

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570028

研究課題名(和文) サンゴから放出される褐虫藻の遊泳ステージ変化と次なるサンゴへの誘引・共生

研究課題名(英文) Expelled zooxanthellae from corals; possible source as symbionts to other corals

研究代表者

小池 一彦 (Koike, Kazuhiko)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：30265722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：温度ストレス環境下における造礁性サンゴからの共生藻(褐虫藻)の放出現象を観察した。その結果、ストレスがかかっていない状態においてもサンゴは褐虫藻を放出していること、放出された褐虫藻の半分は消化されていることがわかった。ここに穏和な温度ストレスを与えると消化褐虫藻の放出割合が増加すると共に、その後、正常な形態ではあるが光合成系に著しくダメージを受けた褐虫藻が多く放出されるようになることもわかった。これは温度ダメージを受けた褐虫藻を速やかに除去するサンゴに備わった機構だと思われた。また、非ストレス状態では健全な褐虫藻も多く排出されており、これらは次なるサンゴへの共生ソースとなると思われた。

研究成果の概要(英文)：Expulsion of a symbiotic alga (zooxanthella) from several species of scleractinian corals was observed under different regimes of temperature stress. The corals expelled zooxanthellae even without giving temperature stress, and in this case, a half of the expelled population was consisted by the ones primarily subjected with coral digestion. Under the moderate heat stress, the ratio of such digested form increased and also the one with normal form but photosynthetically incompetent. These expulsion phenomena could be interpreted as the corals' intrinsic mechanism to remove damaged zooxanthellae immediately. Under the non-stress condition, corals even expelled healthy zooxanthellae, which can be a source of symbiont for other corals.

研究分野：生物海洋学

キーワード：サンゴ さんご礁 褐虫藻 サンゴの白化 ゴーザンテラ

1. 研究開始当初の背景

造礁サンゴには「褐虫藻」と呼ばれる単細胞藻類が共生する。サンゴの85%の種は、褐虫藻を環境水中から獲得するが、そのソースとなる褐虫藻が、どこにいて何に由来するかは解っていない。我々はこれまでに「サンゴ礁における褐虫藻サイクル」を提唱し、サンゴからは褐虫藻が放出され、放出された褐虫藻は環境水中に蓄積し、環境水中に蓄積した褐虫藻は新たにサンゴに共生する可能性を示唆してきた。しかし、サンゴから放出された褐虫藻は実際に共生ソースとしてアクティブなのか、もしそうであっても、どのように次のサンゴへ共生するプロセスを経るのか？本申請研究では、サンゴから放出される褐虫藻が、共生ソースとしてアクティブであり、これが次なるサンゴへの共生ソースとなるという仮説を検証する。

2. 研究の目的

褐虫藻はサンゴ内では不動の休眠期細胞のような形態をとるが、サンゴから分離し人工的に培養すると「遊泳ステージ」へと形態変化する。サンゴと褐虫藻が長い共生関係にありながら、褐虫藻がこの様な独立な生活モードを未だ捨て去ってない理由は、次へのサンゴへと到達するためとも考えられる。このため現場・水槽実験を実施し、(1) サンゴからどのような形態で褐虫藻が放出されるか？(2) 放出された褐虫藻が生理的にアクティブか？(3) 放出された褐虫藻はサンゴに共生するポテンシャルを持っているか、これらについて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 褐虫藻遊泳ステージの評価手法の開発

仮説によればサンゴから放出された褐虫藻は、不動の球形ステージから、鞭毛の生えた遊泳ステージへと変化するはずである。しかし、遊泳ステージの特徴である鞭毛は観察時に容易に剥離し、また、細胞形態もハンドリングのショックで球形化してしまうため、確実な遊泳ステージの評価手法が必要であった。そのため、遊泳ステージのみが持つ「細胞質セルロース」に注目し、これをカルコフロール蛍光染色することによって遊泳ステージ細胞の把握・定量が可能かを培養実験によって把握した。

(2) 様々なサンゴからの褐虫藻放出現象の確認

サンゴからどのような形態・状態で褐虫藻が放出され、その放出がどのような条件により誘発され、放出された褐虫藻が生理的に共生可能か(放出後もアクティブか?)を6種のサンゴを用いた水槽実験により調べた。水槽条件に馴致した *Acropora selago*, *Acropora muricata*, *Heliofungia actiniformis*, *Ctenactis echinata*, *Oxypora lacera*, *Pocillopora eydouxi* を通常温度

(27℃)と高温ストレス下(32℃)におき、そこからの褐虫藻の放出量、褐虫藻の形態、その光合成活性を調べた。光合成活性はパルス変調型蛍光法によった。

(3) ミドリイシ2種からの褐虫藻放出現象の確認

(2)の実験から、特に *Acropora selago* と *Acropora muricata* の褐虫藻放出が顕著であったので、この2種を対象により詳細な水槽実験を行った。この際、前の実験で32℃という水温ではサンゴ組織の剥離による褐虫藻放出が顕著であったため、今度は30℃長期間(一週間程度)のストレスを与え、その条件下での放出現象を調べた。

4. 研究成果

(1) 褐虫藻遊泳ステージの評価手法の開発

この成果は *Fisheries Science* (2014) Vol. 80 363-368 に掲載された。褐虫藻培養株を用い、それが昼は遊泳ステージにあり、夜は不動球形ステージに日周形態変化するという

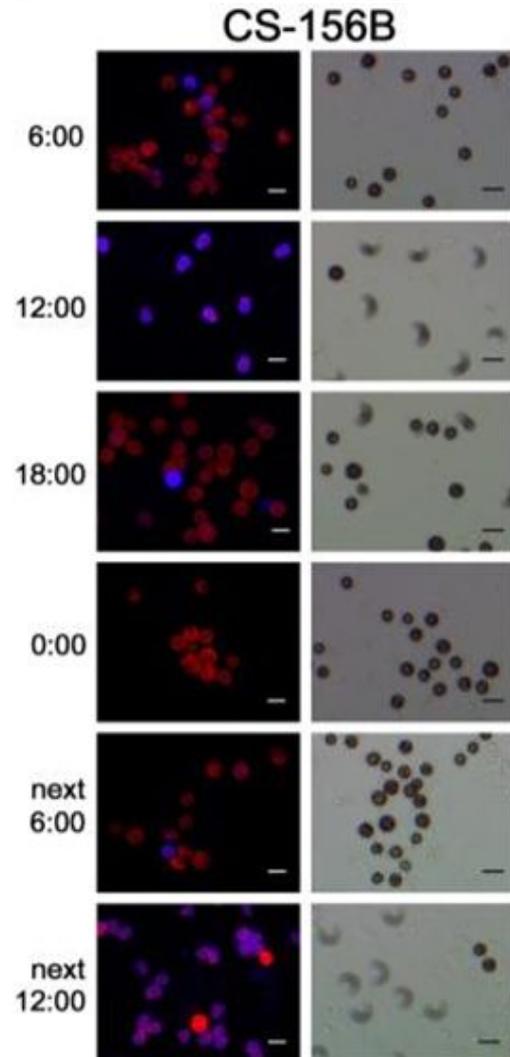


図1. 褐虫藻培養株の時間毎の遊泳細胞(右側、光学像の遊泳軌跡を示すもの)とカルコフロール蛍光像(左側、青色蛍光。赤色はクロロフィル自家蛍光)

特性を利用して、遊泳球形ステージの形態・モーション撮影と、カルコフロールによるセルロス染色結果を6時間毎に観察・比較した。その顕微鏡写真（左側がカルコフロール蛍光写真，右側がモーション撮影写真）を図1に示す。遊泳細胞割合が最も高くなる昼間12時にカルコフロール染色される細胞割合が最大となり，逆に不動球形細胞割合が最も高くなる深夜0時に最低となった。モーション撮影により求めた遊泳細胞割合と，カルコフロール染色により求めた遊泳細胞割合はほぼ同じであり，カルコフロール染色によって遊泳ステージの把握が可能であると判断された（図2）。

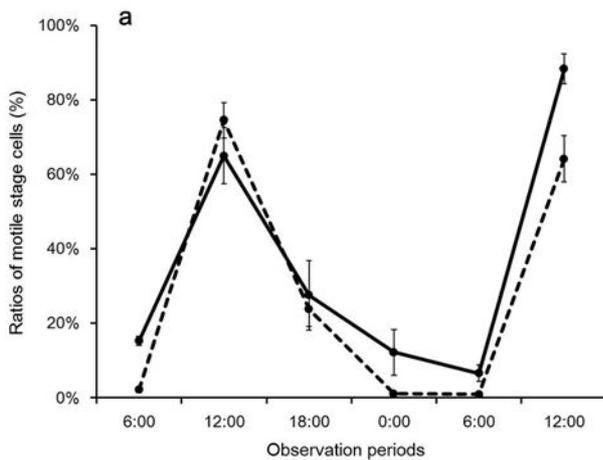


図2. モーション撮影(点線)とカルコフロール染色(実線)により求めた遊泳細胞割合の時間別変化

この手法を利用して2013年9月に沖縄県石西礁湖の海水200Lをプランクトンネット濃縮し，そこで回収された粒子に褐虫藻遊泳細胞が存在するか観察した。その結果，低密度ながら褐虫藻様の形態をし，カルコフロール染色される細胞が散見され，サンゴ礁海域水柱には，遊泳状体の褐虫藻が存在していることが示唆された。

(2) 様々なサンゴからの褐虫藻放出現象の確認

この成果はGalaxea (2013) Vol. 15: 29-36に掲載された。6種のサンゴを水槽飼育し，8日の間サンゴからの褐虫藻放出を観察した結果，まず特筆すべき事として，図3に示すように，通常の形態(図のnormal form)と，その半分ほどのサイズで，細胞質が凝縮した消化されたような形態(degraded form)の褐虫藻がサンゴから放出されていることが見出された。この現象は過去にTitlyanov et al. 1996, 1998によっても発見されているがその理由について定説はない。我々の仮説に従えば，消化形態のものは褐虫藻ソースとはなり得ないので，これら通常形態と消化形態を分けて計数した。

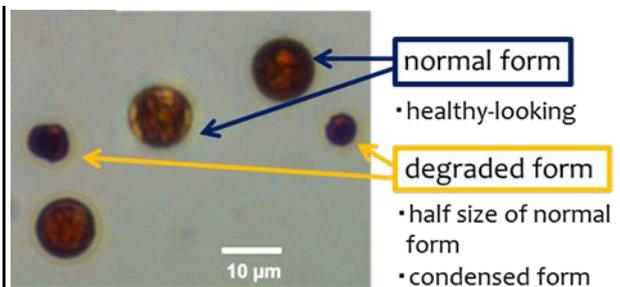


図3. サンゴから放出された通常形態の褐虫藻と消化された細胞

その結果(図4)，6種のサンゴは非温度ストレス環境下(27℃)でも常に一定の褐虫藻を放出していること，その時は消化形態の褐虫藻が多くを占めていることがわかった。放出量そのものは温度ストレス(32℃)によって上昇し，その時は逆に通常形態の褐虫藻が多くを占めた。

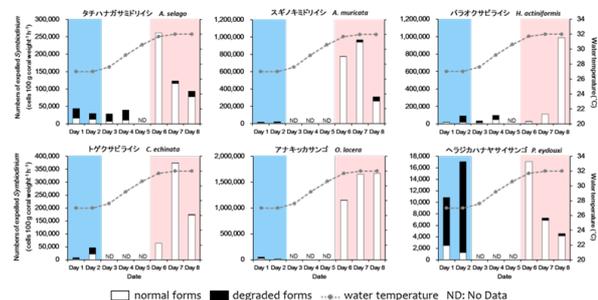


図4. 6種のサンゴからの褐虫藻放出量の変化。初日二日は非温度ストレス(27℃，図中青色域)で，6~8日目が温度ストレス(32℃，赤色域)。黒バーは消化形態，白バーは通常形態の褐虫藻

ここで観察された温度ストレス下における褐虫藻の大量放出は，恐らく過剰な温度条件下でのサンゴ組織の剥離によるものであり，そこにはサンゴの積極的な生理・生態的な意義は無いものと思われる。一方，研究当初には意識していなかった消化形態の褐虫藻が非ストレス下において大量に放出された事は，それらが共生ソースになり得ないと考えた時，仮説立証の上で見逃せない事象である。そこで，次の実験では，褐虫藻を多く放出する傾向があるミドリイシ二種を用い，放出褐虫藻の形態とその光合成活性をより詳細に観察した。その際には，32℃という過剰な温度ストレスを与えるよりはむしろ，現場でも頻繁に生じるであろう穏和な温度ストレス(30℃)を長期間(6日間)与えることにした。

(3) ミドリイシ2種からの褐虫藻放出現象の確認

この研究成果はPLOS ONE (2014) Vol. 9: e114321に掲載された。図5にタチバナガサ

ミドリイシとスギノキミドリイシの、正常細胞・消化細胞別の放出量(上段)と、放出褐虫藻全体に占めるそれぞれの割合(下段)を示す。放出量そのものは非ストレス下においても、ストレス下においても有意な差は無かった。一方、ストレス下において消化形態の褐虫藻が有意に増加した。

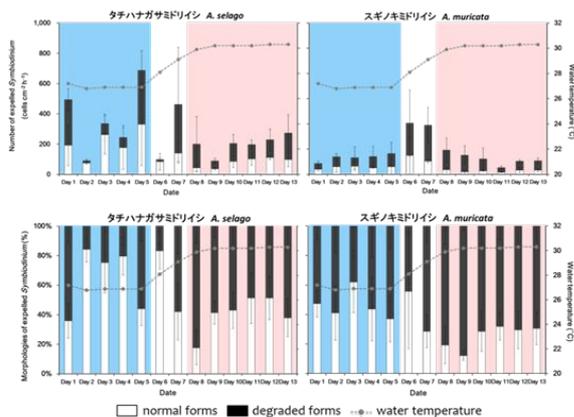


図5. ミドリイシ2種の褐虫藻放出量の変化。初日5日は非温度ストレス(27℃, 図中青色域)で、8~13日目が温度ストレス(30℃, 赤色域)。黒バーは消化形態、白バーは通常形態の褐虫藻

図6には実験期間を通じて測定した、サンゴ組織内と放出された褐虫藻の光合成活性(F_v/F_m , 光化学系IIの最大量子収率)を図示した。なお、消化形態の褐虫藻はそもそも蛍光が弱く(=光合成活性として捉えられない)、透過型電子顕微鏡で観察してもその細胞はもはや生命活動を行っていないと思われたので(図7),ここに示すのは正常形態の細胞の数値である。非ストレス下でも非ストレス下でも、サンゴ組織内の褐虫藻は正常な光合成活性を保っているのに対し、放出された褐虫藻においては、ストレス下、しかも日を追う毎に、著しく光合成活性の低下した細胞が多くを占めるようになった。

このことから、サンゴにおける褐虫藻の放出と、その中に占める消化細胞と正常細胞の意義を以下のように結論づけた。すなわち;(2)と(3)の実験双方においても非ストレス環境下で消化褐虫藻を排出していることから、サンゴは正常な状態において褐虫藻を消化する機能を持っている。これはサンゴ内の褐虫藻密度を一定に保つことに貢献しているのかもしれない。この消化は、水温上昇によってダメージを受けた褐虫藻に対して選択的に行われるため、(3)の実験において温度ストレス下で消化褐虫藻の放出量が有意に高まる。一方、温度ストレス期間が長くなると、サンゴの消化プロセスはダメージを受けた褐虫藻の増加に追いつかず、サンゴは緊急的処置として消化しないままダメージを受けた褐虫藻を排出する、というものである。

今回、消化形態の褐虫藻放出に対して多くの観察を行い、サンゴによる褐虫藻の放出の意義を明らかにすることができた。一方、当初目的にある、共生ソースとしての褐虫藻に関しては、非ストレス下において放出される半数近い褐虫藻は正常な形態であり、光合成活性も正常な値であり、これが成果(1)で示したような水柱に存在する褐虫藻の起源となっている可能性を考えている。そう考えると、昨今問題となっている海水温の上昇は、消化された形態の褐虫藻と、正常ではあっても十分な光合成活性を示さない褐虫藻の放出につながる。このことは共生ソースとなる褐虫藻のバイオマスの低下をもたらすものであろう。すなわち、海水温の上昇は、サンゴの白化を引き起こすだけでは無く、そこからの回復をも難しくしている可能性が考えられる。この件については今後より詳細な研究が必要であろう。

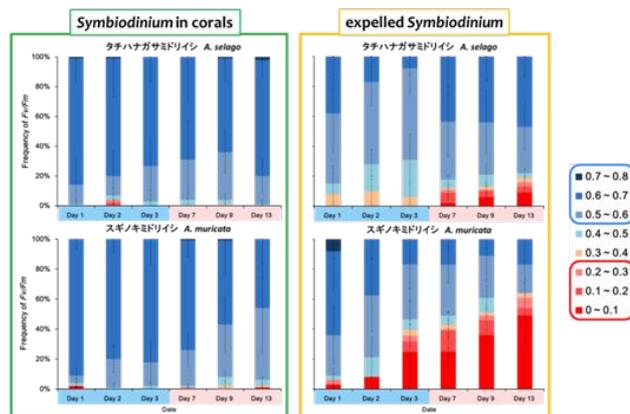


図6. ミドリイシ2種のサンゴ組織内褐虫藻(左)および放出された褐虫藻(右)の光化学系II最大量子収率(F_v/F_m)。非温度ストレス(27℃, 図中青色域)と温度ストレス(30℃, 赤色域)を色分けした(横軸)

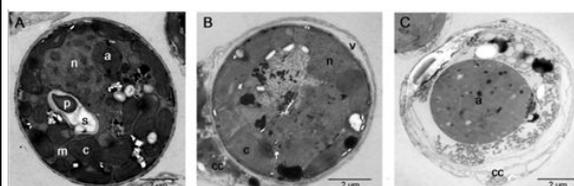


図7. サンゴから放出された褐虫藻の透過型電子顕微鏡画像。Aは正常形態のもの、Cは消化形態のもの、Bはその中庸的な形態のもの

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

1. Fujise L, Yamashita H, Suzuki G, Sasaki K, Liao LM, Koike K (2014) Moderate thermal stress causes active and immediate expulsion of photosynthetically damaged zooxanthellae (*Symbiodinium*) from corals. PLoS ONE 9(12): e114321. doi:10.1371/journal.pone.0114321 査読あり
2. Fujise L, Yamashita H, Suzuki G, Koike K

(2013) Expulsion of zooxanthellae (*Symbiodinium*) from several species of scleractinian corals: comparison under non-stress conditions and thermal stress conditions. *Galaxea* 15:29-36. 査読あり

3. Fujise L, Yamashita H, Koike K (2013) Application of calcofluor staining to identify motile and coccoid stages of *Symbiodinium* (Dinophyceae). *Fish. Sci.* 80: 363-368. 査読あり

〔学会発表〕(計6件)

1. 小池一彦, 山下洋, 藤瀬里紗, その他 3名. サンゴからの褐虫藻の放出: 研究のまとめ. 第17回日本サンゴ礁学会大会. 2014年11月28日. 高知県高知城ホール
2. 山下洋, 鈴木豪, 新里宙也, 神保充, 小池一彦. サンゴと褐虫藻の初期共生~感染した褐虫藻によって変化することしないこと~. 第17回日本サンゴ礁学会大会. 2014年11月28日. 高知県高知城ホール
3. 藤瀬里紗, 山下洋, 鈴木豪, 小池一彦. サンゴからの褐虫藻放出~フィールド実験による検証. 第17回日本サンゴ礁学会大会. 2014年11月28日. 高知県高知城ホール
4. 藤瀬里紗, 山下洋, 鈴木豪, 小池一彦. ミドリイシ属サンゴ2種を用いた異なる温度条件下での褐虫藻放出現象の比較. 第16回日本サンゴ礁学会大会. 2013年12月13日. 沖縄県沖縄科学技術大学院大学
5. 山下洋, 鈴木豪, 甲斐清香, 小池一彦. 様々な褐虫藻培養株を用いた観察実験~Cladeが違ふと何が違ふのか? 第16回日本サンゴ礁学会大会. 2013年12月13日. 沖縄県沖縄科学技術大学院大学
6. 藤瀬里紗, 山下洋, 鈴木豪, 小池一彦. サンゴによる褐虫藻の消化と放出~非ストレス下と温度ストレス下での比較. 第15回日本サンゴ礁学会大会. 2012年11月22日. 東京都 東京大学

〔図書〕(計2件)

1. Yamashita H, Koike K (印刷中) Chapter 18. Biology of symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*) in corals. *Marine Protists: Diversity and Dynamics*. Springer. 査読あり
2. 小池一彦 (2012) 共生・進化する植物の世界 第6回 サンゴと褐虫藻の共生系. 自然と科学の情報誌「ミルシル」5巻: 26-29.

〔その他〕

生物多様性オンラインマガジン The Midori Press: http://www.midori-press-aeon.net/jp/faq/faq_01.html
広島大学 研究成果紹介: <http://www.hiroshima-u.ac.jp/news/show/id/21855>
Eureka アラート: http://www.eurekaalert.org/pub_release_ml/2014-12/aft-122914.php.
中国新聞 17面(2014年12月23日付) "温暖

化で深刻化, サンゴの白化仕組み解明。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 一彦 (Koike Kazuhiko)
広島大学・大学院生物圏科学研究科・
准教授
研究者番号: 30265722

(2) 研究分担者

山下 洋 (Yamashita Hiroshi)
独立行政法人水産総合研究センタ
ー・西海区水産研究所・研究員
研究者番号: 00583147