

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291094

研究課題名(和文)人工的に構築したサンゴ 褐虫藻共生体を用いた共生生物学的イベントの多面的精査

研究課題名(英文) Multifaceted approach for scrutiny of symbiosis ecology using artificially produced coral-zooxantellae symbiosis

研究代表者

山下 洋 (Yamashita, Hiroshi)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・西海区水産研究所・研究員

研究者番号：00583147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：室内実験の結果、遺伝子型A1とA3の褐虫藻はAcropora tenuis幼生との共生が成立したが、遺伝子型A2の褐虫藻は幼生から排出された。幼生の着生や生残に褐虫藻の遺伝子型や褐虫藻の有無は影響しなかった。野外実験では、A1とA2の褐虫藻を取り込ませた幼生を野外の格子状基盤に着生させたが、その後の観察によりA2の褐虫藻は速やかに排出され、新たに環境中から取り込んだと思われるA1やDの褐虫藻に入れ替わっていた。本研究では実験に使用したA. tenuisサンゴとA1褐虫藻培養株のゲノム解読を行うとともに、プロテオーム解析により約2000個のA. tenuisタンパク質を定量可能となった。

研究成果の概要(英文)：We supplied Acropora tenuis larvae with type A1, A2, and A3 Symbiodinium culture strains under the laboratory condition. The infection rate and density of cells infected with types A1 and A3 did not decrease even after the supply of Symbiodinium cells was stopped, and thus these Symbiodinium and the larvae were successfully established their symbiosis. Whereas, the infection rate and density of cells infected with the type A2 was declined. Thus, symbiosis was not established in this combination. The survival and settlement rates of the tested larvae were not significantly different among the treatments. In the field experiment, we artificially introduced type A1 and A2 to A. tenuis larvae, then these larvae were settled on the artificial grid plates set in the natural field. However, A2 Symbiodinium in the tested larvae quickly replaced with A1 or D Symbiodinium acquired from surrounding environment.

研究分野：微細藻類学・共生生物学・生物海洋学

キーワード：サンゴ礁生態系 海洋生態 生物圏現象 共生生物学 海洋保全 褐虫藻 サンゴ Acropora tenuis

1. 研究開始当初の背景

サンゴ礁海域は海の熱帯雨林とも称され、あらゆる海洋環境の中でもトップクラスの生物多様性と生物生産性を有する海域である。しかし近年、サンゴの白化現象などによりサンゴ礁生態系は著しく衰退している。そのため、サンゴ礁の保全策の提言や修復技術の開発が強く望まれている。サンゴ礁生態系は、褐虫藻と呼ばれる単細胞藻類 (*Symbiodinium* 属の渦鞭毛藻) とサンゴとの健全な共生関係の上に成り立ち、サンゴは褐虫藻の作り出す光合成産物を生存・成長に利用する。近年問題となっているサンゴの白化現象は、サンゴが褐虫藻を失うこと、すなわち両者の共生関係の崩壊が原因である。このことから、サンゴにとって褐虫藻がいかに重要であるかが窺えるが、ミドリイシ属のサンゴを含むほとんどのサンゴが発生直後は褐虫藻を持っておらず、幼生や幼体の段階で環境中から褐虫藻を獲得して共生関係をスタートさせる。褐虫藻は、クレードと呼ばれる複数の遺伝的グループ (クレード A~I) とこれを構成するさらに細かい type と呼ばれる遺伝子系統群に分けられ、それぞれに生理的特徴が異なることが示唆されている。したがって、サンゴが世代ごとに褐虫藻を環境中から獲得することは、サンゴがその環境に適した褐虫藻を獲得するためではないかと考えられてきた。しかし近年、我々のフィールド調査・室内実験から、共生初期にサンゴは特定の遺伝子型の褐虫藻 (クレード A と D) を好んで取り込むことが明らかとなった。この共生初期によく取り込まれるクレード A と D の褐虫藻は、成体サンゴの持つクレード C の褐虫藻に比べ、環境中における出現量が少ないことが知られる。したがって共生初期のサンゴは、その環境に適した褐虫藻を取り込んでいるのではなく、何らかの生態学的な意味を持ってクレード A と D の褐虫藻を選択的に取り込んでいると考えられた。ではこの、生態学的な意味、すなわち「サンゴ幼体が最初のパートナーとして A と D の褐虫藻を選んでいる理由」とは一体何なのであろうか？そして、幼体のもつ A と D が、なぜ成長するにつれて C に置き換わるのだろうか？これを明らかにできれば、サンゴ褐虫藻共生系をより詳細に理解することが可能になるだろう。我々の研究グループでは近年、サンゴ幼体が共生初期に宿す褐虫藻の特定及び培養に成功し、その培養株を用いたサンゴ褐虫藻共生体の人工的構築技術の開発に成功した。また、格子状基盤を用いることでサンゴ幼体の野外での長期観察実験が可能なることから、これらの技術・知見を応用し、人工的に構築したサンゴ褐虫藻共生体を用いて、初期共生期に共生体が示す変化を室内及び野外で詳細に観察する基盤が整った。

