

令和元年5月28日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07465

研究課題名(和文) 刺胞動物と緑藻との共生の起源・共進化過程の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the Origin and co-evolution process of symbiosis between cnidarian animal and green algae

研究代表者

小早川 義尚 (Kobayakawa, Yoshitaka)

九州大学・基幹教育院・教授

研究者番号：20153588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：1億年以上前からクロレラと安定的な共生をしているグリーンヒドラの異なる系統の間でクロレラを交換する実験を行った。そして、クロレラの交換による宿主ヒドラの形質及び遺伝子発現パターンの変化を解析することにより、宿主/symbiont の組み合わせの特異性を明らかにした。また、日本からだけクロロコッカムと共生初期の状態にあるヒドラ(J10系統)が知られている。私達はその共生クロロコッカムがJ10系統のヒドラから抜け出して他のヒドラに水平伝播し、特定の系統では安定的な共生関係を作ると明らかにした。そして、クロロコッカムの共生によって新しい宿主のヒドラの形質や遺伝子発現に観られる変化を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリーンヒドラとクロレラの共生関係は、緑藻と刺胞動物の共生のモデル系として古くから研究されてきた。その起源の古さから、宿主のヒドラと共生クロレラの共進化や宿主/共生体の組み合わせ特異性が推測される。本研究において、共生クロレラを入れ換える実験系を確立し、解析を進めたことは共生の研究を一段階進めたという意義がある。また、日本特産のクロロコッカムと共生の初期状態にあるヒドラ(J10系統)を用いて共生体の水平伝播が起こることを明らかにし、緑藻と共生をしていなかったヒドラが新しくクロロコッカムを共生させるときの形質と遺伝子発現の変化を解析したことは、共生の初期状態の研究の先駆けとなる。

研究成果の概要(英文)：We carried out experiments to exchange endosymbiotic chlorellae between two different strains of green hydra which has established stable symbiotic relation between chlorella so long period. By analyzing the change in the trait and gene expression pattern of the host hydra by the exchange, it was clarified the specificity of the combination of host/symbiont. Particular strain (J10) of hydra in the early state of symbiosis with chlorococcum is known only from Japan. We clarified that the chlorococci can escape from endodermal epithelial cells of host J10 strain hydra to the environmental water and can transmit horizontally to some other strain of non-symbiotic hydra. In particular strain of vulgaris group hydra (105 & SW strain), the transmitted chlorococci have established stable symbiotic relation with the host hydra. Then, we analyzed the change in the trait and gene expression pattern of the host hydra (105 strain) by the symbiosis with the horizontally transmitted chlorococci.

研究分野：動物学・発生生物学・進化生物学

キーワード：symbiosis cnidaria green algae Hydra Chlorella Chlorococcum horizontal transmission

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

グリーンヒドラ(*viridissima* 種群)は共生現象を研究する好材料とされてきた。そこで、私たちはグリーンヒドラと共生クロレラの分子系統的解析を行い、その起源と進化について研究を行ってきた。その結果、グリーンヒドラとクロレラの共生はパンゲアの分裂と大陸移動の開始以前に確立し、共種分化を行いつつ分布を広げ、現在のように南極大陸を除く世界中のすべての大陸に分布するに至ったという説を提示した(Kawaida, Ohba, Koutake, Shimizu, Tachida, Kobayakawa. 2013. *Molecular Phylogeny and Evolution*, 66, 906-914.)。

その研究の過程において、私たちは、グリーンヒドラから共生体であるクロレラを除去した Apo-symbiotic な系統に他の系統のグリーンヒドラから抽出した共生クロレラを移植することに成功し、基本的には、宿主であるグリーンヒドラと共生クロレラの間には、厳密な種特異的な関係は観られないことを示した。しかし、その後の長期にわたる観察の結果、新たな宿主-共生体関係を確立したグリーンヒドラは、その組み合わせによって生存率・増殖率や有性生殖を行う頻度などにおいて差異が観られることに気づいた。また、グリーンヒドラから共生クロレラを除去し、Apo-symbiotic なグリーンヒドラを作成すると有性生殖を行う頻度が下がるとの報告もある(Habetha et al., 2003. *The Hydra viridis/Chlorella symbiosis. Growth and sexual differentiation in polyps without symbionts. Zoology* 106, 101-108.)。以上のことから、様々な組み合わせのグリーンヒドラとクロレラの共生系を作成し、共生体が宿主の増殖・生殖等に与える影響を比較・解析するための実験系を確立し、それぞれの系統の生殖生理学的特徴の解析とトランスクリプトームの比較解析を行い研究基盤となるデータを整備することにより、「刺胞動物と緑藻との共生の起源・共進化過程の解明」のための研究を大きく進展させることができると考えられる。

上記のようにグリーンヒドラはこれまでの多くの研究の蓄積もあり、共生の研究の好材料ではある。しかし、おそらく1億年以上前と推察される時期からからクロレラとの安定した共生関係を確立し持続してきているため、かえって共生の起源のメカニズムを研究するには難しい側面がある。一方、同じヒドラ属の *vulgaris* 種群に属するヒドラ (非グリーンヒドラの種群でいわゆるブラウンヒドラの仲間) には、日本だけで単細胞緑藻のクロロコッカムを共生させている野生個体が見つかるが、その共生関係は不安定で、現在共生関係を確立しつつあるとも考えられる。それ故、*vulgaris* 種群に属するヒドラとクロロコッカムの関係は、共生の起源とそのメカニズムを研究する格好の材料となり得る。

## 2. 研究の目的

日本だけで棲息が確認されている内胚葉上皮細胞内にクロロコッカム(*Chlorococcum*)を共生させている *vulgaris* 種群のヒドラ(*Hydra magnipapillata* の J7, J10 系統)とこれまでクロレラ(*Chlorella*)との共生が詳しく研究されているグリーンヒドラ(*viridissima* 種群、日本での棲息は未確認)を材料に、「刺胞動物と緑藻との共生の起源・共進化過程の解明」を目指して、共生体緑藻と宿主の組み合わせを様々に変えた系統を確立し、それぞれの系統について光・温度・栄養条件等による共生状態の変化、増殖率・有性生殖の頻度などの基本的な特徴を明らかにし、比較解析することが本研究の目的の一つである。

また、確立した実験系を用いて共生状態の緑藻と単離培養した緑藻、緑藻を共生させているヒドラと共生させていないヒドラについて次世代シーケンサーを用いてそれぞれのトランスクリプトームのデータを得、その比較解析を行い、共生体・宿主双方における「共生に関する遺伝子の探索」とその発現解析を行うことがもう一つの目的である。

## 3. 研究の方法

(1) グリーンヒドラとクロレラの共生関係の組み合わせ特異性についての研究：

グリーンヒドラ 2 系統(イスラエル産の M9 系統とスイス産の K10 系統)とそれぞれのヒドラから共生クロレラを除去した M9Apo と K10Apo の 4 系統のヒドラを材料に実験・観察を行った。

共生クロレラを入れ換えるために、M9 系統のグリーンヒドラをホモジェナイズして共生クロレラ(M9Ch)を抽出し、先端口径 10~20 $\mu$ m のガラスキャピラリーを用いて K10 系統のグリーンヒドラから共生クロレラを除去した K10Apo のヒドラの胃腔内に口からマイクロインジェクションした。インジェクションを受けたヒドラの多くのものは、その後、内胚葉上皮細胞内に安定的にクロレラを共生した状態を維持し続けた。この系統を M9Ch/K10Apo とした。同様に、M9Apo 系統のヒドラに K10 系統のグリーンヒドラから抽出したクロレラ(K10Ch)を移植し、K10Ch/M9Apo 系統を確立した。

M9, M9Apo, K10Ch/M9Apo, K10, K10Apo, M9Ch/K10Apo の 6 系統のグリーンヒドラについて、宿主とヒドラの組み合わせの違いによる形質の変化を、形態の比較観察、増殖率の比較、摂食能力の比較、有性生殖の出現頻度(卵形成を行っているヒドラの出現頻度)の比較等を行い検出した。

また、この 6 系統のヒドラの mRMA を抽出し NSG を用いてトランスクリプトームデータを取得し、比較解析を行った。

(2) ブラウンヒドラ(グリーンヒドラ以外のヒドラ属の *braueri*, *oligactis*, *vulgaris* の3つの種群に対する総称)とクロロコッカムの共生関係についての研究:

J10 系統の *H. vulgaris* は、国立遺伝学研究所から譲渡を受けて研究室において維持している。J7 系統や J10 系統のヒドラは、内胚葉上皮細胞内に単細胞緑藻のクロロコッカムを細胞内に保持し共生関係を維持しているが、その共生関係は不安定でしばしば、共生クロロコッカムが失われることもある。私たちは、J10 系統のヒドラの継続飼育と予備的な観察から、共生体であるクロロコッカムが他の本来(野生状態で)クロロコッカムを共生させていない系統のヒドラに水平伝播し、受け手のヒドラの系統によっては安定的な共生関係を維持できることの示唆を得ていた。

