琉球大学学術リポジトリ

イシサンゴの種特異性および自己特異性に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 日高道雄 公開日: 2009-07-27 キーワード (Ja): イシサンゴ, 自他認識, 群体, 組織適合性, 種特異性 キーワード (En): NEMATOCYST, COLONY, MESENTERIAL FILAMENTS, APOPTOSIS, CHIMERA, CORAL, HISTORECOGNITION, HISTOCOMPATIBILITY 作成者: 日高, 道雄, Hidaka, Michio メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/11487

第２部　ハナヤサイサンゴの成群体間の接触反応

要　旨

ハナヤサイサンゴ*Pocillopora damicornis*の幼群体どうしを接触させると、組織や骨格は癒合するものの、境界部に共生藻の少ない白い帯域の生ずる反応（非適合癒合）が見られることが多い。この非適合癒合反応は、組織非適合性システムが十分発達していない幼群体でのみ生じる特異な反応であるのか、成群体間においても非適合癒合反応が生ずるのかはまだ分かっていない。そこで本研究では成群体間において非適合癒合反応が生じるかどうかを確かめることを目的として、ハナヤサイサンゴの成群体より単離した枝を用いて接触実験を行い、境界部組織の微細構造を観察した。

同じ群体の枝どうしのペアは全て癒合した（2組み合わせ2ペア）。異なる群体間のペアは16組み合わせ45ペアの内、3組み合わせ9ペアは癒合し、13組み合わせ36ペアは非癒合を示した。実体顕微鏡下の観察で明らかに非癒合と識別された23ペアの他、12ペアは、脱灰後組織が分離したため非癒合と判定した。分離しなかった1ペアについても組織観察の結果、２枝の組織は癒合していないこと、境界面にバリヤーとなる物質が分泌されていることから非癒合と判定した。また脱灰後分離したペアの接触面の組織を観察したところ、14例中6例で少なくとも一方の接触面にバリヤー物質が観察された。非適合癒合反応を示す組織像は今回観察したどのペアにおいても観察されなかった。

非癒合ペアにおいても、接触部付近の皮層組織に、非適合癒合ペアで見られるような大きな空胞が多数見られた。このことは、非癒合反応を示すペアにおいても、成長先端部では両組織が接し、何らかの組織非適合反応が起こっている可能性を示唆する。

目　的

群体性のイシサンゴでは、同群体由来つまり遺伝子組成が等しいサンゴ片を接触させると癒合する。しかし異群体由来つまり遺伝子組成が異なるサンゴ片を接触させると、境界面に骨格の壁を形成して組織が癒合しない場合(非癒合：Nonfusion)と細胞毒性によってペアの一方または両方の境界部組織が1mm～数mmにわたって壊死する場合(拒絶：Rejection; Hildemann et al., 1975, 1977)の2つのパターンの接触反応が知られている。非癒合のペアでは時間が経過すると境界面の骨格の壁は一方に傾いてゆき、その結果一方の組織が他方に覆いかぶさることになる(被い覆せ：Overgrowth)。

Hidaka（1985）は、ハワイのハナヤサイサンゴでは遺伝的に異なったポリプどうしであっても、定着したばかりの一次ポリプあるいは幼群体の時期には組織非適合反応を起こさず癒合してしまうことを報告した。しかし沖縄のハナヤサイサンゴの幼群体間の接触反応を調べた最近の研究では、異群体由来の幼群体どうしを接触させると、多くの場合癒合反応とは異なる新しい反応を示した。この反応は接触面で組織は連続しているものの、境界部に共生藻がほとんど見られない白い帯域を持つこと、また骨格も連続してはいるが両側に突起の並ぶ溝を持つという2つの点で癒合とは異なっているため、非適合癒合(Incompatible fusion)と呼ばれた(Hidaka et al, 1997）。また癒合と非癒合の反応は他の反応に変化しないが、非適合癒合を示すペアのほとんどは数か月後に非癒合へと移行する。そして、その変化の際に境界部ではアポトーシス（細胞自死）が起こっていることが示唆されている(Hidaka and Yogi, 1996)。

しかし、成群体間においても非適合癒合反応が生ずるかどうはまだ分かっていない。成群体間で非適合癒合反応が観察されれば、プラヌラを採集し定着させることから始まる幼群体間の接触実験と比べて容易に実験ができ、非適合癒合から非癒合へと変化する機構を調べる実験系として適している。また、もし成群体間で非適合癒合が観察されなければ、非適合癒合は幼群体間でのみ生じる反応であるということになる。幼群体では組織非適合性システムが十分発達していないため、遺伝的に異なる相手を完全に排除できずに癒合してしまが、その後、何らかの自他認識が起こり非癒合へと移行するという可能性が考えられる。本研究ではハナヤサイサンゴの成群体間において非適合癒合反応が生じるかどうかを確かめることを目的として、成群体の枝を用いて接触実験を行い、各接触反応における接触部組織の微細構造の観察を行った。

材 料 と 方 法

1）材料

実験は沖縄県本部町瀬底島にある熱帯生物圏研究センター瀬底実験所で行った。実験に用いたハナヤサイサンゴ*Pocillopora damicornis*は、1996年7月12日と10月26日の2回にわけて、瀬底ビーチ（ＳＢ）・備瀬（Ｂ）からそれぞれ5コロニーずつ採集した。採集にあたっては、瀬底ビーチでは約30m、備瀬では狭い区域だったため約10mの間隔をおいて任意にコロニーを選び、ハンマーとタガネを用いてサンゴを傷つけないようにコロニー全体を採集した。採集したハナヤサイサンゴは空気に触れないように海水の入ったバケツに入れ、実験所に運んだ。実験所ではコロニー別に採集地とコロニー番号を記入したタグを付けて屋内水槽で飼育した。

2）接触実験

採集してきたコロニーをハンマーとタガネで1.2～1.5cmの大きさの枝に割り、接触実験に用いた。カットした枝から、接触面の安定する相性の良い枝どうしを選んで接触させ、そのまま、あるいは一度釣糸で結んでから、輪ゴムでスライドグラス上に固定しスライドグラスホルダーに立て、流海水の屋内水槽で飼育した。飼育したペアの接触部がどう変化したか、10日～38日後に実体顕微鏡下で観察・写真撮影を行った。成群体10コロニーより単離した枝を用いて合計27の組み合わせで112ペアの接触実験を行った。内訳はコントロールとして同群体由来の枝を接触させたものが6組み合わせ12ペア、異なる群体由来の枝を接触させたものが21組み合わせ100ペアである。

3）光学顕微鏡及び透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）による境界部の組織学的観察

接触反応が観察された47ペアの内、癒合4ペア、非癒合14ペアの計18ペアを光学顕微鏡及び透過型電子顕微鏡用に固定した。固定は、スライドグラスごと室温下で2時間2.5%グルタルアルデヒドによる固定を行った。緩衝液で2回洗浄後、3回目の液で2～9時間保存した後、室温下で2時間1%オスミウム酸による固定を行った。脱灰した後、解剖用のハサミを使って包埋に適した大きさに組織をカットした。脱灰は、Johnston(1979)の方法に従い、2% ascorbic acidと0.3M NaClを1:1に混合した脱灰液を使用した。脱灰液に浸したサンプルは暗黒下に置き、脱灰液は約12時間毎に新しく作った脱灰液と交換した。脱灰後70%エタノール中で小さくカットし、70%エタノールに浸し冷蔵庫で保存した。70%エタノールに浸したサンプルを冷蔵庫から取りだし室温に戻し、脱水後、Spurr樹脂に包埋した。包埋したサ

ンプルは、ウルトラミクロトーム（MT-2）で光学顕微鏡用の組織切片（約0.5μm厚）とＴＥＭ用組織切片（約0.1μm厚）を作成した。光学顕微鏡用の組織切片は1% methylene blue, 1% azurⅡ in 1% boraxで30～80秒間染色した。透過型電子顕微鏡用の組織切片は酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛を用いて２重染色を行った後、透過型電子顕微鏡（日本電子 JEM-2000 EX）で観察した。

