

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19232

研究課題名（和文）シャコガイの「糞」はサンゴ礁生態系を支える

研究課題名（英文）Fecal pellets of tridacnine clams may fundamentally support coral-reef ecosystem

研究代表者

小池 一彦 (Koike, Kazuhiko)

広島大学・統合生命科学研究科（生）・教授

研究者番号：30265722

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：サンゴを含むサンゴ礁の多くの動物は、褐虫藻と呼ばれる藻類と共生している。しかしこの共生藻を親から受け継ぐことは希で、多くの場合、環境中から褐虫藻を取り込む。従って、サンゴ礁には単独の褐虫藻が存在しなければならない。この共生ソースとなる褐虫藻は、サンゴ同様に褐虫藻を体内に共生させる「シャコガイ」から排出されてきたものかもしれない。実際、シャコガイの糞には生きた状態の褐虫藻が密に詰まっている。この研究ではシャコガイの糞に含まれる褐虫藻を詳細に調べ、シャコガイの幼生とサンゴの幼生に糞を与え、褐虫藻が感染するか調べた。その結果、何れもが糞に由来する褐虫藻を取込み、共生が成立可能であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サンゴ礁を構成するサンゴや様々な生物には、その共生藻である褐虫藻が必要である。本研究によって、シャコガイの糞がシャコガイ幼生のみならずサンゴ幼生等へ褐虫藻を運ぶ役割を担っていることが示唆された。様々な生物が褐虫藻を与え、受け取り、サンゴ礁を形作っているとすれば、多様な生物が共存するサンゴ礁の姿そのものを表しているように思える。また、サンゴにとってもシャコガイが褐虫藻供給源として必要であれば、サンゴのみに着目して考えられてきたサンゴ礁の再生も再考の余地がある。

研究成果の概要（英文）：Many of animals inhabiting around coral-reefs, including coral itself, have symbiotic relationship with a microalga called zooxanthella. Most of them rarely inherit this symbiont from their parents but must acquire it from surrounding waters or sediments. Consequently, zooxanthella must exist in the environment, which might be originated from giant clam, a bivalve shellfish also possessing zooxanthella in its body. In fact, there are numerous live zooxanthella cells in the fecal pellets expelled from giant clams. Under this research, the fecal pellets were given to larvae of giant clams or corals, and the infection of zooxanthella cells via the fecal pellets were observed. In the result, both animal larvae could establish symbiosis with the zooxanthella, which supports our hypothesis.

研究分野：海洋微細藻類学

キーワード：サンゴ礁 褐虫藻 サンゴ シャコガイ 共生 生物多様性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造礁サンゴは単細胞の藻類(褐虫藻)を体内に共生させ、その生存エネルギーを褐虫藻の光合成に依存している。造礁サンゴ種の80%以上が幼生時に周囲の環境から褐虫藻を取り込むことを考えれば、周辺環境中に生きた褐虫藻のストックが必要である。実際に、幾つかの海域において海水中もしくは底質上に、宿主と共生していない褐虫藻が単独で存在することが明らかにされつつある。一方、サンゴ礁が広がる熱帯・亜熱帯の海域は極端に貧栄養であり、これら褐虫藻があたかもプランクトン種のように浮遊生活を営み、海水中の溶存態栄養を吸収して独立的に生存しているとは思えない。サンゴ礁の動物の多くが必要とする環境中の褐虫藻ストックは、あくまでストックであり、おそらく他動物から排出されてきたものであろう。

我々は当初、これら褐虫藻ストックは周辺サンゴから排出されてきたものだと想定し研究を進めてきた。多くのサンゴからは大量の褐虫藻が実際に排出されるが(Yamashita et al. 2011)、これら褐虫藻は、光合成系にダメージを受けた細胞であり、サンゴの積極的な消化・リジェクトを受けたものであった(Fujise et al. 2014)。そこでサンゴ礁に生息し、サンゴ同様に褐虫藻を共生させるシャコガイに注目した。シャコガイはサンゴとは異なり、胃から伸び外套膜に張り巡らされる「共生藻管」と呼ばれる管中に褐虫藻を共生させている。ここで増殖した褐虫藻は胃に落ち、消化を免れた細胞は糞として体外に排出される。Trench et al (1981)は糞中に光合成活性を持つ褐虫藻が多く存在することを報告しており、我々も健全なクロロフィル自家蛍光を発する褐虫藻細胞が、消化されず糞中に高密度で詰まっていることを確認した。

2. 研究の目的

本研究では、シャコガイから糞として排出される「生きた褐虫藻」が、共生ソースとしてアクティブであり、次なる動物に共生できるのかを実験により確かめることを目的とした。共生実験には、糞と親和性が高いであろうシャコガイの幼生のみならず、サンゴの幼生も用いることによって、シャコガイの糞に由来する褐虫藻がサンゴ礁全体の共生藻プロバイダーとして役割を果たしている可能性を検証することも目的とした。

3. 研究の方法

3-1. シャコガイ糞中の褐虫藻の状態

ヒメジャコ(*Tridacna crocea*)6個体を1.3Lガラスジャーに5時間インキュベートし、排出される糞を回収した。糞は蛍光顕微鏡によるクロロフィル自家蛍光の観察、透過型電子顕微鏡による細胞内構造の観察、パルス変調蛍光法による光化学系IIの最大量子収率(F_v/F_m)の測定に供した。

3-2. シャコガイ幼生を用いた感染実験

平成30年に実験を行った。沖縄県水産海洋技術センターからヒレジャコ(*Tridacna squamosa*)の幼生の提供を受け、500個体ずつ3Lの濾過海水に収容した。合計5区の実験区を作り、1: ヒレジャコ成員の外套膜から切り出した褐虫藻(freshly isolated zooxanthellae, FIZ), 2: ヒレジャコから得た糞を磨砕したもの(homogenized fecal pellets of *T. squamosa*, HF(Ts)), 3: ヒレジャコから得た糞そのまま(whole fecal pellets of *T. squamosa*, WF(Ts)), 4: ヒメジャコから得た糞を磨砕したもの(homogenized fecal pellets of *T. crocea*, HF(Tc)), 5: ヒメジャコから得た糞そのまま(whole fecal pellets of *T. crocea*, WF(Tc))を与えた。シャコガイ幼生の観察は糞添加開始後9日目と14日目に行った。回収した幼生は、褐虫藻の遺伝型解析に用いた。添加した糞も毎日一部を冷凍保存し、含まれる褐虫藻の遺伝型比率を測定した。解析はYamashita et al (2011)に準拠した。

3-3. サンゴ幼生を用いた感染実験

令和1年に石垣島の施設にて実験を行った。ウスエダミドリイシ3個体から産卵誘導によってバンドルを回収し、受精後のプラヌラ幼生を多数得た。3日齢の幼生を50個体ずつ50ml容の試験管に収容し、これを18チューブ用意した。3つを褐虫藻を添加しないネガティブコントロール区とし、3個体のヒメジャコから得た糞を加える実験区(それぞれ3チューブ×3個体実験区)、ポジティブコントロールとして褐虫藻培養株を与える区を2つ(それぞれ3チューブ)を設定し、3日間毎日与えた。3日目に一部のプラヌラ幼生を、8日目に全ての幼生を回収して、褐虫藻の感染を確認した。3-2同様に、与えた糞中、幼生中の褐虫藻の遺伝子型を調べた。

