

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02266

研究課題名(和文) 珪藻ブルームを終焉に導く珪藻細胞群の同調的休眠機構に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the synchronous-resting mechanisms of the marine diatoms

研究代表者

山口 晴生 (YAMAGUCHI, Haruo)

高知大学・教育研究部自然科学系農学部門・准教授

研究者番号：10432816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：海洋一次生産者として重要な微小珪藻の消長全容を明らかにするために、本研究課題では、微小珪藻細胞を人為的に休眠移行可能な培養技術を確立、この技術を用いて同藻個体群が休眠状態に至るプロセスを解明しようとした。その結果、供試藻は光と栄養塩の複合ストレスをうけると、細胞内における小器官・代謝産物・遺伝子転写を大きく変えることで、暗黒下でも長期にわたって生存可能な“休眠状態”へ移行可能なことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海洋生態系を下支えする珪藻は、大増殖を果たした矢先、突如して海水中から消失することがある。この現象を理解することは、漁業生産を左右する珪藻の消長全容を理解する上で極めて重要である。そのような背景のもと、本研究では、微小珪藻細胞群が同調的に休眠状態へと移行することを明らかにした。この成果は、海水中で大発生した珪藻(珪藻ブルーム)の唐突な終焉現象を休眠移行という観点から合理的に説明可能なものであり、珪藻の消長全容を理解する上で重要な知見と位置づけられる。

研究成果の概要(英文)：Diatoms are an important role in the global primary production. To clarify the bloom dynamics of marine diatoms, this study investigated resting processes of the diatom cultures in laboratory experiments. Under both stresses of dark and nutrient-depleted, vegetative cells of *Chaetoceros tenuissimus* cultures used in the present experiments altered almost-synchronously cell organelle and intracellular metabolism. These stressed diatom cells formed resting-stage cells and survived in the long term even under the dark conditions. We established the culture methods capable of preparing resting-stage cells of the diatom in laboratory and suggested that light- and nutrient-stressed cells of marine diatoms synchronously form resting stage cells, appear to sink, and seem to be disappeared in seawaters. Our results provide a new insight into the bloom dynamics of marine diatoms.

研究分野：水圏微生物生態学

キーワード：珪藻 ブルーム 休眠 代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海洋における珪藻の生産力(光合成活性)は大きく、海洋一次生産全体の40~50%以上、ときに90%を担う。その生産力の高さから、珪藻は「海の牧草」とも称され、食物連鎖の根底を支えている。したがって、珪藻の消長を支持する機構の解明は、生物地球科学的にも水産学的にも極めて重要である。

過去の知見から、珪藻の消長パターンは必ずしも一様ではないことがわかってきた。例えば、年に数回の大発生(ブルーム)があるかと思うと、ある時彼らは水中から突如として姿を消す。これまでに、珪藻の発生機構に関する知見は蓄積されてきたが、珪藻ブルームの唐突な終焉をもたらす機構については十分に解明されていないのが現状である。

申請者らは近年、沿岸海域に分布する微小珪藻種の一つキートセロス テヌイシマス(*Chaetoceros tenuissimus*)を培養している過程で、同藻細胞が球状に変化している状況に遭遇した。この細胞は数日経過しても増殖せず、一見すると死んでいるように思われたが、増殖に最適な環境に移すと、数日後には細胞が増殖することを見出した。この観察現象に基づいて「微小珪藻は休眠状態へと移行し、その結果としてブルームを終焉させる」との仮説を構築した。

2. 研究の目的

本研究では、微小珪藻 *C. tenuissimus* を代表モデルとして、突発的な珪藻ブルームの終焉をロジカルに説明するための休眠移行モデルを構築しようとした。研究期間中、以下の小課題に取り組み、得られた知見を総合することで、珪藻の同調的休眠移行が介在するブルームの終焉現象について総合的に考察しようとした。

- (1) 強力・同調的休眠誘導系の確立
- (2) 休眠細胞の形態性状の特徴づけ
- (3) 休眠誘導代謝経路の解明
- (4) 微小珪藻の休眠診断システムの開発
- (5) 珪藻の休眠移行とブルーム終焉の関連付け

3. 研究の方法

- (1) 強力・同調的休眠誘導系の確立

休眠誘導に関わると考えられる栄養塩・光に着目し、これまで未検討であった栄養塩種・水温も組み合わせた条件下でモデル珪藻株を培養した。顕微鏡・画像解析装置で得られる細胞形態情報・蛍光情報、ならびにバイオアッセイで評価される栄養細胞への復活能に基づいて休眠細胞の形成を調べ、強力かつ同調的に休眠を誘導する条件を特定した。他の数種の微小珪藻についても試験し、休眠誘導条件の普遍性を調べた。

- (2) 休眠細胞の形態性状の特徴づけ

珪藻細胞の細胞壁と核・油滴・液胞・光合成色素を対象に、休眠移行に伴う形態・局在性の変動を特徴づけようとした。ここでは、光学顕微鏡および高速蛍光解析装置(フローサイトメーター)を用いた細胞の蛍光観察・定量の最適化、ならびに超解像度顕微鏡システムの適用に向けた蛍光標識の最適化を図った上で、標題の特徴づけを行った。

- (3) 休眠誘導経路の解明

供試藻のゲノム情報を解読し、それを活用して休眠に関わる遺伝子群と代謝産物群を調べようとした。特に、通常の栄養細胞と休眠誘導細胞における発現遺伝子群を重点的に解析し、当該藻の休眠に関わる遺伝子発現・代謝経路について考察した。

- (4) 微小珪藻の休眠診断システムの開発

モデル微小珪藻の休眠時に認められる液胞様物質・油滴物質等を特異染色し、それらの染色細胞群を蛍光・画像の高速解析装置に流すことで、細胞一つ一つの蛍光情報・画像情報を同時取得した。この情報を生・死細胞のそれらと比較することで、珪藻細胞群の生/死/休眠を定量的に診断可能なシステムを開発しようとした。

- (5) 珪藻の休眠移行とブルーム終焉の関連付け

この小課題では、微小珪藻が発生する沿岸域の海水・底泥を採取し、それらに含まれる微小珪藻の細胞について解析した。これにより、沿岸域における微小珪藻の休眠細胞の諸性状等を明らかにし、休眠移行とブルーム終焉に考察を加えようとした。

4. 研究成果

C. tenuissimus 複数培養株を強力かつ同調的に休眠誘導可能な培養系を確立することができた。本藻は栄養塩の枯渇が引き金となって休眠状態へと移行しはじめ、(本来増殖できない)暗黒下にて、二カ月もの長期にわたって生残可能(休眠状態)であった。特に、低温であれば、より長期間の生存が可能になることも示唆された。このような休眠移行は、*C. tenuissimus* 培養株複数でも共通しており、あるいは他の珪藻種でも認められるケースがあった。また、細胞群としての休眠移行はおよそ同調的なものであることがわかった。

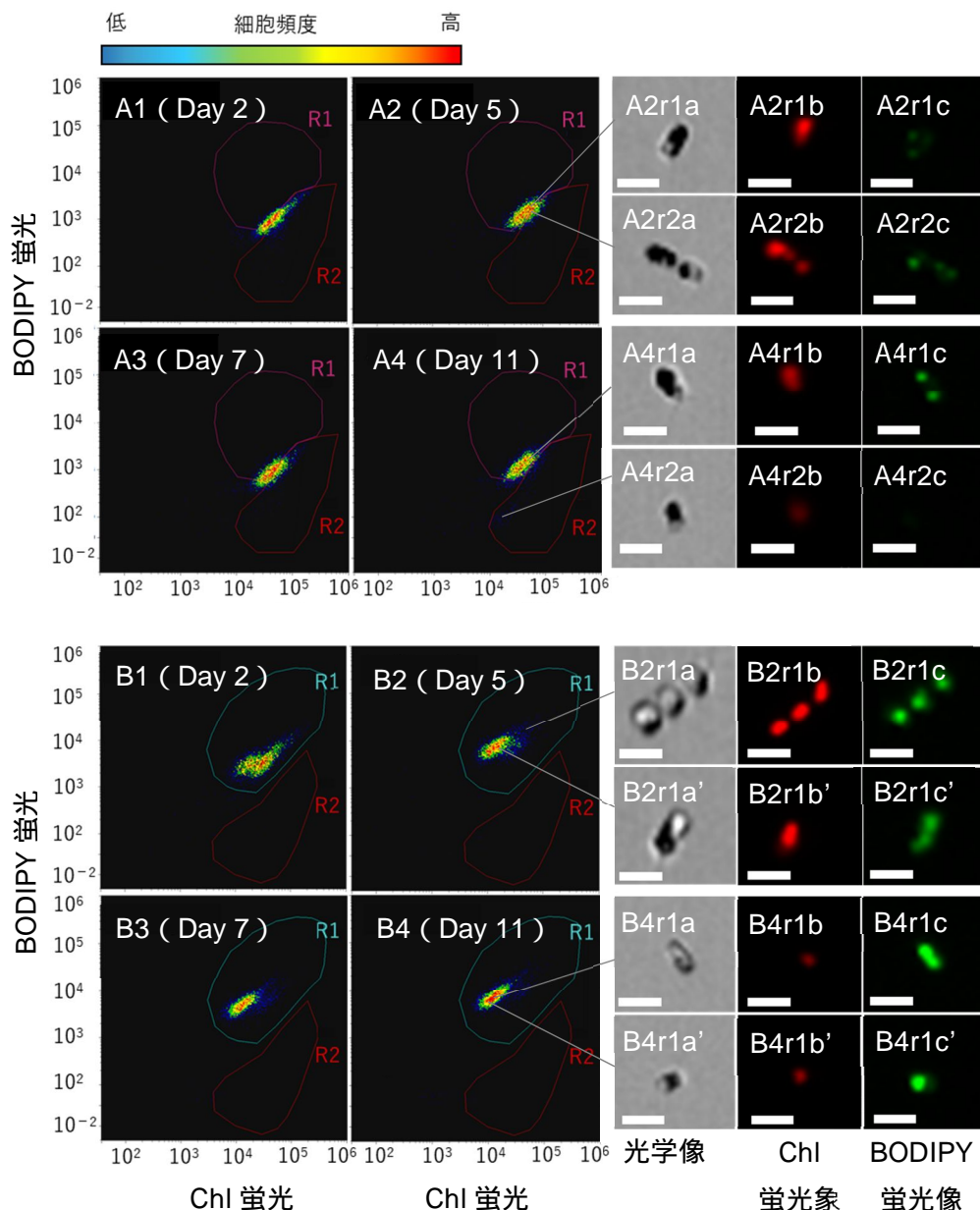


図1 暗所で2, 5, 7および11日間培養した *Chaetoceros tenuissimus* 栄養充足細胞 (A) および窒素欠乏細胞 (B) における一細胞あたりのクロロフィル (Chl) 蛍光強度と BODIPY 蛍光強度を細胞頻度と画像化細胞と共に示した図。図中には次の2つ領域が示されている: BODIPY 染色していない細胞を流した時に当該細胞が分布する領域 (R2), 本試験にて得られたイメージングフローサイトメーターの細胞画像より BODIPY 染色蛍光がみられる細胞をおおよそ囲った領域 (R1)。図右側の細胞像はイメージングフローサイトメーターにより得られた光学像 (末端シリーズ a, a') ならびにクロロフィル (b, b') および BODIPY (c, c') に由来する蛍光像を示す。スケールバーは 10 μ m を示す。

供試藻細胞を覆うシリカ被殻, 細胞を形作るアクチン, 細胞内に分布する油滴・液胞ならびに葉緑体を蛍光染色可能な実験系を構築できた。休眠状態へと移行する際, 珪藻の細胞内の構造はダイナミックに変化することが明らかとなった; 具体的には, 細胞内の葉緑体を大幅に縮小する一方, 油性物質を蓄積するとともに細胞内小器官を発達させることがわかった (図1)。これらの変動器官のうち葉緑体については, 超解像度蛍光顕微鏡により高解像度な観察象を得られる可能性が示された。

ゲノムサイズにして約 50 Mbp ならびに contig 数 200 以上に及ぶ配列情報を得ることができ, これらを供試株のドラフトゲノム情報とした。休眠誘導を開始した珪藻細胞における遺伝子群の転写産物について, ドラフトゲノム情報と照らし合わせた結果, 休眠移行において特徴的な発現配列が見いだされた。これらの発現遺伝子が休眠状態へと導く代謝産物を産生しているとする仮説が構築された。

蛍光観察の結果、休眠移行に至る珪藻細胞群は蛍光試薬 LysoTracker ならびに BODIPY によって染色された。フローサイトメーターを用い、栄養細胞と休眠移行細胞の自家蛍光・BODIPY 蛍光強度ならびに LysoTracker 蛍光を細胞個々で比較することにより、休眠状態に特徴的な蛍光情報を得られることが判明し、その情報に基づいて休眠状態を診断可能なことが示唆された。

本邦沿岸底泥より同藻各種の休眠期細胞を見出すことができ、これら休眠細胞から復活した栄養細胞のなかには *C. tenuissimus* が含まれていた。これらのことは、微小珪藻の長期にわたる生残戦略を合理的に説明可能な重要知見と位置づけられる。

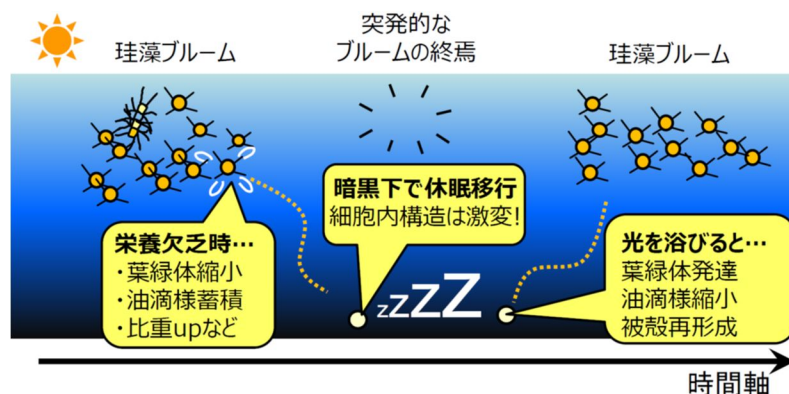


図2 休眠移行が介在する微小珪藻の消長概略図。

近年、微小珪藻の優れた生産性については国内外の藻類研究グループが注目している。その一方で、微小種を含めた珪藻のブルーム終焉に関する知見は乏しい。ブルーム終焉要因には、珪藻細胞の自然死、あるいは捕食圧・ウイルス感染圧による珪藻個体群の減少などが挙げられているが、いずれも合理的な説明を果たせる要因としての統一的な合意はない。

本研究は、微小珪藻の同調的休眠移行を世界で初めて明らかにし、当該生物の消長のカギとなる「突発的なブルームの終焉」を合理的に支持する機構を構築するに至った(図2)。本研究の実施過程においては、高速増殖能・栄養塩再生能を備えた微小珪藻 *C. tenuissimus* 株の人為的かつ無菌的な休眠誘導・休眠診断システムを構築した。また、当初は予定していなかった、培養株を長期間保存可能な新技術についても確立できた。さらに同種のゲノムドラフト情報を高精度化することで、珪藻の生理・生態を包括的に解明するための実験基盤を世界に先駆けて整備するに至った。

これらより、本研究で得られた成果は、海洋生物生産の中核となる珪藻ブルーム現象の全容理解に貢献し、水産科学・生物地球科学の発展に資するものとして重要な位置づけにあると判断される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 角田成美, 山口晴生, 足立真佐雄, 外丸裕司
2. 発表標題 海産微小珪藻 <i>Chaetoceros tenuissimus</i> の休眠移行プロセス
3. 学会等名 2018年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口晴生, 早川由真, 安藤 里, 外丸裕司
2. 発表標題 海産微細藻の強制懸濁培養に関する研究
3. 学会等名 2018年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角田成美, 山口晴生, 足立真佐雄, 外丸裕司
2. 発表標題 本邦沿岸底泥における <i>Chaetoceros tenuissimus</i> の分布
3. 学会等名 令和元年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口晴生, 角田成美, 足立真佐雄, 山田和正, 外丸裕司
2. 発表標題 微小珪藻 <i>Chaetoceros tenuissimus</i> の休眠・復活機作
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

水族環境学研究室（水質汚濁，赤潮，魚毒性中毒・貝毒，バイオ燃料）
<http://www.cc.kochi-u.ac.jp/~yharuo/laques/index.html>

山口晴生（2021年2月発表）魚貝類を斃死させる赤潮現象の解明に向けて．高知大学研究拠点プロジェクト「革新的な水・バイオマス循環システムの構築」2020年度オンライン公開シンポジウム「海の恵みを楽しむために」．

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	外丸 裕司 (TOMARU Yuji) (10416042)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・瀬戸内海区水産研究所・主任研究員 (82708)	
研究分担者	木村 圭 (KIMURA Kei) (30612676)	佐賀大学・農学部・准教授 (17201)	
研究分担者	堀田 純一 (HOTTA Jun-ichi) (80301919)	山形大学・大学院理工学研究科・准教授 (11501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------