2. 研究の目的

地球規模での環境変動や人間活動の活発化によって近年サンゴ礁は衰退が著しいため、その保全策の提言や修復技術の開発が喫緊の課題となっている。しかし、サンゴと褐虫藻の共生関係には未だ不明な点が多く残されているため、その発展が妨げられている。本研究では、サンゴと褐虫藻の共生関係の裏で、両者にどのような変化が起きているのかを、人工的に造りだしたサンゴ褐虫藻共生体を用いて遺伝子、タンパク質、及び実際の生残や成長などの観点から明らかにし、サンゴ褐虫藻間の生理・生態学的関係をより詳細に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では共生の初期段階、すなわちサンゴと褐虫藻の共生開始から2週間程度までに共生体に起こる変化を室内実験で観察するとともに、共生体に起こる変化をより長期間観察するための野外実験を実施した。室内実験においては *Acropora tenuis* (ウスエダミドリイシ) の幼生を使用し、野外のサンゴ幼体がよく共生させている褐虫藻・野外の幼体がまれに共生させている褐虫藻・野外の幼体からは検出されない褐虫藻、をそれぞれ人工的に取り込ませて感染率・感染した褐虫藻の細胞数、生残や着生行動などを観察するとともに、RNA とタンパク質解析用の試料も得た。野外実験では *A. tenuis* の幼生を使用し、野外のサンゴ幼体がよく共生させている褐虫藻と野外の幼体からは検出されない褐虫藻をそれぞれ人工的に取り込ませて感染率・感染した褐虫藻の細胞数を観察した。それぞれの褐虫藻を取り込ませた幼生と、褐虫藻を持たない幼生を野外の6水深(3~13m)に予め設置していた格子状基盤に着生させた。着生から3日後、2週間後、1か月後、3か月後にそれぞれ基盤の一部を回収し、幼体の生残を観察するとともに、幼体内褐虫藻の遺伝子型組成確認用、遺伝子発現・タンパク質発現解析用の試料をそれぞれ固定した。さらに、8か月後、12か月後、18か月後には基盤上の全ての幼体を目視で計数し、生残を見積もった。

4. 研究成果

野外のサンゴは特定の褐虫藻を選択的に取り込んで共生関係を開始するが、実験室内においては暴露する褐虫藻の細胞数を多くすることで通常野外では取り込まれない褐虫藻も取り込ませることができる。そこで、本研究では、野外のサンゴ幼体からよく検出される type A1 の褐虫藻とまれに検出される type A3 の褐虫藻に加え、通常野外のサンゴ幼体からは検出されない type A2 relative (ここでは単に type A2 とする) の褐虫藻を室内で *Acropora tenuis* 幼生に取り込ませ、その感染率と幼体内の褐虫藻細胞数を蛍光顕微鏡下で観察した (図 1, 2)。