まず、J10 系統の共生クロレラが水平伝播によって他の共生体を持たないヒドラに感染し、その後その新しい宿主内で維持されるかどうかについて、J10 系統のヒドラのポリプ1個体と共生体を持たない様々な系統のヒドラのポリプ1個体を同一容器内で飼育し、経時的にクロロコッカムの感染と新しい宿主内での動態を観察した。

上記の水平伝播実験の観察結果から、ゲノム情報の完備された *H. vulgaris* 105 系統のヒドラに J10 系統のクロロコッカムが水平伝播し、安定的に維持されることを見出した。そこで、その系統を 105G 系統とした。105 系統のヒドラの形質が、クロロコッカムの共生によってどのように変化するかを詳細に解析した。

また、この 105G 系統(クロロコッカムを共生している)と 105 系統(クロロコッカムを共生する前の非共生ヒドラ)のヒドラの mRMA を抽出し NSG を用いてトランスクリプトームデータを取得し、比較解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) グリーンヒドラとクロレラの共生関係の組み合わせ特異性について:

①宿主/共生体の組み合わせの違いによる形質の変化:

M9, M9Apo, K10Ch/M9Apo, K10, K10Apo, M9Ch/K10Apo の6系統のグリーンヒドラの増殖率の比較を行った結果、週2回の給餌、12L12D という明暗サイクルという飼育条件下では、共生クロレラを除去されたヒドラ(M9Apo, K10Apo)は、若干元の共生クロレラを持ったヒドラ(M9, K10)に比べて増殖率が下がった。また、興味深いことに共生クロレラを入れ換えた系統では、本来の共生クロレラを保持している系統と比べて増殖率が下がった系統と変化しなかった系統が観られた。具体的には、M9Ch/K10Apo 系統のヒドラは K10 系統のヒドラに比べ増殖率が減少したが、K10Ch/M9Apo 系統のヒドラは M9 系統のヒドラと増殖率に違いはなく、むしろ若干上がる傾向が観られた。

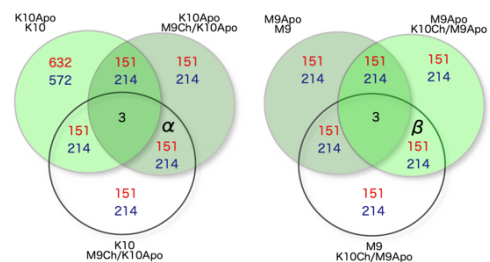
上記の結果と対応するような、形質の変化も観察された。M9Ch/K10Apo 系統のヒドラにおいて、触手あたりの貫通刺胞(stenotele)の数が減少しており、摂食能力の減少傾向が観られた。また、内胚葉上皮細胞内のクロレラの状態も M9Ch/K10Apo 系統のヒドラでは、本来の K10 系統のヒドラでは観られないクラスターを形成することが観察された。

これらの結果は、宿主であるグリーンヒドラと共生クロレラの間には厳密な種特異的な関係は観られないが、その組み合わせは長期間の共生を経て特異的なものとなっていることを示している。しかし、K10Ch/M9Apo 系統のヒドラは M9 系統のヒドラと増殖率に違いはなく、むしろ若干上がる傾向が観られたことから、その組み合わせの適合度(宿主/共生体双方にとっての利益の度合い)は、一概には現状のもの(野生型が維持しているもの)が最適とは限らないことも示唆された。

②宿主/共生体の組み合わせの違いによる遺伝子発現の変化:

K10, K10Apo-M9Ch/K10Apo と M9, M9Apo-K10Ch/M9Apo の組み合わせ(それぞれ右図中の  $\alpha$ ,  $\beta$ )で、発現変動があった遺伝子の Gene Ontology の出現頻度が有意に高かったものが見られた。それぞれの種類のポリプの組み合わせによって 133-2230 個の遺伝子に有意な発現の変動が見られた。Ribosomal protein の発現は M9Ch/K10Apo において増加し、K10Ch/M9Apo においては減少していた。Ribosomal protein の発現増加は異なる種群のヒドラである *H. vulgaris* と *Chlorococcum* sp. の共生において(本研究)、発現減少は M9-M9Apo や共生時のミドリゾウリムシでの報告がある(Ishikawa et al., 2016; Kodama et al. 2014)。このことからタンパク質合成の調節が M9Ch/K10Apo と K10Ch/M9Apo で異なっており、宿主-共生体特異性の違いをもたらしている可能性がある。刺胞動物において collagen 遺伝子は、藻類との共生時に内胚葉で発現が減少することが報告されている(Ganot et al. 2011)。K10Ch/M9Apo のヒドラでは複数の collagen 遺伝子の発現の減少が起きており、それらが間充ゲルの形成を制御しているのかもしれない。

Gene ontology	Source	U/D
$\alpha$ ribosome	CC	UP
peptide biosynthetic process	BP	UP
ion channel activity	MF	Down
$\beta$ extracellular region	CC	Down

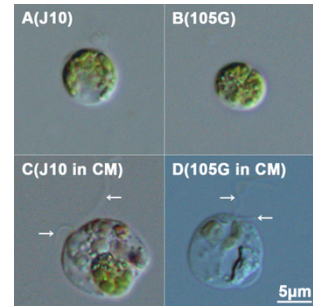


(2) ブラウンヒドラ(グリーンヒドラ以外のヒドラ属の3つの種群に対する総称)とクロロコッカムの共生関係について:

①野生状態でクロロコッカムを細胞内共生させているJ10系統のヒドラからの他系統のヒドラへの水平伝播が起こることの確認:

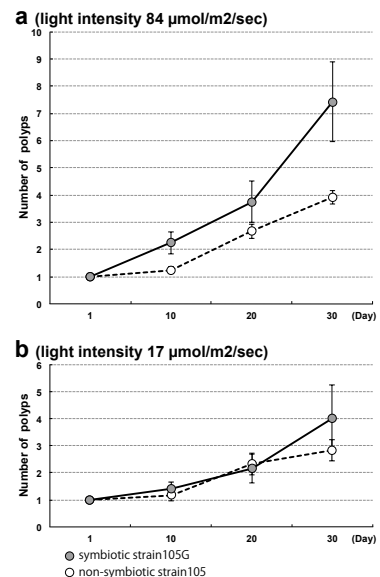
J10系統のヒドラと共生緑藻を保持していない様々な系統のヒドラを同一容器内で飼育し、J10系統の共生クロロコッカムが水平伝播するか、水平伝播したクロロコッカムが安定的な共生関係を新たなヒドラと構築するかを検討した。結果は、*viridissima* 種群、*braueri* 種群、*oligactis* 種群、*vulgaris* 種群の他系統のヒドラ全てにおいて程度の差はあるが、クロロコッカムの水平伝播は観察された。しかし、安定的にクロロコッカムと共生関係を維持できたヒドラは、*vulgaris* 種群の一部の系統に限られた。安定的な共生関係を確立できた系統(*Hydra vulgaris* 105G 系統、*Hydra vulgaris* SW 系統)は現在もその共生関係を維持しており、今後共生の初期状態を研究するための好材料として利用できる。また、この実験に用いたヒドラの系統関係を解析した結果は、このクロロコッカムが安定的に共生できるヒドラは *vulgaris* 種群の一部の相互に近縁の系統であることを示唆している。

また、J10系統のヒドラの飼育液中にはヒドラから遊走して自由生活状態になり、2本の鞭毛を形成して遊泳するクロロコッカムが確認できた(右図)。そのクロロコッカムとJ10系統のヒドラに共生しているクロロコッカムが同一種であることは、*rbcL* 遺伝子等の塩基配列の同一性で確認している。



②クロロコッカムの新たな共生による宿主のヒドラの形質の変化:

*H. vulgaris* 105 系統のヒドラは、J10 系統由来のクロロコッカムを細胞に共生させることによってその形質を顕著に変える。具体的には、照射光が強い条件下では出芽による無性的な増殖速度が上がるということが観察された(右図 a,b)。関連して摂食能力の違いを検証したが顕著な差異は見出されなかった。一方で、個体(ポリプ)の大きさが縮小し、一つのポリプを構成する細胞(内胚葉上皮細胞)の数もそれに伴って減少していた。また、触手に覗られる貫通刺胞の大きさが変化することも観察された。これらの結果は、共生クロロコッカムの存在によって 105 系統のヒドラは、細胞レベルでの増殖には変化はないが、個体としての増殖率(個体数の増加率)が上がるということを示唆している。この現象は、共生しているクロロコッカムにとっても宿主であるヒドラにとってもその分布域を広げるといふ点では共通した利益を得ていると考えられ、相利共生的な関係が樹立されているとも考えられる。そのことは、J10 系統のヒドラから共生クロロコッカムを光合成阻害剤である DCMU 処理によって除去したヒドラ J10Apo 系統のヒドラのポリプの大きさが壮大することによっても裏付けられる。



