

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07197

研究課題名(和文)珪藻の新奇シリカ構造体の形態形成及びその関連遺伝子の解析

研究課題名(英文) Morphogenesis of hitherto-unknown siliceous element in diatom frustule with a combination of cell biological approach and whole genome sequencing

研究代表者

出井 雅彦 (Idei, Masahiko)

文教大学・教育学部・教授

研究者番号：60143624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、Hydrosera属珪藻に特異な新奇シリカ構造体の形成過程、及びそれらに関連する遺伝子の解明である。亜熱帯の島々から試料を採集し、培養株を確立した。その中から、形態の異なる33-06株とAH-10株の2株を用いた。透過電子顕微鏡による観察から、新奇構造体は細胞内で同時多発的に細胞膜直下の嚢状膜中で形成されることが明らかになった。これらは、数 μm の小さなリングから始まり、放射状に成長し、円盤状構造になった。

関連する遺伝子の解析のため、上述2株の全ゲノム及びトランスクリプトームを得、葉緑体及びミトコンドリアの全長配列を決定することができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to understand the genetic basis of the morphogenesis of a novel siliceous element found in *Hydrosera* diatom. We established strains of *H. triquetra* var. *triquetra* (strain ID: 33-06) and *H. triquetra* var. *octagona* (AH-10) from samples collected from subtropical/temperate islands in Japan. Detailed observations were undertaken to uncover the morphogenesis pattern of the novel elements specifically found from the internal surface of the valves. The morphogenesis proceeded within SDV localizing beneath the plasma membrane: this process took place sporadically but synchronously within a cell. The formation started from a ring-like pattern centre with a diameter of a few micrometers, which, after a centrifugal development, gave rise to a disk. Comparative genome and RNA-Seq analyses on the two strains were performed in search for genetic factors responsible for ontogeny. The complete sequences of the organellar genomes had already been recovered from the two strains.

研究分野：植物系統分類学

キーワード：珪藻 シリカ 形態形成 新奇構造体 遺伝子 *Hydrosera* 鱗片

1. 研究開始当初の背景

珪藻はシリカの細胞壁をもつ真核単細胞の光合成生物である。細胞壁は被殻と呼ばれ、上下2枚の殻と数枚の殻帯から成る。栄養細胞には殻と殻帯以外の構成要素は全く知られていなかったが、我々は新たな構成要素となる新奇シリカ構造体を *Hydrosera* 属から発見した。これと類似する鱗片状の構造物は、有性生殖の過程で作られる増大胞子のみ知られている。この鱗片は、珪藻の進化を探る重要な手掛かりとして注目され、現在のような殻をもつ以前の祖先珪藻が、鱗片で被われていたと推測されているからである (Round & Crawford 1989)。しかし、鱗片は生活環のほんの僅かな時間 (半日から数日) だけ細胞を被い、捨てられてしまう存在であり、栄養細胞には存在しないと思われていたが、我々の発見したこの新奇シリカ構造体は、栄養細胞に存在し、細胞を被っている。すなわち、これらは他の珪藻が失ってしまった細胞を被う鱗片の名残ではないかと考え、それを明らかにするためには、新奇構造体の形成過程を細胞学的見地から追求し、同時にその形成に係わる遺伝子を探索する。

2. 研究の目的

本研究では、我々が珪藻の *Hydrosera* で新たに発見した新奇シリカ構造体について、以下の2点の解明を目的とした。形態及びその形成過程を電子顕微鏡を用い、詳細に観察し、形態と構造、そして細胞内のどこでどのように作られるかを細胞学的に明らかにする。新奇構造体の形成に係わる遺伝子を探索することである。そして、最終的には、珪藻の起源と進化の解明に繋げる。