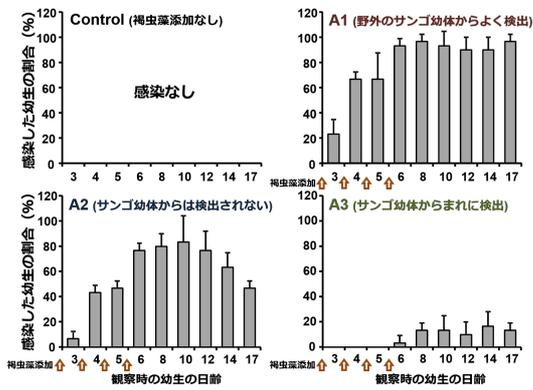


図1. 様々な褐虫藻培養株を添加して感染が確認された*A. tenuis*幼生の割合

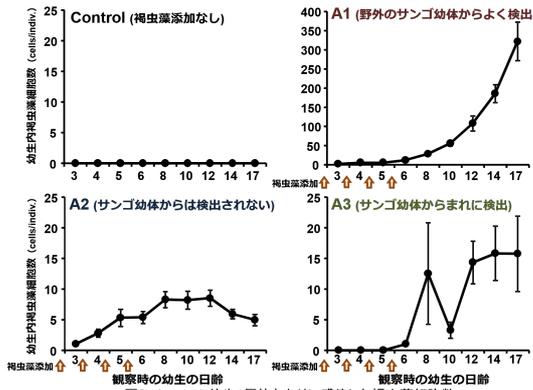


図2. *A. tenuis*幼生1個体あたりに感染した褐虫藻細胞数

その結果、通常野外でもよくサンゴ幼体に共生している type A1 の褐虫藻は、室内においてもよく取り込まれ、また褐虫藻の添加を止めた後も高い感染率をキープした。一方で、通常野外のサンゴ幼体からは全く検出されない type A2 の褐虫藻も幼生に取り込まれるが、褐虫藻の添加を止めたのち感染した幼生の数は徐々に減少した。また、幼生内の褐虫藻細胞数も A1 の場合は日に日に増加していき、A2 は徐々に減少した。したがって、A1 の褐虫藻と *A. tenuis* 幼生は共生が成立したとみなせるが、A2 は無理やり取り込ませても共生は成立しないと考えられる。A3 の褐虫藻は感染率こそ低いものの、一度取り込まれると A2 のように減少することはなかった。これらの褐虫藻を取り込ませた幼生と、褐虫藻を取り込ませなかった幼生の生残と着生率も観察したが、これらは試験区間で大きな差は見られなかった。

A. tenuis と type A1 の褐虫藻は室内においても共生が成立した。両者の遺伝子解析のプラットフォーム構築の一環として、両者のゲノム解読を行った。すなわち、石垣島で *A. tenuis* 一群体を採捕し、一斉産卵時に精子を採集した。そこから共生する褐虫藻が含まれない、高純度かつ高品質なゲノム DNA を単離することができた。これを Illumina 社の HiSeq2500 を用いて全ゲノム解読を行った。その結果、約 4 億塩基のゲノム配列、そこから約 26000 個の遺伝子を同定することが出来た。さらに、A1 褐虫藻培養株についても全ゲノム配列の解読を行い、約 7 億塩基のゲノム配列を得て、そこから約 3 万個の遺

伝子の同定に成功した。これらの情報を基に、次世代シーケンサーを用いたゲノムレベルでのトランスクリプトーム解析を行い、共生のキー遺伝子の絞り込み・特定に取り組んでいる。

また、*A. tenuis* のタンパク質について LC-MS/MS を用いてプロテオーム解析を行った結果、約 2000 個のタンパク質を定量できるようになった。そこで、*A. tenuis* 稚ポリプに新たに type A1 と A3 の褐虫藻培養株を獲得させ、サンゴ内での褐虫藻数と稚ポリプの成長を測定しつつ、タンパク質の解析を行った。A3 の褐虫藻は始めサンゴ内で増殖したが 14 日以降には褐虫藻数が減少し、サンゴの成長も止まった。一方 A1 培養株では、サンゴ内に取り込まれた褐虫藻数が増加するのに伴い、サンゴの成長も促進された。これらの褐虫藻と共生した *A. tenuis* を 21 日目に回収し、タンパク質の発現を検討したところ、A3 褐虫藻添加区では、A1 褐虫藻添加区と比べ食食に関わるタンパク質の発現が多くなっていった。一方、A1 区では骨格形成に関わるタンパク質の発現が増加しており、A1 褐虫藻と共生した *A. tenuis* は成長が速いこととよく一致していた。褐虫藻はサンゴの骨格形成に関わる細胞とは離れているが、何らかの手段により骨格形成を促進していると推定される。

野外での長期観察は、石垣島浦底湾で行った。まず、*A. tenuis* 幼生に野外のサンゴ幼体からよく検出される type A1 の褐虫藻と、通常野外の幼体からは検出されない A2 の褐虫藻をあらかじめ室内で取り込ませた。この時の感染率は A1 添加区で 60%、A2 添加区で 50%、幼生内褐虫藻細胞数は A1: 1.7 ± 0.2 cells/larva、A2: 2.9 ± 0.6 cells/larva であった。これらの幼生とともに褐虫藻を取り込ませない幼生を石垣島浦底湾の水深 3, 5, 7, 9, 11, 13m に設置した格子状基盤に着生させた (図 3)。



図3. 幼生を着生させる格子状基盤
各水深でA1,A2,無. それぞれ2枚づつ

着生から 3 日後の着生密度を 100%とした場合の 18 か月後の生残は A1 添加区で 2.1%、A2 添加区で 2.6%、褐虫藻を添加しなかった区で 2.7%であった。2016 年度は夏季の高水温の影響により各地でサンゴの白化現象が観察されたが、本研究の基盤上でも 2016 年 2 月の観察から 2017 年 1 月の観察の間に約 6

割のサンゴ幼体が死滅してしまった。着生後、定期的に幼体のサンプリングを行い、幼体内の褐虫藻組成をモニタリングした。すなわち、採取した幼体から DNA を抽出し、褐虫藻特異的 PCR プライマーにより褐虫藻の核 ITS 領域全長を増幅、精製したものを MiSeq で解析した。図 4 に結果の一部を示す。

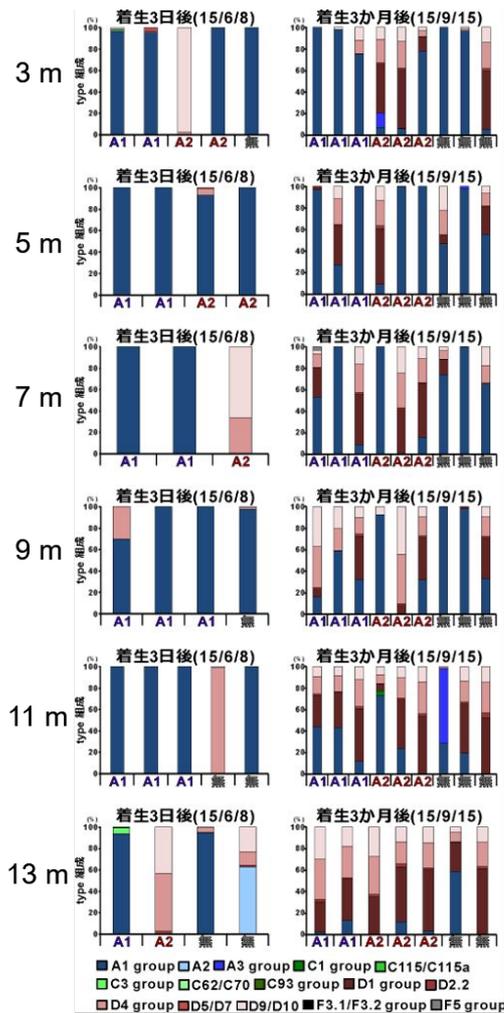


図4. 格子状基盤上の *A. tenuis* 幼体 1 個体中の褐虫藻遺伝子型組成 (A1:A1添加区, A2:A2添加区, 無:褐虫藻添加なし)

