

植物と動物との光共生における生物横断的コミュニケーション

高橋 俊一¹, 濱田 麻友子², 丸山 真一郎^{3,4}

¹ 琉球大学 熱帯生物圏研究センター

〒905-0227 沖縄県国頭郡本部町瀬底 3422

² 岡山大学 自然科学学域 理学部附属牛窓臨海実験所

〒701-4303 岡山県瀬戸内市牛窓町鹿忍 130-17

³ 東北大学 大学院生命科学研究科

〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

⁴ お茶の水女子大学 基幹研究院自然科学系

〒112-8610 東京都文京区大塚 2-1-1

Cross-disciplinary communication in photo-symbiosis between plants and animals

Shunichi Takahashi¹, Mayuko Hamada², Shinichiro Maruyama^{3,4}

¹Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus, Motobu, Okinawa 905-0227, Japan

²Ushimado Marine Institute, Okayama University, Kashino 130-17, Ushimado, Setouchi, Okayama 701-4303, Japan

³Department of Ecological Developmental Adaptability Life Sciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University,

6-3 Aramaki-aza-Aoba, Aobaku, Sendai 980-8578, Japan

⁴Graduate School of Humanities and Sciences, Ochanomizu University, 2-1-1 Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8610, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.13a1.00219

1. はじめに

共生というのは、意外と厄介な言葉である。元々の意味は単純に「共に生きていること」、つまり同時同所的な生存様式を表す言葉だったと考えられるが、それぞれの関係性を詳細に分析する研究が行われ、共生と一括りにされていたものを「相利共生」や「片利共生」、「寄生」などに分類する努力が払われた時期もあった。しかし現在では、こうした分類は便宜的なものであって、時と場所によって変化し得る共生関係の、その折々の一側面を形容する言葉という程度に考えられることが多い。それぞれの関係性がたとえ特別なものであっても、その「特別さ」は必ずしも固定的なものである必要はないということだろう。

すると、また別の疑問も湧き上がってくる。共生が刻一刻と変化する関係性であって、固定的な分類を持たず、ただそこに共に生きることを表す言葉なのだとしたら、地球上の生き物は全て共生していることになってしまうではないか！？確かにその通りで、地球は共生のかたまりと言ってもいいかもしれない。陸上植物は根で無数の微生物たちとの生態系を構築

し、動物は無数の共生細菌を体内に抱えながら生きている。古細菌に寄生する古細菌すら知られている。要は程度の問題であって、他者の存在が大きな影響を持つ生存様式であればあるほど「共生的」だとも言える。例を挙げよう。私たちがヨーグルトを食べるとき、それがたまたまちょっと高級なものだったりすると、一緒に乳酸菌などの生きた細菌類を「捕食」するかもしれない。乳酸菌の一部は消化されたり、排泄されたりするが、一部は腸内に残り、ヒトと「共生」する。捕食・被食関係と共生関係に境界線を引くことでさえ十分に難しい問題と言えそうである。

共生自体が普遍的な現象であったとしても、いやむしろ普遍的であるからこそ、それぞれの共生関係はどれも個性的に見える。生物学者の興味は、共生の関係性を分析して分類することから、共生の成立や維持の仕組み、その共通性と多様性を理解することへと広がり続けている。特に、「扱いにくい」パートナーとの共生という、一見難しそうな共生が成立する仕組みは注目を集めてきた。その中でも、植物と動物の共生、特に光合成共生体（微細藻類など）と従属栄養性宿主（動物や原生生物）との「光共生」に着目したシンポジウムを、日本植物学会第 85 回大会にて開催した。「光共生」は造語的な側面が強く、まだ学術用語として広く受け入れられた定義がある訳ではないが、字義上は「光合成産物の授受を軸にした相互作用を伴う共生」というくらいの意味合いで、特に微細藻類と従属栄養性宿主との関係性について適用されることが多い。藻類のどこが「扱いにくい」のか？それは光合成が持つ二面性と切っても切り離せない。つまり、炭酸固定という地球上で最も重要な化学反応を制御するメリットの大きさと、それに用いる膨大な光エネルギーを制御しきれなかった時に生じるリスクの大きさ、光合成生物はこれらのバランスを保ちながら生きている。光合成生物を共生させるということは、宿主も同じリスクを背負うことに他ならない。

本総説集は、光共生に関わる分野で活躍する日本国内の研究者に（普段あまり植物学に縁のない方々も含め）ご登壇頂き、特に動物側から見た共生植物の生き様に関する最新の知見を紹介していただいたシンポジウムを元に編まれたものである。共生という言葉が生物学の世界を離れて独り歩きするようになって久しい。この言葉が社会や人間の生き様、哲学などへと幅広く応用され、一般社会へと浸透し、陳腐化し、当たり前の方針になってきたことには様々な意見があろうが、ポジティブに評価すべき一面も確かにあるだろう。シンポジウムタイトルの「生物横断的コミュニケーション」は、当初は生物学的な意味での生物間相互作用のことを意図していたが、企画を温める内に、植物学と動物学という近そうで遠い分野を横断するような生物学者の交流という意味合いも自然と包含するようになったと感じている。学問の枠、学会の枠、コミュニティの枠を超えて、共生という現象への興味という純粋な動機で集った研究者が「共生」し、それが生物の共生の理解を深めていく、という正の連鎖を生むことができたなら、学際研究・異分野融合研究を志す人たちの参考ともなり得るかもしれない。この集いが、この総説集が、植物の新しい生き方の進化、そして植物科学の新しい発展の仕方について、活発な議論が行われる土壌を醸成する一助となれば幸いである。

褐虫藻は共生していることをどう感じているのか

石井 悠^{1,2}

¹宮城教育大学大学院教育学研究科高度教職実践専攻
〒980-0845 宮城県仙台市青葉区荒巻青葉 149

²東北大学大学院生命科学研究科
〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

What does symbiosis mean for Symbiodiniaceae?

Yuu Ishii^{1,2}

¹ Department of Biology, Miyagi University of Education
149, Aramaki Aoba, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 980-0845, Japan

² Graduate School of Life Sciences, Tohoku University
6-3, Aramaki Aza-Aoba, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 980-8578, Japan

Keywords: endosymbiosis, fitness, photosynthate, Symbiodiniaceae

DOI: 10.24480/bsj-review.13a2.00220

1. 褐虫藻と非光合成生物との共生

1-1. 多様な宿主と共生する褐虫藻

褐虫藻は単細胞性の Symbiodiniaceae 科渦鞭毛藻類であり、単細胞から多細胞生物まで多くの生物と細胞内外で共生する。この Symbiodiniaceae 科は大きく分けて A-J までの 10 のクレード（分類学上の属に相当する）に分けられることが知られており (LaJeunesse et al. 2018; Yorifuji et al. 2021), それぞれのクレードの褐虫藻が様々な動物門の生物と共生するだけでなく、それぞれの動物門の生物も様々なクレードの褐虫藻と共生し、多対多の共生関係を築いている (Mies et al. 2017) (図 1)。なお褐虫藻 (zooxanthella) は広義には海産無脊椎動物に共生する黄色ないし茶褐色の単細胞藻類の総称とされることもあるが、本稿では Symbiodiniaceae 科渦鞭毛藻類を狭義の褐虫藻として扱う。

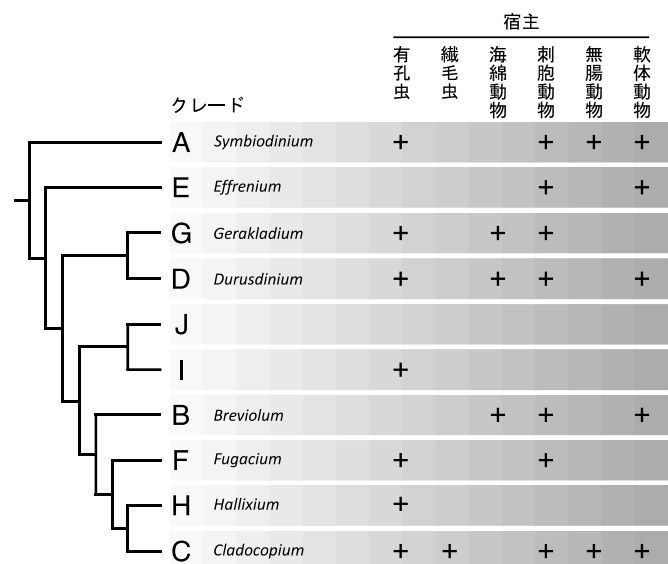


図 1. 褐虫藻のクレードの系統関係とその宿主

+ : 共生例が報告されている組み合わせ

(Mies et. al. 2017, Yorifuji et.al. 2021 より作成)

褐虫藻とサンゴやイソギンチャクに代表される刺胞動物との共生関係は、熱帯・亜熱帯海洋の生態系で一次生産者としての大きな役割を担うことから特に知見が多い。褐虫藻と刺胞動物の共生関係は、古くから相利共生の代表例として扱われ、宿主と褐虫藻がお互いに助け合う理想的な関係であるというイメージで捉えられているかもしれない。しかし、実際のやり取りはどのようなものなのだろうか？本稿ではこれらの共生研究の歴史を通して、現在明らかになっている褐虫藻と宿主との物質のやり取りと、それに関わる未解明の問いを紹介する。そこから、これらの共生関係について、生物学的に両者のメリットやデメリットを正確に評価することができるのか？という点について考察したい。

1-2. 褐虫藻が宿主と交換するもの

多様な宿主生物との共生において、一般的に宿主から褐虫藻へはすみかや栄養（無機炭素や無機窒素、リンなど）が、褐虫藻から宿主へは光合成産物が渡されると考えられている。実際には、褐虫藻から宿主へは一般的なイメージよりも多くのものが渡されており、光合成産物だけではなく、脂質やアミノ酸なども渡される(Davy et al. 2012)。

このような褐虫藻と刺胞動物間の物質の流れを明らかにする研究は、古くは1950年代から本格的に始まり、そのきっかけは、Muscatineらによる報告である。その研究では、共生しているイソギンチャク (*Anthopleura elegantissima*) に $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_2$ を与え、イソギンチャクに含まれる放射性同位体である ^{14}C を検出することで、褐虫藻から宿主へ炭素が渡されている事を実証した(Muscatine and Hand 1958)。近年は物質の流れを制御する分子メカニズムを明らかにしようとする研究も行われている。Muscatineは、これ以外にもサンゴの白化現象の発見やサンゴの骨格形成に関しても大きく貢献し、現在の共生研究の基礎を作ったが、本項では紹介しきれないため、Hoegh-Guldbergらの論文(Hoegh-Guldberg et al. 2007)を参照していただきたい。

今も昔も、共生研究における興味の焦点はあまり変化していないが、研究スタイルは大きく変化した。以前は、野外から共生している生物を採取し、実験を行うスタイルが主流であった。最近では、研究室で刺胞動物の共生モデル生物や褐虫藻の培養株を用いて、研究するスタイルも数多く見られる。刺胞動物の褐虫藻との共生モデル生物としては、セイタカイソギンチャク (*Exaiptasia pallida*) がよく用いられ、ゲノム解読や外来遺伝子の導入など多くの共生研究のツールが開発されつつある(Baumgarten et al. 2015; Grawunder et al. 2015; Jones et al. 2018)。さらに、最近ではサンゴの細胞培養株が樹立され(Kawamura et al. 2021)、これを用いた共生研究の進展も期待される。

2. どのようにして宿主に光合成産物を渡すのか

2-1. 褐虫藻から宿主へ渡される光合成産物量

光合成生物との共生で注目されるのは、やはり光合成産物を宿主がどの程度の量受け取っているか、という点であろう。この問いは貧栄養環境である熱帯・亜熱帯海洋における光合成生物と非光合成生物との共生において最も注目される物質交換の根幹であり、多くの研究がなされてきた。先に紹介した Muscatine が確立した $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_2$ を用いた研究方法を応用した

放射性同位体 ^{14}C のトレーサー実験により、褐虫藻から刺胞動物に渡される炭素の量を見積もる複数の研究では、褐虫藻が光合成により固定した炭素の 5%~60%が宿主に渡されていると報告された。しかし、褐虫藻から宿主に渡された光合成産物が、宿主体内で素早く代謝され CO_2 として外界に放出されてしまうために検出できない分を、少なく見積もってしまうという問題があった(Davy et al. 2012)。そこで、宿主の成長率や褐虫藻の光合成速度から、褐虫藻から宿主に渡されるエネルギーの量を算出する方法が考案された。その方法では 90%以上の光合成産物が宿主に渡されているという結果が得られ(Muscatine 1990)、現在はこの研究結果がよく引用される。しかしこの研究は、計算に使用する宿主と褐虫藻の成長率などの理論値によって、計算結果が大きく変わってしまうという問題が指摘されている(Davy et al. 2012)。一方で理論値を使用しないで、褐虫藻が刺胞動物に渡す光合成産物の量を直接定量する方法が近年報告された。その研究では、Nano SIMS (二次元高分解能二次イオン質量分析装置; 安定同位体を用いて、高感度で元素のイメージングが可能) により、実験室環境下で褐虫藻から宿主への炭素の移動を可視化し、それを定量する(Rädecker et al. 2021a)。実験室でのオンタイムでの物質移動が観察できるようになったものの、未だ野外環境での測定は実現されておらず、自然界で宿主に渡される光合成産物を厳密に定量した研究はない。

2-2. 褐虫藻が共生時に光合成を行う“すみか”の環境

褐虫藻が宿主から提供されるすみかはどのような環境なのだろうか。これについて考える前に、海洋環境での光合成について紹介したい。一般的に海洋は弱アルカリ性(約 pH 8 付近)である。このような弱アルカリ環境では無機炭素はほとんどが細胞膜を通りにくい HCO_3^- の形で溶解する。一方で RuBisCO による炭酸固定では、 CO_2 分子が反応に利用される。つまり、海洋環境では、とても低い濃度の CO_2 を積極的に利用するか、 HCO_3^- 分子を CO_2 に変換して利用する(炭酸濃縮)かのどちらかが重要になる。

刺胞動物との共生では、褐虫藻は共生胞という特殊なオルガネラの中で維持される(図2)。この宿主のオルガネラの膜には、V type H^+ ATPase という酵素が存在し、選択的に H^+ をオルガネラ内に輸送するため膜内は pH が低くなり、 CO_2 の溶解度が海水中よりも高くなる。さらに共生胞では宿主の炭酸脱水酵素(カーボニックアンヒドラーゼ: CA) という酵素により H^+

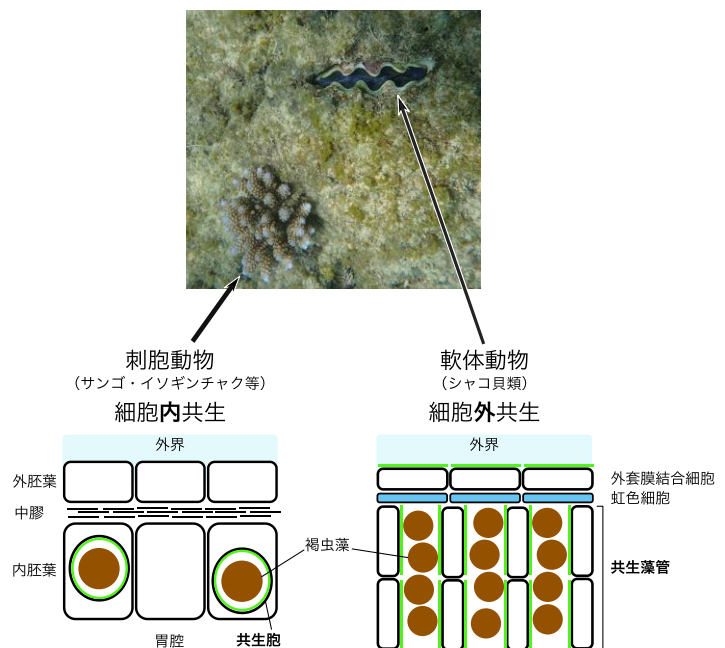


図2. 褐虫藻が宿主と共生するすみか

左) 刺胞動物と共生する際は共生胞というオルガネラに維持される。右) 軟体動物と共生する際は共生藻管と呼ばれる組織に維持される。どちらも細胞膜上に V type H^+ ATPase (緑) が分布し、内部の pH が低く維持される。(Armstrong et al. 2018 を基に作成)

と HCO_3^- を CO_2 に変換することで、共生胞内の CO_2 濃度を上昇させ褐虫藻の光合成能力を高めている可能性が示唆されている (Barott et al. 2015)。同様の炭酸濃縮機構はサンゴだけではなく、軟体動物のシャコガイとの共生にも存在することが予想されている (図 2)。シャコガイと褐虫藻は、共生藻管という特殊な細胞外に相当する組織で共生するが、この管の細胞膜上にも V type H^+ ATPase が存在しており、共生藻管内の pH が低いことが予想される。さらに共生藻管には CA が高濃度で存在し、 HCO_3^- を CO_2 に変換しているというモデルが提唱されている (Armstrong et al. 2018)。

2-3. 褐虫藻から宿主に渡す光合成産物の分子種

では、そのようなすみかで作られる光合成産物は、どのような形で宿主に渡されるのだろうか？長い間、褐虫藻から宿主に渡す光合成産物は、グリセロールであると考えられてきた。これは、共生していた褐虫藻を単離し、宿主の抽出物を混合すると、褐虫藻がグリセロールを分泌するという結果からである (Muscatine 1967)。この実験では、宿主 (サンゴまたはシャコガイ) をすりつぶし、すりつぶした宿主液に褐虫藻 (褐虫藻は硬いためつぶれない) が含まれる溶液と含まれない溶液を作成した。それぞれの溶液に対し、炭素固定によって合成された産物を放射性同位体でマークする目的で、 $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_2$ を添加し培養した。これにより、溶液内で褐虫藻が光合成を行い細胞外に分泌した物質を ^{14}C でトレースすることができる。その結果、褐虫藻が含まれる溶液の方が培養液中に含まれる (褐虫藻が光合成で固定し細胞外に分泌したと予想される) ^{14}C の量が多く、さらにその炭素化合物の大部分 (>90%) はグリセロールであるということが示された。本研究で Muscatine は、宿主のすりつぶし液の中の何らかの物質が、褐虫藻がグリセロールを体外に排出することを促していると結論している。

しかしその後、シャコガイを使った別の研究で、褐虫藻が宿主に渡す光合成産物がグリセロールであることに疑問が持たれる結果が報告された。それは、褐虫藻と共生するシャコガイを $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_2$ を含む海水で飼育し、光合成産物の ^{14}C トレーサー実験を行うと、宿主であるシャコガイに含まれる ^{14}C でラベルされた分子 (褐虫藻から渡された炭酸固定産物と予想される) の大部分は、グルコースであるという結果である (Streamler et al. 1988)。さらに無傷のシャコガイ内で褐虫藻はグルコースを分泌するが、傷ついた宿主液の中ではグリセロールを分泌することが示された (Ishikura et al. 1999)。同様の研究は、サンゴと褐虫藻の共生研究でも行われた。無傷のサンゴからの抽出物を解析した結果から、グリセロールが宿主の画分に含まれないことが示され (Whitehead and Douglas 2003)、グリセロールの分泌は共生系への損傷に関係しているのではないかと考えられた。

こうした論争を踏まえ、Burriesci らは安定同位体である ^{13}C でラベルした光合成産物を GC-MAS (ガスクロマトグラフィー質量分析法; ガスクロマトグラフィーで分離した成分の検出と質量分析を組み合わせ、質量情報から成分の定性および定量を行う) により測定する方法を確立し、宿主と褐虫藻を分離し、それぞれで光合成産物を検出するという方法で、褐虫藻から宿主に渡される光合成産物がグルコースの形をとることを確認した (Burriesci et al. 2012)。Burriesci らは ^{13}C ラベルしたサンプルを経時的に採取し、光合成産物が宿主に渡されるまでの時間を特定すると同時に、宿主の抽出物を褐虫藻と混合した時にグリセロールが検出され

ることを再確認した。さらに、褐虫藻の光合成活性の阻害実験により、宿主体内から検出されたグルコースが、光合成により合成されたものであることを確認した。それまで、褐虫藻から宿主に渡される光合成産物は、グリセロールの形で渡されると思われていた背景もあり、宿主体内で検出されるグルコースがグリセロールを元にした糖新生によるものである可能性が疑われた。そこで宿主の糖新生の阻害実験も行い、宿主体内で検出されるグルコースが、光合成産物が褐虫藻から宿主にグリセロールの形で受け渡された後の、糖新生による代謝物でないことを証明した。このような地道な研究の甲斐もあり、現在では「褐虫藻が宿主に渡す光合成産物はグルコースである」という認識が広まっている。

3. 共生関係という枠の外から共生を評価する

3-1. 共生のメリット・デメリット

これまで、褐虫藻と宿主の間で渡される分子が何かを特定することで、単純にそれがメリットになっていると考えられてきた。しかし、実際に渡される分子それぞれが、どのくらい各生物にとってメリットが大きいのか、もしくはメリットと考えられているもの自体にデメリットがないのか、を評価することは行われていない。それを考えるためには、共生している状態だけではなく、共生していない単独の各生物の適応度（生物がどれだけ多くの子孫を次世代に残せるかの尺度）を考えることが必要だろう。

3-2. 宿主にとっての光合成産物

宿主にとって褐虫藻の作る光合成産物は適応度を上げるほど重要な栄養素なのだろうか？熱帯・亜熱帯海域の栄養素は少ないが、栄養バランスを考えると律速になっているのは窒素 (N) であり、光合成産物は刺胞動物にとって成長速度に大きく影響しないジャンクフードのようなものである、という考え方もある(Falkowski et al. 1984)。ジャンクフードである光合成産物は宿主自体の成長には影響しないが、宿主の体内を通して粘液となり、宿主の体外に排出され、それを他の生物が食べることで、熱帯・亜熱帯海域の生態系を一時生産者として支えている事実は変わらない。むしろ、宿主がジャンクフードを食べてくれるからこそ、熱帯・亜熱帯海域の生態系が出来上がっていると言っても過言ではないかもしれない。

光合成産物がジャンクフードであるとする、宿主が褐虫藻から得ている生体にとってより重要な他の物質はあるのだろうか。褐虫藻は宿主に脂質も渡すことが、古くから示唆されている(Kellogg and Patton 1983; Patton and Burris 1983)。刺胞動物が脂質要求性を示すことは、複数の研究から示されており(Baumgarten et al. 2015; Gold et al. 2016)、褐虫藻から脂質を運ぶタンパク質として、宿主の NPC2 (ニーマンピック C2) タンパク質の関与が、複数の研究で予想されていた(Lehnert et al. 2014; Baumgarten et al. 2015)。NPC2 タンパク質自体は、哺乳類にも存在し、ステロールに結合して細胞内に輸送する機能があることが知られている(Liou et al. 2006)。褐虫藻と共生するイソギンチャクではこの NPC2 が多様化しており、特定のアイソフォームが、共生時に発現上昇する(Ganot et al. 2011)。最近、刺胞動物に特徴的な NPC2 タンパク質が、褐虫藻の合成するステロールの輸送に関わっていることが示された(Hambleton et

al. 2019)。刺胞動物が褐虫藻に求めている「個体の適応度を上げるほど重要な物質」の一つは脂質かもしれない。

では共生関係が宿主にとってデメリットになることはあるのだろうか？光合成生物との共生では、共生藻が光合成を行う際に、宿主にとって有害な活性酸素種などが発生するという説もある(Weis 2008)。そのため、それらの有害物質を代謝する系を発達させる必要があるが、この代謝系を発達させる必要があること自体がデメリットとなっているかもしれない。

3-3. 褐虫藻の栄養獲得（代謝、生育）戦略

一方、褐虫藻が共生関係によって得られるものは何だろうか？宿主が褐虫藻の数を制御するのに炭素（C）と窒素（N）のバランスが関与しているという報告がある(Xiang et al. 2020; Rådecker et al. 2021a)。このことから、褐虫藻が宿主に求める物質は“すみか”の炭酸濃縮機構だけではないだろう。多くの褐虫藻は、共生生活と自由生活の両方を行うことができる。原理的に、ある褐虫藻が「どの生物とも共生しない」ことを証明するのは困難だが、野外で自由生活の状態で単離され、他生物との共生が報告されていない種は一定数存在する(González-Pech et al. 2021)。このことから、共生することが必ずしも褐虫藻にメリットになる訳ではないようである。例えば、窒素は宿主から渡されるものとして有名だが、もしそれが環境中の無機窒素や色々な形で簡単に使える環境だったら、共生するメリットはどのように考えられるだろうか？もしかしたら、窒素が豊富な環境では、共生するよりも自由生活の方が、代謝の点で利益が多いかもしれない。一方で窒素が少ない環境では、自由生活よりも宿主体内で生活する方が有利かもしれない（図3）。

先に紹介したように、褐虫藻が宿主体内で生活する共生胞は低 pH の共生に特化したオルガネラである。すみかが与えられるというが、自由生活よりもどのくらい適応度が上がるのだろうか。褐虫藻ではないが、淡水の細胞内共生系であるミドリゾウリムシ（宿主）とクロレラ（共生体）では共生することがウィルスや他種との競争の回避に役立っているという仮説もある(Iwai et al. 2019)。一方で、ミドリゾウリムシがクロレラから光合成産物を搾取しており、クロレラ自体には共生のメリットがないという仮説もある(Lowe et al. 2016)。褐虫藻でも同様の研究が行われると、共生の理解がより深まるかもしれない。

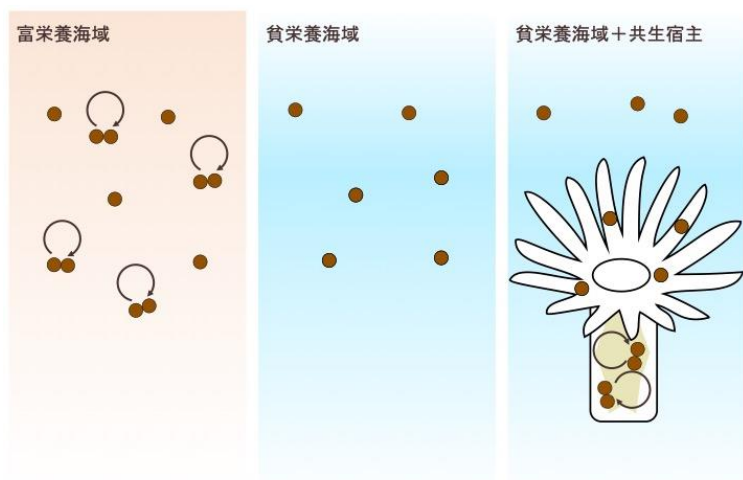


図3. 褐虫藻が生活する海洋環境の比較

窒素が豊富な海（富栄養）では貧栄養な海よりも細胞増殖速度（矢印）が早くなる。一方、貧栄養な海では自由生活の場合は窒素が不足するため細胞増殖速度は低下するが、宿主の体内は窒素が供給されるため増殖速度が速くなるかもしれない。

4. 今後の共生研究について

宿主の適応度を考えると、造礁サンゴでは褐虫藻と共生していない状態（白化状態）で長期的に生きていくことは難しいことから、共生すること自体が宿主の適応度を上げることは明白である。しかし、共生状態と非共生状態の両方をとることができるイソギンチャクのような生物において、共生関係が適応度に与える影響は明らかになっていない。近年、イソギンチャクのモデル生物としてセイタカイソギンチャクが用いられ、本生物は共生状態と非共生状態を人為的に変化させることができる上、産卵を誘導することができる(Baumgarten et al. 2015; Grawunder et al. 2015)。今後この系を用いて、共生すること自体がどのくらい宿主の適応度に影響するかを評価できるかもしれない。

最近、共生研究の中では宿主に焦点が当たることが多かったが褐虫藻自体の研究も進み始めている。単独で培養した褐虫藻に含まれる細胞内のステロールを分析した研究などもあり、その多様性が示されている(Lu et al. 2020)。また別の渦鞭毛藻 (*Prorocentrum minimum*) では、培養液中の窒素濃度を変えて培養すると、増殖スピードなどが変わることが示されている(Abassi and Ki 2022)。このような基本的な研究がすすむことは非常に喜ばしいことではあるが、さらに一歩踏み込んで、これらの性質が共生自体にどのように関わっているかを調べた研究はない。さらに、サンゴ共生系は褐虫藻とサンゴの関係だけでなく、サンゴ自体を生態系（ホロビオントと呼ばれる）としてとらえて、褐虫藻と宿主だけではなく、宿主の周りに生活する他のバクテリアなどの微生物の共生関係への役割についても考慮するような研究も行われている(Thompson et al. 2015; Rädicker et al. 2021b)。

主に無性生殖で増殖する褐虫藻にとって、適応度は細胞数、つまり増殖速度とほぼ等しくなると考えても問題はないだろう。褐虫藻にとって増殖速度が高くなる環境とはどのような環境なのだろうか。これまで共生している状態を中心に研究がなされてきたが、今後は、褐虫藻単独の基本的な性質を見直すことにより、自由生活と共生生活のどちらが褐虫藻にとって利益が大きいか、つまり褐虫藻が共生することをどう「感じて」いるのかを考えるきっかけが得られるかもしれない。今後、褐虫藻自体の性質と共生関係をつなぐような研究が期待される。

謝辞

本稿を上梓するにあたり、東北大学・丸山真一朗博士、宮城教育大学・出口竜作教授に多大なるご協力を頂きました。心より御礼申し上げます。

引用文献

- Abassi S, Ki J-S (2022) Increased nitrate concentration differentially affects cell growth and expression of nitrate transporter and other nitrogen-related genes in the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Chemosphere* 288: 132526. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.132526
- Armstrong EJ, Roa JN, Stillman JH, Tresguerres M (2018) Symbiont photosynthesis in giant clams is promoted by V-type H⁺-ATPase from host cells. *J Exp Biol* 221: jeb177220. doi: 10.1242/jeb.177220

- Barott KL, Venn AA, Perez SO, Tambutté S, Tresguerres M (2015) Coral host cells acidify symbiotic algal microenvironment to promote photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:607–612. doi: 10.1073/pnas.1413483112
- Baumgarten S, Simakov O, Esherick LY, Liew YJ, Lehnert EM, Michell CT, Li Y, Hambleton EA, Guse A, Oates ME et al. (2015) The genome of *Aiptasia*, a sea anemone model for coral symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:11893–11898. doi: 10.1073/pnas.1513318112
- Burriesci MS, Raab TK, Pringle JR (2012) Evidence that glucose is the major transferred metabolite in dinoflagellate-cnidarian symbiosis. *J Exp Biol* 215:3467–3477. doi: 10.1242/jeb.070946
- Davy SK, Allemand D, Weis VM (2012) Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Microbiol Mol Biol Rev* 76:229–261. doi: 10.1128/MMBR.05014-11
- Falkowski PG, Dubinsky Z, Muscatine L, Porter JW (1984) Light and the Bioenergetics of a Symbiotic Coral. *Bioscience* 34:705–709. doi: 10.2307/1309663
- Ganot P, Moya A, Magnone V, Allemand D, Furla P, Sabourault C (2011) Adaptations to Endosymbiosis in a Cnidarian-Dinoflagellate Association: Differential Gene Expression and Specific Gene Duplications. *PLOS Genetics* 7:e1002187. doi: 10.1371/journal.pgen.1002187
- Gold DA, Grabenstatter J, Mendoza A de, Riesgo A, Ruiz-Trillo I, Summons RE (2016) Sterol and genomic analyses validate the sponge biomarker hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:2684–2689. doi: 10.1073/pnas.1512614113
- González-Pech RA, Stephens TG, Chen Y, Mohamed AR, Cheng Y, Shah S, Dougan KE, Fortuin MDA, Lagorce R, Burt DW et al. (2021) Comparison of 15 dinoflagellate genomes reveals extensive sequence and structural divergence in family Symbiodiniaceae and genus *Symbiodinium*. *BMC Biology* 19:73. doi: 10.1186/s12915-021-00994-6
- Grawunder D, Hambleton EA, Bucher M, Wolfowicz I, Bechtoldt N, Guse A (2015) Induction of Gametogenesis in the Cnidarian Endosymbiosis Model *Aiptasia* sp. *Sci Rep* 5:15677. doi: 10.1038/srep15677
- Hambleton EA, Jones VAS, Maegele I, Kvaskoff D, Sachsenheimer T, Guse A (2019) Sterol transfer by atypical cholesterol-binding NPC2 proteins in coral-algal symbiosis. *eLife* 8:e43923. doi: 10.7554/eLife.43923
- Hoegh-Guldberg O, Muller-Parker G, Cook CB, Gates RD, Gladfelter E, Trench RK, Weis VM (2007) Len Muscatine (1932–2007) and his contributions to the understanding of algal-invertebrate endosymbiosis. *Coral Reefs* 26:731–739. doi: 10.1007/s00338-007-0320-0
- Ishikura M, Adachi K, Maruyama T (1999) Zooxanthellae release glucose in the tissue of a giant clam, *Tridacna crocea*. *Mar Biol* 133:665–673. doi: 10.1007/s002270050507
- Iwai S, Fujita K, Takanishi Y, Fukushi K (2019) Photosynthetic Endosymbionts Benefit from Host's Phagotrophy, Including Predation on Potential Competitors. *Curr Biol* 29:3114–3119.e3. doi: 10.1016/j.cub.2019.07.074
- Jones VAS, Bucher M, Hambleton EA, Guse A (2018) Microinjection to deliver protein, mRNA, and DNA into zygotes of the cnidarian endosymbiosis model *Aiptasia* sp. *Sci Rep* 8:16437. doi: 10.1038/s41598-018-34773-1

- Kawamura K, Nishitsuji K, Shoguchi E, Fujiwara S, Satoh N (2021) Establishing Sustainable Cell Lines of a Coral, *Acropora tenuis*. *Mar Biotechnol*. doi: 10.1007/s10126-021-10031-w
- Kellogg RB, Patton JS (1983) Lipid droplets, medium of energy exchange in the symbiotic anemone *Condylactis gigantea*: a model coral polyp. *Mar Biol* 75:137–149. doi: 10.1007/BF00405996
- LaJeunesse TC, Parkinson JE, Gabrielson PW, Jeong HJ, Reimer JD, Voolstra CR, Santos SR (2018) Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. *Curr Biol* 28:2570–2580.e6. doi: 10.1016/j.cub.2018.07.008
- Lehnert EM, Mouchka ME, Burriesci MS, Gallo ND, Schwarz JA, Pringle JR (2014) Extensive differences in gene expression between symbiotic and aposymbiotic cnidarians. *G3-GENES GENOM GENET* 4:277–295. doi: 10.1534/g3.113.009084
- Liou H-L, Dixit SS, Xu S, Tint GS, Stock AM, Lobel P (2006) NPC2, the protein deficient in Niemann-Pick C2 disease, consists of multiple glycoforms that bind a variety of sterols. *J Biol Chem* 281:36710–36723. doi: 10.1074/jbc.M608743200
- Lowe CD, Minter EJ, Cameron DD, Brockhurst MA (2016) Shining a Light on Exploitative Host Control in a Photosynthetic Endosymbiosis. *Curr Biol* 26:207–211. doi: 10.1016/j.cub.2015.11.052
- Lu Y, Jiang J, Zhao H, Han X, Xiang Y, Zhou W (2020) Clade-Specific Sterol Metabolites in Dinoflagellate Endosymbionts Are Associated with Coral Bleaching in Response to Environmental Cues. *mSystems* 5:e00765-20. doi: 10.1128/mSystems.00765-20
- Mies M, Sumida PYG, Radecker N, Voolstra CR (2017) Marine Invertebrate Larvae Associated with Symbiodinium: A Mutualism from the Start? doi: 10.3389/fevo.2017.00056
- Muscatine L (1990) The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. *Coral Reefs* 25:75–87
- Muscatine L (1967) Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and tridacna and its control by the host. *Science* 156:516–519. doi: 10.1126/science.156.3774.516
- Muscatine L, Hand C (1958) Direct Evidence for the Transfer of Materials from Symbiotic Algae to the Tissues of a Coelenterate. *Proc Natl Acad Sci USA* 44:1259–1263. doi: 10.1073/pnas.44.12.1259
- Patton JS, Burriss JE (1983) Lipid synthesis and extrusion by freshly isolated zooxanthellae (symbiotic algae). *Mar Biol* 75:131–136. doi: 10.1007/BF00405995
- Rädecker N, Pogoreutz C, Gegner HM, Cárdenas A, Roth F, Bougoure J, Guagliardo P, Wild C, Pernice M, Raina J-B et al. (2021a) Heat stress destabilizes symbiotic nutrient cycling in corals. *Proc Natl Acad Sci USA* 118:e2022653118. doi: 10.1073/pnas.2022653118
- Rädecker N, Pogoreutz C, Gegner HM, Cárdenas A, Perna G, Geißler L, Roth F, Bougoure J, Guagliardo P, Struck U et al. (2021b) Heat stress reduces the contribution of diazotrophs to coral holobiont nitrogen cycling. *ISME J* 1–9. doi: 10.1038/s41396-021-01158-8
- Streamer M, Griffiths D, Thinh L (1988) The products of photosynthesis by zooxanthellae (*Symbiodinium microadriaticum*) of *Tridacna gigas* and their transfer to the host. *Symbiosis* 6:237–252

- Thompson JR, Rivera HE, Closek CJ, Medina M (2015) Microbes in the coral holobiont: partners through evolution, development, and ecological interactions. *Front Cell Infect Microbiol* 4:. doi: 10.3389/fcimb.2014.00176
- Weis VM (2008) Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *J Exp Biol* 211:3059–3066. doi: doi.org/10.1242/jeb.009597
- Whitehead LF, Douglas AE (2003) Metabolite comparisons and the identity of nutrients translocated from symbiotic algae to an animal host. *J Exp Biol* 206:3149–3157. doi: 10.1242/jeb.00539
- Xiang T, Lehnert E, Jinkerson RE, Clowez S, Kim RG, DeNofrio JC, Pringle JR, Grossman AR (2020) Symbiont population control by host-symbiont metabolic interaction in Symbiodiniaceae-cnidarian associations. *Nat Commun* 11:108. doi: 10.1038/s41467-019-13963-z
- Yorifuji M, Yamashita H, Suzuki G, Kawasaki T, Tsukamoto T, Okada W, Tamura K, Nakamura R, Inoue M, Yamazaki M et al. (2021) Unique environmental Symbiodiniaceae diversity at an isolated island in the northwestern Pacific. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 107158. doi: 10.1016/j.ympev.2021.107158

緑藻はどのようにヒドラと共生してきたか

御代川 涼¹, 小早川 義尚², 濱田 麻友子³, 楠見 淳子⁴

¹九州大学大学院 地球社会統合科学府
〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744

²九州大学 基幹教育院
〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744

³岡山大学 自然科学学域 理学部附属牛窓臨海実験所
〒701-4303 岡山県瀬戸内市牛窓町鹿忍 130-17

⁴九州大学 比較社会文化研究院 環境変動部門 生物多様性講座
〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744

How green algae have created a symbiotic relationship with *Hydra*

Ryo Miyokawa¹, Yoshitaka Kobayakawa², Mayuko Hamada³, Junko Kusumi⁴

¹ Graduate School of Integrated Sciences for Global Society, Kyushu University,
Motooka 744, Nishi-ku, Fukuoka, 819-0395, Japan

² Faculty of Arts and Science, Kyushu University,
Motooka 744, Nishi-ku, Fukuoka, 819-0395, Japan

³ Ushimado Marine Institute, Okayama University,
Kashino 130-17, Ushimado, Setouchi, Okayama 701-4303, Japan

⁴ Department of Environmental Changes, Faculty of Social and Cultural Studies,
Kyushu University,
Motooka 744, Nishi-ku, Fukuoka, 819-0395, Japan

Keywords: *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Hydra*, photosymbiosis

DOI: 10.24480/bsj-review.13a3.00221

1. はじめに

刺胞動物は6億年ほど前に左右相称動物との共通祖先から分かれたと考えられており、クラゲ、イソギンチャク、サンゴなど主に海水棲の動物群からなるグループである。サンゴに代表されるように、光合成を行う藻類と共生（細胞内共生）している例が多くみられ、動物と藻類の共生メカニズムの研究材料として注目されている。本稿では、刺胞動物の中でも、長年の間再生の研究材料として用いられてきた淡水棲のヒドラと緑藻の共生について紹介する。以下、現在までのヒドラの解剖学、生態学的知見を紹介するとともに、共生に関連するこれまでの研究を概観する。また、ゲノム・トランスクリプトーム解析を用いた最近の研究から明らかになりつつある共生メカニズムについて、進化的考察を交えて紹介する。

1-1. ヒドラとはどのような動物か

ヒドラ（ヒドラ属 *genus Hydra* に含まれる動物）は、高校の生物の教科書に無性生殖をする動物の例として挙げられることがある、もっぱら出芽によって増殖する淡水に棲む小さな体長1cm前後の刺胞動物（Cnidaria; サンゴ・イソギンチャク、クラゲの仲間）である。放

射相称のイソギンチャクのようなポリプ型の形態で水草などに付着しており、主にミジンコなどのプランクトンを捕食する。ポリプの上端部は頭部と呼ばれ、ドーム型の口丘 (hypostome) の中央に口が開き、その下側に6~10本ほどの放射状に分布する触手 (tentacle) からなる触手環がある。そこから下部は体幹 (body column) と呼ばれる円柱状の構造である。体幹の上から2/3ほどのところで出芽が起こり、その芽体 (bud) は成長すると親個体と同じ構造を形成し、やがて離脱して独立したポリプとなる。下端は足盤 (basal disk) と呼ばれ、そこから分泌した粘液で水草などに付着する。ヒドラの組織構造はシンプルなもの、その体壁は外表面を覆う一層の外胚葉上皮筋細胞 (ectodermal epitheliomuscular cell) 層と胃腔側を覆う一層の内胚葉上皮筋細胞 (endodermal epitheliomuscular cell) 層が細胞外基質の中膠 (mesoglea) によって結びつけられた2層構造から成っている。その上皮細胞の細胞間隙に、刺胞細胞 (nematocyte; ヒドラには4種類の刺胞細胞があり、それぞれ異なる構造と機能を持った刺胞; nematocyst を細胞内に形成している。図1右上) や神経細胞 (neural cell), 腺細胞 (gland cell), そしてそれらの幹細胞である間細胞 (interstitial cell; I-cell) が部位特異的に分布している。有性生殖をする時に出現する生殖細胞も間細胞から分化してくる。刺胞細胞は外胚葉上皮細胞に潜り込んで体表に機械刺激のセンサーである感覚毛 (ニドシル; cnidocil) を体表に出している。触手の表面を覆う上皮細胞はバッテリー細胞と呼ばれ、とりわけ多くの刺胞を取り込んで捕食に使っている (図1右上)。大型の貫通刺胞が発射されると管状の構造をした刺糸が餌となるミジンコなどのクチクラを突き破り毒液を注入する。小型の捲着刺胞が発射されると刺糸が餌に巻き付き捉える。その後、餌から漏出した体液に含まれるグルタチオンなどに反応して、触手を口の方へ曲げ、口が開きそこから餌を胃腔内に取り込む。腺細胞は内胚葉上皮細胞の間に散在し、捕食時に消化酵素を胃腔に放出する (図1右下)。

