

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22580228

研究課題名（和文） サンゴと褐虫藻の共生成立に関わる分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of establishment of symbiosis between corals and zooxanthellae

研究代表者

神保 充（JIMBO MITSURU）

北里大学・海洋生命科学部・准教授

研究者番号：10291650

研究成果の概要（和文）：

サンゴより褐虫藻の獲得に関わるレクチンを探索した。シゲミカタトサカのレクチンは、褐虫藻の形態を変化させる。これは、褐虫藻表面の糖脂質に結合して引き起こされると示唆される。また、トゲクサビライシレクチンは、共生可能な褐虫藻の誘引を行うことがわかった。一方、ウスエダミドリイシレクチンは、褐虫藻の取込みに関与していることがわかった。これらより、サンゴによる褐虫藻取込み機構は少なくとも 2 段階で引き起こされることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

We searched coral lectins involved in the acquisition of *Symbiodinium*. A lectin SLL-2 purified from *Sinularia lochmodes* transform *Symbiodinium* to the coccoid form which is similar to symbiotic form of them. This resulted from binding of SLL-2 to the Forssman like glycosphingolipid on the surface of *Symbiodinium*. A lectin from *Ctenactis echinata* attracted *Symbiodinium* which can symbiose with the coral. The lectin from *Acropora tenuis* involved in the acquisition of *Symbiodinium*. These indicated that The acquisition mechanism of *Symbiodinium* by corals has at least two steps, attraction and acquisition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：サンゴ、レクチン、共生、糖鎖、褐虫藻

## 1. 研究開始当初の背景

サンゴ礁は、サンゴが支える豊かな生態系である。近年、環境変動や人為的なストレスによりサンゴが白化しつつあり、この状態が長く続くとサンゴが死んでしまうため、この問題はサンゴ礁生態系の維持にとって重要な問

題である。白化は共生機構の破綻により引き起こされると考えられることから、共生機構の解明は白化の予測や対策を考える上で重要である。その分子機構は不明な部分が多いものの、いくつかのサンゴにおいてレクチンが重要な役割を持っていることが報告されつつ

ある。八放サンゴ *Sinularia lochmodes* では、レクチンが共生している褐虫藻の周辺に分布しており、レクチンが褐虫藻の形態維持に関与すると示唆される。また、いくつかのサンゴレクチンでは共生している褐虫藻周辺に分布していた。サンゴの幼生は運動能力が弱いので、共生成立には褐虫藻の誘引・獲得・維持の三段階が必要だと推定される。いままでの知見により、褐虫藻の獲得・維持については糖結合タンパク質であるレクチンの関与が示唆される。

## 2. 研究の目的

サンゴと褐虫藻の共生は褐虫藻の誘引・獲得・維持の3段階から構成されるという仮説に則り、これらの段階に関わる因子をそれぞれ精製し、それらの因子の各段階での役割を明確に証明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

**レクチンの精製** 各サンゴから粗抽出液を抽出し、その抽出液を糖結合 Sepharose 6B で精製した。溶出は、各糖を用いた。その後、透析により糖を除いた後、性状解析や配列分析に用いた。

**糖結合性の検討** 蛍光標識したレクチンに、糖を加え、蛍光偏光消法を用いて、分子の相対サイズを検討した。

**サンゴ幼生を用いた実験** サンゴの一斉産卵の際に受精させて、プラヌラ幼生を採集した。稚ポリプは、ヒドラ神経ペプチド Hym-248 を用いて変態させて作成した後、各種褐虫藻獲得実験を行った。

**誘引活性測定** 試料をキャピラリに入れた後、100,000 細胞の褐虫藻に入れた。1 時間放置後、キャピラリに入った褐虫藻数を計数した。

## 4. 研究成果

(1) すでに、八放サンゴ *Sinularia lochmodes* レクチンが褐虫藻株 CS-156 を、増殖に影響せずに共生状態と同様の形態にすることを明らかにしている。この作用がどのように起っているのか検討した。まず、褐虫藻をグリコシダーゼミックスで消化すると形態変化が抑制された。一方、糖タンパク質糖鎖を消化するグリコペプチダーゼ F を用いた場合、SLL-2 による形態変化への影響は少

なかった。したがって、褐虫藻の形態変化には褐虫藻表面の糖鎖が重要であることが示唆される。細胞の糖鎖は様々な構造を持っており、それを網羅的に解析することは非常に困難である。そこで、SLL-2 に結合する糖鎖を網羅的に検討した。その結果、フォルスマン抗原に特に強い結合性を示すことがわかった。フォルスマン抗原はヒツジ赤血球の抗原として見いだされたが、近年では様々な組織からこの抗原が見いだされ、未分化細胞のマーカーのひとつである。そこで、この糖鎖と SLL-2 の結合の詳細を、長さの異なるフォルスマン抗原誘導体を合成して検討した。その結果、 $\alpha$ -GalNAc 単独で十分な結合力を示したものの、フォルスマン抗原の長さが長くなるにつれて結合力が強くなった。SLL-2 に対する結合が強くなるに従って、褐虫藻への影響は少なくなった。褐虫藻の中性糖脂質は、フォルスマン抗体と反応したことから、SLL-2 の褐虫藻表面のリガンド候補として、フォルスマン抗原類似の糖鎖が形態変化の引き金になっていると推定された。そこで、フォルスマン抗原に結合することができるドリコスマメレクチン (DBA)、*Helix pomatia* レクチン (HPA) や抗フォルスマン抗体について、褐虫藻への影響を検討した (図 1)。その結果、*Helix pomatia* レクチン (HPA) や抗フォルスマン抗体により褐虫藻の形態変化が見られる一方、ドリコスマメレクチンでは、全く影響が見られなかった。また、SLL-2 と HPA では増殖に影響は見られなかったが、抗フォルスマン抗体では増殖が抑制された。SLL-2 が強く結合する褐虫藻では、増殖が阻害されることから、褐虫藻の維持にはレクチンの適度な結合が重要だと推定される。

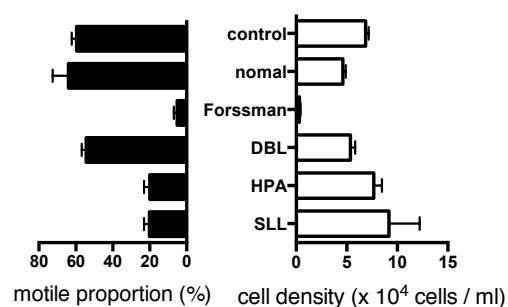


図 1 フォルスマン抗原結合タンパク質による褐虫藻の影響。右) 褐虫藻の形態, 左) 細胞増殖

(2) トゲクサビライシ *Ctenactis echinata* レクチン CecL は、ガラクトース結合性である。Fungia sp. より単離された褐虫藻株 FKM0207 株の形状を共生時と同じ球状に変化させることから、SLL-2 と同様の作用を持つ

と思われていた。しかし、その分布は細胞間が主であり、褐虫藻の維持に関与しないと推定される。近年、トゲクサビライシからも褐虫藻株 FeAK D4y が得られた。この株は、共生が成立することが観察された。さらに興味深いことに、この褐虫藻では稚ポリプの周辺に密集することが観察された。したがって、サンゴが何らかの誘引成分を放出していると推定される。そこで、サンゴが実際に褐虫藻を誘引するか検討した。まず、粗抽出液をキャピラリーに入れ、褐虫藻の誘引を定量できるか検討した。その結果、FeAK D4y を用いた場合、濃度依存的に褐虫藻の誘引を引き起こすことがわかった。この成分は透析内液に残ること、煮沸により失活することから、タンパク質成分だとわかった。そこで、粗抽出液を分画して誘引活性を含む成分を検討した。ガラクトース-Sepharose 6B を用いたアフィニティ精製により分画した結果、費吸着画分には誘引活性はみられず、吸着画分に全体の 80%の活性が回収された。精製 CecL の誘引活性は、CecL 結合糖であるガラクトースで阻害されたが、結合しないグルコースでは阻害されなかった。また、この活性は抗 CecL 抗体により阻害された。同様な結果は粗抽出液を用いても得られたことから、粗抽出液に含まれる誘引活性は主にレクチン CecL によると考えられる (図 2)。このレクチンは親個体から放出されること、幼生の褐虫藻獲得開始時から発現がみられることから、CecL が褐虫藻の誘引に関与していることが支持される。

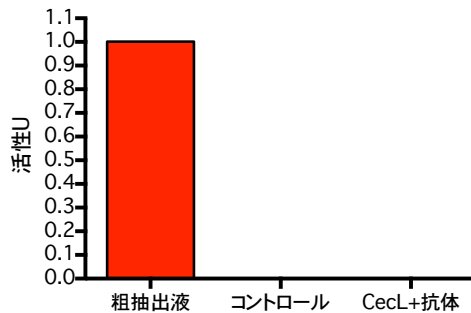


図 2 誘引活性の抗レクチン抗体による阻害

CecL をリジルエンドペプチダーゼを用いて消化し、HPLC により分画したペプチドの内部アミノ酸配列を決定した。その結果、CecL はインテレクチンに類似の配列がみられた。また、アザミサンゴ *Galaxea fascicularis* の卵タンパク質のひとつ GdEP-4 と類似性がみられた。これらは異物認識に関わるレクチンであることから、もともと生体防御に用いられていた分子が褐虫藻によりサンゴへの走化性に用いられる様

になった可能性がある。

(3) サンゴの場合、産卵は年に 1 回しかないため、できるだけ幼生を維持できることが好ましい。ウスエダミドリイシはプラヌラ幼生の状態で 1 ヶ月以上飼育することが可能である。さらに、稚ポリプに変態させることも可能であることから、サンゴによる褐虫藻取込み因子の研究に適した生物である。このサンゴでは、共生が可能な褐虫藻株が報告されており、共生系解明に適した生物である。我々は、*Acropora tenuis* に褐虫藻株 NBRC102920 が取り込まれることを観察した。そこで、この組み合わせを用いて、サンゴによる褐虫藻の取込み因子の探索を行うこととした。現在までの研究によりレクチンが褐虫藻取込みや維持に関与することが示唆されたので、様々な糖を用いて褐虫藻の取込みへの影響を検討した。その結果、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、*N*-アセチルノイラミン酸 (NANA) および *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) により取込みが阻害された (図 3)。

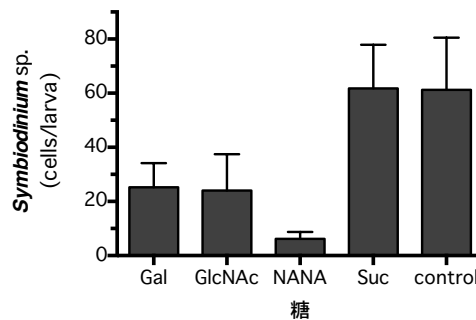


図 3 糖による褐虫藻獲得の阻害

そこで、これらに結合性を示すレクチンの探索を行った。NANA アフィニティークロマトグラフィでは、レクチンを精製できなかったものの GlcNAc-Sepharose 6B によりレクチン ActL が精製できた。ゲル内消化及び質量分析計を用いた *de novo* 配列分析により、一部のアミノ酸配列を決定した。その結果、コビミドリイシに含まれる推定タンパク質と類似していることがわかった。このレクチンは、褐虫藻の取込みを阻害する GlcNAc および NANA に親和性を持っていた。また、抗 ActL 抗体は、サンゴによる褐虫藻の取込みを阻害することから、その取込みに関与することが示唆される。興味深いことに、稚ポリプに取り込まれやすい褐虫藻株にはより ActL が結合することがわかった。この結果は、褐虫藻の選択にこのレクチンが関与することが示唆される。抗 ActL 抗体を用いた免疫組織化学染色により、このレクチンが刺胞内部にのみ分布することがわかった。刺胞は、捕食に関与すると報告されているが、場合によ

では、被食者がいない場合でも放出されることから、刺胞が散発的に放出されて ActL が体外に放出され、褐虫藻を誘引している可能性がある。

一方、*A. tenuis* にも SLL-2 の相同タンパク質が存在するか検討した。コユビミドリシゲノムには SLL-2 類似タンパク質が存在していることがわかった。また、稚ポリプによる褐虫藻の取込みは抗 SLL-2 抗体により阻害された。さらに興味深いことに、SLL-2 に結合性を示すフォルスマン関連糖によってもポリプへの取込みが阻害された。以上の結果は、ウスエダミドリシにも SLL-2 の相同タンパク質が存在しており、褐虫藻の取込みに関与していることが推測される。

(4) 今回の研究により、いくつかのサンゴから共生に関わるレクチンを精製し、その機能について明らかにすることができた。ひとつは、共生の誘引に関与する因子、ひとつは共生の維持に関与する因子であった。これは、褐虫藻の獲得の段階が少なくとも2段階あることを示している。現在までに外因性因子を用いてレクチンの関与を示唆する結果は得られていたが、サンゴ自体の成分が褐虫藻獲得に関与することを見いだしたのは今回の研究が初めてである。現状では、褐虫藻の選択は、宿主に取り込まれた後に起ると考えられているが、今回の結果は、取込みの際にも褐虫藻株の選択が起っていることを示唆している。この結果は、ウスエダミドリシを用いた結果のみであるため、この現象が様々なサンゴでも当てはまるのかは非常に興味深い問題である。近年、コユビミドリシのゲノムが明らかになり、サンゴの生化学的研究に有用な情報がそろってきた。また、プロテオームや RNAseq のような網羅的解析を行うことを敷居が低くなりつつある。ウスエダミドリシおよびコユビミドリシは近縁であり、相同タンパク質も同定しやすいことから、両者の情報を元にすれば、より詳細な共生機構の解明を行うことができると考えられる。これらの情報を基盤としてサンゴ-褐虫藻共生系について、より詳細な機構の解明に繋がると思われる。

#### 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 2 件)

①Tanaka, H., Takeuchi, R., Jimbo, M., Kuniya, N., and Takahashi, T. (2013) Synthesis and biological evaluation of the forssman antigen pentasaccharide and derivatives by a one-pot glycosylation procedure. *Chemistry* **19**,

3177-3187. DOI:10.1002/chem.201203865

②Jimbo, M., Suda, Y., Koike, K., Nakamura-Tsuruta, S., Kominami, J., Kamei, M., Hirabayashi, J., Sakai, R., and Kamiya, H. (2013) Possible involvement of glycolipids in lectin-mediated cellular transformation of symbiotic microalgae in corals. *J Exp Mar Biol Ecol* **439**, DOI:129-135. 10.1016/j.jembe.2012.10.022

〔学会発表〕(計 7 件)

① M. Jimbo, H. Tanimoto, M. Yoshitake, H. Yamashita, K. Koike, Involvement of a lectin to the Acquisition of Symbiotic Dinoflagellates by a Coral. International Lectin Conference Interlec24. 2011.7.29. Brisbane Australia.

② 國谷奈美, 神保 充, 大島泰克, 渡部終五. Acropora tenuis の SLL-2 様タンパク質の精製. 平成 25 年度日本水産学会春季大会 2013.3.27. 東京海洋大学

③ 神保 充, 武内 良太, 田中浩士, 高橋孝志, 村本光二, 渡部終五 サンゴレクチン SLL-2 の自己会合 平成 25 年度日本水産学会春季大会 2013.3.27. 東京海洋大学

④ 竹内亮太, 吉武美乃里, 谷本典加, 神保 充, 安元剛, 渡部終五 平成 25 年度日本水産学会春季大会 2013.3.27. 東京海洋大学

⑤ 神保 充, 國谷奈美, 竹内亮太, 田中浩士, 高橋孝志 褐虫藻表面に存在するサンゴレクチンリガンドの探索 平成 24 年度日本水産学会秋季大会 2012.9.14 水産大学校

⑥ 國谷奈美, 武内良太, 田中浩士, 高橋孝志, 神保 充 SLL-2 様タンパク質がサンゴの褐虫藻取り込みに関与する 平成 24 年度日本水産学会秋季大会 2012.9.14 水産大学校

⑦ 田中浩士, 武内良太, 神保 充, 高橋孝志 サンゴレクチン結合性フォルスマン抗原 5 糖類縁体の迅速合成とその機能評価 日本糖質学会 2012.8.31 鹿児島市民文化ホール

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

神保 充 (JIMBO MITSURU)

北里大学・海洋生命科学部・准教授

研究者番号: 10291650

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし