

令和 7 年 6 月 17 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22H03794・23K25048

研究課題名（和文）造礁サンゴ-褐虫藻共生の生物学的メカニズムのin vitro共生系を駆使した解明

研究課題名（英文）Elucidation of the biological mechanisms of reef-building coral-dinoflagellates symbiosis using in vitro system

研究代表者

西辻 光希（Nishitsuji, Koki）

福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授

研究者番号：60770823

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：これまでの研究において、我々はミドリイシ属サンゴ *Acropora tenuis* のプラヌラ幼生から培養細胞株を確立した。本研究ではそれら複数ある培養細胞の起源を、遺伝子発現や抗体染色などをもとに明らかにした。またサンゴ培養細胞とin vitro共生を行う褐虫藻の種類ごとの共生効率の違いを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サンゴ培養細胞の詳細な起源が解明され、褐虫藻の系統ごとの共生率の違いが明らかになった。これにより、地球温暖化の影響によりサンゴの大白化が起きている状況を改善する手法の開発が期待できる。その一方でサンゴと褐虫藻の共生メカニズム成立に關与する分子メカニズムは未解明のままである。そのため本研究の成果をもとにしてサンゴ-褐虫藻共生の分子メカニズムを詳細に解明する研究に取り組むことにより、サンゴの白化を食い止める対応策の開発が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In previous studies, we established cultured cell lines from planula larvae of the coral, *Acropora tenuis*. In this study, we identified the origins of these various cultured cells based on gene expression analysis and fluorescent antibody staining. Furthermore, we clarified the differences in symbiotic efficiency among different species of Symbiodinium in in vitro co-culture with the coral cells.

研究分野：ゲノム科学、細胞生物学

キーワード：サンゴ 培養細胞 *Acropora tenuis* 褐虫藻

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球上で最も生物多様性に富む場所、それが世界の亜熱帯・熱帯海洋域に広がるサンゴ礁である。サンゴ礁は海の約 0.2%を占めるに過ぎないが記載されている生物の約 30%が生息し、漁業や観光業などでサンゴ礁域に住む人々の生活を支えている。しかし近年の人間活動による環境悪化、特に海水温の上昇、海水の酸性化、オニヒトデの爆発的放散などにより世界のサンゴ礁が絶滅の危機に瀕している。この状態が続けば、2030 年代にはサンゴ礁の半分以上が失われると予測されている。この危機に直面してサンゴ礁の保全・再生事業が世界中に広がっており、私達の研究グループも世界に先駆けてサンゴのゲノム (コユビミドリイシ *Acropora digitifera*, Shinzato et al., 2011. *Nature* 476: 320)、及び共生褐虫藻 (クレード B: Shoguchi et al., 2013. *Curr. Biol.* 23: 1399) のゲノムを解読し、サンゴ礁の保全・再生事業に貢献してきた。

礁を作り出す造礁サンゴは、幼生期から褐虫藻と共生関係を開始成立させ、褐虫藻の光合成産物の一部を利用する見返りに炭酸カルシウム骨格を棲家として提供することにより、現在の広大なサンゴ礁を作り上げてきた。けれども正常に褐虫藻を共生させているサンゴが海水温の上昇などの環境ストレスを受けると、褐虫藻がサンゴから脱出してその共生関係が崩壊し、サンゴは白化し死滅する (図 1)。サンゴと褐虫藻の共生のメカニズムについては以前不明な点が多い。世界中でサンゴ礁の保全・再生事業が展開されているが、共生メカニズムを理解した上での決定的な対応策は見つかっていないのが現状である。

