

令和 5 年 7 月 10 日現在

機関番号：99999

研究種目：奨励研究

研究期間：2022～2022

課題番号：22H04195

研究課題名 高校生物における個体群間の共生に関する探求的教材の開発 - 分子レベルからアプローチ

## 研究代表者

熊谷 あすか (KUMAGAI, ASUKA)

東海大学付属相模高等学校・高校教諭

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 440,000円

研究成果の概要：「個体群間における共生関係」に関し、高校生物における探求型の授業構築を目指した。本研究では、タコクラゲとそれに共生する渦鞭毛藻に着目し、宿主に別の生物が共生していることを分子レベルからアプローチするような教材開発を行なった。採集・提供頂いた鹿児島県、高知県、石川県（能登）で採集されたタコクラゲに共生している藻類の分類を確実に行う方法の開発、および基礎データの収集を行なうと共に、探求型の実験・観察に基づいた授業の構築を考案した。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、タコクラゲに共生している渦鞭毛藻類Symbiodiniumの仲間を確実に分類する方法として、宿主にはなく共生藻のみに見られる葉緑体に関連する遺伝子（cp23SドメインV領域）を用いた分子分類の実験系を確立させた。これにより、鹿児島で採集されたタコクラゲの共生藻はクレードB（*Breviolum* sp.）、高知と石川のものはクレードC（*Cladocopium* sp.）に分類されることが示唆された。その他、タコクラゲおよび、鹿児島由来の共生藻を単離・培養したクローン株の18SrDNAを併せて基礎データとし、これらを用いた探求型授業を考案した。

研究分野：生物教育

キーワード：高校生物 教材開発 共生 クラゲ 渦鞭毛藻類 理科教育

## 1. 研究の目的

昨年度、採択されたテーマに引き続き「個体群間における共生関係」に関する、高校生物における探求型教材の開発を目的とした。本研究では、タコクラゲとそれに共生する渦鞭毛藻に着目し、宿主に別の生物が共生していることを分子レベルからアプローチするような探求型の授業構築を目指した。昨年度は、それに関する基礎データを得るため、提供頂いた高知県、鹿児島県、石川県で採集されたタコクラゲを用いリボソームに関連する遺伝子である 18SrDNA 領域における共生藻の分類を試みた。その結果、高知で採集されたクラゲに共生する藻類は渦鞭毛藻の *Symbiodinium* の仲間であることが分かった。一方、分子分類を行なう際に目的とする遺伝子領域が真核生物に共通の領域であったため、高知以外の産地のものは宿主と共生藻類とのコンタミにより共生藻類の同定が困難をきたし、今後の課題となった。こういったことを踏まえ、本年度は以下の目的で研究を行なった。

- (1) 共生藻の分類を確実にを行う方法の開発、および基礎データの収集
- (2) 探求型の実験・観察に基づいた授業の構築

## 2. 研究成果

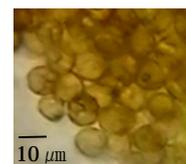
- (1) 共生藻の分類を確実にを行う方法の開発、および基礎データの収集

### 遺伝子領域の検討

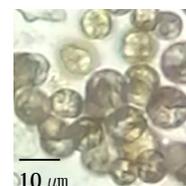
共生藻を分類するための遺伝子として、従来の真核生物共通の遺伝子領域ではなく“共生藻のみ”に特化した遺伝子領域を検討するため、本研究では、宿主には存在せず、共生藻のみが保有するオルガネラに着目した。一方、昨年度の結果において、高知で採集されたタコクラゲに共生していたのは、渦鞭毛藻類の *Symbiodinium* の仲間であったが、近年、これらの仲間は多様性があるため、それを科とみなし分子系統学的に A~I の 9 つの主要クレードに分け、それらクレードに属名を与えることが提案されている (LaJeunesse et al., 2018)。そこで、本研究では、リボソームに関連する遺伝子より進化速度が速く、このクレード間の解析に最適とされている遺伝子の 1 つであり、さらに、共生藻のみが保有するオルガネラである“葉緑体”に関連する「cp23S ドメイン V 領域 (cp23S-DomainV)」を用いた解析を試みた。

### 遺伝子解析の方法

鹿児島で採集されたタコクラゲが保有する共生藻の遺伝子解析は、2021 年 8 月に単離され、培養に成功したクローン株 1 種を用いてダイレクト PCR を行なった。倒立型顕微鏡 (OLYMPUS CK2) 下で、滅菌されたスライドガラス上で滅菌済みのマイクロピペットを用い、フィルターろ過による滅菌した PBS で数回洗浄した数十~数百個体をテンプレート DNA とした。また、それ以外にも PBS で固定し冷凍したタコクラゲ 2 個体をそれぞれ倒立型顕微鏡下にて両刃のカミソリにて切断して数十~数百個体の共生藻類を取り出し、同様に洗浄したものをを用いてダイレクト PCR を行なった。また、高知で採集されたもの 3 サンプル、石川県 (能登) で採集されたもの 2 サンプルも上記と同様に共生藻を数十~数百個体を単離・洗浄し、ダイレクト PCR により約 600bp の cp23-ドメイン V 領域の増幅を行なった。PCR には、ポータブルサーマルサイクラー



鹿児島由来



高知由来



石川由来

図 1. 共生藻

(Portal C、アズワン)を用い、塩基配列の解析はユーロフィンに依頼した。そのデータを用い、BLASTによる相同性検索を行なった。さらに、他の種も併せてMEGAのClustal Wによるアライメントを行なった後、NJ法、ML法、MP法による分子系統樹の作成を行なった。

### 遺伝子解析の結果

鹿児島で採集されたタコクラゲの共生藻は、どれも約9~10 μmの球状で濃い黄褐色をしていた(図1)。相同性検索の結果、単離培養したクローン株1種とタコクラゲの冷凍サンプル2個体に由来する合計3種類の共生藻の全て、渦鞭毛藻 *Symbiodinium* のクレードB (*Breviolum*) のものと相同性が高かった。また、構築した3種の分子系統樹においても同様にクレードBに分類されたことから、鹿児島で採集されたタコクラゲに共生していた藻類は、*Breviolum* sp. と示唆される(図2)。この仲間は、高緯度の沿岸生息地の宿主や、熱帯の広い水深範囲に生息するイソギンチャクやサンゴなどの刺胞動物にしばしば見られるものであった。一方、高知と石川(能登)で採集されたタコクラゲの共生藻は、どちらも鹿児島のものとはやや異なり、色が薄い黄褐色の約9~10 μmの球状のものであった(図1)。これら相同性検索の結果、高知由来のタコクラゲの冷凍サンプルの3個体にそれぞれ由来する3種の共生藻、および、石川(能登)由来の冷凍サンプルの2個体にそれぞれ由来する2種の共生藻の全てが、渦鞭毛藻 *Symbiodinium* のクレードC (*Cladocopium*) のものと相同性が高かった。また、構築した3種の分子系統樹からも同様に全てクレードCに分類されたことから、高知と石川(能登)で採集されたタコクラゲに共生していた藻類は、*Cladocopium* sp. と示唆される(図2)。この仲間は幅広く分布しており、パラオのタコクラゲ、サンゴや貝類、繊毛虫など、他の刺胞動物を含む多様な宿主に見られるものであった。また、共生藻を保有するサカサクラゲの仲間においても、共生藻の種類がクレードAとクレードCと、2つのクレードに確認される事例もあった。

### (2) 探求型の実験・観察に基づいた授業の構築

先に述べた基礎データ他、タコクラゲおよび鹿児島由来の単離培養された共生藻における18S rDNAの塩基配列解析データを用いた探求型の授業を考案した。始めに、タコクラゲを実際に観察することで別の生物が共生していることを実感させ、目的意識を持って分子レベルからアプローチした探求活動を行なう。その際、葉緑体に関連する遺伝子を用いるため、葉緑体は独自のDNAを持つことがより意識づけされると期待される。

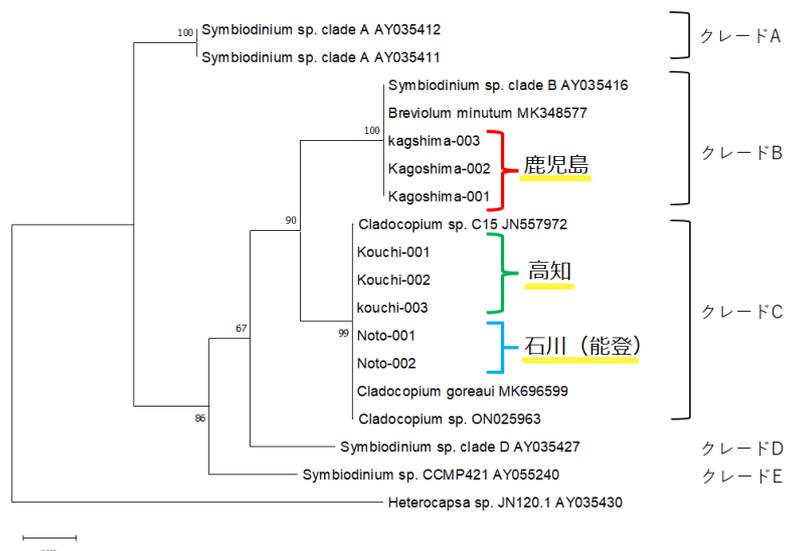


図2 . 渦鞭毛藻 *Symbiodinium* に関する分子系統樹 (ML法)

<参考文献> LaJeunesse TC, Parkinson JE, Gabrielson PW et al. Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. *Curr Biol* 2018; 28: 2570-80 e6.

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
真山 茂樹	(MAYAMA SHIGEKI)
三宅 裕志	(MIYAKE HIROSHI)
湯浅 智子	(YUASA TOMOKO)