

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570092

研究課題名(和文) 藻類共生性群体ホヤにおける共生様式の多様性と種分類の再検討

研究課題名(英文) Taxonomy and diversity of the mode of photosymbiosis in ascidians harboring algal symbionts.

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

研究成果の概要(和文)：琉球列島-台湾における藻類共生性ホヤの分布調査を行い、4種の未採取を発見し、それぞれについて新種記載を行った。*Diplosoma*属の種についてはCOI遺伝子の部分配列を利用したDNA-barcodingの整備を行った。形態で区別されるチャツボボヤが遺伝的にも区別されることから既に種分化している可能性を示唆した。*Lissoclinum*属2種について共生藻の世代間伝播様式を明らかにした。鰓孔数・骨片形態に注目し、種分類への有効性について検証を行った。

研究成果の概要(英文)：Biogeography of the photosymbiotic ascidians was studied in the Ryukyu Archipelago and Taiwan. During the survey, we found four undescribed species and newly described them as new species. As for *Diplosoma* species, we determined the partial sequences of the COI gene to establish the basis of the DNA-barcoding as species-tags in this group. We demonstrated that each morphotype of *Didemnum molle sensu lato* can be distinguished with the COI gene sequences from one another, suggesting that the speciation had been occurred in this species group. The modes of trans-generational transmission of photosymbionts were ultrastructural examined in two *Lissoclinum* species to show the diversity of the mode of the algal transmission. The stigma numbers and the spicule morphology was evaluated as characters for species identification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：海洋生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：ジデムニ科ホヤ、光共生、垂直伝播、種分類、分類形質、DNA-barcoding

1. 研究開始当初の背景

ジデムニ科群体性ホヤと藍藻との共生は、脊索動物で唯一知られる絶対的な光共生系であり、この共生系は数多くの生理活性物質のソースとしても注目されている分類群である。我が国における共生ホヤの分布情報は

少なかったが、これまでの我々による調査から琉球列島には多数の共生性ホヤが分布しており、これには未記載種も含まれていることがわかってきた。このユニークな藻類共生性ホヤの多様性と進化を明らかにするためには、まず各種の分布状況の把握と正確な種

分類が必須である。そこで、共生性ホヤの分布調査を進めるとともに、琉球列島で確認されている未記載の記載分類を行うことが当面の課題である。また、一般に群体ホヤの分類は難しいため、種分類に有用な分類形質の検討も必要である。さらに、宿主ホヤの種によって多様な共生様式についても明らかにしてゆかねばならない。

2. 研究の目的

琉球列島を主たるフィールドとして、ジデムニ科ホヤと藍藻の光共生システムの多様性を把握し、共生の成立と多様化のプロセスを明らかにしてゆくことを目的とする。このため、共生性ホヤの分布調査を進めながら、未記載種の記載を行う。同時に、種分類や種同定をより正確に行うために、有用な分類形質の検討を進めることで分類学的研究基盤を確立してゆく。これにはDNAの塩基配列情報の利用も含まれる。また、ホヤ群体内における共生藻の分布や共生藻の世代間伝播様式など宿主種に特異的な共生様式の多様性を明らかにし、共生システムの多様化とその過程について理解を深めてゆきたい。

3. 研究の方法

(1) 藻類共生性ホヤの分布

沖縄島を中心に琉球列島における藻類共生ホヤの分布調査を行う。主にスノーケリングによって共生性ホヤを各地の潮下帯で探索し、採集を行う。採集したホヤは麻酔の後固定標本を作成し、後日顕微鏡下で解剖し種同定を行う。一部の試料はDNA解析のためエタノールで固定保管する。

(2) 種記載

上記の種同定の過程で発見された未記載種については、種記載に必要なスケッチを描画装置を用いて行い、順次新種記載を行う。必要に応じて、組織切片の作成や電子顕微鏡を用いた観察を行う。

(3) DNA-barcoding と分子系統解析

DNA-barcodeとして利用するため、COI遺伝子の部分配列の決定を行う。同種であっても、形態から区分できそうなものについては複数産地の試料で配列を決定し、分子系統解析によって遺伝的な分科が生じている可能性を検討する。

(4) 分類形質の検討

骨片の形態と鰓孔数に注目し、それぞれの形質について、種内での安定性を調べるとともに、これらの形質と分子系統解析の結果を比較し、形質が系統を反映している可能性についても検証する。

(5) 共生様式の多様性（共生藻の分布と垂直伝播）

我々の先行研究から有性生殖シーズンがほぼ特定で来ていた *Lissoclinum punctatum*、*L. timorense*、*Trididemnum clinides*、*T. miniatum* について、配偶子や胚を持っている群体を採集し、組織学的・微細構造学的観察より、次世代（配偶子／胚／幼生）が共生藻を『いつ、どのようにして』獲得するかを明らかにする。

同様に、孵化直前の胚を持つ群体を採集し、群体から放出された幼生について組織学的・微細構造学的観察を行い、共生藻をどのようにして保持しているかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 藻類共生性ホヤの分布

未記載種の発見があったことから、主に沖縄島、久米島、宮古島、石垣島を中心に調査を行った。さらに、中央研究院（台湾）の研究者の協力を得て、台湾および緑島においても採集調査を行う機会が得られた。このため、台湾も調査エリアに加えることができた。

琉球列島では低緯度の島の方が種数が多い傾向が確認された。また、台湾では墾丁と緑島で藻類共生性ホヤが採集できたが、これは全て琉球でも分布が確認されている種であった。一方、台湾の北海岸では藻類共生性ホヤが発見されなかった。北海岸は黒潮から離れており、冬期はかなり水温が下がる（15度ぐらいまで）ことが、共生ホヤが分布していない原因と考えられる。これは造礁サンゴの種組成とも一致している。

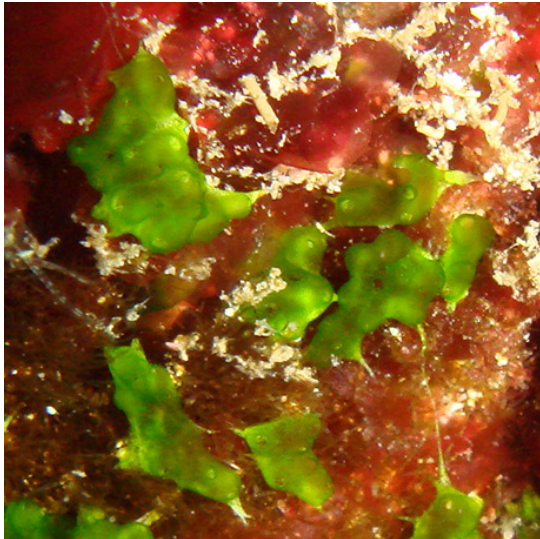
(2) 種記載

琉球列島から5種の未記載種が確認され、順次新種記載を行った。

このうち4種は *Diplosoma* 属である。それぞれ、*Diplosoma aggregatum*、*D. gumavirens*、*D. variostigmatum*、*D. watanabei* と命名した。既に我々は2種の *Diplosoma* を沖縄島より新種記載しているため、これまでに本属で計6新種を琉球列島から記載したことになる。これらの多くは沖縄のサンゴ礁域において決して稀な種ではないことから、これは藻類共生性ホヤの分類学的研究がまだまだ不十分であることに他ならない。その理由の一つに、本属の種は個虫が小さい（1mm以下）ものが多く、構造が単純なため、利用できる分類形質が少ないことがあげられる。これまで、牽引筋の位置が分類形質となりうるものが Kott により示されていたが、これに加えて我々は鰓孔数が種内で安定していることに注目することで上記の種を形態形質から認識できるようになった (*D. variostigmatum* については、群体内で鰓孔数が安定していないことが分類形質となっている。あわせて、COI