長年多くの研究者は、『造礁サンゴの培養細胞を作り培養皿の中で褐虫藻を取り込むということができれば、この *in vitro* 系を駆使してサンゴ-褐虫藻共生系を解析できるのではないかと考えてきた。実際多くの研究グループが試みたが、成功に至っていない。本研究グループは 2019 年からウスエダミドリイシ (*Acropora tenuis*) の幼生細胞をもとに、液体窒素中で永久保存できる安定したサンゴ細胞株の樹立に取り組み、2021 年について成功した。この *in vitro* 共生系では、サンゴ培養細胞に褐虫藻 (クレード B1) を加えると 30 分以内にサンゴ細胞が褐虫藻を認識し、1 時間以内に共生関係を成立させる。すなわちサンゴ-褐虫藻の共生関係の成立を実験室の培養皿の上で実現することに成功した。これにより *in vitro* 共生系を用いたサンゴ-褐虫藻の共生関係に関する分子生物学的な研究に取り組む基盤が整った。

その一方で複数の課題も残された状況である。例えば複数種確立されているサンゴプラヌラ幼生由来の培養細胞の起源が明らかになっていないことが挙げられる。細胞の形態や遺伝子発現、免疫染色などの結果からおおよその起源は明らかになっているものの、詳細な解析はなされていなかった。さらにサンゴとの共生は、特定の種類の褐虫藻でのみ可能であることが知られているが、培養可能な複数種の褐虫藻のうちの一部でのみ *in vitro* 共生系の実験が行われており、褐虫藻の種ごとの *in vitro* 共生の違いは明らかにされていない。これらを明らかにすることができれば、サンゴ-褐虫藻の共生関係に関する分子メカニズム的な機構の解明に迫ることがより容易になることが見込まれる。

2. 研究の目的

本研究では以下の 2 点の解明を目的とした。

(i) サンゴ培養細胞の起源の解明

これまでの研究において、*Acropora tenuis* のプラヌラ幼生由来の培養細胞系を約 15 株樹立してきた。これらの細胞は形態的な特徴などからおおまかに、扁平不定形細胞 (FAmCs)、液胞を含む接着性細胞 (VAdCs)、および小型で滑らかな細胞 (SSmCs) の 3 種に分類することができる。そのうち FAmCs には、線維芽細胞様の細胞と、球形で輝く褐色細胞 (BBrCs) が含まれており、これら 2 種の細胞は可逆的に変化することができる。

しかしながら各培養細胞がプラヌラ幼生のどの細胞に由来するのかが、おおよその検討はつけられているものの、詳細な解析はなされていなかった。そこで本研究では各培養細胞の由来を明らかにすることを目的とした。遺伝子発現解析と抗体免疫染色を組み合わせることにより、各細胞の詳細な特徴を明らかにすることを試みた。

(ii) 褐虫藻の種ごとのサンゴ培養細胞との共生能の解明

研究を開始する時点では、扁平化した細胞が共生褐虫藻を取り込む様子が撮影されていた。ここで褐虫藻は複数の種類が存在していること、同一種の褐虫藻においても異なる形態が存在することがすでに知られている。これまでの研究ではサンゴ-褐虫藻共生関係成立における褐虫藻の種や形態についての詳細な解析はさらされていなかった。

そこで本研究では、サンゴ-褐虫藻共生関係の成立における褐虫藻の種や形態ごとの差を解明することを目的とした。そのためにサンゴ培養細胞と異なる培養可能な褐虫藻を使用して、褐虫藻の取り込み率などを詳細に解析することにより、サンゴ-褐虫藻共生メカニズムの一旦を明らかにすることに挑んだ。

3. 研究の方法

(i) サンゴ培養細胞の起源の解明

サンゴ培養細胞 (VAdCs, SSmCs, BBrCs を含む FAmCs) の幼生期における由来を調べるために、各培養細胞に特異的に発現している遺伝子群を、RT-PCR を行って同定した。細胞特異的な発現が認められた遺伝子について、ユーロフィンゲノミクス株式会社に外注しウサギ抗体を作成した。

作成した抗体とプラヌラ幼生を用いて Western blotting を行い、各種抗体の特異性を確認した。その後、各抗体を用いてプラヌラ幼生の免疫染色を行い、各細胞がプラヌラ幼生のどの部分に由来するのかを解析した。

