

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770081

研究課題名(和文) 海綿動物の無性生殖による浮遊分散機構の解明

研究課題名(英文) Floating dispersal through asexual reproduction of sponges

研究代表者

伊勢 優史 (ISE, Yuji)

東京大学・農学生命科学研究科・研究員

研究者番号：20535108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：海綿動物では未知の現象であった浮遊性芽球について、芽球を形成するフウライカイメンの分類学的再検討や浮遊性芽球の起源、芽球の形成および浮遊沈降機構の解明、分散過程の解明を目指して研究を行った。その結果、フウライカイメンはセンコウカイメン科のうち共生褐虫藻類をもつ単系統群に含まれることがわかった。また、フウライカイメンは芽球の形態および遺伝的に異なる2種からなることが判明した。芽球の形成過程や浮遊および沈降機構については、当該年度中に十分な成果を得ることができずこれからの課題である。

研究成果の概要(英文)：To clarify mechanism of floating dispersal through asexual reproduction by sponges, we conducted systematic revision of *Spherospongia inconstans* (Clionidae, Hadromerida, Demospongiae), molecular phylogeny of excavating sponge of the family Clionidae, developmental process of asexual buds, floating/sinking mechanism of buds, and molecular phylogeography of *S. inconstans*. In consequence, *S. inconstans* is revealed to be a member of monophyletic clade that has symbiotic zooxanthellae in the family Clionidae. And *S. inconstans* should be divided into two species based on morphology of buds and ALG11 sequences. We could not get enough data about developmental process of asexual buds, and floating/sinking mechanism of buds in the fiscal years.

研究分野：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：海綿動物 浮遊分散 無性生殖 サンゴ礁 共生褐虫藻

## 1. 研究開始当初の背景

底生性かつ固着性生物である海綿動物において、分布域の拡大は短い幼生期間に頼るしかないというのが常識である。一方、申請者は2010年にフウライカイメン *Sphaciospongia inconstans* が、浮遊性の芽球を形成することを発見・発表し、成体自らによる長距離分散は不可能というこれまでの常識を覆した。

フウライカイメンは、インド・西太平洋のサンゴ礁域に広く分布することが知られており、申請者らによって礁湖の砂礫底に体の大部分を埋没させて生活するという特異な生態をとることが判明している (Ise *et al.*, 2004)。フウライカイメンの芽球形成 (無性生殖) は以下の4つの段階を経て進行することがわかっていった。1: 体の上部表面に小さな突起が形成される。2: 突起が成長し球状になる。3: 芽球とカイメン本体部の連結部がもろくなる。4: 芽球が本体部分から離れて浮遊し漂流する。芽球はフウライカイメンのもつ共生褐虫藻が光合成により気泡を生成し、その気泡を芽球表面の凹みにより保持するか皮層によって包み込むことによって浮遊すると考えられた (Ise, 2010)。本種の分布域は東アフリカ沿岸からハワイ島、グレートバリアリーフから琉球列島と広い。浮遊期間は不明ではあるものの芽球が浮遊することが本種の分布域の拡大に大きな役割を果たしていると推察された。

フウライカイメンの芽球形成および芽球が浮遊するメカニズムについて表面的な事象を観察することはできたが、詳細な形態学的、生態学的な観察は不十分であり、より厳密に研究を進める必要がある。また何よりもフウライカイメン自体の種分類が世界的に混乱しており分類体系に問題がある (Ise *et al.*, 2004) ためフウライカイメン *Sphaciospongia inconstans* とは何か? という

根本的な問題を最初に解決しておく必要が出てきた。

## 2. 研究の目的

本研究ではフウライカイメンをモデルとした海綿動物の無性生殖による浮遊分散機構の解明を目標として以下に説明する3つの研究を進めることにした。

### (1) 形態, 遺伝, 生態情報を併用したフウライカイメン *Sphaciospongia inconstans* の分類学的再検討

フウライカイメンは、その原記載時 (Dendy, 1887) に3つの亜種が提唱されたが、これらは外見のみ (それぞれ小さな塊状, 上面が平らな大きな塊状, 枝状) で分けられたものであり現在では認められていない。申請者の観察から、これらが同所的に生息することがわかっており (Ise *et al.*, 2004), 予備的な実験から塊状の個体と枝状の個体が別種の可能性が示唆されている。本研究では既に申請者の手元にある標本に加えてインド・西太平洋のなるべく広い範囲から採集したフウライカイメンを材料として分子系統学的研究を行い、確認されたクレードに形態および生態情報を重ね合わせることでフウライカイメンの亜種問題を解決する。また、フウライカイメンの属する *Sphaciospongia* 属はインド・西太平洋区から約30種が知られており、これらの模式標本を観察することにより *S. inconstans* と *Sphaciospongia* 属全体の分類学的再検討を行う。

### (2) 芽球形成と浮遊機構の解明

フウライカイメンの芽球形成は、これまで外見の観察しか行われていなかったが、本研究では各成長段階の個体を採集し組織切片を観察することにより芽球内部でどのような変化が起きながら芽球が形成されていくのかを調べる。また、現段階で未知である芽球の浮遊期間や沈降のメカニズムを調べるため浮遊直後の芽球を採集し、屋外

水槽で飼育し、経時観察を行う。

### (3) フウライカイメンの分子系統地理学的研究

芽球の浮遊分散が地域個体群間の遺伝的交流にどの程度影響を与えているかを調べるためインド・西太平洋区の広い範囲から採集したフウライカイメンを材料として分子系統地理学的研究を行う。

以上のことを通して底性無脊椎動物としては非常に珍しい生物現象である浮遊性芽球を包括的に調べる。

## 3. 研究の方法

### 標本採集

研究に用いるカイメンは、素潜り、スキューバダイビングにより採集する。採集時の生態写真の撮影を原則とし、後に撮影個体と標本の照合を可能な状態にしておく。

### 標本固定

得られた標本は基本的に 90%以上エタノールで固定し、芽球形成の組織切片観察を行うものについては体表を含む襟細胞層の一部をブアン固定液で固定する。

### 形態観察

骨格構造の観察のため、剃刀を用いて体表を含む襟細胞層の切片を作成、オイキッド液にて包埋し、光学顕微鏡下で観察する。また、体組織を次亜塩素酸で溶かし、蒸留水で洗浄する事により骨片標本を得る。光学顕微鏡や電子顕微鏡下で骨片の観察、測定を行う。体組織の詳細な観察はマイクロトームで組織切片を作成し光学顕微鏡下で観察を行う。

*Sphaciospongia* 属既知種の前記載論文を収集、形態情報の抽出を行う。また、より詳細な形態比較のために各国の研究機関に収蔵されている模式標本の観察、再記載も行い、自ら採集した標本との比較検討を行う。

### 塩基配列の決定および分子系統解析

各標本の襟細胞層の一部からキットを用いてゲノム DNA を抽出し、PCR、シーケンスを行って、細胞核の 28S rDNA 遺伝子、ITS 領域および ALG11 遺伝子、ミトコンドリアの CO1 遺伝子の塩基配列を決定する。系統関係の推定には RAxML 等の解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) フウライカイメンの系統的位置と姉妹群の探索

フウライカイメンが含まれるセンコウカイメン科とその近縁科である

Placospongiidae, Acanthochaetetidae, Spirastrellidae の各種を用いて 54 個体 47 種 2 遺伝子 (28SrDNA と ALG11) を用いた分子系統解析を行った。その結果、センコウカイメン科内においては *Pione* 属を除いたいずれの属も単系統群にはならず、新たに 4 つの属を再定義する必要があることが判明した。遺伝子数を増やした 50 個体 44 種 3 遺伝子を用いた解析からは、これら 4 つの属の系統関係も明瞭になり、非穿孔型のカイメンから穿孔型のカイメンへの進化および穿孔型のカイメンの中での様々な適応放散の概要が判明しつつある。

フウライカイメンについては、共生褐虫藻類をもつ単系統群に含まれることが判明し、褐虫藻類との共生が生態の多様化を引き起こしたことが示唆された。また、これまで不明であったフウライカイメンの姉妹群がカリブ海固有種の *Sphaciospongia vesparium* であることが示唆された。これら 2 種の姉妹群が *Cliona varians* であることも判明し、フウライカイメン以外の 2 種が無性生殖の芽球を形成するかどうかも含めて浮遊性芽球の起源について今後調べる必要がある。

