

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：16401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～ 2012
 課題番号：23770064
 研究課題名（和文）サンゴ-褐虫藻共生系における白化および共生メカニズムの微細形態学的解析による解明
 研究課題名（英文）Ultrastructural investigation of mechanisms of the symbiosis and bleaching of the coral-zooxanthellae symbiotic system
 研究代表者
 関田 諭子（SEKIDA SATOKO）
 高知大学・教育研究部総合科学系・准教授
 研究者番号：70314979

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ハナヤサイサンゴに共生する褐虫藻の細胞微細構造を急速凍結固定法、フリーズフラクチャー法によって観察した。その結果、サンゴ細胞および褐虫藻の微細構造が明らかになった。さらに、高温ストレス時の細胞微細構造の変化を観察し、健康なサンゴと比較検討した。また、サンゴの細胞内での褐虫藻の細胞分裂過程を明らかにした。分裂後の褐虫藻の分配様式を明らかにすることが今後の課題であるが、これらの結果の一部は学会誌に投稿予定である。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, the fine structure of the coral-zooxanthellae symbiotic system in the scleractinian *Pocillopora damicornis* were clarified by freeze-substitution and freeze-fracture electron microscopies. Ultrastructure of healthy corals and corals exposed to higher temperatures were compared. In addition, a cytokinesis process of the symbiotic zooxanthellae was clarified in detail.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：微細構造, サンゴ, 褐虫藻, 共生, 白化

1. 研究開始当初の背景

サンゴ礁生態系は、地球上で最も生物生産性と多様性が高い生態系の一つである。その主要構成要素である造礁サンゴは、褐虫藻と呼ばれる渦鞭毛藻類が共生することで生存のためのエネルギーを獲得し、熱帯・亜熱帯海域を中心にサンゴ礁を形成して生物多様性の維持に重要な役割を果たしている。しかし近年、世界各地でサンゴ礁劣化が進み、その大きな原因の一つであるサンゴの白化現象は、サンゴと褐虫藻の共生関係が海水温上昇などの様々な環境ストレスにより破綻することで生じるとされているが、それを引き

起こす要因や細胞レベルでの作用機序、褐虫藻の詳細な動態等の白化メカニズムについては未解明な部分が多い。すなわち、褐虫藻共生に関する研究は、その多くが光学顕微鏡レベルでの研究、または生理生態学的研究が主であり、サンゴ内での褐虫藻の基本的な細胞微細構造に関する研究は少ない。また、これまでに分子系統学的手法を用いて、褐虫藻 (*Symbiodinium* sp.) には遺伝的に異なる 8 つのグループが存在し、各グループによって温度耐性などの生理的性質が異なることが報告されているが、それら知見は十分とは言えない。さらに、実際の生息環境下での環境

負荷要因と白化との用量反応関係も定量的には明らかにされていない。このように、サンゴ-褐虫藻共生関係の基礎的知見、および白化や回復の過程・メカニズムについては未解明な部分が多くあり、社会科学研究者が環境負荷の削減策を検討し、その策について合意を形成する上でネックになっており、保全策は十分な成果をあげていないのが現状である。そこで電子顕微鏡を駆使した細胞微細構造の観点から基礎的な共生のメカニズムの解明を進め、環境負荷がサンゴ-褐虫藻共生系に与える影響とそのメカニズムの解明が必要となってくる。しかし、サンゴ-褐虫藻共生系における細胞学的研究は、特に褐虫藻の固定の困難さから十分に進んでいるとは言えず、褐虫藻が本当にサンゴ細胞の内部に存在するのか、また、サンゴ内での褐虫藻の正確な形態、および微細構造も未だ明確にはされていない状況である。このように正確な形態も未解明な現状では、白化を誘導したサンゴの細胞内で起きる現象を正確に知ることはできない。