ヒドラは、アルテミアなどを餌として与えることで小さな容器で容易に飼育・増殖させることができる。1個体のポリプから出芽によって簡単に無性的に増殖するため、多量の単一クローンの個体群を得ることができる。よく知られている通り、ヒドラは再生力が強い。例えば、ポリプをコラゲナーゼ等によって処理して個々の細胞にまで解離しても、その細胞を集めておくとその集塊からポリプが再生してくる。また、ポリプの体幹中央で上下に切断すると上部はその下端に足盤を形成して小型のポリプとして再生し、下部はその上端に頭部を再生する。つまり、典型的な形態調節的再生 (morphallaxis) をする動物として知られている。そのため、その体制や組織構造の簡単さも相まって、ヒドラは発生生物学における細胞分化やパターンフォーメーションの研究材料として使われてきた。

刺胞動物は、刺胞 (nematocyst; ヒドラの刺胞についてはその捕食に関連させて説明したが、私たちがクラゲに刺されるとき実際に私たちの皮膚に刺さるのは発射された刺胞の刺糸。それは中空の管でそこを通過して毒液が注入される) と呼ばれる複雑な細胞内器官を持つ動物群で、およそ1万種が記載されているが、そのほとんどは海棲である。しかし、何故かごく少数のヒドロ虫綱 (Hydrozoa) に属するヒドラと真水クラゲの仲間だけが淡水に進出している (Bridge et al. 1995; Collins 2000, 2002; Collins et al. 2006)。現在記載されているヒドラの種数は100足らずであるが、その分布は広く南極大陸を除く世界中の淡水系に湖沼を中心に棲息している (Jankowski et al. 2008)。日本からも数種のヒドラが記載されている。また、生物の教科書では生活環の項目において刺胞動物は必ずと言って良いほど取り上げられ、ポリプ型だけの花虫綱 (Anthozoa, イソギンチャクやサンゴ)、ポリプ型とクラゲ型を持つ鉢虫類 (Scyphozoa) など多様である。とは言え、有性生殖をするときには、受精卵は

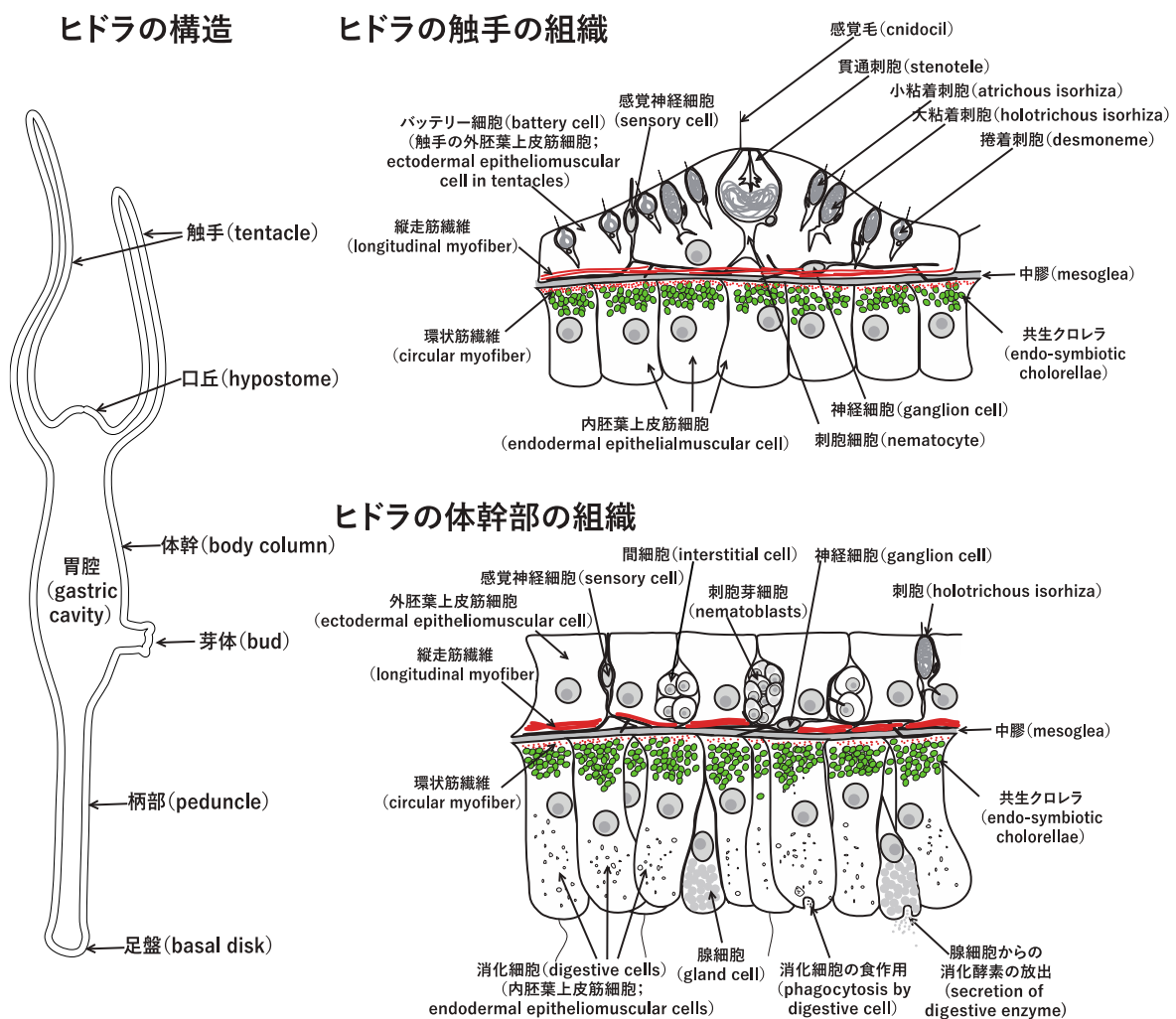


図 1. グリーンヒドラの構造と組織構成

ヒドラは左の図に示すようなポリプ型の着生性の淡水に棲む刺胞動物で、その体壁 (右の図) は、中膠を挟む内外2層の上皮筋細胞層 (上皮細胞と筋細胞の分化はない) から成っている。その間隙に分布する間細胞から刺胞細胞・神経細胞・腺細胞などが分化してくる。触手の外胚葉上皮筋細胞 (右上の図) はその中に多数の刺胞細胞を含み、バッテリー細胞と呼ばれる。

卵割・胞胚形成・原腸形成（その初期発生過程も多様である）を経てプラヌラ幼生となり、その後しばらく遊泳しポリプに変態することがほとんどの刺胞動物で共通して観られる。しかし、ヒドラは *aplanulata* という一群に分類されており (Nawrocki et al. 2013), 有性生殖の際には受精卵はその分泌物によって形成された卵鞘 (embryonic theca) の中で一定しない発生期間（孵化までの期間が数日から1年以上と幅広い）を経た後、直達発生的に小さなポリプが孵化してくる。

1-2. 緑藻とヒドラの共生

ヒドラ属は大きく4つの種群に分類されるが、その系統はまず *viridissima* 種群（グリーンヒドラと総称される）が他の3種群（*braueri* 種群, *oligactis* 種群, *vulgaris* 種群；合わせてブラウンヒドラと総称される）と分岐することが形態的特徴と塩基配列情報に基づく研究によって明らかにされている (Campbell 1983, 1987, 1989; Hemmrich et al. 2007; Kawaida et al. 2010; Martinez et al. 2010; Schwentner and Bosch 2015)。グリーンヒドラは、単細胞緑藻のクロレラが細胞内共生をしていることがこの種群の特徴（共有派生形質 *synapomorphy*）でありヒドラの種を同定するときのキーとされる (Campbell 1983)。人為的に共生クロレラを除去して *apo-symbiotic*（共生体なし）のポリプを作り出し維持することは可能であるが、野外においてクロレラと共生していないポリプ（個体）が発見・報告されたことはない（図2左）。また、その分布は広いが、日本から明確な記録はない。

一方、他の3種群の中では、*vulgaris* 種群と *oligactis* 種群に属する種に於いて野外で緑藻と共生するポリプがいることが日本からだけ報告されている (Ito 1947a,b)。また、その *vulgaris* 種群に観られる共生緑藻は、クロレラではなくクロロコッカムである (Rahat and Reich 1985a, 1986; Rahat and Sugiyama 1993; Kawaida et al. 2013 図2右)。この *vulgaris* 種群の特定の系統とクロロコッカムの共生はグリーンヒドラとクロレラの共生のように安定なものではなく、共生の初期段階（クロロコッカムの寄生？）にあると考えられている

(Ishikawa et al. 2016ab; Miyokawa et al. 2018, 2021)。つまり、「緑藻と動物の共生」という観点から、ヒドラは安定した細胞内共生を維持しているグリーンヒドラ-クロレラの共生系と一部のブラウンヒドラ-クロロコッカムの初期段階にある共生系という2つの発達段階の共生系を持つ興味深い研究対象である (Bosch 2012; Kovacevic 2012; Kobayakawa 2017)。

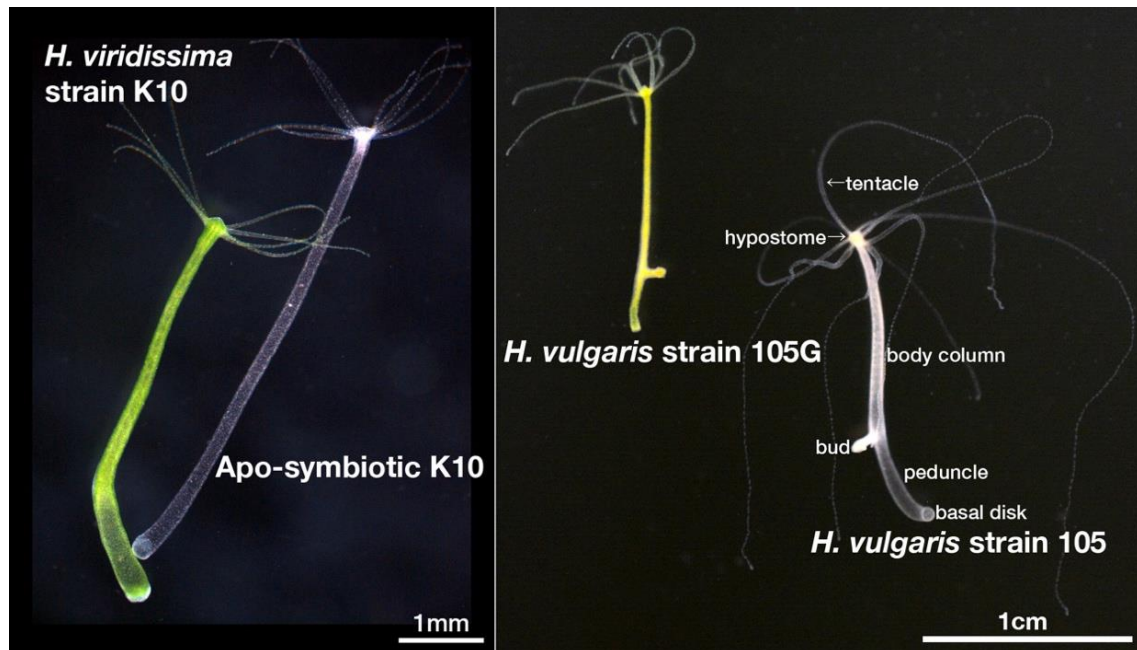


図2. ヒドラと緑藻に観られる2種類の共生

左の写真は、クロレラを細胞内共生させているグリーンヒドラの *H. viridissima* K10 とそれからクロレラを人為的に除去された *Apo-symbiotic* な K10。右の写真は、ブラウンヒドラの *H. vulgaris* 105 とそれに野外でクロロコッカムを細胞内共生させている *H. vulgaris* J10 のから水平伝搬によってクロロコッカムが共生した 105G。

2. ヒドラの2つの共生系

2-1. グリーンヒドラとクロレラの相利共生

さて、ヒドラは、17世紀にレーウエンフック (Antoni van Leeuwenhoek) によって最初に記載されたとされているが、ヒドラ属の記載はリンネ (Carl von Linné) によって1758年になされている。グリーンヒドラの最初の記載は、*Hydra viridissima* Pallas, 1766で (リンネもその直後に *Hydra viridis* Linnaeus, 1767として記載したが、現在ではシノニムとされている)、緑色のヒドラの存在は18世紀半ばから知られていることになる。しかし、その緑色の正体が細胞内共生する緑藻であることが判明し、共生研究の好材料とされるのは、20世紀後半に入ってからである。葉緑体やミトコンドリアの細胞内共生説で有名なマーギュリス (Lynn Margulis) もグリーンヒドラを研究対象としており、インスピレーションの元となったのかもしれない (Thorington and Margulis 1981)。20世紀初頭には、グリーンヒドラから緑色の粒子 (green body) を取り出し、除去するといった報告 (Whitney 1907) があるが、その正体は不明のままであった。

20世紀後半に入るとグリーンヒドラの光合成活性が確認され (Muscatine and Lenhoff 1963)、現在では遺伝子情報も含めて共生体がクロレラであることが判明している

(Douglas and Huss 1986; Huss et al. 1989, 1993/94, 1999; Lewis and Muller-Parker 2004; Kawaida et al. 2013)。グリーンヒドラの内胚葉上皮細胞内に共生体である個々のクロレラが symbiosome (共生胞) と呼ばれる膜で囲まれている。サンゴなどの共生体である褐虫藻も内胚葉細胞内に symbiosome の状態で存在し、刺胞動物における共通性が観察される。グリー

ンヒドラの共生クロレラは細胞の基部側（中膠側）に数十個（その密度は系統によって異なる）偏在している（Muscatine 1974; Habetha et al. 2003; Bosch 2012 ; 図3 K10 & M9）。その偏在はクロレラがヒドラの細胞内においてリソソームの融合による消化を避けることに役立ち、ヒドラに他の藻類が侵入して増殖することを抑制しているという報告がある（McAuley and Smith 1982）。また、一つのポリプに細胞内共生しているクロレラは一種類に限られ、複数種・系統のものが同一ポリプに混在していることはない（Rahat 1985）。つまり、特定のグリーンヒドラの系統には特定のクロレラの系統が共生するという特異性の高い宿主-共生体の組み合わせが形成・維持されている。

共生が相利的であるためには、宿主と共生体が相互に増殖にとっての利点を提供し合うことが重要である。グリーンヒドラとクロレラの共生においては、共生クロレラからマルトースやグルコース 6 リン酸などの糖が宿主であるヒドラの細胞へ移送されること（Muscatine 1965; Cernichiari et al. 1969; Mews 1980; Huss et al. 1993/94），逆にヒドラ側から共生クロレラにアミノ酸が移送されること（Thorington and Margulis 1981; McAuley 1986, 1987, 1991）が報告され、グリーンヒドラとクロレラは相利共生（mutualistic symbiosis）の関係にあることが示されている。実際に、グリーンヒドラは共生クロレラを除去されると飢餓に対する耐性が減少すること（Muscatine and Lenhoff 1965），光条件や給餌条件等にも依存するが共生クロレラを除去されると増殖率が減少すること（Habetha et al. 2003; Ishikawa et al. 2016a）も報告されている。また、ヒドラにとっての利点は単に栄養条件に関わるものだけではなく、金属イオン等の毒性に対する耐性が共生クロレラの存在によって増していることも報告されている（Karntanut and Pascoe 2002, 2005）。一方、共生体のクロレラについてフロリダ産のグリーンヒドラの共生クロレラを単離培養することを試みたがうまくいかず、単離直後のクロレラの微細構造を観察したところウイルスが感染しており、そのウイルスの感染と急激な増殖がクロレラを溶解するという報告がある（Meints et al. 1981）。クロレラはヒドラの細胞内に共生することによってこうしたウイルスの攻撃から守られている可能性も考えられる。さらに、共生クロレラを除去されるとグリーンヒドラは有性生殖時に卵形性が抑制されることも報告されている（Habetha et al. 2003）。

グリーンヒドラとクロレラの共生関係が安定的に維持されるには、ヒドラの細胞内におけるクロレラの密度は過不足ない必要がある。もちろん、共生クロレラの維持に光条件は重要であり、恒暗条件下では共生クロレラは増殖できず、長期にわたると完全に除去されることもある。当然のことながら弱光条件下での飼育ではクロレラの密度は低下する。一方で、ヒドラが十分に給餌されている条件下では共生クロレラの密度が下がり、飢餓条件下では密

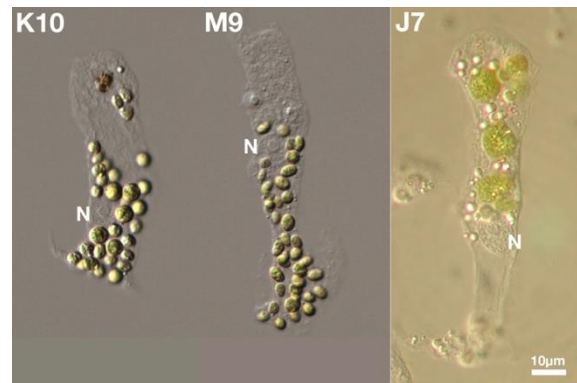


図3. ヒドラの個々の内胚葉上皮筋細胞内に共生する緑藻

K10, M9; グリーンヒドラに共生するクロレラ。系統間でクロレラの形態に違いがある。J7; ブラウンヒドラ, *H. vulgaris* J7に共生するクロロコッカム。N はヒドラの細胞核。

度が上がることが報告されている。また、グリーンヒドラの増殖にとって適切な給餌条件・光条件の下では共生クロレラは過剰に増殖することが示唆されており、何らかのクロレラの増殖を抑制するメカニズムの存在が必要とされるが、その実態は不明である。増殖を抑制すること以外でもヒドラが採餌・消化する過程で共生クロレラを胃腔内に放出し、その数を調整しているという報告もある。また、symbiosome 内の pH 条件がクロレラの増殖に影響するという研究もある (McAuley 1981; Bossert and Dunn 1986; Dunn 1987; Muller-Parker and Pardy 1987; Fishman et al. 2008)。

共生関係の維持のためには、グリーンヒドラの増殖に伴った共生クロレラの世代を越えての垂直伝搬が必要である。無性生殖する場合には、親個体の体幹部の体壁の突出として出芽が起こり、その芽体が成長して形成される新しいポリプの内胚葉上皮細胞内には当然のことながら共生クロレラが受け継がれてゆく。また、有性生殖の場合には、卵形成の過程で卵細胞内にクロレラが取り込まれて経卵的に次世代へと共生体が垂直伝搬してゆく (Muscatine and McAuley 1983; Campbell 1990; Habetha et al. 2003; Bosch 2012; Kawaida et al. 2013)。ヒドラの卵形成過程では、外胚葉上皮の細胞間隙に間細胞が集合し、その中に卵母細胞が出現し、最終段階では周りの間細胞を取り込んで急激に成長し卵細胞と成る。この時、内胚葉上皮に細胞内共生しているクロレラがどのように卵母細胞へと取り込まれるのかは興味深いですが、その詳細は不明である。

さて、このように密接なグリーンヒドラとの相利共生関係を維持している共生クロレラはヒドラの細胞外で自由生活をすることが可能なのか？ これまで、いくつかのグリーンヒドラの共生クロレラを単離培養したという報告がある (e.g. Jolley and Smith 1978)。一方で、共生クロレラの長期にわたる単離培養は難しく未だ明確な成功例はないとする報告もある (e.g. Habetha and Bosch, 2005)。Kovacevic et al. (2010), Kovacevic (2012) は、グリーンヒドラの共生クロレラ複数系統を単離培養し継続培養できる 3 株を得て、その 18SrDNA の塩基配列情報に基づく系統解析を報告した。しかし、彼らは単離培養した株の由来元であるグリーンヒドラ内にいるクロレラを直接抽出してその塩基配列情報との比較による確認は行っていない。その報告に対して Kobayakawa (2017) は、これまで報告されたの共生クロレラ (グリーンヒドラ, ミドリゾウリムシなどの原生動物などに共生している系統) の 18SrDNA の塩基配列情報に基づく系統解析を行い、それらが *Chlorella* 属とその近縁系統とからなる単一のクレードに含まれることを示したが、Kovacevic et al. (2010), Kovacevic (2012) が報告した単離培養した 3 系統はそのクレードに含まれなかった。以上のことから、グリーンヒドラに共生しているクロレラは自由生活に戻ることはもはや困難であると推察される。それは、以下に述べるグリーンヒドラ系統 (*viridissima* 種群) の起源の古さとも整合する。

2-2. グリーンヒドラとクロレラの共生の起源と進化

クロレラには多くの共生性の種が知られており、上記の通りグリーンヒドラやミドリゾウリムシの共生クロレラに加え、海綿や扁形動物、太陽虫やアメーバなどの原生物に共生する種も見られる。これらの共生クロレラは多系統であり、共生性は独立に複数回出現したと考えられている (Hoshina et al. 2005; Hoshina and Imamura 2008; Kawaida et al. 2013)。グリーンヒドラとクロレラの共生の起源については、分子系統解析のデータが得られるようになって複数起源を示唆するデータ解析の報告 (Huss et al. 1993/94; Rajević et al. 2015) や単一起源と共種分化・共進化を示唆するデータ解析の報告 (Kawaida et al. 2013) が示されており、興味深い。複数起源を示唆する根拠は、複数系統のグリーンヒドラに共生するクロレラに自由生活する非共生クロレラを含めた分子系統解析を行った結果、グリーンヒドラに共生するクロレラが単系統群を形成しなかったこととされている。一方、単一起源を示唆する根拠としては、複数系統のグリーンヒドラの宿主ヒドラとそれぞれの共生体クロレラの分子系統解析を行った結果、その系統樹の分岐パターンが一致することが上げられている。また、グリーンヒドラの共生クロレラが単系統とならないことについては、共生の初期段階では一旦共生し

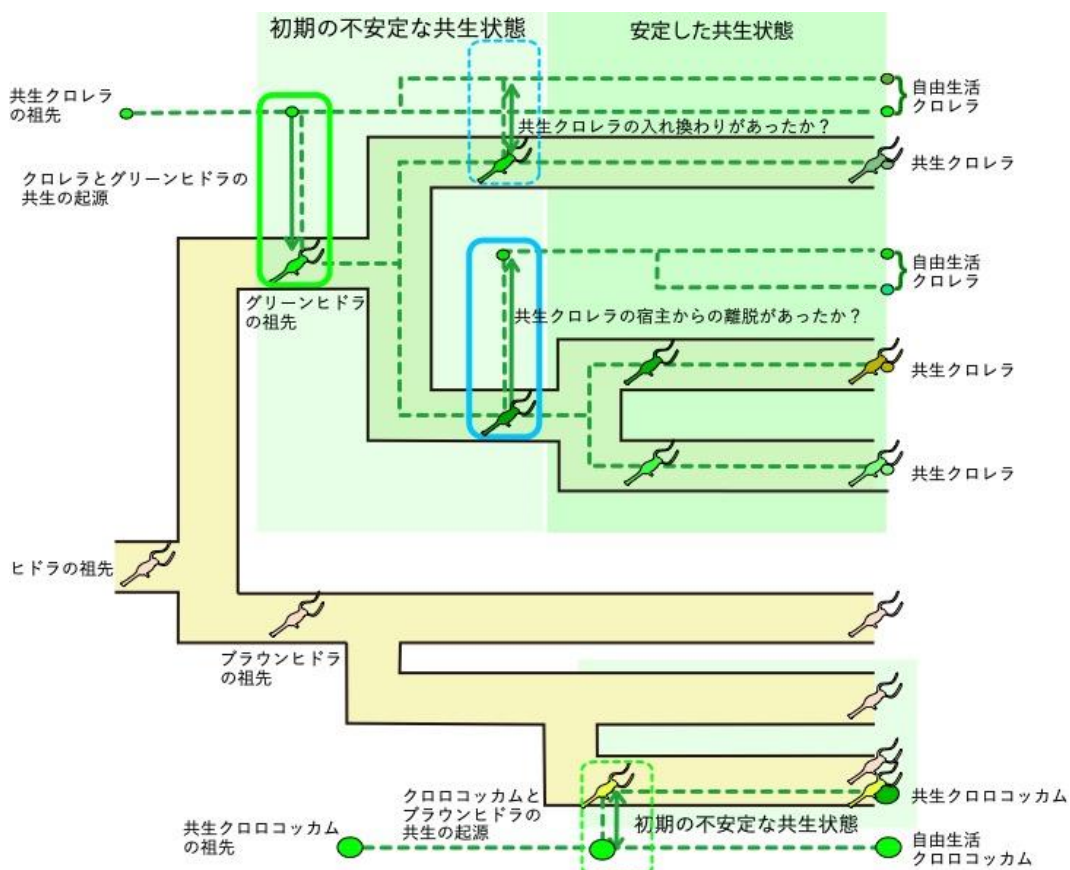


図4. 緑藻とヒドラの共生の起源と進化

グリーンヒドラとクロレラの共生の起源については諸説があるが、単一起源を考えてその後の共進化・共種分化を考えたモデル。共生の起源は古く、現在ではその共生関係は宿主と共生体相互にとって不可欠なものとなっている。クロロコッカムとブラウンヒドラの一部の系統との共生は、それとは全く別に後代に起こり、未だ未成熟で不安定な状態にあると考えられる。

たクロレラがヒドラから抜け出して自由生活に戻った可能性を上げている (図 4)。現生のグリーンヒドラにおいても、人為的に共生クロレラを除去した *apo-symbiotic* なグリーンヒドラに他系統のグリーンヒドラの共生クロレラや自由生活をしているクロレラを導入する実験が行われている。その結果から、グリーンヒドラに共生しているクロレラは本来の宿主ではない他系統の *apo-symbiotic* なグリーンヒドラとも共生関係を維持できること (Kawaida et al. 2013)、自由生活をしているクロレラでも酸性条件に耐性を持つ系統のクロレラは共生関係を維持できることが報告されている (Rahat and Reich 1984, 1985b; Kessler et al. 1988; Huss et al. 1993/94)。一方で、ブラウンヒドラの 3 種群のヒドラには、クロレラを人為的に導入し共生状態を維持することはできないと報告されている (Rahat and Reich 1986)。

宿主のヒドラと共生体の組み合わせに関して、グリーンヒドラのフロリダ系統とイギリス系統との間で共生クロレラを交換移植した実験の報告がある (Pardey 1976)。フロリダ系統のグリーンヒドラに共生しているクロレラはイギリス系統のグリーンヒドラに導入されてもその形態に変化がなかったが、イギリス系統のグリーンヒドラに共生しているクロレラはフロリダ系統のグリーンヒドラに導入されると形態変化を起こしフロリダ系統のグリーンヒドラに本来共生していたクロレラと類似するようになった。また、筆者らはスイス系統のグリーンヒドラ (K10) とイスラエル系統のグリーンヒドラ (M9) の間で共生クロレラの交換実験を行い、K10 のグリーンヒドラに M9 のクロレラを共生させるとヒドラの細胞内においてクロレラが個々に単離されず集塊を作ることや、宿主のヒドラの刺胞が減少し増殖率が下がることなどの変化が起こることを観察している。しかし、M9 のグリーンヒドラに K10 のクロレラを共生させた場合には、そのようなクロレラの集塊や宿主の M9 のヒドラの変化は観察されなかった。この時、光学顕微鏡レベルでの観察ではクロレラの形態に宿主が替わったことに因る変化はなかった。これらの報告から、グリーンヒドラに共生するクロレラは、グリーンヒドラであれば宿主の系統が変わっても共生関係を維持することはできるが、そこには宿主・共生体ともに微妙な変化が起こる場合があり、自然状態では特定のグリーンヒドラの系統には特定のクロレラの系統が共生するという特異性の高い宿主-共生体の組み合わせが維持されてきたことが示唆される。

以上のことから、グリーンヒドラの祖先とクロレラの共生によってグリーンヒドラ (*viridissima* 種群) が他のブラウンヒドラの 3 種群と分岐した後に宿主ヒドラと共生体クロレラの共種分化・共進化が起こったとしても、共生状態が安定しない初期においてはある系統において共生状態の消失や他系統のクロレラの再共生が起こったことも考えられる。グリーンヒドラは *vulgaris* 種群とともに特に分布が広く、且つ、種・系統も多い。また、*viridissima* 種群内での種・系統の分岐も古く 1 億年以前には種群内での種分化が始まったと推測されている (Kawaida et al. 2010; Schwentner and Bosch 2015)。今後、より多くの系統を対象に宿主と共生体の分子系統解析を行うこと、共生体の交換実験による組み合わせ特異性の解析をより詳細に行うことなどが待たれる。

2-3. ブラウンヒドラとクロロコッカムの共生

これまで述べてきたようにグリーンヒドラにとってクロレラとの共生は不可欠のものとなっている。しかし、他の3種群から成るブラウンヒドラにおいてはクロレラとの共生はこれまで全く報告されていない。また、人為的にクロレラをブラウンヒドラに導入し共生させようとした結果、共生関係が成り立たったという報告はない。しかし、先述したように *vulgaris* 種群と *oligactis* 種群に属する種で緑藻と共生するポリプがいることが報告されており (Ito 1947ab), その *vulgaris* 種群に観られる共生緑藻はクロロコッカムである (Rahat and Reich 1985a, 1989; Kawaida et al. 2013; 図2右)。グリーンヒドラの場合と同様に, *vulgaris* 種群のポリプに共生するクロロコッカムは内胚葉上皮筋細胞内に細胞内共生している。しかし, 細胞内における分布と密度はグリーンヒドラに共生するクロレラとは異なり, 個々のクロロコッカムはクロレラよりも大きく, 細胞全体に分布しており, その数も10足らずである (図3J7)。この特定の *vulgaris* 種群のヒドラに共生するクロロコッカムを他の系統のヒドラに導入すると共生関係の成立する系統としない系統があることが示されている (Rahat and Reich 1986)。さらに, 興味深いことに内胚葉上皮と外胚葉上皮が異なるキメラの *vulgaris* 種群のヒドラを作成した場合, 内胚葉上皮の由来がクロロコッカムと共生できる系統のヒドラ由来の場合は外胚葉が共生できない系統のヒドラ由来であっても共生が成立するが, 逆の場合は成立しないことが報告されている (Rahat and Sugiyama 1993)。この共生クロロコッカムの単離培養に成功したとの報告もあり, その飼育条件を変えることによって遊走子 (zoospore) を形成するとの報告がある (Rahat and Reich 1989, 1991)。Rahat and Reich は, これらのことから日本の野外におけるクロロコッカムを細胞内共生させている *vulgaris* 種群のヒドラの生息地では, 自由生活をするクロロコッカムがいるのではないかと示唆している。最近, 実際に実験室内の飼育において共生クロロコッカムが飼育液を介して水平伝搬することが確認されている (Miyokawa et al. 2018)。このクロロコッカムと *vulgaris* 種群のヒドラの共生については, 以下に紹介するように, 宿主側のクロロコッカムの共生時と非共生時におけるトランスクリプトームの比較解析が進められている (Ishikawa et al. 2016b; Miyokawa et al. 2021)。

3. ゲノム・トランスクリプトーム解析が紐解くヒドラ・緑藻の共生システム

3-1. 近年の共生性・非共生性刺胞動物, クロレラ, 緑藻のゲノム解析

2000年代後半に次世代シーケンサーが登場したことで, 非モデル生物でもゲノム・トランスクリプトーム解析が盛んに行われるようになった。共生生物もその例外ではなく, ゲノムから共生関係が理解されつつある。ブラウンヒドラ *H. vulgaris* 105 は古くから発生や再生のモデル動物であり, 2010年にゲノムが解読されていたが, グリーンヒドラでも *H. viridissima* A99 とその共生クロレラ *Chlorella* sp. A99 のゲノムが解読された (Hamada et al. 2018, 2020)。クロレラでは, ミドリゾウリムシの共生クロレラ *Chlorella variabilis* NC64A (Blanc et al. 2010) や *Micractinium conductrix* SAG 241.80 (Arriola et al. 2018), 非共生性のいくつかの種でゲノム情報が公開されている。このような共生性・非共生性の近縁種のゲノム情報

も利用した比較ゲノム解析によって、共生生物の普遍的特性やそれぞれの共生生物種の特異性を明らかにすることが可能となった。

3-2. ブラウンヒドラと共生クロロコッカムのトランスクリプトーム解析

日本で発見されたクロロコッカムと共生する *H. vulgaris* J7 および J10 では、共生時に飢餓耐性が減少すること報告されている (Ishikawa et al. 2016a)。また、恒暗条件で共生クロロコッカムが消失することや、明所下において必ずしも共生ヒドラの増殖が活発になっていないことを考えると (Ishikawa et al. 2016ab; Miyokawa et al. 2018, 2021), ブラウンヒドラと共生クロロコッカムの間には、グリーンヒドラと共生クロレラ間にみられるような栄養面での互恵的な依存関係が成立しているわけではなく、むしろ共生クロロコッカムがヒドラを寄主として利用している状態に近いのかもしれない。

しかし、前述した共生クロロコッカムの水平伝搬の効率は、*vulgaris* 種群内の系統間で異なっており、これは一方的にクロロコッカムが細胞内共生しているだけではなく、ヒドラ側にも共生クロロコッカムを受け入れ維持するメカニズムがあることを示唆している

(Miyokawa et al. 2018)。例えば、J7, J10 と系統的に近縁な 105 を J10 と同じ容器で飼育すると、30%の割合で 105 のポリプが共生クロロコッカムを獲得し、長期にわたって共生状態が維持されるのに対して、*vulgaris* 種群内の異なるサブグループの AEP, K6 では水平伝搬の割合は 5~10%にとどまる。この結果は、共生クロロコッカムを直接導入した実験結果とも一致する (Rahat and Reich 1986; Ishikawa et al. 2016b)。また、共生藻の獲得、維持に系統的な偏りがあることから、J7, J10 や 105 が属する系統では新たに共生系が構築されつつあるとも考えられる (Ishikawa et al. 2016b; Miyokawa et al. 2018)。

これを裏付けるように、J7 のトランスクリプトーム解析では、グリーンヒドラに比べると弱いものの、共生時において活性酸素除去に働くペルオキシダーゼ活性をもつ遺伝子の発現が増加することが報告されており、共生状態の維持に貢献していると考えられる (Ishikawa et al. 2016a)。J10 から飼育液を介した水平伝播により共生クロロコッカムを新たに獲得した 105G では、非共生ヒドラ (105) に比べ体サイズが小さくなるものの飼育環境下で安定して共生が維持される (図 5 上, Miyokawa et al. 2018)。この 105G のトランスクリプトーム解析の結果、先天性免疫応答に関与すると考えられるラムノース結合レクチンの遺伝子やリソソ-

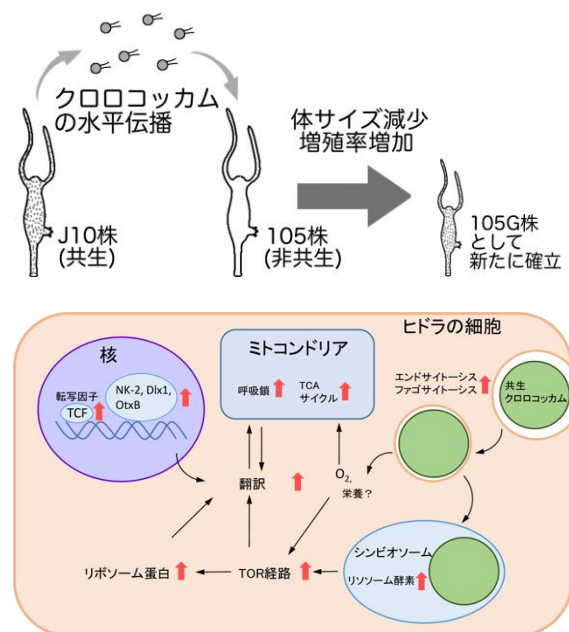


図 5. 水平伝搬により共生クロロコッカムを獲得したヒドラの遺伝子発現解析

新たに確立した共生ヒドラ 105G では、共生システムに関連すると考えられる遺伝子群の発現変動が起こっていた。(Miyokawa et al. 2021 より転載)

ム酵素の遺伝子発現増加、刺胞に関連する遺伝子の発現減少など、共生と関連すると考えられる遺伝子群において J7 と共通する発現変動が見られた (図 5 下, Miyokawa et al. 2021)。それに加え、共生時における翻訳や呼吸系に関連する遺伝子の発現増加など、グリーンヒドドラや J7 とは異なる遺伝子発現変動も見出されており、細胞内共生が確立する初期の状態では、安定した共生系とは異なる遺伝子発現パターンを持つことを示唆している。特に、細胞代謝の制御が変化していることは非常に興味深いものの、この変化が共生メカニズムとどう関わるのかは未解明のままである。また、ブラウンヒドドラとクロロコッカムの共生系については、宿主側の解析が進んでいる一方で、共生時にクロロコッカムがどのような応答を行なっているのかは全く明らかになっていない。ブラウンヒドドラとクロロコッカムの共生系における共生の成立、維持機構に関わる因子の解明には、今後の共生クロロコッカムのゲノム解析や詳細なトランスクリプトーム解析が待たれるところである。

3-3. グリーンヒドドラと共生クロレラのゲノム・トランスクリプトーム解析

グリーンヒドドラの共生系では、*H. viridissima* A99 とその共生クロレラのゲノム・トランスクリプトーム解析が行われ、その結果は、ヒドドラ-共生クロレラ間の栄養面での依存関係を明確に反映していた (Hamada et al. 2018)。通常の共生状態のグリーンヒドドラと、共生藻の除去や暗所飼育、光合成阻害剤処理を行ったグリーンヒドドラの遺伝子発現を比較したところ、共生クロレラから光合成産物であるマルトースがグリーンヒドドラに供給されることで、グリーンヒドドラのグルタミン合成酵素などの遺伝子発現が上昇することが明らかになった。このことは、クロレラからヒドドラに光合成産物が供給されることで、ヒドドラのアミノ酸合成が活性化され、それをクロレラに窒素源として供給するというギブ&テイクの関係があることを示唆している (図 6)。また、人工的にゾウリムシの共生クロレラを共生させたグリーンヒドドラではこのような遺伝子発現変化は起こらず、この相利的關係には種特異性があると考えられる。

この共生クロレラのゲノムを解析したところ、驚くべきことに、一般に植物では窒素代謝に重要な役割を果たすことが知られている亜硝酸還元酵素や硝酸トランスポーターの遺伝子が欠失していることがわかった。このような硝酸同化経路の退化は、この共生クロレラがヒドドラの体外では生きられず、培養も困難である理由の一つであろう。その一方、低分子の中性アミノ酸を取り込むアミノ酸トランスポーター遺伝子が他の緑藻類に比べて多く、ヒドドラから供給されるグルタミンなどのアミノ酸を効率的に取り込むことが可能であると考えら

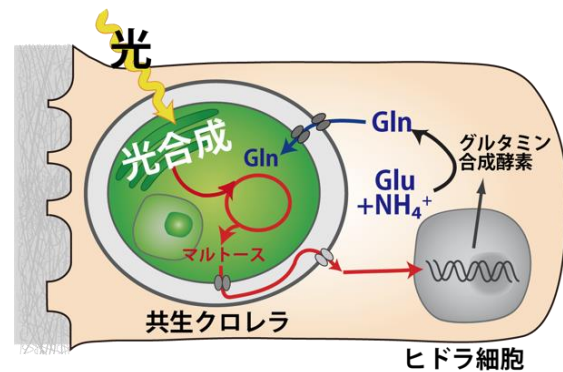


図6 ヒドドラ細胞内における共生クロレラとの相互作用

共生クロレラは光合成産物としてマルトースを合成し、ヒドドラに供給する。マルトースはヒドドラのグルタミン合成酵素の遺伝子発現を上昇させ、クロレラにグルタミンが栄養として供給される。

れる。このアミノ酸トランスポーター遺伝子はクロレラクレードで共通で多い傾向があり、クロレラ共通祖先で既に遺伝子重複によりこのような遺伝子が増加していたと考えられる。このことは、クロレラクレードで独立かつ頻繁に共生性が出現した理由かもしれない (図7)。ゾウリムシの共生クロレラ *Chlorella variabilis* NC64A も *Chlorella* sp. A99 と同様にアミノ酸要求性である。硝酸同化遺伝子の欠失は見られないが、自由生活クロレラで見られる硝酸塩による硝酸還元酵素や亜硝酸還元酵素の活性の上昇が起こらないことから、これらの遺伝子調節領域に変異がある可能性が示唆されている (Kamako et al. 2005)。*Chlorella variabilis* NC64A と *Chlorella* sp. A99 は系統的に離れており、これらで見られる硝酸同化システムの退化は、類似の共生環境中でそれぞれ独立に起こった収束進化であろう (図7)。

同様に、ホストの *H. viridissima* A99 でも失われている遺伝子を探したが、今のところ主要な代謝経路で失われている遺伝子は見つかっていない。逆に、多く存在する遺伝子を探したところ、細胞内異物認識レセプターとして自然免疫に関わることが知られている Nod-like

