

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06240

研究課題名(和文) レクチンは褐虫藻の獲得にどのように関与しているか

研究課題名(英文) Are lectins involved in the acquisition of symbiotic zooxanthellae in coral symbiosis?

研究代表者

神保 充 (Jimbo, Mitsuru)

北里大学・海洋生命科学部・教授

研究者番号：10291650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： いままでサンゴによる褐虫藻の獲得機構については十分に解明されていなかった。本研究により、サンゴの一種 *Acropora tenuis* において、レクチンが、褐虫藻の誘引や貪食に重要な役割を持つことを明らかにした。石垣島と瀬底島から得られた *A. tenuis* 幼生が異なる褐虫藻株を獲得する傾向を有することを見いだした。さらに、交配実験により、稚ポリプが獲得する褐虫藻株は、レクチン ActL により影響されている可能性があることが見いだされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の環境変動の影響でサンゴの白化が進行しており、サンゴの減少のみならず、サンゴ礁生態系の衰退に繋がっており、観光業や漁業など様々な影響が報告されている。一つの原因はサンゴが脱落することである。本研究ではサンゴの一種ウスエダミドリイシをモデルとして、その獲得機構をレクチンを中心に検討して、サンゴによる褐虫藻の誘引や、胃腸細胞への取り込みに関与していることを見いだした。これらのレクチンを活用することにより、白化したサンゴに褐虫藻を再獲得させるのを、より効率的に行うことができると期待される。

研究成果の概要(英文)： Previously, the zooxanthellae acquisition by corals were not fully known. In this research, I showed that some lectins, ActL and AtL-2, play important roles in two steps in zooxanthellal acquisition, chemotaxis and phagocytosis, using *Acropora tenuis* as a coral model. I found that *A. tenuis* juvenile polyps tend to acquire different strains of zooxanthellae each other. Mating experiments showed that juvenile polyps from different coral colonies tends to acquire different zooxanthellae strains. Since each polyp strain had different ActL isoproteins which have several mutations in their amino acid sequences, it is plausible that ActL isoproteins determine the kind of zooxanthellae acquired by the polyp strains.

研究分野： 生化学

キーワード： レクチン ウスエダミドリイシ サンゴ 褐虫藻 獲得 共生

1. 研究開始当初の背景

本研究で着目しているレクチンは、糖結合タンパク質の総称であり、主に免疫系において、病原菌に最初に結合するタンパク質であり、獲得免疫を持たない無脊椎動物ではレクチンの機能は重要である。レクチンは、カイメンやシャコガイ、マメ科植物の共生に関与することが報告されて来ているものの、いまだ議論が続いている。申請者は幾つかのサンゴからレクチンを精製した。これらのレクチンは褐虫藻の形態を変化させたり誘引するなどの影響をもっており、その影響は褐虫藻株により異なることを見出した。また、サンゴによる褐虫藻の獲得は、レクチン抗体やレクチンの結合糖により阻害されることからレクチンが獲得に関与すると推定される。近年、サンゴの一種 *Acropora tenuis* をモデルとして、褐虫藻獲得におけるレクチンの役割を検討してきた。これにより、褐虫藻の獲得を阻害する糖を3種 (*N*-アセチルガラクトサミン、*N*-アセチルグルコサミン、ガラクトース) 明らかにし、そのうち2種については、その糖に結合するレクチン AtTL-2 および ActL を同定した。ActL は、褐虫藻を誘引することを明らかにしたが、AtTL-2 の機能は明らかにできていなかった。*A. tenuis* の幼生は沖縄本島およびより南に位置する石垣島で採集しているが、その両方で獲得されやすい褐虫藻株が異なっていた。*A. tenuis* による褐虫藻の獲得にはレクチンが関与していることから、褐虫藻の選択にもレクチンが関与しているかもしれない。

このようにレクチンは共生において様々な機能を持つと推定される。実際、湯山らは、稚ポリプに特定の褐虫藻を獲得させると、しばらくはサンゴ内に保持されるものの増殖せず、しばらく後に増殖することを見いだした。この褐虫藻が増殖しない時期には、レクチンの一種 *intelectin* に類似したタンパク質が増加していた。このタンパク質は、サンゴ内で褐虫藻が増殖せずに維持されている時に発現が増加することから共生への関与が推定されるが、明確な機能は明らかにされていない。

2. 研究の目的

サンゴによる褐虫藻の獲得において、レクチンの関与は明らかにされつつあるものの、その機能については完全には明らかにされてこなかった。サンゴの稚ポリプが褐虫藻を獲得する際には、褐虫藻を誘引した後、褐虫藻を体内にとりこみ、さらに胃層細胞に褐虫藻を貪食する必要がある。そこで、今まで見いだされたレクチンおよび新たに見いだしたレクチンが褐虫藻獲得のどの段階に関与しているのかを解析する。具体的には以下を明らかにする。