2. 研究の目的

近年、サンゴと褐虫藻の共生関係が破綻する白化現象が問題となっている。しかし、その白化のメカニズムや褐虫藻の詳細な動態などの基礎的知見については未解明な部分が少なくない。本研究では、褐虫藻の挙動に焦点を当て、実験室レベルでの各種環境ストレス条件下におけるサンゴ-褐虫藻共生系の成立と維持および破綻のメカニズムを電子顕微鏡を駆使した細胞微細構造の変化の解析から解明することを目的とした。さらに、それらの成果を社会科学分野の研究者と共同し、地域社会の生態系管理・保全における科学の関与のあり方と方法を探ることを目標とする。

3. 研究の方法

研究材料として、比較的入手が容易であるイシサンゴ目に属するクシハダミドリイシ、ハナヤサイサンゴを野外採集し、サンゴ-褐虫藻共生系における細胞微細構造、サンゴへの褐虫藻の出入りの挙動、高温ストレス時の細胞微細構造の変化について電子顕微鏡を用いた細胞生物学的解析を中心に研究を行う。

具体的な方法としては、急速凍結固定法、フリーズフラクチャー法を用いて健康なサンゴ、ストレス時のサンゴを固定し、透過型電子顕微鏡で観察、形態の比較検討を行う。

4. 研究成果

造礁サンゴはサンゴ礁をつくるサンゴのなかまで、ほとんどの種は刺胞動物門花虫綱に属している。小さなイソギンチャクの形を

した1つひとつのポリプがサンゴの個体であり、それぞれ炭酸カルシウムの骨格をつくる。ポリプが分裂、または新たに形成されて無性的に繁殖することで、サンゴは多数の個体からなる群体として発達する。造礁サンゴの体内には必ず褐虫藻と呼ばれる単細胞の藻類が共生している。サンゴは褐虫藻が光合成した栄養の一部を得て増殖し、また、サンゴの骨格形成も光合成によって促進される。褐虫藻との共生はサンゴが生存するために不可欠である。

一方、褐虫藻は海中で2本の鞭毛を使って泳ぐ渦鞭毛藻類のなかま (*Symbiodinium* spp.) で、いわゆる植物プランクトンでもある。褐虫藻はサンゴだけでなく、イソギンチャクやクラゲ、シヤコ貝などの他の動物とも共生する。褐虫藻がこれら動物の体内に入ると、鞭毛を使って泳ぐ遊走細胞相から鞭毛をもたない不動細胞相へ移行する。これとは逆に、褐虫藻が動物の体内から出て行くこともある。たとえば、サンゴと褐虫藻の共生関係が水温上昇などの様々な環境ストレスにより破綻し、サンゴは共生させている褐虫藻を排出または消化してしまうことが報告されている。

褐虫藻がサンゴ体内のどこで共生しているのか、また、サンゴ体内の褐虫藻はどのような形態をしているのかという問題は、まだ未解明な部分がある。本研究では、土佐湾沿岸に生育するハナヤサイサンゴ (*Pocillopora damicornis*) とクシハダミドリイシ (*Acropora hyacinthus*) を用い、サンゴと共生している褐虫藻の微細構造と温度に対するサンゴ細胞の挙動について透過型電子顕微鏡を用いて調べた。

(1) サンゴのからだのつくりと褐虫藻の分布密度

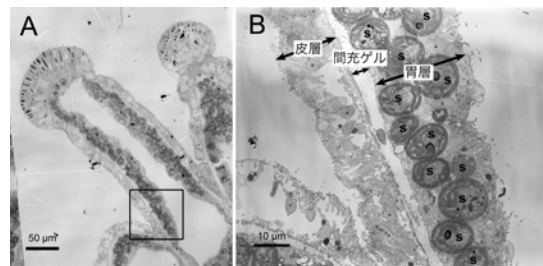


図1

サンゴは二胚葉動物であり、からだは外胚葉由来の皮層組織と内胚葉由来の胃層組織から構成される。図1はハナヤサイサンゴのポリプの触手を縦に切った断面を示す。触手は指サックのような形をしており、内部の大きな空間を胃腔という (図1A)。胃腔はポリプの口を通じて外部とつながり、海水で満たされている。組織は外側から順に皮層、非細

