

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07535

研究課題名(和文) 無腸動物における共生藻の垂直伝搬：宿主と共生藻の緊密性はどこまで進化しているか？

研究課題名(英文) Vertical transfer of symbiotic algae in Acoela: How far has the integrity between host and symbiotic algae evolved?

研究代表者

彦坂 暁 (Hikosaka, Akira)

広島大学・統合生命科学研究科(総)・准教授

研究者番号：30263635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：無腸動物には体内に微細藻類を共生させている種が多い。その多くは幼生期に共生藻を取り込む(水平伝搬)が、一部の無腸動物では親が子に共生藻を受け渡し(垂直伝搬)、共生藻との緊密性がより深まっている。本研究は、この緊密性がどこまで深まっているのかについて研究を行い、以下の成果を得た。(1)水平伝搬型の無腸動物であるナйкаイムチョウウズムシのゲノム解析を行った。(2)垂直伝搬型のワミノアの2種の共生藻と、同じ水槽に生息する水平伝搬型の無腸動物ヘテロケロスの共生の培養を試みた結果、ワミノアの共生藻は自由生活能力が低下していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

無腸動物は動物の初期進化を解明する上で重要な位置付けにいる動物であり、また動物と藻類の共生進化を解明する上でも重要な動物である。その一種であるナйкаイムチョウウズムシのゲノムを明らかにしたことは、無腸動物の研究を進める基盤となるという意味で学術的な意義がある。また、垂直伝搬型のワミノア由来の共生藻の培養が困難であるという結果は、この種と共生藻の依存関係がより深化していることを示唆しており、水平伝搬から垂直伝搬へという、共生関係の進化における重要な契機を理解するための端緒となる。

研究成果の概要(英文)：Many Acoela species have symbiotic microalgae in their bodies. While most of them take up symbiotic algae during larval stages (horizontal transmission), in some Acoela species, parents pass symbiotic algae to their offspring (vertical transmission). The latter has evolved into a deeper host-symbiont dependency. This study investigates the extent to which this integrity is deepened. We obtained the following results. (1) We analyzed the genome of an Acoela species, *Praesagittifera naikaiensis* (horizontal transmission type). (2) Cultivation of two symbionts of *Waminoa* (vertical transmission type) and the symbiont of *Heterochaerus* (horizontal transmission type) suggested that the former symbiotic algae have a reduced ability of free-living.

研究分野：動物進化学

キーワード：無腸動物 共生 進化 ゲノム 藻類

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

無腸動物は非常に単純な体制を持つ海産動物で、世界中に約 400 種が分布している。無腸動物は左右相称動物の中で最も初期に分岐した可能性が指摘されており、進化学的に重要な動物群である (Cannon et al. 2016)。

無腸動物の多くは体内に微細藻類を共生させ、その光合成産物を利用している。かれらの共生藻獲得法は 2 つに大別できる。ほとんどの無腸動物は孵化直後には共生藻を持たず、幼生期に環境中の特定の藻類を取り込み共生藻とする (水平伝搬)。一方、ワミノア属の無腸動物だけは親が卵の中に共生藻 (褐虫藻) を入れて子に受け渡し (垂直伝搬) 孵化した時から共生藻を持つ (Barneah et al. 2007)。この 2 つの獲得法のうち水平伝搬が祖先的であり、ワミノアと内在性の褐虫藻は共生関係がより緊密になるように進化したと考えられる。

宿主による共生体の捕食や共生体の宿主への感染等から始まった共生関係が、互いの依存関係を深めて緊密化し、極端な場合には両者の融合・一体化まで進むという進化は、生物の歴史上くり返し起きてきた。ミトコンドリアや葉緑体のような進化的新機軸もこのような起源をもち、生物の進化・多様化の可能性を広げる重要なしくみの一つである。この宿主-共生体関係の緊密化において、共生体を次世代に受け渡せるようになる垂直伝搬の進化は、きわめて重要なステップである。無腸動物には水平、垂直の両方の伝搬様式があり、近縁種間の比較解析を行えるため、垂直伝搬への進化がいかにして起きたのかという未解決問題を研究するには絶好の材料である。

我々はこれまで、宿主と共生体の相互作用による生物進化の駆動について研究してきた。この観点から無腸動物と藻類の共生進化に興味をもち、研究を始めた。

我々はまずワミノアの飼育法を開発した。ワミノアは熱帯域の珊瑚礁でサンゴの表面に生息しており、水槽ではハナガタサンゴと共に飼育することで長期間の飼育が可能になった (Hikosaka-Katayama and Hikosaka 2010)。

ワミノアには *Symbiodinium* sp. と *Amphidinium* sp. という 2 種類の褐虫藻が共生している。そこで我々はワミノアにおける褐虫藻の垂直伝搬プロセスを観察した。その結果、これらの褐虫藻は未熟な卵母細胞の中には存在しないが、その周囲をとりまく濾胞細胞内に存在し、卵母細胞の成熟とともに濾胞細胞から卵母細胞へ移入することが分かった (Hikosaka-Katayama et al. 2012)。

一方、ワミノアが生息するサンゴにも *Symbiodinium* が共生しており、ワミノアは垂直伝搬以外にサンゴから褐虫藻を取り入れている可能性もあった。そこでワミノアとサンゴの *Symbiodinium* の分子系統解析を行ったところ、両者は別群に別れ、ワミノア内在性の *Symbiodinium* はワミノアとの共生に特化した系統である可能性が示唆された。またワミノア内在性 *Amphidinium* の分子系統解析も行い、この系統は共生性と自由生活性の *Amphidinium* の両方を含むクレードに入ることが分かった。これによりワミノア内在性の *Amphidinium* が自由生活もできる可能性が示唆された (Hikosaka-Katayama et al. 2012)。

他方で、我々は無腸動物のゲノム解析も進めていたが、無腸動物のように共生体を持つ宿主の場合は (中でもワミノアのように宿主と共生体を分離することが困難な場合は特に) 混在する両種のゲノムのソーティングが課題になる。これに関連して、代表者は 2 つの祖先種の異種交雑により全ゲノム重複を起こしたアフリカツメガエルのゲノム解読に参加し、祖先種が分かっていた期間にのみ増幅していたトランスポゾン指標にして各祖先種に由来するゲノムサブセットの判別に初めて成功した (Session et al. 2016)。この解析法は共生する 2 種以上の生物に由来する混在したゲノムのソーティングにも有効だと期待できた。以上の背景から、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

宿主と共生体が共生関係を強めていく進化の過程で、世代ごとに取り込んでいた共生体を次世代に渡せるようになる垂直伝搬の進化は重要なステップである。無腸動物には水平伝搬、垂直伝搬の両方の共生藻伝搬様式があり、近縁種で比較解析ができるため、この進化を研究する絶好の材料である。

共生藻を垂直伝搬するワミノアは、他の無腸動物よりも共生藻との関係が緊密化していると考えられる。そこで本研究は、ワミノアと内在性の共生藻 (褐虫藻) の共生関係がどこまで緊密化しているかを調べることを目的とする。そのために、次の 2 点を明らかにする。

- (1) 内在性褐虫藻の宿主依存性：ワミノアに内在し垂直伝搬する 2 種の褐虫藻は、ワミノアに依存するように進化した特別な系統なのか、それともワミノアから離れて自由生活もできるのか？
- (2) ワミノアの共生藻選択性：ワミノアと共生し垂直伝搬できるのは、内在性の褐虫藻だけなのか、それともワミノアは他系統の藻類も取り込み、共生を成立させ、垂直伝搬することができるのか？

3. 研究の方法

以下の (1)(2) により内在性褐虫藻の宿主依存性を、(3) によりワミノアの共生藻選択性を調べる。

(1) 内在性褐虫藻が自由生活に必要な遺伝子を保持しているか調べるために、ゲノム解析を行う
もしワミノアに内在する褐虫藻 *Symbiodinium* と *Amphidinium* がワミノアとの共生に特化して自由生活を放棄した系統なら、これらのゲノムは自由生活に必要な遺伝子のいくつかを欠失している可能性がある。そこでこれらのゲノムを読み、遺伝子の構成を調べる。しかしここで問題になるのが、ワミノアは内在性褐虫藻と分離するのが難しく、シークエンスデータにはワミノアと2種の褐虫藻のゲノムが混在してしまう点である。そこでまず、混在したゲノムデータからそれぞれのゲノムを判別してソーティングする。そのために、申請者がアフリカツメガエルゲノム解読において開発した手法を流用する。ソーティングしたゲノムデータを用いて、すでに明らかにされている *Symbiodinium* のゲノムと比較し、内在性の褐虫藻で遺伝子（特に自由生活に必要な遺伝子）の欠失が起きているかを調べる。

(2) 内在性褐虫藻が自由生活できるか調べるために、ワミノアから単離して培養を試みる

ワミノア内在性の *Symbiodinium* と *Amphidinium* に自由生活の能力が保持されているかを調べるために、これらがワミノアから分離されても生存・増殖が可能かを単離培養によって調べる。ワミノアをCa/Mg除去海水処理により細胞解離し、内在性褐虫藻を遊離させる。褐虫藻の培養方法は確立されており、サンゴに共生する褐虫藻も単離培養が可能である。これらの培養法をベースに培養条件（培養液、温度、光など）の検討を行う。培養が可能な場合は株化する。様々な条件を検討しても培養できない場合は、これらの系統が共生に特化したために自由生活能力を失っている可能性がある。この解釈の妥当性は(1)のゲノム解析の結果と合わせて判断する。

(3) ワミノアが外部から褐虫藻を取り込み、共生を確立し、垂直伝搬できるか調べる

ワミノアは垂直伝搬のみで褐虫藻を獲得しているのか、それとも外部から取り入れることもあるのか。またワミノアは内在性の系統以外の褐虫藻とも共生を確立し、垂直伝搬できるのか。これを調べるためには外部から褐虫藻を取り込ませて追跡する必要がある。そこで複数の *Symbiodinium* と *Amphidinium* の株を用いて、蛍光蛋白質 GFP をマーカーに持つ褐虫藻を作製する。次に、ワミノアの共生藻選択性を調べるために、形質転換した褐虫藻を導入・追跡する。上記の GFP 蛍光をもつ褐虫藻株を増殖させ、孵化直後からワミノア幼生に給餌し飼育する。成長したワミノアをマグネシウムで麻酔して蛍光顕微鏡で観察し、GFP 蛍光をもつ褐虫藻がワミノアの体内に共生しているか、そして内在性の褐虫藻と同様の経路で垂直伝搬するかを調べる。給餌による環境からの藻類の取り込みが起きない可能性もあるが、その場合は、GFP を持つ褐虫藻を顕微注入により導入するなどの方法も試み、共生が成立するか調べる。

4. 研究成果

(1) ゲノム解析

共同研究者と共にワミノアのゲノム解析を開始したが、共生藻である褐虫藻のゲノムサイズが巨大であるため、宿主と2種の共生体のゲノムを同時に解析することは容易でないことが判明した。そこで我々はまず、共生藻を水平伝搬するために共生体を持たない胚または幼生を大量に集めることができるナйкаイムチョウウズムシのゲノムを解読し、この動物のゲノムと、既存の褐虫藻ゲノムを参照してワミノアのゲノム解析へ進むことを考えた。ナйкаイムチョウウズムシのゲノム解析の成果 (Arimoto et al. 2019, Ueki et al. 2020) と、それに付随して明らかになったナйкаイムチョウウズムシの地理的な遺伝的分化に関する研究 (Hikosaka-Katayama et al. 2020) を、それぞれ論文として発表した。

(2) 共生藻の培養実験

前提として、培養して増殖してきた藻類が確かにワミノアの共生藻に由来するものであることをモニターしつつ実験を行う必要がある。これを簡便に行うために、いくつかの遺伝子配列を用いて褐虫藻の種類・系統を同定した。具体的には、藻類の DNA barcoding に用いられるミトコンドリア cytochrome c oxidase 1 (cox1) 及び cytochrome b (cob) を PCR で増幅した。ワミノアには *Symbiodinium* と *Amphidinium* という2種の共生藻が同時に共生しているため、この PCR 産物には両者からの増幅産物が混在している。そこでこれらをクローニングしてから塩基配列の決定を行った。

次に、ワミノアから褐虫藻を単離して培養することを試みた。またワミノアを飼育している同じ水槽に水平伝搬で褐虫藻を獲得する別種の無腸動物ヘテロケロスが生息していたため、この動物の共生藻も対照として培養を試みた。動物との共生下にある褐虫藻は鞭毛を失い、遊泳能力を持たないが、自由生活下では鞭毛を生やして遊泳する。共生していた褐虫藻が動物外に取り出された時に遊泳できるようになるかは、共生藻が自由生活能力を持つか否かの初期の指標となりうる。そこでワミノアとヘテロケロスからそれぞれ共生藻を単離し、まず藻類の培養に広く使用されている IMK 培地と、人工海水 + KW21 培地の2種の培地で培養し、単離された共生藻が遊泳能力を示すかを継続的に観察した。この際、遊泳能力の有無を簡便に判定できる手法を開発した。この方法を用いた観察の結果、ヘテロケロス由来の共生藻は培養開始後数日で遊泳を開始するのに対し、ワミノア由来の共生藻は、少なくともこの培養条件下では遊泳を開始しないことが示された。この結果を受け、さらに褐虫藻の培養方法を検討した。これまでに、サンゴの共生藻を培養している研究者の助言を参考にして、腐葉土の抽出液を加えた培地などの検討を行って

きた。しかし現在までのところ、試した培地においてワミノア由来の共生藻の遊泳は確認されていない。以上の結果はまだ端緒的なものではあるが、ワミノアの共生藻がより共生生活に特化している可能性を示唆している。

(3) 外部からの共生藻の取り込み実験

上記(2)のステップがクリアできていないため、ワミノアにおいて共生藻の取り込み実験は行えていない。そこで現在は、培養が可能なナйкаイムチョウズムシの共生藻を用いて、異なる種類の共生藻を取り込めるかどうかの検討を行っている。その結果、ナйкаイムチョウズムシにおいては共生藻の選好性があることが判明している。