(ii) 褐虫藻の種ごとのサンゴ培養細胞との共生能の解明

Acropora tenuis のプラヌラ幼生に由来する安定な *in vitro* 細胞培養系のうち、IVB5 を用いた。IVB5 細胞は凍結保存可能な細胞系統の 1 つであり、ポリクローナルな細胞集団ではあるが、主に、長さ 20~40 μm の暗色で扁平な不定形細胞 (FAmCs) で構成されている (図 1A)。FAmCs は、暗色不定形細胞を増殖培地で満たされた 24 ウェルプレートに懸濁すると、扁平化し、ラメリポディアやフィロポディアを伸長しながら中程度の運動性を示した。これらの扁平な不定形細胞と褐虫藻が *in vitro* 共生する様子が 2021 年に撮影、報告されている。

褐虫藻は *Symbiodiniaceae* 科に属する培養可能な以下の 4 種 5 株を使用した：*Symbiodinium microadriaticum* (培養 ID: AJIS2-C2)、*S. microadriaticum* (CCMP828)、*Breviolum minutum* (Mf1.05b)、*Cladocopium sp.* (Y103)、および *Effrenium voratum* (GY-H50-E)。各株の同定は、褐虫藻ゲノムの ITS2 領域の塩基配列を決定することで再確認した。AJIS2-C2、Mf1.05b、Y103 についてはドラフトゲノムがすでに公開されている。一方、CCMP828 および GY-H50-E についてはドラフトゲノムが未公開のため、28S rDNA の部分配列を同様に SeqStudio Genetic Analyzer を用いて解析し、BLASTN 比較には GeoSymbio ITS2 Local Database (<https://sites.google.com/site/geosymbio/downloads>) を用いた。褐虫藻は鞭毛を持つ運動性のマストゴート型、鞭毛を持たない球形のコイド型、および細胞分裂中で鞭毛を持たないダブレット型の 3 種の形態が存在することが知られている。サンゴ培養細胞との共生実験には、鞭毛を持たない休憩のコイド型の褐虫藻を用いた。

4. 研究成果

(i) サンゴ培養細胞の起源の解明

サンゴ培養細胞 (VAdCs, SSmCs, BBrCs を含む FAmCs) を用いた RT-PCR のポジティブコントロールとして β -アクチンを用いた実験を行い、実験系に問題がないことが確認された。RT-PCR の結果から、VAdCs に特異的に発現する遺伝子として *AtGal* と *AtFat4*、SSmCs では *AtSOMP5* と *AtEndoG*、FAmCs では *AtMLRp2*、BBrCs では *AtAHNAK* がそれぞれ同定された。これらの遺伝子についてウサギ抗体を作成し、プラヌラ幼生サンプルを用いた Western Blotting を行ったところ、特異的なシグナルを検出することができた。これら 6 種の細胞を用いてプラヌラ幼生の免疫染色を行った。

FAmCs に対する抗 *AtMLRP2* 抗体では口陥および肛門側極付近の外胚葉に存在する神経芽様細胞が染色された。次に BBrCs に対する抗 *AtAHNAK* 抗体では、神経様細胞および神経芽様細胞が染色された。また *AtAHNAK* 抗体で染色された細胞は、神経特異的抗体であるチューブリン β -3 抗体によっても染色された。この結果は *in vitro* の BBrCs と *in vivo* の神経芽様細胞が共通して神経的性質を有することを示唆している。SSmCs に対する抗 *AtSOMP5* および抗 *AtEndoG* の 2 種の抗体は、幼生外胚葉細胞を染色した。このことから、SSmC が外胚葉の性質を有することが示唆される。VAdCs に対する抗 *AtGal* および抗 *AtFat4* は、幼生内胚葉細胞を染色し、VAdCs が内胚葉の性質を有することが示唆された (図 1)。

このように *in vitro* におけるこれらの細胞株は、それぞれ口陥、神経芽、外胚葉、もしくは内胚葉の性質を保持していると考えられる。

(ii) 褐虫藻の種ごとのサンゴ培養細胞との共生能の解明

Acropora tenuis の細胞と *Breviolum minutum* の間における *in vitro* 共生系では、サンゴ培養細胞が能動的にファゴサイトーシスを行い、褐虫藻は受動的に細胞に取り込まれる可能性が高いことが示されている。褐虫藻のいくつかの属はサンゴとの共生を確立しうるが、その共生率は系統により異なる。これらの違いの要因を明らかにするため、本研究では、培養したサンゴ細胞

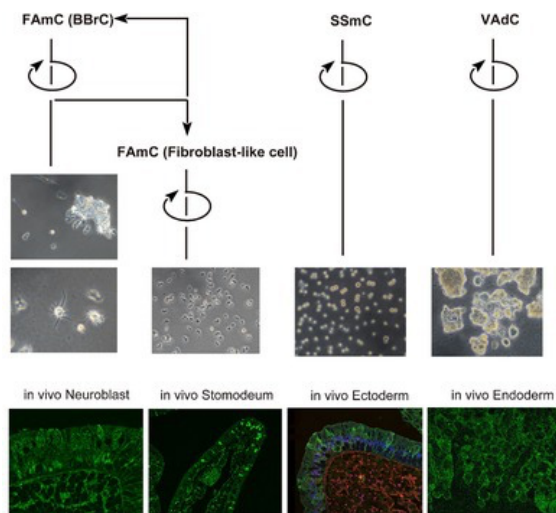


図 1 サンゴ培養細胞と、特異的抗体を用いたプラヌラ幼生の免疫染色

形状の異なる 4 細胞において特異的に発現する遺伝子に対する抗体を持ちて、免疫染色を行った。すると VAdC は内胚葉、SSmC は外胚葉、FAmC は外胚葉の中でも口陥、BBrC は外胚葉の神経芽様細胞が起源であることが示唆された。Kawamura et al., 2025, DGD より引用。

が、健常な *A. tenuis* と同様に、さまざまな渦鞭毛藻株に対してファゴサイトーシス活性を示すかどうかを検証した。

その結果、*A. tenuis* の幼生は *Symbiodinium* および *Breviolum* を取り込むが、*Cladocopium* は取り込まず、*Effrenium* の取り込みもごくわずかであった。培養サンゴ細胞は、4 種すべての藻類を取り込んだが、その取り込み率は *Symbiodinium* および *Breviolum* において有意に高く、*Cladocopium* および *Effrenium* に比べて顕著であった (図 2)。また、培養サンゴ細胞は、無機ラテックスビーズに対してもファゴサイトーシスを示したが、その挙動は渦鞭毛藻に対するものとは異なっていた。以上のことから、培養サンゴ細胞は *Symbiodinium* および *Breviolum* を選択的に取り込む傾向があると考えられ、共生の開始に関与する特異的な分子機構の存在が示唆される。

本研究の成果を報告した論文 (Kawamura et al., 2023, Zoological Science) が評価され、2024 年度の日本動物学会の論文賞を受賞した。

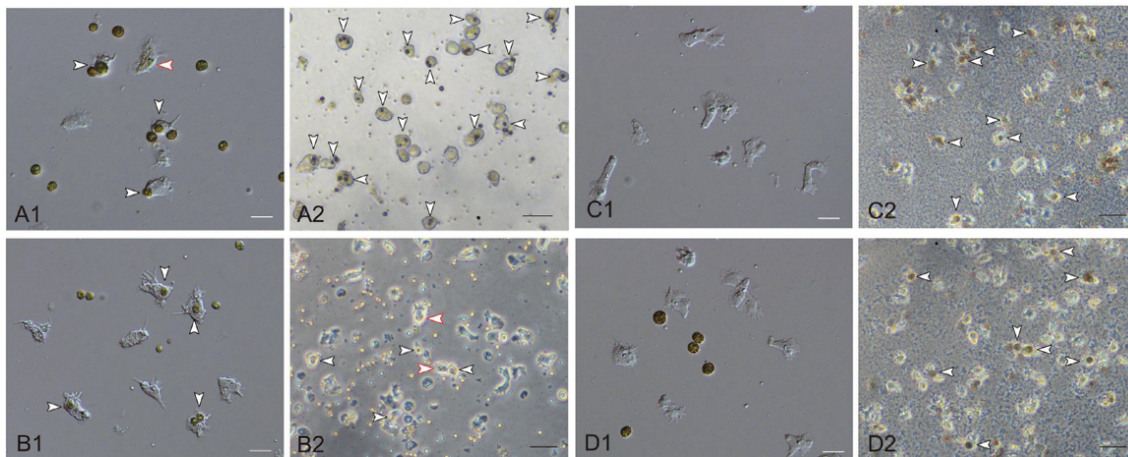


図 2 サンゴ培養細胞 IVB5 と各褐虫藻の共生効率の違い

(A) *Symbiodinium microadriaticum* CCMP828. (B) *Breviolum minutum* Mf1.05b. (C) *Cladocopium* sp. Y103. (D) *Effrenium voratum* GY-H50-E.

白矢尻で示された細胞は褐虫藻を取り込んでいる。赤矢尻の細胞では褐虫藻が消化されている。(A1-D1) 褐虫藻添加 1 日後。スケールバー 20 μm . (A2, B2) 添加 3 日後スケールバー 50 μm . (C2, D2) 添加 2 日後スケールバー 50 μm . Kawamura et al, 2023, Zool. Sci. より引用。

(i) と (ii) の研究から、サンゴ培養細胞の詳細な起源が解明され、褐虫藻の系統ごとの共生率の違いが明らかになった。その一方でサンゴと褐虫藻の共生メカニズム成立に関与する分子メカニズムは未解明のままである。この課題に取り組むためにはサンゴ培養細胞に対する遺伝子導入系、特にゲノム編集などに代表される遺伝子の機能阻害実験が必須となる。ここでサンゴ培養細胞でのゲノム編集に必要となるプラスミド DNA などは、本研究グループが独自に開発を行っている。これらを利用することにより、サンゴ-褐虫藻共生の分子メカニズムを詳細に解明する研究が近い将来、行われる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawamura Kaz, Shoguchi Eiichi, Nishitsuji Koki, Sekida Satoko, Narisoko Haruhi, Zhao Hongwei, Shu Yang, Fu Pengcheng, Yamashita Hiroshi, Fujiwara Shigeki, Satoh Noriyuki	4. 巻 40
2. 論文標題 In Vitro Phagocytosis of Different Dinoflagellate Species by Coral Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 444-454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs230045	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

1. 著者名 Kawamura Kaz, Sekida Satoko, Nishitsuji Koki, Satoh Noriyuki	4. 巻 67
2. 論文標題 The property of larval cells of the scleractinian coral, <i>Acropora tenuis</i> , deduced from in vitro cultured cells	5. 発行年 2025年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 119 ~ 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.70000	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西辻光希, 久田香奈子, 佐藤矩行
2. 発表標題 シングルセルRNA-seq法を用いた刺胞動物サンゴ <i>Acropora tenuis</i> の発生過程における遺伝子発現解析
3. 学会等名 日本動物学会第94回山形大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西辻光希, 川村和夫, 久田香奈子, 佐藤矩行
2. 発表標題 刺胞動物サンゴの環境適応と褐虫藻共生メカニズムの1細胞レベルでの理解を目指して
3. 学会等名 NGS EXPO 2023
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究の成果を発表したKawamura et al., 2023, Zoological Scienceの論文が評価され、2024年度の日本動物学会の論文賞を受賞した。

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	佐藤 矩行 (Sato Noriyuki) (30025481)	沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミクスユニット・教授 (38005)	
研究分担者	川村 和夫 (Kawamura Kazuo) (30136361)	高知大学・その他部局等(名誉教授)・名誉教授 (16401)	
研究分担者	藤原 滋樹 (Fujiwara Shigeki) (40229068)	高知大学・教育研究部自然科学系理工学部門・教授 (16401)	
研究分担者	將口 栄一 (Shoguchi Eiichi) (90378563)	沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミクスユニット・シニアスタッフサイエンティスト (38005)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------