

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

サンゴの褐虫藻獲得におけるレクチンの機能

指導教員 神保 充 准教授

平成 26 年度海洋生命科学専攻博士後期課程入学

竹内 亮太

平成 29 年 3 月

熱帯・亜熱帯地域の海域は貧栄養であるが、サンゴ礁の周辺には多種多様な生物が存在している。これを支えている生物の一つが造礁サンゴ（以下：サンゴ）である。多くのサンゴは褐虫藻と呼ばれる渦鞭毛藻の一種を細胞内共生させ、その光合成産物を大部分の栄養として利用しているので、サンゴにとって褐虫藻との共生は重要である。しかし、多くのサンゴは元々褐虫藻を持っておらず、プラヌラ、稚ポリプの段階から褐虫藻を獲得する。稚ポリプは動くことができないので、積極的に褐虫藻を獲得することは困難だと思われる。また、海水中の褐虫藻密度は 5 cells/ml から 130 cells/ml 程度であり、偶然の接触により褐虫藻を獲得することは難しいと思われる。したがって褐虫藻を獲得するために、サンゴは褐虫藻を誘引していると推定される。そこで我々は褐虫藻獲得メカニズムを明らかにするのに適したモデル生物であるサンゴの一種 *Acropora tenuis* を用いて褐虫藻誘引因子の探索および褐虫藻獲得における役割を検討することを目的とした。

## 第一章 誘引活性成分の精製およびその構造決定

誘引物質を含んだキャピラリを褐虫藻が遊泳している培地に挿入し、キャピラリに入った褐虫藻数を計数する誘引活性測定法を確立した。この方法により、*A. tenuis* 粗抽出液に含まれる誘引活性成分はタンパク質成分であることがわかった。粗抽出液による誘引は A-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の添加によって阻害されたことから、GlcNAc 結合レクチンが誘引物質だと示唆されるので、ActL は群体によって分子量が異なることがあったので、産地によっても成分が異なる可能性がある。そこで、瀬底産または石垣産 *A. tenuis* 粗抽出液に含まれている GlcNAc 結合性レクチン ActL を精製し、誘引活性を検討したところ、それぞれの産地の *A. tenuis* が獲得しやすい褐虫藻に対し誘引活性を示した。ActL をゲル内消化した後、*de novo* シークエンシングを行ったところ、瀬底島産では AEVHPSYDSN, S(I/L)AWQA(I/L), APSGGSGTHVDT(I/L)AR, YYNYGGT, NEPGAPEEQ(I/L)TSNK の 5 つの部分アミノ酸配列が、石垣島産では KA(I/L)HMAAAPK, SHVNTV(I/L)A, DAEVS(I/L)R, ATEDAD(I/L)VAK, NEPGAPEDE(I/L), DGAYSF(I/L)CR の 6 つの部分アミノ酸配列が得られた。これらの配列を *A. tenuis* の遺伝子モデルと比較したところ、s130\_g38.t1, s201\_g17.t1, s201\_g18.t1 と高い類似性を示した。これらの遺伝子モデルは幾つかの *Acropora* 属で見出されたが、他の生物では類似の部分配列が見当たらなかった。また ActL の配列は石垣産と瀬底産で E 値が異なること、ハワイの ActL 様アミノ酸とは配列が異なることから、*A. tenuis* は迅速に適した褐虫藻を獲得するためにサンゴの生息環

境に適した褐虫藻を獲得するために、獲得に関わるレクチンを変化させているのかもしれない。

## 第二章 ActL の作用機構の検討

様々な褐虫藻株に対する ActL の誘引活性を測定したところ、稚ポリプが獲得しやすい褐虫藻株を誘引する傾向があった。ActL による誘引は、ActL 結合糖の GlcNAc 添加により阻害される一方、結合しないグルコース (Glc) では誘引が阻害されなかった。このことから、褐虫藻の誘引には ActL との結合が重要であると示唆される。褐虫藻の誘引は、褐虫藻の遊泳方向が変化することで起こるはずなので、ActL が褐虫藻の動きに影響すると予想される。そこで、試料添加時に褐虫藻がどのように遊泳するのか観察した。褐虫藻は ActL により直線的に遊泳することで誘引されたが、粗抽出液付近では円の軌跡を描きながら遊泳し誘引された。粗抽出液付近の動きは、GalNAc 結合レクチン AtTL-2 と類似していた。したがって、ActL は褐虫藻の推進力を調節する一方、AtTL-2 は進行方向の調整に関与している可能性がある。

## 第三章 稚ポリプの褐虫藻誘引能における ActL の役割

稚ポリプに対する誘引は、褐虫藻 NBRC102920 株が稚ポリプに向かって遊泳することとした。5 分間で稚ポリプに誘引される褐虫藻数は GlcNAc および抗 ActL 抗体を添加することで低下した。誘引される際の褐虫藻の軌跡は粗抽出液に誘引される時と類似しており、GlcNAc および抗 ActL 抗体の添加により褐虫藻はその場で回転した。以上より、ActL は体外に放出されていると予想されるので、稚ポリプから飼育海水に放出された ActL を ELISA により定量した。その結果、3.4 ng/ml/10 polyps だった。これまでの実験でプラヌラ幼生に含まれる誘引因子がガラス製品に吸着すると推定されるので、もしかすると ActL は飼育容器に吸着しやすいために、ELISA による定量結果は、実際に放出される ActL 量より低く見積もられているのかもしれない。ActL のこの放出量により褐虫藻を誘引できるかは検討する必要があるものの、稚ポリプは ActL を放出して褐虫藻を誘引していると示唆される。

## 第四章 環境中における誘引活性の検討

ActL がサンゴ礁海域においても褐虫藻を誘引するか検討した。誘引トラップとして 50 ml チューブに ActL または粗抽出液を含む 1%寒天 20 ml を作製し、トラップに入った褐虫藻数を定量した。実験は 2013 年から 2015 年の 3 回行い、2013 年は瀬底産の ActL では、クレード A の褐虫藻が ActL を含む寒天に有意に多く入り、ActL が環境中でも褐虫藻を誘引することを見出した。2014 年は、粗抽出液に含まれる寒天にクレード B の褐虫藻が多く入り、抗 ActL 抗体を添加で褐虫藻数が低下したので、粗抽出液中の ActL がクレード B の褐虫藻を誘引したと示唆される。2013 年の瀬底産 ActL ではクレード B の褐虫藻は誘引されなかったことから、サンゴの産地によ

って ActL が誘引するクレードが異なると示唆されるので、2015 年には、石垣産および瀬底島産 *A. tenuis* 粗抽出液を用いて誘引実験を行った。その結果、瀬底島産 *A. tenuis* の粗抽出液は対照に比べ、クレード A の褐虫藻誘引する傾向にあり、抗 ActL 抗体を添加する誘引が阻害される傾向にあった。一方、石垣島産 *A. tenuis* 粗抽出液を用いた場合、粗抽出液はどのクレードに対しても誘引活性を示さず、クレード D では褐虫藻数の減少が見られた。石垣島産 *A. tenuis* の粗抽出液については年度を通じた共通性は見出せなかったものの、ActL が環境中においても褐虫藻を誘引すると推定される。

## 第五章 総合考察

本研究で誘引活性測定法を確立したことにより *Acropora tenuis* の粗抽出液に含まれる褐虫藻誘引因子の探索が可能になった。この実験系は *Aiptasia pulchella* の粗抽出液においても有効であることから、他の生物の誘引因子の探索にも利用出来ると期待される。

ActL は、*A. tenuis* 稚ポリプに多く獲得される褐虫藻株を誘引した。また、環境中での誘引実験により、ActL がクレード A の褐虫藻を誘引することが明らかになった。これは *Acropora* 属の幼生が環境中の褐虫藻相とは異なる比率で褐虫藻を獲得しているおり、自然環境下の *Acropora tenuis* 稚ポリプに獲得される褐虫藻クレードは環境中で比較的多いクレード D だけでなく、環境中ではほとんど検出されないクレード A も多く獲得されている現象のかなりの部分を ActL で説明出来ると思われる。

*A. tenuis* の産地により誘引する褐虫藻株が異なること、獲得する褐虫藻株異なっていた。ActL の遺伝子モデルは、石垣島産 *A. tenuis* を用いて得られたものであるが、今回塩基配列を決定したのは、瀬底産 *A. tenuis* であり、両者には 6 残基の違いが見られた。その一方、ハワイ産の *A. tenuis* の遺伝子モデルも存在するが、そのアミノ酸配列とは 44 残基の違いが見られた。サンゴにおいてもレクチンがポジティブセレクションされていることが報告されていることから、ActL の配列に変異が多く見られるのはこれが原因である可能性がある。これにより、その地域の環境に適した褐虫藻を誘引しているのかもしれない。

また、正常な成体 *A. tenuis* の ActL の発現量はあまり多くない一方、稚ポリプでは ActL の発現量が多いことから、*A. tenuis* は褐虫藻を獲得しなければならない状態のときに ActL を発現させているのかもしれない。た、本研究で精製した ActL は成体 *A. tenuis* の粗抽出液から得ている。既に褐虫藻を獲得しており、新たに褐虫藻を獲得する必要がないのにもかかわらず ActL を有していることから、もしかすると、白化が起こった際にすぐに褐虫藻を獲得できる機構は常に残しているのかもしれない。