<引用文献>

- Cannon JT, Vellutini BC, Smith J, Ronquist F, Jondelius U, Hejnol A (2016) Xenacoelomorpha is the sister group to Nephrozoa. *Nature* 530: 89-93.
- Barneah O, Brickner I, Mooge M, Weis VM, Benayahu Y (2007) First evidence of material transmission of algal endosymbionts at an oocyte stage in a triploblastic host, with observations on reproduction in *Waminoa brickneri* (Acoelomorpha). *Invertebrate Biol* 126: 113-119
- Hikosaka-Katayama T, Hikosaka A (2010) Artificial rearing and oviposition of *Waminoa* sp. (Acoela, Acoelomorpha): Toward the development of a model system to study animal-algal symbiosis. *Bulletin of the Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University I* 5: 39-45.
- Hikosaka-Katayama T, Koike K, Yamashita H, Hikosaka A, Koike K (2012) Mechanisms of maternal inheritance of dinoflagellate symbionts in the Acoelomorph worm *Waminoa litus*. *Zool Sci* 29: 559-567.
- Session AM, Uno Y, Kwon T et al. (2016) Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature* 538: 336-343
- Arimoto A, Hikosaka-Katayama T, Hikosaka A, Tagawa K, Inoue T, Ueki T, Yoshida M, Kanda M, Shoguchi E, Hisata K, Satoh N (2019) A draft nuclear-genome assembly of the acoel flatworm *Praesagittifera naikaiensis*. *GigaScience* 8: 1-8.
- Ueki T, Arimoto A, Tagawa K, Satoh N (2019) Xenacoelomorph-Specific Hox Peptides: Insights into the Phylogeny of Acoels, Nemertodermatids, and Xenoturbellids. *Zool Sci* 36:395-8.
- Hikosaka-Katayama T, Watanuki N, Niiho S, Hikosaka A (2020) Geographical distribution and genetic diversity of *Praesagittifera naikaiensis* (Acoelomorpha) in the Seto Inland Sea, Japan. *Zool Sci* (in press).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hikosaka-Katayama Tomoe, Watanuki Nanami, Niiho Saki, Hikosaka Akira	4. 巻 -
2. 論文標題 Geographical distribution and genetic diversity of Praesagittifera naikaiensis (Acoelomorpha) in the Seto Inland Sea, Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueki Tatsuya, Arimoto Asuka, Tagawa Kuni, Satoh Noriyuki	4. 巻 36
2. 論文標題 Xenacoelomorph-Specific Hox Peptides: Insights into the Phylogeny of Acoels, Nemertodermatids, and Xenoturbellids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 395-401
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/zs190045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arimoto Asuka, Hikosaka-Katayama Tomoe, Hikosaka Akira, Tagawa Kuni, Inoue Toyoshige, Ueki Tatsuya, Yoshida Masa-aki, Kanda Miyuki, Shoguchi Eiichi, Hisata Kanako, Satoh Noriyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 A draft nuclear-genome assembly of the acoel flatworm Praesagittifera naikaiensis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 GigaScience	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/gigascience/giz023	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 綿貫七海, 新保早, 岡部楓, 松浦綾音, 彦坂智恵, 彦坂暁
2. 発表標題 瀬戸内海の2種の無腸動物とその共生藻
3. 学会等名 生物系三学会中国四国支部大会（広島）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 亀川礼記, 彦坂暁, 古川康雄
2. 発表標題 無腸動物(<i>Praesagittifera naikaiensis</i>)からの酸感受性チャネルのクローニング
3. 学会等名 生物系三学会中国四国支部大会(広島)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 彦坂暁, 綿貫七海, 松浦綾音, 岡部楓, 新保早, 彦坂智恵
2. 発表標題 瀬戸内海の無腸動物とその共生藻の分布と遺伝的分化
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会(大阪)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹歳桃芳, 彦坂智恵, 彦坂 暁, 石田 健一郎
2. 発表標題 ナйкаイムチョウズムシ <i>Praesagittifera naikaiensis</i> の共生藻は何か?
3. 学会等名 日本共生生物学会第3回大会(横浜)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平野絢香, 彦坂智恵, 彦坂暁
2. 発表標題 瀬戸内海産無腸動物ナйкаイムチョウズムシの浸透圧適応
3. 学会等名 日本動物学会広島県例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 綿貫七海, 新保早, 彦坂智恵, 彦坂暁
2. 発表標題 無腸動物ナйкаイムチョウウズムシの分布と遺伝的分化
3. 学会等名 日本動物学会広島県例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 彦坂暁
2. 発表標題 瀬戸内海の無腸動物とその共生藻
3. 学会等名 日本共生物学会第2回大会(神戸)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡部楓, 彦坂智恵, 彦坂暁
2. 発表標題 2種の瀬戸内海産無腸動物の共生藻
3. 学会等名 生物系三学会中国四国支部大会(山口)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡部楓, 彦坂智恵, 彦坂暁
2. 発表標題 瀬戸内海産無腸動物 <i>P. naikaiensis</i> の共生藻の遺伝的変異と地理的分布
3. 学会等名 日本動物学会広島県例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 彦坂暁, 新保早, 彦坂智恵
2. 発表標題 無腸動物ナйкаイムチョウウズムシ (Praesagittifera naikaiensis) の地理的分布
3. 学会等名 日本動物学会88回大会 (富山)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	田川 訓史 (TAGAWA KUNIFUMI) (00403577)	広島大学・統合生命科学研究科(理)・准教授 (15401)	
連携研究者	佐藤 矩行 (SATOH 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)	