### (2) フウライカイメンの分類学的再検討

国内外 5 地点から得られたフウライカイメン合計 36 個体について、細胞核 DNA の

ALG11 遺伝子の塩基配列 933bp を用いて分子系統解析を行った。その結果、フウライカイメンは2つの明瞭な単系統群からなることが判明した。解析に用いた個体の外部形態から、指状の *Spheciospongia inconstans* var. *digitata* はクレード1に、塊状の var. *globosa* と var. *maendrina* はクレード2に入ることが示唆された。一方、中間型の形態を示す複数の個体も2つのクレードに収まったため、それぞれのクレードを支持する形態形質の再検討も行い、3点の差異を認めることができた。これらのうち最も顕著な差異は無性生殖時の芽球に見ることができた。芽球がクレード1においては滑らかな球状だが、クレード2においては凹凸の多い潰れた球状を示した。また、芽球の形成個数についても差異が認められ、クレード1では指状突起の頂上部に一度に1~2個、クレード2では砂礫底から出ている体表部全面から複数個体形成していた。以上のことから、クレード1および2は別種と見なすことが妥当であると考えられ、インド・西太平洋区に模式産地がある同属既知種約30種とのシノニム関係の整理を視野に入れて学名の対応を検討中である。

### (3) 芽球形成と浮遊機構の解明

平成24, 25年の夏季にフウライカイメンの飼育実験や芽球の成長速度についての観察を行った。しかし、飼育したカイメンの多くが芽球の成長を止めてしまう等、多くの問題が起き、屋外水槽でのフウライカイメンの飼育や、測定時にカイメンを海水から上げること及びノギス等で芽球に直接接触れることが悪影響を及ぼしていることが示唆された。これらの問題に対し、野外での定期的な観察を行う等、工夫を試みたが十分な成果を得ることができなかった。

### (4) フウライカイメンの系統地理学的研究

当初解析に用いようと試みていた細胞核

DNAのITS領域からは多くの intragenomic variation が見付き、使用することができなかった。ALG11 遺伝子ではフウライカイメン内に2種あることは検知できたが、それぞれの種内変異が地理的な差異を得るには不十分であった。また、CO1 遺伝子に至ってはPCR産物すら得ることができなかった。今後はマイクロサテライトマーカーを開発してこの問題に取り組みたい。

### 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7件)

1. Tajima, H., Wakimoto, T., Takada, K., Ise, Y. & Abe, I. (2014) Revised Structure of Cyclolithistide A, a Cyclic Depsipeptide from the Marine Sponge *Discodermia japonica*. *Journal of Natural Products* 77: 154–158. 査読有.
2. Akiyama, T., Takada, K., Oikawa, T., Matsuura, N., Ise, Y., Okada, S. & Matsunaga, S. (2013) Stimulators of adipogenesis from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *Tetrahedron* 69: 6560–6564. 査読有.
3. Imae, Y., Takada, K., Okada, S., Ise, Y., Morii, Y., Yoshimura, H. & Matsunaga, S. (2013) Isolation of Ciliatamide D from a Marine Sponge *Stelletta* sp. and a reinvestigation of the Configuration of Ciliatamide A. *Journal of Natural Products* 76: 755–758. 査読有.
4. 伊勢優史. (2013) 分類学に基づいた動物学 – 海綿動物を例に, “海綿動物門第4の綱: 同骨海綿綱”. *タクサ-日本動物分類学会誌* 34: 18-24.
5. Suzuki, M., Ueoka, R., Takada, K., Okada, S., Otsuka, S., Ise, Y. & Matsunaga, S. (2012) Isolation of Spirastrellolides A and B from a Marine Sponge *Epipolasis* sp. and their Cytotoxic Activities. *Journal of Natural Products* 75: 1192–1195. 査読有.
6. Kimura, M., Wakimoto, T., Egami, Y., Co Tan, K., Ise, Y. & Abe, I. (2012) Calyxamides A and B, Cytotoxic Cyclic Peptides from the Marine Sponge *Discodermia calyx*. *Journal of Natural Products* 75: 290–294. 査読有.
7. Imae, Y., Takada, K., Murayama, S., Okada, S., Ise, Y. & Matsunaga, S. (2011) Jasisoquinolines A and B,

Architecturally New Isoquinolines, from a Marine Sponge *Jaspis* sp. *Organic Letters* 13: 4798–4801. 査読有.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 松永茂樹, 人羅勇氣, 高田健太郎, 伊勢優史, 岡田茂. 宮古首根で採取したカイメンに含まれるがん細胞増殖抑制物質. *ブルーアース* 2014, 東京海洋大学, 東京. 2 月 19–20 日, 2014 年. ポスター発表.
2. 藤田喜久, 成瀬貴, 久保弘文, 伊勢優史. 宮古諸島下地島の海底洞窟の無脊椎動物相(予報). 沖縄生物学会第 50 回大会. 琉球大学, 那覇, 沖縄. 5 月 26 日, 2013 年. 口頭発表.
3. 大西雄二, 長塩皓美, 山上翔世, 渡部裕美, 伊勢優史, 小糸智子, 山中寿朗. 熱水および冷湧水が支える生態系の多様性と広がりに関する研究. 日本地球惑星科学連合 2013 年大会. 幕張メッセ国際会議場, 千葉. 5 月 19 日–5 月 24 日, 2013 年. ポスター発表.
4. 但馬大紀, 脇本敏幸, 伊勢優史, 阿部郁郎. 環状デブシペプチド Cyclolithistide A の構造訂正. 日本薬学会 133 年会. パシフィコ横浜, 横浜, 神奈川. 3 月 27 日–30 日, 2013 年. 口頭発表.
5. Ise, Y. Diversity, molecular phylogeny, and evolution of excavating sponges. 1st JAMBIO International Symposium “Marine Biology - Cell and Evolution”. Tokyo Campus, University of Tsukuba, Tokyo, Japan. 25–26 February, 2013. 招待講演.
6. Nagashio, H., Yamanaka, T., Watanabe, H., Yamagami, S., Ise, Y., Makita, H. Evaluation of nutrient sources for the sponges inhabited around seafloor hydrothermal fields in the Okinawa Trough. American Geophysical Union (AGU). San Francisco, US. 3–7 December, 2012.
7. Ise, Y. Preliminary report of asexual reproduction of psammobiontic sponge in the Indo-Pacific coral reefs – possible floating dispersal. LIPI-JSPS Asian Core Program Joint International Seminar on Coastal Ecosystems in Southeast Asia (COMSEA). LIPI Convention Hall, Jakarta, Indonesia. 12–14 November, 2012. 招待講演.
8. 伊勢優史. 分類学に基づいた動物学 – 海綿動物を例に. 第 83 回日本動物学会関連集会「分類学を基礎にした動物学」, 大阪大学, 大阪. 2012 年 9 月 13 日. 招待講演.
9. 長塩皓美, 山中寿郎, 渡辺裕美, 山

上翔世. 伊勢優史, 牧田寛子. 沖縄トラフの海底熱水系周辺に生息する海綿動物の栄養源の推定. 平成 24 年度・日本地球惑星科学連合大会, 幕張メッセ, 千葉. 5 月 20–25 日, 2012 年. 口頭発表.

〔図書〕(計 3 件)

1. 伊勢優史. 2013. 襟, 襟細胞, 海綿質繊維, 海綿動物, 間充ゲル, 硬骨海綿類, 軸系, 尋常海綿類, 水溝系, 石灰海綿類, 皮層, 六放海綿類, 生物分類表: 海綿動物門.(編) 巖佐庸・倉谷 滋・斎藤成也・塚谷裕一. 岩波生物学辞典 第 5 版. 岩波書店.
2. 伊勢優史. 2012. 第 15 章 海綿動物門.(編) 藤倉克則, 奥谷喬司, 丸山正. 潜水調査船が観た深海生物 深海生物研究の現在(第 2 版). 東海大学出版会. pp. 215–227.
3. 伊勢優史. 2012. 第 5 章 海綿動物門.(編) 藤倉克則, 奥谷喬司, 丸山正. 潜水調査船が観た深海生物 深海生物研究の現在(第 2 版). 東海大学出版会. p. 95.

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊勢 優史 (ISE, Yuji)

東京大学・農学生命科学研究科・研究員

研究者番号：20535108

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：