

共生渦鞭毛藻の 18SrRNA 遺伝子による 分子系統解析とそれを利用した シャコガイの共生藻集団の解析

丸山 正

海洋バイオテクノロジー研究所

Molecular phylogenetic analysis of zooxanthellae-clam symbiosis using 18SrRNA gene

T. Maruyama

はじめに

海産無脊椎動物と微細藻類の共生は熱帯・亜熱帯のサンゴ礁で多く認められる。これらの共生はどのようにして進化して来たのだろうか、またサンゴとシャコガイの様に宿主が異なると共生藻は異なるのだろうか、1個体の宿主中には同じ共生藻だけが居るのだろうか、という数々の疑問が湧いてくる。代表的な共生藻は渦鞭毛藻の *Symbiodinium* 属であるが、形態学的に特徴が少なく、18SrRNA 遺伝子解析が導入されるまで (Rowan and Powers 1991)、上記のような問題にアプローチするのはなかなか困難であった。我々は主にシャコガイを含む共生二枚貝で宿主と共生藻の 18SrRNA 遺伝子の解析を利用して上記の問題にアプローチしようと試みた。

共生二枚貝の系統解析と共生の起源

まず、二枚貝で *Symbiodinium* を共生させているザルガイおよびシャコガイ類の系統関係を 18SrRNA 遺伝子を用いて解析した (図 1; Maruyama *et al.* 1998)。その結果、共生藻を有しないザルガイ類 (トリガイとリュウキュウザルガイ) がシャコガイ類とクレードを形成し、このクレードがさらに共生ザルガイ類 (リュウキュウアオイ属、オオヒシガイ属) とクレードを形成する事が判明した。このことはシャコガイ類と共生ザルガイ類がそれぞれ *Symbiodinium* との共生を独立に獲得した可能性 (図 1 の矢印) を示唆している。

共生藻の系統解析

もしそうだとすると、シャコガイとザルガイ類の共生藻は異なっている可能性が出てくる。これに答えるために各宿主から共生藻を単離培養し、クローン化された共生藻の 18SrRNA 遺伝子の配列を解析した (Carlos *et al.* 1999)。同時にハワイの海岸の砂から単離した自由生活性と思われる *Symbiodinium* やパラオのカイメン (*Haliclona koremella*) から単離した株を含む他の共生藻も解析した。これらの 18SrRNA 遺伝子を PCR 法で増幅し、その塩基配列を決定後アライメントし、近隣結合法などに基づいて系統樹を作成した。この時データベースからの短い配列も用いたため、ここでは部分配列に基づく系統樹を示す (図 2)。その結果、Rowan and Powers (1991) が報告している制限酵素切断による多様性解析結果と一致するようなクレードに分かれた。ここでは彼らの命名に従い、クレード A, B, C などと呼ぶ。シャコガイ類 (*Tridacna* spp.

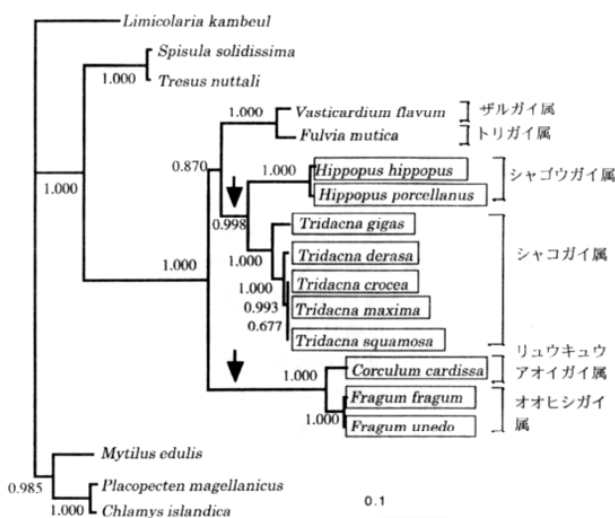


図 1. *Symbiodinium* 属共生藻を有する二枚貝の 18SrRNA 遺伝子に基づく系統関係

シャゴウガイ属およびシャコガイ属はシャコガイ科に分類され、リュウキュウアオイガイ属、オオヒシガイ属、ザルガイ属およびトリガイ属はザルガイ科に分類される。学名を四角で囲んだところは共生藻を有する二枚貝。矢印は *Symbiodinium* との共生を獲得したと推定できるところ。

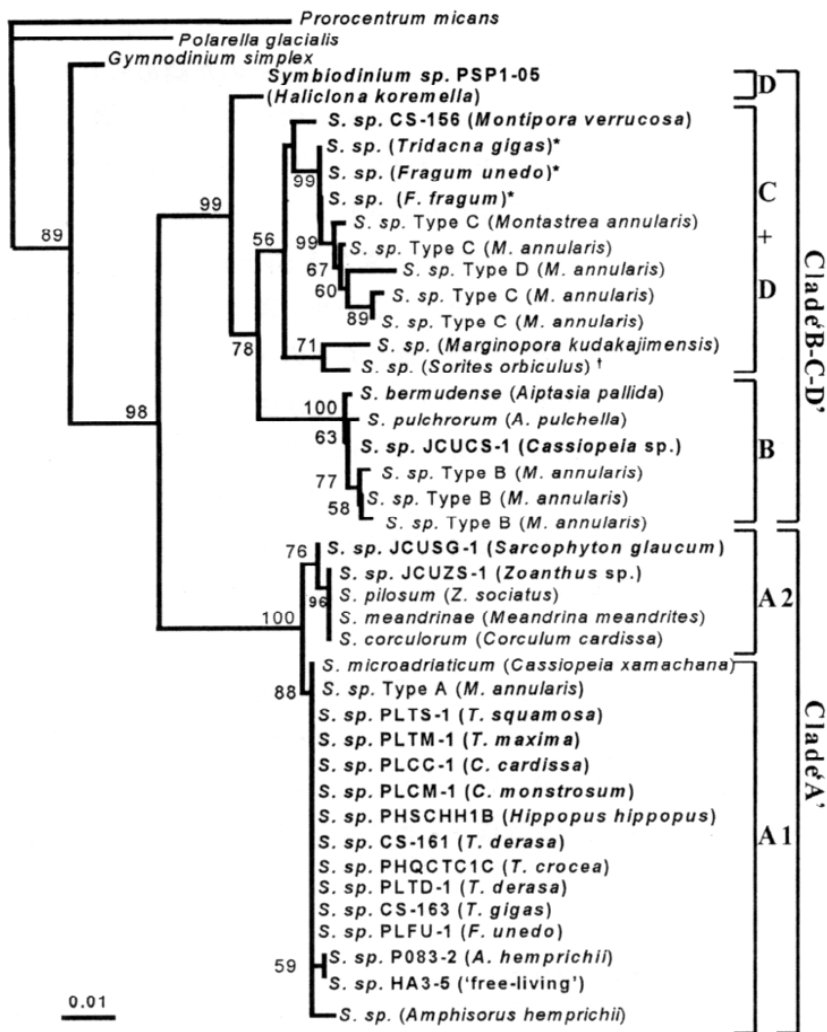


図 2. 18SrRNA 遺伝子配列に基づく *Symbiodinium* 属共生藻の系統樹
 太字は本研究で解析したデータ。データベースの配列との比較のために可変領域のデータのみを利用した。カッコ内は宿主名を示す。主な宿主のグループは以下の通り。Marginopora, Sorites および Amphisorus は有孔虫。Cassiopeia (Cassiopea) はクラゲ (刺胞動物)。Sarcophyton は軟体サンゴ (刺胞動物)。Haliciona はカイメン。Montipora および Montastrea はイシサンゴ (刺胞動物)。Aiptasia はイソギンチャク (刺胞動物)。Zoanthus はスナギンチャク (刺胞動物)。Corculum, Fragum, Tridacna および Hippopus は二枚貝。Free-living はハワイの砂から単離した自由生活性と思われる *Symbiodinium*。は培養できない共生藻で二枚貝宿主から DNA を直接抽出して解析したもの。† は制限酵素による切断パターンが報告されていないもの。

と *Hippopus hippopus*) およびカワラガイ (*Fragum unedo*) やリュウキュウアオイガイ (*Corculum cardissa*) から単離培養 (ESM培地) した共生藻の配列は全て同一でサカサクラゲ (*Cassiopea xamachana*) 由来の *S. microadriaticum* と非常に近く、系統樹の上ではクレード A の中のサブグループ A1 に属していた。自由生活性と思われる

Symbiodinium sp. HA3-5 や有孔虫 (*Amphisorus hemprichii*) の共生藻も A1 に属した。A2 にはスナギンチャク (*Zoanthus* spp.) やサンゴ (*Meandrina meandritus*) の共生藻等が含まれた。面白いことに、同じパラオのリウキュウアオイから単離した共生藻でも McNally *et al.* (1994) が単離した *S. corculorum* は A2 に入ったが、我々が単離した共生藻は A1 に属していた。クレード B にはサカサクラゲ (*Cassiopea* sp.) やイソギンチャク (*Aiptasia* spp.) から単離培養された共生藻が含まれる。クレード C にはイボコモンサンゴ (*Montipora verrucosa*) 等から単離された共生藻が含まれる。クレード C にはオオジャコガイ (*Tridacna gigas*) やオオヒシガイ属 (*Fragum* spp.) から共生藻を培養せずに直接 DNA を抽出、増幅後クローン化して配列決定した共生藻が含まれていた。このことは、共生二枚貝体内にはクレード A と C の異なる *Symbiodinium* が共存する事を示していた。また、カイメン由来の *Symbiodinium* は制限酵素断片解析ではクレード D であったが、系統樹上ではクレード B、C や D からは少し離れていた。

宿主個体内の共生藻の多様性

共生二枚貝個体内 *Symbiodinium* 集団の多様性は、宿主から共生藻を集団として単離後 DNA を抽出し、18S rRNA 遺伝子の可変異領域を増幅した後、温度勾配電気泳動法で解析した (Carlos *et al.* 2000)。この解析では同一サイズでも塩基配列の異なる DNA 断片を移動度の差で検出出来る。リボソーム遺伝子はコピー数が多く、コピー間の相違が問題になることから、共

生藻株を3クローンほど解析したが、この相違は無視して良さそうであった。シャコガイおよびザルガイ類で調べたところ、共生藻の組成は宿主の種により異なるが、宿主1個体内には複数の異なる共生藻が検出された(図3)。バンドを切り出して塩基配列

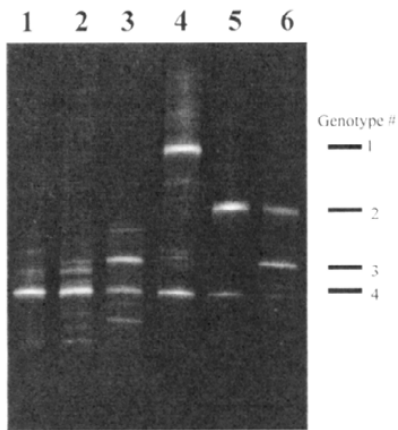


図3. 共生二枚貝個体内の共生藻集団の18SrRNA遺伝子の一部を増幅後、温度勾配電気泳動により解析した結果。個々の移動度の異なるバンドが、それぞれ異なる共生藻に対応する。(1) *Tridacna gigas*, (2) *Hippopus porcellanus*, (3) *Corculum cardissa*, (4) *H. hippopus*, (5) *T. crocea*, (6) *T. squamosa*. (Carlos *et al.* (2000) より引用)

を決定すると、その中には図2で示したクレードCの培養出来ないもの(図3のgenotype 4)、クレードAの培養可能なもの(genotype 2)に加えて、新たに幾つかの異なる *Symbiodinium* (genotype 1および3)の存在が明らかとなった。現在のところ、我々が用いている培地ではシャコガイの共生藻の内、クレードAに属

す一つのタイプのみが増殖し、残りの複数のものは増殖が遅いのか、あるいは栄養要求性が異なるのか、培養出来ない。イソギンチャク *Aiptasia* sp.にはクレードBに属す *Symbiodinium*が唯一検出された。共生二枚貝の方がイソギンチャクより体が複雑で大きく、光条件など、共生藻の生息環境に多様性があることが複数の *Symbiodinium*が共生している理由ではないかと想像される。

まとめ

シャコガイなどの宿主と共生藻の関係を18S rRNA遺伝子配列から解析してみた結果、宿主と共生藻の系統関係との間にはあまり明確な対応関係は見られなかった。このことは、*Symbiodinium*が宿主との共生を獲得する機会が進化の上で複数回あったこ

とを示すのであろうか。図2に示したように *Symbiodinium*には多くのものが認められたが、これらのどれとどれが種を構成するのは難しい問題で、他のキャラクターや有性生殖の存在など、今後の研究で明らかにされることを期待したい。また、同一の宿主個体内に異なる *Symbiodinium*が共生している意味は分からないが、環境の変化が生じた場合に、その中から適したものが生き残るのであろうか。実際、サンゴでは白化が生じる際に群体内の共生藻の組成が変化する例が報告されている (Rowan *et al.* 1997)。これらの遺伝子から見出された関係は、宿主共生藻間の特異性に反映されているかなど、今後いろいろな角度から検討していく必要があると思われる。

ここで紹介した研究開発は通産省工業技術院の産業科学技術プロジェクト「複合生物等生物資源利用技術開発」の一環として、新エネルギー・産業技術総合開発機構から委託を受けて実施した研究の一部である。

引用文献

Carlos, A., B. K. Baillie, M. Kawachi and T. Maruyama 1999. Phylogenetic position of *Symbiodinium* (Dinophyceae) isolates from tridacnids (Bivalvia), cardiids (Bivalvia), a sponge (Porifera), a soft coral (Anthozoa), and a free-living strain. *J. Phycol.*, 35: 1054-1062.

Carlos, A., B. K. Baillie and T. Maruyama 2000. Diversity of dinoflagellate symbionts (zooxanthellae) in a host individual. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 195: 93-100.

Maruyama, T., M. Ishikura, S. Yamazaki and S. Kanai 1998. Molecular phylogeny of zooxanthellate bivalves. *Biol. Bull.*, 195: 70-77.

McNally, K. L., N. S. Govind, P. E. Thome and R. K. Trench 1994. Small-subunit ribosomal DNA sequence analysis and a reconstitution of the inferred phylogeny among symbiotic dinoflagellates (Pyrrophyta). *J. Phycol.*, 30: 316-329.

Rowan, R. and D. A. Powers 1991. A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal-algal symbioses. *Science*, 251: 1348-1351.

Rowan, R., N. Knowlton, A. Baker and J. Jara 1997. Landscape ecology of algal symbionts creates variation in episodes of coral bleaching. *Nature*, 388: 265-269.