遺伝子の部分配列を用いた分子系統解析によっても、この種分類は支持されている（次項参照）。

残る1種は *Lissoclinum* 属に分類される種であるが、個虫それぞれが独立した出水口をもつ点で、ジデムニ科ホヤとしては極めて特異である（写真参照）。本種の発見はジデムニ科ホヤの種多様性がまだ十分に解明されていないことを示している。これまで、本種は久米島でのみ確認されているだけであるが、この産地においては稀な種ではない。



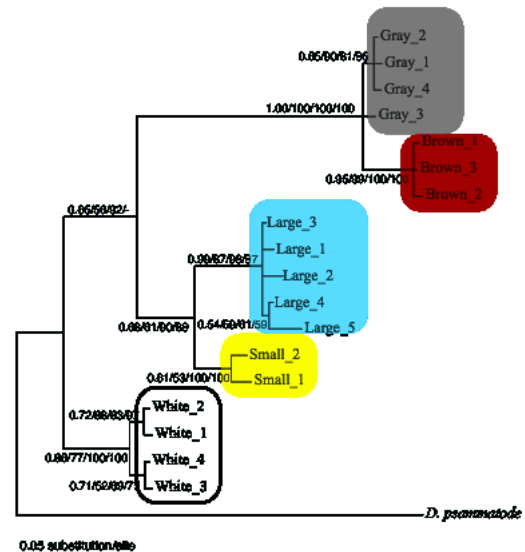
(3) DNA-barcoding

琉球列島で確認されている藻類共生性の *Diplosoma* 属について、COI 遺伝子の部分配列を決定し、分子系統解析を行った。塩基配列は種ごとに明瞭な違いがあることから、この配列を種の分子タグとして利用できることが明らかとなった。従来、本分類群の種同定には、麻酔後に固定された精巣を持つ群体標本が不可欠であり、孵化前の胚の構造も必要な場合が多かった。今回の DNA-barcoding によって、エタノールで保存された試料があり、COI 遺伝子の部分配列が決定できれば琉球列島産の藻類共生性 *Diplosoma* については種同定が可能となる。藻類共生性ホヤは天然物化学のソースとしてよく利用されているので、種同定のツールの開発が求められていたことから、DNA-barcode による種同定の情報基盤を整備した意義は大きい。

(4) チャツボボヤ種群の問題

チャツボボヤ *Didemnum molle* はインド洋から西太平洋の熱帯・亜熱帯域に広く分布する藻類共生性ホヤである。本種には、群体の色やサイズで区別できるいくつかのタイプがあるが、個虫の形態などに違いが認められておらず、単一種として扱われてきた。各タ

イブの複数産地の試料について、COI 遺伝子の部分配列を用いた分子系統解析を行ったところ、brown, white, gray, large および small の計 5 タイプが区別されることが明らかになった。従って、遺伝的にも区別されるチャツボボヤのそれぞれのタイプはすでに種分化を遂げていると解釈される。複数のタイプが同所的に分布することも多く、同時期に発達した生殖腺を持つことも確認されているため、生殖隔離もすでに成立しているものと考えられる。今回の試料は琉球-台湾より得られたものであるが、本種の分布が広域であるため、新たなタイプが今後見つかる可能性が高い。



チャツボボヤ 5 タイプの COI 分子系統樹

(5) 分類形質の検討

一般に、群体性の生物は個体（個虫）が小さく、これにともない構造も単純化するため、分類に利用できる形質が少ない傾向にある。従って、より正確な種の認識のためには有用な分類形質の検討が必要である。

