

令和元年6月7日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07483

研究課題名(和文) ホヤと藍藻の共生システムの進化・多様化過程の再構築

研究課題名(英文) Reconstruction of the evolution and diversification in ascidian-cyanobacterial symbiosis

研究代表者

広瀬 裕一 (HIROSE, Euichi)

琉球大学・理学部・教授

研究者番号：30241772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ジデムニ科ホヤ4属で知られている藍藻との共生は脊索動物と光合成生物間の絶対的な共生として唯一の共生系である。ジデムニ科6属の共生種・非共生種について分子系統解析を行ったところ、得られた系統樹ではDiplosoma属の単系統性が支持されたが、Trididemnum属は多系統で藍藻共生種だけでも4つのグループに別れた。共生藍藻のタイプや宿主内での分布様式を系統樹に対応させたところ、藍藻との共生がジデムニ科内で複数回生じたことや、同様な様式の共生が異なる属やグループにおいて収斂的に進化したことが支持された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サンゴやシャコガイなど光合成生物と共生することによって効率の良い代謝システムを獲得している動物が様々な分類群で知られているが、共生システムの進化・多様化についてはわかっていないことが多い。本研究では我々を含む脊索動物では唯一の光合成共生系であるホヤと藍藻について、宿主ホヤの系統と共生様式の多様性から、共生系の進化・多様化過程を推定することができた。これにより、なぜ脊索動物においてはジデムニ科ホヤにおいて『だけ』繰り返し藍藻との共生成立が生じたのかという問題が新たに提起される。

研究成果の概要(英文)：Cyanobacterial symbiosis in some colonial ascidians of the four genera in the family Didemnidae is the only obligate-symbiosis system between the chordates and photosynthetic organisms. We examined the molecular phylogeny of didemnid ascidians including non-symbiotic and symbiotic species belonging to six didemnid genera. The phylogenetic tree supports the monophyly of Diplosoma, while photosymbiotic species of Trididemnum were separated into four discrete clades. We mapped the modes of symbiosis (e.g., cyanobacterial species, distribution pattern on the phylogenetic tree) to elucidate the evolutionary history of this symbiosis system. The present results supported that 1) cyanobacterial symbiosis was independently established in multiple times within Didemnidae, 2) similar modes of symbiosis were convergently evolved in discrete genera and/or clades.

研究分野：動物形態学・分類学

キーワード：ホヤ 分子系統 光共生 藍藻 進化 多様性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物と光合成生物との絶対共生（共生が宿主または共生体の生存に不可欠な共生関係）は、プロチスタ、刺胞動物、扁形動物、軟体動物など様々な分類群で知られている。この共生システムは効率の優れた代謝システムとしても注目され、例えばサンゴ礁のように貧栄養の環境において高い生産力を持つ生態系における生産基盤を構成している。しかし、我々脊椎動物亜門を含む脊索動物門では、熱帯・亜熱帯産のジデム二科ホヤにおいてのみ「生涯にわたる藻類との絶対共生」が認められている。多様な海洋生物の中で、なぜジデム二科のホヤだけが絶対的なパートナーになれたのかは大きな謎である。この問題を解明するためには、ジデム二科4属にまたがる宿主ホヤの系統関係を明らかにし、共生の成立と多様化のプロセスを理解することが必要である。

ホヤ-藻類の共生系にも宿主種によって多様な共生様式が知られている。代表的な共生藻は *Prochloron* と *Synechocystis* であるが、他の藍藻も混在する場合がある。ホヤ群体内の共生藻分布様式は同属内でも種によって異なる場合がある一方で、親群体から胚・幼生への共生藻伝播（垂直伝播）機構は共生藻分布様式が同じ種では同様な方法で垂直伝播機構を行うことが多い（Hirose, 2015）。また、*Prochloron* 以外の共生藍藻は、藍藻が被嚢内に分布する種に限られている。共生藻は宿主から何らかの保護を受けていると思われるが、一例として、宿主ホヤの外被組織（被嚢）には紫外線吸収物質が含まれることが知られている。このような共生に関わる形質と宿主ホヤの系統を対照することで、ホヤ-藻類の共生系の成立と多様化プロセスを再構築できることが期待される。