胞性の間充ゲル、胃層からなり、褐虫藻は胃層にのみ分布している (図 1B)。

サンゴのポリプのどの部位に褐虫藻が存在するのかを明らかにするために、クシハダミドリイシとハナヤサイサンゴのポリプをそれぞれ7つの部位に分け (図 2A), 各部位に含まれる褐虫藻の密度を調べた。サンゴを固定・包埋し、ポリプを横断する切片を作製してポリプ各部位の断面を光学顕微鏡で観察し、単位面積当たりに含まれている褐虫藻の数を求めた (図 2B)。褐虫藻はどの部位でも胃層組織にのみ見られ、皮層組織や間充ゲルにはなかった。褐虫藻の分布はポリプの部位によって異なり、両種ともに褐虫藻の密度が最も高かった部位は触手で、2番目は体壁であった。褐虫藻は光合成を行うので、ポリプ内部よりも光が十分に当たる触手と体壁に多く分布しているのだろうと考えられる。しかし、口盤の褐虫藻の密度はクシハダミドリイシよりもハナヤサイサンゴの方が高かった。これは、クシハダミドリイシの口盤が奥にあって触手の影になりやすいのに対し、ハナヤサイサンゴでは触手が長く伸びて口盤に光が直接当たりやすいからだと推測される。

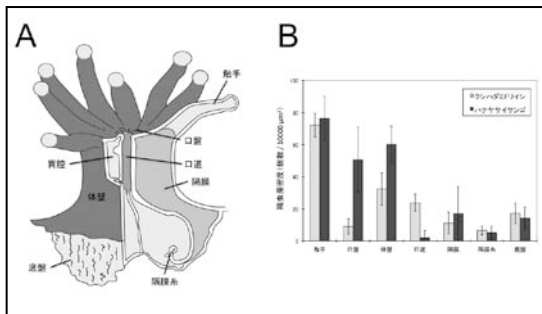


図 2

(2) サンゴに共生する褐虫藻の細胞微細構造

細胞を電子顕微鏡で観察するには、細胞膜や細胞小器官などの微細構造をきちっと保存しなければならない。この処理を固定という。今回、過マンガン酸カリウムを用いて固定し、サンゴと褐虫藻の細胞膜を初めて明瞭に観察できた。図 3A で示すように、褐虫藻細胞全体がサンゴ細胞の内部に入っていることから、褐虫藻は細胞と細胞の間隙間ではなく、サンゴの胃層細胞内に共生していることがはっきりした。

サンゴ細胞に共生する褐虫藻は、直径約 10 μm の球形を呈し、サンゴ細胞の容積のほとんどを占めている (図 3A)。葉緑体は細胞膜に沿って分布し、内部に筋状のチラコイドラメラとこぶ状に突き出たピレノイドを含む (図 3A, B)。褐虫藻の核は渦鞭毛藻核と呼ばれ、核分裂時以外でも常に染色体が見える。図 3B はサンゴの細胞内で二分裂している褐虫藻

細胞を示す。これは核分裂を終えた母細胞が 2 つの娘細胞に細胞質分裂しようとしている段階である (図 3B の矢印)。このように、褐虫藻はサンゴの胃層細胞内で増殖する。

葉緑体とミトコンドリアはそれぞれシアノバクテリアと好気性細菌が起源となって真核細胞に取り込まれ、細胞共生した結果、細胞小器官になったと考えられている。細胞外の物質や粒子は食作用によって細胞内へ取り込まれるが、この時に取り込まれた物質や粒子は細胞膜に包まれる。褐虫藻は、もともと海中で自由生活していた渦鞭毛藻がサンゴ細胞に取り込まれ、細胞内共生している状態にある。

