

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05326

研究課題名(和文) 分子系統と微細構造から探る原生物放散虫の共生系確立の起源と被殻成分の進化

研究課題名(英文) Origin of establishment of symbiotic relationship between radiolarians and the symbionts and evolution of the shell components based on the molecular phylogeny and the ultrastructural observations.

研究代表者

高橋 修 (TAKAHASHI, Osamu)

東京学芸大学・教育学部・准教授

研究者番号：20242232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： 海洋原生物放散虫の、PolycystieaとAcanthareaのうち、いくつかの種において遊走子放出の現象を確認し、SEM、TEM、分子系統解析をおこなった。そこで、放散虫の遊走子のサイズは数 $\mu\text{m}$ と、共生藻の大きさよりも小さく、有性生殖では子孫に共生藻を受け渡すことは不可能であると結論づけた。共生体については、放散虫に特有の共生体の論文を作成した。放散虫には少なくとも4種類の共生体、ハプト藻、渦鞭毛藻、緑藻、シアノバクテリアが確認されており、今回あらたにGymnoxantella radiolariaeを放散虫に共生する渦鞭毛藻の新種として記載した。

研究成果の概要(英文)： SEM, TEM and molecular phylogenetic analysis were carried out confirming the reproductive stages of some polycystines and acantharean radiolarian species. We concluded that the radiolarian swarmer size is several micrometers. Those are smaller than the size of their symbiotic algae and it is impossible to get the symbiotic algae in the sexual reproduction. In addition, at least four kinds of symbionts, haptophyte, dinoflagellates, green algae and cyanobacteria have been confirmed in radiolarians, and this time we described Gymnoxantella radiolariae as a new species of dinoflagellate in symbiosis with radiolarians. It suggests that radiolarians are selected out from the environment after being adulted and acquire symbionts in situ in the same area.

研究分野：地質学

キーワード：放散虫 共生 系統解析 渦鞭毛藻 ハプト藻 緑藻 遊走子 リプロダクション

## 1. 研究開始当初の背景

放散虫は大きさ数 10~数 100 $\mu\text{m}$  の海洋浮遊性原生生物で、 $\text{SiO}_2$  (シリカ) ないし  $\text{SrSO}_4$  (硫酸ストロンチウム) の骨格や殻を持つ。約 6 億年前に出現し、数多くの生物大量絶滅事変を生き残って、現在では、高緯度域から低緯度域までの海洋環境の異なる広い範囲に分布している。

この放散虫の特徴として共生藻の存在があげられる。有孔虫のあるグループでは、地質時代における共生藻の獲得が種の多様化に優位に働いたことが知られているが (Norris 1996)、放散虫においても、宿主と共生藻の間での光合成産物のやりとりが報告されており (Anderson et al. 1985)、この共生藻の存在が、地質時代に幾度も起こった大量絶滅を放散虫が乗り越えられた要因のひとつだと考えられている。この細胞内共生は、これ以上ない空間的な近接性で成立する関係のため、その強い相互作用や依存関係から、しばしば新規の生存戦略が創出されると考えられている。

(1) 本研究に先行した観察で、代表者らは、放散虫のいくつかの種において遊走子放出の現象を確認した。これまでに観察された放散虫の遊走子のサイズは数  $\mu\text{m}$  と、共生藻の大きさよりも小さく、有性生殖では子孫に共生藻を受け渡すことは不可能であるとした (Yuasa & Takahashi 2014)。しかしながら、採取地点・時期が異なっても放散虫は同じ共生藻をもち、宿主-共生体間に種特異性があることが分子系統解析から指摘されている (Gottschling & McLean 2013)。これらのことは以下の仮説を導く。放散虫は種ごとに決まった種類の共生藻を後生的に獲得する。ひとつの放散虫には複数の種の共生藻は存在しない。海域ごとに保持する共生藻は異なる。

(2) Kondo et al. (2002) では、ズキゾウムシの X 染色体の中に、共生細菌の大きなゲノム断片が入りこんでいることを明らかにした。この発見により、共生している生物から、種の壁を越えて遺伝子が取り込まれる現象 (遺伝子の水平伝播) が自然界で実際に起きていることが明らかになった。すでに放散虫には、ハプト藻・プラシノ藻・渦鞭毛藻などが共生していることがわかっている。放散虫が、これらとの共生系を築き上げてからの長い歴史の中で、光合成産物等のやりとりに伴って、共生藻から放散虫へ、あるいは放散虫から共生藻への遺伝子の受け渡し (遺伝子水平伝播) が起こっている可能性が示唆される。