2. 研究の目的

(1) 藍藻と共生するジデム二科ホヤを幅広く収集し、ミトコンドリア COI 遺伝子の部分配列を決定する。ジデム二科では従来用いられているユニバーサル・プライマーでは目的の配列が増幅できないことが多いため、近年開発された改変プライマーや新たに属・種特異的プライマーを開発する。得られた配列情報をもとに系統解析を行い、共生藍藻の種多様性、共生藻の分布様式、共生藻の垂直伝播機構などの形質と対照して、ホヤと藍藻の共生システムの進化・多様化プロセスを明らかにする。さらに、得られた COI 遺伝子部分配列の種内変異、属内変異、属間変異を比較し、同配列の DNA-Barcode としての有用性を評価する。

(2) 共生系の維持機構の一つである「外被組織における紫外線吸収」について、紫外線吸収物質の局在を特定し、共生維持機構の進化を検討する。

3. 研究の方法

(1) 琉球～台湾を中心とした地域で藻類共生性ホヤの採集を行った。地理的変異を明らかにする上で、各種について複数の地域で採集することを目指した。採集した群体ごとにミトコンドリア COI 遺伝子の部分配列を決定した。目的の配列が得られない場合、属・種特異的プライマーを開発し配列決定を進めた。分子系統解析の結果を、藍藻の種、群体内の分布、垂直伝播法などの形質と対照し、共生の進化・多様化プロセスを検討した。

(2) 紫外線を光源とする顕微鏡による観察から、外被組織における紫外線吸収の場を特定した。

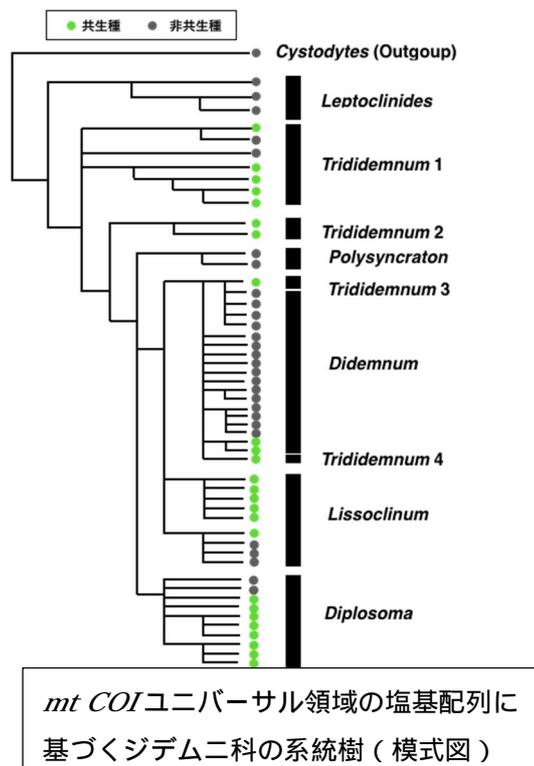
4. 研究成果

(1) 分子系統解析

5 属 19 種 46 群体（非共生 2 種を含む）から DNA を抽出し、ミトコンドリア COI 遺伝子ユニバーサル領域の塩基配列を決定した。一部の属・種については特異的プライマーを設計して用いた。Oliveira et al. (2017) が解析に用いた配列と合わせて、7 属 46 種 108 群体(488bp)について RAxML を用いた最尤法 (ML) と MEGA を用いた距離法 (Minimum Evolution method(ME)) による系統解析を行った (ブートストラップ = 1,000 回)。従来の解析と同様に *Didemnum*、*Diplosoma*、*Leptoclinides*、*Polysyncraton* の各属の単系統性が支持された。このうち *Didemnum*、*Diplosoma* には共生種が含まれる。従って、少なくとも *Didemnum* と *Diplosoma* では藍藻との共生が独立に生じたことが支持される。

(2) DNA-barcode としての COI 遺伝子部分配列

今回解析に用いた全ての組み合わせ(6216 ペア)で、種内変異率の平均は 1.97%(n=94)、種間変異率は 26.18%(n=6122)であった。しかし、一部の分類群では種内変異と種間変異がオーバ



ーラップしたり，分類群ごとに種内変異の最大値が大きく異なる場合があった。

(3) 共生様式の多様性と宿主ホヤの系統

各宿主種における共生様式を属クレードごとにまとめたのが下表である。これで明らかなように、ジデムニ科内で同様な共生様式が異なる属/クレードで認められ、収斂的に同様な共生様式が繰り返し獲得されたことを支持する。

Diplosoma を例外として、共生藍藻の伝播様式は属/クレードに関わらず藍藻の保持様式に対応しており、絶対共生は『藍藻保持様式と垂直伝播様式のセット』として獲得されたと考えられる。一方、*Diplosoma* は本属固有の垂直伝播様式を持つことから、本属では藍藻との絶対共生を確立した祖先種から全ての共生種が分化したものと考えられる。

