

総説・解説

藍藻と群体性ホヤの絶対共生

広瀬裕一*

琉球大学理学部 (〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町字千原1番地)

Euichi Hirose*: Obligate symbiosis between cyanophytes and colonial ascidians. Jpn. J. Phycol. (Sôrui) 67: 115-124, November 10, 2019

Among chordates, obligate photosymbiosis has been only known in some colonial ascidians of the family Didemnidae. The photosymbionts are always cyanophytes (cyanobacteria): *Prochloron*, *Synechocystis*, and undescribed species including filamentous species. The occurrence of nutritional exchange was demonstrated by the studies using radioisotopes, although there is a debatable point. Molecular phylogeny of the host ascidians indicates that the symbioses were established at least once in each genus. *Prochloron* phylogeny is not related to geography, suggesting the algal cells are horizontally translocated between the host colonies. The horizontal transmission would maintain the genetic diversity of the symbionts that produce bioactive compounds protecting the host from the predators. The photosymbionts are also vertically transferred to the offspring (larva) of the host ascidians. The comparative surveys of the algal transmission processes suggest that the modes of vertical transmission were convergently evolved in each of the host genera besides *Diplosoma* spp. that have the genus-specific mode. In any modes of the vertical transmission, the process of the embryogenesis was modified to collect and carry the photosymbiont. The evolutionary plasticity of embryonic development in didemnid ascidians may be a potential reason why didemnid ascidians could establish obligate symbiosis with the cyanophytes.

Key Index Words: chemical defense, convergent evolution, coral reefs, Didemnidae, obligate symbiosis, *Prochloron*, *Synechocystis*, vertical transmission

Faculty of Science, University of the Ryukyus, Senbaru-1, Nishihara, Okinawa 903-0213, Japan

*Author for correspondence: euichi@sci.u-ryukyu.ac.jp

1. 藍藻と共生するホヤの概観：分類から生態まで

1. 藻類と動物の絶対共生

「共生」は2種あるいはそれ以上の種が同じ空間に共存する関係を指す。自然界に見られる多様な共生関係において共生相手への依存性は様々であり、広義の共生には寄生生物と宿主の関係も含まれる。このうち、共生相手への依存が極めて高く、共生相手が存在しなければ生存が不可能な（生活環が維持できない）関係を絶対共生（obligate symbiosis）と呼ぶ。絶対共生には共生する2種の片方が共生相手を絶対的に必要とする場合と、双方が互いに必須である場合がある。これに対して、共生相手の存在が必須ではない関係は条件的共生または任意共生（facultative symbiosis）と呼ばれ、宿主は共生体を持たなくても生存は可能である。例えば、ある宿主動物が特定の微生物を必須とする絶対共生では、全ての宿主個体は共生微生物を保持していることになる。また、宿主にとって生活環の中で共生微生物を確実に獲得することが極めて重要な問題となるため、宿主動物の世代間で共生体を受け渡しする垂直伝播（または垂直感染：vertical transmission）の仕組みを持つ共生系も多い。さらに、宿主と共生体の組み合わせが種特異的である場合には、両者の間で共種分化が生じるケースも広く知られている。

後生動物において、藻類との絶対共生は海綿動物、刺胞動物（サンゴ、イソギンチャク、クラゲなど）、無腸動物、軟体動物（シャコガイ、ウミウシなど）、脊索動物といった様々な門で知られている（Melo Clavijo *et al.* 2018）。このうち、我々

脊椎動物を含む脊索動物門で確認されている絶対共生は群体性ホヤと藍藻との共生システムだけである。脊椎動物亜門の中では、藻類と絶対共生の関係を持つ事例は現時点で報告されていない。トラフサンショウウオの仲間では単細胞の緑藻が胚の表面に出現し緑藻の一部が胚細胞内に分布することがある（Kerney *et al.* 2011）。しかし、緑藻を伴わないサンショウウオ胚も存在することから、これは条件的共生に相当する。どうして我々脊椎動物は藻類との絶対共生を実現できなかったのだろうか？我々に最も近縁な絶対共生系であるホヤと藍藻の共生関係を知ることで、絶対共生の進化・多様化について理解を深められるのではないだろうか。

2. ホヤとはどんな動物か？

ここで宿主動物であるホヤについて説明したい。ホヤは海に暮らす付着性の無脊椎動物であるが、オタマジャクシのような形をした幼生の尾部に「脊索」を持つことから、我々と同じ脊索動物門に含まれる。ただし、ホヤはその生涯で「脊椎」を持つことはないため脊椎動物亜門ではなく尾索動物亜門（Urochordata）に分類される。この亜門はホヤ綱、タリヤ綱、オタマボヤ綱の3綱で構成され、（少し例外はあるものの）「生涯で尾部に脊索を持つ時期がある」ことでグルーピングされる。このうちタリヤとオタマボヤは生涯浮遊生活である。尾索動物亜門の共有派生形質に「セルロースの合成」があり、ホヤやタリヤの体はセルロースを主成分とする皮に包まれている。この皮を「被囊」と呼ぶことから、尾索動物亜

門は被囊動物亜門 (Tunicata) と呼ばれることも多い。オタマボヤは被囊を持たないが、表皮から分泌される使い捨ての採餌装置 (包巣: ハウス) がセルロース性である (Kimura *et al.* 2001)。被囊動物はゲノム内にセルロース合成酵素遺伝子を持つが、他の後生動物からは見つかっていない (Inoue *et al.* 2019)。このことからセルロース合成能やセルロース性の組織を持つことが後生動物の中でとてもユニークであることがわかるだろう。分子系統学的解析からも尾索 (被囊) 動物亜門の単系統性は支持されているが、現行の3綱のシステムとは一致しない (Kocot *et al.* 2018 など)。

多くの人にとってホヤは身近な動物ではないかもしれない。しかし、現存量の点からホヤは海の付着動物としてマイナーな存在ではなく、気付きさえすればいたるところの海で見ることができる。極地から赤道域まで、潮間帯から深海まで、文字通り世界中の海にホヤは生息している。ホヤの間には無性生殖によって群体を形成する群体性ホヤと無性生殖を行わない単体性ホヤがある。ただし単体性ホヤも群体性ホヤも単系統群にはならない。食用に流通しているマボヤやアカボヤは単体性で個体サイズも比較的大きいため鮮魚店はもちろん野外でも目にすることがあるかもしれない。一方、数ミリ程度の個虫が集めたシート状、ドーム状あるいは不定形のホヤ群体は一見して「なんだかわからないもの」であり、しばしば動物であることさえ認識してもらえない。藍藻と絶対共生しているのは全てジデムニ (ウスボヤ) 科の群体性ホヤである。

群体性ホヤの体のつくりを見てみよう (図1)。群体は出芽によって生じた多数の個体 (個虫) とこれを包む被囊で構成される。ホヤは雌雄同体なので性成熟した個虫は精巣と卵巣を持っている。図1Bのホヤ群体に多数開口する小さな穴は入水口で、それぞれの個虫はここから海水を取り込む。海水の中に分散する微細藻など餌となる粒子は鰓囊 (ヒトの咽頭に相当) の内面に広がる粘液性のネットでからめとられて消化管へと運ばれ、残った海水は鰓孔を通して個虫から外へ出る。ジデムニ科では複数の個虫から排出される海水は共同出水腔で合流し、出水口 (図1Bの矢尻) からまとめて排出される。消化管で消化吸収を経た排泄物は糞粒となって、排出される海水の流れに乗って群体から放出される。被囊には多種の被囊細胞が散在しており様々な機能を果たしているが、これに加えてジデムニ科では球状~金平糖状の骨片を含む種が多い。ジデムニ科ホヤは一般に透明でゼラチン状の軟らかな被囊を持つが、被囊細胞の含む色素や骨片によって色を持つことも多い。特に骨片はよく光を反射するので骨片の密度が高い群体は白く見える。

3. 宿主となるホヤ、共生する藍藻

ジデムニ科はホヤ綱で最大の科であり、現時点で9属599種を擁している (Shenkar *et al.* 2019)。ジデムニ科は多数の未記載種が見込まれている分類群でもあり本科の総種数はさらに増加すると考えられる。ジデムニ科の種は個虫が小さく

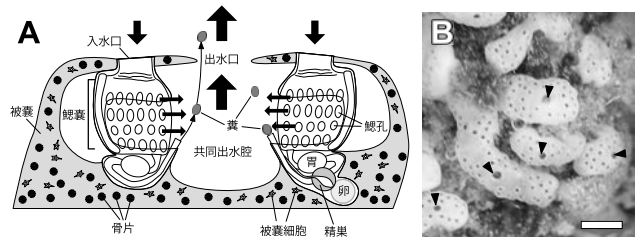


図1. ジデムニ科ホヤの群体。A, 模式図。B, *Trididemnum miniatum* の群体 (備瀬崎, 沖縄島)。矢尻は出水口を示す。スケールは約5 mm。

被囊内の骨片が解剖や観察の邪魔となるためホヤの中でも種同定が難しいグループである。インド~太平洋のジデムニ科ホヤについては、Kott (2001) の総説が近年記載された種を除くほぼ全ての共生種を網羅しているので種同定の参考文献としては便利である。他の分類群と同様にジデムニ科でも種の異同については研究者間で議論があり、共生ホヤの種数は研究者によって必ずしも一致しない。沖縄に分布する共生ホヤについては、筆者らがミトコンドリア COI 遺伝子の部分配列を DNA-barcode として配列情報を整備しているので同定の役に立てば幸いである (Hirose *et al.* 2010, Hirose & Hirose 2011, Koplovitz *et al.* 2015 など)。

ジデムニ科9属のうち4属 (*Didemnum*, *Diplosoma*, *Lissoclinum*, *Trididemnum*) で約30種の藍藻共生ホヤが知られている。今後新たな藍藻共生ホヤが発見される可能性も高く、最新では久米島から *Lissoclinum midui* Hirose & Hirose が新種記載されている (Hirose & Hirose 2011)。4属に含まれる種は合計で400種を超えるので、各属においてほとんどの種は藍藻と共生していない。ジデムニ科ホヤの分子系統解析では各属の単系統性は概ね支持されていることから (Oliveira *et al.* 2017)、藍藻と共生する種が単系統群だと解釈することは難しい。なぜなら、属の分岐前に藍藻共生が成立し、その後にはほとんどの種において共生が二次的に解消されたと推定するのは節約的なシナリオではないからだ。したがって属ごとに1回以上の共生成立が生じたと考えられている (Yokobori *et al.* 2006)。

ホヤの共生藍藻として最も代表的なものはクロロフィル *b* を持ちフィコピリンを欠く藍藻として知られる *Prochloron didemni* Lewin であるが、*Synechocystis trididemni* Lafargue & Duclaux との共生も広く知られている。複数種の藍藻と共生するホヤも知られている (Parry & Kott 1988)。クロロフィル *d* を持つ *Acaryochloris marina* Miyashita & Chihara は *Prochloron* と共生する *Lissoclinum patella* (Gottschaldt) から発見されている (Miyashita *et al.* 1996)。しかし、*L. patella* には *A. marina* が共存していない群体もあるので絶対的な共生ではない。

Prochloron はホヤ群体の表面に付着していることもあり、これにはジデムニ科以外の種の場合もある (Kott *et*

al. 1984)。さらには *Prochloron* がナマコの体表に付着する事例も報告されている (Cheng & Lewin 1984)。しかし *Prochloron* がたまたま付着しているだけなのか、より密接な条件的共生関係を確立しているのかは不明である。*Synechocystis* もホヤ群体の表面に付着することがある (Hernández-Mariné *et al.* 1990, Martínez-García *et al.* 2011 など)。さらに、海綿動物との共生も報告されていることから、*Synechocystis* は *Prochloron* よりも幅広い宿主を選択できるのかもしれない (Cox *et al.* 1985, Steindler *et al.* 2005, Erwin *et al.* 2012)。

4. 生息環境

藍藻共生ホヤの分布は一般に熱帯～亜熱帯に限られている。これは共生藍藻が低温で機能できないことが一因であろう。宿主ホヤから単離した *Prochloron* の光合成活性は 35～40°C で最大になる一方で、20°C 以下あるいは 45°C ではゼロになってしまう (Dionisio-Sese *et al.* 2001)。冬季に 20°C 以下の水温が長期間継続するような環境では藍藻共生ホヤは生存できないだろう。日本で筆者が直接確認できている分布域は種子島以南と小笠原諸島であるが、*Prochloron* と共生する *Diplosoma* の一種が串本で稀に出現すると報告されている (西川 1995)。冬季の最低水温が 16°C 以下となる台湾海峡の澎湖諸島で夏季に *Diplosoma gumavirens* Hirose & Oka が確認されていることから (Hirose *et al.* 2015)、分布北限の周辺では高水温期に幼生が分散して定着した群体が無性的に増殖し、低水温期に個体群が絶滅している可能性がある。さらに、地球温暖化に伴う海水温の上昇によって藍藻共生ホヤの分布域が高緯度に拡大してゆくとすれば、宿主ホヤの分布情報が海水温上昇の指標に利用できることも考えられる。

共生藍藻が光合成を行う上で太陽光は不可欠である。そのため、多くの藍藻共生ホヤが分布しているのは主に水深 10 m 以浅であるが、透明度の高い環境ではより深い場所からの採集例も報告されている。例えば *Didemnum molle* (Herdman) (チャツボボヤ) は水深 1 m 以浅にも普通に見られる宿主ホヤであるが、Sluiter (1909) は本種をフローレス海の水深 69 m から採集している。沖縄でも 30 m 以深でダイバーに目撃されることは珍しくない。同様に紅海では *Diplosoma simile* (Sluiter) が 1–35 m の幅広い深度に分布すると報告されている (Koplovitz *et al.* 2015)。長時間干出するような環境で藻類共生ホヤを見つけることはないが、低潮線付近やタイドプールにも多数の宿主ホヤが出現する。このような浅い場所では太陽光が強すぎるため、宿主ホヤは岩の窪みやサンゴ群体の基部など日陰になる所に付着している。また明るい場所に付着する群体の方が被囊に含まれる骨片や色素細胞の密度は高い傾向にあるので、群体内の光環境は宿主ホヤによっても調整されているようだ (Hirose *et al.* 2006)。Nielsen *et al.* (2015) は群体表面に分布する *Prochloron* の光合成活性は低光量の環境に適応しているが強光に対して高い耐性を備える」と報告しているので、光量について *Prochloron* は幅広い条件

下で生育できるものと思われる。

付着動物であるホヤは一般に移動することはできないと考えられているが、チャツボボヤの群体の分裂や移動が観察されている (Cowan 1981)。したがって、近距離であれば周辺のより適した環境へ本種は移動が可能である。チャツボボヤの幼生は骨片や色素細胞を持たないため強光に耐えられないと思われるが、大きな群体はむしろ露出した明るい場所に多い。実際に幼生は暗い場所を選択して付着変態している。群体の生長にともなう骨片や色素細胞を持つようになり光耐性が高まるとともに、チャツボボヤ群体は明るい場所へ移動していると考えられている (Olson 1983)。

5. 藍藻共生ホヤはサンゴ礁の脅威となるか？

大規模なサンゴ礁の減少を背景に、サンゴ礁保全の観点から造礁サンゴを捕食したり寄生したりする非サンゴ生物が注目されるようになった。例えばオニヒトデの大発生によるサンゴの食害と駆除活動はマスメディアでもしばしば報道されている。時に藍藻共生ホヤがサンゴ礁で大発生し、サンゴを被覆することでサンゴ礁の脅威とみなされることがある。骨格を作りながらゆっくりと生長するサンゴと比べて群体性ホヤは生長速度が速く、ホヤ群体がサンゴ群体の上を覆ってしまえば下敷きになったサンゴのポリプは口を塞がれて死んでしまうだろう。

インド～太平洋に広く分布する *Diplosoma simile* によるサンゴの被覆はフィジー、サモア、海南島で報告されている (Littler & Littler 1995, Vargas-Ángel *et al.* 2009, Li *et al.* 2016)。本種は小笠原やハワイなどの海洋島でも普通に見られることから分散力が高い種であると考えられており、カリブ海への侵入も確認されている (Hirose *et al.* 2012)。今後も海水温の上昇による高緯度への分布拡大や、船舶などによる人為的な分散によって同様な問題が各地で生じるであろう。また、カリブ海でも *Trididemnum solidum* (Van Name) によるサンゴの被覆が報告されている (Sommer *et al.* 2010, Rodriguez-Martinez *et al.* 2012)。

サンゴと藍藻共生ホヤはスペースをめぐる競合関係にあるが、通常はホヤがスペースを優占してしまうことはない。共生ホヤの群体はむしろサンゴ群体の基部など日陰になるような場所に見られ、サンゴとは空間を使い分けている。むしろ環境の悪化によってサンゴポリプが弱った (あるいは死んだ) ところにホヤが侵入しているのであろう。グレートバリアリーフでは大規模白化によって死んだサンゴ上に多数のチャツボボヤが出現している (Tebbett *et al.* 2019)。チャツボボヤは直接サンゴを殺す関係にはないが、チャツボボヤ群体が密集するスペースにはサンゴが新たに加入しにくい可能性があり、サンゴ礁回復の抑制要因となるかもしれない。

II. 共生ホヤ発見の歴史

藻類様の球体が見られる事例は、それぞれのホヤの記載分類や分布の調査報告にも触れられてきた。例えば

Herdman (1906) は *Diplosoma virens* (Hartmeyer) について、「群体が緑色を呈するのは共生藻と思われる多量の小球による」と *Prochloron* について記述している。Smith (1935) は単細胞性の藻類を含むことがあると報告されているホヤ 10 種について組織学的な精査を行い、熱帯産のジデムニ科 4 種で藻類の細胞が皮の中や出水腔に分布していることを確認した。さらに、藻類の一部が細胞分裂中であることも観察している。ただし、この研究では博物館に収蔵された液浸標本を材料にしていたので共生藻は脱色しており、藻類の種類については「褐虫藻 (zooxanthella) や zoochlorella だろう」と推定するにとどまっている。また、ジデムニ科に属さない他の 6 種の群体ホヤでは藻類と思われていた構造はホヤの色素細胞であると推定している。日本では委任統治時代のパラオで藍藻共生ホヤが報告されており、これはパラオ熱帯生物研究所の重要な業績の 1 つである (Tokiooka 1942, 1950)。太平洋戦争後では、トカラ列島が日本に返還された際に行われた調査で藍藻共生ホヤが記録されており、これが現在の日本領内での最初の記録となる (Tokiooka 1954)。いずれの報告でも共生藻は zoochlorella と記されている。

ここまでの研究では藻類とホヤの関係はあくまで「共存」していることがわかっているだけで、相利 (あるいは偏利) 的な共生関係が存在する根拠は得られていなかった。しかし、Eldridge (1966) によって *Diplosoma virens* の幼生が共生藻の保持・運搬を行っていることが明らかにされ、少なくとも宿主ホヤにとって共生藻が生存に重要であることが示唆された。その後、他の共生ホヤでも共生藻の垂直伝播が報告されるようになった (Kott 1977, 1982 など)。しかしながら、これらの研究においても共生藻は単に algal cell と記されただけで、この藻類が何であるかについては注目されていなかった。Lewin (1975) が *Synechocystis didemni* Lewin をホヤ群体の表面に共生する藍藻として記載したことで、ホヤの共生藍藻が注目されるようになった。本種がクロロフィル *b* を持ちフィコピリンを欠くことを根拠として藍藻から独立した原核緑色植物門 (Prochlorophyta) が提唱され、本種の学名は *Prochloron didemni* に改められた (Lewin 1976, 1977)。Prochloron の発見は陸上植物や緑藻の葉緑体の起源論を背景に大きな関心を集め、Prochloron を対象とした多数の研究が展開された (Lewin & Cheng 1999 参照)。一方、分子系統では Prochlorophyta を構成する 3 属 (Prochloron, Prochlorococcus, Prochlorothrix) の単系統性が支持されないことから、クロロフィル *b* を持つ原核性藻類 3 属は藍藻を起源として独立に生じたと考えられるようになった (Palenik & Haselkom 1992, Urbach *et al.* 1992)。現在では Prochlorophyta は分類群として支持されず、Prochloron も一般に藍藻として扱われている。Lewin (1975) が最初に Prochloron を発見した宿主ホヤは種同定されていないが、表面に Prochloron が付着するホヤには同種であっても Prochloron が付着しない群体もあることから絶対共生ではない。これは藍藻と共生するホヤの中ではむしろマイナーなケー

スであり、実際には *Prochloron* とジデムニ科ホヤの共生系のほとんどは絶対共生である。ここで Lewin (1975) の記載したホヤ群体表面に付着する *Prochloron didemni* と宿主ホヤと絶対共生の関係にある *Prochloron* とを同一の種として扱えるのかどうか疑問となる。この問題については後で議論したい。

III. 共生関係

1. 養分の供給

藻類と動物の共生系では藻類が光合成によって生産した養分を宿主動物に提供し宿主動物から窒素源など栄養塩の供給を受けるサイクルが想定されることが多い。ホヤと *Prochloron* の共生においても同様なサイクルの検証が進められている。Fisher & Trench (1980) は単離した *Prochloron* が同化した炭素の一部をグリコール酸として放出することを報告している。また、 $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ を含む海水で培養した共生ホヤ群体から *Prochloron* を分離し *Prochloron* と残渣に含まれる ^{14}C 量を比較することで、同化された炭素の一部が宿主に移行していることが示されている (Pardy & Lewin 1981, Kremer *et al.* 1982, Griffiths & Thinh 1983)。群体から完全に *Prochloron* を分離することは不可能なので、上記の実験では残渣に残った *Prochloron* 量を残渣に含まれるフェオフィチンの量から推定して補正を行っている。しかしながら藍藻共生ホヤは被囊の中に強酸を保持する細胞があるため (Hirose 2001)、Prochloron の分離 (群体から絞り出す) の際に潰れた細胞から相当量の酸が漏出し、強酸による色素の変性が進むと考えられる。これ考慮すると残渣に含まれる Prochloron が過小評価されている可能性もあり、共生藍藻から宿主への養分の供給は十分に立証できているとは言えない (Hirose & Maruyama 2004)。また群体内の水の流れから (図 1A)、出水腔に保持される Prochloron が水溶性の同化産物を分泌してもそのまま出水口から排出されると想像されるので、宿主ホヤが Prochloron から養分を得ているとすれば、分泌された養分を効果的に取り込む仕組みを持つ必要がある。シャコガイでは外套膜に広がる共生管内に褐虫藻が保持される一方で、褐虫藻の一部は胃内で分解消化を受けており、褐虫藻の一部は直接シャコガイの栄養源になっていると考えられる (Hirose *et al.* 2006)。しかしホヤ個虫の胃内で共生藍藻が見られることは稀で、共生藻がそのまま餌と利用されているとは考えられない。さらに宿主ホヤの出水腔に寄生するホヤノシラミ (寄生性カイアシ類) も周りにある大量の共生藍藻を摂食することではなく、ホヤノシラミにとっても共生藻は餌として不適なようだ (Hirose 2000b)。

Prochloron はクロロフィル *a* と *b* を有しフィコピリンを欠く色素組成で酸素発生型の光合成を行うが (光合成系については Hirose *et al.* (2009) を参照)、長期間の単離培養に成功した例は報告されていない。トリプトファンを添加した培地で Prochloron を増殖できるとする報告はあるが (Patterson & Withers 1982)、再現性に問題があるようで一

般に unculturable とされている。筆者もこれまで複数の研究者に *Prochloron* と共生するホヤ群体を提供しているがまだ培養に成功した事例はない。そのため宿主ホヤが *Prochloron* の増殖に不可欠な「何か」を提供しているのではないかと考えられており、*Prochloron* の生息する微小環境と光合成活性は詳細に研究されている (Kühl *et al.* 2012, Nielsen *et al.* 2015)。一方、*Prochloron* のゲノムは標準的な藍藻の一次代謝に必要な遺伝子群を含んでおり、ゲノムの縮小は認められない (Donia *et al.* 2011)。ゲノムには窒素源のリサイクルに必要な代謝系を備えており、*Prochloron* は宿主ホヤの排泄物等を窒素源に利用できると考えられる。*Prochloron* の単離培養に必要な「何か」は今日においても突き止められていない。

2. 紫外線防御

Prochloron と共生するホヤの被嚢には mycosporine-like amino acids (MAAs) と呼ばれる紫外線吸収物質が含まれている (Hirose *et al.* 2004)。紫外線を光源とした顕微鏡観察では、被嚢内の MAAs は被嚢細胞の細胞質に含まれていることが示されている (Maruyama *et al.* 2003, Sensui & Hirose 2018)。MAAs は紫外線を吸収するが可視光は吸収しないので、被嚢は光合成に必要な波長の光をあまり減衰させずに透過しつつ太陽光の紫外線を吸収できるという共生藻にとって都合の良い特性を持つ。非共生のホヤでも配偶子などに MAAs を蓄積する事例はあるが (Epel *et al.* 1999)、これまで被嚢に MAAs を含む種は藍藻共生ホヤしか報告されていないので、被嚢の MAAs は藍藻共生のための適応の 1 つと考えて良いだろう。ホヤは MAAs の合成系を持たないので (*Donia et al.* 2011)、宿主ホヤは餌または *Prochloron* に含まれる MAAs を利用していると考えられる。共生ホヤ群体から *Prochloron* を分離し *Prochloron* と残渣に含まれる MAAs を比べると主要な MAAs の構成比がほぼ同じなので (Hirose *et al.* 2004)、MAAs の多くは *Prochloron* に由来すると考えられる。宿主ホヤが共生藻の生産した MAAs を利用するためには MAAs をホヤ組織に移送する仕組みが必要となるが、これについては解明されていない。

3. 化学防御

藍藻共生ホヤは天然物化学の分野で非常に注目されてきた材料である。*Synechocystis trididemni* と共生する *Trididemnum solidum* から単離されたジデムニンは海洋生物由来の二次代謝産物の中でも代表的な分子である。抗ウイルス、抗がん、免疫抑制などの生理活性を有しており、かつては抗がん剤として臨床試験が進められていたが毒性が高ことから医薬品として承認には至っていない。*Prochloron* と共生するホヤからも多数の生理活性物質が単離されており、少なくともその一部については *Prochloron* ゲノム内に合成系の遺伝子が含まれている (*Donia et al.* 2011, Schmidt *et al.* 2012)。ただし共生ホヤに含まれる全ての生理活性物質が共

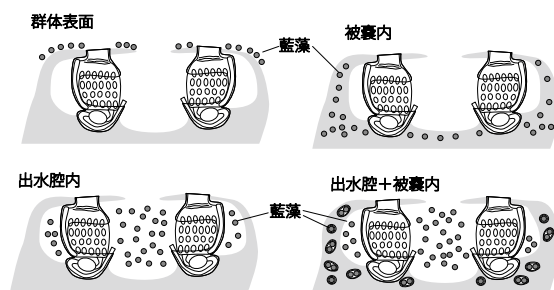


図2. 宿主ホヤにおける共生藍藻の分布様式。

生藍藻に由来する訳ではなく、共生藍藻の有無に関わらずホヤに共生する多様な微生物によって様々な生理活性物質が産生されていると考えられている。例えば *Prochloron* を出水腔内に保持する *Lissoclinum patella* では、強力な毒性を持つパテラゾールがホヤの血球中に共生する細菌 *Candidatus Endolissoclinum faulkneri* Kwan *et al.* によって合成されている (Kwan *et al.* 2012)。

共生藍藻が合成する様々な生理活性物質には毒性があり宿主ホヤにとっては化学防御として役立つことが期待される (Schmidt 2015 など)。ホヤ群体における共生藍藻の分布様式からも明らかのように (図2)、群体を丸かじりするような捕食者が共生藍藻を避けて宿主ホヤを摂食することはほぼ不可能である。*Prochloron* の持つパテラミド合成系の遺伝子には非常に変異の多い領域があり、この変異に応じて異なる種類のパテラミドが合成されることがわかっている (*Donia et al.* 2006)。つまり、個々の *Prochloron* 細胞は1タイプの合成経路しか持たないが、共生ホヤ群体は遺伝的に多様な *Prochloron* 集団を持つことによって複数のタイプのパテラミドを保有することができる。宿主ホヤが多様な化学防御分子を保持するためには、共生藍藻の遺伝的多様性を維持することが重要となる。

IV. 共生様式から見た藍藻共生ホヤの多様性

1. 共生藍藻の分布様式

宿主ホヤ群体が共生藍藻を保持している場所は「群体表面」、「被嚢内」、「出水腔内」、「出水腔+被嚢内」の4タイプに分類できる (図2)。この共生藍藻の分布様式はホヤの種ごとに決まっており、同種であれば群体によって異なる場所に藍藻を保持することはない。このうち「群体表面」に藍藻が付着するタイプは既に述べたように条件的共生であるが、他の3タイプは全て絶対共生であると考えられている。「被嚢内」に藍藻が分布するタイプは *Didemnum*, *Trididemnum*, *Lissoclinum* で報告されている。共生藍藻は多様で *Trididemnum miniatum* Kott や *Lissoclinum midui* は *Prochloron* と共生するが、*Trididemnum nubilum* Kott は *Synechocystis* 様の藍藻と共生し、*Trididemnum clinides* の被嚢内には3種の藍藻が共生する。「出水腔内」に分布する藍藻は *Prochloron* のみである。このタイプは藍藻共生ホヤの中で最も一般的な分布様式で、宿主ホヤ4属の全てに見

表1. 共生様式から見たホヤと藍藻の絶対共生の多様性

宿主 (属)	共生藍藻	共生藻の分布様式	垂直伝播様式*	宿主の例
<i>Didemnum</i>	<i>Prochloron</i>	出水腔内	B	<i>D. molle</i>
		被囊内	不明	<i>D. viride</i>
<i>Trididemnum</i>	<i>Prochloron</i>	出水腔内	B	<i>T. cyclops</i>
		被囊内	C	<i>T. miniatum</i>
	<i>Synechocystis</i> 他	被囊内	C	<i>T. clinides</i>
<i>Lissoclinum</i>	<i>Prochloron</i>	出水腔内	B	<i>L. patella</i>
		出水腔+被囊内	B	<i>L. punctatum</i>
		被囊内	C**	<i>L. midui</i>
<i>Diplosoma</i>	<i>Prochloron</i>	出水腔内	A	<i>D. simile</i>

* 図3参照

**Hirose & Nozawa 未発表

られる。また, *Diplosoma* ではこのタイプしか知られていない。「出水腔と被囊内」に *Prochloron* が分布するタイプは *Lissoclinum punctatum* Kott だけで知られている特殊な様式で, 被囊内の *Prochloron* はほぼ全て被囊細胞の中に取り込まれており, 藍藻共生ホヤで唯一の細胞内共生である。この被囊細胞 (tunic phycocyte) は貪食能を持つことから, 被囊内の *Prochloron* を貪食的に取り込んでいると思われるが, 細胞内の *Prochloron* は分解消化されずに維持されている (Hirose et al. 1996, 1998)。以上のように, 異なる属の宿主ホヤの間で同じ共生藻分布様式が見られることから, それぞれの属で収斂的に同じ分布様式の共生が成立したと考えられる。

2. 共生藍藻の垂直伝播様式

共生藍藻を群体表面に保持するタイプを除いた3つのタイプで共生藍藻の垂直伝播が確認されている。それぞれの垂直伝播様式を比較すると, *Diplosoma* spp. は属に特異的な伝播様式を持つが, 他の3属ではそれぞれの共生藻の分布様式に対応した共通の伝播様式を持つことがわかってきた (Hirose 2015) (表1, 図3)。

ジデムニ科ホヤは全て胎生である。胚発生は群体の被囊の中で進行し, 被囊から抜け出した幼生は共同出水腔を通過し出水口から群体の外へ泳ぎ出る。*Diplosoma* spp. では泳ぎ出

す少し前の幼生の胴部背側後方から *rastrum* と呼ばれる粘着性の構造が突出し, これを共同出水腔に突き出すことにより表面に *Prochloron* を付着させる (図3A)。その後, *rastrum* を胴部後半部に収容した幼生が群体から泳ぎ出る。幼生が付着変態する過程で, *Prochloron* を収容している空間 (algal pouch) は稚ホヤの出水腔となる (Hirose 2000a)。藍藻と共生する *Diplosoma* の種は全て同じ方法で垂直伝播を行うことから, 共生性 *Diplosoma* の共通祖先がこの伝播様式を獲得したものと考えられる。

他の3属では, *Prochloron* を共同出水腔に保持する種は, 幼生胴部後半の表面が粘着性であるため, 幼生が共同出水腔を通過する時に *Prochloron* がここに付着する (Kott 1980, Hirose & Fukuda 2006, Hirose & Nakabayashi 2008) (図3B)。胴部後半の表面は襞状に褶曲して表面積を増大させており, 多数の *Prochloron* を運べるように特化している。出水腔と被囊内に *Prochloron* を保持する *L. punctatum* でも同じプロセスで出水腔の *Prochloron* が幼生に付着し運搬され, 細胞内共生する被囊内の *Prochloron* は伝播に関与しない (Kojima & Hirose 2010)。幼生が付着変態する過程で, *Prochloron* が付着している部分は出水腔内壁となるので, *Prochloron* もそのまま出水腔内に保持される。

被囊内に藍藻を保持するホヤでは, 被囊細胞が藍藻を細胞内に取り込んで, 発生中の胚に運び込む (図3C)。胚が被囊を分泌するようになると, 藍藻を抱えた被囊細胞は被囊内に移動する。その後, 藍藻は細胞から出て被囊中に分散するので, 遊泳幼生の被囊内では被囊細胞に取り込まれた藍藻と細胞外の藍藻が混在する。共生藍藻の種に関わらず垂直伝播過程は同じであり, *Trididemnum clinides* では3種の共生藍藻全てが被囊細胞によって運ばれている (Kojima & Hirose 2012)。

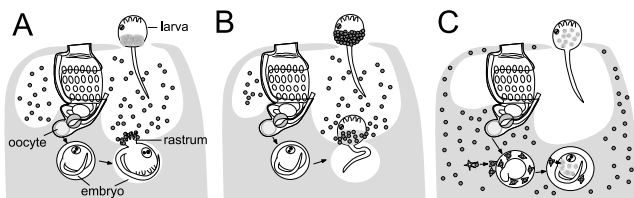


図3. 共生藍藻の垂直伝播様式。A, 出水腔の *Prochloron* が *rastrum* に付着する *Diplosoma* spp. の垂直伝播。B, 出水腔の *Prochloron* が幼生の胴部後半に付着する垂直伝播。 *Diplosoma* 以外の3属に見られる。C, 被囊内の共生藍藻が宿主被囊細胞によって胚の被囊内に輸送される垂直伝播。

V. 共生藍藻の多様性

Lewin (1975, 1977) が記載した *Prochloron didemni* は宿主群体の表面に付着するものであるが, 被囊基質に埋まっ

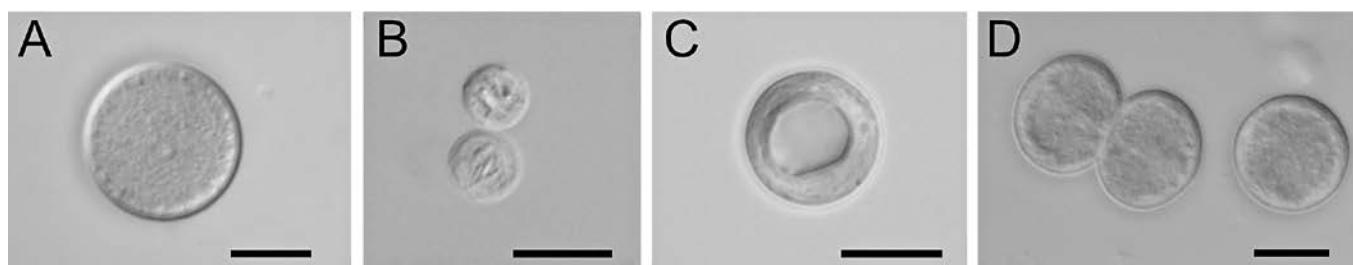


図4. ホルマリン固定した宿主ホヤより単離した *Prochloron*。A, *Lissoclinum verrilli* の群体表面に付着する *Prochloron* (グループ I)。B, *Lissoclinum midui* 被囊内の *Prochloron* (グループ I)。C, *Diplosoma virens* の出水腔内の *Prochloron* (グループ II)。D, *Didemnum molle* (チャツボボヤ) の出水腔内の *Prochloron* (グループ III)。

ている *Prochloron* や出水腔に分布する *Prochloron*, 被囊細胞内に取り込まれている *Prochloron* のそれぞれについても *P. didemni* と同じ種であると考えてよいのだろうか? *Prochloron* 属ではこれまでに *P. didemni* 以外の種が記載されていないため有効な種名は *P. didemni* のみであるが, これは *Prochloron* が 1 属 1 種であることを保証するものではない。このような背景から様々な論文の中で被囊や出水腔のものは *Prochloron* sp. あるいは *Prochloron* spp. と表現されているが, *Prochloron* が培養できないこともあり, 現時点でこの問題に分類学的な決着はついていない。Cox (1986) は形態から *Prochloron* を 3 グループに分けている。このうちグループ I と II はホヤ群体における分布様式に対応しており, グループ III はチャツボボヤに固有のものである。*Prochloron* の細胞は同心円状のチラコイドが配列する周辺部と液胞様の構造で満たされる中心部からなるが, 群体表面に付着する *Prochloron* (*P. didemni* に相当?) では中心部が多数の小胞で構成されている (図 4A)。被囊内に分布する *Prochloron* もこれと同様な構造を持つが, 細胞のサイズは小さい傾向にある (図 4B)。Cox (1986) に従えば, これらの *Prochloron* はグループ I に分類される。出水腔に分布する *Prochloron* はグループ II に分類され, 中心部が 1 つの液胞様構造で占められるため周辺部と明瞭に区分される (図 4C)。出水腔の *Prochloron* は群体から単離することが容易なため, *Prochloron* の生理・生化学的研究の多くはこのタイプが材料に用いられている。*Lissoclinum punctatum* では出水腔と被囊細胞内に *Prochloron* が分布するが, いずれの *Prochloron* も大きな液胞様構造で特徴付けられるグループ II である。このことから, *L. punctatum* では被囊細胞内の *Prochloron* が出水腔に分布するものと共通の起源を持つことが推定される。チャツボボヤの *Prochloron* は出水腔に分布しているが細胞の中心部は多数の小胞で占められておりグループ III に分類される (図 4D)。この *Prochloron* は, 中心部に不規則に配置するチラコイドや特有の顆粒構造などからグループ I とは区別されるが, これらの確認には微細構造の観察が必要となる。

16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく *Prochloron* の分子系統解析では, 宿主ホヤの種特異性も地理的な特異性も確認されていない (Münchhoff et al. 2007)。宿主特異性が見られないことは, 異なる宿主ホヤに共生する *Prochloron* が同

一種であり, 3 グループに区別される形態は *Prochloron* の可塑性の範囲内であることを支持する。しかし, 近年の分子系統解析では, 出水腔の *Prochloron* (グループ II) は単一のクレードとなり, 群体の表面や被囊内の *Prochloron* (グループ I) とは高いブートストラップ値で区別されている (Nielsen et al. 2015)。この場合, グループ II はグループ I から分岐した *Prochloron* 属の未記載種である可能性が支持され, 形態もこれに対応していることになる。また *Prochloron* に地理的な特異性が見られないことは *Prochloron* が長距離分散している可能性を示している。これは共生藍藻が垂直伝播されていることと矛盾しているように思われるかもしれない。なぜなら垂直伝播はしばしば共生者と宿主の特異性を高め共種分化に繋がると考えられるからである。しかし「化学防御」の項で述べたように, 共生藍藻の遺伝的多様性が高ければホヤ群体はより多様な化学防御物質を保持することができる。そこで宿主ホヤは垂直伝播によって確実に共生藻を次世代に継承する一方で, 水平伝播によって共生藻の多様性を維持していると理解できる。また, 運動性の無い共生藍藻が宿主ホヤ間で水平伝播するためには宿主から離れてかなりの期間生存できなければならない。これまでホヤの共生藍藻は単離培養できていないが, *Prochloron* ゲノムには標準的な藍藻の遺伝子セットが含まれていることから, *Prochloron* が海水中で長期間生存できる可能性は否定できない。この場合, 海水中に *Prochloron* の細胞が希薄に漂っていると想像されるので, 環境 DNA の解析から *Prochloron* 様の配列が得られることがあるかもしれない。興味深いことにハメルンプール (オーストラリア西海岸) の「生きているストロマトライト」に含まれる未培養の藍藻叢から得られた 16S rRNA 遺伝子の部分配列の中から *Prochloron* に相当する配列が見つかった (Burns et al. 2004, Münchhoff et al. 2007)。ハメルンプールは高塩濃度の環境であるが, 自由生活性の *Prochloron* (あるいは近縁種) がこの極限環境に存在するのだろうか。

Prochloron と共生するホヤ群体に含まれる生理活性物質の組成が宿主種 (未記載の隠蔽種を含む) によって異なることがわかってきた (Kwan et al. 2014, Tiano et al. 2015)。Lin et al. (2016) は 18S rRNA 遺伝子に基づく宿主ホヤの系統樹と *psbU* や生理活性物質合成経路の遺伝子に基づく *Prochloron* の系統樹のトポロジーがよく一致することを示

している。これは *Prochloron* と宿主ホヤは共種分化の過程にあることを示唆している。しかし遺伝子配列を基にした *Prochloron* のクレード間に種の境界を設定できるかどうかを結論するのは現時点ではまだ難しいだろう。一方、この研究でも *Prochloron* に地理的な特異性は認められていないので、*Prochloron* の水平伝播は支持されることになる。

多くの分子系統解析で *Prochloron* に最も近縁な姉妹群は *Synechocystis trididemni* となっている。*Prochloron* と比べて *Synechocystis* についての研究は少なく、ホヤに共生する *Synechocystis* の多様性についてはわかっていない。ホヤの共生藍藻として代表的なこの2属および共通祖先はジデムニ科ホヤと共生する上で必要な特性を共通に備えていると想像されるが、出水腔に分布する共生藍藻が *Prochloron* に限られている点で両者の特性には違いもあるはずである。これら2属と全く異なる系統に *Trididemnum clinides* や *T. miniatum* の被囊内に分布している糸状藍藻がある (Parry 1984, Larkum *et al.* 1987, Hirose *et al.* 2009)。これは *Oscillatoria* sp. と記述されることもあるが分類学的な研究は行われていないようだ。糸状藍藻が共生する宿主の被囊には *Prochloron* や *Synechocystis* も必ず共生するが、糸状藍藻が赤い補助色素を持つことから共生する他の共生藍藻とは光環境を棲み分けていると考えられる。沖縄の *T. clinides* は糸状藍藻を含むがヘロン島 (グレートバリアリーフ) の同種にはなく、反対に沖縄の *T. miniatum* からは糸状藍藻が確認できていないので、この藍藻については条件的共生である可能性がある。ただし沖縄の *T. clinides* では糸状藍藻も他の共生藍藻と一緒に垂直伝播されている (Kojima & Hirose 2012)。

VI. なぜジデムニ科ホヤだけが宿主に選ばれたのか？

冒頭で触れたように多様な脊索動物の中で藻類との絶対共生が確認されているのはジデムニ科ホヤのうち4属だけである。また、宿主ホヤの分子系統解析から共生成立はそれぞれの属で1回以上生じたと考えられる。ジデムニ科ホヤは何度も藍藻共生の機会を得られたのに、他の動物にその機会がなかったとすれば不自然ではないだろうか。言い換えれば、*Prochloron* をはじめとする共生藍藻はジデムニ科ホヤと繰り返し共生を成立させる一方で、なぜ他の動物を絶対共生のパートナーに選ぶことがなかったのだろうか？ジデムニ科ホヤには共生成立に不可欠な「何か」を備えているが、これを他の動物は持っていなかったのだろうか？藍藻と絶対共生するホヤでは共生藍藻は被囊内または出水腔内のいずれかに分布する。*Prochloron* にとっては被囊と出水腔が、他の共生藍藻にとっては被囊だけが絶対共生の場となり得たのだろう。しかし、被囊や出水腔は全てのホヤに見られる組織なので、分布様式から宿主がジデムニ科に限定された理由を説明することはできそうにない。

これまで確認されている限り全ての絶対共生ホヤが共生藍藻の垂直伝播を行うことから、垂直伝播の獲得は絶対共生の成立の重要なステップであったと考えられる。藍藻共生性

Diplosoma では本属に固有の垂直伝播様式を持つことから、最初に藍藻との共生を確立した *Diplosoma* がこの伝播様式を獲得したと思われる。これに対して *Diplosoma* spp. を除く3属 (*Didemnum*, *Trididemnum*, *Lissoclinum*) では同じ共生藻分布様式を持つ種であれば属を問わず同様な過程で垂直伝播が行われており、それぞれの属で分布様式に応じた垂直伝播様式が収斂的に進化したと考えられる。これは、垂直伝播を実現する上で他に有効な選択肢 (方法) がほとんど無かったことを示唆している。非共生のジデムニ科ホヤでも胚は被囊内で保育され幼生は共同出水腔を通して群体外に放出されるが、この胚発生過程が絶対共生ホヤでは藍藻の獲得・保持のために改変されている。すなわち、被囊内の藍藻は被囊細胞が運搬し、出水腔の藍藻は *Diplosoma* のように特別な器官 (rastrum) で集めるか他の3属のように幼生の胴部に付着させる方法だけが進化的に現実的だったのだろう (図3, 詳細は Hirose (2015) 参照)。ジデムニ科ホヤだけが絶対共生の宿主になり得た理由は、胚発生過程を改変して共生藍藻の垂直伝播を実現できたことにあるのかも知れない。どうしてジデムニ科ホヤが絶対共生の実現に適した発生過程の可塑性を持ち得たのだろうか、その背景はまだ謎のままである。

VII. 謝辞

本誌に総説を発表する機会を提供いただいた須田彰一郎博士と編集委員会の皆様に感謝いたします。また、一通の手紙で藍藻共生ホヤの研究に私を引きずり込んだ故 Ralf A. Lewin 博士をはじめ Lanna Cheng 博士、丸山正博士に感謝いたします。

引用文献

- Burns, B. P., Goh, F., Allen, M. & Neilan, B. A. 2004. Microbial diversity of extant stromatolites in the hypersaline marine environment of Shark Bay, Australia. *Environ. Microbiol.* 6: 1096–1101.
- Cheng, L. & Lewin, R. A. 1984. *Prochloron* on *Synaptula*. *Bull. Mar. Sci.* 35: 95–98.
- Cowan, M. E. 1981. Field observation of colony movement and division of the ascidian *Didemnum molle*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 6: 335–337.
- Cox, G. C. 1986. Comparison of *Prochloron* from different hosts 1. Structural and ultrastructural characteristics. *New Phytol.* 104: 429–445.
- Cox, G. C., Hiller, R. G. & Larkum, A. W. D. 1985. An unusual cyanophyte, containing phycourobilin and symbiotic with ascidians and sponge. *Mar. Biol.* 89: 149–163.
- Dionisio-Sese, M., Maruyama, T. & Miyachi, S. 2001. Photosynthesis of *Prochloron* as affected by environmental factors. *Mar. Biotechnol.* 3: 74–79.
- Donia, M. S., Fricke, W. F., Partensky, F., Cox, J., Elshahawi, S. I., White, J. R., Phillip, A. M., Schatz, M. C., Piel, J., Haygood, M. G., Ravel, J. & Schmidt, E. W. 2011. Complex microbiome underlying secondary and primary metabolism in the tunicate-*Prochloron* symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: E1423–E1432.
- Donia, M. S., Hathaway, B. J., Sudek, S., Haygood, M. G., Rosovitz, M. J., Ravel, J. & Schmidt, E. W. 2006. Natural combinatorial peptide libraries in cyanobacterial symbionts of marine ascidians. *Nat. Chem. Biol.* 2: 729–735.
- Eldredge, L. G. 1966. A taxonomic review of Indo-Pacific didemnid

- ascidians and descriptions of twenty-three central Pacific species. *Micronesica* 2: 161–261.
- Epel, D., Hemela, K., Shick, M. & Patton, C. 1999. Development in the floating world: Defenses of eggs and embryos against damage from UV radiation. *Am. Zool.* 39: 271–278.
- Erwin, P. M., López-Legentil, S. & Turon, X. 2012. Ultrastructure, molecular phylogenetics and chlorophyll *a* content of novel cyanobacterial symbionts in temperate sponges. *Microb. Ecol.* 64: 771–783.
- Fisher, C. R. & Trench, R. K. 1980. *In vitro* carbon fixation by *Prochloron* sp. isolated from *Diplosoma virens*. *Biol. Bull.* 159: 639–648.
- Griffiths, D. J. & Thinh, L. 1983. Transfer of photosynthetically fixed carbon between the prokaryotic green alga *Prochloron* and its ascidian host. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 34: 431–440.
- Herdman, W. A. 1906. Report on the Tunicata. Rep. Gov. Ceylon Pearl Oyster Fish. Gulf Manaar Suppl. Rep. 39: 295–348.
- Hernández-Mariné, M., Turon, X. & Catalan, J. 1990. A marine *Synechocystis* (Chroococcales, Cyanophyta) epizoid on didemnid ascidians from the Mediterranean Sea. *Phycologia* 29: 275–284.
- Hirose, E. 2000a. Plant rake and algal pouch of the larvae in the tropical ascidian *Diplosoma similis*: an adaptation for vertical transmission of photosynthetic symbionts *Prochloron*. *Zool. Sci.* 17: 233–240.
- Hirose, E. 2000b. Diet of a notodelphyid copepod inhabiting in an algal-bearing didemnid ascidian *Diplosoma virens*. *Zool. Sci.* 17: 833–838.
- Hirose, E. 2001. Acid containers and cellular networks in the ascidian tunic with special remarks on ascidian phylogeny. *Zool. Sci.* 18: 723–731.
- Hirose, E. 2015. Ascidian photosymbiosis: Diversity of cyanobacterial transmission during embryogenesis. *Genesis* 53: 121–131.
- Hirose, E. & Fukuda, T. 2006. Vertical transmission of photosymbionts in the colonial ascidian *Didemnum molle*: The larval tunic prevents symbionts from attaching to the anterior part of larvae. *Zool. Sci.* 23: 669–674.
- Hirose, E. & Hirose, M. 2011. A new didemnid ascidian *Lissoclinum midui* sp. nov. from Kumejima Island (Okinawa, Japan), with remarks on the absence of a common cloacal system and the presence of an unknown organ. *Zool. Sci.* 28: 462–468.
- Hirose, E., Hirose, M. & Shy, J.-Y. 2015. *Diplosoma gumavirens* (Asciacea, Didemnidae): the first record of photosymbiotic ascidians in the Taiwan Strait. *Mar. Biodivers. Rec.* 8: e128.
- Hirose, E., Iwai, K. & Maruyama, T. 2006 Establishment of the photosymbiosis in the early ontogeny of three giant clams. *Mar. Biol.* 148: 551–558.
- Hirose, E. & Maruyama, T. 2004 What are the benefits in the ascidian-*Prochloron* symbiosis? *Endocytobiosis Cell Res.* 15: 51–62.
- Hirose, E., Maruyama, T., Cheng, L. & Lewin, R. A. 1996. Intracellular symbiosis of a photosynthetic prokaryote, *Prochloron* sp., in a colonial ascidian. *Invertebr. Biol.* 115: 343–348.
- Hirose, E., Maruyama, T., Cheng, L. & Lewin, R. A. 1998. Intra- and extra-cellular distribution of photosynthetic prokaryotes, *Prochloron* sp., in a colonial ascidian: Ultrastructural and quantitative studies. *Symbiosis* 25: 301–310.
- Hirose, E. & Nakabayashi, S. 2008. Algal symbionts in the tunic lamellae on the posterior half of the larval trunk of the colonial ascidian *Lissoclinum timorense* (Asciacea, Didemnidae). *Zool. Sci.* 25: 1205–1211.
- Hirose, E., Neilan, B. A., Schmidt, E. W. & Murakami, A. 2009. Enigmatic life and evolution of *Prochloron* and related cyanobacteria inhabiting colonial ascidians. In: Gault, P. M. & Marler, H. J. (eds.) *Handbook on Cyanobacteria*, pp. 161–189. Nova Science, New York.
- Hirose, E., Ohtsuka, K., Ishikura, M. & Maruyama, T. 2004. Ultraviolet absorption in ascidian tunic and ascidian-*Prochloron* symbiosis. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 84: 789–794.
- Hirose, E., Turon, X., López-Legentil, S., Erwin, P. M. & Hirose, M. 2012. First records of didemnid ascidians harbouring *Prochloron* from Caribbean Panama: genetic relationships between Caribbean and Pacific photosymbionts and host ascidians. *Syst. Biodivers.* 10: 435–445.
- Hirose, E., Uchida, H. & Murakami, A. 2009. Ultrastructural and microspectrophotometric characterization of multiple species of cyanobacterial photosymbionts coexisting in the colonial ascidian *Trididemnum clinides* (Tunicata, Ascidiacea, Didemnidae). *Eur. J. Phycol.* 44: 365–375.
- Hirose, M., Tochikubo, T. & Hirose, E. 2010. Taxonomic significance of tunic spicules in photosymbiotic ascidians: a quantitative and molecular evaluation. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 90: 1065–1071.
- Inoue, J., Nakashima, K., Satoh, N. 2019. ORTHOSCOPE analysis reveals the presence of the cellulose synthase gene in all tunicate genomes but not in other animal genomes. *Genes (Basel)* 10: 294.
- Kerney, R., Kim, E., Hangarter, R.P., Heiss, A. A., Bishop, C. D. & Hall, B. K. 2011. Intracellular invasion of green algae in a salamander host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 6497–6502.
- Kimura, S., Ohshima, C., Hirose, E., Nishikawa, J. & Itoh, T. 2001 Cellulose in the house of the appendicularian *Oikopleura rufescens*. *Protoplasma* 216: 71–74.
- Kocot, K. M., Tassia, M. G., Halanych, K. M. & Swalla, B. J. 2018. Phylogenomics offers resolution of major tunicate relationships. *Mol. Phylogenet. Evol.* 121: 166–173.
- Kojima, A. & Hirose, E. 2010. Transfer of prokaryotic algal symbionts from a tropical ascidian (*Lissoclinum punctatum*) colony to its larvae. *Zool. Sci.* 27: 124–127.
- Kojima, A. & Hirose, E. 2012. Transmission of cyanobacterial symbionts during embryogenesis in the coral reef ascidians *Trididemnum nubilum* and *T. clinides* (Didemnidae, Ascidiacea, Chordata). *Biol. Bull.* 222: 63–73. (doi:10.1086/BBLv222n1p63)
- Koplovitz, G., Hirose, E., Hirose, M. & Shenkar, N. 2015. Being green in the Red Sea-the photosymbiotic ascidian *Diplosoma simile* (Asciacea: Didemnidae) in the Gulf of Aqaba. *Syst. Biodivers.* 13: 131–139.
- Kott, P. 1977. Algal-supporting didemnid ascidians of the Great Barrier Reef. In: Taylor, D. L. (ed.) *Proceedings of the Third International Coral Reef Symposium*. pp. 616–623. University of Miami, Miami.
- Kott, P. 1980. Algal-bearing didemnid ascidians in the Indo-West-Pacific. *Mem. Qld. Mus.* 20: 1–47.
- Kott, P. 1982. Didemnid-algal symbiosis: Algal transfer to a new host generation. In: *Proceedings of the Fourth International Coral Reef Symposium*, Manila 1981. University of the Philippines, Quezon.
- Kott, P. 2001. The Australian Ascidiacea, part 4, Aplousobranchia (3), Didemnidae. *Mem. Qld. Mus.* 47: 1–408.
- Kott, P., Parry, D. L. & Cox, G. C. 1984. Prokaryotic symbiont with a range of ascidian hosts. *Bull. Mar. Sci.* 34: 308–312.
- Kremer, B. P., Parry, D. L. & Lewin, R. A. 1982. Carbon fixation and photosynthates of *Prochloron*, a green alga symbiotic with an ascidian, *Lissoclinum patella*. *Phycologia* 21: 258–263.
- Kühl, M., Behrendt, L., Trampe, E. *et al.* 2012. Microenvironmental ecology of the chlorophyll b-containing symbiotic cyanobacterium *Prochloron* in the didemnid ascidian *Lissoclinum patella*. *Front. Microbiol.* 3: 402.
- Kwan, J., Donia, M., Hanb, A. W., Hirose, E., Haygood, M. G. & Schmidt, E. W. 2012. Genome streamlining and chemical defense in a coral reef symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 20655–20660.
- Kwan, J. C., Tianero, M. D. B., Donia, M. S., Wyche, T. P., Bugni, T. S. & Schmidt, E. W. 2014. Host control of symbiont natural product chemistry in cryptic populations of the tunicate *Lissoclinum patella*. *PLoS One* 9: e95850.
- Larkum, A. W. D., Cox, G. C., Hiller, R. G., Parry, D. L. & Dibbayawan, T. P. 1987. Filamentous cyanophytes containing phycocourolin and in symbiosis with sponges and an ascidian of coral reefs. *Mar. Biol.* 95: 1–13.
- Lewin, R. A. 1975. A marine *Synechocystis* (Cyanophyta, Chroococcales)

- epizoic on ascidians. *Phycologia* 14: 153–160.
- Lewin, R. A. 1976. Prochlorophyta as a proposed new division of algae. *Nature* 261: 697–698.
- Lewin, R. A. 1977. *Prochloron*, type genus of the Prochlorophyta. *Phycologia* 16: 217.
- Lewin, R. A. & Cheng, L. 1989. *Prochloron*, a microbial enigma. Chapman Hall: New York.
- Li, S., Chen, T., Xu, L. & Hu, M. 2016. Ascidians (*Diplosoma* sp.) kill *Acropora* corals in a deteriorating reef environment (Luhuitou, Sanya, northern South China Sea). *Bull. Mar. Sci.* 92: 527–528.
- Lin, Z., Torres, J. P., Tianero, M. D., Kwan, J. C. & Schmidt, E. W. 2016. Origin of chemical diversity in *Prochloron*-tunicate symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 82: 3450–3460.
- Littler, M. M. & Littler, D. S. 1995. A colonial tunicate smothers corals and coralline algae on the Great Astrolabe Reef, Fiji. *Coral Reefs* 14: 148–149.
- Martínez-García, M., Koblizek, M., López-Legentil, S. & Anton, J. 2011. Epibiosis of oxygenic phototrophs containing chlorophylls *a*, *b*, *c*, and *d* on the colonial ascidian *Cystodytes dellechiaiei*. *Microb. Ecol.* 61: 13–19.
- Maruyama, T., Hirose, E. & Ishikura, M. 2003. Ultraviolet-light-absorbing tunic cells in didemnid ascidians hosting a symbiotic photo-oxygenic prokaryote, *Prochloron*. *Biol. Bull.* 204: 109–113.
- Melo Clavijo, J., Donath, A., Seródio, J. & Christa, G. 2018. Polymorphic adaptations in metazoans to establish and maintain photosymbioses. *Biol. Rev.* 93: 2006–2020.
- Miyashita, H., Ikemoto, H., Kurano, N., Adachi, K., Chihara, M. & Miyachi, S. 1996. Chlorophyll *d* as a major pigment. *Nature* 383: 402.
- Münchhoff, J., Hirose, E., Maruyama, T., Sunairi, M., Burns, B. P. & Neilan, B. A. 2007. Host specificity and phylogeography of the prochlorophyte *Prochloron* sp., an obligate symbiont in didemnid ascidians. *Environ. Microbiol.* 9: 890–899.
- Nielsen, D. A., Pernice, M., Schliep, M. *et al.* 2015. Microenvironment and phylogenetic diversity of *Prochloron* inhabiting the surface of crustose didemnid ascidians. *Environ. Microbiol.* 17: 4121–4132.
- 西川輝明 1995. 脊索動物門. 西村三郎(編)原色検索日本海岸動物図鑑 [II]. pp. 573–610. 保育社. 大阪.
- Oliveira, F. A. S., Michonneau, F. & da Cruz Lotufo, T. M. 2017. Molecular phylogeny of Didemnidae (Asciacea: Tunicata). *Zool. J. Linn. Soc.* 180: 603–612.
- Olson, R. R. 1983. Ascidian-*Prochloron* symbiosis: the role of larval photoadaptation in midday larval release and settlement. *Biol. Bull.* 165: 221–240.
- Palenik, B. & Haselkom, R. 1992. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll *b*-containing prokaryotes. *Nature* 355: 265–267.
- Pardy, R. L. & Lewin, R. A. 1981. Colonial ascidians with prochlorophyte symbionts: Evidence for translocation of metabolites from alga to host. *Bull. Mar. Sci.* 31: 817–823.
- Parry, D. L. 1984. Cyanophytes with R-phycoerythrins in association with seven species of ascidian from the Great Barrier Reef. *Phycologia* 23: 503–505.
- Parry, D. L. & Kott, P. 1988. Co-symbiosis in the Asciacea. *Bull. Mar. Sci.* 42: 149–153.
- Patterson, G. M. L. & Withers, N. W. 1982. Laboratory cultivation of *Prochloron*, a tryptophan auxotroph. *Science* 217: 1034–1036.
- Rodriguez-Martinez, R. E., Jordan-Garza, A. G., Baker, D. M. & Jordan-Dahlgren, E. 2012. Competitive interactions between corals and *Trididemnum solidum* on Mexican Caribbean reefs. *Coral Reefs* 31: 571–577.
- Schmidt, E. W. 2015. The secret to a successful relationship: lasting chemistry between ascidians and their symbiotic bacteria. *Invertebr. Biol.* 134: 88–102.
- Schmidt, E. W., Donia, M. S., McIntosh, J. A., Fricke, W. F. & Ravel, J. 2012. Origin and variation of tunicate secondary metabolites. *J. Nat. Prod.* 75: 295–304.
- Sensui, N. & Hirose, E. 2018. Cytoplasmic UV-R absorption in an integumentary matrix (tunic) of photosymbiotic ascidian colonies. *Zool. Stud.* 57: 1–11.
- Shenkar, N., Gittenberger, A., Lambert, G., Rius, M., Moreira da Rocha, R., Swalla, B. J. & Turon, X. 2019. Asciacea World Database. Accessed at <http://www.marinespecies.org/asciacea> on 2019-07-12.
- Sluiter, C. P. 1909. Die Tunicaten der Siboga-Expedition Pt. 2. Die merosomen Ascidien. *Siboga-Expedite* 56B: 1–112.
- Smith, H. G. 1935. On the presence of algae in certain Asciacea. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 15: 615–626.
- Sommer, B., Harrison, P. L. & Scheffers, S. R. 2010. Aggressive colonial ascidian impacting deep coral reefs at Bonaire, Netherlands Antilles. *Coral Reefs* 29: 245.
- Steindler, L., Huchon, D., Avni, A. & Ilan, M. 2005. 16S rRNA phylogeny of sponge-associated cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4127–4131.
- Tebbett, S. B., Streit, R. P. & Bellwood, D. R. 2019. Expansion of a colonial ascidian following consecutive mass coral bleaching at Lizard Island, Australia. *Mar. Environ. Res.* 144: 125–129.
- Tianero, M. D. B., Kwan, J. C., Wyche, T. P., Presson, A. P., Koch, M., Barrows, L. R., Bugni, T. S. & Schmidt, E. W. 2015. Species specificity of symbiosis and secondary metabolism in ascidians. *ISME J.* 9: 615–628.
- Tokioka, T. 1942. Ascidians found on the mangrove trees in Iwayama Bay, Palao. *Palao Trop. Biol. Stn. Stud.* 3: 497–507.
- Tokioka, T. 1950. Ascidians from the Palao Islands. I. Publ. Seto Mar. Biol. Lab. 1: 115–150.
- Tokioka, T. 1954. Invertebrate fauna of the intertidal zone of the Tokara Islands VII. Ascidians. *Publs Seto Mar. Biol. Lab.* 3: 239–264.
- Urbach, E., Robertson, D. L. & Chisholm, S. W. 1992. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation. *Nature* 355: 267–270.
- Vargas-Ángel, B., Asher, J., Godwin, L. S. & Brainard, R. E. 2009. Invasive didemnid tunicate spreading across coral reefs at remote Swains Island, American Samoa. *Coral Reefs* 28: 53.
- Yokobori, S., Kurabayashi, A., Neilan, B. A., Maruyama, T. & Hirose, E. 2006. Multiple origins of the ascidian-*Prochloron* symbiosis: Molecular phylogeny of photosymbiotic and non-symbiotic colonial ascidians inferred from 18S rDNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 40: 8–19.