1) レクチン自体の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

幼生の取得

ウスエダミドリイシ *Acropora tenuis* のプラヌラ幼生は、2019-2021年の5、6月に得られたバンドルを用いて得た。また、交配実験を行う場合、各群体から得られたバンドルから卵および精子を得て、群体ごとに掛け合わせて、幼生を得た。

稚ポリプによる褐虫藻獲得の検討

得られたプラヌラ幼生に、ヒドラ神経ペプチド Hym-248 を添加して、稚ポリプへの変態を誘導した。72時間後に、各褐虫藻株を添加して、24時間静置した。その後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、稚ポリプに取り込まれた褐虫藻数を計数した。

ActL の精製

ウスエダミドリイシの親群体を破碎した後、抽出を行った。粗抽出液は、*N*-アセチルグルコサミン-アフィニティークロマトグラフィーを用いて ActL を精製した。

ActL による褐虫藻の誘引

10万細胞の褐虫藻に、2 μ l の ActL を含むキャピラリを挿入して、1時間放置した。その後、キャピラリ内に入った褐虫藻数を計数した。

ActL cDNA の塩基配列の決定

プラヌラ幼生に Hym-248 を添加して72時間放置して、稚ポリプを得た。この稚ポリプから RNA を調製した後、cDNA を作製した。得られた cDNA を鋳型として、ActL cDNA を増幅した。プライマーは、ActL1、ActL4 および ActL2/3 を増幅するプライマーを用いた。

RNAi による ActL mRNA の抑制

Hym-248 を添加後24時間静置した後、各 *act1* mRNA に対応する siRNA を添加した。その 48

時間後に褐虫藻を加え、24 時間静置した。その後、稚ポリブ内の褐虫藻数を計数した。

AtTL-2 固定化ビーズの調製

ビーズにウシ血清アルブミン (BSA) または、ActL を固定した。これを変態した稚ポリブに添加し、24 時間静置した。その後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、稚ポリブ内のビーズの面積を測定した。

4. 研究成果

レクチン ActL について

このレクチンは、褐虫藻を誘引する機能を持っていた。複数の褐虫藻株を用いて褐虫藻の誘引を検討したところ、NBRC102920 や CCMP2556 ではよく誘引される一方、CS-156 のようにほとんど誘引されない褐虫藻もみられた。これらの株は、稚ポリブへの獲得数も異なっていた。両者の相関をみたところ、一つの株を除いて、ActL によく誘引される褐虫藻は、よく獲得されることが分かった (図 1)。したがって、多くの褐虫藻の場合、レクチン ActL に依存して褐虫藻が獲得されると示唆される。一方、例外があるということは、稚ポリブによる褐虫藻獲得に ActL が関わらず、別の因子が重要である場合もあるということを示している。近年、褐虫藻の一種 *Symbiodinium* は 490 nm の光に誘引されることが示されていることから、同属である CS-161 は、褐虫藻の獲得に光が関与している可能性がある。

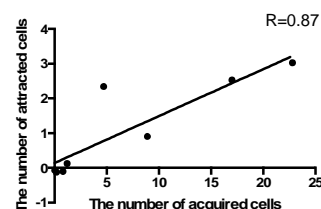


図 1 ActL による誘引と稚ポリブによる獲得数の相関

ActL について、そのアミノ酸配列を決定したところ、*A. tenuis* ゲノムから類似タンパク質をコードする遺伝子が 4 つ (act1-1, 2, 3, 4) 見いだされた。これらに類似のタンパク質は共生の有無に拘わらず、刺胞動物に広くみられた。これらの遺伝子のうち、一つ act1-3 は、翻訳配列の途中で停止コドンがあり、翻訳されていないと推定される。幼生の段階で発現している ActL 遺伝子を探索したところ、act1-2 以外の act1-1, 3, 4 が発現していた。これらの遺伝子を siRNA により発現抑制したところ、褐虫藻の獲得は阻害された (図 2)。その時、ActL cDNA は、減少していたことから、ActL により褐虫藻の獲得が促進されていることが分かった。

次に、サンゴの遺伝的な背景により褐虫藻の獲得に差があるかを検討した。まず、交配実験により、7 群体の *A. tenuis* から得られた 11 株の幼生を用いてそれぞれの褐虫藻株の獲得について検討した。その結果、幼生の株ごとに、よく獲得される褐虫藻の傾向が異なっていた。それぞれの幼生株から、発現している ActL cDNA の塩基配列を決定したところ、様々な部分に変異が入っていることが分かった (図 2)。これらと獲得す

4-typeA	GMEAKPFKA I D K NVRFMDLPQTSN A SPYDLAWQSLH V AAAAACRGSTP T GGSGTAVNLVL 60
4-typeD	GMEAKPFKA I DTNVRHMDLPQTAD A SPYDLAWQSLHMAAAAACRGSTPKGSGTAVNLVL 60
4-typeB	GMEAKPFKA I DTNVRHMDLPQTV D ASPYDLAWQSLHMAAAAACRGSTPKGSGTAVNLVL 60
4-typeC	GMEAKPFKA I DTNVRHMDLPQTV D ASPYDLAWQSLHMAAAAACRGSTPKGSGTAVNLVL 60
4-typeE	GMEAKPFKA I DTNVRHMDLPQTV D ASPYDLAWQSLHMAAAAACRGSTPKGSGTAVNLVL 60
act14	GMEAKPFKA I DTNVRHMDLPQTAD A SPYDLAWQSLHMAAAAACRGSTPKGSGTAVNLVL 60
4-typeG	GMEAKPFKA I DTNVRHMDLPQTV D ASPYDLAWQSLHMAAAAACRGSTPKGSGTAVNLVL 60
4-typeF	GMEAKPFKA I DTNVRHMDLPQTV D ASPYDLAWQSLHMAAAAACRGSTP T GGSGTAVNLVL 60
4-typeK	GMEAKPFKA I DTNVRHMDLPQTV D ASPYDLAWQSLHMAAAAACRGSTPKGSGTAVNLVL 60
4-typeJ	GMEAKPFKA I DTNVRHMDLPQTV D ASPYDLAWQSLHMAAAAACRGSTPKGSGTAVNLVL 60
4-typeH	GMEAKPFKA I D A NVRHMDLPQTV D ASPYDLAWQSLHMAAAAACRGSTPKGSGTAVNLVL 60
4-typeI	GMEAKPFKA I D A NVRHMDLPQTV D ASPYDLAWQSLHMAAAAACRGSTPKGSGTAVNLVL 60
	***** ** * ***** .***** .***** * ** * *****
4-typeA	ARNPHGTKSKQKLCSDS A QPHCDAEAS I RGWDGKA T QNGQ V VAEFFNYGCDRKK L GYGRN 120
4-typeD	ARNPHGTKSKQKLCSDSGQPHCDAEAS I RGWDGKA T QNGQ I VAEFFNYGCDRKKWGYGRN 120
4-typeB	ARNPHGTKSK Q LCSDSGQPHCDAEAS I RGWDGKA T QNGQ I VAEFFNYGCDRKKWGYGRN 120
4-typeC	ARNPHGTKSKQKLCSDSGQPHCDAEAS I RGWDGKA T QNGQ I VAEFFNYGCDRKKWGYGRN 120
4-typeE	ARNPHGTKSKQKLCSDSGQPHCDAEAS I RGWDGKA I QNGQ I VAEFFNYGCDRKKWGYGRN 120
act14	ARNPHGTKSKQKLCSDSGQPHCDAEAS I RGWDGKA I QNGQ I VAEFFNYGCDRKKWGYGRN 120
4-typeG	ARNPHGTKSKQKLCSDSGRPHCDAEAS I RGWDGKA T QNGQ I VAEFFNYGCDRKKWGYGRN 120
4-typeF	ARNPHG R KSKQKLCSDSGRPHCDAEAS I RGWDGKA T QNGQ I VAEFFNYGCDRKKWGYGRN 120
4-typeK	ARNPHGTKSKQKLCSDSGRPHCDAEAS I RGWDGKA T QNGQ I VAEFFNYGCDRKKWGYGRN 120
4-typeJ	ARNPHGTKSKQKLCSDSGRPHCDAEAS I RGWDGKA T QNGQ I VAEFFNYGCDRKKWGYGRN 120
4-typeH	ARNPHGTKSKQKLCSDSGRPHCDAEAS I RGWDGKA T QNGQ I VAEFFNYGCDRKKWGYGRN 120
4-typeI	ARNPHGTKSKQKLCSDSGRPHCDAEAS I RGWDGKA T QNGQ I VAEFFNYGCDRKKWGYGRN 120
	***** ** * ***** .***** .***** * ** * *****
4-typeA	EPGA N EDDI LNNDWIKG G YSFCCCRKN 146
4-typeD	EPGAEDDDI LNNDWIKGAYSFC C CRKN 146
4-typeB	EPGAEDDDI LNNDWIKGAYSFC C CRKN 146
4-typeC	EPGAEDDDI LNNDWIKGAYSFC C CRKN 146
4-typeE	EPGAEDDDI LNNDWIKGAYSFC C CRKN 146
act14	EPGAEDDDI LNNDWIKGAYSFC C CRKN 146
4-typeG	EPGAED N DI LNNDWIKG G YSFCCCRKN 146
4-typeF	EPGAEDDDI LNNDWIKGAYSFC C CRKN 146
4-typeK	EPGAEDDDI LNNDWIKGAYSFC C CRKN 146
4-typeJ	EPGAEDDDI LNNDWIKGAYSFC C CRKN 146
4-typeH	EPGAEDDDI LNNDWIKGAYSFC C CRK K 146
4-typeI	EPGAEDDDI LNNDWIKGAYSFC C CRKN 146
	*****:*****.*****:

図 2 各株の幼生で発現している ActL のアミノ酸配列

黄色は、変異が見いだされた配列を示す。矢印は、褐虫藻の獲得傾向に影響があり得るアミノ酸。

る褐虫藻株との関連を調べたところ、19、92 残基目のアミノ酸については、有意ではないものの稚ポリブに獲得される褐虫藻株と ActL のアミノ酸配列の変異に関連があると推定される。

AtTL-2 について

AtTL-2 の抗体は、稚ポリブによる褐虫藻獲得に影響することから、獲得への関与が示唆されている。しかし、誘引活性を測定しても、明確な褐虫藻の誘引は示されておらず、その機能は明確には分かっていなかった。褐虫藻の組織分布を検討すると、サンゴ内の褐虫藻の周辺に存在することから、貪食への関与を検討した。BSA 固定化ビーズと AtTL-2 固定化ビーズを稚ポリブに添加したところ、AtTL-2 固定化ビーズで有意に褐虫藻の獲得がみられた（図 3）。したがって、AtTL-2 は褐虫藻の貪食に関与していると推定される。

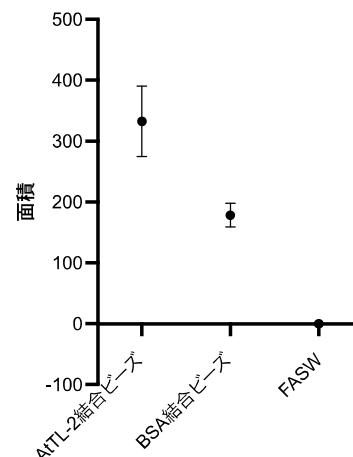


図 3 ビーズの稚ポリブへの獲得への AtTL-2 の影響

Intelectin 様タンパク質について

褐虫藻を獲得した稚ポリブに intelectin siRNA を添加したところ、褐虫藻の増殖が促進された。Intelectin 様タンパク質は、稚ポリブ内での褐虫藻の増殖が抑制されているときに発現していることと考え合わせると、稚ポリブ内での褐虫藻の増殖の制御に拘わると推定される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Takeuchi Ryota, Jimbo Mitsuru, Tanimoto Fumika, Iijima Mariko, Yamashita Hiroshi, Suzuki Go, Harii Saki, Nakano Yoshikatsu, Yasumoto Ko, Watabe Shugo	4. 巻 19
2. 論文標題 N-Acetyl-d-Glucosamine-Binding Lectin in Acropora tenuis Attracts Specific Symbiodiniaceae Cell Culture Strains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 146 ~ 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/md19030146	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 -

1. 著者名 Jimbo Mitsuru, Takeuchi Ryota, Yoshino Mayu	4. 巻 2132
2. 論文標題 A Bioassay for Determining Symbiotic Zooxanthellae Shape Control Using Lectin SLL-2 from the Octocoral <i>Sinularia lochmodes</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 369 ~ 378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0430-4_36	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神保 充
2. 発表標題 褐虫藻AJIS2-C2のプロテオーム解析
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神保 充, 湯山 育子, 山下 洋, 鈴木 豪, 波利井 佐紀, 服田 昌之, 新里 宙也, 天野 春菜, 安元 剛
2. 発表標題 RNAi による <i>A. tenuis</i> レクチン遺伝子の発現抑制と褐虫藻獲得
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第22回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辰野 怜美 , 神保 充 , 天野 春奈 , 安元 剛 , 鈴木 豪 , 山下 洋 , 波利井 佐紀
2. 発表標題 異なるポリブによる選択的な褐虫藻獲得へのレクチンActLの関与
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第22回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神保 充, 神谷 直輝, 湯山 育子, 山下 洋, 鈴木 豪, 波利井 佐紀, 天野 春菜, 安元 剛
2. 発表標題 サンゴのレクチンAtTL-2 は, 褐虫藻の細胞内への貪食に関与している
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mitsuru Jimbo
2. 発表標題 GlcNAc-binding lectin attract and select symbiotic dinoflagellates for a coral Acropora tenuis to acquire them
3. 学会等名 Pacifichem21
4. 発表年 2021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
研究協力者	山下 洋 (Yamashita Hiroshi)		サンゴの採集

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	鈴木 豪 (Suzuki Go)		サンゴの採集
研究協力者	波利井 佐紀 (Harii Saki)		幼生の採集

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関