, Hayward DC, Hatta M, Minagawa J, Maruyama T, Takahashi S (2017)

Acceptable symbiont cell size differs among cnidarian species and may limit symbiont diversity. *ISME Journal*. In press (DOI: 10.1038/ismej.2017.1) 査読あり

Watanabe CK, Yamori W, Takahashi S, Terashima I, Noguchi K (2016)

Mitochondrial alternative pathway-associated photoprotection of photosystem II is related to the photorespiratory pathway. *Plant & Cell Physiology*, 57, 1426-1431. (DOI: 10.1093/pcp/pcw036) 査読あり

Aihara Y, Takahashi S, Minagawa J (2016) Heat induction of cyclic electron flow around photosystem I in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium*. *Plant Physiology*, 171, 522-529. (DOI: 10.1104/pp.15.01886) 査読あり

Yamamoto H, Takahashi S, Murray RB, Shikanai T (2016) Artificial remodelling of alternative electron flow by flavodiiron proteins in *Arabidopsis*. *Nature Plants*, 2:16012. (DOI:10.1038/nplants.2016.12) 査読あり

Voolstra C, Takahashi S <10<sup>th</sup> in 26 authors > (2015) The ReFuGe 2020 consortium - Using 'omics' approaches to explore the adaptability and resilience of coral holobionts to environmental change. *Frontiers in Marine Science*, 2: 68. (DOI: 10.3389/fmars.2015.00068) 査読あり

Zavafer A, Cheah MH, Hillier W, Chow WS, Takahashi S, (2015) Photodamage to the oxygen evolving complex of photosystem II by visible light. *Scientific Reports*. 5:16363. (DOI: 10.1038/srep16363) 査読あり

Kou J, Takahashi S, Fan D-Y, Badger MR, Chow WS (2015) Partially dissecting the steady-state electron fluxes in Photosystem I in wild-type and *pgr5* and *ndh* mutants of *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 6:758. (DOI:10.3389/fpls.2015.00758) 査読あり

〔学会発表〕(計11件)

Elise Biquand、大久保奈弥、相原悠介、Vivien Rolland、David C. Hayward、服田昌之、皆川純、丸山正、高橋俊一「サンゴと褐虫藻の種特異性を決める要因」日本サンゴ礁学会19回大会、2016年12月2日、沖縄タイムスビル(沖縄県・那覇市)

高橋俊一「サンゴと藻類の共生：良いパートナーを持つことの大切さ」関西原生生物セミナー、2016年11月26日、芦原青年の家(福井県・あわら市)

高橋俊一「サンゴに共生する褐虫藻のストレス耐性機構」遺伝研研究会、2016年11月3日、遺伝研(静岡県・三島市)

Elise Biquand, Nami Okubo, Yusuke Aihara, Vivien Rolland, David C. Hayward, Masayuki Hatta, Jun Minagawa, Tadashi Maruyama, Shunichi Takahashi, "Size-dependent symbiont specificity in cnidarian-dinoflagellate symbiosis" The 13<sup>th</sup> International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, 10 – 14 September, 2016, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Kyoto (Japan)

Yusuke Aihara, Shunichi Takahashi, Jun

Minagawa, "Cyclic electron flow around photosystem I is enhanced under high-temperature stress to dissipate excess energy in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium*" 17th International Congress on Photosynthesis, Maastricht, 7 – 12 Aug 2016, Maastricht (Netherlands)

高橋俊一「サンゴに共生する褐虫藻の光合成とその重要性」日本プランクトン学会シンポジウム、2016年3月14日、東京大学（東京都文京区）

高橋俊一「モデル生物（*Aiptasia*）を用いた白化機構の研究」日本さんご礁学会第18回大会・自由シンポジウム、2015年11月28日、慶応大学（東京都・港区）

岸本真理子、得津隆太郎、相原悠介、加藤弘樹、菊池彩花、皆川純、高橋俊一「異なる褐虫藻によりサンゴの白化感受性は変化する」日本さんご礁学会第18回大会、2015年11月28日、慶応大学（東京都・港区）

菊池彩花、高橋俊一、大久保奈弥、皆川純「白化が褐虫藻の新規獲得を促進する」日本さんご礁学会第18回大会、2015年11月28日、慶応大学（東京都・港区）

加藤弘樹、Frederic Sinniger、波利井佐紀、得津隆太郎、皆川純、酒井一彦、高橋俊一「サンゴの光環境適応」日本さんご礁学会第18回大会、2015年11月28日、慶応大学（東京都・港区）

相原悠介、高橋俊一、皆川純「サイクリック電子伝達の活性化による褐虫藻の高温ストレス応答」日本さん

ご礁学会第18回大会、日本さんご礁学会第18回大会、2015年11月28日、慶応大学（東京都・港区）

〔図書〕(計 1件)

高橋俊一、農文教、共生：サンゴと褐虫藻の共生関係の成立から破綻まで、生物科学、2016、第68巻、第1号、24-29.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ:

<https://sites.google.com/site/symbiodiniumcoral/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 俊一 (TAKAHASHI, Shunichi)  
基礎生物学研究所・環境光生物学研究部門・  
准教授  
研究者番号: 80620153

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )