

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570081

研究課題名(和文) 有孔虫に共生する紅藻の共生維持機構の解明とその進化的意義

研究課題名(英文) Elucidation of the symbiotic mechanism and its evolutionary significance on the red algal symbiont in foraminifer.

研究代表者

横山 亜紀子 (YOKOYAMA AKIKO)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：30466601

研究成果の概要(和文)：

本研究では有孔虫-共生紅藻系に注目し、共生紅藻と宿主有孔虫がどのように共生関係を成立・維持してきたのかを解明する事を目的として実施した。世界各地から有孔虫を採集し、共生紅藻を単離培養して、宿主有孔虫、共生紅藻それぞれの系統解析を行った。系統解析の結果、共生紅藻は単系統で、先行研究で同定されていた種(チノリモ)とは全く別系統(新種)であることが明らかとなった。一方、共生紅藻を維持する宿主有孔虫も、すべて単系統群であったことから、紅藻を共生するという機構は、ペネロプリス科有孔虫の祖先的な位置で獲得されたものであることが明らかとなった。しかし、同所的に生育する別種の有孔虫から採集された共生紅藻は、地理的に遠い同種の有孔虫内の共生藻よりも近縁であることから、宿主有孔虫は進化の過程で何度か共生藻を入れ替えながら、分布を拡大してきた可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

In this study, I focused on a symbiosis between a foraminifers and red algae, and conducted a phylogenetic comparisons among them to clarify the origin and maintenance mechanism of this symbiosis. Formerly, the symbiotic red algae were identified as *Porphyridium purpureum*. From the results of the molecular phylogenetic analysis, however, all red algal symbionts isolated from the foraminifers were monophyletic and different from typical *P. purpureum*, which was identical to symbiont. On the other hands, foraminifers having red algal symbionts were also monophyletic. Those results suggested that the single origin of the symbiosis with red algal symbiont in ancient Peneroplidae foraminifer. However, genetic distances between red algal symbionts collected from different foraminiferan species in the same area were closer than those of the symbionts from same foraminiferan species in the different area. Therefore, the host foraminifers may have extended their distribution ranges and habitats with switching their symbionts in several times.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,000,000 | 600,000   | 2,600,000 |
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2010年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,800,000 | 1,500,000 | 4,940,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：進化, 共生

## 1. 研究開始当初の背景

様々な生物相互作用の中でも“共生”という現象は、時に生物を劇的に変化させ、新たな生物群を生み出す原動力となる。したがって、共生現象の実態を把握し、そのメカニズムを解明することは生物進化の過程を明らかにする上で重要である。

有孔虫と藻類の共生系では、共生体を宿主細胞外へ取り出しても永続的に独立生物として培養できるほか、クレプトクロプラスト段階のものなどが知られている。特に、前者のような共生関係は“パートナーシップ”とも呼ばれ、共生体が宿主の器官へ進化する初期段階と考えられる。したがって、これらの実態の把握や、その成立過程を解明することは、生物多様性の成立・維持機構を理解するための重要な手がかりとなる。

宿主である有孔虫は、分類群ごとにそれぞれパートナーとする共生藻類の種類を限定して持つ傾向にある。共生藻類は、様々な分類群から報告されており、渦鞭毛藻、珪藻、緑藻、紅藻、黄金色藻、ハプト藻、藍藻などが知られている。共生藻が珪藻や渦鞭毛藻の場合は、その宿主の有孔虫分類群との対応関係は比較的ルーズで、複数の宿主分類群に複数の共生藻群が対応する上、同一宿主内に複数の共生種が存在する場合もある (Lee 2006)。特に渦鞭毛藻では、有孔虫に共生する遺伝型をもつものが、別の海産無脊椎動物に共生する場合もある (Gracia-Cuetos et al. 2005)。つまり、渦鞭毛藻や珪藻と有孔虫の共生は、パートナーシップの交替が頻繁に生じる不安定な段階である。一方、共生紅藻を有する有孔虫は、宿主分類群は有孔虫1科に限定され、その共生紅藻も1種のみであるなど、両者の間には非常に厳密な対応関係が存在する (Lee 2000)。しかも、他の共生藻類は、共生膜という一重の膜で囲まれた状態で宿主細胞内に存在しているのに対し、共生紅藻だけは細胞が直接宿主細胞内に存在するという状態で維持される。このため有孔虫-共生紅藻の共生系は、他の共生藻類と有孔虫共生系に比べて、やや進んだ共生段階にあると推測された。したがって、この系での宿主が共生体を認識する機構の解明は、共生に伴う細胞進化過程の初期段階で、特に宿主の器官分化に向かう一歩進んだ段階での共生関係維持のメカニズムを解き明かすことになる

と期待される。

有孔虫共生紅藻は、細胞内微細構造の類似性から *Porphyridium purpureum* (チノリモ) と同定されていた (Lee 1990) が、分子系統学的に同種であるかどうかは確認されていなかった。通常、チノリモは、土壌表面、汽水、海水域からも採集される。しかし、有孔虫内部は、これらの外部環境とは明らかに異なる光や栄養条件下にあり、さらに宿主細胞からの食作用を避けながら増殖しなければならないという制約を受ける。したがって共生藻は、チノリモと祖先が同じであっても、既に遺伝的に分化している可能性がある。そこで、日本国内から有孔虫を採集し、内部共生紅藻を単離し、その培養株を用いて予備的な解析を試みた結果、共生紅藻は、土壌産の自由生活型チノリモとは、塩基配列、塩分濃度に対する増殖特性や、光合成補助色素の吸収特性に変異がある可能性を見出した。しかし、用いた共生紅藻サンプルが少なく、海産の自由生活型チノリモとの形態的あるいは遺伝子レベルでの違いについても不明なままであった。さらに、有孔虫に共生している紅藻は、すべて単一種かどうかについては、調査した有孔虫の獲得地域、個体数が少なく判断し難い状態であった。

一方、有孔虫の系統分類学的研究も十分行われていたとは言いがたかった。紅藻を共生している有孔虫で、その塩基配列情報が取得されていたのは *Peneroplis pertusus* と *Peneroplis* sp., *Dendritina zhenga* で 18SrDNA の塩基配列のみであった。したがって、有孔虫の分類体系において、種や属の分類基準となっている殻の形態が生物の系統を反映した形質であるのか、あるいは紅藻共生型の宿主有孔虫は、単一系統群なのかは判断できない状態であった。それゆえ、共生藻と有孔虫のパートナーシップが、進化の過程でいつ、どのように何回獲得されたのか、あるいは、共生藻が有孔虫の種分化にもなって遺伝的な分化をとげているのかどうか (共進化) などを判断するための情報に欠けている状態であった。

## 2. 研究の目的

本研究では有孔虫に共生する紅藻が、進化の過程でどのように共生を成立させ、維持してきたのかを明らかにするため、次の点を明

らかにすることを目的とした。

#### (1) 共生紅藻の分類学的独立性の解明

有孔虫共生藻は非共生藻のチノリモとは遺伝的に異なり独立した種であるのか、共生藻内の遺伝的な違いを明らかにするため、系統解析を行う。

#### (2) 宿主有孔虫であるペネロプス科有孔虫の系統地理学的研究

各種ペネロプリス科有孔虫の系統的位置と殻形態による分類体系は一致するのか、また生物地理学的な遺伝的分化は見られるのかを明らかにするために、18Sr DNA の系統解析を行う。

#### (3) 有孔虫と共生紅藻の共進化の有無

共生紅藻と宿主有孔虫それぞれの系統解析の結果から両者の進化と生物地理学的な分布について考察する。

### 3. 研究の方法

採集：共生紅藻を保有するペネロプリス科有孔虫は、熱帯-亜熱帯のサンゴ礁に生育する。また地理的な違いを反映させたサンプルを得るため、西太平洋、地中海、紅海、西大西洋、東インド洋のサンゴ礁沿岸で SCUBA やスキューバダイビング、あるいは徒歩採集などにより、海底砂サンプルの採集を行った。