本研究ではあらかじめ、A1 と A2 の褐虫藻を取り込ませたうえで基盤上に着生させたが、着生 3 日後ですでに A2 褐虫藻添加区の幼体においても、体内から A2 褐虫藻は検出できなかった。野外に置いた場合、環境中に出現する褐虫藻を自由に取り込むことができるため、A2 の褐虫藻は速やかに A1 や D の褐虫藻と入れ替えられたと考えられる。そのため、褐虫藻組成は全ての実験区で実験開始直後からほぼ均一になっていたが、着生から 3 か月後の結果を見ると、水深が深い基盤に着生させた幼体ほど clade D の褐虫藻を環境中から取り込んでいるようであった。2016 年の白化現象により、多くのサンゴ幼体が死滅してしまったが、褐虫藻組成とサンゴの生残の間に何らかの関係があるかどうか、今後も詳細に観察を続ける必要があるだろう。

本研究の実施により、サンゴは通常取り込まない褐虫藻を室内で無理やり取り込ませても、これを速やかに排除することが明らかとなった。一方で野外のサンゴ幼体からよく検出される褐虫藻とは室内においても共生が成立した。さらに、共生する褐虫藻の遺伝的なタイプは幼生期の生残や着生に影響を及ぼさないようであった。本研究で使用した *A. tenuis* サンゴと A1 褐虫藻のゲノムは解読済みであり、また LC-MS/MS を用いたプロテオーム解析も可能となった。これにより、サンゴ 褐虫藻共生体の生理・生態学的な関係の詳細を肉眼で観察可能な生残率などのデータのみならず遺伝子やタンパク質といった目には見えない変化の解析と合わせて議論することが可能となった。得られた成果は現在投稿中の論文 2 件と準備中の論文 2 件で順次公表していく予定である。

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 1 件)

1. Yamashita H. and Koike K. (印刷中) Motility and cell division patterns among several strains of *Symbiodinium*. *Galaxea*. 査読有。

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 福地優一, 神保充, 山下洋, 新里宙也, 安元剛, 渡部終五. 異なる褐虫藻と共生したサンゴでのタンパク質発現解析. 平成 29 年度日本水産学会春季大会. 2017 年 03 月 27 日. 東京海洋大学品川キャンパス (東京都港区)

2. 神保充, 福地優一, 山下洋, 鈴木豪, 新里宙也, 安元剛, 渡部終五. ウスエダミドリイン発現タンパク質の網羅的解析手法の確立. 第 19 回日本サンゴ礁学会. 2016 年 12 月 02 日. 沖縄タイムスビル (沖縄県那覇市)

3. 山下洋, 新里宙也, 鈴木豪, 藤倉佑治, 神保充. *Acropora tenuis* 幼体に共生する褐虫藻組成のモニタリング. 第 19 回日本サンゴ礁学会. 2016 年 12 月 02 日. 沖縄タイムスビル (沖縄県那覇市)

4. 福地優一, 神保充, 山下洋, 鈴木豪, 新里宙也, 安元剛, 渡部終五. *Acropora tenuis* の成長とタンパク質発現への褐虫藻による影響. 第 19 回日本サンゴ礁学会. 2016 年 12 月 02 日. 沖縄タイムスビル (沖縄県那覇市)

5. Yamashita H., Suzuki G., Fujikura Y., Shinzato C., Jimbo M., Koike K. Specificity of the initial symbiosis between corals and *Symbiodinium*. Japan-Israel Workshop (招待講演) (国際学会). 2016 年 12 月 01 日. サンパレス球陽館 (沖縄県那覇市)

6. Takeuchi R., Tanimoto N., Kuniya N., Yamashita H., Jimbo M. *Acropora tenuis* lectin attracts specific *Symbiodinium* culture strains. 13th International Coral Reef Symposium (国際学会). 2016年06月21日. Honolulu (USA).