③クロロコッカムの新たな共生による宿主のヒドラの遺伝子発現の変化:

J10 系統のヒドラからのクロロコッカムの水平伝播によって新たに共生関係を確立した 105G 系統と共生する前の非共生ヒドラ 105 系統の mRMA を抽出し NSG を用いてトランスクリプトームデータを取得し比較解析を行った。その結果、共生ヒドラでは、ポリプサイズが有意に小さくなり、触手も短縮し、刺胞のサイズ分布にも変化が見られた。また、無性生殖である出芽による増殖率が増加した。遺伝子発現変動解析では 2794 遺伝子の発現量が有意に増加し、2970 遺伝子の発現量が減少することが示された。発現量が増加した遺伝子には、タンパク質の翻訳を制御するものや電子伝達系に關与するもの、ホメオボックス遺伝子といったものが観られた。発現量が減少した遺伝子には、カルシウム・カリウムチャンネルやプロトカドヘリンといった神経細胞に關連する可能性のあるものが観られた(表)。

表: 主な共生時に出現頻度の高い Gene ontology (GO) terms

発現増加	発現減少
Category GO term	Category GO term
BP translation	CC plasma membrane*
CC mitochondrion	MF cation channel activity
CC ribosome	MF calcium ion binding*
BP RNA splicing	CC actin cytoskeleton*
BP respiratory chain	BP neurological system process*

\*印は Ishikawa et al. (2016) (J10 strain と J10\_Apo strain の遺伝子発現の比較) と共通して共生時に出現頻度の高い GO term。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Miyokawa R., Tsuda T., Kanaya H. J., Kusumi J., Tachida H., & Kobayakawa Y. (2018) Horizontal Transmission of Symbiotic Green Algae Between Hydra Strains. *Biol. Bull.* **235**: 113–122.(査読あり)
- ② Kobayakawa Y. (2017) “Symbiosis between green algae and hydra” in “ALGAE and CYANOBACTERIA SYMBIOSES” edited by Martin Grube, Lucia Muggia, and Joseph Seckbach, World Scientific.(査読あり)

[学会発表] (計5件)

- ① 「グリーンヒドラ-共生緑藻の組み合わせの特異性について  
戸川優弥子、山口淳也、小早川義尚  
三学会（動物学会、植物学会、生態学会）合同大分大会、鹿児島、2016年5月
- ② 「共生緑藻 (*Chlorococcum* sp.) のヒドラポリプ間での水平伝播」  
御代川 涼、津田 卓也、金谷 啓之、楠見 淳子、舘田 英典、小早川 義尚  
三学会（動物学会、植物学会、生態学会）合同大分大会、大分、2017年5月
- ③ 「クロロコッカムとヒドラの水平伝播での共生関係構築における遺伝子発現変動解析」  
御代川 涼、津田 卓也、楠見 淳子、舘田 英典、小早川 義尚.  
日本遺伝学会第89回大会、岡山、2017年9月
- ④ 「グリーンヒドラとクロレラの共生関係の特異性」  
御代川 涼、戸川 優弥子、山口 淳也、楠見 淳子、舘田 英典、小早川 義尚  
日本進化学会第20回大会、東京、2018年8月
- ⑤ 「ヒドラにおける共生クロロコッカムの水平伝播と遺伝子発現変動解析」  
御代川 涼、津田 卓也、金谷 啓之、楠見 淳子、舘田 英典、小早川 義尚  
日本動物学会第89回大会、札幌、2018年9月

[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：  
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：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：舘田 英典

ローマ字氏名：Tachida Hidenori

所属研究機関名：九州大学大学院

部局名：理学研究院

職名：教授

研究者番号（8桁）：70216985

研究分担者氏名：楠見 淳子

ローマ字氏名：Kusumi Junko

所属研究機関名：九州大学大学院

部局名：比較社会文化研究院

職名：準教授

研究者番号（8桁）：20510522

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：御代川 涼、金谷 啓之、津田 卓也

ローマ字氏名：Miyokawa Ryou, Kanaya Hiroyuki, Tuda Takuya

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。