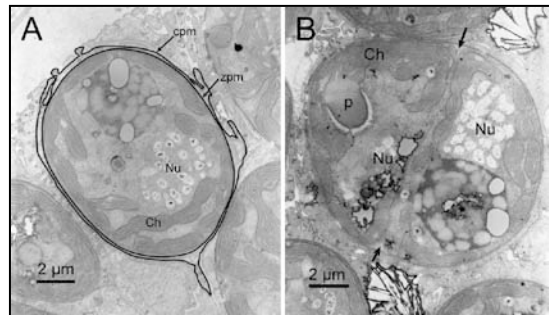


図 3

褐虫藻はサンゴ細胞の細胞膜に由来する膜に包まれているのかどうかを含めて、サンゴ細胞内での褐虫藻の微細構造を明らかにするために、サンゴ組織を急速に凍結して微細構造を保存する凍結置換固定法を用いて観察した。サンゴ細胞の細胞質内で、褐虫藻は 2 枚の膜様構造 (外側から順に膜様構造 1, 2) によって取り囲まれていた (図 4A, B)。膜様構造 2 の内側にある褐虫藻本体は、基本的に渦鞭毛藻類の細胞構造と同じであった。すなわち、まず褐虫藻の細胞膜があり、そのすぐ内側にアンフィエスマ小胞と呼ばれる扁平な小胞が細胞膜を裏打ちするように配列した。さらに、アンフィエスマ小胞の下方細胞質側に束になった微小管が分布した。また、膜様構造 1 と膜様構造 2 の間に、膜の断片が層になって積み重なったような構造が部分的に観察された (図 4B)。

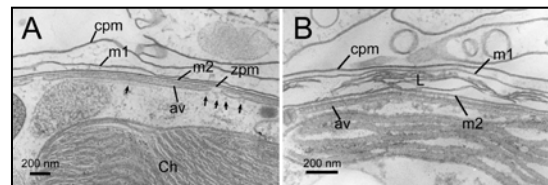


図 4

図 5 の模式図に示すように、サンゴ細胞内に共生している褐虫藻の表層構造は予想以上に複雑であることが分かった。また、フリ

ーズフラクチャー法によって、膜様構造1はサンゴ細胞の食胞膜由来と考えられる生体膜であり、膜様構造2は、生体膜ではないことが明らかになった。

さらに、サンゴ細胞内での褐虫藻の分裂過程も明らかになり、サンゴの細胞内での褐虫藻の細胞分裂は、まず核分裂が先行して起こり、その後、原形質膜が細胞の赤道面で貫入し始めた。細胞質分裂が完了後、膜様構造2が細胞質分裂面に向かって貫入してそれぞれの娘細胞を取り囲んだ後に、膜様構造1が分裂面に向かって貫入し始めた。最終的に、膜様構造1と2にそれぞれ囲まれた2つの娘細胞(褐虫藻)が1つのサンゴ細胞の中に存在した。

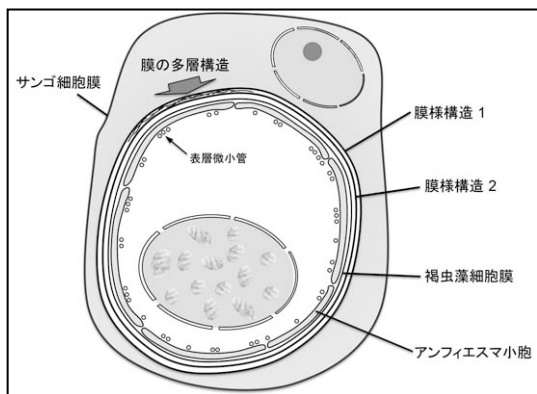


図5

(3) 高温条件下でのサンゴ-褐虫藻共生系の細胞微細構造の変化

サンゴと褐虫藻の共生関係は高温ストレスによって崩れ、サンゴは共生させている褐虫藻を排出または消化し、結果としてサンゴの白化が起こることが知られている。今回、ハナヤサイサンゴを高温条件で短期間飼育し、サンゴ細胞と褐虫藻の細胞構造がどのように変化するかを調べた。実体顕微鏡でポリプを観察していると、高温に移して数分で、触手の胃腔の中へ褐虫藻が遊離して流動し始め、やがて口から排出された。高温条件に移した後、一定時間おきにサンゴを固定し、褐虫藻が共生している胃層組織の微細構造を電子顕微鏡で観察した。