結　果

１）成群体間では非適合癒合反応は見られない

接触実験を行った27組み合わせ112ペア中、18組み合わせ47ペアで接触反応が観察された。そのうち同群体の枝どうしの２組み合わせ２ペア及び異群体間の３組み合わせ９ペアは癒合(Fusion)、13組み合わせ36ペアは非癒合(Nonfusion)を示し、非適合癒合(Incompatible fusion)は観察されなかった(Table 1)。

同群体の枝どうしの組み合わせ（2組み合わせ2ペア）はすべて癒合し、異群体間の組み合わせでも癒合するもの（3組み合わせ9ペア）が観察された(Table 1)。これらの癒合ペアでは、両群体の組織は完全に一体化し、境界部とそれ以外の部分とで共生藻の分布に違いは見られなかった。癒合したペアは脱灰後群体を固定していた釣糸を外しても組織は分離せず一体化していた。

異なる群体由来の枝の組み合わせのうち、13組み合わせ23ペアは、接触部に形成された骨格の壁によって組織が隔てられていることが観察され、非癒合と判定された(Fig. 1A)。これら以外の異群体間の接触（8組み合わせ14ペア）では、実体顕微鏡下では、非癒合か非適合癒合か判別が困難であった(Fig. 1B)。しかし、これら14ペアのうち13ペアでは、脱灰後、固定した釣糸を外したときにペアは分離した。脱灰後も組織が分離しなかった1ペア（#078）の境界部の組織を光学顕微鏡で観察したところ、両群体の組織は癒合せず、境界面に何らかの物質が分泌されていた(Figs. 2, 3)。脱灰後分離した13ペアの片方あるいは両方の群体の接触部の組織を観察した結果、すべて接触部に物質を分泌して境界を作り、組織が癒合していなかったことが確認された(Fig. 6)。

以上のように実体顕微鏡下では非適合癒合と区別の付けにくかった反応も、非癒合反応であることが組織観察の結果確かめられた。実体顕微鏡下で非癒合と判定された13組み合わせ23ペアおよび組織観察の結果非癒合と判定された8組み合わせ14ペアの計13組み合わせ36ペアの全てが非癒合反応であり、Hidaka and Yogi (1996), Hidaka et al (1997)が示したような非適合癒合反応は観察されなかった。

2）非癒合ペアの組織学的特徴

①脱灰後も分離しなかったペア（#078）の特徴

両群体は接触し続けてはいるものの組織は連続しておらず、接触部に何らかの物質を分泌し境界を形成していた(Figs. 2, 3)。接触部に観察された物質はいくつかの中心を持ちその中心から層状に広がっていく構造を持った小さな物質がいくつか並びさらにその回りを層状に物質が広がっていくというような構造を持っていた(Fig. 4)。

接触部の皮層組織には、非適合癒合ペアで見られたのと同様の多数の空胞が観察された。細胞の核が空胞と空胞の間に押しつぶされたように凝集して散在していた。空胞内には繊維状の構造が観察された(Fig. 5)。

接触部周辺の組織には、消化胞と思われる液胞も観察され、中には電子密度の高い物質が詰まっていた(Fig. 6A)。また、分解中の共生藻も観察された(Fig. 6B)。分解中の共生藻はサイズが縮小し、共生藻を含んでいた小胞の膜から分離していた。共生藻は変形し、核などの細胞内の小器官も分解されつつあった。

②脱灰後分離したペア

脱灰後分離したペアにおいても、ペアの両方の組織を観察した場合には、少なくとも一方の群体の接触面に境界物質が分泌され付着していた(Fig. 7)。接触部付近の中膠の肥大、皮層の空胞が程度の差はあれ観察された。

3）癒合ペアの組織学的特徴と癒合の進行過程

光学顕微鏡の観察では、2つのコロニーはその境界部は滑らかに連続して他の部域の組織と特に変わりはなく、皮層・中膠・胃層が明確な三層構造をなして胃腔を形成し、完全に一体化していた(Fig. 7)。癒合ペア(SB1-SB2)の接触部の異なる部位の組織切片を観察することにより、癒合の進行過程を示す4つの段階が観察された(Fig. 8)。先ずサンゴ体の一番外側にある皮層(Epidermis)が触れ合う所で一部分の癒合が始まっていた。次に癒合面が広がりその外縁は滑らかで境界が分からなくなり、皮層部分が完全に一体化していた。さらに、接触しているペアの一方の中膠(Mesoglea)と胃層(Gastrodermis)が同時に他方へ侵入した(Fig. 9)。最終的に皮層・中膠・胃層が明確な三層構造を成して胃腔を形成し、完全に癒合していた。この段階では2つの群体としてではなく1つの群体として生活していたといえるだろう。

考　察

1）成群体間では非適合癒合反応は見られない

接触反応の実体顕微鏡下での観察において、ハナヤサイサンゴの成群体ではこれまで行われてきた幼群体間の接触反応と同様に、癒合、非癒合、非適合癒合の3つのタイプがあるかのように思われた。しかし非適合癒合と思われた13例中1例を除き、脱灰後に両群体の組織が分離することから、12例のペアは非癒合であることが示唆された。脱灰後に組織が分離しなかった1例も、光学顕微鏡による境界部組織の観察の結果、接触面の組織は不連続であり、分泌物により接着されていたことが分かった。ハナヤサイサンゴの成群体間においては非適合癒合反応は起こらないと考えられる。ハナヤサイサンゴの成群体間の接触反応には癒合と非癒合の2つのタイプしか見られず、非適合癒合反応はプラヌラ幼生が定着して間もない幼群体間の時期にのみ見られる反応だと言える。

この結果は、『発生初期には組織非適合性システムが十分発達していないため相手を拒絶できずに組織は一度癒合するが、機能的な組織非適合性システムが発達すると非自己の細胞を認識して相手組織を排除する』という考えを支持する。ハナヤサイサンゴの非適合癒合を示すペアは数か月たつとほとんどのペアが非癒合へと移行する(Hidaka et al., 1997)。機能的な組織適合性システムが、いつ発現するのかを調べることが今後の課題である。

今回の実験で非適合癒合は観察されなかったが、成群体間の接触においても接触初期に組織は非適合癒合を起こすが、すぐに非癒合へと移行してしまうため観察されなかったという可能性は捨てきれない。この可能性を排除するためには、成群体間の接触初期段階のより詳しい観察が必要である。

2）非癒合ペアの境界部の形態について

非癒合反応を示すペアの接触部の切片を作成し光学顕微鏡や透過型電子顕微鏡で観察すると、組織は不連続であり、境界面に何らかの物質が分泌され両組織は隔てられていた。境界物質はいくつかの中心を持ちその中心から外側に同心円状に層状構造が広がっていく構造をしている。この境界物質は、遺伝的に異なる淡水カイメンが接触したときに境界面に分泌するコラーゲン繊維を含んだバリアー物質(Humphreys, 1994)に近いものか、それとも骨格形成の前段階として分泌された基質であるのかそれとも脱灰後に残った骨格基質であるのか興味深いが、境界物質の化学的性質については今後調べたい。

さらに非癒合ペアの接触部付近の組織に大きな空胞が多数観察されたが、これは

Hidaka and Yogi (1996)が観察した非適合癒合ペアの接触部の形態と似ている。このことは非癒合のペアにおいても、成長先端部においては両群体の組織が接触し、相手組織から何らかの影響を受けていることを示す。接触部の組織には分解中の共生藻や皮層から何らかの小胞が放出されている像が観察され、この群体は遺伝的に異なる群体との接触により悪影響を受けていることを示していると考えられる。

