

平成21年 5月29日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2005-2008

課題番号：17370009

研究課題名（和文） クロロフィル *d* の分布と *Acaryochloris* の微生物生態学的解析研究課題名（英文） Studies on the distribution of chlorophyll *d* and the microbial ecology of *Acaryochloris* spp.

研究代表者

宮下 英明 (MIYASHITA HIDEAKI)

京都大学・大学院人間・環境学研究科・准教授

研究者番号：50323746

研究成果の概要：

本研究では、クロロフィル *d* を有する唯一のシアノバクテリア *Acaryochloris* spp. が、海藻などへの付着生物、あるいは浮遊生物として世界中の海洋沿岸に広範に分布すること、2種程度に分けることのできる遺伝的多様性をもつこと、地理的な遺伝的分化がみられないことなどを明らかにした。さらに、海洋沿岸環境ではクロロフィル *d* の量が、クロロフィル *a* の量に対して平均1%前後存在し一次生産に一定の寄与をしていることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	6,400,000	0	6,400,000
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
総計	10,100,000	750,000	10,850,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生態・環境

キーワード：クロロフィル *d*, *Acaryochloris*, PCR-DGGE, 分布, 多様性, 微生物生態

1. 研究開始当初の背景

本研究は、クロロフィル *d* (以降 Chl *d* と略記) を利用して酸素発生型の光合成をおこなうシアノバクテリア *Acaryochloris* spp. (以降 *Acaryochloris* と略記) の微生物生態学的特性を明らかにする研究である。*Acaryochloris marina* は、研究代表者が世界に先駆け発見した Chl *d* を主要光合成色素とするシアノバクテリアである (Nature 1996)。*A. marina* が熱帯海域であるパラオ諸島沿岸に棲息する群体ホヤ体腔の共生生物として分離されたことから、

その分布は限られていると考えられてきた。しかし我々は最近、淡路島沿岸で採取した紅藻の色素研究から、紅藻から検出される Chl *d* の真の生産者が、紅藻自体でなく紅藻に付着する *Acaryochloris* 属のシアノバクテリアであることを突き止めた (Science 2004)。Chl *d* がさまざまな大型紅藻類に不安定に検出される第二の緑色色素であると報告されてきた歴史的経緯から、*Acaryochloris* が紅藻類の着生生物として世界の沿岸域に広く分布していることが容易に類推できる。本研究は、*Acaryochloris*

の分布と生物量を明らかにするとともに、大型紅藻類との共生関係、Chl *d* を利用していることの生態学的意義を解明することを目的とする。さらに *A. marina* が Chl *d* を利用することにより 700 - 750 nm 付近の近赤外光も効率的に使うことのできる光合成機構を獲得していることから、*Acaryochloris* の分布と生物量および光変換効率の解明により、これまで無視されてきた一次生産量（近赤外光に依存した酸素発生型光合成量）を見積もることが可能になる。これらの結果は、自然環境における一次生産の見積りに常識的に用いられてきた光合成有効放射（PAR; photosynthetically active radiation）の概念にあらたな考察を加えることになるものと期待される。

2. 研究の目的

本研究計画では、Chl *d* を利用する唯一の酸素発生型光合成生物 *Acaryochloris* spp.（シアノバクテリア）の微生物生態学的解析を目的に以下のことを明らかにする。

- (1) どのような環境にどの程度の量が分布しているのか。
- (2) どのような状態で、他の生物とどのような関係をもって存在しているのか。
- (3) Chl *d* を利用していることの生態学的意義は何か。

3. 研究の方法

(1) サンプルの採取

海藻については、日本沿岸（図1）から採取した。



図1 海藻の採取ポイント

甲殻類や付着動物などを取り除いた後、実験に用いるまで -20°C で冷凍保存した。各海藻の同定は「日本の海藻」（千原光雄監修、学習研究社）および「神戸の海藻」（川井浩史