有孔虫単離：採集した底砂サンプルは、現地にて有孔虫を実体顕微鏡（ファール、Nikon）とピンセットを用いて海水中より分離し、滅菌海水をいれたボトルにいれ、生きたまま研究室に持ち帰った。その後、実体顕微鏡下で細いブラシを用いて殻表面のクリーニングを行い、滅菌海水内に戻した。倒立顕微鏡や実体顕微鏡で仮足が形成されている生きた有孔虫のみ取り出し、デジタルカメラで殻形態を撮影した。

共生藻類の培養株確立：クリーニングを行った有孔虫を、ESM 培地（藻類用）をいれたマイクロウェルプレートに移し、滅菌したリナーを用いて殻を破碎し、大きな細胞破片を有孔虫 DNA 抽出用に取り出した。数日間予備培養したのち、共生紅藻類の単細胞をマイクロキャピラリー法で単離し、共生藻クローンの培養株を確立した。

共生藻および非共生藻の系統解析決定：確立した培養株や、比較対象とした非共生性の

単細胞紅藻から DNA を抽出し、ユニバーサルプライマーで PCR 増幅し、18SrDNA の塩基配列を決定した。既知の単細胞紅藻の配列とともに最尤系統樹を構築した。

有孔虫の塩基配列決定：培養株確立のために破碎した有孔虫の破片の一部を 1.5ml のマイクロチューブに移し、殻を研磨破碎し、DNA 抽出した。その後、ペネロプリス科を特異的に増幅するように設計したプライマーを用いて PCR 増幅、18SrDNA の塩基配列を決定し、既知の有孔虫の配列とともに最尤系統樹を構築した。

### 4. 研究成果

本研究では、ペネロプリス科のすべての属を採集することができたほか、緑藻、珪藻、渦鞭毛藻類などを共生している底生有孔虫も採集し、共生藻類の培養、DNA 抽出を試みた。

#### (1) 共生紅藻の分類学的独立性の解明

単離した共生紅藻は、チノリモ綱の非共生性株とともに系統解析した結果、赤色を呈するチノリモは 3 系統群に分かれる事が明らかとなった。このうち、有孔虫共生紅藻は、すべてが単系統群となった。非共生性のチノリモは、世界各地の土壌から海までの様々な生育環境から採集された培養株を用いたが、共生藻のクレードに土壌産の培養株が入る事はなかった。またフィコビルタンパクの色素組成や、塩分濃度に対する増殖特性は、共生藻クレードは他のクレードのものとは異なる事も確認した。さらに、共生藻は地理的に隔離された地域ごとに、単系統となることも明らかとなった。

#### (2) 宿主有孔虫であるペネロプス科有孔虫の系統地理学的研究

宿主有孔虫の系統解析の結果、ペネロプリス科有孔虫は単系統であること、同一種内は、採集した地域（地理的距離）と遺伝的距離とが相関する傾向があることも確認した。さらに、種の識別形質である殻形態は、基本的に系統を反映していた。しかし、ペネロプリス属が偽系統となることも明らかとなった。一方、ペネロプリス科有孔虫全体は大きく 2 系統群に分かれ、旋回軸からのずれという殻形成パターンに注目すると、この形質がそれぞれの系統群を特徴づけるという事もわかっ

た。したがって、今後新しい分類体系の構築の際に、殻形成の進化パターンが有効な形質となる事が示唆された。

### (3) 有孔虫と共生紅藻の共進化の有無

共生紅藻が単系統群となること、また紅藻を共生する宿主有孔虫群が単系統となることから、少なくとも紅藻を共生するという現象はペネロプリス科の祖先的な位置で獲得されたものであることが確認できた。しかし、少なくとも18SrDNAの塩基配列から得られた共生紅藻の遺伝的構造をみると、宿主有孔虫の種ごとに系統群を形成するのではなく、共生藻類が生育していた地域ごとに近縁となる傾向が強い。したがって、有孔虫と共生紅藻の共生関係は、有孔虫の進化や分布拡大の過程で、何度か共生紅藻の入れ替えがおこった可能性があることが示唆された。

## 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4件)

1. Kushibiki A., Yokoyama A., Iwatani M., Yokoyama J., West J., Hara Y. 2012. New unicellular red alga, *Bulboplastis apyrenoidosa* gen. et sp. nov. (Rhodellophyceae, Rhodophyta) from the mangroves of Japan: Phylogenetic and ultrastructural observations. *Phycol. Res.*, in press. 査読あり
  2. Scott J., Yang E. C., West J. A., Yokoyama A., Kim H. J., de Goër S. L., O' Kelly C. J., Orlova R., Kim S. Y., Park J. K. and Yoon H. S. 2011. On the genus *Rhodella*, the emended orders Dixonellales and Rhodellales with a new order Glaucosphaerales (Rhodellophyceae, Rhodophyta). *Algae* 26(4): 277-288. 査読あり
  3. Yang E. C., Scott J., West J. A., Yoon H. S., Yokoyama A., Karsten U., Loiseaux de Goër S. and Orlova E. 2011. *Erythrolobus australicus* sp. nov. (Porphyridiophyceae, Rhodophyta): a description based on several approaches. *Algae* 26(2): 167-180. 査読あり
  4. Yokoyama A., Takahashi F., Kataoka H., Hara Y. and Nozaki H. 2011. Evolutionary analyses of the nuclear-encoded photosynthetic gene *psb0* from tertiary plastid-containing algae in Dinophyta. *J. Phycol.* 47: 407-414. 査読あり
- [学会発表] (計10件)
1. 高橋文雄, 横山亜紀子, 野崎久義 (2011). 三次共生型渦鞭毛藻 *Kryptoperidinium* の色素体についての考察. 日本植物学会第75回大会. 2011年09月18日. 東京大学(東京).
  2. 横山亜紀子 (2011). 有孔虫-紅藻類共生系の成立と維持機構を探る. 日本地球惑星科学連合2011年大会, 2011年05月26日, 幕張メッセ(千葉).
  3. 榎引明日香, 横山亜紀子, 岩滝光儀, 原慶明 (2010). 単細胞性紅藻の未記載種における分子系統解析と核分裂様式. 日本植物学会東北支部第22回宮城大会. 2010年12月18日. 石巻専修大学(宮城).
  4. Akiko Yokoyama (2010). Phylogenetic implication of evolution in the endosymbiosis between the foraminifer and red algae. Memorial Symposium for the 26th International Prize for Biology. Biology of Symbiosis, 2010年12月7-8日, エポカルつくば(茨城).
  5. 横山 亜紀子 (2010). 藻類・プロティストの多様な世界. 日本化学会東北支部地区講演会(招待講演). 2010年11月19日. 山形大学理学部(山形).
  6. Yokoyama A., Fujita K., Yokoyama J., Hara Y. (2009). Did symbiosis make genetic differentiation of red algal symbiont in peneroplid foraminifer? The 9th International Phycological Congress, 2009年8月6日, 国立オリンピック記念青少年総合センター(東京).
  7. 横山亜紀子, 原慶明 (2009). 有孔虫に共生する *Porphyridium* 属藻類の系統分類学的研究, 日本藻類学会第33回大会, 2009年3月28日, 琉球大学(沖縄).
  8. 横山亜紀子 (2009). *Peneroplis* 属有孔虫に共生する紅藻の系統分類学的研究. MRC研究発表会, 2009年3月4日, 国立科学博物館新宿分館(東京).

9. 平原知香, 下永高弘, 藤原祥子, 藤田直子, 横山亜紀子, 原慶明, 中村保典, 都筑幹夫(2008). 原始紅藻の*Porphyridium*における貯蔵多糖の構造とその結合性合成酵素の性質. 日本植物学会第72回大会. 2008年9月26日, 高知大学 (高知).
10. Yokoyama A., Fujita K. and Hara Y. (2008). Phylogeny and taxonomy of an endosymbiotic alga in Foraminifera, *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta). Vth Asian Pacific Phycological Forum. 2008年11月11日, Wellington (New Zealand) .

[図書] (計1件)

横山亜紀子, 単細胞紅藻, エヌ・ティー・エス出版, 藻類ハンドブック, 渡辺信監修 (in press) .

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横山 亜紀子 (YOKOYAMA AKIKO)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：30466601