

令和元年6月6日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15163

研究課題名(和文) サンゴ共生系の真の安定性を反映する共生藻回転率と食胞内微小環境応答の解析

研究課題名(英文) Regulations of symbiont turnover and phagosomal micro-environments reflecting the stability of coral-algal symbiosis

研究代表者

丸山 真一郎 (Maruyama, Shinichiro)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：50712296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：サンゴ共生藻とも呼ばれる褐虫藻と宿主刺胞動物との細胞内共生系は、特に熱帯から温帯の貧栄養海域において、一次生産を支える重要な生態的地位を占めるが、共生の成立に関する細胞レベルでのメカニズムには未解明な点が多い。本研究では、刺胞動物体内に取り込まれた褐虫藻やマイクロプラスチックなどの粒子の動態をライブイメージングや細胞分画などの手法を組み合わせることで詳細に解析、観察するための技術基盤を開発した。その結果、褐虫藻が安定に維持される過程で、特に宿主内胚葉が細胞を取り込む活性が大きな役割を果たすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、「サンゴの白化」と呼ばれるような、褐虫藻と刺胞動物との共生が崩壊する現象が大きな環境問題となっているが、この細胞内共生を支える細胞レベルでの仕組みはよく分かっていなかった。本研究で開発された技術を用いることにより、安定な共生の維持に関わる細胞機能を詳細に解析することができるようになった。これを用いることで、マイクロプラスチックなどの海洋汚染微粒子が生物に与える影響などを解析する実験系への発展などが期待される。

研究成果の概要(英文)：Symbiodiniaceae algae are known as coral symbionts and play crucial roles in the coral-algal symbiosis to sustain the primary production in oligotrophic tropical and subtropical oceans. However, cellular mechanisms relevant to the establishment of the symbiosis remain to be clarified. In this study, via integrating live imaging and cell fractionation methods, foundational techniques and tools to investigate the dynamics of symbiont cells and plastic particles ingested by host cnidarian animals were developed. The results suggested that ingestion activity of the host endodermis played a key role in maintaining the stable symbiosis with symbiotic algae.

研究分野：共生ゲノム進化

キーワード：共生 細胞 刺胞動物 褐虫藻

1. 研究開始当初の背景

細胞内共生は、ミトコンドリアや葉緑体などのオルガネラを生み出した進化プロセスであり、真核生物進化の原動力であるとも言える。進化史上複数回起こったと考えられる細胞内共生は、多様な光合成生物の系統を生み出してきたが、動物の系統でも藻類の細胞内共生がごく稀だが知られている。

造礁サンゴ等の刺胞動物は、褐虫藻 (Symbiodiniaceae) と呼ばれる渦鞭毛藻を細胞内共生させることで光合成産物を得、貧栄養の熱帯海域における一次生産の多くを担う重要な共生生態系 (ここでは「サンゴ共生系」と総称) を構築している。しかし、温暖化など環境変動に脆弱なサンゴ共生系の成立機構を理解するには、褐虫藻の動物体内への侵入、細胞内共生により褐虫藻を取り込んだ食胞が「共生胞」へと成熟する過程、宿主との相互作用など、様々なプロセスのどの部分が影響を受けるのかという分析的研究が不足している。

褐虫藻と宿主刺胞動物との相互作用に関する見方は大きく変わりつつある。古くから褐虫藻の取込みには認識と維持に関わる鍵と鍵穴式のリガンド・レセプターが関わっているのではないかと考えられてきたが、最近の蛍光ビーズを用いた解析から、生物学的シグナルが無くても細胞内への取込みと排出自体は起こり得ることが示された。このことは、宿主と共生体の一対一の「密」な関係よりも、共生胞という微小環境を介したそれぞれの環境応答系の「疎」な重ね合わせとして考える必要があることを示唆している。実際に申請者らの予備的研究により、共生モデル刺胞動物のセイタカイソギンチャク (*Exaiptasia diaphana*) の細胞内に取り込まれた蛍光ビーズが経時的に位置を変えることから、褐虫藻の取込みと排出が恒常的に起こっていることが示唆された。即ち、褐虫藻・刺胞動物共生系はこれまで考えられていたような固定的な系というより、系への入力と出力が均衡している定常状態あるいは「動的平衡」として捉える必要があると考えられる。

2. 研究の目的

造礁サンゴなどの刺胞動物と、褐虫藻と呼ばれる単細胞藻類との細胞内共生の成立と崩壊の機構は未だ謎が多い。その原因として、共生した褐虫藻をミトコンドリアや葉緑体のような「固定的なオルガネラ」として捉え、単に共生藻の総数 (静的観測値) のみを問題にする傾向が強くなり、共生系全体としての共生藻の増減や出入の収支 (動的構造) を分析できていないことが挙げられる。本研究の目的は、安定な共生系は共生体の出入が釣り合った動的平衡にあると捉え直し、固定的に見える宿主細胞における共生状態の時間的変化を個々の褐虫藻細胞を標識・追跡することで「回転率」を計測し、これを指標に環境変動への初期応答過程を解明することである。

3. 研究の方法

本研究では、下記の計測を、実験の過程で共生藻の総数が大きく変動しないような安定した条件の下で行う。

- 1) 蛍光ビーズ、または生きた状態で蛍光試薬により染色した褐虫藻をプローブとする
- 2) プローブを宿主の餌に混ぜ込み、細胞内共生により内胚葉細胞内に取り込ませる
- 3) 蛍光を指標にして、動物体内での処理細胞の位置関係を画像 (静止、動画) として保存する
- 4) 経時的な位置関係の変化から、移動した細胞の割合を「回転率」と定義し、定量する