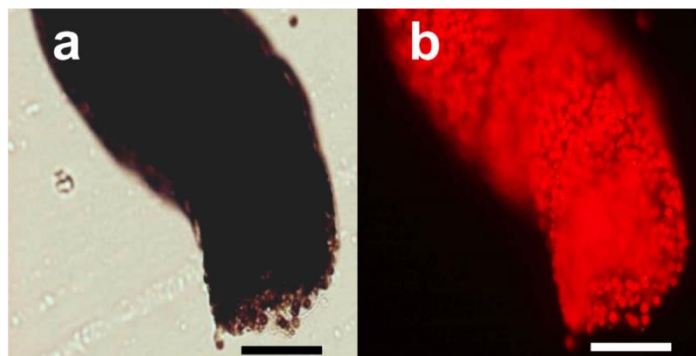


図1. ヒメジャコガイから得た糞の光学顕微鏡像(左)および蛍光顕微鏡像(右)。スケールバー=100 μm

4. 研究成果

4-1. シャコガイ糞中の褐虫藻の状態

ヒメジャコから回収した糞の光学顕微鏡写真および蛍光顕微鏡写真を図1に示す。蛍光顕微鏡から、クロロフィル自家蛍光を発する多数の褐虫藻が糞中に存在することがわかる。

図2には同じ糞を切片にし、トルイジンブルー染色により褐虫藻を観察したもの(左)および透過型電子顕微鏡により細胞内構造を観察したものを示す(右)。糞中にはトルイジンブルーで濃く染まる褐虫藻細胞以外に、消化残渣が多数認められた。褐虫藻の細胞内構造は生きた状態、すなわち染色体の凝集、葉緑体チラコイドの未損傷、スターチ顆粒の存在が確認された。

図3にはヒメジャコ外套膜中および糞中の褐虫藻の光合成能(最大量子収率)の比較を示す。外套膜中の F_v/F_m の平均値は最低 0.41 ± 0.01 (個体3), 最大 0.58 ± 0.01 (個体5)であった。一方、糞中の活性は最低 0.40 ± 0.01 , 最大 0.58 ± 0.01 であり、個体1と2を除き、統計的に外套膜中の細胞の活性と差は無かった。このことは、外套膜中の褐虫藻が光合成活性を保ったまま糞として排出されていることを示す。

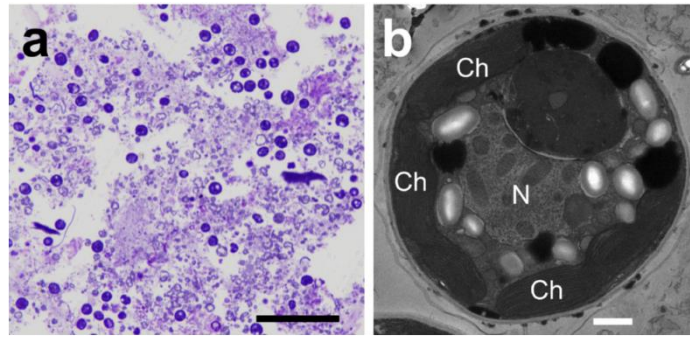


図2. ヒメジャコガイから得た糞の切片。トルイジンブルー染色(左)および透過型電子顕微鏡像(右)