鰓孔数はほとんどの藻類共生性 *Diplosoma* で種ごとに安定しており、種分類に有用であることが明らかになった。しかし、他の属においては、同一群体内のクローン個虫間においてもある程度の幅で鰓孔数が安定していない種もあることから、それぞれの種について鰓孔数の安定性慎重に検討した上で利用することが必要であることがわかった。前項で取り上げたチャツボボヤのタイプ間でも鰓孔数の比較を行ったが、タイプ内にも鰓孔数の変異があるため、この形質は各タイプの分類には利用できないことがわかった。

被嚢に含まれる骨片の形状やサイズは古くから分類形質の一つとして扱われてきた。前出のチャツボボヤ種群をはじめ、種分類に問題のある *Lissoclinum bistratum* - *L. timorense* と *Trididemnum cyclops* - *T.*

paracyclops について骨片の形状やサイズを比較するとともに、これから区分されるタイプと COI 遺伝子の部分配列によって認識されるクレードとの比較を行った。その結果、今回検討したいずれのケースにおいても、骨片形態/サイズに基づくタイプと塩基配列に基づくタイプは一致しなかった。今回の結果は、骨片の形態の分類形質としての有用性を一概に否定するものではないが、骨片形態にはある程度の変異があり、少なくともその一部には生育環境など後天的要因が含まれるものと考えられる。従って、骨片形態を分類形質として利用する際には、種内変異の程度を把握しておくとともに、他の形質と組み合わせるなどの検討が必要であろう。

(6) *Lissoclinum*, *Trididemnum* における共生藻の垂直伝播様式

Lissoclinum timorense は共生藻（プロクロロン）を共同出水腔を持つ宿主ホヤである。共生藻の垂直伝播は、被囊内で胚発生を終えた幼生が、共同出水腔を通して群体から泳ぎ出す過程で行われる。プロクロロンは、幼生胴部の後半分を覆うひだ状の被囊表面にトラップされる。プロクロロンと似たサイズの着色ビーズを用いた実験から、ひだ状の被囊表面は粘着性を持ち、効率的にプロクロロンを接着できることがわかった。ホヤ幼生が変態時に脱ぎ捨てる幼生被囊（outer tunic layer）は、本種では幼生胴部の前半分のみを覆っており、ここには粘着性がないためにプロクロロンは付着しない。これによって感覚器や幼生が基質に付着するための装置がプロクロロンによって干渉されることを防いでいると考えられる。

Lissoclinum punctatum は共生藻（プロクロロン）を共同出水腔と被囊内に持つ宿主ホヤである。被囊内のプロクロロンの大半は被囊細胞内に取り込まれており、本種における共生はこれまで報告されている藻類共生性ホヤでは唯一の細胞内共生である。本種の垂直伝播様式も *L. timorense* と基本的に同じで、共同出水腔内のプロクロロンのみが幼生胴部後半に付着し、被囊内で細胞内共生状態のプロクロロンは垂直伝播には関与していなかった。したがって、幼生の段階では細胞内共生のプロクロロンは存在しない。本種の幼生が保持するプロクロロンの一部は、幼生の変態後に被囊内に取り込まれ、細胞内に移行すると考えられる。また、*L. timorense* と比較すると、本種の幼生のひだ状の被囊の面積がかなり小さいことから、運搬されるプロクロロンの量も少ないと考えられる。

Trididemnum clinides と *T. nubilum* はいずれも被囊内に共生性の藍藻を保持している。*T. nubilum* の共生藻は *Synechocystis* sp.

で、共生藍藻は被囊内で発生中の胚を包む上皮細胞シートの内側（囲胚腔）に移行し、これが胚が形成する被囊内に取り込まれることで垂直伝播が行われる。藍藻には運動器官がないため、藍藻が移動するためには何らかの機構が必要と考えられるが、まだ明らかではない。胚を包む上皮細胞の外側に、藍藻を細胞内に取り込んだ被囊細胞が認められることから、被囊細胞が藍藻の移行に関与している可能性がある。これは、プロクロロンを被囊内に保持する *Trididemnum miniatum* における垂直伝播様式とよく似ている。しかし、*T. miniatum* では、囲胚腔のプロクロロンの多くが被囊細胞に保持されているのに対して、本種の囲胚腔にみられる藍藻は宿主の細胞に包まれていない。被囊細胞によって運ばれた藍藻が細胞から放出される時期が本種ではかなり早いのだろう。