サンゴの胃層は、褐虫藻を共生させている細胞と褐虫藻を含まない細胞とで組織を構成している(図6A)。高温ストレスの初期段階で影響を受けるのはサンゴの胃層細胞であり、褐虫藻の微細構造自体はほとんど変化しないことが分かった。高温に移した後、最初に変化が起きたのは、褐虫藻を含まない胃層細胞であった。細胞内に黒く染色されるライソソーム様構造が現れ、時間とともに増加した(図6B)。ライソソームは加水分解酵素を含み、細胞内消化を行う細胞小器官である。その後、ライソソーム様構造のはたらきで細

胞質が分解し、内容物も断片化した(図6C)。細胞質の断片化が進むと、細胞の機能は失われ、さらには細胞の形そのものが壊れた。褐虫藻を共生させている胃層細胞はほとんど変化しなかった。しかし、褐虫藻を含まない細胞の崩壊により、胃層組織としてお互いに結合していた細胞同士の接着が失われ、褐虫藻を共生させている細胞が胃層組織から脱落して胃腔内へ遊離した(図6D)。このように、実体顕微鏡でポリプの口から排出されたように見えた褐虫藻は、実は褐虫藻を共生させているサンゴの胃層細胞ではないかと推察された。褐虫藻をもたないサンゴの胃層細胞で起こったこれら一連の現象は、オートファジー(自己消化)によるプログラム細胞死と類似することが示唆された。

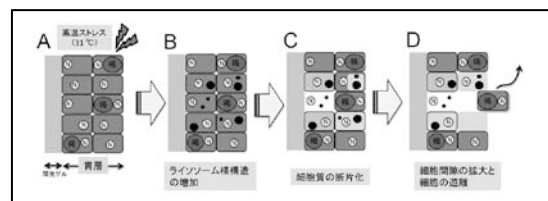


図6

フィリピンから台湾、南西諸島を経由して日本列島に連なる黒潮圏の沿岸域に発達している造礁サンゴ群集は、世界でも有数の規模を誇り、高い生物生産性と生物多様性を有している。しかし近年、サンゴ群集の劣化が顕著に進んできていることから、サンゴの保全に取り組む研究機関の役割が期待されている。本研究では、サンゴに共生する褐虫藻の微細構造を明らかにしたが、サンゴ群集の劣化を含むグローバルな環境問題の解決には、自然科学分野だけではなく、社会科学分野の研究者や地域社会とも連携して共同研究し、これらの成果を社会に還元していくことが重要である。

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 関田諭子・奥田一雄 (2012) サンゴに共生する褐虫藻の微細構造と生理学的挙動 海洋と生物, 査読無, 34 (4): 338-342
- ② Kawamura K., Kitamura S., Sekida S., Tsuda M., and Sunanaga T. (2012) Molecular anatomy of tunicate senescence: Reversible function of mitochondrial and nuclear genes associated with budding cycles. Development, 査読有, 139:4083-4093

- (doi:10.1242/dev.083170)
- ③ Elvira P. R., Sekida S. and Okuda K. (2012) Rhizoid formation in *Valonia* (Siphonocladales, Chlorophyceae). *Phycologia*, 査読有, 51 (4): 391-402
 - ④ Elvira P. R., Sekida S. and Okuda K. (2012) Inducible growth mode switches influence *Valonia* rhizoid differentiation. *Protoplasma*, 査読有, 250 (1): 407-414, (DOI 10.1007/s00709-012-0381-y)
 - ⑤ Sekida S., Takahira M., Horiguchi T. and Okuda K. (2012) Effects of high pressure in the armored dinoflagellate *Scrippsiella hexapraecingula* (Peridinales, Dinophyceae): Changes in thecal plate pattern and microtubule assembly. *J. Phycol.*, 査読有, 48, 163-173
 - ⑥ Himeno S., Yasuoka S., Sekida S., Mine I., Matsui T., Okuda K. and Takahashi M. M. (2011) Distribution of eelgrass, *Zostera japonica* Aschers. & Graebn., in a tidal river with reference to some environmental characteristics. *Hikobia*, 査読有, 16: 85-94
 - ⑦ Mine I, Yuasa K, Uesugi M, Sekida S, Okuda K (2011) Band growth and localization of vesicle exocytosis in the red alga *Antithamnion nipponicum* (Ceramiales). *Eur. J. Phycol.*, 査読有, 46 (3): 263-270
 - ⑧ Mine I, Yoshimatsu K, Kobanba A, Sekida S, Okuda K (2011) Outflow movement during gamete discharge in *Bryopsis plumosa* (Caulerpales, Chlorophyta). *Phycologia*, 査読有, 50 (4): 363-369
 - ⑨ Mine I, Sekida S and Okuda K (2011) Microtubule Arrangement during the Formation of a New Growing Tip in the Coenocytic Green Alga *Bryopsis plumosa* (Caulerpales, Chlorophyta). *Cytologia*, 査読有, 76(2): 129-135
 - ⑩ Mine I, Ozaki C, Sekida S, Okuda K (2011) Induction of gamete discharge by hypertonic treatment in the green alga *Bryopsis plumose* (Caulerpales, Chlorophyta). *Phycological Research*, 査読有, 59 (1): 70-73

[学会発表] (計9件)

- ① 川村 和夫, 関田諭子, 砂長毅: ホヤの生殖と加齢 —ミトコンドリア遺伝子と核遺伝子の機能相関—, 土佐生物学会, 2012年12月9日, 高知大学(高知県高知市)

- ② 佐藤 友則, 湯浅 健, 関田諭子, 奥田 一雄: ミドリゲ目緑藻キッコウグサの分割細胞分裂の光阻害とアクチンフィラメントの動態, 日本植物学会第76回大会, 2012年9月17日, 兵庫県立大学(兵庫県姫路市)
- ③ 関田諭子, 堀口健雄, 奥田一雄: 渦鞭毛藻 *Spiniferodinium galeiforme* の細胞外被構造, 日本藻類学会第36回大会, 2012年7月15日, 北海道大学(北海道札幌市)
- ④ 長谷部有美, 関田諭子, 奥田一雄: ミドリゲ目海産多核緑藻タンポヤリの分割細胞分裂の過程と特徴, 生物系三学会大会中国四国支部・島根大会, 2012年5月13日, 島根大学(島根県島根市)
- ⑤ Paul Rommel Elvira, 関田諭子, 奥田一雄: Dictating cell fate by light: Serial growth mode switches in a *Valonia* rhizoid, 日本植物学会第75回大会, 2011年9月17日, 東京大学(東京都)
- ⑥ 関田諭子, 島田真知, 奥田一雄: 黄金色藻 *Epipyxis pulchra* におけるロリカの微細構造と形成過程, 日本植物学会第75回大会, 2011年9月17日, 東京大学(東京都)
- ⑦ 的野はる菜, 関田諭子, 奥田一雄: 多核緑藻キッコウグサの細胞同士を連結させる接着細胞の誘導要因, 生物系三学会大会中国四国支部・香川大会, 2011年5月15日, 香川大学(香川県高松市)
- ⑧ 関田諭子, 奥田一雄: サンゴに共生する渦鞭毛藻の微細構造, 日本藻類学会第35回大会, 2011年3月28日, 富山大学(富山県富山市)
- ⑨ Satoko Sekida: The development and its regulation of cell coverings in armored dinoflagellates. 2011年10月9日-14日, The 6th Asian Pacific Phycological Forum, 韓国美麗市

[その他]

ホームページ等

<http://kuroshio.cc.kochi-u.ac.jp/umihenka/index.html> (国立大学法人高知大学 2013 南国土佐のうみへんか)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関田 諭子 (SEKIDA SATOKO)

高知大学・教育研究部総合科学系・准教授
研究者番号: 70314979