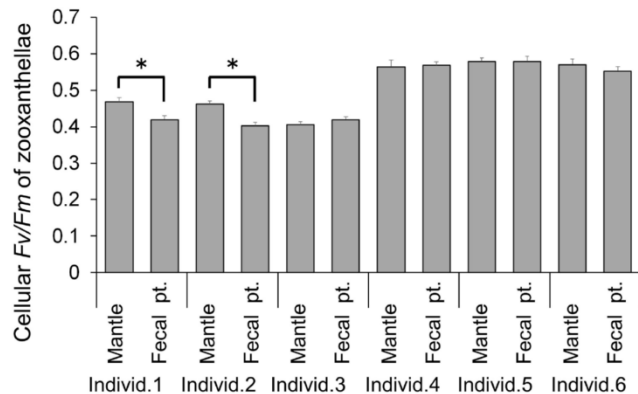


図3. 6個体のヒメジャコガイそれぞれから得た糞および外套膜中の褐虫藻の最大量子収率の比較

4-2. シャコガイ幼生を用いた感染実験

図4にヒレジャコ幼生に糞を与え9日目および14日目に観察した際の蛍光顕微鏡写真を示す。

9日目には幼生の中心部付近にクロロフィル自家蛍光の顆粒、すなわち褐虫藻の細胞が集まっているのが観察された。幼生は褐虫藻取り込んだ際にまず胃に収納するので、その過程だと思われた(取込ステージ)。14日目には褐虫藻が幼生の外殻膜辺縁部に分布し共生が成立したことがうかがえた(共生ステージ)。取込ステージ、共生ステージそれぞれの感染率を図5に示す。糞の由来、処理の違いにかかわらず、全て幼生に取り込まれ共生に至った。ただし、取り込まれたものの共生に至らなかった幼生も多く、共生ステージの比率は低かった。9日目には共生ステージの幼生はみられず、取込ステージの幼生の割合は、FIZ, HF(Ts), WF(Ts), HF(Tc), WF(Tc)はそれぞれ $29.56 \pm 41.44\%$ ($n=12-34$), $15.34 \pm 13.57\%$ ($n=10-19$), $20.54 \pm 17.46\%$ ($n=10-16$), $22.61 \pm 3.89\%$ ($n=22-62$)であった。14日目の取込ステージは、FIZ, HF(Ts), WF(Ts), HF(Tc), WF(Tc)それぞれ9日目より若干減少し $23.84 \pm 4.48\%$ ($n=112-129$), $15.57 \pm 3.30\%$ ($n=104-117$), $18.49 \pm 11.53\%$ ($n=108-130$), $22.00 \pm 20.46\%$ ($n=102-126$), $28.33 \pm 5.13\%$ ($n=117-126$)であった。14日目には共生ステージの幼生も観察され、FIZ, HF(Ts), WF(Ts), HF(Tc), WF(Tc)それぞれの感染率は $0.88 \pm 0.88\%$, $0.89 \pm 0.86\%$, $1.13 \pm 0.99\%$, $1.64 \pm 2.19\%$, $5.25 \pm 1.30\%$ であった。ヒメジャコの糞そのままを与えた区の感染率(WF(Tc))が統計的に最も高かった($p < 0.05$)。

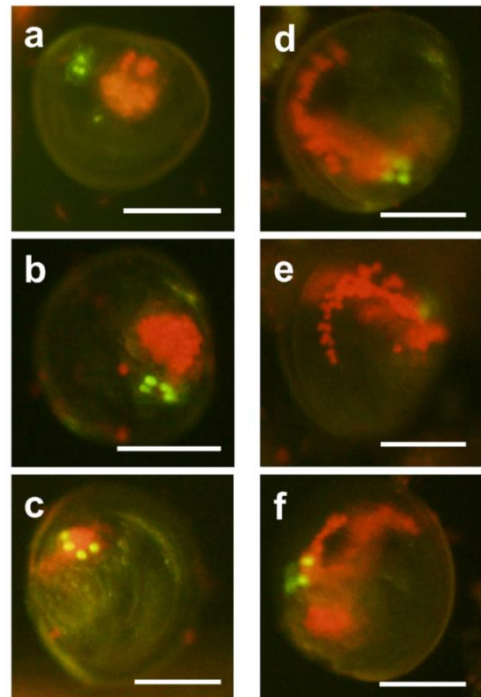


図4. 9日目(左カラム)および14日目に採集したヒレジャコ幼生の蛍光顕微鏡写真

ソースとして与えた褐虫藻属の割合は、外套膜から切り出したソース (FIZ) が最も多様で、*Symbiodinium* 属が $77.15 \pm 7.27\%$ 、*Cladocopium* 属が $7.86 \pm 3.61\%$ 、*Durusdinium* 属が $14.98 \pm 5.30\%$ だった。一方、ヒメジャコ、ヒレジャコに由来する糞両方とも、*Symbiodinium* 属が 99%以上を占め、その他の属は微量だった。図6に14日目に回収したヒレジャコ幼生に含まれる褐虫藻属の割合を示す。ソースの多様性を反映して FIZ 区が最も多様な褐虫藻属で構成され、*Symbiodinium* 属が $77.82 \pm 9.37\%$ 、*Cladocopium* 属が $16.04 \pm 8.49\%$ 、*Durusdinium* 属が $6.14 \pm 2.27\%$ だった。その他の区では、ヒメジャコの糞そのまま (WF (Ts)) の区を除き、全てが *Symbiodinium* 属で構成された。

褐虫藻ソースとして与えた FIZ, HF (Ts), HF (Tc) の F_v/F_m を図7に示した。FIZ, HF (Ts) および HF (Tc) において $F_v/F_m=0.41-0.60$ の比較的高い光合成活性を示した細胞の割合はそれぞれ $70.19 \pm 4.47\%$ 、 $33.95 \pm 5.53\%$ 、 $72.16 \pm 3.26\%$ であり、 F_v/F_m が 0.40 以下の比較的低い光合成活性を示した細胞の割合は 16.72% 、 34.89% 、 19.67% であった。HF (Tc) において $F_v/F_m=0.41-0.60$ の比較的高い光合成活性を示した細胞の割合が多かったことが、この区における比較的高い感染率をもたらし得た可能性がある。

4-3. サンゴ幼生を用いた感染実験

実験開始後3日目には褐虫藻がプラヌラ幼生の口周辺に取り込まれているのが観察された。8日目 (図8) では、褐虫藻ソースを与えなかった場合は感染はみられなかったが、糞 (a-c) もしくは褐虫藻培養株 (d, e) 何れの区においても幼生内に褐虫藻が取り込まれ、それが増殖している様子が観察された。3日目における感染率は、別個のヒメジャコ個体から採取した糞毎に (FP1, FP2, FP3), $56.7 \pm 6.8\%$ 、 $70.0 \pm 17.3\%$ 、 $93.3 \pm 5.8\%$ であり、培養株, AJIS2-C2 と CCMP2556 の混合 (C1) および TsIs-H4 と TsIs-G10 (C2) の混合を与えた場合は $76.7 \pm 15.3\%$ 、 $93.3 \pm 5.8\%$ であった (図9バー)。8日目には感染率は若干上昇し、FP1, FP2, FP3, C1, C2 それぞれ $80.0 \pm 0.0\%$ 、 $66.7 \pm 15.3\%$ 、 $96.7 \pm 5.7\%$ 、 $88.4 \pm 15.3\%$ 、 $100 \pm 0.0\%$ であった。FP3 を与えた場合の感染率は8日目において有意に高かった。幼生あたりの褐虫藻細胞数は3日目には全平均7細胞と低かったが、

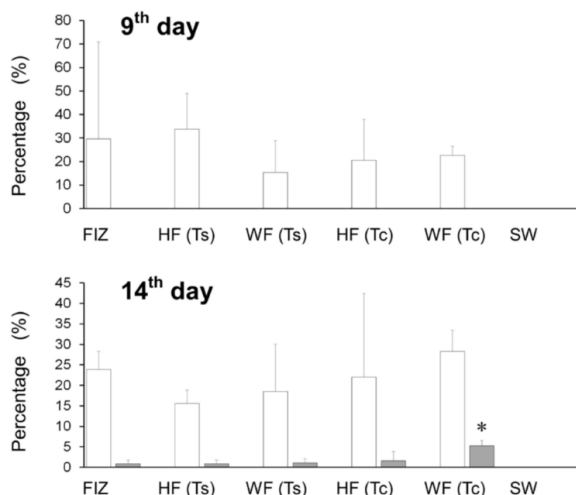


図5. ヒレジャコ幼生の褐虫藻感染率。各区の略号は本文を参照。白バーは取込ステージの幼生の比率。グレーバーは共生ステージの比率

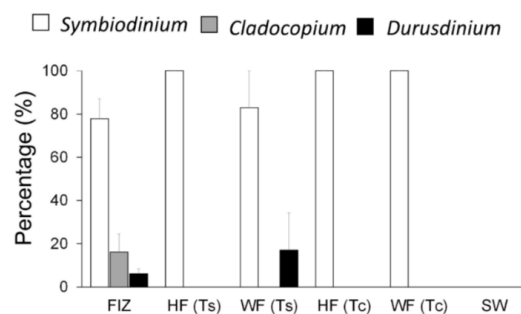


図6. 14日目に回収したヒレジャコ幼生に含まれる褐虫藻属の割合。各区の略号は本文を参照。

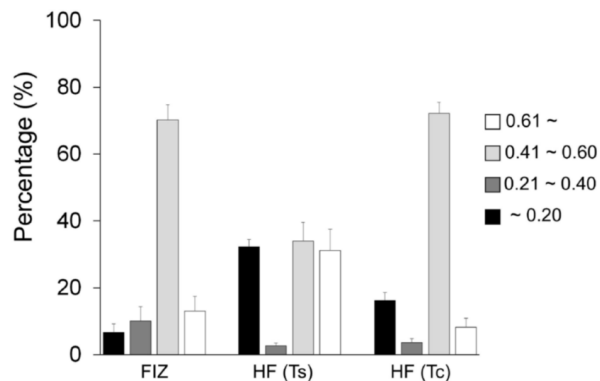


図7. 与えた褐虫藻ソースに含まれる褐虫藻属の割合 (6日間平均)。各区の略号は本文を参照。

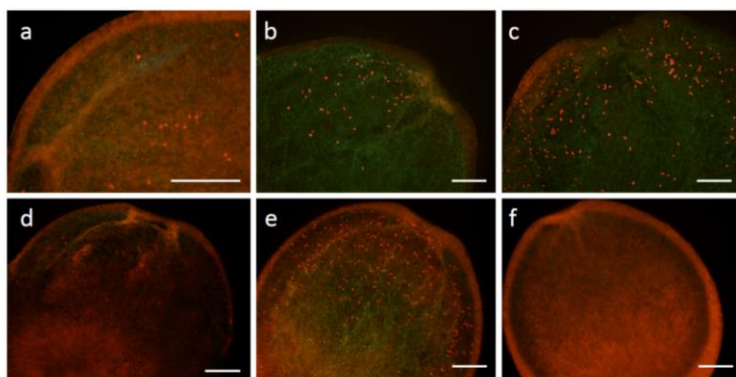


図8. ウスエダミドリイシのプラヌラ幼生にヒメジャコ糞 (a-c) もしくは褐虫藻培養株 (d-e) を与え8日経過した後の蛍光顕微鏡写真。fは褐虫藻ソースを与えないネガティブコントロール区

3日目以降褐虫藻ソースを与えていないにもかかわらず細胞数は増え、8日目にFP1, FP2, FP3, C1, C2それぞれ 10.9 ± 1.7 , 35.2 ± 6.1 , 57.6 ± 9.3 , 23.4 ± 3.1 , 226 ± 31 cells/個体に達した(図9 ライン)。

図10にはウスエダミドリイシのプラヌラ幼生に与えたヒメジャコ糞(FP1-3)の褐虫藻属組成(3日間)と8日目に回収した幼生内の属組成を示した。FP1, FP2, FP3に含まれる *Symbiodinium* 属と *Cladocopium* 属の組成平均は $85.7 \pm 2.8\%$ と $14.3 \pm 2.8\%$ であった。興味深いこ

とに、8日目に回収した幼生内の組成は糞中のそれとは異なり、*Symbiodinium* 属のみが共生した。培養株を与えたポジティブコントロールにおいても同様の傾向が見られ、AJIS2-C2 (*S. microadriaticum*) と CCMP2556 (*D. trenchii*) (C1) もしくは TsIs-H4 (*S. tridacnidorum*) と TsIs-G10 (*Durusdinium* sp.) (C2) を与えた場合、*Symbiodinium* 属(AJIS2-C2, TsIs-H4)の割合はそれぞれ 93.6 ± 2.2 と $96.4 \pm 1.4\%$ であった。、

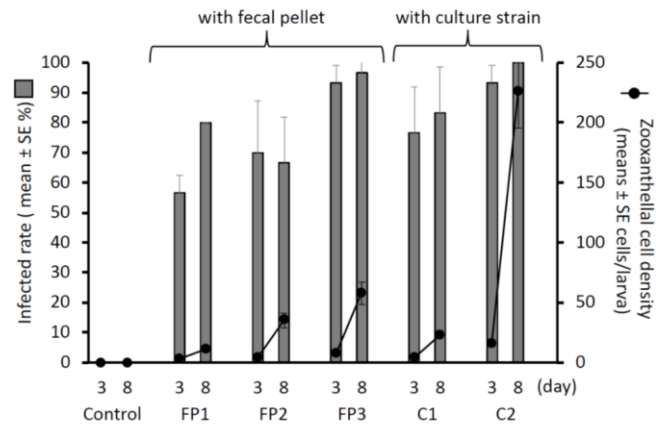


図9. ウスエダミドリイシのプラヌラ幼生にヒメジャコ糞(FP1-3)もしくは褐虫藻培養株(C1, C2)を与え、3日目、8日経過時の感染率(バー)と幼生1個体当たりの褐虫藻細胞数

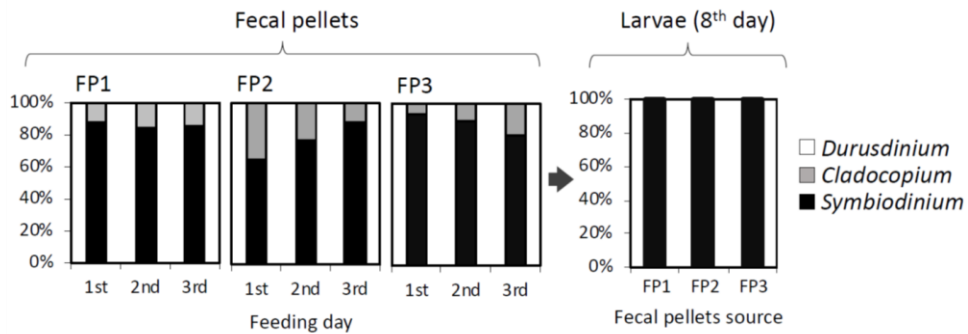


図10. ウスエダミドリイシのプラヌラ幼生に与えたヒメジャコ糞(FP1-3)の褐虫藻属組成(3日間)と8日目に回収した幼生内の属組成

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morishima Shin-Ya, Yamashita Hiroshi, O-hara Shizuka, Nakamura Yuji, Quek Vanessa ZhiQin, Yamauchi Momo, Koike Kazuhiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Study on expelled but viable zooxanthellae from giant clams, with an emphasis on their potential as subsequent symbiont sources	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山下洋, 鈴木豪, 新里宙也, 神保充, 小池一彦
2. 発表標題 サンゴ幼生の蛍光と褐虫藻の走光性は両者の初期共生成立に関与するか
3. 学会等名 第21回日本サンゴ礁学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森島慎也, 山内モモ, Quek Z. Vanessa, 山下洋, 高津戸啓介, 小池一彦
2. 発表標題 シャコガイ類の糞に含まれる褐虫藻に関する研究
3. 学会等名 第21回日本サンゴ礁学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuhiko Koike
2. 発表標題 Zooxanthellae as the foundations of coral reef communities
3. 学会等名 The 1st International Conference on Fisheries and Marine (InCoFIMS) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅木雅美, 山下 洋, 鈴木 豪, 小池一彦
2. 発表標題 シャコガイの糞は褐虫藻をサンゴに運ぶ
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会 第22回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masami Umeki, Shinya Morishima, Yuji Nakamura, Hiroshi Yamashita, Suzuki Go, Kazuhiko Koike
2. 発表標題 Fecal pellets of giant clams, as vectors to transport zooxanthellae
3. 学会等名 Ocean Science Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小池一彦
2. 発表標題 海洋生態系を支える微細藻類
3. 学会等名 広島大学統合生命科学研究科発足記念シンポジウム(招待講演)(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下 洋, 梅木雅美, 森島慎也, 中村勇次, 小池一彦
2. 発表標題 サンゴ礁生態系におけるシャコガイ類の役割
3. 学会等名 第4回おきなわマリンサイエンスワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Giant Clams' Poop Hosts Symbiotic Algae <https://www.asianscientist.com/2019/09/in-the-lab/giant-clam-poop-algae/> The Surprising Merit of Giant Clam Feces <https://www.ecomagazine.com/news/science/the-surprising-merit-of-giant-clam-feces> Giant Clams Spread Their Symbiotic Algae <https://www.hakaimagazine.com/news/giant-clams-spread-their-symbiotic-algae-through-their-poop/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山下 洋 (Yamashita Hiroshi) (00583147)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・西海区水産研究所・主任研究員 (82708)	