

北里大学大学院海洋生命科学研究科  
海洋生命科学専攻博士後期課程

研究論文要旨

褐虫藻獲得過程に関わる  
サンゴレクチンの探索と検証

指導教員 神保 充 准教授

平成 24 年度 海洋生命科学専攻博士後期課程入学

國谷 奈美

平成 27 年 2 月

## 褐虫藻獲得過程に関わるサンゴレクチンの探索と検証

DF12001 國谷奈美

多くの生物が生息するサンゴ礁は主に造礁サンゴ（以下サンゴ）によって支えられている。しかし、近年の地球環境変動によりサンゴ内の褐虫藻が脱落する白化現象が起きており、これが長期に渡るとサンゴは死ぬばかりでなく、その周辺のサンゴ礁生態系も破壊される。よって、サンゴと褐虫藻との共生関係を解明することは、白化現象の解決の糸口を見つけることに繋がると期待される。

多くのサンゴは、褐虫藻と呼ばれる渦鞭毛藻の一種と細胞内共生させて、ほとんどの栄養を褐虫藻の光合成産物に依存していることから、サンゴの生存には褐虫藻との共生が重要である。褐虫藻は自由生活下では鞭毛を持ち遊泳しているが、サンゴと共生すると遊泳しない形態に変わる。この褐虫藻は遺伝的な単位であるクレードにより A-I に分類されており、環境や宿主により共生する褐虫藻のクレードが異なる。各クレードの褐虫藻は、温度や光に対する耐性が異なっており、それに従ってサンゴの耐性が変化するという報告もある。

ほとんどのサンゴは元々褐虫藻を持っておらず、発生の途中で環境中から褐虫藻を獲得する。その共生の確立過程は誘引・獲得・維持の大きく3つに分けられる。サンゴはまず褐虫藻を誘引し、その後エンドサイトーシスによりサンゴの細胞内へ取り込む。そしてサンゴは細胞内へ取り込んだ褐虫藻の形態や増殖を維持することで共生を確立させる。細胞表面糖鎖を除去された褐虫藻はサンゴに獲得されないことから、この過程にレクチンの関与が示唆されている。現在までに褐虫藻の誘引・維持に関わるサンゴレクチンは見出されているが、獲得に関わるレクチンはまだ見出されていない。サンゴの一種 *Acropora tenuis* は幼生の採集が可能で褐虫藻獲得実験に適しているため、共生確立のモデル生物として使用されている。そこで、本研究では *A. tenuis* を用いて褐虫藻獲得過程に関わるレクチンを探索し、その機能を推定することを目的とした。第一章では *A. tenuis* の褐虫藻獲得過程に別のレクチンが関与するか検討した。続く第二章、第三章では褐虫藻獲得過程に関与するレクチンを同定し、機能を推定した。第四章では、*A. tenuis* から褐虫藻株を分離し、*A. tenuis* に感染させ、その共生状態を検討した。

### 第一章 *A. tenuis* による褐虫藻獲得過程に関与しうるレクチンの種類

まず *A. tenuis* による褐虫藻獲得実験に適した褐虫藻株を探索した。*A. tenuis* 初期ポリブに10種の褐虫藻株を与えたところ、7種の褐虫藻株が獲得された。そのうち、6株はクレードAに属す褐虫藻だった。同じクレードA株でも24時間後に獲得された褐虫藻数はNBRC102920株では  $19.3 \pm 8.4$  cells だったが、GTP-A6-Sy株では  $0.1 \pm 0.5$  cells であった。同じクレードの褐虫藻でもサンゴによる褐虫藻の獲得が異なることから、褐虫藻の細胞表面糖鎖が重要である可能性がある。そのため以降の褐虫藻獲得実験には、NBRC102920株を実験に用いることにした。

褐虫藻の獲得に糖結合タンパク質であるレクチンが関与するか検討するため、6種の糖を含む海水であらかじめ *A. tenuis* を飼育したのち褐虫藻を与えた。その結果、D-ガラクトース (Gal), *N*-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc), *N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) を含む海水により褐虫藻獲得が阻害される傾向がみられた。誘引に関わるサンゴレクチン ActL は GlcNAc に結合するが Gal, GalNAc には結合しないので、Gal または GalNAc 結合性レクチンが別に存在し、褐虫藻獲得過程に関与している可能性がある。

## 第二章 Gal 結合性レクチンの探索

共生維持に関与するサンゴ *Sinularia lochmodes* レクチン SLL-2 は Gal に結合し、サンゴと共生中の褐虫藻細胞表面および刺胞に分布した。そこで、*A. tenuis* に抗 SLL-2 抗体反応性タンパク質が存在するか検討した。SLL-2 は多糖では 5 糖であるフォルスマン抗原類似糖とよく結合するので、8 種のフォルスマン抗原関連糖を用いて、褐虫藻獲得への影響を検討した。その結果、フォルスマン抗原関連糖による *A. tenuis* の褐虫藻獲得阻害は、SLL-2 への結合性と類似する傾向だった。さらに *A. tenuis* による褐虫藻獲得は抗 SLL-2 抗体により阻害された。また免疫組織化学染色により、抗 SLL-2 抗体反応性タンパク質は褐虫藻の細胞表面や胃層細胞、刺胞に分布していた。褐虫藻は胃層より細胞内へ取り込まれることから、この抗 SLL-2 抗体反応性タンパク質に褐虫藻が結合することで、サンゴの細胞内へ取り込まれると示唆される。

*A. tenuis* 粗抽出液の二次元電気泳動により、抗 SLL-2 抗体に反応する、19.6 kDa, pI 5.1 のスポットを見いだした。このスポットを *de novo* シークエンシングしたところ、QFGGSQSS (I/L) K, SSSQSA (I/L) K の 2 つの部分アミノ酸配列が得られた。FASTS 検索したところ、*A. digitifera* の推定タンパク質 adi\_v1\_18693 と類似し (E 値; 1.6), カイウミヒドラ *Hydractinia echinata* の cnidarian egg lectin isoform c や海産ヒドラの一種 *Hydractinia symbiolongicarpus* の rhamnospondin 1 の配列の一部と類似していた。これらのタンパク質は Gal に結合する。SLL-2 との類似性は低かったが、一部で類似している部分があったので、その部分が抗 SLL-2 抗体と反応しているのかもしれない。従って、抗 SLL-2 抗体反応性タンパク質が *A. tenuis* の褐虫藻獲得過程に関与する可能性がある。

## 第三章 GalNAc 結合性レクチンの探索と機能の検討

GalNAc 結合セファロース 6B を用いたアフィニティ精製により、*A. tenuis* からレクチンを分離したところ、14.6, 29.0 kDa の 2 つの成分が含まれていた。これらの成分を *de novo* シークエンシングしたところ、14.6 kDa からは EFEN (I/L) VSGVK, YDQW (I/L) (I/L) ASP, HVNTV (I/L) AR の 3 つの部分アミノ酸配列が、29.0 kDa からは N (I/L) (I/L) FGVTAGK, VXXXGWHVFK (X は不明なアミノ酸を示す) の 2 つの部分アミノ酸配列が得られた。14.6 kDa の成分は *A. digitifera* の推定タンパク質 adi\_v1.13780 と類似し (E 値;  $6.7 \times 10^{-6}$ ), マガキ *Crassostrea gigas* のノイラミニダーゼモチーフ

を含む tripartite motif-containing protein 2 の配列の一部と類似していた。29.0 kDa の成分は *A. digitifera* の推定タンパク質 adi\_v1.08085 と類似し (E 値;  $7.6 \times 10^{-8}$ )、カブトガニのレクチンの一つであるタキレクチン-2 (TL-2) と類似していた。そこで、この 29.0 kDa の成分を AtTL-2 と名付け、RACE 法により cDNA 配列を決定した。抗 TL-2 抗体は AtTL-2 の糖結合性を阻害した。この抗体を含む海水で *A. tenuis* を 1 時間飼育すると、初期ポリプによる褐虫藻の獲得は有意に阻害された。抗 TL-2 抗体を用いた免疫組織化学染色により、AtTL-2 は刺胞や共生する褐虫藻の周辺に分布していた。興味深いことに、AtTL-2 組換え体は褐虫藻をゆっくりと誘引した。これらのことから、*A. tenuis* から放出された AtTL-2 により褐虫藻の *A. tenuis* への遊泳を制御する可能性がある。

#### 第四章 *A. tenuis* からの褐虫藻の分離と共生状態の検討

現在まで、褐虫藻獲得実験で用いてきた褐虫藻は、*A. tenuis* 由来ではない。*A. tenuis* から褐虫藻株を採ると、本来の *A. tenuis* の褐虫藻獲得過程が検討できる。そこで、宿主粗抽出液を含む培地で *A. tenuis* より分離した褐虫藻を培養したところ、継代培養可能な褐虫藻株 AtJK-C1 を得た。この株はクレード C1 に属することから、初めてサンゴから得られたクレード C の株であった。*A. tenuis* ポリプに褐虫藻株 NBRC102920 と AtJK-C1 を感染させたところ、24 時間後では AtJK-C1 ( $8.0 \pm 3.2$  cells) は NBRC102920 ( $13.6 \pm 2.7$  cells) より獲得褐虫藻数が少なかった。NBRC102920 は、獲得開始から 13 日目まで増殖したが ( $276.7 \pm 125.5$  cells)、19 日目より減少し、30 日目には 6 個体中 2 個体が死んでしまい、生存するもので  $156.0 \pm 61.6$  cells だった。一方、AtJK-C1 は獲得開始から 13 日目より増殖しだし、30 日目には  $635.0 \pm 168.0$  cells になった。サンゴの個体サイズは、AtJK-C1 を獲得したものの方が大きくなった。今回分離した AtJK-C1 は *A. tenuis* の成長に適した株であり、共生の維持を検討するために適した褐虫藻であるとわかった。

#### 総括

第一章より、サンゴによる褐虫藻の獲得には Gal, GalNAc, GlcNAc 結合性レクチンが関与していると示唆される。GlcNAc 結合性レクチン ActL はすでに誘引に関わることが見出されている。Gal 結合性レクチンは第二章でその存在が推定され、GalNAc 結合性レクチンは第三章で AtTL-2 であることを明らかにし、褐虫藻の誘引の微調整に関わることを明らかにした。本研究により、*A. tenuis* の褐虫藻獲得過程は以下の様に仮説を立てることが出来る。すなわち、共生可能な褐虫藻は ActL や AtTL-2 により *A. tenuis* ポリプ周辺まで誘引され、最終的に抗 SLL-2 抗体反応性タンパク質が結合することにより細胞内へ取り込まれると推測される。第四章より得られた褐虫藻株 AtJK-C1 は、*A. tenuis* の成長に適した褐虫藻株である。共生の維持に関わる因子は不明なままであることから、この株を用いることにより共生の維持に関わる因子の探索に用いることができると期待される。