

## サンゴ共生性褐虫藻の新規培養株の確立

平田 皓大 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 橋本 哲男 (筑波大学 生命環境系)

### 【背景・目的】

サンゴ礁を形成する有藻性サンゴ (以降サンゴと記載) は渦鞭毛藻類に属する褐虫藻 (*Symbiodiniaceae*) と共生関係を結んでいる。サンゴと褐虫藻の共生関係においては、高温等のストレスにさらされると、サンゴから褐虫藻が脱離し共生関係が崩壊する白化と呼ばれる現象を起こすことが知られている。これまでの研究で、サンゴと共生する褐虫藻には多様な遺伝的タイプが存在し、さらにタイプごとにサンゴとの共生時のストレス耐性が異なる可能性が示唆されている<sup>(1)</sup>。しかし、褐虫藻のタイプごとの共生時の特徴に関する情報はいまだに少ない。これはサンゴと共生関係を結ぶ褐虫藻が難培養であることに起因する<sup>(2)</sup>。とくに、多くのサンゴと共生している *Cladocopium* 属の褐虫藻に関して、サンゴから単離された株についての報告例は限られている。本研究では、褐虫藻の遺伝的タイプごとの特徴理解に向けて、褐虫藻の培養条件について再検討し、サンゴの褐虫藻を単離培養することを目的とした。

### 【方法】

下田臨海実験センターで維持されていたアザミサンゴ (*Galaxea* sp.) の褐虫藻を用い、①粗培養レベルでの適切な培養条件の検討→②寒天プレートを用いた単一細胞の単離→③ rRNA 遺伝子の 5.8S を含む ITS2 領域を用いた分子系統解析という手順で研究を行った。

#### ① 粗培養レベルでの適切な培養条件の検討

サンゴから分離した時点で培養液中に褐虫藻だけでなく、他の藻類や鞭毛虫など多様な生物が存在した。褐虫藻の培養条件を検討する上で、褐虫藻以外の生物を除去する必要がある。結果として、pH2 という酸性度の高い海水で培養することで他の生物を除去できることがわかった。しかし、この条件では褐虫藻の増殖は見られなかった。そのため、pH2 の海水中で 20 日間培養を行い、他の生物をある程度除去した上で、増殖に適切な培養条件を探索した。

IMK 培地や f2 培地などの既存の海産微細藻類用の培地やサンゴのホモジネートを含む海水等で褐虫藻を培養し、その細胞数の増加率を比較した。

#### ② 寒天プレートを用いたクローン株の作成

褐虫藻の増加が見られた IMK 培地を用いて寒天プレートを作り、そこに褐虫藻培養液を塗布し、25°C、明暗周期 12h/12h で3ヶ月間培養した。

#### ③ ITS2 領域を用いた分子系統解析

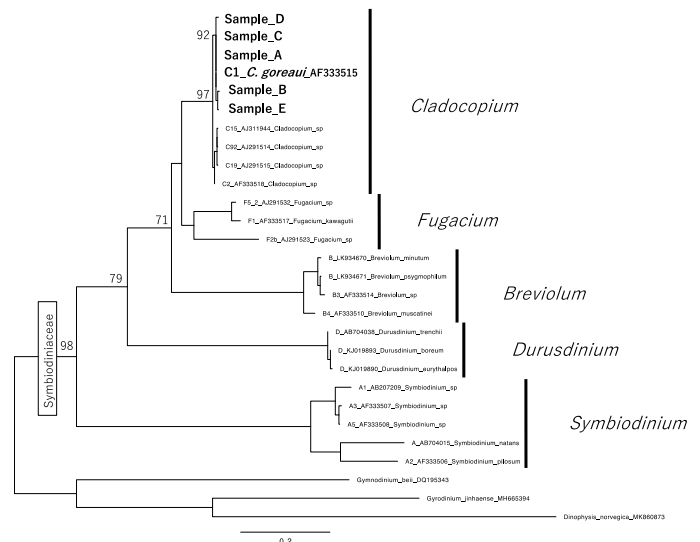
②で得られたコロニーについて 5.8S を含む ITS2 領域を PCR で増幅し、クローニングの後、シーケンシングを行い、塩基配列を決定した。これらにデータベースから取得した配列を含め、MAFFT および sea view を用いてアライメントを作成し、IQ-TREE (モデル: TIM2+I+G4+F) で分子系統解析を行った。

### 【結果】

粗培養の条件検討の結果、IMK 培地で褐虫藻の増加がみられた。そこで IMK 寒天プレートを用いて、クローン株の単離を試みたところ5つのコロニーが観察された。系統解析の結果、得られた褐虫藻のコロニーA~Eは *Cladocopium* 属の褐虫藻であり、サブクレード C1 に近縁であることが示唆された (図1)。

### 【考察と今後の展望】

今回得られた5つのコロニーのうちA株とC株に関しては、カリブ海のイソギンチャクから単離された *Cladocopium goreau* (CCMP 2466) と配列が100%一致した。このことからこの種が広い海域に分布しサンゴとも共生関係を築いていることが考えられる。残りの3株 (B, D, E) については、サンゴ由来の新規の培養株であることが確認できた。本研究で、難培養とされていたサンゴ由来の *Cladocopium* 属の褐虫藻の単離培養に成功した。同様の方法で他の共生褐虫藻も単離できる可能性があり、とくに異なる地域、異なる種類のサンゴや、様々な生息環境のサンゴから褐虫藻を単離することで、様々な褐虫藻が単離可能であると考えられる。また遺伝的に単一であるため、遺伝子解析や、サンゴとの共生関係を調べるための実験系にも応用が可能である。



(図) IQ-tree (モデル: TIM2+I+G4+F) で推定した *Symbiodiniaceae* の系統樹。

- (1) Lajeunesse et al, Current Biology, volume 28 2570-2580 e6, 2018
- (2) Krueger et al, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, volume 413 169-176, 2012