

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570071

研究課題名(和文) 褐虫藻とサンゴの細胞共生の成立・維持・破綻に関する微細形態学的研究

研究課題名(英文) Ultrastructural studies on the establishment, maintenance and breakdown of a coral-zooxanthella symbiotic system

研究代表者

奥田 一雄 (OKUDA, Kazuo)

高知大学・教育研究部総合科学系・教授

研究者番号：40152417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：サンゴ-褐虫藻の共生系の成立、維持、破綻における微細構造を明らかにした。細胞の膜系を明瞭に観察できる適切な化学固定法および凍結固定法を開発した。共生系の破綻は短時間の高水温処理で誘導され、胃層組織中の褐虫藻を含まないサンゴ細胞がまず自己消化し、それに続いて褐虫藻を含むサンゴ細胞が胃層から脱落した。加圧凍結法および凍結切断法により、サンゴ細胞内で共生膜に包まれた褐虫藻の表層周辺構造と分裂前後の形態変化を明らかにし、褐虫藻の娘細胞のサンゴ細胞への分配により共生系を維持する機構の存在を示した。発生初期のサンゴは自由遊泳する褐虫藻をポリプの胃腔へ誘引し、胃層細胞内に取り込むことで共生系が成立した。

研究成果の概要(英文)：Fine structure during the establishment, maintenance and breakdown of a coral-zooxanthella symbiotic system was examined. Suitable chemical and freeze fixation methods were applied for observing various cellular membranes clearly. When corals were treated with high temperatures, gastroderm cells without zooxanthellae autolyzed first, followed by the disconnection of cells with zooxanthellae away from gastroderm, so that the symbiotic system was broken down. Zooxanthellae in coral cells were found to have several distinct layers on the cortex. After cell divisions of zooxanthellae, symbiosome membranes and these layers were cleaved by constriction into two parts and enveloped the daughter cells. This process may ensure to distribute zooxanthellae into coral cells for the maintenance of the symbiotic system. Free-living zooxanthellae were attracted inward the gastric cavities of polyps in early developing corals and incorporated into gastroderm cells to establish the symbiotic systems.

研究分野：植物形態学

キーワード：サンゴ 褐虫藻 細胞共生 微細構造

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 健康な造礁サンゴには、体内に褐虫藻と呼ばれる渦鞭毛藻類 (*Symbiodinium* sp.) が共生する。褐虫藻が光合成し、サンゴはその栄養の一部を得て生存する。褐虫藻がサンゴ体内から失われると、サンゴは白化して死ぬ (共生の破綻)。一方、サンゴは海洋中から褐虫藻を体内に獲得することができる (共生の成立)。また、健康なサンゴは成長する。サンゴの成長は細胞分裂によるが、サンゴ-褐虫藻共生系を維持するためには、褐虫藻がサンゴ細胞の分裂前または分裂時に同調的に分裂し、サンゴの娘細胞へきっちりと分配されることが必要である (共生の維持)。

(2) サンゴの白化現象が顕在となり、沿岸生態系が劣化する大きな問題となっている。日本および国際サンゴ礁学会はこの問題に取り組み、サンゴ群集の生態学的・生物地理学的研究、環境ストレスがサンゴに及ぼす生理学的・生化学的な研究、褐虫藻の分子系統学的研究など多くの研究がなされている。しかし、驚いたことに、細胞・組織レベルの形態学的研究がほとんどない。これは、サンゴ研究者に形態学・細胞生物学の専門家が少ないことと、サンゴの組織・細胞を観察するための適切な試料作製技術が確立されていないからである。例えば、褐虫藻がサンゴ細胞内に確実に入っているか、または、サンゴ組織の細胞間隙に存在しているのかという基本的な問題でさえ未解決のままである。

(3) 渦鞭毛藻の細胞外被は外側から原形質膜、アンフィエスマ小胞、微小管の順に構成される。申請者らは沿岸で遊走細胞相と不動細胞相が交代する種を用い、以下のことを明らかにしてきた。遊走細胞が不動細胞化するとき、遊走細胞の原形質膜とアンフィエスマ小胞は崩壊して脱ぎ捨てられ (ecdysis)、アンフィエスマ小胞の内膜が融合して出来た新たな膜が不動細胞の原形質膜になり、それと同時に不動細胞の原形質膜外にペリクルという別の細胞外被層が発達する。不動細胞の原形質は無性生殖的に分裂し、それぞれの娘細胞が原形質膜直下に新たなアンフィエスマ小胞を発達させ、ペリクル層を破って新しい遊走細胞が泳ぎ出る。

(4) サンゴは遊走細胞相の褐虫藻をポリプの口から取り込み、胃層細胞内にその褐虫藻を不動細胞相の形態で共生させる。共生が成立する時、遊走細胞は胃層細胞の原形質膜表面から直接ファゴサイトシスされてサンゴ細胞の食胞内で不動細胞化するか、または、まず胃層細胞の表面で遊走細胞の細胞外被の ecdysis が起こり、その後で不動細胞が食胞に取り込まれ、細胞外被構造が変化すると予測される。そこでサンゴ関連の文献を調べたが、褐虫藻がサンゴ細胞内へ入る過程を細胞レベルで明らかにした研究はほとんどなく、食胞内の不動細胞相のペリクルの有無も明らかにされていない。また、褐虫藻とサンゴとの共生関係を壊す環境変化や褐虫藻への生理的影響に関する研究は多数なされているが、そのような脱共生が起こる条件でサンゴ細胞内から褐虫藻がどのように離脱するのかは形態学的に明らかにされていない。

(5) 造礁サンゴは重要な一次生産者であり、沿岸生態系と生物多様性を支えている。サンゴに共生する褐虫藻は、サンゴ体内には高密度に存在するが、海洋中におけるその遊走細胞は極めて少ない。そのような遊走細胞のほとんどは休眠シスト (不動細胞相) に変異して沿岸の砂地の中に埋まっており、休眠から目覚めてシストから泳ぎ出てくる遊走細胞がサンゴを含む種々の刺胞動物などと共生する褐虫藻の供給源になっていると考えられている。これらの観点を加えて褐虫藻の生活史と生態を考えると、サンゴとの共生を介しての遊走細胞相と不動細胞相の交代および外界における遊走細胞相と不動細胞相の交代が見えてくる。褐虫藻の生活史に含まれる褐虫藻とサンゴとの共生の成立、維持、破綻の過程を追跡・解明することで、褐虫藻の細胞構造の変化とそのメカニズムがダイナミックな沿岸生態系に果たしている役割と重要性を理解することに繋がる。

## 2. 研究の目的

(1) サンゴは体内に褐虫藻を共生させている。多くのサンゴは、幼生段階で外界から褐虫藻を取り込んで共生を始めるが、一方で、環境負荷が原因となり、体内から外界へ褐虫藻を排出して脱共生する。しかし、

サンゴからまたはサンゴへの褐虫藻の出入りおよびサンゴ内での褐虫藻の分裂に関する微細形態学的知見は極めて限られている。本研究では、サンゴ-褐虫藻の共生が維持されているときの双方の細胞分裂および共生が破綻するときの双方の細胞構造の変化と挙動を、急速凍結置換固定・超薄切片法およびフリーズフラクチャー法によって電子顕微鏡で明らかにする。

(2) サンゴ-褐虫藻細胞の微細構造を適切に保存する固定法を確立させる。サンゴ細胞同士の境界(原形質膜)を明確に区別し、褐虫藻がサンゴに共生する部位を確定する。サンゴ細胞内に存在する褐虫藻の表層微細構造(膜系と細胞外被)を明らかにする。サンゴから褐虫藻を分離して単藻培養し、その遊走細胞と不動細胞の表層微細構造を比較する。サンゴ細胞内で褐虫藻が分裂する過程を明らかにし、細胞分裂しているサンゴの娘細胞への褐虫藻の分配様式を明らかにする。サンゴの再生組織を誘導した培養系を用い、温度や光等のストレス条件下におけるサンゴと褐虫藻の細胞微細構造の変化を調べ、白化に至る細胞・組織の挙動を明らかにする。褐虫藻が水平伝搬するサンゴを用い、遊走細胞がサンゴ細胞内へ共生を成立させる過程を可能な限り明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 褐虫藻を垂直伝搬するハナヤサイサンゴ(*Pocillopora damicornis*)と水平伝搬するクシハダミドリイシ(*Acropora hyacinthus*)を高知県土佐湾沿岸で採集し、研究室の実験水槽で飼育した。実験試料を継続的に供給するため、サンゴの枝の断片から再生組織を誘導した。

(2) サンゴ組織と褐虫藻の微細構造、特に膜系を明瞭に観察するために、種々の化学固定法を試行した。併せて生細胞を加圧凍結固定して凍結置換する方法と凍結割断法のための最適条件を設定した。サンゴと褐虫藻の共生状態と細胞分裂の微細構造を明らかにするため、化学固定および凍結固定したサンゴ組織を脱水後に樹脂に包埋し、ウルトラマイクロトームで超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡で観察した。

(3) サンゴから褐虫藻が離脱する過程を明

らかにするため、飼育サンゴを高温条件に移し、経時的に固定した試料を電顕観察した。また、サンゴの再生組織を用い、褐虫藻の増殖に及ぼす単色光と光エネルギーの影響を調べた。

(4) 夏期に高知県大月町の黒潮生物実験所へ赴き、サンゴ受精卵の発生胚が褐虫藻と共生させるタイミングを捉え、その試料を電顕観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) サンゴ-褐虫藻共生系の維持

過マンガン酸カリウム固定法により、褐虫藻がサンゴの胃層細胞内のみ限定して共生することが明らかになった。急速凍結置換固定では、共生褐虫藻は原形質膜の内側に微小管で裏打ちされた扁平な小胞(アンフィエスマ小胞)が分布する渦鞭毛藻類特有の細胞外被をもつが、原形質膜の外側には、褐虫藻細胞を取り囲む連続する2枚の膜様構造(外側から膜様構造1, 膜様構造2)が存在し、それら膜様構造1と2の間に膜断片の積層構造が部分的に観察された。さらに、膜様構造1はサンゴの食胞膜由来と考えられる生体膜(共生膜)であるのに対し、膜様構造2は生体膜ではないことがフリーズフラクチャー法によって明らかになった。サンゴ細胞内で褐虫藻が細胞分裂するとき、褐虫藻の細胞質分裂が完了後、膜様構造2が細胞質分裂面に向かって貫入してそれぞれの娘細胞を取り囲んだ。その後、膜様構造1が分裂面に向かって貫入し始め、最終的に、膜様構造1および2に囲まれた2つの娘細胞が1つのサンゴ細胞の中に存在した。褐虫藻を取り囲む2枚の膜様構造が狭窄・分離することが共生褐虫藻の細胞分裂に特有の現象であり、このメカニズムが褐虫藻のサンゴ細胞への分配を保証し、サンゴ-褐虫藻共生系を維持することが判明した。

#### (2) サンゴ-褐虫藻共生系の破綻

高水温処理によるサンゴ組織の微細構造変化には2つの様式があった。1つはサンゴ外側の皮層組織(褐虫藻と共生しないサンゴ組織)の空胞化に続いて内側の胃層組織(褐虫藻と共生するサンゴ組織)が崩壊する様式であり、高水温処理後数時間で、まず皮層細胞に液胞が出現した。液胞は皮層細胞のほとんどの体積を占めるほどに拡大し、それに伴

って細胞小器官が崩壊し、皮層細胞は細胞周縁部にのみ薄い細胞質が分布する空胞化した形態になった。その結果、皮層組織は薄い細胞質が網目のようにつながったスポンジ状の構造を呈した。その後、細胞の空胞化は胃層組織に進行したが、空胞化は褐虫藻を含まない胃層細胞で顕著であった。褐虫藻を含む胃層細胞は周りの空胞化した胃層組織から脱落した。高水温処理によるサンゴ組織の微細構造変化のもう1つの様式では、皮層組織は影響を受けず、胃層組織が崩壊した。高水温処理後数十分で、褐虫藻を含まない胃層細胞に電子密度の高い物質を含む多胞体が多数現れ、多胞体をもつ細胞の細胞質のほとんどは消化された。細胞質が消化された細胞が崩壊し、隣接していた細胞組織が断片化した結果、褐虫藻を含む胃層細胞が胃層組織から脱落した。2つの様式ともに、褐虫藻の細胞微細構造の変化は観察されなかった。短時間の高水温処理は褐虫藻を含まないサンゴ細胞の空胞化または崩壊を誘導し、それによってサンゴ-褐虫藻の共生系の破綻をもたらすことが明らかになった。

#### (3) サンゴ-褐虫藻共生系の成立

発生初期に褐虫藻を環境から取り込むクシハダミドリイシを用いた。産卵後3日で受精卵はプラヌラ幼生に発達し、その後3-4日で定着してポリプを形成した。これにクレードが異なる褐虫藻、AP1株(クレードB)、Y109株(クレードA)、A001株(クレードD)を共存させた。褐虫藻はただちにポリプの口に集まって胃腔内に侵入し、翌日にはポリプ組織内で不動化した。褐虫藻との共存後1-3日で、サンゴの幼体を化学固定および加圧凍結固定し、褐虫藻のサンゴ細胞内の共生を確認した。初期発生期のサンゴは自由遊泳する褐虫藻を誘引・獲得し、数日内で細胞共生を成立させることが明らかになった。

#### (4) サンゴ再生組織の誘導と単色光の効果

ハナヤサイサンゴの枝の断片を数週間静置培養することで、ガラス基板上に再生組織を誘導し、数ヶ月以上維持することができた。再生組織には、ほぼ一定の密度で褐虫藻が分布した。この再生組織を種々の単色光で培養すると、紫色(405 nm)と青色光(470 nm)は組織内の褐虫藻の増殖を促進したのに対し、遠赤色光(735 nm)は組織の顕著な縮退を導いた。暗黒条件および緑色(525 nm)

黄色(570 nm)、赤色(620 nm, 680 nm)の光は褐虫藻とサンゴ組織にほとんど影響を及ぼさなかった。サンゴの再生組織はサンゴ-褐虫藻共生系に及ぼす環境因子を調べるために有効であることが明らかになった。

#### 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2件)

Taguchi T, Mezaki T, Iwase F, Sekida S, Kubota S, Fukami H, Okuda K, Shinbo T, Oshima S, Iiguni Y, Testa JR, Tominaga A. Molecular cytogenetic analysis of the scleractinian coral *Acropora solitaryensis* Veron & Wallace 1984. Zoological Science, 査読有、31巻、2014、89-94

Taguchi T, Kubota S, Mezaki T, Sekida S, Okuda K, Nakachi S, Shinbo T, Iiguni Y, Tominaga A. Detection of characteristic heterochromatin distribution, highly amplified rRNA genes and presence of the human satellite III DNA motif in the scleractinian coral *Echinophyllia aspera* Ellis and Solander 1788. Chromosome Science, 査読有、16巻、2013、33-38

[学会発表](計4件)

関田諭子、奥田一雄、サンゴ細胞内における褐虫藻の細胞分裂の電子顕微鏡観察、日本サンゴ礁学会第17回大会、高知城ホール、高知県、2014年11/26-12/1

関田諭子、岩崎望、奥田一雄、アカサンゴの生殖巣の発達に関する形態学的研究、日本サンゴ礁学会第17回大会、高知城ホール、高知県、2014年11/26-12/1

Taguchi T, Kubota S, Mezaki T, Sekida S, Okuda K, Tominaga A. Ribosomal RNA gene mapping and manifestation of sex chromosomes on the scleractinian coral *Acropora Solitaryensis* Veron & Wallace. 10th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, May 4-8 May 2014, Taipei, Taiwan

Sekida S, Okuda K. Ultrastructure of cortical and extracellular structures of zooxanthellae during cell division in a coral cell, 10th international phycollogical congress, 4-10 August 2013, Orlando, Florida, USA

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥田 一雄 (OKUDA, Kazuo)  
高知大学・教育研究部総合科学系・教授  
研究者番号：40152417

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：