今までサンゴにおいては、非癒合反応は拒絶反応と異なり、両群体が互いに組織の損傷を与えずに共存している状態と考えられてきた。多くの場合接触した２群体の成長速度が全く等しいことはまれであるので、一方の群体が他方の群体を覆いかぶせることになる。しかし今回の結果は、覆いかぶせにおいてどちらの群体が優位に立つかは、必ずしも成長速度のみによって決まるのではなく、成長先端部での相互作用の結果、相手の成長を阻害して覆いかぶせてしまうという可能性を示唆する。

３）癒合反応の進行過程

いくつかの癒合ペアの組織観察から以下のような癒合の進行過程が推測された。両群体が出会うと、サンゴ体の一番外側にある皮層(Epidermis)が触れ合う所で癒合が始まり、ついで癒合面が広がり皮層部分が完全に一体化してブリッジを形成する。次に、接触しているペアの一方の中膠(Mesoglea)と胃層(Gastrodermis)が、癒合した皮層のブリッジに侵入していく。最終的には中膠、胃層も癒合し、皮層・中膠・胃層が明確な三層構造を成して胃腔を形成し、完全に癒合する。この段階では２つの群体というより１つの群体と見なされる。

癒合の際に中膠と胃層が皮層のブリッジへと侵入する像は、B2-B2の組み合わせで観察された。もし遺伝子組成が異なる組み合わせでの癒合でこの様な反応が観察されるとしたら、その侵入後の細胞の行方は大変興味深い。

まとめ

ハナヤサイサンゴの成群体間の接触実験では、幼群体間の接触実験で見られる非適合癒合反応は観察されなかった。非適合癒合反応は、幼群体間のみに見られる反応であり、機能的な組織非適合性システムが発達していないために起こる反応であると考えられる。遺伝的に異なる幼群体同士が接触したときに、相手を拒絶できずに癒合してしまうが、細胞レベルでは何らかの非適合反応が起こっているために普通の癒合とは異なる反応を示すと考えられる。

非癒合ペアでは、遺伝的に異なる群体と接触すると、境界面に何らかの物質を分泌し、さらに骨格の壁を形成してて組織を隔てると考えられる。しかし、接触部付

近の皮層には空胞や肥大した中膠などが観察され、非癒合ペアにおいても成長先端部では組織が接触するため、接触部で何らかの組織非適合反応が起こっていることが示唆される。この非適合反応が一方の成長速度を低下させるように働き、覆いかぶせ(overgrowth)の強弱の序列を決めている可能性が考えられる。

引 用 文 献

Hildemann WH and DC Linthicum (1975) Transplantation and immuno-incompatibility reactions among reef-building corals. Immunogenetics, 2: 269-284

Hildemann WH, RC Raison, G Cheung, CJ Hull, L Akaka and J Okamoto (1977) Immunological specificity and memory in a sceractinian coral. Nature, 270: 219-223

Hidaka M (1985) Tissue compatibility between colonies and between newly settled larvae of *Pocillopora damicornis*. Coral Reefs, 4: 111-116

Hidaka M and M Yogi (1996) Incompatible fusion between young colonies of the coral Pocillopora damicornis: ultrastructure of the interface region. Zool Sci. Vol 13 Supplement: 131

Hidaka M, K Yurugi, S Sunagawa and RA Kinzie III (1997) Contact reaction between young colonies of the coral *Pocillopora damicornis*. Coral Reefs. 16: 13-20

Humphreys T (1994) Rapid allogeneic recognition in the marine sponge *Microciona prolifera*. Ann N Y Acad Sci 712: 342-345

Table 1. Contact reactions between branches from adult colonies of *Pocillopora damicornis*. Numbers indicate the number of pairs that show either fusion or nonfusion. Type of reaction was identified based on histological observations of the interface region under light microscope, when necessary. The letter indicates site of collection; B, Bise; SB, Sesoko beach.

combination	days of contact	Fusion	Nonfusion
B2-B2	38	1	
B3-B3	38	1	
B2-B3	38	2	
SB1-SB2	28	3	
	38	3	
SB4-SB5	18	1	
B1-B2	28		1
B4-B5	18		3
B1-SB1	28		3
	38		1
B1-SB2	28		3
B2-SB1	28		2
	38		3
B20SB2	28		2
B2-SB3	38		2
B3-SB2	38		1
B3-SB3	38		1
B4-SB4	18		3
B4-SB5	18		3
B5-SB5	18		4
B5-SB4	18		4

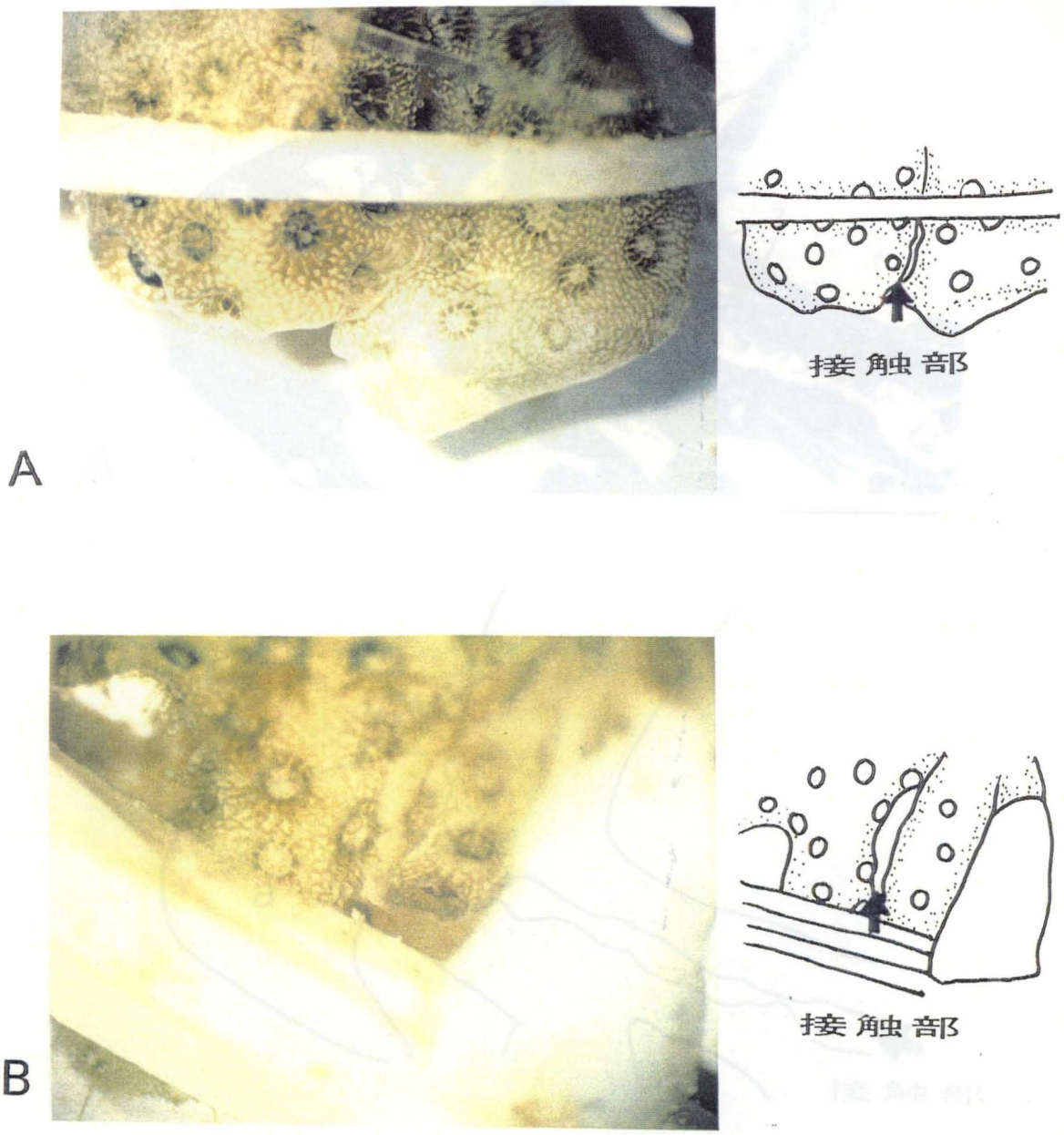

Fig. 1. Contact reaction between branches of adult colonies of *Pocillopora damicornis*. **A**, Nonfusion response. A skeletal ridge was formed at the interface. B5-SB4, 18 days after setting. **B**, Incompatible fusion-like response which was later identified as nonfusion based on histological study. The interface was white but it is not clear whether the response was nonfusion or incompatible fusion. B2-SB2, 28 days after setting.

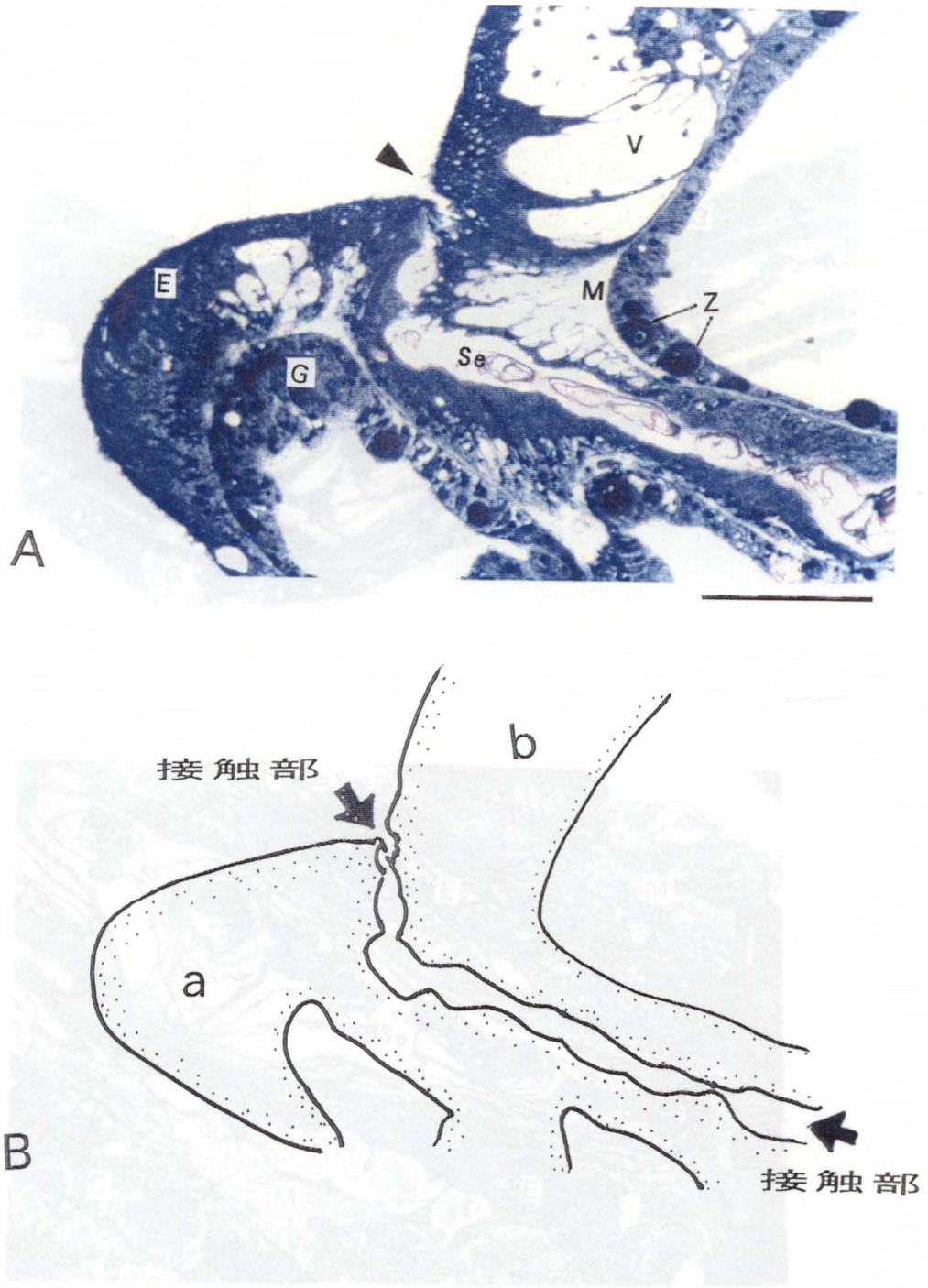

Fig. 2. Photomicrographs of the interface of a nonfused pair (#078; B2-SB1) of *Pocillopora damiocornis*. This pair is the only pair that did not separate after decalcification. Tissues of the paired colonies were discontinuous with secreted substance (Se) between them. Large vacuoles were observed in the epidermis. E, epidermis; G, gastrodermis; M, mesogloea; SK, skeleton; V, vacuole; Z, zooxanthellae. Scale bar, 50 μm.

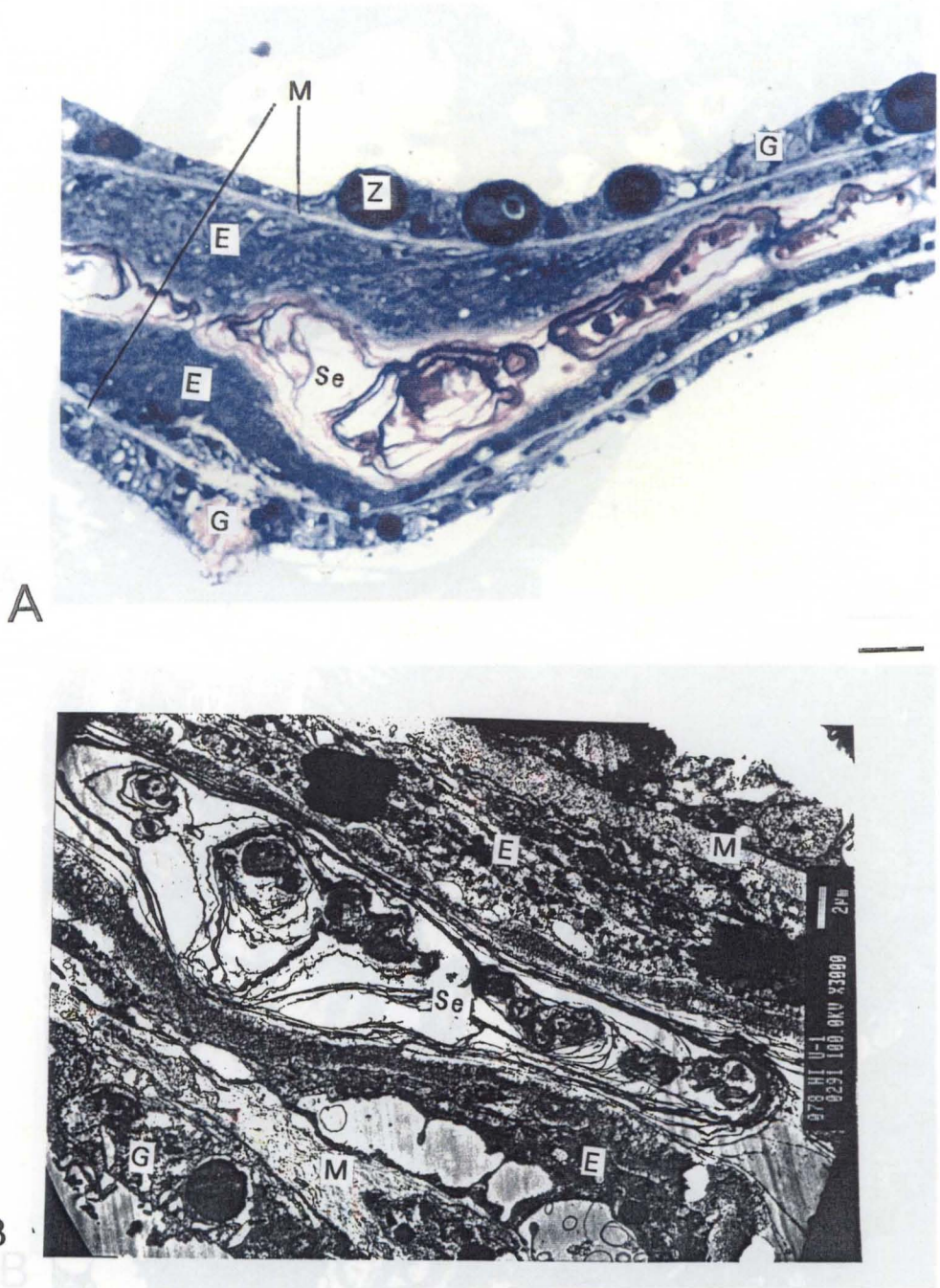

Fig. 3. The interface of a nonfused pair (#078; B2-SB1). **A**, Photomicrograph of the interface of the nonfused pair. Tissues of the paired colonies were separated by secreted substance (Se). **B**, Electronmicrograph of the barrier substance, with concentric, laminar structure, at the interface of the nonfused pair. E, epidermis; G, gastrodermis; M, mesogloea; Se, secreted substance; Z, zooxanthellae. Scale bar, 10 μm.

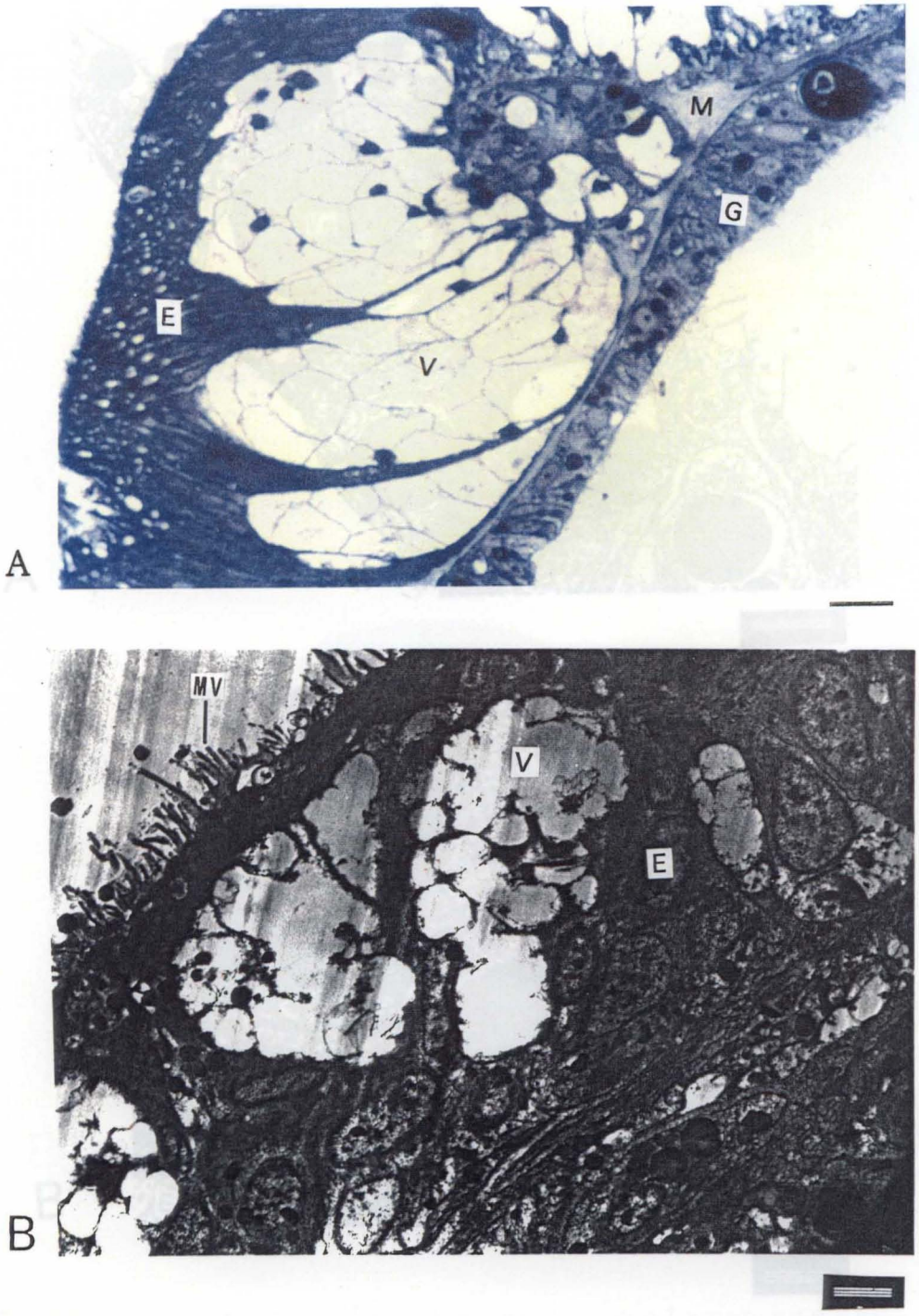

Fig. 4. Tissue at the interfaceof a nonfused pair (#078; B2-SB1). **A**, Photomicrograph showing aggregates of vacuoles in the epidermis near the border. **B**, Electronmicrograph of vacuoles in the epidermis near the border. E, epidermis; G, gastrodermis; M, mesogloea; SK, skeleton; V, vacuole;E, epidermis; Nu, nucleus; Mv, microvilli. Scale bar, 2 μm.

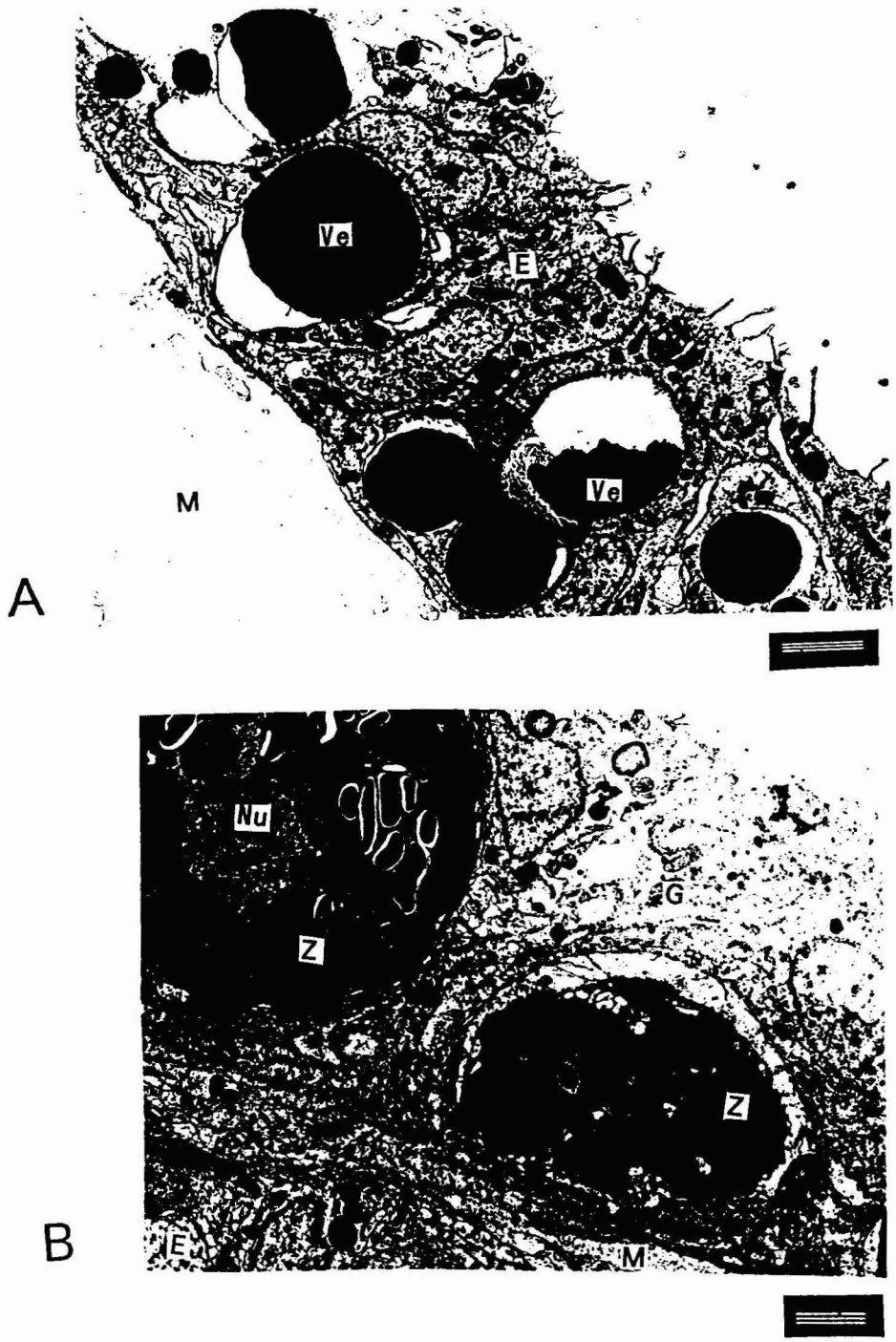

Fig. 5. Electronmicrographs of the interface tissue of a nonfused pair (#078). **A**, Vacuoles containing degraded substance.**B**, The zooxanthella on the left appear to be under the process of degradation. E, epidermis; G, gastrodermis; Nu, nucleus; M, mesogloea; Mv, microvilli; Z, zooxanthella. Scale bar, 2 μm.

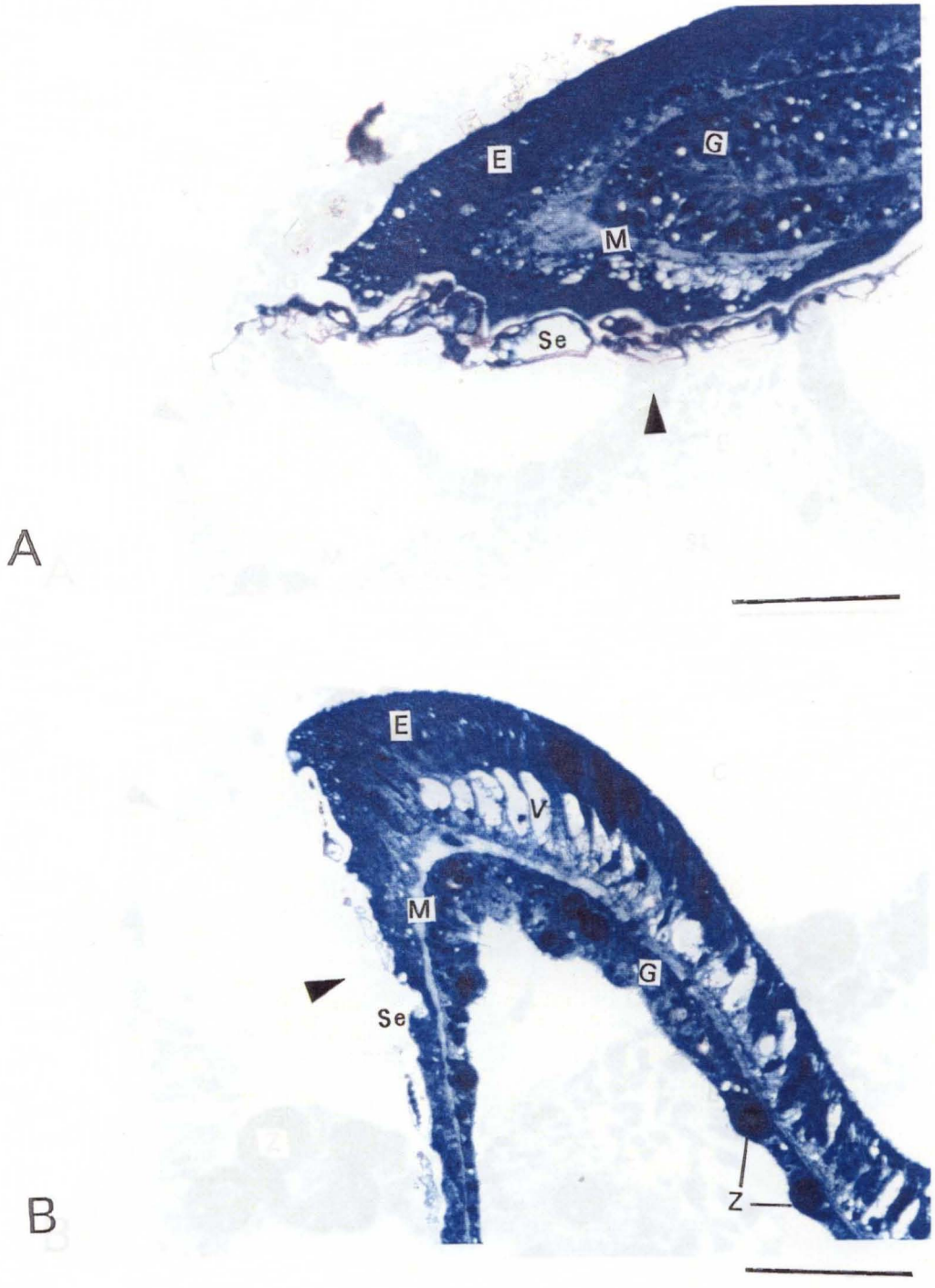

Fig. 6. Photomicrographs of the border tissue of nonfused pairs. As the paired branches separated after decalcification, the border zone of one branch is shown. **A**, B2 colony of the pair B2-SB2 (#037). **B**, B5 colony of the pair B5-SB4 (#015). Secreted substance (Se) is still attched to the contact surface. E, epidermis; G, gastrodermis; M, mesogloea; Se, secreted substance; V, vacuole; Z, zooxanthellae. Scale bar, 10 μm.

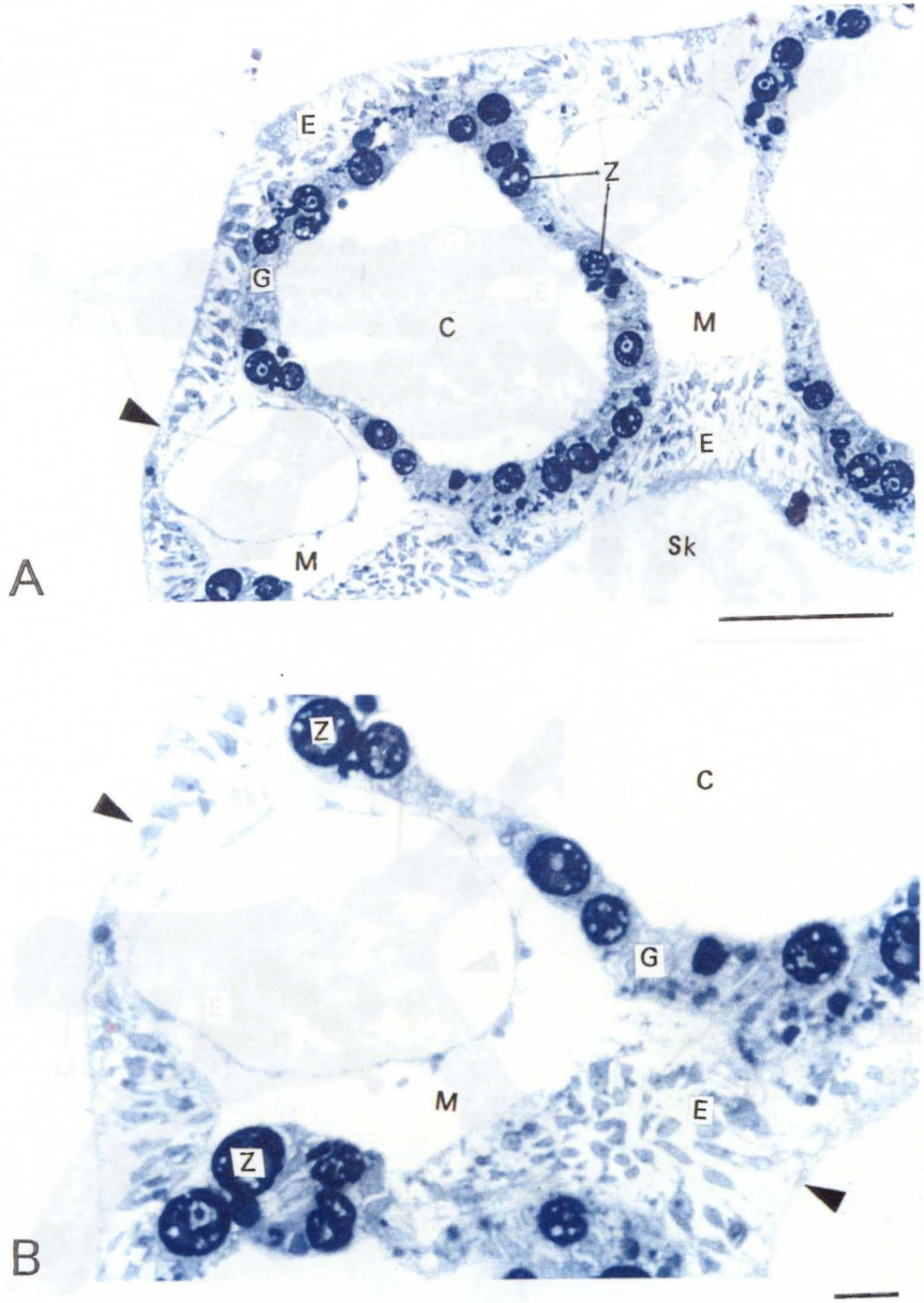

Fig. 7. Photomicroscope of the interface region of a fused pair of *Pocillopora damicornis*. **A**, Interface region of the fused branches. **B**, Interface region at a higher magnification. A previous border is shown by arrowheads. C, coelenteron; E, epidermis; G, gastrodermis; M, mesogloea; SK, skeleton; Z, zooxanthellae. Scale bar, 50 μm in **A** and 10 μm in **B**.

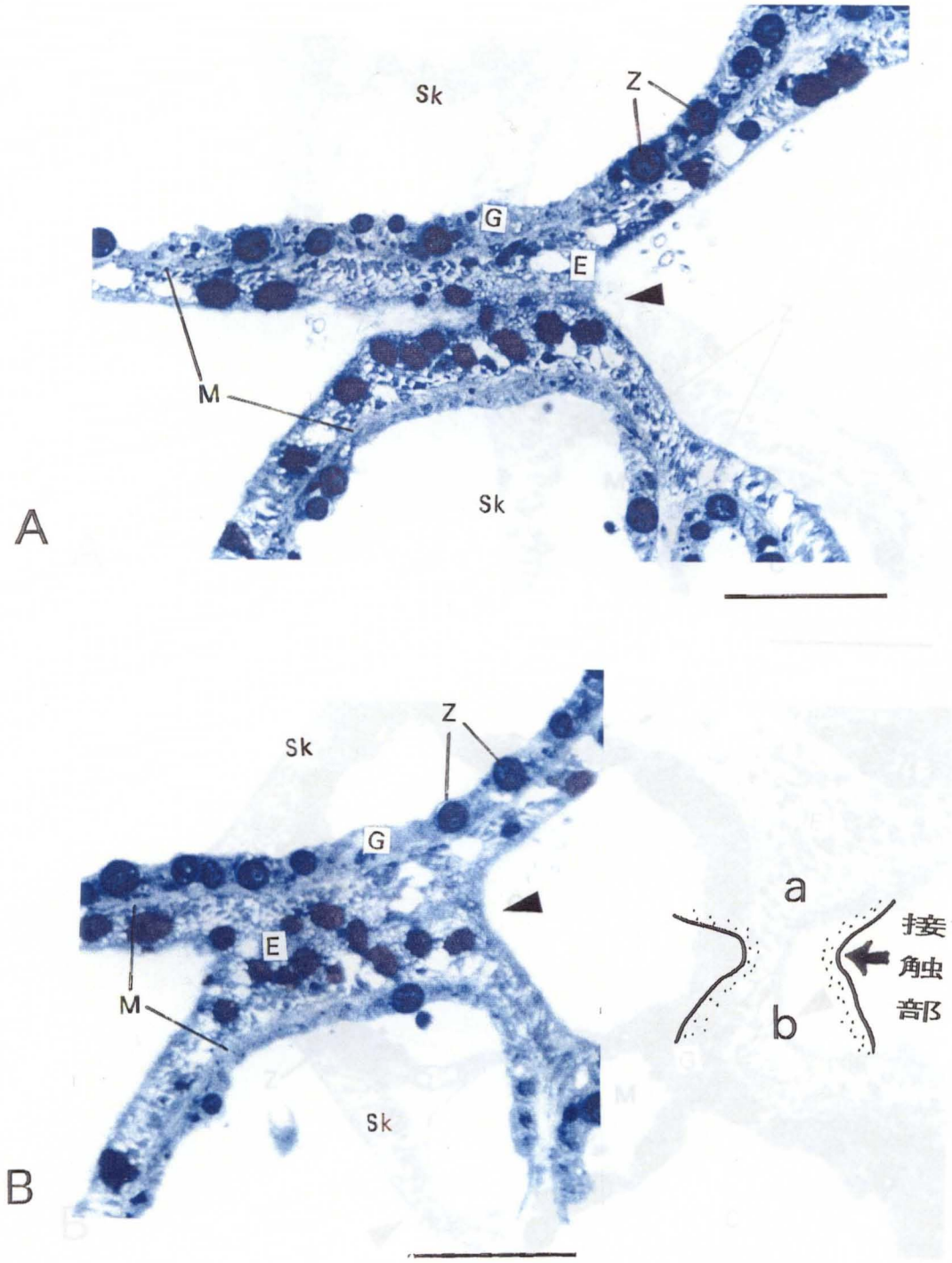

Fig. 8. Process of fusion reaction between different colonies (SB1-SB2) of *Pocillopora damicornis*. **A**, An initial stage of fusion. Only outer surface of epidermis fused. **B**, Tissue bridge of epidermis is formed. C, coelenteron; E, epidermis; G, gastrodermis; M, mesogloea; Z, zooxanthellae. Scale bar, 10μm.