著、財団法人神戸市体育協会）を用いた。また、群体ホヤについては、パラオ共和国ならびに沖縄本島において採取し、エタノールに浸漬し、冷蔵庫に保管した。各群体ホヤおよびカイメンの同定には「*Prochloron* -A microbial Enigma-」（Ralph A. Lewin and Lanna Cheng, Chapman and Hall, New York, 1989）および「Tropical Pacific Invertebrates」（Patrick L. Coline and Charles Arneson, Coral Reef Press, California, 1995）を用いた。

(2) DNA の抽出

各海藻を乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で粉砕し、cell lysis buffer（100 mM Tris-HCl（pH 8.0）、50 mM EDTA、500 mM NaCl、1% CTAB）と 10% SDS 水溶液を加えて懸濁し、 80°C で5分間加熱した。チューブを 50°C のヒートブロックに移した後、プロテイナーゼ K 水溶液と 10 M 酢酸カリウム水溶液を加えて混ぜながら1時間加熱した。クロロホルム-イソアミルアルコール（24:1）を加えてよく混ぜ、氷上に20分間置いた後、 $16,000\times g$ で15分間遠心した。上清を新しいチューブに取り、フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール（25:24:1）を加えて1回、クロロホルム-イソアミルアルコール（24:1）で2回抽出操作を行った。遠心分離後回収した水相に6 M 酢酸アンモニウムを加えて氷上に30分間置き遠心分離した後、上清を新しいチューブに回収し、イソプロパノール沈殿によってDNAを回収し、70%エタノールで洗浄後、風乾して、TE バッファーに溶かした。

エタノール中に浸漬していた群体ホヤおよびカイメンについては、断片を真空デシケーター中で減圧乾燥させた後、乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で粉砕した。この粉末を用いて、上記の方法に従ってDNAを得た。

(3) 特異的プライマーによる PCR

既知の *Acaryochloris* 分離株の 16S rRNA 配列の V1 領域に特徴的に見られる配列を標的として、*Acaryochloris* 特異的プライマー AcaryoSPF（5' -AGGAGCTTGCTCCTTGGTGG-3'）を作製した。リバースプライマーとして CYA781Rb（5' -GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT-3'）を用いることによって、*Acaryochloris* の 16S rRNA 遺伝子に由来する約 700 bp の DNA 断片を選択的に増幅した。PCR 反応補助試薬として、Ampdirect[®]-D および AmpAddition-3（Shimadzu Biotech、日本）を加え、タッチダウン PCR 法で行った。

(4) PCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (PCR-DGGE)

プライマーセット AcaryoSPF/CYA781Rb を用いて得られた PCR 産物が、DGGE 解析には大

きいため、これを鋳型にして、GC クランプ付きのプライマー GC-BAC341F (5' -CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCACGGGGG-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') および CYA781Rb をプライマーとして nest PCR を行った。この PCR サンプルについて DGGE 解析を行った。DGGE は DCode™ Universal Mutation Detection System (BioRad, USA) を用いた。

(5) シーケンスと分子系統解析

DGGE で検出されたバンドを、ゲルから切り出して精製後、同じプライマーを用いて PCR 増幅した後、これを鋳型として、シーケンス反応を行い ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) を用いて解析した。得られたデータから NCBI (National Center for Biotechnology Information) の BLAST によって最も相同性の高い配列を持つ生物種を検索するとともに、*Acaryochloris* spp. に由来するバンドの塩基配列については、clustalX を用いて他のシアノバクテリアの配列とアライメントし、近隣接合法 (NJ 法) を用いて系統樹を作成した

(6) HPLC による色素分析

色素分析には、メタノール単相系による方法と、新たに開発した Ch1 *b* と Ch1 *d* の分離が可能な混合溶媒系による方法を併用した。メタノール単相系では、凍結乾燥した海藻を液体窒素中で粉末状になるまで破碎し、これにメタノールを加えて光合成色素を抽出し、抽出後速やかに HPLC による解析を行った。固定相に C18 カラム (Chemco Nucleosil 5C18 (150×4.6 mm))、移動相にメタノールを用いて Ch1 *a*, Ch1 *b*, Ch1 *d* を分離した。色素の検出・定量にはフォトダイオードアレイ検出器を用いた。Ch1 *b* と *d* は溶出時間が等しいため、両色素を含むピークにおける波長 652 nm と 696 nm の吸光度 (S_{652} , S_{696}) を用いて以下の式で Ch1 *d* 量を算出した。

$$[\text{Ch1 } d] (\mu\text{g/mL}) = -0.00031 \times S_{652} + 0.013 \times S_{696}$$

混合溶媒系では、固定相には C18 カラム (Waters Spherisorb ODS2 (150×4.6 mm)) を、移動相にはアセトニトリル/アセトン/水 (83:10:7) の混合溶媒を用いた。フォトダイオードアレイ検出器と蛍光検出器によって検量線を作成し、Ch1 *a* および Ch1 *d* の量を算出した。

4. 研究成果

(1) 海藻等に付着する *Acaryochloris* の検出

本研究によって開発した海藻からの効率的な DNA の抽出法 (方法参照) を用いて、付着生物を含め海藻から DNA 抽出した。プライマーセット AcaryoSPF/CYA781Rb によって *Acaryochloris* の 16S rDNA 遺伝子のみを増幅した後、プライマーセット GC-BAC341F/

CYA781Rb によって nestPCR の後、DGGE したものの結果を図 2 に示した。その結果、1) *Acaryochloris* は、室蘭から鹿児島までにおいて採取をおこなったすべての地点から検出された、2) 紅藻類に限らず、緑藻類、褐藻類を含む、すべての藻類から検出された、3) さらには潮間帯域の砂や石の付着生物、海水から抽出した DNA 中にも検出された、4) いずれのサンプルにおいても、2-5 のバンドが検出された。これらの結果から、*Acaryochloris* は、海藻の葉上生物として、また、単なる付着生物として様々な基質に付着し、日本沿岸に広く分布していることが示された。

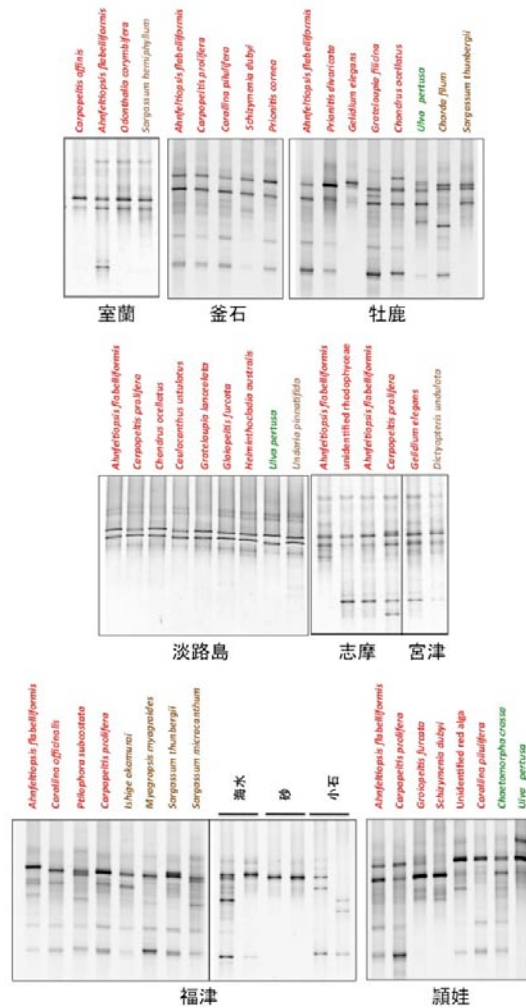


図 2 海藻の *Acaryochloris* の検出

各レーンには海藻名 (学名) を示した。学名の色はそれぞれ紅藻 (赤), 緑藻 (緑), 褐藻 (茶) であることを示す。バンドの数は、異なる遺伝子型をもつ *Acaryochloris* が存在していることを示している。

(2) 群体ホヤに検出される *Acaryochloris* の多様性

プライマーセット AcaryoSPF/CYA781Rb を用いて 16S rDNA 遺伝子の一部を PCR により増幅した。増幅された DNA 断片を精製し、シアノバクテリア特異的プライマーセット

GC-BAC341F/CYA781Rb を用いた nestPCR によって再増幅した後、DGGE によって分離した結果を図 3 に示した。どの個体の群体ホヤからも 2 つ以上の異なる遺伝子型が検出された。また、それらの構成はホヤの種によって異なっていた。これらのことから、パラオ沿岸の群体ホヤに分布する *Acaryochloris* にも複数の遺伝子型が存在することがわかった。これまでパラオで分離された株は全て同一の遺伝子型であったことから、検出されたバンドの由来となっている *Acaryochloris* はほとんど未培養であることがわかった。また、同じ遺伝子型が属あるいは種の異なる複数の群体ホヤ個体から検出されたことから、宿主に対する特異性はないと考えられた。したがって、*Acaryochloris* と群体ホヤとは特別な共生関係をもたずに、むしろ、*Acaryochloris* が様々な基質に対して付着あるいは寄宿する性質をもった生物であることが示された。

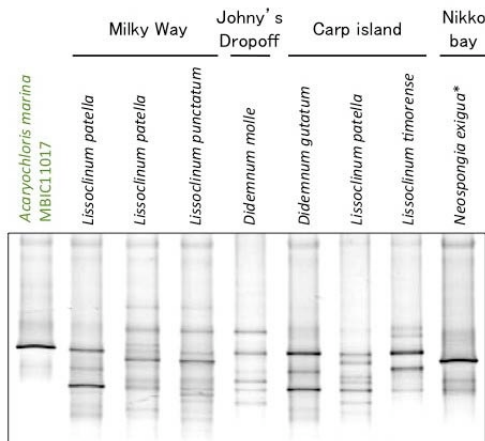


図 3 群体ホヤの *Acaryochloris* spp. の検出
各レーンにはホヤ名(学名)を、その上には採取場所を示した。ただし、一番左のレーンは *Acaryochloris marina* の培養細胞、一番右のレーンは、ホヤでなくカイメンを解析したものである。バンドの数は、異なる遺伝子型をもつ *Acaryochloris* が存在していることを示している。

(3) *Acaryochloris* の遺伝的多様性

海藻ならびに群体ホヤの *Acaryochloris* 検出によって得られた DGGE バンドの塩基配列を決定し、既知の配列とともに系統解析をおこなった結果を図 4 に示した。海藻から検出された 14 遺伝子型、パラオの群体ホヤから検出された 14 遺伝子型について分子系統解析したところ、2 つのクレードに分かれ、その遺伝的距離から少なくともこの 2 つのクレードが種レベルで異なる生物群であることが示唆された。また地理的隔離や宿主(海藻、群体ホヤ、自由生活など)の違いを反映した系統関係は見られないことから、*Acaryochloris* が他の生物あるいは環境と特別な関係をもっているとは考えにくい結果であった。

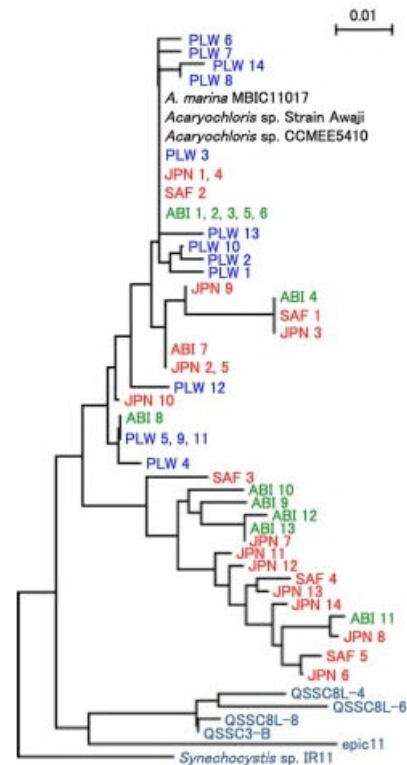


図 4 検出されたバンドの分子系統関係
黒文字は分離株、赤文字は海藻、青文字は群体ホヤ、緑文字は小石、砂、海水などからそれぞれ検出された配列を示す。

(4) Chl *d* の定量

環境中の光合成色素を分離するために知られている一般的な HPLC の条件では Chl *b* と *d* の保持時間がほぼ一致しており、Chl *d* の正確な定量が困難であった。

そこで、Chl *b* と *d* を分離するための条件検討をしたところ、固定相に C18 カラムを、移動相にアセトニトリル/アセトン/水の混合溶媒を用いた系によって、両色素を分離することが可能となった(図 5)。

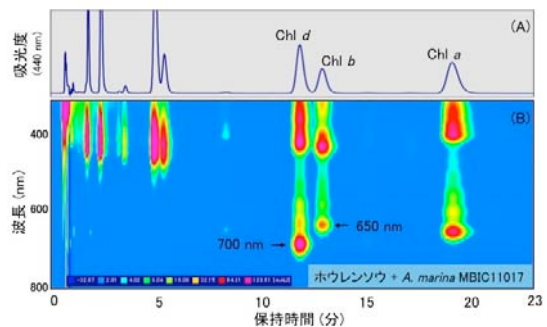


図 5 複合溶媒系によるクロマトグラム

さらに、蛍光検出器を用いることで Chl *b* 混在下においても微量の Chl *d* を検出する事が可能となった。この方法を用いて日本沿岸(釜石、牡鹿、福津、颯娃)で採取した海藻について Chl *d* の定量を行い、Chl *a* 量に対

する Chl *d* 量を算出した。その結果を図 6 に示した。

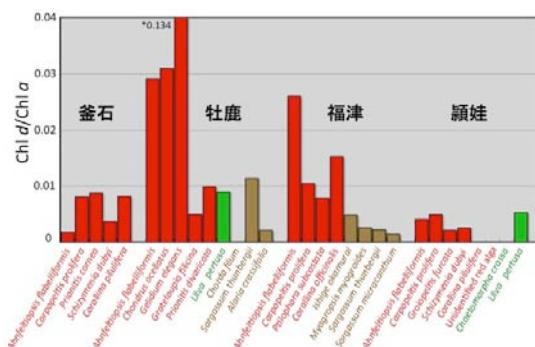


図 6 海藻における Chl *d* / Chl *a* の量比
各カラムの下には海藻名 (学名) を示した。学名の色はそれぞれ紅藻 (赤), 緑藻 (緑), 褐藻 (茶) であることを示す。

海藻に検出される Chl *d* の量は Chl *a* に対して平均で約 1% 程度であることが明らかとなった。ただし、採取の場所や時期によって大きく変動する可能性が否定できないことから今後のさらなる検討が必要である。また、日本沿岸ならびに、北極海、ベーリング海海底の底泥表層にも、Chl *a* に対して約 1% 程度の Chl *d* が検出され、Chl *d* を含む生物が海洋に広く存在し、一次生産に対する一定量の寄与をしている可能性が示された。

表 1 海底泥コア表層のクロロフィル組成

	濃度 (ppm)				([Chl <i>d</i>] + [Phe <i>d</i>]) / ([Chl <i>a</i>] + [Phe <i>a</i>]) (%)
	Chl <i>a</i>	Phe <i>a</i>	Chl <i>d</i>	Phe <i>d</i>	
北極海	160	58	0.44	0.22	0.3
ベーリング海	120	71	0.44	0.65	0.6
内浦湾	0.25	2.6	0	0.096	3.5
大槌湾	5.2	3.6	0.098	0.051	1.7
東京湾	110	280	1.6	2	1
相模湾	17	92	0	1.1	1

(5) 研究成果の国内外の位置づけとインパクト

本研究は、PCR-DGGE 法を用いることによって、これまで未知であった Chl *d* をもつ唯一の生物である *Acaryochloris* の分布と多様性を明らかにした極めて独創的な研究成果である。また、海藻や沿岸底泥表層の Chl *d* 量の測定から一次生産への一定量の寄与が推察されたことについては、著名な科学雑誌 *Science* にも掲載され、国際的にも高く評価できる研究成果であるといえる。

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 7 件)

1. Ohashi, S., Miyashita, H., Okada, N., Iemura, T., Watanabe, T., & Kobayashi, M. nique photosystems in *Acaryochloris marina*, *Photosynth Res.*, 98:141-149 (2008) 査読有

2. Kashiya, Y., Miyashita, H., Ohkubo, S., Ogawa, N. O., Chikaraishi, Y., Takano, Y., Suga, H., Toyohuku, T., Nomaki, H., Kitazato, H., Nagata, T., & Ohkouchi, N. Evidence for global Chlorophyll *d*, *Science* 321, 658 (2008) 査読有

3. Swingle, W. D., Chen, M., Cheung, P. C., Conrad, A. L., Dejesa, L. C., Hao, J., Honchak, B. M., Karbach, L. E., Kurdoglu, A., Lahiri, S., Mastrian, S. D., Miyashita, H., Page, L., Ramakrishna, P., Satoh, S., Sattley, W. M., Shimada, Y., Taylor, H. L., Tomo, T., Tsuchiya, T., Wang, Z. T., Raymond, J., Mimuro, M., Blankenship, R. E., & Touchman, J. W. (2008) Niche adaptation and genome expansion in the chlorophyll *d*-producing cyanobacterium *Acaryochloris marina*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:2005-2010 (2008) 査読有

4. Ohkubo, S., Miyashita, H., Murakami, A., Takeyama, H., Tsuchiya, T., Mimuro, M., Molecular detection of epiphytic *Acaryochloris* spp. on marine macroalgae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72. 7912-7915. (2006) 査読有

5. 宮下英明. シアノバクテリアに見られるクロロフィルの多様性、『遺伝』、6 巻 6 号、33-39、エヌ・ティー・エス (2006) 査読無

6. Miyashita, H., Ohkubo, S., Naganuma, T., Imura S., Detection of cyanobacteria in Antarctic samples using PCR-DGGE、Proceedings of the Seminar on Antarctic Research in the University of Malaya, (2005) 査読無

7. 宮下英明. クロロフィル *d* を使うシアノバクテリア *Acaryochloris* の光合成と系統発生過程の推定 光合成研究会会報、44 号 (2005) 査読無

[学会発表] (計 18 件)

1. Miyashita, H., Ohkubo, S., Kashiya, Y. & Ohkouchi, N. Possible impacts of

chlorophyll *d* on global carbon cycle, 8th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, 2008.11.15, Busan, Korea.

2. Ohkubo, S. & Miyashita, H. Ecological distribution of *Acaryochloris* spp. and chlorophyll *d*, 12th International Symposium on Microbial Ecology, 2008. 8. 17, Cairns, Australia

3. 大久保智司, 宮下英明. 海藻から抽出されるクロロフィル *d* の検出と定量, 第 11 回マリンバイオテクノロジー学会, 2008. 5. 24, 京都大学

4. 大久保智司, 宮下英明. 海藻に検出されるクロロフィル *d* の定量. 日本藻類学会第 3 2 回大会. 2008. 3. 23. 東京海洋大学

5. 大久保智司, 宮下英明, 土屋徹, 三室守. クロロフィル *d* を主要色素とするシアノバクテリア *Acaryochloris* spp. の分布と遺伝的多様性. 第 27 回微生物系統分類研究会年次大会. 2007. 11. 16. 地方職員共催組合 富士保養所 富士桜荘

6. 大久保智司, 宮下英明, 土屋徹, 三室守. *Acaryochloris* spp. の分布. 第 23 回日本微生物生態学会. 2007. 9. 16. 愛媛大学

7. Miyashita, H., Ohkubo, S., Tsuchiya, T, & Mimuro, M. Wide dsitribution of *Acaryochloris* spp., chlorophyll *d*-dominating cyanobacteria, 21st Pacific Science Congress (PSC21), 2007.6.14, Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan

8. 大久保智司, 宮下英明, 土屋徹, 三室守. *Acaryochloris* spp. の地理分布と生態分布. 日本藻類学会第 31 回大会. 2007. 3. 25. 神戸大学

9. 宮下英明. シアノバクテリアの多様化. 大阪大学蛋白質研究所セミナー (共催: 日本光合成研究会第 6 回ワークショップ). 2006. 10. 12. 大阪大学

10. 大久保智司, 宮下英明, 竹山春子, 三室守. 群体ホヤに検出される *Acaryochloris* spp. の遺伝的多様性. 日本藻類学会第 30 回大会. 2006. 3. 27. 鹿児島大学

11. 大久保 智司, 宮下 英明, 村上 明男, 土屋 徹, 竹山 春子, 三室 守. 日本沿岸に生息する *Acaryochloris* spp. の分布と遺伝的多様性. 第 12 回 日本光生物学協会年会. 2005. 8. 6. 京都大学

12. 大久保智司, 宮下英明, 土屋 徹, 竹山 春子, 三室 守. PCR-DGGE 法を用いた *Acaryochloris* spp. の分布と遺伝的多様性の解析. かずさ DNA 研究所研究会「ラン藻の分子生物学」. 2005. 12. 5. 木更津かずさアカデミアホール

13. 宮下英明. シアノバクテリアの多様性と不思議. かずさ DNA 研究所研究会「ラン藻の分子生物学」. 2005. 12. 5. 木更津かずさアカデミアホール

14. 宮下 英明, 細谷 直史, 土屋 徹, 三室 守. *Acaryochloris* spp. の光化学系 I 反応中心タンパク質の進化速度は速い. 第 21 回日本微生物生態学会. 2005. 11. 2. 福岡国際会議場

15. 大久保 智司, 宮下 英明, 土屋 徹, 竹山 春子, 三室 守. Palau の群体ホヤから検出される *Acaryochloris* spp. の遺伝的多様性. 第 21 回日本微生物生態学会. 2005. 10. 31. 福岡国際会議場

16. Miyashita, H., Ohkubo, S., Tsuchiya, T, & Mimuro, M. Wide distribution of epiphytic *Acaryochloris* on red macroalgae, The 8th International Phycological Congress, 2005. 8. 16. Durban, South Africa

18. 小泉創, 細田定正, 宮下英明, 三室守, 白岩善博, 山下俊, 小林正美. パパインによるクロロフィル *a* → クロロフィル *d* 変換の発見 - *Acaryochloris marina* での Chl *d* 生合成との関連. 第 8 回マリンバイオテクノロジー学会大会. 2005. 5. 29. 熊本大学

〔その他〕

平成 19 年 8 月 1 日新聞掲載

(朝日新聞、フジサンケイビジネスアイ、日経産業新聞、日刊工業新聞、化学工業日報、京都新聞)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下 英明 (MIYASHITA HIDEAKI)

京都大学・大学院人間・環境学研究所・准教授

研究者番号: 5 0 3 2 3 7 4 6