Trididemnum clinides には3種の藍藻が被囊内に共生している。本種の垂直伝播ではこの3種全てが囲胚腔に移行し、胚の形成する被囊内に取り込まれることがわかった。本種では胚を包む上皮細胞の外側に藍藻を取り込んだ細胞が多数認められ、囲胚腔内でも細胞に包まれている藍藻は散見されることから、宿主の被囊細胞が藍藻を被囊内から囲胚腔へ運んでいると思われる。

同属の近縁種間においても共生藻の種や分布様式には多様性があり、同様な垂直伝播様式を持つ場合でも詳細に比較すると差異が認められた。藻類共生ホヤの共生様式の多様性を詳細に比較することで、共生の多様化のプロセスの解明につながることを期待される。

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10件）

- ①. Hirose E, Nozawa Y: Photosymbiotic ascidians from Kenting and Lyudao in Taiwan. *Zoological Studies*, 査読有 49(5): 681-687, 2010
- ②. Hirose M, Tochikubo T, Hirose E: Taxonomic significance of tunic spicules in photosymbiotic ascidians: A quantitative and molecular evaluation. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 査読有 90(5): 1065-1071, 2010
- ③. Kojima A, Hirose E: Transfer of prokaryotic algal symbionts from a tropical ascidian (*Lissoclinum punctatum*) colony to its larvae.

Zoological Science, 査読有 27(2):
124-127, 2010

- ④. Hirose M, Hirose E: DNA-barcoding in photosymbiotic species of the genus *Diplosoma* (Asciacea: Didemnidae) and a description of a new species from the southern Ryukyus, Japan. Zoological Science, 査読有 26(8): 564-568, 2009
- ⑤. Hirose M, Yokobori S, Hirose E: Potential speciation of morphotypes in the photosymbiotic ascidian *Didemnum molle* in the Ryukyu Archipelago, Japan. Coral Reefs, 査読有 28 (1):119-126, 2009

[学会発表] (計 8 件)

- ①. 広瀬裕一: 厄介なジデムニ科の分類の話: とくに藍藻と共生する種について ホヤの生物学談話会. 東京、2010年9月23日
- ②. Hirose E, Hirose M: A potentially undescribed genus in the family Didemnidae (Asciacea, Aplousobranchia). The 5th International Tunicate Meeting. Okinawa, June 21, 2009.
- ③. 広瀬裕一、岡篤: 光共生性ネンエキボヤにおける鰓孔数の安定性と琉球列島で発見された 1 未記載種. 日本動物学会第 79 回大会、福岡、2008 年 9 月 7 日

[図書] (計 1 件)

- ①. Hirose E, Neilan BA, Schmidt EW, Murakami A: Enigmatic life and evolution of *Prochloron* and related cyanobacteria inhabiting colonial ascidians. In "Handbook on Cyanobacteria" (eds. PM Gault, HJ Marler), Nova Science Publishers, Inc., pp. 161-189, 2009.

[その他]

ホームページ等

http://www.geocities.jp/the_tunicata/index.html

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 研究連携者

該当無し

(4) 研究協力者

広瀬 慎美子 (HIROSE MAMIKO)

琉球大学・理工学研究科・博士研究員
研究者番号: 10398307

小島 葵 (KOJIMA AOI)

琉球大学・理工学研究科・博士前期課程 (大学院生)

長屋 和彦 (NAGAYA KAZUHIKO)

琉球大学・理工学研究科・博士前期課程 (大学院生)

栢窪 哲也 (TOCHIKUBO TETSUYA)

琉球大学・理学部海洋自然科学科 (学部学生)