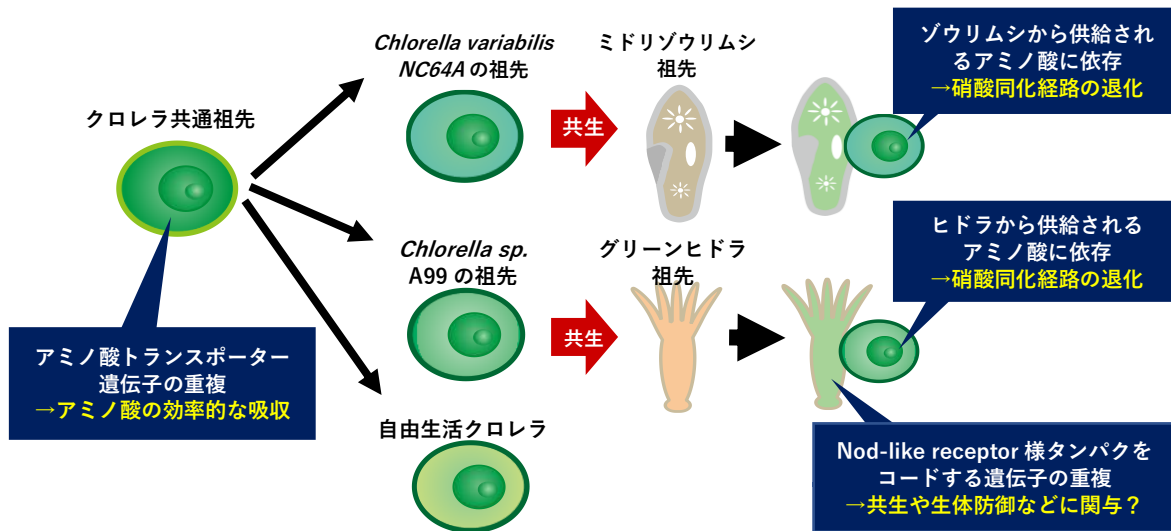


図7 ヒドラークロレラ共生進化の道筋

クロレラの共通祖先において、アミノ酸トランスポーター遺伝子の重複が起こり、効率的なアミノ酸の取り込みが可能となった。このことは細胞内での共生生活に適した性質であったと考えられる。その後、ヒドラやゾウリムシなどとの共生生活を行うものや遊泳生活を続けるものへと種分化した。共生クロレラでは、ホストから供給される栄養であるアミノ酸に依存した結果、エネルギーコストのかかる硝酸同化経路は退化してしまったのであろう。

receptor (NLR) に似たタンパクをコードする遺伝子が多く見つかった (Hamada et al. 2020)。NLR 遺伝子の大規模な重複はサンゴ *Acropora digitifera* でも特異的に見られたことから (Hamada et al. 2013)、共生性刺胞動物で共通の特徴であると考えられる。その機能は未だ不明であるが、共生や生体防御など独自の環境応答機構が存在する可能性がある。

以上のようにグリーンヒドラは藻類との共生という生存戦略で繁栄し、そのユニークな生態はゲノム中に刻まれていることが明らかになった。一方、ブラウンヒドラの *vulgaris* 種群や *oligactis* 種群は体の大型化や捕食器官である刺胞の能力のアップによって、捕食能力を増加させる戦略を取ったと考えられる。このことからボディプランに関わる遺伝子の違いが予想されたが、意外なことに体サイズに関係することが知られている Wnt や TGF-beta

pathway などの転写因子・シグナル分子をコードする遺伝子の構成はブラウンヒドラとグリーンヒドラで違いがなく (Mortzfeld et al. 2019; Hamada et al. 2020) , 未だ体サイズの違いを生み出す原因はわからない。今後は遺伝子構成だけでなく、遺伝子発現調節メカニズム等も調べることで、異なる生存戦略を取るに至った種分化メカニズムも解明できるかもしれない。今や共生生物を含め、多くの非モデル生物のゲノムも解読され、大規模な比較解析が可能となった。これを利用することで、共生を含め、生物の生存戦略の普遍性や多様性がより詳細に明らかになることだろう。

引用文献

- Arriola MB, Velmurugan N, Zhang Y, Plunkett MH, Hondzo H, Barney BM (2018) Genome sequences of *Chlorella sorokiniana* UTEX 1602 and *Micractinium conductrix* SAG 241.80: implications to maltose excretion by a green alga. *Plant J* 93: 566-586
- Blanc G, Duncan G, Agarkova I, Borodovsky M, Gurnon J, Kuo A, Lindquist E, Lucas S, Pangilinan J, Polle J et al. (2010) The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. *Plant Cell* 22: 2943-55
- Bosch, TCG (2012) What Hydra Has to Say About the Role and Origin of Symbiotic Interactions. *Biol Bull* 223: 78-84
- Bossert P and Dunn KW (1986) Regulation of intracellular algae by various strains of the symbiotic *Hydra viridissima*. *J Cell Sci* 85: 187-19
- Bridge D, Cunningham CW, DeSalle R, Buss LW (1995) Class-level relationships in the phylum Cnidaria: molecular and morphological evidence. *Mol Biol Evol* 12: 679-689
- Campbell RD (1983) Identifying *Hydra* species. In: Lenhoff HM (ed) *Hydra: Research Methods*, Plenum Press, New York, pp 9-28
- Campbell RD (1987) A new species of *Hydra* (Cnidaria: Hydrozoa) from North America with comments on species clusters within the genus. *Zool J Linn Soc-Lond* 91: 253-263
- Campbell RD (1989) Taxonomy of the European *Hydra* (Cnidaria: Hydrozoa): a re-examination of its history with emphasis on the species *H. vulgaris* Pallas, *H. attenuata* Pallas and *H. circumcincta* Schulze. *Zool J Linn Soc-Lond* 95: 219-244
- Campbell RD (1990) Transmission of symbiotic algae through sexual reproduction in *hydra*: movement of algae into the oocyte. *Tissue & Cell* 22: 137-147
- Cernichiari E, Muscatine L, and Smith DC (1969) Maltose Excretion by the Symbiotic Algae of *Hydra viridis*. *Proc R Soc Lond B* 173: 557-576
- Cook CB (1981) Adaptations to endosymbiosis in green-hydra. *Ann NY Acad Sci* 361: 273-283
- Collins AG (2000) Towards understanding the phylogenetic history of Hydrozoa: hypothesis testing with 18S gene sequence data. *Sci Mar* 64: 5-22
- Collins AG (2002) Phylogeny of the Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. *J Evol Biol* 15: 418-432

- Collins AG, Schuchert P, Marques AC, Jankowski T, Medina, M, Schierwater B (2006) Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Syst Biol* 55: 97–115
- Douglas AE and Huss VAR (1986) On the characteristics and taxonomic position of symbiotic *Chlorella*. *Arch Microbiol* 145: 80-84
- Dunn K (1987) Growth of endosymbiotic algae in the green-hydra, *Hydra viridissima*. *J Cell Sci* 88: 571-578
- Fishman Y, Zlotkin E, Sher D (2008) Expulsion of symbiotic algae during feeding by the green-hydra - a mechanism for regulating symbiont density? *PLoS One* 3: e2603
- Habetha M, Erxleben FA, Neumann K, Bosch TCG (2003) The *Hydra viridis*/*Chlorella* symbiosis. Growth and sexual differentiation in polyps without symbionts. *Zoology* 106: 101–108
- Habetha M, Bosch TCG (2005) Symbiotic *Hydra* express a plant-like peroxidase gene during oogenesis. *J Exp Biol* 208: 2157-2164
- Hamada M, Shoguchi E, Shinzato C, Kawashima T, Miller DJ, Satoh N (2013) The complex NOD-Like receptor repertoire of the coral *Acropora digitifera* includes novel domain combinations. *Mol Biol Evol* 30: 167-176
- Hamada M, Satoh N, Khalturin K (2020) A reference genome from the symbiotic Hydrozoan, *Hydra viridissima*. *G3* 10: 3883-3895
- Hamada M, Schröder K, Bathia J, Kürn U, Fraune S, Khalturina M, Khalturin K, Shinzato C, Satoh M, Bosch TCG (2018) Metabolic co-dependence drives the evolutionarily ancient *Hydra*-*Chlorella* symbiosis. *eLife* e35122
- Hemrich G, Anokhin B, Zacharias H, Bosch TCG (2007) Molecular phylogenetics in *Hydra*, a classical model in evolutionary developmental biology. *Mol Phylogenet Evol* 44: 281–290
- Hoshina R, Imamura N (2008) Multiple Origins of the Symbioses in *Paramecium bursaria*. *Protist* 159: 53-63
- Hoshina R, Kato Y, Kamako S, Imamura N (2005) Genetic Evidence of “American” and “European” Type Symbiotic Algae of *Paramecium bursaria*. *Ehrenberg Plant Biology* 7: 526–532
- Huss VAR, Rahat M, Kessler E (1989) DNA base compositions of "zoochlorellae" hosted by three strains of *Hydra viridis* show them to be different. *Endocytobiosis & Cell Res* 6: 109-112
- Huss VAR, Holweg C, Seidel B, Reich V, Rahat M, Kessler E (1993/94) There is an ecological basis for host/symbiont specificity in *Chlorella*/*hydra* symbioses. *Endocytobiosis & Cell Res* 10: 35-46
- Huss VAR, Frank C, Hartmann EC, Hirmer M, Kloboucek A, Seidel BM, Wenzeler P, Kessler E (1999) Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella sensulato* (Chlorophyta). *J Phycol* 35: 587-593
- Ishikawa M, Yuyama I, Shimizu H, Nozawa M, Ikeo K, Gojobori T (2016a) Different Endosymbiotic Interactions in Two *Hydra* Species Reflect the Evolutionary History of Endosymbiosis. *Genome Biol Evol* 8: 2155–2163
- Ishikawa M, Shimizu H, Nozawa M, Ikeo K, Gojobori T (2016b) Two-step evolution of endosymbiosis between *hydra* and algae. *Mol Phylogenet Evol* 103: 19–25

- Ito T (1947a) A new fresh-water polyp, *Hydra magnipapillata*, N. SP. from Japan. Science reports of The Tohoku Univ: 4th Ser. (Biology), 18: 6–10
- Ito T (1947b) Description of a new *Pelmatohydra* from Japan. Science reports of The Tohoku Univ: 4th Ser. (Biology), 18:11–16
- Jankowski T, Collins AE, Campbell R (2008) Global diversity of inland water cnidarians. *Hydrobiologia* 595: 35–40.
- Jolley E, Smith DC (1978) The green-hydra symbiosis. I. Isolation culture and characteristics of the *Chlorella* symbiont of “European” *Hydra viridis*. *New Phytol* 81: 637-645
- Kamako S, Hoshina R, Ueno S, Imamura, N (2005) Establishment of axenic endosymbiotic strains of Japanese *Paramecium bursaria* and the utilization of carbohydrate and nitrogen compounds by the isolated algae. *Eur J Protistol* 41:193–202
- Karntanut W, Pascoe D (2002) The toxicity of copper, cadmium and zinc to four different *Hydra* (Cnidaria: Hydrozoa). *Chemosphere* 47: 1059–1064
- Karntanut W, Pascoe D (2005) Effects of removing symbiotic green algae on the response of *Hydra viridissima* (Pallas 1776) to metals. *Ecotoxicol Environ Safety* 60: 301–305
- Kawaida H, Shimizu H, Fujisawa T, Tachida H, Kobayakawa Y (2010) Molecular phylogenetic study in genus *Hydra*. *Gene* 468: 30–40
- Kawaida H, Ohba K, Koutake Y, Shimizu H, Tachida H, Kobayakawa Y (2013) Symbiosis between hydra and chlorella: Molecular phylogenetic analysis and experimental study provide insight into its origin and evolution. *Mol Phylogenet Evol* 66: 906-914
- Kessler E, Huss VAR, Rahat M (1988) Species-specific ability of *Chlorella* strains (Chlorophyceae) to form stable symbioses with *Hydra viridis*. *Plant Syst Evol* 160: 241- 246
- Kobayakawa Y (2017) SYMBIOSIS BETWEEN GREEN ALGAE AND HYDRA. In: Grube M, Seckbach J, Muggia L (ed) *ALGAE and CYANOBACTERIA SYMBIOSES*, Chapter11, World Scientific, pp 347–369 https://doi.org/10.1142/9781786340580_0011
- Kovacevic G, Franjevic D, Jelencic B, Kalafatic M (2010) Isolation and cultivation of endosymbiotic algae from green-hydra and phylogenetic analysis of 18S rDNA sequences. *Folia biologica* (Kraków) 58: 135-143
- Kovacevic G (2012) Value of the *Hydra* model system for studying symbiosis. *Int J Dev Biol* 56: 627-635
- Lewis LA, Muller-Parker G (2004) Phylogenetic placement of "zoochlorellae" (Chlorophyta), algal symbiont of the temperate sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Biol Bull* 207: 87-92
- Martinez DE, Iñiguez AR, Percell KM, Willner JB, Signorovitch J, Campbell RD (2010) Phylogeny and biogeography of *Hydra* (Cnidaria: Hydridae) using mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 57: 403–410
- McAuley PJ (1981) Control of cell division of the intracellular chlorella symbionts in green-hydra. *J Cell Sci* 47: 197-206
- McAuley PJ, Smith DC (1982) The green-hydra symbiosis. VII. Conservation of the host cell habitat by the symbiotic algae. *Proc R Soc Lond B* 216: 415-426

- McAuley PJ (1986) Glucose uptake by symbiotic *Chlorella* in the green-hydra symbiosis. *Planta* 168: 523-529
- McAuley PJ (1987) Quantitative estimation of movement of an amino acid from host to *Chlorella* symbionts in green-hydra. *Biol Bull* 173: 504-512
- McAuley PJ (1991) Amino acids as a nitrogen source for *Chlorella* symbiotic with green-hydra. *Hydrobiologia* 216/217: 369-376
- Meints RH, Van Etten JL, Kuczmarski D, Lee K, Ang B (1981) Viral Infection of the Symbiotic *Chlorella*-like Alga Present in *Hydra viridis*. *Virology* 113: 698-703
- Mews LK (1980) The green-hydra symbiosis. III. The biotrophic transport of carbohydrate from alga to animal. *Proc R Soc Lond B* 209: 377-401
- Miyokawa R, Tsuda T, Kanaya HJ, Kusumi J, Tachida H, Kobayakawa Y (2018) Horizontal Transmission of Symbiotic Green Algae Between Hydra Strains. *Biol Bull* 235: 113-122
- Miyokawa R, Kanaya HJ, Itoh TQ, Kobayakawa Y, Kusumi J (2021) Immature symbiotic system between horizontally transmitted green algae and brown hydra. *Scientific Reports* 11: Article number 2921
- Mortzfeld BM, Taubenheim J, Klimovich AV, Fraune S, Rosenstiel P, Bosch TCG (2019) Temperature and insulin signaling regulate body size in *Hydra* by the Wnt and TGF-beta pathways. *Nat Commun* 10: 3257
- Muscatine L, Lenhoff HM (1963) Symbiosis: On the Role of Algae Symbiotic with *Hydra*. *Science* 142: 956-958
- Muscatine L (1965) Symbiosis of hydra and algae. III Extracellular products of the algae. *Comp. Biochem Physio* 16: 77-92
- Muscatine L, Lenhoff HM (1965) Symbiosis of hydra and algae. II. Effects of limited food and starvation on growth of symbiotic and aposymbiotic hydra. *Biol Bull* 129: 316-328
- Muscatine L (1974) Endosymbiosis of cnidarians and algae. In: Lenhoff HM, Muscatine L (eds) *Coelenterate Biology: Reviews and New Perspectives*, Academic Press, New York, pp 359–395
- Muscatine L, McAuley PJ (1983) Transmission of symbiotic algae to eggs of green-hydra. *Cytobios* 33: 111–124
- Muller-Parker G, Pardy RL (1987) Response of green-hydra to feeding and starvation at four irradiances. *Biol Bull* 172: 46-60
- Nawrocki AM, Collins AG, Hirano YM, Schuchert P, Cartwright P. (2013) Phylogenetic placement of *Hydra* and relationships within *Aplanulata* (Cnidaria: Hydrozoa). *Mol Phylogenet Evol* 67: 60–71
- Pardy RL (1976) The morphology of green-hydra endosymbionts as influenced by host strain and host environment. *J Cell Sci* 20: 655-669
- Rahat M, Reich V (1984) Intracellular infection of aposymbiotic *Hydra viridis* by a foreign free-living *Chlorella* sp.: initiation of a stable symbiosis. *J Cell Sci* 65: 265-277
- Rahat M (1985) Competition between *Chlorella* in chimeric infections of *Hydra viridis*: the evolution of a stable symbiosis. *J Cell Sci* 77: 87-92

- Rahat M, Reich V (1985a) A new alga/hydra symbiosis: *Hydra magnipapillata* of the 'nonsymbiotic' *Vulgaris* group hosts a *Chlorococcum-Yikt* alga. *Symbiosis* 1: 177-184
- Rahat M, Reich V (1985b) Correlations between characteristics of some free-living *Chlorella* sp. and their ability to form stable symbioses with *Hydra viridis*. *J Cell Sci* 74: 257-266
- Rahat M, Reich V (1986) Algal endosymbiosis in brown-hydra: host/symbiont specificity. *J Cell Sci* 86: 273-286
- Rahat M, Reich V (1989) *Symbiococcum hydrae* gen. et sp. nov. (Chlorosarcinales, Chlorophyta): an endosymbiotic green alga from cells of the Japanese *Hydra magnipapillata* (Coelenterata). *Phycologia* 28: 181- 187
- Rahat M, Reich V (1991) Zoospore formation by *Symbiococcum hydrae* (Chlorosarcinales, Chlorophyta), an alga endosymbiotic in *Hydra magnipapillata* (Coelenterata). *Phycologia* 30: 226-230
- Rahat M, Sugiyama T (1993) The endodermal cells of some "brown" hydra are autonomous in their ability "to host or not to host" symbiotic algae: analysis of chimera. *Endocytobiosis & Cell Res* 9: 223-231
- Rajević N, Kovačević G, Kalafatić M, Gould SB, Martin WF, Franjević D (2015) Algal endosymbionts in European *Hydra* strains reflect multiple origins of the zoochlorella symbiosis. *Mol Phylogenet Evol* 93: 55-62
- Schwentner M, Bosch TCG (2015) Revisiting the age, evolutionary history and species level diversity of the genus *Hydra* (Cnidaria: Hydrozoa). *Mol Phylogenet Evol* 91: 41-55
- Thorington G, Margulis L (1981) *Hydra viridis*: Transfer of metabolites between hydra and symbiotic algae. *Biol Bull* 160: 175-188
- Whitney DD (1907) Artificial removal of the green bodies of *Hydra viridis*. *Biol Bull* 13: 291-299

無腸類と藻類の共生進化

彦坂 暁¹, 彦坂-片山 智恵²

¹広島大学 大学院統合生命科学研究科
〒739-8521 広島県東広島市鏡山 1-7-1

²広島大学 自然科学研究支援開発センター
〒739-8527 広島県東広島市鏡山 1-4-2

Symbiotic Evolution of Acoels and Alga

Akira Hikosaka¹, Tomoe Hikosaka-Katayama²

¹Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University,
1-7-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima, 739-8521, Japan

²Natural Science Center for Basic Research and Development, Hiroshima University,
1-4-2 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima, 739-8527, Japan

Keywords: Acoela, Acoelomorpha, Horizontal transfer, Vertical Transfer

DOI: 10.24480/bsj-review.13a4.00222

1. はじめに

いまから 100 年以上前に出版された「Plant-Animals; A Study in Symbiosis」(Keeble 1910) という本がある。ここで「Plant-Animals」と呼ばれているのが、本稿でとりあげる無腸類 (Acoela) である。この本の中で著者は、この小さな蠕虫の体内にある緑色の細胞が、共生する微細藻類であることを丁寧に論証し、両者の共生関係のあり方について深く考察している。

無腸類と藻類の共生の研究には、百数十年にわたる長い歴史がある。一方で、おそらく多くの人 (生物学者も含めて) にとって、無腸類は馴染みのない生物だろう。本稿では、無腸類と藻類の共生関係と、その進化についての知見を紹介する。

2. 無腸類はどのような動物か

無腸類は世界中の海洋 (一部は汽水や淡水) に生息し、400 種ほどが知られている。脊椎動物や節足動物、軟体動物などの「高等」動物と同じく、三胚葉からなる左右相称動物 (Bilateria) だが、その体制は著しく単純である。腸などの上皮性の消化器官を持たず (なので無腸類と呼ばれる)、呼吸器系、循環器系、排出系などの器官系も、体腔も、付属肢などの構造もない。表皮は柔らかく、殻や内外骨格は持たない。単純な神経系と全身に網状に張り巡らされた筋肉を持ち、体型は柔軟に変形する。体は扁平で、体表に生えた繊毛によって這うように移動する。

無腸類のからだのつくりは一見、ヒラムシなどの扁形動物に似ており、かつては扁形動物門の渦虫綱無腸目に分類されていた。一方で、原腎管の欠如や上皮構造の特異性など、詳細な形態をみれば扁形動物との違いも大きい。そのため、その系統的位位置については長く議論

が続いてきた。1990年代以降、分子系統解析により他の扁形動物とは単系統群を形成しないことが明らかになり (Katayama et al. 1993; Katayama et al. 1995; Carranza et al. 1997), 無腸動物門 (Acoelomorpha) として独立させられた (Ruiz-Trillo et al. 1999)。その後、ゲノミクス解析により珍渦虫類 (Xenoturbella) との類縁性が示唆され、両者を珍無腸動物門 (Xenacoelomorpha) としてまとめることも提唱された (Philippe et al. 2011)。動物界における (珍) 無腸動物の系統的位はまだ確定していないが、現生の左右相称動物の中でもっとも初期に分岐した基盤的な左右相称動物であるという説が有力である (図 1A)。すなわち、現生の新口動物や旧口動物がもつ複雑な諸器官をまだ獲得していなかった時代の祖先 (原左右相称動物) の姿を現在にとどめている可能性がある。一方で、無腸動物は新口動物のグループに入るという説もあり (図 1B), いまだに完全には決着がつかない (Cannon et al. 2016; Philippe et al. 2019)。どちらの説が正しいかによって、動物の進化の全体像が変わってしまうため、動物の初期進化を理解する上で鍵となる動物群の一つである。

一方、無腸類も他の系統と別れて以降、独自の進化を遂げてきた。その一つが微細藻類との共生関係の獲得である。とくに *Convolutidae* 科の無腸類には、体内に共生藻をもつものが多い。以下、無腸類と藻類の共生研究について概略を紹介する。

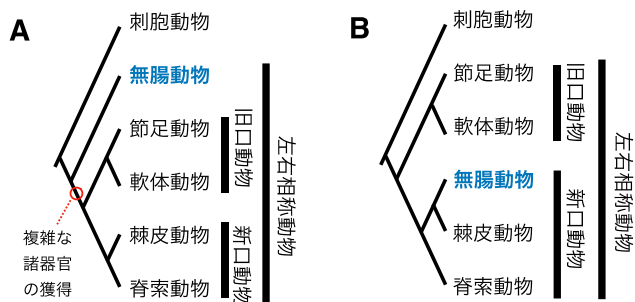


図 1. 無腸動物の系統的位に関する 2 つの説

A: 現生の左右相称動物の中でもっとも初期に分岐した。B: 新口動物のグループに入る。

3. *Symsagittifera roscoffensis* とその共生藻

無腸類のなかでもっとも研究が進んでいるのがヨーロッパ産の *Symsagittifera roscoffensis* (Graff 1891) (原記載では *Convoluta* 属) である (Bailly et al. 2014; Arboleda et al. 2018)。前述の「Plant-Animals」にも、主としてこの種を用いた研究が紹介されている。

S. roscoffensis の名はフランスのブルターニュ地方ロスコフにちなんでつけられたが、当地のみならずポルトガルの南端 (Carvalho et al. 2013) やチャンネル諸島 (Doonan and Gooday 1982), ウェールズ (Mettam 1982) などでも分布が確認されている。発見当時からその体内の緑色細胞が注目され、これが共生する微細藻類であることが明らかにされてきた (Keeble 1910)。この共生藻はのちに *Platymonas convolutae* と命名され (Parke and Manton 1967), その後 *Tetraselmis* 属に移された (Norris et al. 1980)。この記載と前後する 1960 年代半ばから 80 年代半ばにかけて、*S. roscoffensis* と共生藻の関係について、生化学的手法や電子顕微鏡観察による基礎的な研究が行われてきた。

孵化したばかりの *S. roscoffensis* の幼体は共生藻を持たないが、孵化後数日のうちに周囲の環境から中央柔組織 (central parenchyma) に共生藻を取り込む。この共生は宿主にとって必須 (obligatory) であり、共生が成立しなければ長くは生存できない。取り込まれた共生藻は自由生活時に持っていた鞭毛, 細胞壁 (theca), 光受容器である眼点を失い, 宿主の表皮下

の、表皮細胞や筋肉細胞からなる末梢柔組織 (peripheral parenchyma) へ移動する (Oschman 1966; Provasoli et al. 1968; Douglas 1983b)。Oschman and Gray (1965) によれば、共生藻は細胞外に位置するが、Dorey (1965) や Douglas (1983b) は細胞内の液胞内に位置すると述べている。

S. roscoffensis の幼体に本来の共生藻と異なる系統の藻類を与えると、あるていど近縁の藻類ならば共生が成立する (Provasoli et al. 1968; Douglas 1983b)。しかし、その後、本来の共生藻を与えると、そちらが優勢になる (Provasoli et al. 1968)。すなわち宿主には共生藻の選択性がみられる。

共生藻の主な光合成産物はマンニトールであり (Muscatine et al. 1974)、固定された炭素は主にアミノ酸の形で共生藻から放出されて宿主に移動する (Kremer 1975; Boyle and Smith 1975)。また共生藻の滲出物である乳酸も宿主に利用される (Taylor 1974)。さらに、*S. roscoffensis* は長鎖の飽和/不飽和脂肪酸やステロールを新規に合成せず、共生藻からの供給に依存している (Meyer et al. 1979) 一方、共生藻は宿主の窒素廃棄物である尿酸を窒素源として利用する (Boyle and Smith 1975; Douglas 1983a)。このように *S. roscoffensis* が進化の過程で築いてきた共生藻との深い共生関係が明らかにされてきた。

4. 瀬戸内海の無腸類とその共生藻

日本でも未記載種を含め 30 種ほどの無腸類が確認されているが (Faubel et al. 2004)、最近まで無腸類を用いた実験的研究はあまり行われてこなかった。我々がフィールドにしている瀬戸内海では、ナйкаイムチョウウズムシ *Praesagittifera naikaiensis* (Yamasu 1982) (原記載では *Convoluta* 属) という種が優勢で、淡路島から九州まで、広範囲に分布が確認されている (図 2A) (Hikosaka-Katayama et al. 2020)。我々はこの種を日本における無腸類研究のモデルとして用いることをめざして、採集・飼育方法の確立 (Hikosaka-Katayama and Hikosaka 2015; 彦坂 and 彦坂-片山 2021)、分布調査と遺伝的分化の検討 (Hikosaka-Katayama et al. 2020)、ドラフトゲノムの解析 (Arimoto et al. 2019) などをすすめてきた。また、*Symsagittifera* 属の別の無腸類 (種は未同定) も瀬戸内海に生息しており、ナйкаイムチョウウズムシとしばしば同じ場所で見つかる (図 2B) (Hikosaka-Katayama et al. 2020)。これらのいずれも体内に緑色の共生藻を持つ。



図 2. 3 種の無腸動物

A: 瀬戸内海産のナйкаイムチョウウズムシ。B: 瀬戸内海産の *Symsagittifera* sp.。C: 熱帯産のワミノア。アスタリスクは体の前方を示す。

我々はまず、瀬戸内海沿岸の各地でナйкаイムチョウウズムシのサンプリングを行い、共生藻の葉緑体の *rbcL* 遺伝子（植物の DNA バーコーディングに利用される）の部分塩基配列を調べ、ハプロタイプ解析を行った（図 3）。その結果、主に 2 つのハプロタイプ（Pn_symbiont1, 2）が瀬戸内海全体に広く分布していることが分かった。分子系統解析を行うと、いずれも各種テトラセルミスと単系統群をなし、特に *T. suecica* などと系統的に近かった。

一方、*Symsagittifera* の共生藻についても *rbcL* 配列を調べると（Sy_symbiont1~4）、おなじテトラセルミスに含まれるものの、ナйкаイムチョウウズムシの共生藻とは系統的に離れていることがわかった（図 3）。さきほど述べたように、これらの無腸類はしばしば同所的に生息している。にもかかわらず異なる共生藻を持つことから、かれらには共生藻の選択性があるのではないかと考えられた。

そこで、これらの共生藻を実験に用いるために、単離培養を行った。宿主を Ca/Mg フリー海水中で乖離し、遊離した共生藻を寒天培地にまいて培養すると、共生藻のコロニーが得られた。これを液体培地に移すことで、共生藻を単離培養できた。以下、ナйкаイムチョウウズムシ由来の共生藻株を P 系統、*Symsagittifera* 由来の共生藻株を S 系統と呼ぶ。両系統は光学顕微鏡観察でも形態の違いがわかり、P 系統は細長い米粒状の形をしており、S 系統はより球に近い形をしていた（図 4）。

ナйкаイムチョウウズムシの孵化直後の幼生は、共生藻を持たない。これに P 系統または S 系統の共生藻を与え、共生が成立するかを調べた。その結果、いずれも宿主に取り込まれ、体全体に分布しているのが見られた。つまり、共生藻を取り込む段階では、いずれの系統も取り込めることがわかる。次に、幼生に両系統の共生藻を同時に与える実験を行った。共生藻を与えて 14~17 日後に幼生を個別にサンプリングし、取り込まれた共生藻の種類を *rbcL* 配列により調べた。その結果、調べた 8 個体すべてが P 系統を取り込んでいた。

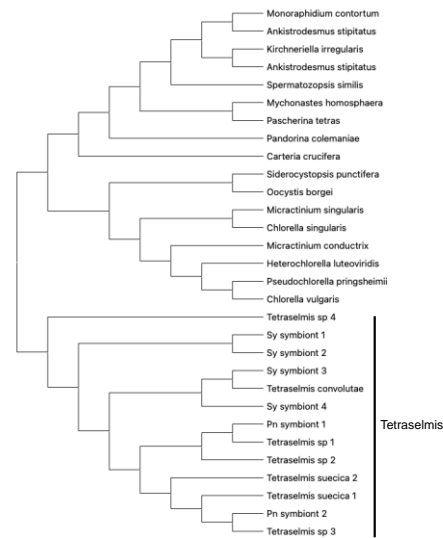


図 3. 共生藻の *rbcL* 配列による系統樹

ナйкаイムチョウウズムシの共生藻（Pn_symbiont）と *Symsagittifera* sp. の共生藻（Sy_symbiont）は、いずれも *Tetraselmis* グループに入る。

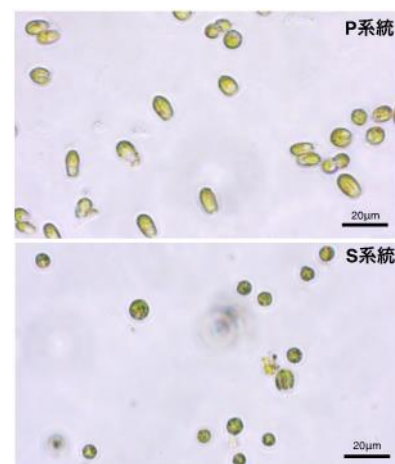


図 4. 培養した P 系統と S 系統の共生藻

さらに、P 系統または S 系統を与えた幼生の成長を調べると、P 系統を与えたグループは順調に成長したのに対し、S 系統を与えたグループはほとんど成長が見られなかった。つまり S 系統は、体に取り込まれたとしても、正常な共生が成立していない可能性が示唆された。

そこで、P 系統と S 系統それぞれを与えた幼生を電子顕微鏡で観察した。いずれの藻類も、表皮細胞やその下の筋肉細胞などと混在するように分布していたが、両者の様態には違いが見られた。P 系統では S 系統に比べて、光合成産物であるスターチが多く蓄積していた（図 5A, B）。また P 系統は表皮や筋肉等の細胞の間に埋め込まれ、周囲の細胞と密着し、押されて柔軟に変形しているが（図 5A）、S 系統では共生藻の周囲のスペースが広く、もとの丸い形を保っているように見えた（図 5B）。両者を比較すると、P 系統が宿主の細胞に「馴染んでいる」のに対して、S 系統と宿主細胞の関係は「よそよそしい」印象を受ける。さらに S 系統の表面を拡大してみると、細胞膜が断片化されている像や、細胞が崩壊しているような像も見えた（図 5C）。

以上の結果を総合すると、次のことが示唆される。瀬戸内海産の 2 種の無腸類は、同所的に生息している場合でも、環境中の特定の藻類を選択して共生させている。ナイカイムチョウウズムシは本来の共生藻以外も取り込み、表皮直下に配置することはできるが、本来の共生藻のように安定した共生関係を確立させることはできず、そのため共生藻からの利益を十分に受け取れないと考えられる。

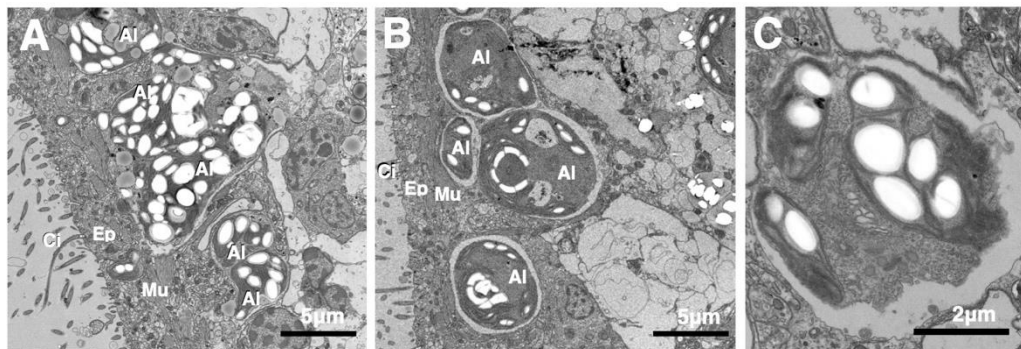


図 5. 宿主に取り込まれた P 系統と S 系統の共生藻の電子顕微鏡写真

A: P 系統。B: S 系統。C: S 系統の拡大図。Al: 共生藻, Ci: 繊毛, Ep: 表皮細胞, Mu: 筋肉細胞。

5. ワミノアにおける共生藻の垂直伝搬

私たち動物は餌を食べて生きている。微細藻類などを捕食していた無腸類の祖先が、進化のある時点で特定の相手を選んで共生することで、「植物」的な生活への一步を踏み出した。もちろん、あらゆる食べ物を共生させることはできないので、共生の相手を選ぶことは、共生が成立するために重要である。

そしてさらに「植物」化，すなわち共生相手との関係が深まっていく重要なステップの一つに，水平伝搬から垂直伝搬への進化がある。つまり，毎世代，新たに環境から共生藻を得るという方式から，親が子へ共生藻を伝達するという方式への進化である。多くの無腸類は，前述のように，水平伝搬により共生藻を獲得している。一方，無腸類の中には共生藻を卵に入れて垂直伝搬するワミノア属というグループがいる（図 2C）。ワミノアは熱帯の珊瑚礁に住む無腸類で，珊瑚の上で生活している（Winsor 1990; Barneah et al. 2007a）。かれらは *Symbiodinium* と *Amphidinium* という 2 種の褐虫藻と共生し，これらを垂直伝搬する（Barneah et al. 2007b）。この垂直伝搬はどのようにして可能になったのか，それを調べるために，我々はワミノアが共生藻を垂直伝搬するプロセスを調べた（Hikosaka-Katayama et al. 2012）。

ワミノアの成体では，2 種類の共生藻は成体の柔組織（parenchyma）に分布していた（図 6）。ワミノアの卵形成では，初期の卵母細胞が体の前方に生じ，後へ移動するにつれて卵母細胞が成長していく。卵形成の初期には，いくつかの共生藻は卵母細胞の近くにあるが，卵母細胞内には見られず，卵母細胞を取り囲む濾胞細胞（Accessory follicle cell）内で観察された（図 6A, 7A）。卵形成後期になると，卵母細胞は前期よりも成長し，共生藻は濾胞細胞だけでなく卵母細胞内にも見られるようになった（図 6B, 7B, C）。この時期の卵母細胞と濾胞細胞の境界面をみると，濾胞細胞の細胞膜は卵母細胞に密着しており，随所に細胞膜のない間隙 membrane devoid region（MDR）が見られた。濾胞細胞の MDR 付近には藻類や脂質の液滴が観察され，MDR を通過している小胞も観察された（図 7D）。濾胞細胞はこの間隙を通して卵形成のための物質を輸送していると考え

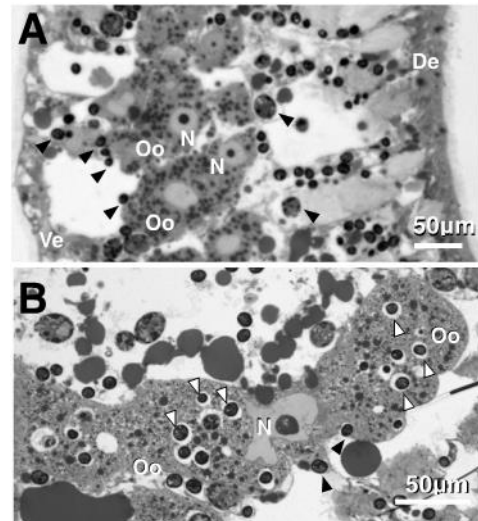


図 6. ワミノアの共生藻の分布

A: 卵母細胞形成初期。B: 卵母細胞形成後期。黒矢頭は卵母細胞外の共生藻，白矢頭は卵母細胞内の共生藻を示す。N: 卵母細胞の核，Oo: 卵母細胞，De: 背側表皮，Ve 腹側表皮。

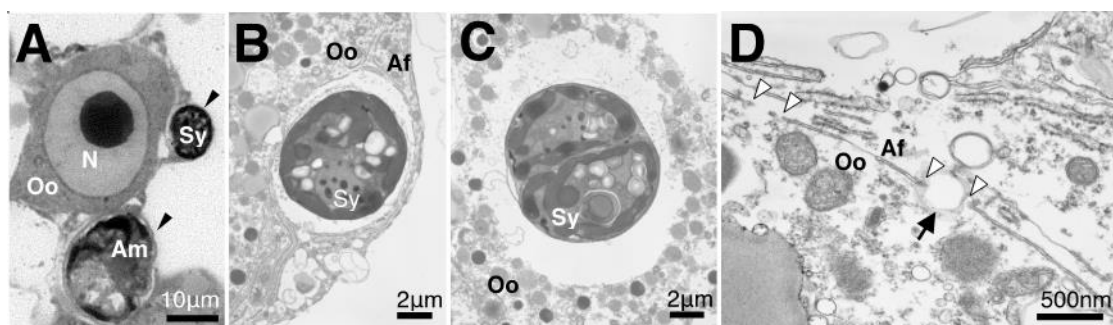


図 7. ワミノアの共生藻の垂直伝搬

A: 卵母細胞形成初期。B-C: 卵母細胞形成後期。B は濾胞細胞内，C は卵母細胞内に共生藻が見られる。D: 卵母細胞と濾胞細胞の境界にある MDR。黒矢頭：共生藻，白矢頭：MDR，矢印：MDR を通過する小胞。N: 卵母細胞の核，Oo: 卵母細胞，Af: 濾胞細胞，Sy: *Symbiodinium*，Am: *Amphidinium*。

えられる。以上の観察から、共生藻はまず濾胞細胞に取り込まれ、輸送経路である MDR を利用して卵母細胞に入ることが示唆された。

ワミノアは共生藻を垂直伝搬するが、それと同時に外界からも共生藻を獲得している可能性も残されている。特にワミノアは褐虫藻を共生させているサンゴの上で共生生活しており、その粘膜を摂食しているとされているため

(Naumann et al. 2010) , 宿主であるサンゴから共生藻を獲得している可能性が考えられた。そこで我々はハナガタサンゴの褐虫藻 *Symbiodinium* と、3 種のサンゴ (ハナガタサンゴ, ヒユサンゴ, ボーンミドリイシ) に共生するワミノアの *Symbiodinium* について、ITS1-5.8S rRNA-ITS2 領域の塩基配列を調べ、分子系統解析を行なった。その結果、ワミノアの *Symbiodinium* は宿主のサンゴとは別の単一クレードにまとまることわかった (図 8) (Hikosaka-Katayama et al. 2012)。最近、国広らも *psbA^{ncf}* 配列を用いた分子系統解析により、ワミノアの共生藻は宿主サンゴの共生藻とは異なり、いくつかの例外を除いて単一クレードに含まれることを示した (Kunihiro and Reimer 2018)。一方で、国広らは、少数ではあるが、このクレードに含まれない *Symbiodinium* をもつワミノア个体がいることも報告している。この結果をみると、ワミノアが稀にはあるにせよ、環境から自由生活性の *Symbiodinium* を獲得できる可能性も、まだ否定はできない。

一方、もう一つの共生藻である *Amphidinium* の系統を 28S rDNA による系統解析で調べると、ワミノアの *Amphidinium* は自由生活性の *A. klebsii* と共生性の *A. gibbosum* の両方を含むクレードにまとまる (Hikosaka-Katayama et al. 2012)。このことから、ワミノアに共生する *Amphidinium* が自由生活の能力を残しており、環境から取り込まれている可能性も残された。

垂直伝搬されるワミノアの 2 種の共生藻が、共生に特化した系統なのか、あるいは自由生活もできるのかを調べることは、今後の興味深い課題である。

6. おわりに

かつて藻類を含む雑多な微生物を捕食していた動物が、特定の藻類を選択して共生を開始した。藻類との共生は動物に「植物的な生活」という飛躍的な進化をもたらす (図 9)。し

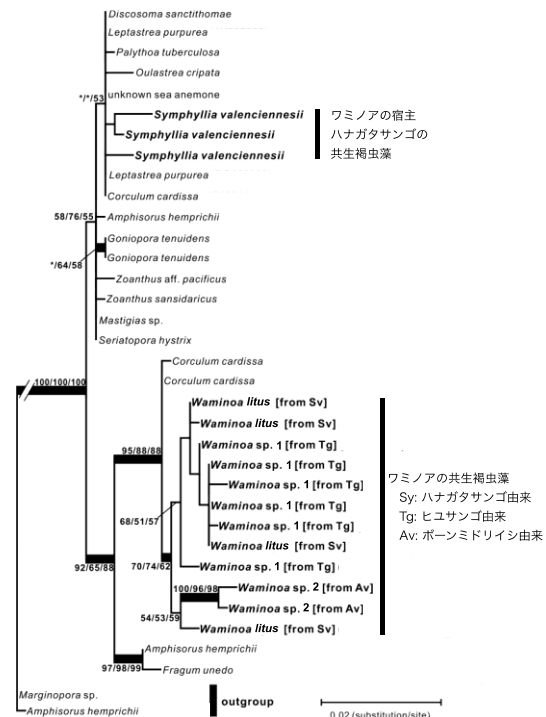


図 8. ワミノアと宿主サンゴの共生藻の系統関係

ITS1-5.8S rRNA-ITS2 領域を用いた ML 法による分子系統樹。数値は各ノードの支持率 (ML/NJ/MP 法) を示し、50% 未満は*で示した。Hikosaka-Katayama et al. (2012) を改変。

かし利害が一致するとは限らない他の生物を体内に共生させることには、様々なリスクも伴うはずであり、適切な共生の相手を選択し、馴致することは、宿主にとって重要な課題だったはずだ。ナイカймチョウウズムシに見られた共生藻の選択性は、そのようなリスク管理の進化史を反映していると考えられる。さらにワミノアにおける共生藻の垂直伝搬機構の進化は、動物の「植物化」をより前進させる重要な契機である。

私たちは、無腸類を用いて、動物と藻類の共生進化の重要なステップである、共生相手の選択、そして垂直伝搬機構の獲得がいかに進化してきたのかを、さらに明らかにしていきたいと考えている。

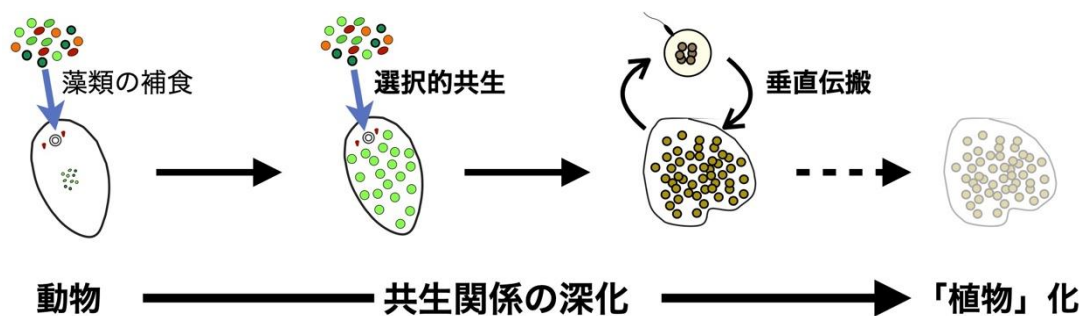


図9. 無腸類を用いた共生進化の研究

動物が藻類との共生関係を深めて「植物」化していく進化の過程には、いくつかの重要な契機がある。無腸類は、選択的な共生の成立、垂直伝搬機構の獲得などのステップを研究する上で、優れたモデルになり得る。

謝辞

ここで紹介した私たちの研究は、以下の共同研究者とともに行ったものです（敬称略）。小池一彦，小池香苗，山下洋，篠原美江，松浦綾音，新保早，岡部楓，綿貫七海。また研究は以下の研究助成を受けて行われました。科学研究費補助金（課題番号：21K06290，17K07535，26924012，24924009，23924013，22924017），水産無脊椎動物研究所 2017 年度個別研究助成。

引用文献

- Arboleda E, Hartenstein V, Martinez P, Reichert H, Sen S, Sprecher S, Bailly X. (2018) An emerging system to study photosymbiosis, brain regeneration, chronobiology, and behavior: The marine acoel *Symsagittifera roscoffensis*. *Bioessays* 40:e1800107. doi: 10.1002/bies.201800107
- Arimoto A, Hikosaka-Katayama T, Hikosaka A, Tagawa K, Inoue T, Ueki T, Yoshida M, Kanda M, Shoguchi E, Hisata K, Satoh N. (2019) A draft nuclear-genome assembly of the acoel flatworm *Praesagittifera naikaiensis*. *GigaScience* 8:1–8. doi: 10.1093/gigascience/giz023
- Bailly X, Laguerre L, Correc G, Dupont S, Kurth T, Pfannkuchen A, Entzeroth R, Probert I, Vinogradov S, Lechauve C, et al. (2014) The chimerical and multifaceted marine acoel *Symsagittifera roscoffensis*: from photosymbiosis to brain regeneration. *Frontiers in Microbiology* 5:498. doi: 10.3389/fmicb.2014.00498

- Barneah O, Brickner I, Hooge M, Weis VM, LaJeunesse TC, Benayahu Y. (2007a) Three party symbiosis: acoelomorph worms, corals and unicellular algal symbionts in Eilat (Red Sea). *Mar Biol* 151:1215–1223. doi: 10.1007/s00227-006-0563-2
- Barneah O, Brickner I, Hooge M, Weis VM, Benayahu Y. (2007b) First evidence of maternal transmission of algal endosymbionts at an oocyte stage in a triploblastic host, with observations on reproduction in *Waminoa brickneri* (Acoelomorpha). *Invertebr Biol* 126:113–119. doi: 10.1111/j.1744-7410.2007.00082.x
- Boyle JE, Smith DC. (1975) Biochemical interactions between the symbionts of *Convoluta roscoffensis*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 189:121-135. doi: 10.1098/rspb.1975.0046
- Cannon JT, Vellutini BC, Smith J, Ronquist F, Jondelius U, Hejnol A. (2016) Xenacoelomorpha is the sister group to Nephrozoa. *Nature* 530:89–93. doi: 10.1038/nature16520
- Carranza S, Bagaña J, Riutort M. (1997) Are the Platyhelminthes a monophyletic primitive group? An assessment using 18S rDNA sequences. *Mol Biol Evol* 14:485–497. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025785
- Carvalho LF, Rocha C, Fleming A, Veiga-Pires C, Aníbal J. (2013) Interception of nutrient rich submarine groundwater discharge seepage on European temperate beaches by the acoel flatworm, *Symsagittifera roscoffensis*. *Mar Pollut Bull* 75:150–156. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.07.045
- Doonan SA, Gooday GW. (1982) Ecological-studies of symbiosis in *Convoluta roscoffensis*. *Mar Ecol Prog Ser* 8:69–73.
- Dorey AE. (1965) The organization and replacement of the epidermis in acoelous turbellarians. *Q J Microsc Sci* 106:147–172.
- Douglas AE. (1983a) Uric acid utilization in *Platymonas convolutae* and symbiotic *Convoluta roscoffensis*. *J Mar Biol Assoc UK* 63:435–447. doi: 10.1017/S0025315400070788
- Douglas AE. (1983b) Establishment of the symbiosis in *Convoluta roscoffensis*. *J Mar Biol Assoc UK* 63:419–434.
- Faubel A, Kawakatsu M, Froehlich EM, Jones HD, Sasaki G. (2004) The present status of taxonomic studies on Acoela (Platyhelminthes) in Japan. <http://planarian.net/kswp/42/acoela.pdf>
- Graff LV. (1891) Die Organisation der Turbellaria Acoela. Mit einem Anhang ueber den Bau und die Bedeutung der Chlorophyllzellen von *Convoluta roscoffensis*.
- 彦坂暁, 彦坂-片山智恵 (2021) ナイカイクモチュウウズムシ. *比較内分泌学* 47:44–48.
- Hikosaka-Katayama T, Hikosaka A. (2015) 瀬戸内海産無腸動物 *Praesagittifera naikaiensis* の飼育システム. *広島大学総合科学研究科紀要 I* 10:17–23.
- Hikosaka-Katayama T, Hikosaka A. (2010) 無腸動物 *Waminoa* sp. の人工飼育と産卵法 —動物-藻類共生研究のモデル系開発に向けて. *広島大学総合科学研究科紀要 I* 5:39–45.
- Hikosaka-Katayama T, Koike K, Yamashita H, Hikosaka A, Koike K. (2012) Mechanisms of maternal inheritance of dinoflagellate symbionts in the acoelomorph worm *Waminoa litus*. *Zool Sci* 29:559–567. doi: 10.2108/zsj.29.559

- Hikosaka-Katayama T, Watanuki N, Niiho S, Hikosaka A. (2020) Geographical Distribution and Genetic Diversity of *Praesagittifera naikaiensis* (Acoelomorpha) in the Seto Inland Sea, Japan. *Zool Sci* 37:314–9. doi: 10.2108/zs190119
- Katayama T, Yamamoto M, Wada H, Satoh N. (1993) Phylogenetic position of acoel turbellarians inferred from partial 18s rDNA sequences. *Zool Sci* 10:529–536.
- Katayama T, Wada H, Furuya H, Satoh N, Yamamoto M. (1995) Phylogenetic position of the dicyemid mesozoa inferred from 18S rDNA sequences. *Biol Bull* 189:81–90.
- Keeble F. (1910) Plant-animals; a study in symbiosis. 1–190. Cambridge University Press (London).
- Kremer BP. (1975) $^{14}\text{CO}_2$ -fixation by endosymbiotic alga *Platymonas convolutae* within Turbellarian *Convoluta roscoffensis*. *Mar Biol* 31:219–226. doi: 10.1007/BF00387150
- Kunihiro S, Reimer JD. (2018) Phylogenetic analyses of *Symbiodinium* isolated from *Waminoa* and their anthozoan hosts in the Ryukyu Archipelago, southern Japan. *Symbiosis* 76:1–13. doi: 10.1007/s13199-018-0557-0
- Mettam C. (1979) A northern outpost of *Convoluta roscoffensis* in South Wales. *J Mar Biol Assoc UK* 59:1–2.
- Meyer H, Provasoli L, Meyer F. (1979) Lipid biosynthesis in the marine flatworm *Convoluta roscoffensis* and its algal symbiont *Platymonas convoluta*. *Biochim Biophys Acta* 573:464–480.
- Muscatine L, Boyle JE, Smith DC. (1974) Symbiosis of the Acoel Flatworm *Convoluta roscoffensis* with the Alga *Platymonas convolutae*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 187:221–234. doi: 10.1098/rspb.1974.0071
- Naumann MS, Mayr C, Struck U, Wild C. (2010) Coral mucus stable isotope composition and labeling: Experimental evidence for mucus uptake by epizoic acoelomorph worms. *Mar Biol* 157:2521–2531. doi: 10.1007/s00227-010-1516-3
- Norris RE, Hori T, Chihara M. (1980) Revision of the Genus *Tetraselmis* (Class Prasinophyceae). *Botanical Magazine-Tokyo* 93:317–339. doi: 10.1007/BF02488737
- Oschman JL. (1966) Development of the symbiosis of *Convoluta roscoffensis* Graff and *Platymonas* sp. (1). *J Phycol* 2:105–111. doi: 10.1111/j.1529-8817.1966.tb04603.x
- Oschman JL, Gray P. (1965) A study of the fine structure of *Convoluta roscoffensis* and its endosymbiotic algae. *Trans Am Microsc Soc* 84:368–375. doi: 10.2307/3224725
- Parke M, Manton I. (1967) The specific identity of the algal symbiont in *Convoluta roscoffensis*. *J Mar Biol Assoc UK* 47:445–464. doi: 10.1017/S002531540005654X
- Philippe H, Brinkmann H, Copley RR, Moroz LL, Nakano H, Poustaka AJ, Wallberg A, Peterson KJ, Telford MJ. (2011) Acoelomorph flatworms are deuterostomes related to Xenoturbella. *Nature* 470:255–258. doi: 10.1038/nature09676
- Philippe H, Poustka AJ, Chiodin M, Hoff KJ, Dessimoz C, Tomiczek B, Schiffer PH, Müller S, Domman D, Horn M, et al. (2019) Mitigating anticipated effects of systematic errors supports sister-group relationship between Xenacoelomorpha and Ambulacraria. *Curr Biol* 29:1818–1826.e6. doi: 10.1016/j.cub.2019.04.009

- Provasoli L, Yamasu T, Manton I. (1968) Experiments on the resynthesis of symbiosis in *Convoluta roscoffensis* with different flagellate cultures. J Mar Biol Assoc UK 48:465–478. doi: 10.1017/S0025315400034603
- Ruiz-Trillo I, Riutort M, Littlewood DT, Herniou EA, Bagueña J. (1999) Acoel flatworms: earliest extant bilaterian Metazoans, not members of Platyhelminthes. Science 283:1919–1923. doi: 10.1126/science.283.5409.1919
- Taylor DL. (1974) Nutrition of algal-invertebrate symbiosis. I. Utilization of soluble organic nutrients by symbiont-free hosts. Proc R Soc Lond B Biol Sci 186:357–368. doi: 10.1098/rspb.1974.0054
- Winsor L. (1990) Marine turbellaria (Acoela) from north Queensland. Memoirs of the Queensland Museum 28:785–800.
- Yamasu T. (1982) Five new species of Acoela flat worms from Japan. Galaxea 1:29–43.

両生類の卵塊と微細藻類の共生

宮下英明¹, 武藤清明¹, 武井萌¹, 神川龍馬², 西川完途^{1,3}

¹京都大学大学院人間・環境学研究科 〒606-8501 京都市左京区二本松町

²京都大学大学院農学研究科 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

³京都大学大学院地球環境学堂 〒606-8501 京都市左京区吉田本町

Microalgal symbiosis in amphibian eggs

Hideaki Miyashita¹, Kiyooki Muto¹, Megumi Takei¹, Ryoma Kamikawa²,
Kanto Nishikawa^{1,3}

¹Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University,
Yoshida-nihonmatsu-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

²Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku,
Kyoto 606-8502, Japan

³Graduate School of Global Environmental Studies, Kyoto University, Yoshida-honmachi,
Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

Keywords: amphibians, *Hynobius nigrescens*, microalgae, *Oophila*, symbiosis

DOI: 10.24480/bsj-review.13a5.00223

1. はじめに

両生類は胚がゼリー層に包まれた卵を水中や湿潤な場所に産む。一部の両生類の卵は、ゼリー層に藻類が共生することによって緑色に色づくことが知られている。この共生関係は、藻類と脊椎動物との共生において唯一、相利関係をもつ事例であると考えられている。北米に分布する両生類の研究では、卵のゼリー層に共生する藻類が、いずれも緑藻綱オオヒゲマワリ目 *Oophila* クレードに帰属するうえ、特定の両生類種の卵には特定のサブクレードの *Oophila* が共生するという1対1の共生関係が成立していることが報告されている (Kim et al. 2014)。日本固有種であるクロサンショウウオ (*Hynobius nigrescens*) においても、産卵直後には透明あるいは白濁した卵塊のゼリー層が、胚の発生が進み孵化する頃になると単細胞緑藻が共生して緑色になることが知られていた。そこでクロサンショウウオに共生する藻類を調べたところ、*Oophila* クレードに帰属する藻類であったものの、北米から報告されている系統とは異なる第5のサブクレードであった (Muto et al. 2017)。そのうえ直線距離で相互に100km以上離れた異なる3地域の5地点で採取した卵に共生する *Oophila* の18S rRNA 遺伝子配列は、全く同じであった。これらの結果は、*Oophila* と宿主両生類の共生関係には種特異性があるという北米の先行研究結果を支持した。一方で、両生類の卵塊に共生する藻類には、多様性があることもわかってきた。本稿では、クロサンショウウオに共生する単細胞緑藻に関する結果を中心に、両生類の卵に共生する藻類の不思議な関係とそこから巻き起こる疑問について述べる。

2. 両生類の卵と藻類の共生

サンショウウオやカエルに代表される両生類は、水中や湿潤な場所に卵を産む。卵は胚が何層かのゼリー層に包まれた構造をもち、複数の卵が卵嚢に包まれた状態で産卵されることもある。卵のゼリー層は繊維状の糖たんぱく質が密に網目状になった構造であり (Gilbert 1942; Humphries 1966; Shivers and James 1970; Bonnell and Chandler 1996) , ゼリー層の数は両生類種によって異なる。このゼリー層は、卵の物理的ダメージからの保護、乾燥の防止、懸濁物の混入防止、温度変化や紫外線照射などの環境ストレスからの保護、天敵や病原体からの防御、多精受精の防止などの役割を担っている (Marco and Blaustein 2000)。

北米大陸の東側に広く分布するキボシサンショウウオ (*Ambystoma maculatum*) でも、ゼリー層に藻類が共生することにより、卵塊が緑色になることが古くから報告されている (Orr 1888; Gilbert 1942, 1944) 。共生している藻類は、球状またはやや凹凸のある細胞外皮をもつ単一種の緑藻であり (Gilbert 1942, 1944) , 1909 年には卵塊に共生することを特徴とする緑藻の所属不明種として *Oophila amblystomatis* と命名されている (Wille 1909) 。

キボシサンショウウオと *Oophila* の共生は、相互依存的な相利関係にあると考えられている。*Oophila* が存在する卵塊において、光照射した卵塊から孵化した幼生は、暗所の卵塊や藻類のない卵塊の幼生よりも体長が大きく、孵化にかかる日数が短くなり孵化率も高くなることが報告されている (Gilbert 1942; Marco and Blaustein 2000) 。これは、*Oophila* の光合成によって、卵塊中の酸素濃度が増加するためであると考えられている (Hutchison and Hammen 1958; Small et al. 2014) 。一方、共生藻は、胚の発生にともなって排出される二酸化炭素とアンモニアを利用して急速に増殖することができる (Goff and Stein 1978; Small et al. 2014) 。ゼリー層は必ずしもガスや物質の交換速度が速くないため、両生類の胚にとっては、共生藻によって局所的に酸素が供給され (Bachmann et al. 1986; Pinder and Friet 1994) , 呼吸によって生成した二酸化炭素や代謝によって生成したアンモニアが効率的に除去されるメリットもあるとされている (Goff and Stein 1978) 。また、藻類が胚の周囲に共生することによって、胚が有害な紫外線から守られ、浅い場所での卵の発達を可能にしているメリットも示唆されている (Marco and Blaustein 2000) 。一方で、相利関係を表す明確なデータはないとする主張も散見される (Anderson 1971; Marco and Blaustein 2000) 。

両生類の卵塊に共生する藻類は、長い間、*Oophila amblystomatis* の1種のみであるとして捉えられてきた。2014 年に報告された北米大陸に生息する4種の両生類の卵塊に共生する藻類の広域的な調査結果によって、両生類の卵塊に共生する *Oophila* の遺伝的多様性が明らかになるとともに、共生両生類種と *Oophila* のサブクレードとの間に特異的な関係が存在することが見出されている (Kim et al. 2014) 。それによると、緑色に色づいた卵塊に共生する藻類はいずれも緑藻綱オオヒゲマワリ目内の *Oophila* クレードに帰属する単系統の藻類であった。*Oophila* クレードは、4つのサブクレード (I~IV) に分けられ、各サブクレードの藻類は特定の両生類種の卵塊に固有のものであった。サブクレード I, II, IV はそれぞれキボシサンショウウオ、ブラウンサラマンダー (*A. gracile*) , カナダアカガエル (*Lithobates sylvaticus*) の卵にのみ検出された。サブクレード III は、他のサブクレードとは異なり、キボシサンショウウオとアカアシガエル (*L. aurora*) の卵の両方に検出された。これらに基づ

き、Kim ら (2014) は、両生類卵に含まれる共生藻はすべて *Oophila* クレードに帰属する単細胞緑藻であり、両生類種とはサブクレードごとにほぼ 1 対 1 の共生関係にあると述べている。現在では、両生類の卵塊に共生する藻類として、オオヒゲマワリ目内の *Chlorococcum* 属の 1 種も見出されており、それらを *Chlorococcum amblystomatis* とすることが提案されている (Nema et al. 2019; Correia et al. 2020a, b)。また、我々も卵塊に共生する共生藻類として *Oophila* とは異なるオオヒゲマワリ目藻類や黄金色藻類を見出しており (未発表)、今後、両生類のゼリー層に共生する藻類の多様性は広がってゆくものと考えられる。

3. 日本固有種クロサンショウウオの卵塊に共生する藻類

サンショウウオ科の両生類は、日本で著しく多様化している生物群の一つである。このうちクロサンショウウオは、東北、関東北部、中部、北陸地方に分布する成体の全長が 13–16 cm 程度の小型サンショウウオで、海岸付近から高山帯に生息している日本固有種である (図 1)。春に池や沼などの止水環境で繁殖し、メスは 1 匹あたり 20–70 個ほどの卵を含む、紡錘型で透明または乳白色の卵囊を極浅い水中の枯れ枝などに産み付ける (図 2) (松木 2016)。クロサンショウウオの卵塊が、緑色に色づくことは古くから知られており、それが卵の中に単細胞の緑藻類が存在するためであることも報告されている (図 3)