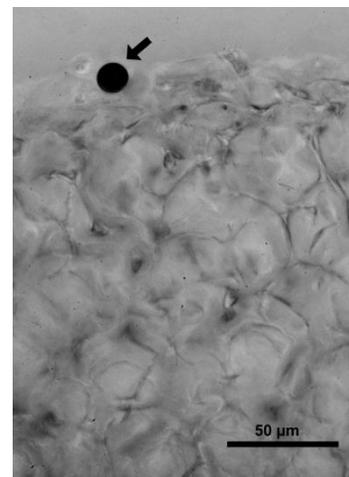
ほとんどの宿主種において共生藍藻は *Prochloron* であるが、*Trididemnum* では *Synechocystis* 等と共生する種がある。ただし *Trididemnum* は多系統群であり、*Synechocystis* の共生は明らかに系統の異なるクレードにまたがって認められることから、*Synechocystis* との共生が異なる系統で独立に生じたと考えられる。

これらの結果は、ジデムニ科において、藍藻との絶対共生が異なる系統で収斂的に繰り返し成立したことを支持している。絶対共生の成立には垂直伝播様式の獲得が不可欠であるが、進化的に最適な垂直伝播様式が限られていることが収斂の原因になったのかも知れない。

属/クレード	共生藍藻	藍藻を保持する組織	垂直伝播様式
<i>Didemnum</i>	<i>Prochloron</i>	共同出水腔	幼生胴部の表面
<i>Trididemnum-1</i>	<i>Prochloron</i>	群体表面	垂直伝播しない
	<i>Synechocystis</i>	被囊	被囊細胞による運搬
	<i>Prochloron</i> + <i>Synechocystis</i> + unknowns		
<i>Trididemnum-2</i>	<i>Prochloron</i>	共同出水腔	幼生胴部の表面
<i>Trididemnum-3</i>	<i>Prochloron</i>	被囊	被囊細胞による運搬
<i>Trididemnum-4</i>	<i>Synechocystis</i>		
<i>Lissoclinum</i>	<i>Prochloron</i>	群体表面	垂直伝播しない
		共同出水腔	幼生胴部の表面
		共同出水腔 + 被囊細胞	
		被囊	未確認
<i>Diplosoma</i>	<i>Prochloron</i>	共同出水腔	特別な幼生器官 (rastrum)

(4) 外被組織における紫外線吸収物質の局在

Prochloron と共生する *Diplosoma* の透明な被囊組織を紫外線顕微鏡で観察した。被囊内には巨大な液胞を持つ bladder tunic cell をはじめ様々なタイプの被囊細胞が散在するが、細胞質が紫外線を吸収する像が得られたことから、紫外線吸収物質は被囊細胞の細胞質に含まれていると思われる。また、被囊基質は紫外線をよく透過しており、紫外線防御には役立っていないと考えられる。紫外線吸収物質を生産していると考えられている *Prochloron* の細胞質は紫外線よく吸収することも明らかとなったが、本種では *Prochloron* は被囊に分布していない。宿主の外被組織が共生藻を紫外線から保護するためには、共生藻が生産する紫外線吸収物質を被囊内の細胞に運搬・保持する仕組みが必要であると考えられる。



< 引用文献 >

- Oliveira FAS, et al. (2017) Molecular phylogeny of Didemnidae (Ascidiacea: Tunicata). Zool. J. Linn. Soc. 180:603–12
- Hirose (2015) Ascidian photosymbiosis:

Diplosoma simile 被囊の紫外線顕微鏡写真。
矢印は軍隊表面に付着した *Prochloron*

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Sensui N, Hirose E (2018) Cytoplasmic UV-R absorption in an integumentary matrix (tunic) of photosymbiotic ascidian colonies. Zoological Studies, 査読有, 57: 33
doi:10.6620/ZS.2018.57-33

〔学会発表〕(計 2 件)

広瀬慎美子、広瀬裕一 (2018) COI 領域の分子系統からみた藍藻共生ホヤにおける共生様式の多様化. 日本動物学会第 89 回大会代替集会. 東京

広瀬慎美子、広瀬裕一 (2017) COI バーコード領域の分子系統に基づくホヤと藍藻の共生プロセスの再構築. 日本動物学会第 88 回大会、富山

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：広瀬 慎美子

ローマ字氏名：HIROSE, Mamiko

所属研究機関名：東海大学

部局名：海洋学部

職名：特任准教授

研究者番号 (8 桁): 10398307

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。