まず、餌 (ブラインシュリンプをすりつぶしたもの) に混ぜ込んだ蛍光ポリスチレンビーズをプローブとしてセイタカイソギンチャク (以下イソギンチャクと略す) に食べさせ、内胚葉細胞内の食胞に取り込ませる。これまでの実験で、食胞内への取込み確認後、1週間程度でほぼ細胞外へ排出され、体外の培地中に放出されることを確認している。そのため、細胞内ビーズ数が安定する3日間程度の間の実験を行う。

実験は実体蛍光顕微鏡下でイソギンチャク個体を上 (口盤側) から見た画像を撮影して行う。イソギンチャクの口 (口道) は構造的に向きがはっきりしており、経時観察時にも各触手の相対的位置の対応付けが行いやすい。この特徴を生かし、触手の一部を予め切除するような外科的操作などで生体にストレスをかけることなく12時間、24時間など一定の間隔で経時観察する。取得した蛍光画像と明視野画像を基に、ビーズ像を (1) 観察期間中に移動しなかったもの、(2) 期間中に移動したもの (喪失・獲得含む) にグループ分けを行い、全体に対する移動した数の割合を回転率として、経時変化を測定する。

4. 研究成果

本研究では、褐虫藻と蛍光ビーズという2種類のプローブを用いた実験を行った。褐虫藻は長期間同じ位置に留まる割合が高い一方で、蛍光ビーズは数日後に体外に放出され、殆ど体内で観察されることがなくなるという動的な推移を示した。これは、先行研究で示唆されていた

結果と同様であった。さらに詳細な動態を解析するため、観察期間中に移動したプローブを、新たに細胞内に取り込まれた「獲得」、もしくは細胞外に吐出された「喪失」の事例と解釈し、獲得と喪失のパターンを解析したところ、褐虫藻は新たに獲得される割合も喪失する割合も非常に低く、パターンが安定していたが、蛍光ビーズはどちらの割合も高く、常に流動的にイソギンチャク体内に存在していることが明らかになった。これは、一見同数のプローブが存在するように見える場合でも、プローブの種類によって内部の安定性は大きく異なる可能性があることを示している。これまでサンゴ共生系における安定性は褐虫藻密度などで評価されることも多かったが、今回の研究結果は、褐虫藻の種類やその割合などを識別することが安定性評価において重要である可能性を示唆している。また、蛍光ビーズのような非生物学的プローブは経時的に口から吐出されることから、細胞からは吐出されるが胃内腔に残存するプローブの総量が次の観察期間における新規取込率に大きく影響する。このことは、サンゴ共生系においても、共生体が細胞内にどの程度安定に保たれるかだけでなく、胃内にどの程度安定して存在できるか、という2つの要素が系全体の安定性に関わることを示唆している。

さらに技術的な進展として、これまでの蛍光観察に加え、実際に細胞内に取り込まれたプローブをイソギンチャクから単離し、褐虫藻や蛍光ビーズを囲む食胞膜を観察する技術を確認することができた。これにより、プローブの挙動をより詳細に評価する基礎技術として今後応用していくことが可能となった。

一方、褐虫藻の生物活性自身が共生安定性にどのように関わるかについても研究を行った。褐虫藻の自然発生的突然変異体を用いることにより、褐虫藻の細胞増殖を抑制した状態を誘導し、イソギンチャクとの共生パターンを観察したところ、共生状態の褐虫藻が減少することが示唆された。このことは、安定な共生が成立するためには褐虫藻の増殖能力が重要であることを示している。本研究では、こうした基礎的な細胞機能と共生との関係を、遺伝子レベル、細胞レベルのデータを用いて具体的に示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ishii Y, Maruyama S, Fujimura-Kamada K, Kutsuna N, Takahashi S, Kawata M, Minagawa J. Isolation of uracil auxotroph mutants of coral symbiotic alga for symbiosis studies. *Sci Rep* 2018, 8(1):3237. DOI:10.1038/s41598-018-21499-3. 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

1) 丸山真一朗

現在進行形の共生現象から葉緑体の起源を考える

植物オルガネラワークショップ、2019年3月12日、名古屋大学 (東山キャンパス) 理学南館 坂田・平田ホール

2) 丸山真一朗

サンゴ共生藻と刺胞動物のモデル系を用いた温暖化時代の共生生物学

Biothermology Workshop 2018、2018年12月25・26日、岡崎コンファレンスセンター

3) Shinichiro Maruyama, Yuu Ishii, Konomi Fujimura-Kamada, Natsumaro Kutsuna, Shunichi

Takahashi, Takashi Makino, Jun Minagawa, Masakado Kawata

Evolution of exon-intron boundary recognition in coral symbiotic algae

The Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE) 2018, Yokohama. July 8-12, 2018.

4) Shinichiro Maruyama, Yuu Ishii, Takashi Makino, Masakado Kawata

Evolution of exonic nucleotide variation at the exon-intron boundary in coral symbiotic dinoflagellates
XXII Meeting of the International Society of Evolutionary Protistology, Cyprus, May 27-June 1, 2018.

5) 石井悠、鎌田このみ、高橋俊一、皆川純、河田雅圭、丸山真一朗：「非モデル生物時代に

敢えてサンゴ共生藻をモデル生物にしようとする試みについて」日本植物学会第81回大会、2017年9月8日-10日、東京理科大学 (口頭発表)

〔図書〕(計 1 件)

Maruyama S, Kim E. Symbiosis in eukaryotic cell evolution : Genomic consequences and changing classification. In: Cells in Evolutionary Biology. (ed. Hall BK & Moody SA) 2018, 119-48.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：河田雅圭、石井悠、宮澤真琴

ローマ字氏名：Masakado Kawata, Yuu Ishii, Makoto Miyazawa