図 1. クロサンショウウオ (成体)



図 2 クロサンショウウオの卵塊 (丹羽奎太氏撮影)

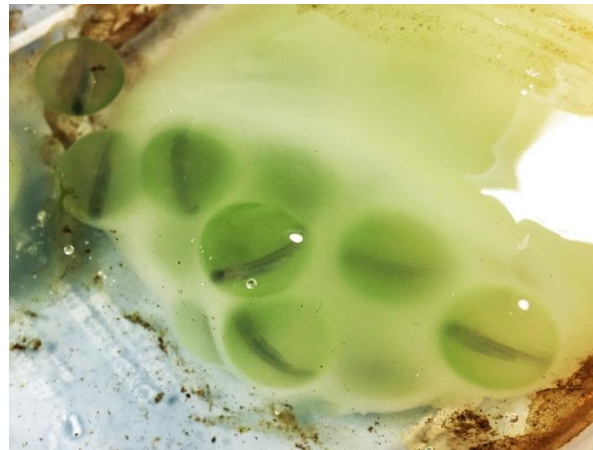


図 3 卵囊のなかの卵

(田子 1931; 佐藤 1943)。

我々は、クロサンショウウオの卵塊に共生する緑藻の実体を明らかにすることを目的に、共生緑藻の形態的特徴の観察および分子系統学的位置の解析を行った (Muto et al., 2017)。緑藻はゼリー層全体に分布し、特に卵黄膜の外側のゼリー層に最も高密度に存在していた (図 4)。ゼリー層に観察された藻類は、単細胞の緑藻ほぼ 1 種のみで、細胞は、球形ある

いは表面に脈絡状突起をもつ厚い細胞壁に包まれた、直径 4.0–6.3 μm の球形の不動細胞であった (図 5)。葉緑体はピレノイドを欠き、不規則な切れ込みのある杯状であった。これらの特徴は北米から報告された *Oophila* の特徴に一致した。直線距離で相互に 100km 以上離れた異なる 3 地域の 5 地点で採取した卵塊に共生する緑藻の 18S rRNA 遺伝子配列はすべて一致し、その配列は *Oophila* クレードに帰属したものの、北米から報告されている 4 つのサブクレードとは異なる第 5 のサブクレード (J1 クレードと命名) を形成した (図 6) (Muto et al. 2017)。つまり、日本固有種であるクロサンショウウオの卵塊に共生する *Oophila* は、クロサンショウウオの卵塊にのみ検出される J1 クレードの *Oophila* で、クロサンショウウオと *Oophila* との間に 1 対 1 の共生関係が成立していた。この結果は、共生緑藻と宿主両生類の共生関係に種特異性があるという北米の先行研究結果を支持するものであった。

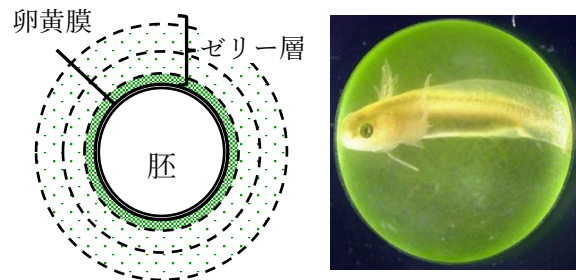


図4 クロサンショウウオの卵の模式図 (左)と卵黄膜の外側に存在する藻類(右)

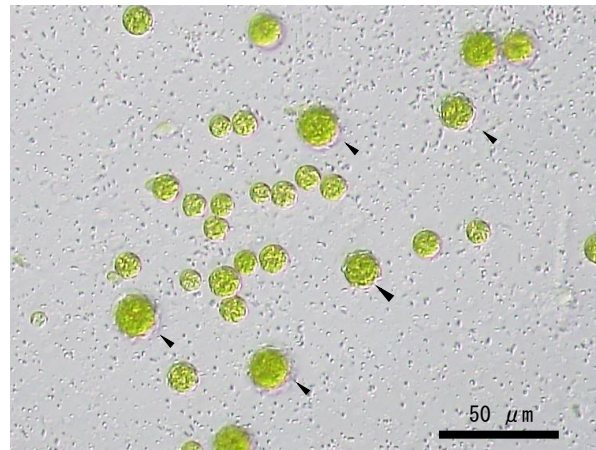


図5 ゼリー層の藻類

矢じりは表面に脈絡状突起をもつ厚い細胞壁をもつ細胞を示す。

4. 両生類の卵と共生藻の不思議な関係とさまざまな疑問

さて、この共生関係にはさまざまな疑問が生ずる。まず、*Oophila* はどこから来て両生類の卵塊に共生するのか、という疑問である。*Oophila* 細胞の由来については、キボシサンショウウオの研究から 2 つの説が提案されている。一つは、産卵後に、水中に存在する *Oophila* が卵塊に侵入するという考え方である (Gilbert, 1942)。この考え方は、サンショウウオの卵塊に緑藻が共生することが研究された当初からの考え方である。サンショウウオが産卵する止水環境に *Oophila* が存在することは、PCR 法による本藻由来 DNA の検出によって明らかにされており、産卵場所には *Oophila* が定常的に生育している可能性が示唆されている (Lin and Bishop 2015)。サンショウウオの産卵行動につ

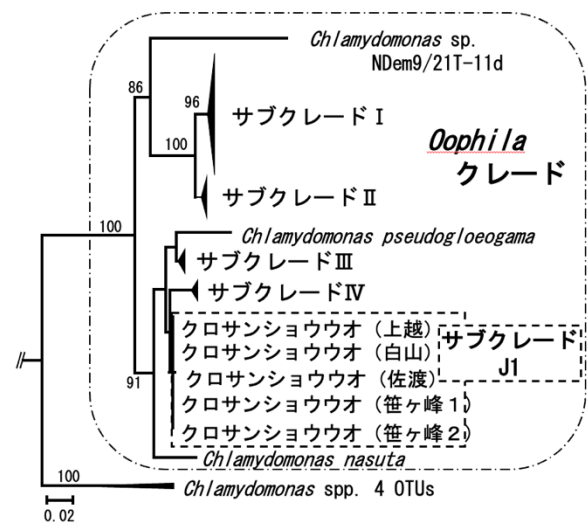


図6 クロサンショウウオに共生する緑藻の分子系統位置 (18S rRNA 遺伝子)

いては、まだ未解明な部分が多いものの、サンショウウオが特定の止水環境において産卵する傾向も、藻類との共生と関係しているかもしれない。一方で、サンショウウオの体内や細胞内に *Oophila* が侵入していることが観察されている。そのため、近年、メスのサンショウウオの体内に *Oophila* が共生しており、産卵時に卵に受け継がれるという考え方が提案されている (Kerney et al. 2011, 2019)。しかし、全ての個体に *Oophila* が保持されているかどうか不明であること、緑色に色づかない卵塊も存在すること、他種での研究が進んでおらず一般化できるか疑問であることなど、まだまだ未解明な部分が多い。そのうえ、サンショウウオと *Oophila* の共生成立の過程は、種ごとに異なる可能性も考えられる。たとえば、体内に *Oophila* が検出されたキボシサンショウウオの卵塊では、発生が進むなかで卵黄膜 (vitelline membrane) の内側 (ヒトの羊水にあたる液体部分) にまで *Oophila* が侵入することが知られているものの (Kerney 2011; Kerney et al. 2011)、クロサンショウウオでは、卵黄膜の内側に侵入した *Oophila* は観察されていない。また、この疑問と関連して、1対1の共生関係はどのように成立したか、も大きな疑問の1つである。メスの体内に共生するという考え方であれば、地域的隔離によって宿主(サンショウウオ)の種分化とともに、*Oophila* のサブクレードが分かれた理由も理解しやすい。しかし、*Oophila* はサンショウウオと絶対共生しているわけではなく、自由生活が可能であり、他のサンショウウオと接触することも可能であることから、他種のサンショウウオやカエルから分離された *Oophila* を別の種の卵塊に共生可能かどうか等の研究が必要になってくる。異なる共生関係のサンショウウオと *Oophila* とを共培養した実験では、卵塊への共生藻の侵入度合いがそれぞれ異なり、相互に種特異性を認識する仕組みが備わっている可能性が示唆されている (Kerney et al. 2019)。

同様に、環境中に生育する *Oophila* が卵塊に侵入するという考え方にも多くの難解な問題がある。すなわち、水中に存在する多様な藻類のなかで、なぜ、特定のクレードの *Oophila* だけが特定の両生類の卵塊に侵入および生育が可能なのか、である。その理解には、藻類側の能力と卵塊側の工夫の両方に関する検討が必要になる。藻類側の能力としては、特定の両生類の卵が産み落とされたことを感知し、そこに泳いでゆく能力 (走化性) と、ゼリー層のなかに侵入し、かつゼリー層のなかにおいて胚に近づく能力が不可欠である。一方、卵塊側の工夫には、他の藻類の侵入を排除し特定のクレードの藻類を受け入れる仕組みを作らなければならない。あるいは上記以外に、産卵時期の産卵場所の環境が *Oophila* を選択している可能性も否定できない。我々の初歩的な実験では、クロサンショウウオから分離した *Oophila* には、クロサンショウウオの卵塊に向かって泳ぐ傾向がみられている。しかし、それが天然環境中で同様に機能するものかどうかを含め再検討を要する。

藻類学として不思議なことは、クロサンショウウオのゼリー層内で *Oophila* どのように増殖しているのか見当がつかないことである。キボシサンショウウオでは、卵黄膜の内側およびゼリー層に、しずく型の遊走細胞が観察されていることから、*Oophila* には *Chlamydomonas/Chlorococcum* 型の通常の生活環が回っているものと考えられる。しかし、クロサンショウウオでは、ゼリー層内に観察される *Oophila* が、すべて球形の不動細胞であり (図5)、遊走細胞が観察されることはほぼ無い。また、球形細胞の多くは脈絡状突起をもつ厚い細胞壁に包まれている。この細胞壁の構造は *Chlamydomonas* 等の接合子におい

てよく知られている細胞壁構造と良く似ており、これらが接合子である可能性もある。さらに、活発に生育しているのであれば、遊走子形成あるいは不動胞子形成をした細胞が見つかるはずであるが、球形の不動細胞には胞子形成をしている細胞が見つからない。これらの観察結果からは、クロサンショウウオの卵塊のゼリー層内で *Oophila* が活発に生育しているとは思えない。この理由の1つとしては、我々が観察した卵塊がすでに緑色になっている卵塊であり、遊走細胞が存在するステージを過ぎ、すべて不動細胞になっている状況を観察していた可能性と、*Oophila* にわれわれの知らない特異な生活環がある可能性などが考えられる。上述の *Oophila* 細胞の由来とともに、ゼリー層内での *Oophila* の増殖方法を解明するためには、産卵直後の卵塊を天然の環境に触れないまま採取し、*Oophila* の増殖の有無、増殖方法等を詳細に解析する必要があると考えられる。

両生類と *Oophila* の共生において、ゼリー層内の *Oophila* が幼生の孵化後にどうなるのか、についても興味深い。クロサンショウウオの卵塊では、*Oophila* が、ゼリー層から飛び出し自由生活になることができることは明らかである。それは、*Oophila* 細胞を含むゼリー層を培養液中にいれ光照射下においておくと *Oophila* の遊走細胞が増殖してくることからわかる。しかし、孵化後しばらくは、ゼリー層から抜け出し自由生活する細胞が観察されないことから、ゼリー層から抜け出し遊走細胞が出現するまでにはある程度の時間がかかる。それでは、産卵場所に、孵化後の緑色のゼリー層の塊が水中に漂っているかというところでもなさそうである（そのことに着目した観察結果はない）。1つの可能性として、孵化した幼生に *Oophila* がゼリー層ごと食べられている可能性がある。それは、これまでの卵塊の収集の過程において幾度か見られた現象から推定できる。緑色に色づいた卵塊を採取し、小さな容器に入れて研究室に運ぶ過程で一気に孵化が進んでしまい、ゼリー層が殆ど見当たらないサンプルがあった。このとき、比較的多い糞が存在していた。このサンプルでは、孵化した幼生がゼリー層ごと *Oophila* を食べた可能性が極めて高い。もし仮に、ゼリー層に *Oophila* を共生させることが、孵化直後の幼生の初期の餌として利用させるクロサンショウウオの戦略であったとすれば、極めて興味深い。ただし、クロサンショウウオによる輸送中のゼリー層の捕食は容器の中に閉じ込められたことによるアーティファクトである可能性もある。さらに、捕食されることが *Oophila* の拡散戦略である可能性もある。ゼリー層に存在する *Oophila* 細胞は、表面に脈絡状突起をもつ厚い細胞壁をもつことが多い。この細胞はオオヒゲマワリ目藻類などに見られる接合子の表面構造と良く似ている。このような厚い細胞壁をもつ細胞は、クロサンショウウオの幼生に捕食されても消化されないかもしれない。その結果、生きた細胞のまま糞に混ざって排出され、広く拡散される可能性があり、それが *Oophila* がゼリー層に共生するメリットである可能性も否定できない。これらの孵化後のゼリー層のなかの *Oophila* の行方を明らかにするには、やはり産卵現場におけるゼリー層の消失過程の観察や幼生の糞の収集・観察が必要であろう。

他の日本固有種両生類の卵塊には藻類が共生するのか、共生するとしたらどのような藻類が共生しているのか、これらも非常に興味深い疑問である。サンショウウオ科の両生類は、日本で著しく多様化している生物群の一つであり、世界で 86 種が知られているうち、日本には 42 種（約 49%）が生息している（Frost, 2021）。本研究では、クロサンショウウ

オについて紹介したが、他種の両生類では、上記とは必ずしも一致しない結果が得られている。特に、日本固有のカエル類の卵塊に共生する藻類の多様性についても研究を始めているが、それらの結果も必ずしもキボシサンショウウオやクロサンショウウオの事例とは一致していない（未発表）。これまでの我々の初歩的な研究結果で明らかなのは、両生類の卵のゼリー層が微細藻類の新たなニッチの1つであり、両生類の卵塊と微細藻類の間には想像を遙かに超えたさまざまな共生関係が存在する可能性が極めて高いことである。

5. おわりに

既知の共生関係と比較すると、両生類と藻類の共生関係は極めて特殊である。既知の共生関係の多くでは、宿主生物の1世代における比較的長い間、宿主と藻類との共生関係が維持される。それに対して、両生類と藻類の共生関係では、住処となるゼリー層に藻類が出会えるチャンスは1年に1度である。そのうえ、孵化するまでの極めて短い期間だけの相利的な共生関係のように見える。それにもかかわらず、藻類との宿主とは密接な共進化関係を成立させている。今のところ、卵塊が存在しない季節における *Oophila* の生態に関する詳しい報告は見られないが、*Oophila* が自らの生活環のなかで両生類の卵のゼリー層という極めて特殊なニッチをどのように利用しているのか、また、それが *Oophila* の生残戦略として有効に働いているのか非常に興味深い。同時に、両生類が卵の発生期という重要な時期に、藻類の力を借りながら孵化の時間と効率を高め、かつ、藻類との密接な共進化関係を成立させた進化的仕組みも興味深い。両生類の卵塊に共生する藻類の多様性のみならず、相互に利用し合う関係の成立過程やその仕組みなど、両生類と藻類の共生関係には興味が尽きない。

謝辞

クロサンショウウオの卵塊の採集にあたっては、松木崇司氏に大変お世話になりました。ここに厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Anderson JD. (1971) The egg–alga relationship in *Ambystoma tigrinum*. *Herpetol Rev* 3: 76.
- Bonnell BS, Chandler DE. (1996) Egg jelly layers of *Xenopus laevis* are unique in ultrastructure and sugar distribution. *Mol Reprod Dev: Incorporating Gamete Research* 44: 212–220. doi: 10.1002/(sici)1098-2795(199606)44:2<212::aid-mrd10>3.0.co;2-4
- Bachmann MD, Carlton RG, Burkholder JM, Wetzel, RG. (1986) Symbiosis between salamander eggs and green algae: microelectrode measurements inside eggs demonstrate effect of photosynthesis on oxygen concentration. *Can J Zool* 64: 1586–1588. doi: 10.1139/z86-239
- Correia N, Pereira H, Silva JT, Santos T, Soares M, Sousa CB, Schüle LM, Costa M, Varela J, Pereira L, Silva J. (2020a). Isolation, identification and biotechnological applications of a novel, robust, free-living *Chlorococcum* (*Oophila*) *amblystomatis* strain isolated from a local pond. *Applied Sciences* 10(3040): 1–14. doi: 10.3390/app10093040

- Correia N, Varela J, Pereira L. (2020b) *Chlorococcum amblystomatis* (F.D.Lambert ex Wille) N.Correia, J.Varela & Leonel Pereira, comb. nov. (Chlorococcaceae). Notulae algarum No. 138 (ISSN 2009-8987).
- Frost, DR. (2021) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1 (20 December 2021 accessed). Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. doi: doi.org/10.5531/db.vz.0001
- Gilbert PW. (1942) Observations on the eggs of *Ambystoma maculatum* with especial reference to the green algae found within the egg envelopes. Ecology 23: 215–227.
- Gilbert PW. (1944) The alga-egg relationship in *Ambystoma maculatum*: a case of symbiosis. Ecology 25: 366–369.
- Goff LJ, Stein JR. (1978) Ammonia: basis for algal symbiosis in salamander egg masses. Life Sci 22: 1463–1468.
- Humphries Jr AA. (1966). Observations on the deposition, structure, and cytochemistry of the jelly envelopes of the egg of the newt, *Triturus viridescens*. Dev Biol 13: 214–230.
- Hutchison VH, Hammen CS.(1958) Oxygen utilization in the symbiosis of embryos of the salamander, *Ambystoma maculatum* and the alga, *Oophila amblystomatis*. Biol Bull 115: 483–489.
- Kerney R. (2011) Symbioses between salamander embryos and green algae. Symbiosis 54: 107–119.
- Kerney R, Kim E, Hangarter RP, Heiss AA, Bishop CD, Hall BK. (2011) Intracellular invasion of green algae in a salamander host. Proc Natl Acad Sci USA 108: 6497–6502.
- Kerney R., Leavitt J., Hill E., Zhang H., Kim E., Burns J. (2019). Co-cultures of *Oophila amblystomatis* between *Ambystoma maculatum* and *Ambystoma gracile* hosts show host-symbiont fidelity. Symbiosis 78: 73–85. doi:10.1007/s13199-018-00591-2
- Kim E, Lin Y, Blumberg L, Bishop CD. (2014) Phylogenetic analysis of algal symbionts associated with four North American amphibian egg masses. PLoS ONE 9: 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0108915
- Lin Y, Bishop CD. (2015) Identification of free-living *Oophila amblystomatis* (Chlorophyceae) from yellow spotted salamander and wood frog breeding habitat. Phycologia 54: 183–191. doi: 10.2216/14-076.1
- Marco A, Blaustein AR. (2000) Symbiosis with green algae affects survival and growth of northwestern salamander embryos. J Herpetol 34: 617–621. doi:10.2307/1565283
- 松木崇司 (2016) 白山のサンショウウオ.はくさん 43(3): 9-14.石川県白山自然保護センター
- Muto K, Nishikawa K, Kamikawa R, Miyashita H. (2017) Symbiotic green algae in eggs of *Hynobius nigrescens*, an amphibian endemic to Japan. Phycol Res 65: 171–174. doi:10.1111/pre.12173

- Nema M, Hanson ML, Müller KM. (2019) Phylogeny of the egg-loving green alga *Oophila amblystomatis* (Chlamydomonadales) and its response to the herbicides atrazine and 2,4-D. *Symbiosis* 81: 187–199. doi:10.1007/S13199-018-0564-1
- Orr H. (1888) Memoirs: Note on the development of amphibians, chiefly concerning the central nervous system; with additional observations on the hypophysis, mouth, and the appendages and skeleton of the head. *J Cell Sci* s2-29(115): 295–324.
- Pinder A, Friet S. (1994) Oxygen transport in egg masses of the amphibians *Rana sylvatica* and *Ambystoma maculatum*: convection, diffusion and oxygen production by algae. *J Exp Biol* 197: 17–30.
- 佐藤井岐雄 (1943) 日本産有尾類総説. 日本出版社
- Shivers CA, James JM. (1970) Morphology and histochemistry of the oviduct and egg-jelly layers in the frog, *Rana pipiens*. *Anat Rec* 166: 541–555.
- Small DP, Bennett RS, Bishop CD. (2014) The roles of oxygen and ammonia in the symbiotic relationship between the spotted salamander *Ambystoma maculatum* and the green alga *Oophila amblystomatis* during embryonic development. *Symbiosis* 64(1): 1–10. doi: 10.1007/s13199-014-0297-8
- 田子勝彌 (1931) 『蝾螈と山椒魚』 芸艸堂
- Wille N. (1909). Conjugatae und Chlorophyceae. In: Die natürlichen Pflanzenfamilien Nachträge zum I. Teil, Abteilung 2 über die Jahre 1890 bis 1910. (Engler, A. & Prantl, K. Eds), 1–96. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann.