

サンショウウオの卵に共生する緑藻の系統分類学的研究

成田 紗由美 (筑波大学生物学類)

指導教員：中山 剛 (筑波大学生命環境系)

【背景・目的】

一部の両生類の卵には緑藻が共生していることがある (図1)。いくつかの研究から、両者は相利共生の関係にあると考えられている。こうした両生類の卵に共生する緑藻は *Oophila amblystomatis* として記載された後、3 属 6 種のサンショウウオ及びカエルの卵から発見された。このような共生緑藻の系統について、先行研究では、2つの異なる系統 (*Oophila* クレード A,B) に分かれるということが示唆されている (Nema et al. 2019)。このうち、日本ではクロサンショウウオ (*Hynobius nigrescens*) の卵から、クレード B の共生緑藻が報告されている (Muto et al. 2017, Vences et al. 2024)。

一方で、日本ではクロサンショウウオ以外からは、このような共生緑藻は報告されていない。また、クレード A,B ともに共生緑藻の形態に着目した詳細な研究はほとんどない。そこで、本研究では、クロサンショウウオ及びオオイタサンショウウオ (*Hynobius dunni*) の卵に共生する緑藻の系統及び形態を明らかにすることを目的とした。

【材料・方法】

<卵塊の採集・形態観察・培養株の作成>

クロサンショウウオの卵は2023年4月及び2024年5月に菅平高原実験所のトンボ池において採集されたものを用いた。また、オオイタサンショウウオの卵は、2024年4月に大分大学構内において孵化後に採集されたものを用いた。

卵は光学顕微鏡 (Zeiss, Imager.A2) を用いて共生緑藻の観察を行った。また、パスツールピペットを用いて共生緑藻を単離し、AF-6 培地で培養した。得られた培養株についても、光学顕微鏡による形態観察を行った。

<分子系統解析>

まず、培養株から DNeasy® Plant Mini Kit を用いて DNA を抽出した後、18S rRNA 遺伝子の PCR 配列の増幅及びダイレクトシーケンスによる配列決定を行った。次に、Nakada et al. (2008) のデータセットをもとにクラミドモナス目全体の配列を GenBank から取得し、得られた配列を加えてデータセットを作成した。その後、MAFFT によるアライメント、TrimAl によるトリミングを行い、IQ-TREE 2 により最尤系統樹を作成した。

<シングルセル解析>

クロサンショウウオの卵共生藻について、パスツールピペットを用いて1細胞単離した後、倒立顕微鏡を用いて形態写真を撮影した。その後、PCR チューブに入れて冷凍保存した。得られた細胞について REPLI-g キットを用いた全ゲノム増幅を行った後、PCR により 18S rRNA 遺伝子を増幅した。その後、ダイレクトシーケンスにより 18S rRNA 遺伝子の配列決定を行い、培養株から得られた配列との比較を行った。

【結果・考察】

<共生藻の形態観察・培養株の作成>

2023年に採集したクロサンショウウオの卵においては、Muto et

al. (2017)の報告と同様に球形の緑藻や細胞壁に突起のある細胞が観察された。一方で、2024年に採集したクロサンショウウオの卵においては、球形の細胞の他に、等長または不等長の鞭毛をもつ細胞が観察された。また、クロサンショウウオの卵に共生する緑藻について単離したところ、各年で2株ずつ培養株が得られた。

オオイタサンショウウオの卵においては、クロサンショウウオで観察された細胞に類似した球形の細胞や突起のある細胞が観察された。そのほか、等長の鞭毛をもつ細胞も観察された。しかし、培養株は得られなかった。

<分子系統解析>

2023年と2024年にクロサンショウウオの卵から単離・培養した共生藻について分子系統解析を行ったところ、2023年に得られた培養株はクレード A、2024年に得られた培養株はクレード B に含まれることが分かった。同一の場所から異なる系統に属する共生緑藻が得られたのは初めての報告であり、このような共生緑藻の系統の差異は場所によるものではなく、宿主胚の発生段階などによるものである可能性がある。

<シングルセル解析>

クロサンショウウオの卵から単離した直後の細胞形態と培養株で観察される細胞形態を比較したところ、単離直後の細胞形態はクレード A と B の培養株で観察された細胞のどちらにも類似していなかった。一方で、得られた 18S rRNA 遺伝子の部分配列はクレード B の配列とほぼ一致していた。このことから、少なくともクレード B の共生緑藻は共生時と自由生活時では異なる形態をもつと考えられる (図2)。

【今後の展望】

今後はクレード A、B の形態的な比較を行うため、透過型電子顕微鏡による微細形態の観察を行っていく。

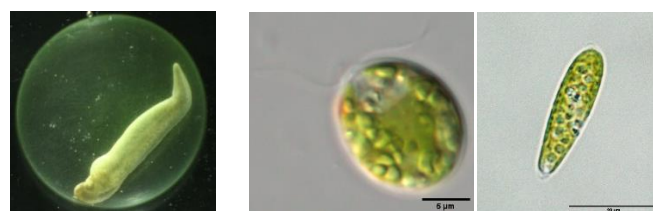


図1 緑藻が共生する卵 図2 クレード B の培養株の形態 (左) とシングルセル解析で観察された形態 (右)

【参考文献】

Muto et al. (2017) doi: <https://doi.org/10.1111/pre.12173>

Nema et al. (2019) doi: [10.1007/s13199-018-0564-1](https://doi.org/10.1007/s13199-018-0564-1)

Vences et al. (2024) doi: <https://doi.org/10.1016/j.jympev.2024.108165>

【謝辞】

クロサンショウウオの卵のご提供や採集協力をしていただいた出川洋介博士、オオイタサンショウウオの卵をご提供していただいた永野昌博博士に感謝申し上げます。