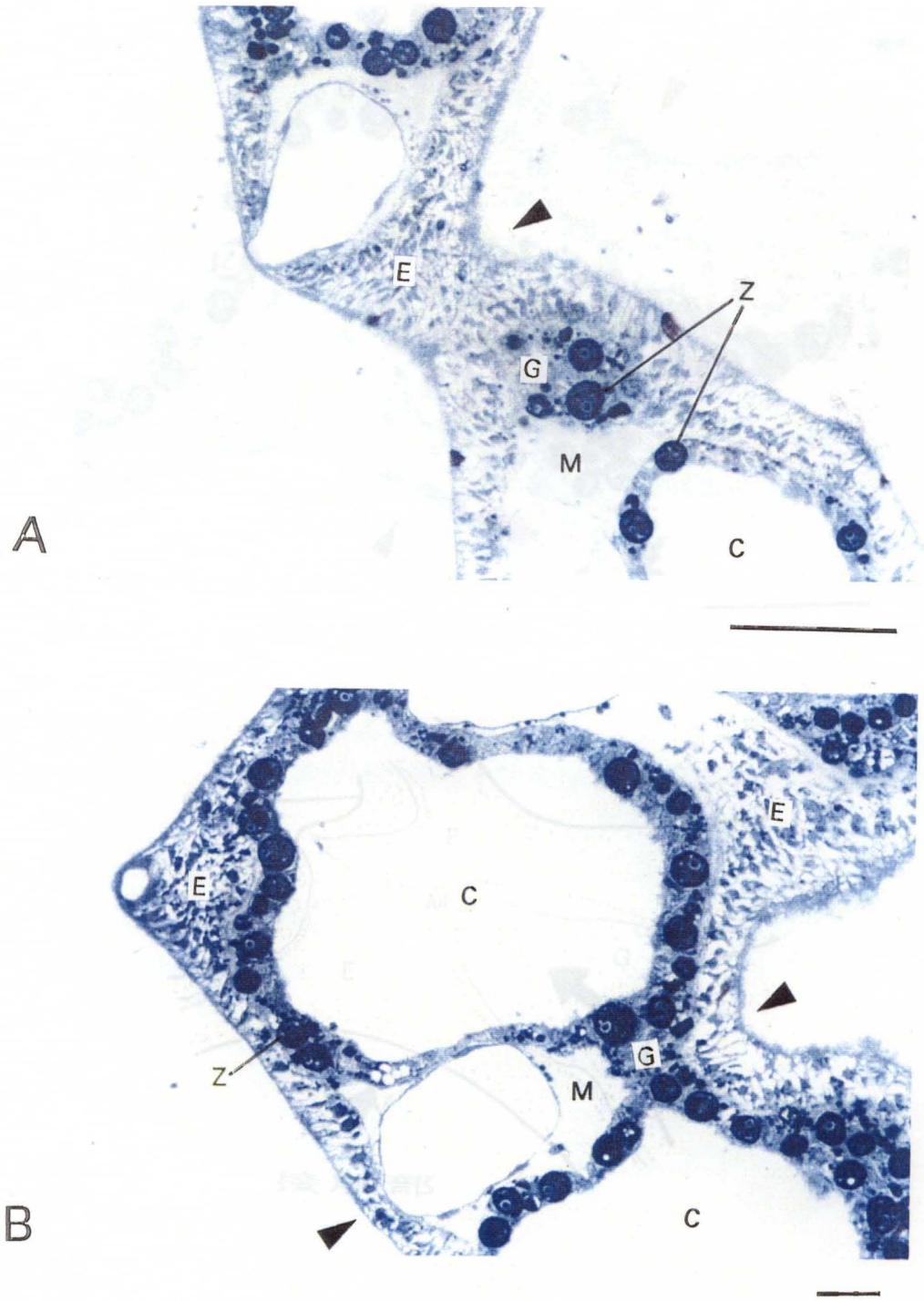

Fig. 8 continued. **C**, Gastrodermal cells with zooxanthellae enter the tissue bridge. **D**, Gastrodermis of both branches become connected. C, coelenteron; E, epidermis; G, gastrodermis; M, mesogloea; Z, zooxanthellae. Scale bar, 10μm.

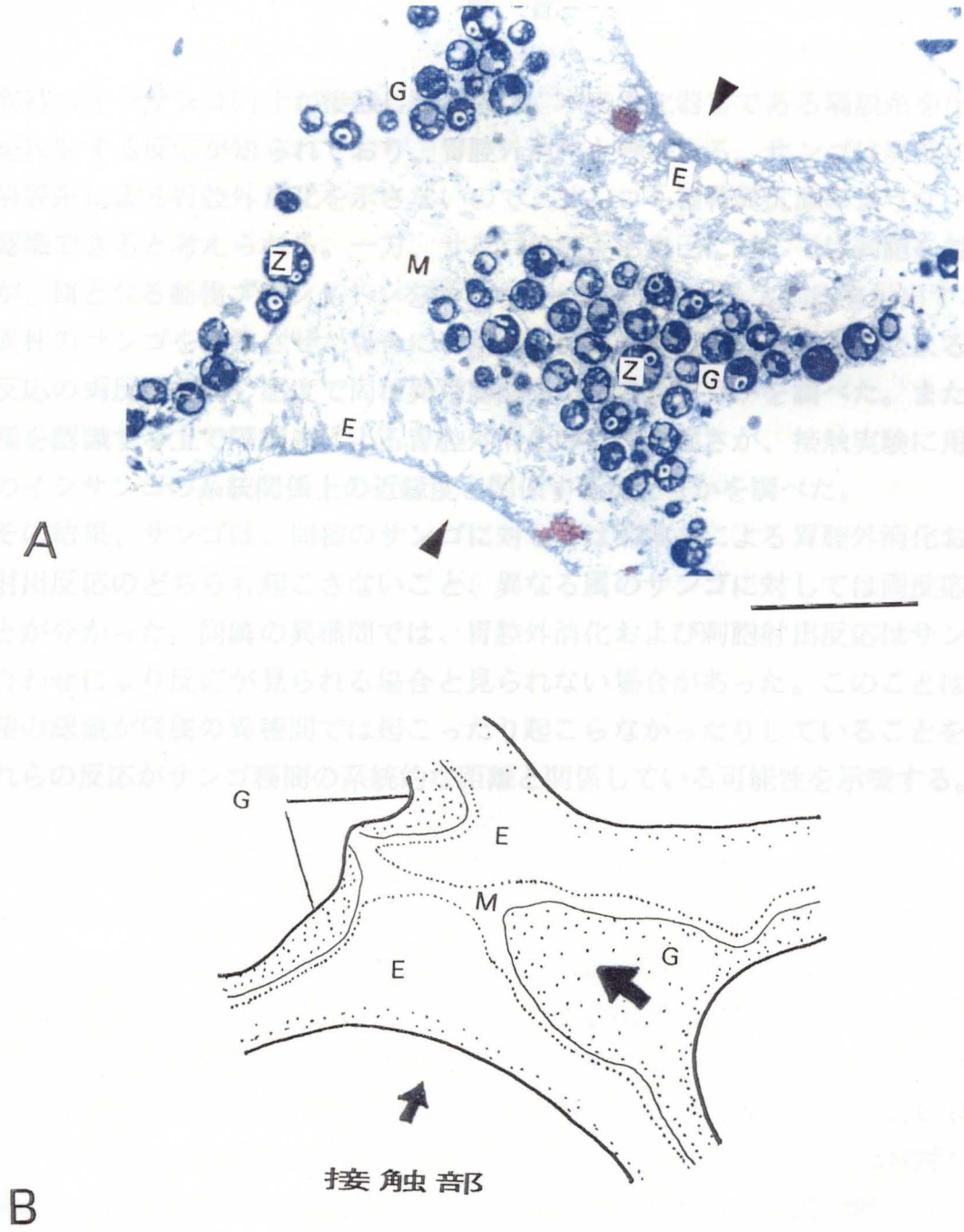

Fig. 9. Process of fusion reaction between branches isolated from the same colony (B2) of *Pocillopora damicornis*. Mesoglea and gastrodermis of one branch enter the tissue bridge formed by fusion of epidermis. C, coelenteron; E, epidermis; G, gastrodermis; M, mesogloea; Z, zooxanthellae. Scale bar, 50μm.