

平成 21年 5月 5日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間： 2006～2008  
 課題番号：18570082  
 研究課題名 (和文) 極限的環境に生育する珪藻種の形態・分子および物質レベルにおける分類学的研究  
 研究課題名 (英文) Morphological, molecular and substance based taxonomy of diatom species living in extreme environment.  
 研究代表者  
 真山 茂樹 (MAYAMA SHIGEKI)  
 東京学芸大学・教育学部・准教授  
 研究者番号：40199914

研究成果の概要:主に強酸性水域に生育する *Pinnularia acidojaponica* を19地点から採取し、分子配列に基づく同一種性を解析した。いずれの個体群もわずかに異なる形態を示すものであった。個体群間に認められた塩基置換の総数はSSU rDNA, rbcL, ITSともに0～7程度のもので、形態計測値に基づく主成分分析のクラスターと一致するものであった。しかし、置換数がより多いものは異なるクラスターとなった。また、*P. acidojaponica* の被殻より silaffin 様物質の抽出をおこなうことができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,200,000	0	2,200,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	420,000	4,020,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：珪藻、極限的環境、強酸性、系統、形態計測、多変量解析、殻形成、シラフィン

## 1. 研究開始当初の背景

珪藻は珪酸質でできた殻の形と模様によって分類がなされてきた。'80年代以降、電子顕微鏡による殻の詳細な観察に基づく分類が行われ、以前よりも正確な分類がなされるようになった。しかし、光学顕微鏡では殻の外形に、ある程度の相違が認められる個体群であっても、電子顕微鏡レベルでは有用な識別構造をもたない *Pinnularia* 属の種のようなものも、数多く存在する。有機質の柔らかな細胞外被をもつ他の単細胞性藻類と比べ、珪酸質の硬い細胞外被である“殻”をもつ珪藻で

は、認識しうる形の違いが多く生じていると考えられる。このため、珪藻の分類では形態の“小さな違い”の意味を正しく理解することが必要である。

## 2. 研究の目的

pH2以下の強酸性水域およびBOD 20mg・02・L-1以上の強腐水域に特異的に生育する羽状縦溝珪藻の *Pinnularia* 種を主たる材料とし、多数の産地から採集した個体群の分類学的位置の解明を下記の方法に基づいて行う。

(1) 形態：電子顕微鏡により殻の形態を詳細に

観察と共に、光学顕微鏡による計測により個体群間における形態の“小さな違い”を多変量解析により客観的に把握する。

(2)分子：複数の遺伝子種を用い、これら個体群間の分子系統を明らかにする。

(3)物質：珪酸化に関わりのある物質の個体群間での違いと、殻の形態の関係を明らかにするための、方法開発し解析をおこなう。

### 3. 研究の方法

#### (1)試料の採集

【北海道】川湯温泉、登別温泉、恵山温泉、【青森県】恐山、【秋田県】玉川温泉、蒸ノ湯、泥湯、【山形県】蔵王御釜、【宮城県】潟沼、【栃木県】那須湯本温泉、塩原温泉新湯【群馬県】草津温泉、万座温泉、【東京都】多摩川、【神奈川県】鶴見川、大湧谷温泉、【長野県】奥蓼科温泉、毒沢温泉、【富山県】立山地獄谷温泉、【鹿児島県】林田温泉、硫黄谷温泉、栗野岳温泉から珪藻を採集し、形態解析を行った。また、これらのうち、17群集は培養をおこない、分子解析に使用した。培養液は改変 BBM 培地を用い、硫酸にて pH を現地水と同じ値に調製した。さらに被殻のため、*Pinnularia ferroindulgentissima* のタイプスライド（アイオワ州炭田跡の池）をフィラデルフィア自然科学アカデミーから借用した。

#### (2)分子による系統解析

PCRによりDNAを増幅し、ダイレクトシーケンスによる塩基配列の決定をおこなった。用いた塩基配列はSSU rDNA、rbcLおよびITS-1~ITS-2領域であった。塩基配列は Applied Biosystems 3130にて解析した。Clustal Xにて多重整列をおこない、PAUPにて近隣結合法、最大節約法、最尤法を実施し分子系統樹の解析を行った。また、SSU rDNAの二次構造の決定には、The European Ribosomal RNA databank から得た *Bacillaria paxillifer* の 18S rRNA 二次構造モデルを基に行った。