3. 研究の方法

(1) 材料の採集と分離、株の確立

研究材料となる *Hydrosera* は、温帯から亜熱帯の淡水に主に生育している。この研究に先立ち、既に培養株を得ていたが、新たな株の確立のため、採集を行った。鹿児島県、沖縄県及び周辺の離島で材料の採集を行い、得られた試料の中から、細胞を単離し、クローン株を複数作成した。本研究では、形態の異なる3分類群、*Hydrosera triquetra* var. *triquetra* (33-06株) と *H. triquetra* var. *hexagona* (AH-10株)、*H. stellata* を主に用いた。

(2) 走査電子顕微鏡による観察

培養株を定法により処理し、走査電子顕微鏡 (Hitachi S-4000) を用い、新奇構造体の微細構造を観察した。

(3) 透過電子顕微鏡による観察

新奇構造体が細胞内のどこで、どのように作られるかを観察するため、増殖中の株を固定・脱水・包埋し、超薄切片を作り、透過電子顕微鏡 (JEM-1200EX) を用い観察した。

(4) 新奇構造体に係わる遺伝子の探索

両株の全ゲノム配列を HiSeqX シーケンサーを用いて決定し、新奇構造体に係わる遺伝子及び殻形態の違いを生み出す遺伝的因子を探索した。

4. 研究成果

(1) 新奇シリカ構造体の形態とその形成過程について。

走査電子顕微鏡の観察から、構造体 (以下プレートと呼ぶ) の形態が明らかになった。構造体は、*Hydrosera* の3分類群のいずれにも見られ、円盤状、鱗片状のプレートであり、その縁は細かなフリンジ状となる。幾つものプレートによって殻内面がほとん

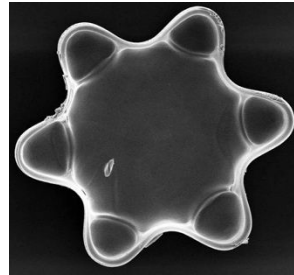


図1. *Hydrosera* の内面観

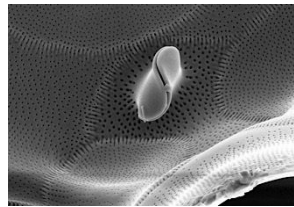


図2. 唇状突起の周辺部

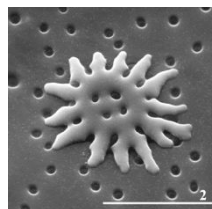


図3. 形成初期の円盤

状のプレート

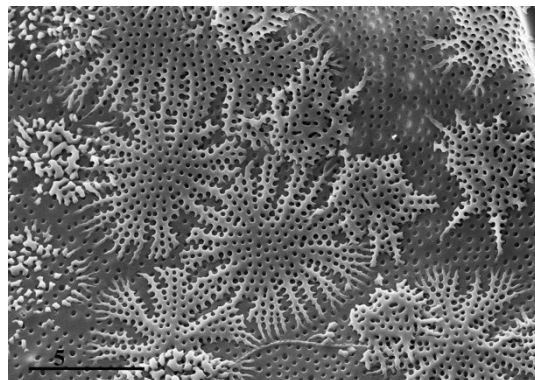


図4. 様々な形成段階の大きさの異なるプレート

ど被われていた。そのため、均質的な内面観となり、プレートの存在が不明瞭となる (図1)。しかし、唇状突起の周辺部分を見ると、プレートの縁取りのフリンジが明瞭となり、多数のプレートが存在していることが分かる (図2)。このプレートには、小さな孔が多数有り、放射状に配列する傾向が見られた。孔のサイズは、殻の胞紋に比べ細かい。また、プレートの大きさは一定ではなかった。様々な大きさのプレートを観察した結果、プレート形成の初期段階では数ミクロンの小さな円盤状であり、増大胞子の鱗片とよく似ている (図3)。しかし、成長すると複数

も見られ、円盤状、鱗片状のプレートであり、その縁は細かなフリンジ状となる。幾つものプレートによって殻内面がほとん

ど被われていた。そのため、均質的な内面観となり、プレートの存在が不明瞭となる (図1)。しかし、唇状突起の周辺部分を見ると、プレートの縁取りのフリンジが明瞭となり、

多数のプレートが存在していることが分かる (図2)。このプレートには、小さな孔が多数有り、放射状に配列する傾向が見られた。孔のサイズは、殻の胞紋に比べ細かい。また、プレートの大きさは一定ではなかった。様々な大きさのプレートを観察した結果、プレート形成の初期段階では数ミクロンの小さな円盤状であり、増大胞子の鱗片とよく似ている (図3)。しかし、成長すると複数

このプレートは1層ではなく、しばしば2層、3層と重なる。

次に、これらのプレートが細胞のどこでどのように作られるのかを、細胞の超薄切片を

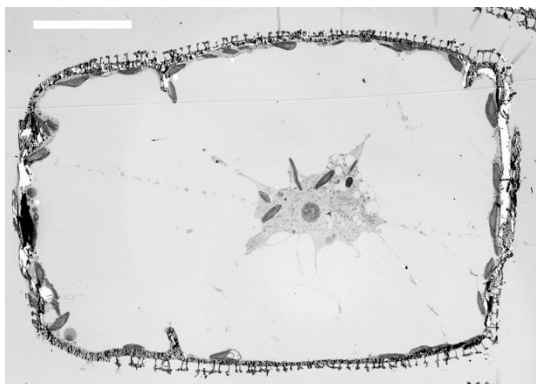


図5. *Hydrosera* 細胞の横断切片(全体)

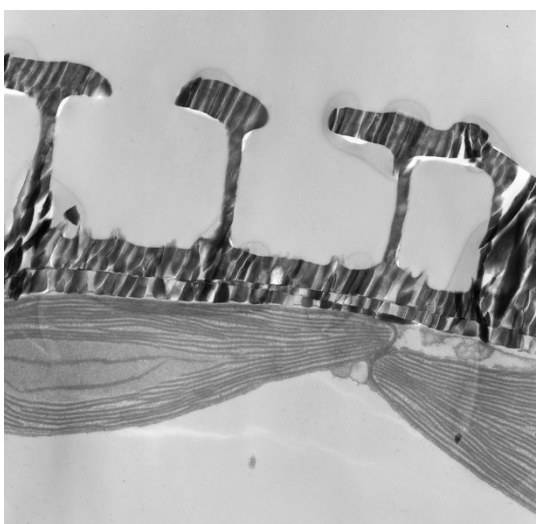


図6. 殻とその直下のプレートの拡大。2枚のプレートの重なりが見られる。

作り、透過顕微鏡を用いて観察した(図5、6)。切片の観察から、プレートはかなりの厚さを持ち、殻より厚い部分も見られた。細胞

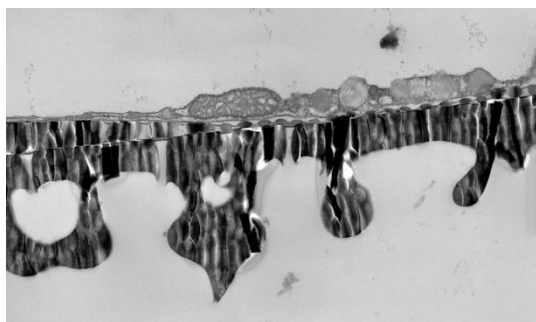


図7. スケール形成中の小胞。その先端部に顆粒状のシリカの沈着と小胞膜が見られる。

膜直下に作られた囊状の小胞(シリカレンマと相同と思われる)に顆粒状のシリカが沈着し、それらが互いに融合することでプレートが徐々に大きく成長すると考えられる(図7)。おそらく、最初に作られたリングから放射状に伸びる細い肋が作られ、それらが遠心的に伸びると同時に、肋と肋をつなぐ横肋が形成され、結果として放射状に小孔が配列する円盤

状のプレート、すなわち新奇シリカ構造体が形成されると考えられる。これらのプレートは、主に殻面部の細胞膜の直下で形成され、完成したプレートは次々と細胞外被となる。そのため、数枚のプレートが重なるように殻内面を被うことになると考えられる。また、プレートを形成していたシリカレンマが、発達の途中で別のシリカレンマと融合することで、本来円盤状となるプレートが、大きく不定形の形状となると考えられる。新奇シリカ構造体は、*Hydrosera* 属珪藻の栄養細胞にのみ見られるが、形態的には他の珪藻に見られる増大胞子の鱗片と非常に類似している。今回の観察から、プレートも鱗片も同様な形成様式であることが明らかになった。これは、鱗片状の構造体を作る遺伝的能力は多くの珪藻に共通しており、有性生殖時のみ発現するが、*Hydrosera* では栄養細胞でもその能力が発現している。あくまでも仮説に過ぎないが、その理由として、特殊な生育環境が考えられる。*Hydrosera* は、他の珪藻とは異なり、水中ではなく、乾燥し易い場所、例えば川岸のアシ植物の根元付近や僅か濡れた岩の表面などに生育する紅藻に附着して生育している。このような場所は、降雨量の少ない時期はしばらくの間完全に水がなくなり、珪藻の生育環境としては決して良好ではなく、むしろ過酷な環境下となる。このような環境に耐え生き残るために、殻の下にプレートを形成し、水分の放出を抑えることで、乾燥しやすい環境に適応していると考えられる。こうした環境への適応のため、他の珪藻では既に発現しなくなった鱗片形成の遺伝子が、栄養細胞でも発現している可能性が考えられる。この問題については、今後更なる研究が必要であるが、新奇シリカ構造体の形態と形成過程についてはほぼ明らかにすることができた。

(2) 新奇構造体の形成に係わる遺伝的子の探索について。

33-06 株および AH-10 株を主な材料とし、両株の全ゲノム配列を HiSeqX シーケンサー

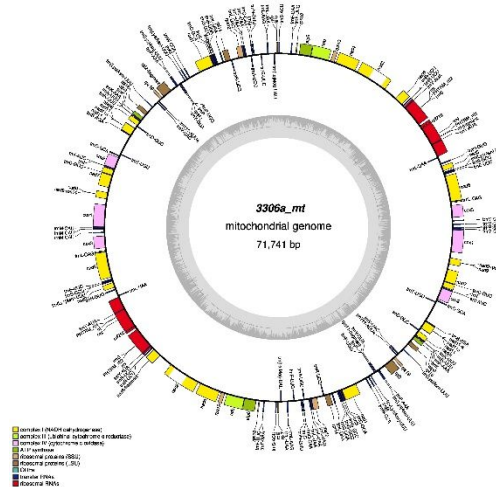


図8. 完全長ミトコンドリアゲノム

を用いて決定し、細胞壁形態の違いを生み出す遺伝的因子を探索した。現在までに葉緑体およびミトコンドリアゲノムの全長配列を決定することができ、それらのサイズは

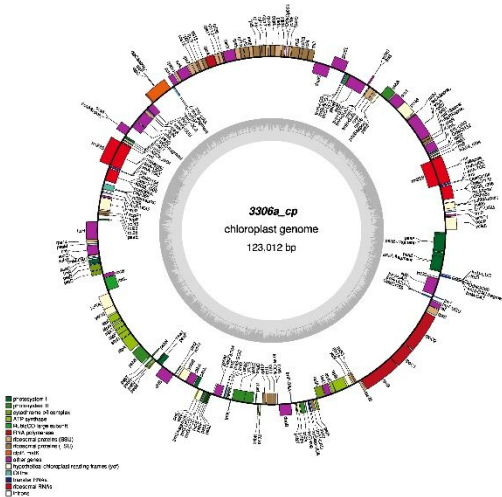


図 9. 完全長葉緑体ゲノム

33-06 株と AH-10 株でほぼ同一であった (図 8、9)。

これらの株間における配列相同性は非常に高く、両株が形態や分類学的な扱いは異なっているものの、ゲノムの類似度という観点から

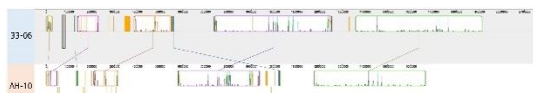


図 10. 33-06 株と AH-10 株の比較ゲノム解析の結果、両者で配列の違いが大きい可変領域、部分的に相同な箇所がみられる。

らみると同種として扱うべきであることを示唆している。核ゲノムは 33-06 株と AH-10 株でそれぞれトータルサイズ 262 Mb、と 18.0 Mb、スキヤフォールドは 688 本と 257 本であった。また核ゲノム中に、他の珪藻には見出されないが両株間では保存されている領域を見出した (図 10)。ただし、本領域中における高い相同性は相互ブラストベストヒットにより確認されたものの、その内部には保存性の低い領域も点在していた。両株から得たトランスクリプトーム情報も使い、本領域

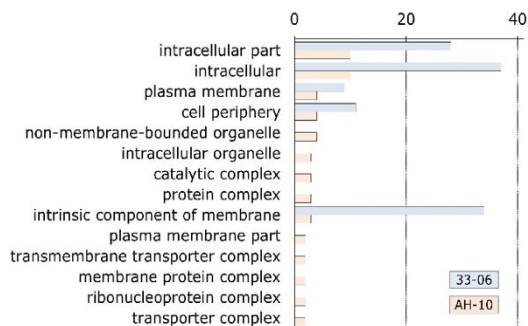


図 11. 両株の可変領域中にコードされている遺伝子の GO term (Cellular Component)

にコードされている遺伝子を Augustus により検索した。リストアップされた遺伝子は全体的にトランスクリプトームのマッピング率が低かったものの、これらが細胞壁形態の違いを生み出している可能性は十分にある (図 11)。現在、本領域を対象とし更なる配列解析を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 4 件)

Idei M, Sato S, Nagumo T & Mann DG (2018) Valve morphogenesis in *Diploneis smithii* (Bacillariophyta). *Journal of Phycology*. 54: 171-186.

Carbelleira R, Trobajo R, Leira M, Benito X, Sato S & Mann DG (2017) A combined morphological and molecular approach to *Nitzschia varelae* sp. nov., with discussion of symmetry in Bacillariaceae. *European Journal of Phycology* 52: 342-359.

Li CL, Ashworth MP, Witkowski A, Dąbek P, Medlin LK, Kooistra WHCF, Sato S, Zgłobicka I, Kurzydłowski KJ, Theriot EC, S. M. Sabir JSM, Khiyami MA, Mutwakil MHZ, Sabir MJ, Alharbi NS, Hajarrah NH, Qing S, Jansen RK (2015) New Insights into Plagiogrammaceae (Bacillariophyta) based on multigene phylogenies and morphological characteristics with the description of a new genus and three new species. *PLoS ONE* 10: e0139300.

Rovira R, Trobajo R, Sato S, Ibáñez C & DG Mann (2015) Genetic and physiological diversity in the diatom *Nitzschia inconspicua*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 62: 815-832.

(学会発表)(計 16 件)

Trobajo R, Mann D. G., Li C, Sato S, Rimet F, Rovira L, Witkowski A (2017) A four-gene approach to the Bacillariaceae: establishing a framework for classifying a highly diverse and taxonomically difficult diatom group. 11th International Phycological Congress. Szczecin, Poland. 13-19th August.

Nakamura N, Sato S (2017) Comparison of genome between opposite mating types of *Pseudostaurosira trainorii*. 11th International Phycological Congress. Szczecin, Poland. 13-19th August.

Sato S, Toyoda K, Osada K, Idei M (2017) Whole genome sequencing of two closely related but morphologically distinct clones of centric diatom *Hydrosera*. 11th

International Phycological Congress. Szczecin, Poland. 13-19th August.

Yamada K, Yamazaki M, Sato S, Yoshikawa S, Kuwata A, Ichinomiya M (2017) Silicified bolidophytes (Parmales, Bolidophyceae) is not monophyly as evidenced by the phylogenetic characterization of *Triparma retinervis*. 11th International Phycological Congress. Szczecin, Poland. 13-19th August.

Yoshikawa S, Sato S, Yamazaki M, Yamada K, Ichinomiya M, Saitoh K, Nakamura Y, Sato N, Kuwata A (2017) Morphological and transcriptome analysis in cell wall formation of *Triparma laevis*. The 73rd Fujihara Seminar "Molecular Life of Diatoms". Kobe, Japan. 9-13 July.

Sato S, Toyoda K, Osada K, Idei M (2017) Comparative genomics in two closely related but morphologically distinct clones of centric diatom *Hydrosera*. The 73rd Fujihara Seminar "Molecular Life of Diatoms". Kobe, Japan. 9-13 July.

Nakamura N, Sato S (2017) Comparison of organellar genome between opposite mating types of *Pseudostaurosira trainorii*. The 73rd Fujihara Seminar "Molecular Life of Diatoms". Kobe, Japan. 9-13 July.

Idei M, Osada K, Sato S, Nagumo T, David DG (2016) Valve morphogenesis in a multipolar diatom genus *Hydrosera*. International Diatom Symposium. Quebec, Canada. 21st-26th August.

Nakamura N, Sato S, Julius ML, Maeda Y, Tanaka T, Fujimoto K, Mayama S (2016) Variation in morphological characters of diatopem in relation to valve ultrastructure. International Diatom Symposium. Quebec, Canada. 21st-26th August.

Rovira L, Trobajo R, Sato S, Kelly M, Ibañez C, Krokowski J, Mann DG (2016) Genetic, morphological, and ecophysiological diversity in *Nitzschia inconspicua* (Bacillariophyta) and implications for ecological assessment of waterbodies. British Phycological Society Annual Meeting, Bournemouth, UK. 2nd-4th June

Idei M, Osada K, Sato S, Nagumo T, David DG (2015) Valve and scale-like plate morphogenesis in a multipolar diatom *Hydrosera*. 6th European Phycological Congress, London UK. 23-28 August.

中村憲章、磯野弘之、佐藤晋也 (2017) *Pseudostaurosira trainorii* におけるオルガネラの遺伝様式の解明. 日本珪藻学会第 37 回研究集会. 三方青年の家. 福井.

中村憲章、真山茂樹、佐藤晋也 (2017) 汽水産珪藻 *Pseudostaurosira* の被殻を裏打ち

する有機層の構造的、生化学的特徴. 日本藻類学会第 41 回大会. 高知大.

佐藤晋也、高尾祥丈 (2015) ストレスによる珪藻の生殖誘導と細菌との関わり. 第二回分子珪藻研究会. 関西学院大学大阪梅田キャンパス. 大阪.

佐藤晋也 (2015) 細菌と珪藻生殖. 日本珪藻学会第 35 回研究集会. 日光交流促進センター. 栃木.

出井雅彦、長田敬五、佐藤晋也、南雲保 (2015) *Hydrosera* 属の殻内面を被う新奇鱗片状プレートについて. 日本珪藻学会第 35 回研究集会. 日光交流促進センター. 栃木.

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出井 雅彦 (Masahiko, Idei)
文教大学・教育学部・教授
研究者番号: 60143624

(2) 研究分担者

長田 敬五 (Keikgo, Osada)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授
研究者番号: 10147829

(3) 研究分担者

佐藤 晋也 (Shinya, Sato)
福井県立大学・海洋生物資源学部・講師
研究者番号: 80709163