## 2. 研究の目的

(1) 「共生系獲得」の過程を明らかにするため、研究期間を通して、可能な限り多くの

海域や多くの放散虫種についてその共生藻の特異性や多様性をさぐる。東シナ海 (琉球大学) および日本海 (新潟大学) と、海外研究協力者である K.R. Bjørklund によるノルディック海・ソグネフィヨルド (オスロ大学) でのサンプリングが協働して、これらの海域で多様な放散虫種の共生藻の同定を網羅的にこなす。

また、薬品により人為的に共生藻類を一度排除し、その後再び、共生していた藻類の遊走細胞と一緒に飼育することにより藻類の再獲得のようすや細胞内での藻類の個体数の変動、共生状態の解除のきっかけ、特異性のない藻類に対して放散虫がどのような挙動を示すのかなどを探る。

(2) 「共生による遺伝子水平伝播」の可能性を明らかにするために、宿主と共生藻の遺伝子解析をおこなう。シリカ固定能は、真核生物の様々な系統で出現しており (例えば、放散虫の殻、ケイ藻の殻、海綿の骨針、ディクティオカ藻の骨格など)、そこでは分類群を越えてシリカ骨殻の形態制御に関するタンパク質である silicatein や silaffin などが重要な役割を担っていることが指摘されている。放散虫とその共生藻の cDNA ライブラリ作成により、シリカ骨殻の形態制御に関する silicatein や silaffin などのタンパク質をコードする遺伝子が、それぞれの分類群で共通して存在していないか明らかにする。

## 3. 研究の方法

さまざまな海域の放散虫と共生藻の関係をさぐるために、サンプリング地点は、定点観測を続けている琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設・新潟大学佐渡臨海実験所・ノルウェーソグンダル大学臨海実験所においておこなう。一部の個体からは藻類を単離し、共生藻の株を作成する。

サンプルを宿主と共生体双方の SSU 領域・LSU 領域を解析し、あわせて cDNA ライブラリの作成も行う。採取した放散虫を単離し、微細解剖することによって宿主と共生体を分けて分子系統解析をおこなう。落射蛍光顕微鏡により放散虫細胞内の藻類の存在と位置を観察し、さらに放散虫の細胞を固定・超薄切片観察をおこなって、数多くの放散虫種について細胞内構造を明らかにする。遊走子や共生藻の遊走細胞についても生きたままの状態を固定し、それらの形態や内包する結晶についても検討する。

さらに、遊走子の放出という生活環の一部を観察し、シリカや硫酸ストロンチウムの殻形成の過程を明らかにする。シリカの骨格をつくる放散虫にも遊走子には硫酸ストロンチウムの結晶が含まれている。できるだけ多くの放散虫の遊走子を走査型電子顕微鏡や透過型電子顕微鏡で観察、エネルギー分散型 X 線分光装置 (EDS) 等を用いて分析をおこ

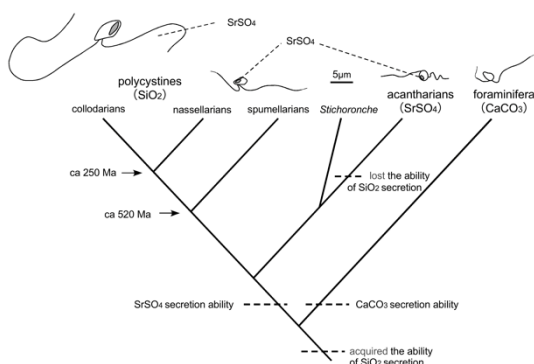
ない，どんな種類の放散虫が遊走子の段階で硫酸ストロンチウムの微小結晶を保持しているのか，成長によってその結晶は維持されるのかについて明らかにし，硫酸ストロンチウム結晶の幼生における役割を考察する．現在までのところ，放散虫数種の遊走子放出までの過程を観察することには成功しているが，幼生まで成長させるにはいたっていない．

(1) 分子系統解析によるアプローチ：放散虫と共生藻双方の SSU/LSU rDNA を網羅的に探索する．また，共生の特異性が明らかになっているものについて，cDNA ライブラリを作成する．

(2) 超微細構造観察によるアプローチ：放散虫細胞内での共生藻の状態と細胞構造，共生藻を包んでいる膜の微細構造観察．

(3) 培養・生態観察によるアプローチ：共生の特異性が明らかになっているものについて，作為的に藻類を一度排除し，どのような過程を経て再び共生状態へ移行するのかを明らかにする．また，放散虫のさまざまな成長段階における共生藻の獲得のようす，細胞内での個体数の変動などをさぐる．

#### 4. 研究成果



海洋原生物放散虫の，Polycystinea と Acantharea のうち，いくつかの種において遊走子放出の現象を確認し，SEM, TEM, 分子系統解析をおこなった．それらの結果から，放散虫の遊走子のサイズは数  $\mu\text{m}$  と，共生藻の大きさよりも小さく，有性生殖では子孫に共生藻を受け渡すことは不可能であると結論づけた(上図)．

共生体については，放散虫に特有の共生体が存在することを明らかにし，その論文を作成した．結果として，放散虫には少なくとも4種類の共生体，ハプト藻，渦鞭毛藻，緑藻，シアノバクテリアが確認され，今回あらたに *Gymnoxanthella radiolariae* を放散虫に共生する渦鞭毛藻の新種として記載した．また，そのほかにもハプト藻の新種や緑藻の新種2種について，現在論文を執筆中である．

上述したように，遊走細胞中には共生体が存在しないにもかかわらず，放散虫は，ある

海域(東シナ海)においては，共生体についての種特異性をもつ．しかし，大西洋など他の海域からの報告(例えば，Decelle, et al. 2015 など)を見ると，海域により同じ放散虫種でも保持する共生体の種類が異なることがわる．このことは，放散虫が成体になった後に，環境中から選別しながら，その海域に産する共生体を in situ で獲得しているということが示唆されるのである．

また，第二の目的のゲノム解析については，現在のところ，放散虫種2種の遊走子細胞を用いて，ゲノムデータを取得することに成功している．これらにおいても現在解析中で，今後，有孔虫や珪藻などとのゲノムデータの比較を行い，放散虫のバイオミネラリゼーションや起源についての考察を行う予定である．

#### <引用文献>

Norris, R.D.  
Symbiosis as an evolutionary innovation in the radiation of Paleocene planktic Foraminifera. *Paleobiology*, 22, 1996, 461-480

Anderson, O.R., Swanberg, N.R., Bennett, P.  
Laboratory studies of the ecological significance of host-algal nutritional associations in solitary and colonial Radiolaria. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 65, 1985, 263-272.

Yuasa, T., Takahashi, O.  
Ultrastructural morphology of the reproductive swimmers of *Sphaerozoum punctatum* (Huxley) from the East China Sea. *European Journal of Protistology*, 50, 2014, 194-204.

Gottschling, M., McLean, T.I.  
New home for tiny symbionts: dinophytes determined as *Zooxanthella* are Peridinales and distantly related to *Symbiodinium*. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 67, 2013, 217-222.

Kondo, N., Nikoh, N., Ijichi, N., Shimada, M., Fukatsu, T.  
Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *PNAS*, 99, 14280-14285.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計1件)

YUASA, T., TAKAHASHI, O.  
Observations of the reproductive swarmer  
cells of polycystine and acantharian  
radiolarians in the east China Sea.  
InterRad XV, 2017.

〔図書〕(計0件)

〔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 なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高橋 修 (TAKAHASHI, Osamu)  
東京学芸大学・教育学部・准教授  
研究者番号：20242232

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

真山茂樹 (MAYAMA, Shigeki)  
東京学芸大学・教育学部・教授  
研究者番号:40199914

松岡 篤 (MATSUOKA, Atsushi)  
新潟大学・理学部・教授  
研究者番号:00183947

竹村明洋 (TAKEMURA, Akihiro)  
琉球大学・理学部・教授  
研究者番号:40222103

##### (4) 研究協力者

K. R. Bjørklund  
オスロ大学