#### (3)形態観察と計測

①試料を硫酸処理し、有機物を除去後、光学顕微鏡プレパラートを作成した。各個体群とも、光学顕微鏡で無作為に 200 個体を写真撮影した。写真より、殻長、殻幅、条線密度、くびれ幅、殻端幅、中心域長、無紋域面積、殻面積を計測した、また、これらの値より、殻幅殻長比、四角率、無紋率、くびれ率、頭率、中心域長率を求めた。また、これらのデータによる主成分分析を実施した。用いた解析ソフトは SPSS (SPSS 社) であった。

②硫酸処理した被殻を SEM 試料台に載せ、乾燥後、オスミウムコーターで蒸着をおこなった跡、HITACHI S4000 走査電子顕微鏡にて被殻微細構造の観察をおこなった。

#### (4)物質による解析

①*Pinnularia* の解析の前に、より培養方法が確立されている *Melosira varians* および *M. nummloides* を用いた実験を行った。しかし、これらの種類でも培養液中にゲルカルチャー（富士シリシア）を添加することで従来より効率よく細胞を収穫することができた。細胞は次亜塩素酸により前処理をおこない、ソニケーターで殻を破碎後、2%SDS/10mM EDTA で煮沸。遠心分離後、沈殿にアセトンを加え、さらに遠心分離、沈殿に 46%HF を加え 4°C で 1 時間処理。遠心分離後、上清をスペクトラ・ポア透析用 CE チューブ 500Da cut off を使用し 4°C で透析し、凍結乾燥した。

Tris-Tricine SDS-PAGE をおこない被殻抽出物質の存在を確認した。また、1M テトラメトキシシランと被殻抽出物質を加えることでシリカ沈殿形成反応をおこなった。

沈殿物の元素分析は JEOL5800 走査型電子顕微鏡に付けられた EDS によりおこなった。また、沈殿物の電子顕微鏡観察は沈殿試料を乾燥後、オスミウムコーティングを行い、HITACHI S5000 走査電子顕微鏡を用いて行った。

被殻抽出物質は HPLC にて逆相カラム CAPCELL PAK C18 UG120 (4.6i.d. × 250mm, SHISEIDO) を使用し、流速 1.0ml/min、カラム温度 35°C の条件で精製した。溶出溶媒は 0.5%diethylamine と 0.5%diethylamine CH<sub>3</sub>OH を用い、CH<sub>3</sub>OH 濃度を 10-100% (0-30min)、100% (30-50min) となるようにグラジエント溶出を行い、開始後 32 分まで 2 分ごとに分取した

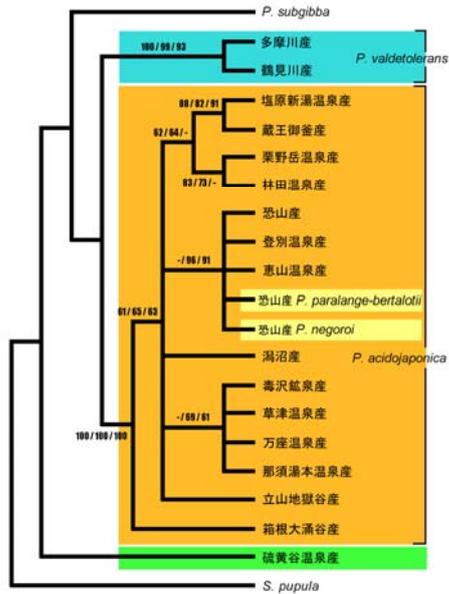
②*P. acidojaponica* のタイプロカリティーである大湧谷から採集した試料の大量培養法を検討した結果、BBM 寒天 2 相培地を使用することで、効率良い増殖を行うことができた。しかし、ゲルカルチャーの使用は特に効果を認めることができなかつたため、最終的に使用しなかつた。*Melosira* の 2 種と同様の方法で収穫後の細胞を処理し、被殻抽出物質によるシリカ沈殿実験をおこなった。

### 4. 研究成果

#### (1)分子系統

SSR rDNA に基づく系統樹では、*P. acidojaponica* と同定できる 14 産地から得た株、および *P. negoroi* と *P. paralange-*

*bertalotii*が一つの単系統群を形成した。



また、この単系統群は *P. validetolerans* と姉妹群を形成した。しかし、光学顕微鏡観察において、当初 *P. acidojaponica* の形態変異の範囲にあると考えられた硫黄谷温泉産株は、これらより離れて位置することが示された。各株間において置換された塩基の数は、*P. acidojaponica*、*P. negoroi*、*P. paralange-bertalotii* の株よりなる単系統群内で 0~9 塩基、また、この系統群内の株と *P. validetolerans* 株との間で 24~29 塩基、さらに、*P. acidojaponica* 系統群内の株と硫黄谷温泉産株との間で 40~43 塩基、*P. validetolerans* 株と硫黄谷温泉産株との間で 28 塩基であった。なお、登別温泉産の同一地点から採集された *P. acidojaponica* 3 個体の株の塩基配列は、すべて一致した。

タイプロカリティーである箱根大涌谷から単離した培養株の *P. acidojaponica* の塩基配列から構築した 18S rRNA 二次構造モデルに基づいて、*P. acidojaponica* complex 内の塩基置換サイトを比較したところ、1350 番目のサイト付近において、それぞれわずかな二次構造の違いが見出された。また、*P. acidojaponica* および *P. validetolerans* 株と硫黄谷温泉産株との間では、ステムを構成する塩基鎖の両側で補償的な塩基置換が一箇所見出された。

ITS 1-5. 8S rDNA-ITS2 領域に基づく系統樹では、13 株の *P. acidojaponica*、*P. negoroi*、*P. paralange-bertalotii* が集まり、一つの単系統群を形成した。また、この単系統群とは異なる系統に、*P. validetolerans* と硫黄谷温泉産株が、それぞれ位置した。さらに、塩

原新湯温泉産の *P. acidojaponica* は、他の *P. acidojaponica* 株とは離れ、独立した系統を示した。なお、登別温泉産の同一地点から単離された *P. acidojaponica* 3 個体の株の塩基配列は、すべて一致した。

*rbcL* に基づく系統樹では *P. acidojaponica*、*P. negoroi*、*P. paralange-bertalotii* の株は共に一つの単系統群を形成した。また、*P. validetolerans* および硫黄谷温泉産の株は、この単系統群とは離れて位置し、両者は姉妹群を形成した。

各株間における塩基置換数は、*P. acidojaponica*、*P. negoroi*、*P. paralange-bertalotii* より構成される単系統群の間で 0~11 塩基であった (1166 塩基中)。また、この系統群と *P. validetolerans* 株との間で 13~18 塩基、さらに、硫黄谷温泉産株との間で 13~18 塩基であった。なお、*P. validetolerans* と硫黄谷温泉産の株間では 5~6 塩基であった。アミノ酸配列データに基づく NJ 法および MP 法のどちらによる系統樹においても、*P. acidojaponica*、*P. negoroi*、*P. paralange-bertalotii* の株は共に一つの単系統群を形成した。また、*P. validetolerans* および硫黄谷温泉産の株は、この単系統群とは異なる系統に位置した。各アミノ酸配列間におけるアミノ酸置換数は、*P. acidojaponica* と *P. negoroi* と *P. paralange-bertalotii* で構成する単系統群内の株間で 0~2 アミノ酸 (389 アミノ酸中)、この系統群と *P. validetolerans* 株の間で 4~6 アミノ酸、*P. acidojaponica* 系統群と硫黄谷温泉産の株の間で 3~5 アミノ酸、*P. validetolerans* と硫黄谷温泉産の株の間で 2~3 アミノ酸であった。

表 9. 塩基の置換/置換数 (389 アミノ酸中)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. 登別温泉産	-	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	5	4	4
2. 原新湯温泉産	-	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	5	4	4
3. 箱根産	-	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	5	4	4	
4. 硫黄谷温泉産	-	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	5	4	4		
5. 蔵王御釜産	-	-	0	0	1	0	0	1	1	2	2	1	1	6	5	3		
6. 原新湯温泉産	-	-	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	5	4	4			
7. 登別温泉産	-	-	1	0	0	1	1	2	2	1	1	6	5	3				
8. 箱根産	-	-	1	1	0	0	1	1	0	0	5	4	4					
9. 硫黄谷温泉産	-	-	0	1	1	2	2	1	1	6	5	3						
10. 箱根大涌谷産	-	-	1	1	2	2	1	1	6	5	3							
11. 立山御嶽谷産	-	-	0	1	1	0	0	5	4	4								
12. 箱根産	-	-	1	1	0	0	5	4	4									
13. 登別温泉産	-	-	0	1	1	6	5	3										
14. 林田温泉産	-	-	1	1	6	5	3											
15. <i>P. negoroi</i>	-	-	0	5	4	4												
16. <i>P. paralange-bertalotii</i>	-	-	5	4	4													
17. 硫黄谷温泉産	-	-	1	3														
18. 多摩川産	-	-	2															
19. 硫黄谷温泉産	-	-	2															

なお、登別温泉産の同一地点から採集された *P. acidojaponica* 3 個体の株の塩基配列は、すべて一致した。

*P. negoroi* (= *P. braunii* var. *undulata*) および *P. paralange-bertalotii* は、恐山の強酸性水域において *P. acidojaponica* と共に出現するが、光学顕微鏡観察による形態的な相違点から、それぞれ別の種として記載されてきた (Neg-



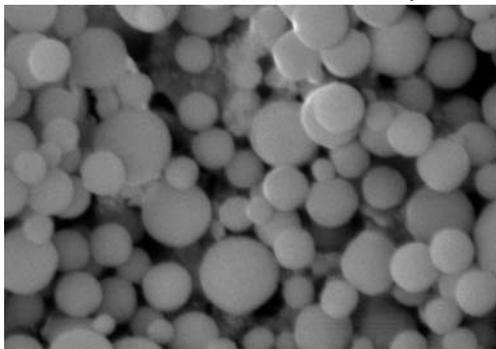
*M. nummuloides*は抽出に使った開始細胞量は1.5ml, HF処理前の被殻の湿重量0.49g、*B. aurita*は抽出に使った開始細胞量3ml, HF処理前の被殻の湿重量0.99gであった。*B. aurita*は始めの細胞量が2倍であるにもかかわらず、CBB染色では*M. nummuloides*よりもバンドが薄かった。

珪酸溶液に被殻抽出物質を加えたところ、瞬時に白濁を生じ沈殿を生じた。この沈殿をEDSで定性分析したところ、主にSiとO、そしてCを少し含む物質であった。

また、沈殿を観察したところ、*M. varians*の活性沈殿物では直径150~400nm程度のシリカ球が認められた。またリン酸を25mM含む珪酸溶液に同抽出物質を加えたところ、直径30nm程度のシリカ球の沈殿を生じた。

さらに、リン酸を100mM含む珪酸溶液に同抽出物質を加えたものではほとんど沈殿を生じなかったが、直径30 $\mu$ m程の大きなシリカ球が2球のみ観察された。珪酸溶液に*M. nummuloides*の被殻から抽出した物質を加えたところ直径30~60nm程度のシリカ球の沈殿が観察されたしかし大部分は球ではない薄い膜(繊維)状の物質であった。リン酸を25mM含んだ珪酸溶液に*M. nummuloides*の被殻から抽出した物質を加えたところ、同じく直径30nm程度のシリカ球の沈殿を一部生じた、こちらも大部分は球ではない薄い膜状の物質の沈殿であった。またリン酸を100mM含んだ珪酸溶液に*M. nummuloides*の被殻から抽出した物質を加えたものも同じく薄い膜状の物質の沈殿を多く生じた。また各所に直径350nm~1 $\mu$ m程度のシリカ球が観察された。

被殻からの粗抽出物質をHPLCを用いて逆相カラムにより分取したところ、*M. varians*では8minの分画、*M. nummuloides*では10minの分画がニンヒドリン反応により赤紫色を呈した。この分画を珪酸溶液に加えたところ、瞬時に白濁が起こり、SEM観察では両種ともにシリカ球沈殿が認められた。



*M. varians*では8minの分画以外に14min, 24min, 32minの分画の活性も試験を行った

が、珪酸溶液との混合で白濁は認められず、SEM観察においても、沈殿は認められなかった。一方*M. nummuloides*では10minの分画以外に14min, 18min, 26minの分画の活性を試験したところ、14min, 26minの分画では白濁は認められなかったものの、SEM観察では沈殿が認められた。10min, 14minの分画では直径30nm程度、26minの分画では直径9 $\mu$ m程度のシリカ球の沈殿が観察された。

*P. acidojaponica*の培養では、多量の多糖物質が細胞外へ放出された(Extracellular polymeric substances: EPS)。被殻抽出物質の電気泳動結果で、CBB染色においてスミアが多量に出現したのは、このEPSのためと思われた。EPSは熱水に溶解するものが知られているため、処理過程の水をすべて熱水を用いた実験を試みたが、電気泳動実験の結果の改良にはつながらなかった。これに対し、次亜塩素酸による細胞の処理はある程度効果を上げることができた。結果、6kDaと14kDa付近においてCBB染色によるバンドを認めることができた。これらは、先行研究におけるシラフィンの存在する分子量の範囲内にある。しかし、ポリアミンの存在を示す、3.5kDa以下にバンドを認めることはできなかった。

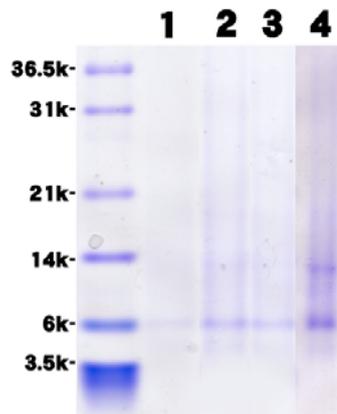


図7. 培養材料より抽出した物質の電気泳動。ゲルアブライ時の温度は80 $^{\circ}$ C, CBB染色。  
Lanes: 1. 方法2でできた方法に似た。2. Lanes1の量をアブライ。3. 使った水0.5mlを全て熱水にした。4. 前処理に1%次亜塩素酸を用いた。

*P. acidojaponica*の被殻抽出物質を珪酸溶液に加えたところ、瞬時に白濁を生じ、*Melosira*同様の沈殿反応が生じていることが示された。

*Cylindrotheca fusiformis*ではポリアミンにシラフィンが結合した状態で存在することが報告されているが、*P. acidojaponica*でも同様の状態が存在する可能性も示唆される。その一方、抽出過程でポリアミンが失われた可能性も否定できない。今後、ポリアミンの存在についてはさらなる検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4件)

- ① Mayama, S. & Idei, M. 2009 Fine structure of two *Hygropetra* species, *H. gelasina* sp. nov. and *H. balfouriana* (Bacillariophyceae), and the taxonomic position of the genus with special reference to *Frankophila*. *Phycol. Res.* **57**: in press. 査読有り
- ② Umemura, K., Noguchi, Y., Ichinose, I., Hirose, Y., Kuroda, R. & Mayama, S. 2008. Diatom cells grown and baked on a functionalized mica surface. *J Biol. Phys.* **34**: 189-196. 査読有り
- ③ Poulickova, A., Mayama, S., Chepurnov, V. A. & Mann, D. G. 2007. Heterothallic auxosporulation, incunabla and perizonium in *Pinnularia* (Bacillariophyceae). *Eur. J. Phycol.* **42**(4): 367-390. 査読有り
- ④ Umemura, K., Yamada, T., Maeda, Y., Kobayashi, K., Kuroda, R. & Mayama, S. 2007. Regulated growth of diatom cells on self-assembled monolayers. *Journal of Nanobiotechnology* **5**(2): 1-14. 査読有り

[学会発表] (計 9件)

- ① 真山茂樹・中川絵美子、19 地点から採集した *Pinnularia acidojaponica* 類似個体群は形態学的に同種と言えるか? 日本珪藻学会第 29 回大会、2008. 5. 25、国立科学博物館
- ② 真山茂樹、市岡元気、大竹弘通、渡辺剛、珪藻がもつ多孔質のシリカの殻の成因を探る、日本進化原生物学研究会第 3 回研究会、2007. 7. 8、海洋研究開発機構横浜研究所
- ③ 椎名亮平、石井織葉、真山茂樹、出井雅彦、強酸性温泉珪藻 *Pinnularia acidojaponica* の温度耐性、日本珪藻学会第 28 回大会、2007. 5. 20、近畿大学
- ⑤ 石井織葉、真山茂樹、出井雅彦、本邦の強酸性水域に出現する羽状珪藻 *Pinnularia* 種の分布と分子系統、日本藻類学会第 31 回大会、2007. 3. 24、神戸大学
- ⑥ 真山茂樹、市岡元気、珪藻殻の形態形成— in vitro における小孔構造の作成、バイオミネラライゼーションワークショップ、2006. 12. 13、東京大学
- ⑦ 真山茂樹、四ツ柳敬、平田恵理、複数ヶ所から採取した *Pinnularia acidojaponica* および *Pinnularia valdetolerans* 群集の形態計測解析における多変量解析の適用、

日本珪藻学会第 26 回研究集会、2006. 11. 11、上田市武石公民館

- ⑧ 石井織葉、真山茂樹、複数ヶ所から採取した *Pinnularia acidojaponica* と類縁分類群の分子系統学的解析、日本珪藻学会第 26 回研究集会、2006. 11. 11、上田市武石公民館
- ⑨ Mayama, S., Ichioka, G., Okano, K., Watanabe, T. and Nagumo, T.、*In vitro* silica nano-pattern formation with putative LCPA extracted from *Melosira* frustules. 19th International Diatom Symposium、2006. 9. 2、Listvyanka, Russia

[図書] (計 1件)

- ① 小林弘、出井雅彦、真山茂樹、南雲保、長田敬五、内田老鶴圃、小林弘珪藻図鑑、2006 年、1 頁～596 頁

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

真山茂樹 (MAYAMA SHIGEKI)  
東京学芸大学・教育学部・准教授  
研究者番号：40199914

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

南雲保 (NAGUMO TAMOTSU)  
日本歯科大学・生命歯学部・教授  
研究者番号：70120706

出井雅彦 (IDEI MASAHIKO)  
文教大学：教育学部・教授  
研究者番号：60143624