

平成 30 年 6 月 24 日現在

機関番号：33401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05607

研究課題名(和文)クロロフィル二次代謝産物を新規指標とした海洋の微細藻類食プロティストの生態の解明

研究課題名(英文) Study on chlorophyll catabolites as new proxies understanding the ecology of algivorous protists in the ocean

研究代表者

柏山 祐一郎 (Kashiyama, Yuichiro)

福井工業大学・環境情報学部・教授

研究者番号：00611782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：中低緯度の貧栄養海域では、プロクロロコッカス属のピコシアノバクテリアが高度に優占することが知られているが、これら直径が0.6μm程度の微細な球形細胞については、「濾過食者である多細胞動物プランクトンが植物プランクトンを補食する」という海洋生態系の古典的なパラダイムが通用しない。本研究では、「プロティスト(原生生物)による食胞作用によるプロクロロコッカスの捕食を起点とした、より大型の生物へエネルギーを供給する食物網が存在する」という仮説を立て、プロクロロコッカスに固有な光合成色素であるジビニルクロロフィル類の捕食者による代謝産物に着目することで、その証明を試みた。

研究成果の概要(英文)：It is known that picocyanobacteria *Prochlorococcus* spp. are highly dominant in the low to mid latitudinal oligotrophic ocean; yet, importantly, because they are conspicuously minute coccoids down to < 0.6 μm in diameter, a classical paradigm on the marine food web is unlikely to be applied where phytoplankton would have to be grazed by multicellular filter-feeders. In the present study, I hypothesized that the direct consumers of those picoplanktons should be phagotrophic protists that thus supplies energy derived from the photosynthesis of those minute producers to larger organisms. We tested this hypothesis by particularly paying attention to catabolites of divinylchlorophylls, unique photosynthetic pigments of *Prochlorococcus*, that are expected to be generated by the predatory process of picocyanobacteria-feeding protists.

研究分野：Microbiology

キーワード：Divinylchlorophylls cyclophosphoride enol picocyanobacteria *Prochlorococcus* protists algivore primary production

## 1. 研究開始当初の背景

外洋環境では、光合成を行う微細藻類が生態系へのエネルギーの入り口として圧倒的に重要な位置を占める。これら微細藻類を直接の栄養源とする生物は、外洋生態系におけるエネルギーフローを理解する上での鍵となる。特に、全球の約半分の面積を占める広大な貧栄養水域を考えると、近年の研究で量的に最も重要な一次生産者であることが分かってきたピコ藻類（細胞の長径が 0.2~3  $\mu\text{m}$ ）に関する捕食者は未解明であった。これら極微細な一次生産者については、多細胞動物プランクトンなど濾過食者ではなく、食胞作用により餌を取り込み消化するプロティスト（単細胞体制の真核生物）が理論上可能な捕食者であるが、具体的な検証は乏しく、定量的な議論はなされていなかった。従って、ピコ藻類による基礎生産は全球的には極めて重要だが、ピコ藻類と外洋生態系全体との繋がりは未解明であった。

このように、外洋の光合成一次生産からのエネルギーフラックスの定量的な理解を妨げてきた要因の一つは、微細藻類の種レベルでの捕食-被食関係など、食物網基底部のエネルギーフローの経路について定性的な議論の域を出ず、生態系全体の議論においては「ブラックボックス」して扱われてきた状況にあった。しかし近年、申請者らの研究により、外洋域の一次消費者として、微細藻類捕食性プロティストの量的な関与が示された。この知見は、食物網基底部の実際の構造が従来の認識より複雑であり、微細藻類捕食性プロティストがより大きな動物プランクトンに捕食されることでより高次の捕食者へ、あるいは沈降粒子を形成することで中層-深層の生態系にエネルギーを供給している可能性を示唆するものであった。

## 2. 研究の目的

本研究では、新規な生態学的な分子指標（水圏環境中の生物学的「プロセス」の指標）を用いた研究手法を通して微生物種間の捕食-被食関係を解析することで、これまでブラックボックスであった外洋の貧栄養海域で優占する基礎生産者であるピコシアノバクテリアを起点とするエネルギーフローのパスとフラックスを解明するための基盤の確立を目指した。すなわち、申請者が世界で研究をリードしてきた、微細藻類食プロティストによるクロロフィルの無毒化代謝産物 13<sup>2</sup>,17<sup>3</sup>-cyclophorbide enol 類(CPE 類)をピコシアノバクテリアの「被食指標」として利用することで、海洋調査と培養観察実験、および化学分析を通して、「ピコシアノバクテリアの一次消費者として、食胞作用による摂食をおこなうプロティストが食物網での橋渡し役を担っている」という仮説の検証を試みた。

## 3. 研究の方法

**1) ピコシアノバクテリア *Prochlorococcus* の被食指標としてのジビニル型 CPE 類の分析手法確立:** 外洋で量的に最も重要な *Prochlorococcus* 属ピコシアノバクテリアに固有な光合成色素であるジビニル型クロロフィルを基質として生成されることが期待される、ジビニル型 CPE 類の標準物質の合成をおこなった。すなわち、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の変異株由来のジビニル型の Chlorophyll a を原料に 3,8-Divinyl-13<sup>2</sup>,13<sup>7</sup>-cyclophorbide a enol (DV-cPPB-aE) の合成を試みた。この標準試料を用いて、環境試料中のジビニル型 CPE 類を HPLC を用いて定量する実験方法を検討した。

**2) プロティストによるジビニル型 CPE 類生産の実験生物学的検証:** 上述のジビニル型の Chlorophyll a を生産する PCC 6803 変異株を餌とした二員培養系において、CPE 代謝が確認されている既存のプロティストが、捕食・消化に伴って DV-cPPB-aE を生産するかどうかを実験的に検証した。

**3) 貧栄養海域表層水試料からのピコシアノバクテリア捕食性プロティストの同定と分離:** 中央水産研究所などによる太平洋中・低緯度域の調査航海に参加し、表層水を層別採水して、それぞれの深度からピコシアノバクテリア捕食性プロティストの分離・培養を試みた。すなわち、培養した *Prochlorococcus* spp. NIES-2087, 2882 や *Synechococcus* sp. NIES-969 を採取した海水試料に船上で直ちに添加・培養し、この粗培養物に含まれた増殖したプロティストを含む懸濁物から DNA を抽出し、18S rDNA の大腸菌クローンライブラリを作成して、量的に顕著に増殖したプロティストの遺伝系統解析をおこなった。さらに、このように増殖されたプロティストの単離株を作成することを試みた。株化されたプロティストは、*Prochlorococcus* sp. NIES-2882 を餌とした二員培養系で維持された。

**4) 貧栄養海域の捕食性プロティストによる CPE 代謝の検証:** 上述 3) の *Prochlorococcus* を餌として用いた素培養物の懸濁粒子から色素類を抽出して HPLC により分析し、餌の *Prochlorococcus* に含まれたジビニル型クロロフィル類に由来する代ジビニル型 CPE 類の産生を検証した。また、上述 3) の *Prochlorococcus* 捕食性プロティストの単離株について、カルチャー懸濁物を同様に分析して、それぞれの CPE 産生能を検証した。

**5) 貧栄養海域表層水懸濁物からの CPE 代謝産物の検出の試み:** 上述 3) の外洋表層水の層別採水試料から、懸濁物を限外濾過膜を用いたタンジェンシャルフロー濾過とそれに続く高速遠心分離によって濃縮し、色素類を抽出して HPLC により分析することで、天然環境におけるジビニル型 CPE 類の分布について検証を試みた。

#### 4. 研究成果

**1) ピコシアノバクテリア *Prochlorococcus* の被食指標としてのジビニル型 CPE 類の分析手法確立:** DV-cPPB-aE の高純度標準試料を *in vitro* で有機合成することに成功し、その光化学的な特性を決定し、HPLC による定量分析法を確立した(新規化合物の報告)。

**2) プロティストによるジビニル型 CPE 類産生の実験生物学的検証:** シアノバクテリア食のプロティスト *Paracercomonas* sp. にジビニル型 Chlorophyll *a* をもつ *Synechocystis* sp. PCC 6803 変異株を捕食させて残渣を分析したところ、*in vivo* で DV-cPPB-aE の産生が示された。また、バクテリア食とされた色素体を有しないクリプト生物既存の系統保存株 *Goniomonas pacifica* NIES-1372 にジビニル型の Chlorophyll *a* 及び Chlorophyll *b* を有する *Prochlorococcus marinus* NIES-2087 を捕食させて培養したところ、DV-cPPB-aE に加えて、Chlorophyll *b* の CPE 代謝産物であると考えられる 3,8-Divinyl-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>,<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-cyclopheophorbide *b* enol (DV-cPPB-bE) の産生も確認された(新規化合物の報告)。これらのことにより、CPE 代謝の基質として、従来報告のあった Chlorophyll *a* 及び Chlorophyll *b* に加えてこれらのジビニル体も反応基質となり得ることが示された。

**3) 貧栄養海域表層水試料からのピコシアノバクテリア捕食性プロティストの同定と分離:** 中央水産研究所の漁業調査船蒼鷹丸による 2016 年度~2018 年度の調査航海に参加し、御前崎沖定線の黒潮流軸以南の海域(北緯 30° 東経 138°)における層別採水試料、御前崎沖太平洋の黒潮流軸以南(東経 138 度、北緯 27-30 度)において表層水を層別採水した。各深度の試料水に対して船上で *Prochlorococcus* spp. を添加し、20 の寂光条件で一週間培養したところ、この粗培養カルチャー中に様々な鞭毛虫類およびアメーバ類の増殖が認められた。これらプロティストをマイクロキャピラリーを用いて単離し、*Prochlorococcus* spp. を餌とした二員培養系を合計 12 株確立した。それぞれの単離株について、18S rDNA 塩基配列に基づいて分子系統解析をおこなったところ、それぞれ無色鞭毛虫 4 属とアメーバ 1 属に分類された。さらに、粗培養カルチャーのバルク懸濁粒子に対して DNA を抽出して 18S rDNA の大腸菌クローンライブラリを作成して解析したところ、6 属の無色プロティストが量的に重要な構成者であると認められたが、うち 2 属は単離培養が未成功の生物であると考えられた。なお、先行研究などから、少なくともうち 5 属は CPE 代謝をおこなう生物であると考えられた。

また、2018 年度の練習船勢水丸(三重大学)および上述の漁業調査船蒼鷹丸の調査航海においては、タンジェンシャルフロー濾過

法の改良について試行錯誤をおこない、作業効率および濾過量について大幅に改良することに成功した。

**4) 貧栄養海域の捕食性プロティストによる CPE 代謝の検証:** 上述の船上実験による素培養カルチャーの懸濁粒子を高速遠心分離器で回収し、抽出液を HPLC で分析したところ、DV-cPPB-aE および DV-cPPB-bE が顕著な量検出された。よって、*Prochlorococcus* を餌として増殖する捕食性プロティストの多くが CPE 代謝によるクロロフィル分解をおこなっていることが示唆された。すなわち、これらプロティストは自然環境においてもピコシアノバクテリアを捕食していることが予想された。次に、上述の *Prochlorococcus* を餌として培養された単離培養株カルチャーの懸濁粒子を同様に分析したところ、CPE 代謝が顕著に認められる株と全く CPE 代謝が認められない株が存在することが分かった。これは、(1) 全てのピコシアノバクテリア食プロティストが CPE 代謝をおこなうわけではないと解釈されたが、(2) 今回 *Prochlorococcus* 培養株の添加により増殖したプロティストのうち CPE 代謝をおこなわないものは、自然環境では常態的に光合成生物を捕食している生物ではない可能性も考えられた。

**5) 貧栄養海域表層水懸濁物からの CPE 代謝産物の検出の試み:** 上述の蒼鷹丸航海で黒潮流軸以南(北緯 30° 東経 138°)における層別採水試料中の懸濁粒子の抽出物を HPLC を用いて分析したところ、DV-cPPB-aE および DV-cPPB-bE が検出された。この結果により、これらの海域において、*Prochlorococcus* の少なくとも一部が、CPE 代謝をおこなうプロティストに捕食されていることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Y. Kinoshita, M. Kayama, Y. Kashiyama, H. Tamiaki. *In vivo* and *in vitro* preparation of divinyl-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>,<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-cyclopheophorbide-a enol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **28**, 1090-1092 (2018).

Y. Kashiyama, A. Yokoyama, A. Yabuki, M. Nakazawa, G. Tanifuji, et al. Taming chlorophylls allowed eukaryotes to prosper on the oxygenated Earth. Submitted to *Nature Ecology & Evolution*.

[学会発表](計 16 件)

柏山祐一郎, ほか. <sup>13</sup>C<sub>2</sub>,<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Cyclopheophorbide *d* enol: 海洋における Chlorophyll *d* 生物による遠赤色光合成からピコ藻類食プロティストを介した生態系へのエネルギーフローの可能性. 第 6 回日本光合成学会及び公開シンポジウム, 岡山大学(岡山), 2015 年 5 月. ポス

ター(一般)  
四本木彰良, 柏山祐一郎, 石川輝, ほか. 外洋表層水から分離されたピコ藻類を捕食する無色プロティストとそれらのクロロフィル代謝. *日本藻類学会第40回大会*, 日本歯科大学(東京), 2016年3月. ポスター(一般)  
四本木彰良, 木下雄介, 民秋均, 柏山祐一郎. ピコプランクトン *Prochlorococcus marinus* のプロティストによる「被食」指標としての 3,8-divinyl-13<sup>2</sup>,17<sup>3</sup>-cyclophorbide a enol. *第7回日本光合成学会及び公開シンポジウム*, 東京理科大学(東京), 2016年5月. ポスター(一般)  
A. Shihongi, Y. Kinoshita, A. Ishikawa, H. Tamiaki, Y. Kashiyama. Pelagic protists feeding on pico-cyanobacteria and their chlorophyll catabolisms. *Annual meeting of the International Society of Protistologists*, Moscow, Russia, 2016年6月. ポスター(国際一般)  
柏山祐一郎, 横山亜紀子, 民秋均. クロロフィルを制する者が光環境を征した - クロロフィルの分解代謝と二次植物の進化. *日本進化学会第18回東京大会*, 東京工業大学(東京), 2016年8月. 口頭(招待)  
柏山祐一郎, 横山亜紀子, 民秋均. 真核生物に広く共有されるクロロフィル無毒化代謝機構とその藻類進化との関わり. *日本植物学会第80回沖縄大会*, 沖縄コンベンションセンター(沖縄), 2016年09月. 口頭(招待)  
柏山祐一郎, 横山亜紀子, 民秋均. 真核生物の繁栄を可能たらしめたクロロフィルの無毒化代謝. *第49回日本原生生物学会岡山大会 原生生物若手の会*, 岡山大学(岡山), 2016年10月. 口頭(基調)  
木下雄介, 北川裕一, 柏山祐一郎, 民秋均. 8-ピニル-13<sup>2</sup>,17<sup>3</sup>-シクロフェオフォルバイド-a の合成とその電子吸収スペクトル. *日本化学会第97春季年会*, 慶應義塾大学(神奈川), 2017年3月. 口頭(一般)  
四本木彰良, 加山基, 木下雄介, 民秋均, 日高清隆, 柏山祐一郎. 遠洋水塊におけるピコシアノバクテリア捕食性プロティストとそれらのクロロフィル代謝. *日本藻類学会第41回大会*, 高知大学(高知), 2017年3月. 口頭(一般)  
加山基, 柏山祐一郎. 微細藻類食 *Paracercomonas* sp. KMO002株のクロロフィル分解代謝に関する研究. *日本藻類学会第41回大会*, 高知大学(高知), 2017年3月. ポスター(一般)  
Y. Kashiyama, A. Shihongi, T. Matsuda, K. Hidaka, A. Ishikawa, et al. Predation of picocyanobacteria *Prochlorococcus* by pelagic nano-scaled protists and their catabolism on divinylchlorophylls. *15th International Congress of Protistology*, プラハ市, チェコ, 2017年7月. 口頭(国際一般)  
柏山祐一郎, 四本木彰良, 日高清隆, 石川輝, ほか. ナノ鞭毛虫/アメーバによるピコシア

ノバクテリア *Prochlorococcus* の捕食とそれに伴うジピニルクロロフィル類の無毒化代謝. *環境微生物系学会合同大会 2017*, 東北大学(仙台), 2017年8月. 口頭(一般)  
加山基, 四本木彰良, 松田知樹, 日高清隆, 石川輝, 柏山祐一郎. ほか. 貧栄養海域におけるピコ藻類捕食性プロティストの単離培養および分子系統解析. *環境微生物系学会合同大会 2017*, 東北大学(仙台), 2017年8月. 口頭(一般)  
Y. Kashiyama. Detoxification catabolism of chlorophylls: a key understanding the early evolution of eukaryotes. *日加先端科学(JCFoS)シンポジウム*, 沖縄科学技術大学院大学(沖縄), 2017年11月. ポスター(国際招待)  
松田知樹, 四本木彰良, 加山基, 日高清隆, 瀬藤聡, 石川輝, 柏山祐一郎. *Prochlorococcus* 捕食性プロティストの分子系統とクロロフィル分解代謝. *日本藻類学会第42回大会*, 東北大学(仙台), 2018年3月. ポスター(一般)  
Y. Kashiyama. Role of a pan-eukaryotic chlorophyll catabolism during the late Proterozoic global oxygenation: a hypothesis. *Japan Geoscience Union Meeting 2018*, 千葉県千葉市, 2018年5月. 口頭(一般)  
〔図書〕(計0件)  
〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)  
〔その他〕  
ホームページ等:  
<http://bnei-amateras.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柏山 祐一郎 (Kashiyama, Yuichiro)  
福井工業大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号: 00611782