7. Yamashita H., Suzuki G., Shinzato C., Jimbo M., Koike K. *Acropora tenuis* larvae can expel non-essential *Symbiodinium* strains. 13th International Coral Reef Symposium (国際学会). 2016年06月20日. Honolulu (USA).

8. Jimbo M., Kuniya N., Yamashita H., Harii S., Nakano Y., Yasumoto K., Watabe S. A galnac-binding lectin could be involved in acquisition of *Symbiodinium* by *Acropora tenuis*. 13th International Coral Reef Symposium (国際学会). 2016年06月20日. Honolulu (USA).

9. 竹内亮太, 神保充, 安元剛, 渡部終五, 波利井佐紀, 山下洋, 新里宙也. ActLの褐虫藻誘引能及びアミノ酸配列の検討. 平成28年度日本水産学会春季大会. 2016年03月29日. 東京海洋大学品川キャンパス(東京都港区)

10. 長島洋紀, 神保充, 鈴木豪, 山下洋, 安本剛, 渡部終五. *Acropora tenuis*の産卵に伴って変動する物質の探索. 第18回日本サンゴ礁学会. 2015年11月28日. 慶應義塾大学三田キャンパス(東京都港区)

11. 山下洋, 鈴木豪, 藤倉佑治, 新里宙也, 神保充. 共生する褐虫藻のタイプはサンゴ幼体の初期生残に影響するか? 第18回日本サンゴ礁学会. 2015年11月27日. 慶應義塾大学三田キャンパス(東京都港区)

12. 神保充, 山田龍太郎, 國谷奈美, 鈴木豪, 山下洋, 安元剛, 渡部終五. プラヌラ存在下での褐虫藻の行動とレクチンの関与. 第18回日本サンゴ礁学会. 2015年11月27日. 慶應義塾大学三田キャンパス(東京都港区)

13. 山下洋. 褐虫藻と呼ばれる *Symbiodinium* 属渦鞭毛藻の生態 ~ 動物との共生機構を中心に ~. 2015年度藻類談話会(招待講演). 2015年11月07日. 神戸大学理学部(兵庫県神戸市)

14. 新里宙也. サンゴ礁生態系の保全・再生へのゲノミクス技術の活用. 第67回日本生物工学会大会シンポジウム(招待講演). 2015年10月27日. 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

15. 山田龍太郎, 神保充, 國谷奈美, 山下洋, 鈴木豪, 安元剛, 渡部終五. サンゴ幼生による褐虫藻の行動変化の検討. 平成27年度日本水産学会秋季大会. 2015年09月24日. 東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

16. 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事しない事 ~. 第17回日本サンゴ礁学会. 2014年11月29日. 高知城ホール(高知県高知市)

17. 神保充, 山下洋, 鈴木豪, 安元剛, 渡部終五. サンゴの産卵前後で変動する物質の解析. 第17回日本サンゴ礁学会. 2014年11月29日. 高知城ホール(高知県高知市)

18. 鈴木豪, 甲斐清香, 山下洋. 異なる環境下におけるミドリイシ属サンゴの着生後生残比較. 第17回日本サンゴ礁学会. 2014年11月28日. 高知城ホール(高知県高知市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

山下 洋 (Hiroshi Yamashita)

国立研究開発法人 水産研究・教育機構
西海区水産研究所・研究員

研究者番号: 00583147

(2) 研究分担者

鈴木 豪 (Go Suzuki)

国立研究開発法人 水産研究・教育機

構・西海区水産研究所・研究員
研究者番号：30533319

新里 宙也 (Chuya Shinzato)
東京大学・大気海洋研究所・准教授
研究者番号：70524726

神保 充 (Mitsuru Jimbo)
北里大学・海洋生命科学部・准教授
研究者番号：10291650

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
藤倉 佑治 (Yuji Fujikura)
国立研究開発法人 水産研究・教育機構・
西海区水産研究所
小池 一彦 (Kazuhiko Koike)
広島大学