

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：34316

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05797

研究課題名（和文）水域生態系におけるシアノバクテリア生物時計の意義の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the significance of cyanobacterial circadian clock in aquatic ecosystems

研究代表者

吉山 洋子（Yoshiyama, Yoko）

龍谷大学・農学部・実験助手

研究者番号：80519968

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：原核生物シアノバクテリアには概日リズムを持つ種の存在が知られている。その研究は生化学的研究が中心で、野外生態系での研究は遅れている。水域生態系において生物が概日時計を有するメトリットも明らかではない。そこでシアノバクテリア概日時計の適応的意義に関して理論的に、その鉛直移動を解析した結果、日周鉛直移動や隔日鉛直移動、不規則周期鉛直移動（カオス様振動）といった鉛直移動パターンが得られた。この結果は、概日時計などによる制御が行われない場合にシアノバクテリアの光合成生産が不安定となることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は自然生態系の淡水域のシアノバクテリアの時計遺伝子に注目した点、および一次生産者の概日時計の役割を明らかにすることを試みる点が、先行研究と比較して、独自性・創造性が高い。これまで水域生態系の基盤をなす植物プランクトンの動態、例えば植物プランクトン種組成の季節変化といった現象を考える際、食物網におけるトップダウン効果とボトムアップ効果のバランスで考えられてきたが、さらに内生リズムが重要な役割を果たす可能性がある。本研究の成果は「時計遺伝子はプランクトン態のシアノバクテリアでは維持されているが、付着態などのシアノバクテリアでは適応的意義が少なく失われている」といった検証可能な予測を与える。

研究成果の概要（英文）：Cyanobacteria are phototrophic bacteria, part of which possesses circadian clock genes. Previous studies focused on the biochemistry, and the ecological and evolutionary studies are limited. In particular, it is still to be elucidated what brings the adaptive advantages to cyanobacteria. In this study, we revealed that the vertical migrations of cyanobacteria in lakes include diurnal, bidiurnal, and chaotic vertical oscillations by using a mathematical model. The results suggest primary production by cyanobacteria can be unstable unless the photosynthesis rate is controlled by the circadian clock, which in turn, diurnal migration controlled by the circadian clock may provide adaptive advantages to cyanobacteria in lakes.

研究分野：微生物生態学

キーワード：湖沼生態系 藻類 生物時計 理論モデル 鉛直移動

## 1. 研究開始当初の背景

生物のもつ約 24 時間の内生リズムを生み出すシステムを概日時計とよぶ。概日時計研究は原核生物のシアノバクテリアで特によく進んでおり、KaiA, KaiB, KaiC の 3 タンパク質が概日リズムを生み出す。これまでの概日時計に関する研究は、その仕組みの解明に主眼を置いており、自然生態系における適応的意義に関する研究は進んでいない。水域生態系では近年研究が始まったばかりで、いく種かの海洋性シアノバクテリアでは、概日リズムを持つことが明らかになり始めた。現在の研究の中心は海洋で、淡水性シアノバクテリアの時計遺伝子に関する研究は進んでいない。そこで本研究では、淡水域を中心に「シアノバクテリア生物時計の、水域生態系における適応的意義を（1）野外調査、（2）室内実験及び（3）理論研究において検証する」ことを試みた。

原核生物であるシアノバクテリアから動物・植物などの真核生物まで、多くの生物は、約 24 時間周期の内生リズム（概日リズム）をもつことが知られている。1993 年、近藤らは、シアノバクテリアの光合成遺伝子の発現が、24 時間周期を持つことを示し、その後、1997 年に時計遺伝子 kaiABC によってコードされている KaiA, KaiB, KaiC の 3 つのタンパク質によってそのリズムが生み出されることを明らかにした（Kondo et al. PNAS 1993, Ishiura et al. Science 1998）。2005 年には、ほとんどの遺伝子発現がストップする恒暗条件下でも、KaiC のリン酸化リズムが継続することが明らかになるなど（Tomita et al. Science 2005）、シアノバクテリアの概日リズムは（1）約 24 時間周期で自動的に継続する自立振動性、（2）化学反応のみでは説明できない幅広い温度帯での温度補償性、（3）環境からの刺激（温度サイクル）への同調性、という 3 つの特性を持つことが明らかとなっている（Terauchi et al. PNAS 2007）。分子生物学レベルでは、シアノバクテリアの概日リズムのメカニズムの解明は進みつつある。

一方、生態系レベルでの概日時計の研究は始まったばかりである。海洋の二大代表種の 1 つである *Prochlorococcus* は、KaiA が欠損しており、自律的な生物時計が機能していない（Dvornyk et al. PNAS 2003）。もう一方の優占種である *Synechococcus* は、時計タンパク質（KaiA, KaiB, KaiC）を持ち、多くの代謝活性が 24 時間周期で変動していることが明らかとなっている（Ottson et al. PNAS 2013）。*Prochlorococcus* は熱帯、*Synechococcus* は極域を除く地域の有光層に分布する。*Prochlorococcus* は生物時計やアミノ酸合成などの機能が欠損し、藍藻類の中で最小レベルのゲノムサイズしか保持していないことが知られている。これは、環境安定度の高い場所では、機能を最小化したことでエネルギーコストが抑えられ、他種よりも有利に分布できた可能性がある。一方、エネルギーコストがかかっても、生物時計や多くの機能を維持したことが、*Synechococcus* が幅広い環境で分布できた理由かもしれない。海洋生態系ではこの他、*Trichodesmium* 等、数種のシアノバクテリアで時計タンパク質の相同遺伝子が保持されていることが報告されている（Wiegand et al. Microbiology 2013, Axmann et al. Marine Genomics 2014）。淡水生態系では、生物時計のモデル株（*S. elongates* PCC7942）以外では、殆ど調べられていない。環境変動の大きな淡水生態系では、多くの種が時計遺伝子を保持していることが考えられる。

原核生物であるシアノバクテリアは、最もシンプルで原始的な概日時計を保有する生物であると共に、水域生態系における一次生産者として物質循環により食物網を駆動する役割を担っている。シアノバクテリアの生態系機能において、概日時計はどのような役割を果たしているのか。時計遺伝子変異株を用いた競争実験では、内生リズムと環境サイクル（昼夜周期）の一致した株が、一致しない株に比べて reproductive fitness（占有率）を上げることが明らかとなっている（Ouyang et al. PNAS 1998）。水域生態系において、植物プランクトンの種組成は季節変化する。また、日本では日照時間に年間 5 時間もの変動がある。これらを考慮すると、野外のシアノバクテリアは、それぞれ固有の内生リズムを持ち、最も一致した昼夜周期の季節に出現している可能性も考えられる。

光合成を行う生物にとって、概日時計で内生リズムを刻むことは、日照パターンへの対応といった利点となりうる一方で、概日時計を保持するコストも考えられる。シアノバクテリアに関して、概日時計によるコストに見合うベネフィットは得られるのか、あるいは概日時計は古環境への適応進化の遺産なのだろうか。これまでの概日時計に関する研究は、その仕組み解明に主眼を置いており、生態系における適応的意義（生物の内生リズムと昼夜リズムが一致する利点）に関する研究は進んでいない。また先述のように、海洋性のシアノバクテリアの時計遺伝子の多様性は明らかになりつつあるが、淡水性シアノバクテリアの時計遺伝子の多様性は殆ど明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

目的：最も単純で原始的な概日時計を持つシアノバクテリアに着目し「水域生態系における概日時計の適応的意義を（1）野外調査（2）室内実験室（3）理論研究によって明らかにする」。テーマ 1（野外調査）。淡水域生態系におけるシアノバクテリア時計遺伝子保持の検証：仮説「環境変動の大きい淡水生態系では、シアノバクテリアは、時計遺伝子を保持している」ことを検証する。具体的には、野生種の単離とその時計遺伝子の遺伝子解析を行う。本テーマにより淡水性シアノバクテリアの時計遺伝子の保有率と時計遺伝子の多様さを明らかにする。

テーマ2（室内実験）シアノバクテリア体内時計の適応的意義の実験的検証：  
野外においても「内生リズムと環境サイクルの一致が reproductive fitness を向上させる方向に働く」ことが予測される。そこで、淡水生態系からの単離株で、昼夜リズムと生理活性（増殖速度と光合成活性）の関係を明らかにする。なお、本実験では、生理活性（増殖速度と光合成活性）を reproductive fitness の指標とする。

テーマ3（理論研究）仮説「概日時計による光合成リズム制御は、光合成量の最適化に寄与する」を数理モデルにより検証する。シアノバクテリアの鉛直移動パターンは炭水化物の蓄積による密度増加と消費による密度現象により生じる。ストークスの法則に従いコロニーサイズに応じた沈降速度が決まるため、必ずしも鉛直移動は1周期=1日の昼夜リズムを刻むわけではない。光合成速度を概日時計により制御することで、1周期=1日の規則的な鉛直移動パターンを維持し、光合成効率を最適化するという可能性を理論的に検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

テーマ1（野外調査）淡水域生態系におけるシアノバクテリア時計遺伝子保持の検証：  
野外調査により淡水性シアノバクテリアの単離を行い、これらの遺伝子解析から、時計遺伝子（kaiA, kaiB, kaiC および、その相同遺伝子）の保持を解析する。これらの結果は、既知の海洋性シアノバクテリアの時計遺伝子の多様性と比較を行う。野外調査は、琵琶湖北湖表水層の複数地点・深度を中心に行なった。現場で採取した湖水を濃縮し、複数種類の培地に接種、継代培養によりシアノバクテリアの単離を試みた。

テーマ2（室内実験）シアノバクテリア体内時計の適応的意義の実験的検証：  
前述の仮説を野外からの単離株を用いた室内実験により検証する。本実験は、テーマ1で野外より単離した株について、様々な明暗周期下で培養を行い、生理活性指標（増殖速度、光合成活性）を最大化する周期を調べ、各株の内生リズムや、実際の出現時期の昼夜パターンとの比較を行う。光合成活性測定は、明暗瓶法を改良して用いた。これまでの方法では、溶存酸素瓶に詰めた試水を一定時間ごとに固定し、滴定（ウインクラー法）により溶存酸素濃度測定を行うため、大量の試水と大量の酸素瓶を培養する大掛かりな水槽設備が必要であった。本実験では、非接触型の溶存酸素センサーを用いることで、同一試料で連続的に精度の高い溶存酸素濃度の測定を行った。

テーマ3（理論研究）シアノバクテリア体内時計の適応的意義に関する理論の構築：  
Visser et. al (1997)に基づくラン藻日周鉛直移動の動態を表す数理モデルを用い、様々なコロニーサイズのラン藻の鉛直移動パターンを光量などを変えて計算した。得られたパターンの数学的構造を明らかにするために、上記モデルを単純化したモデルに強制振動を与え、移動パターンに引き込みが生じるかどうかを詳細に検討した。

### 4. 研究成果

テーマ1（野外調査）淡水域生態系におけるシアノバクテリア時計遺伝子保持の検証：  
野外調査（採水）は、琵琶湖北湖および南湖の複数深度で行い、シアノバクテリアの単離を行なった。培地は標準的にシアノバクテリアの培養に使用されているBG11およびBG11<sub>0</sub>を用いた。結果、全くコロニーの培養できない時期もあったが、2019~2020年で、20種類以上の藻類が採取できた。これを顕微鏡観察した結果は、ほとんどが緑藻類であった。濃縮湖水を用いた第1段階ではシアノバクテリアも数種類が増えた。さらに、単離のために植えつぎを行ったところ、バクテリアが徐々に優占となり、藻類は消失し、安定して継代培養することができなかった。  
2021~2022年度はコロナウイルス感染症の流行により、調査船の利用が停止され、大学への入校・実験が著しく制限されたこともあり単離は断念せざるを得なくなってしまった。

テーマ2（室内実験）シアノバクテリア体内時計の適応的意義の実験的検証：  
非接触溶存酸素センサーを用いた培養システムの構築を行った。大学近隣のため池の水を用いて藻類群集で予備実験を行い、システムが機能することは確認ができた。しかし、野外からのシアノバクテリアの継代培養ができなかったため、実際シアノバクテリアではシステムを用いた実験はできなかった。  
テーマ1, 2について、本研究課題は終了するが、引き続き検討を行っていきたい。

テーマ3（理論研究）シアノバクテリア体内時計の適応的意義に関する理論の構築：  
シアノバクテリアの細胞比重は炭水化物の貯蔵量とともに変化し、その生成（比重増加）・消費（比重減少）に従いシアノバクテリアコロニーは水柱を鉛直移動する。この生理メカニズムに基づく鉛直移動モデルを解析した結果、コロニーサイズに応じて日周鉛直移動や隔日鉛直移動、不規則周期鉛直移動（カオス）といった鉛直移動パターンが得られた。この結果は体内時計を保持せず光環境に応じ光合成を行う場合、規則的な昼夜日射環境下においても不規則な鉛直移動パターンに陥る可能性を示唆している。

概日時計による制御が行われない場合にカオス様振動が生じる条件について、さらに詳細な解析を行った。従来の数理モデルを簡素化した強制振動モデルを用いて得られた振動パターンについて、振幅、周期比、周期数のそれぞれを得た。その結果、コロニーサイズに応じて、鉛直振動が強制振動に引き込まれて同期する強制振動周期と、引き込み不全となりカオス振動が生じる強制振動周期が存在することが明らかになった。特に典型的なコロニーサイズである半径  $100 \mu\text{m}$  の場合、強制振動の周期が短い場合は（1～12 時間程度の晴れ・曇り周期）は完全な引き込みが見られた一方で、昼夜周期（24 時間）の強制振動を与えた場合は常に引き込み不全が生じてカオス様振動が見られた。この結果は、概日時計などによる制御が行われない場合にシアノバクテリアの光合成生産が不安定となることを示唆している。

本研究により、シアノバクテリアの鉛直移動パターンが昼夜リズムへ引き込まれずに不規則なパターンを示す可能性が示唆された。さらにこの不規則な昼夜リズムは光合成効率の低下をもたらすことが明らかとなった。この成果は、「概日時計は鉛直移動パターンの調整機能を司る」という可能性を示唆するものである。さらに「時計遺伝子はプランクトン態のシアノバクテリアでは維持されているが、付着態などのシアノバクテリアでは適応的意義が少なく失われている」といった理論的予測が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉山洋子
2. 発表標題 自然生態系のシアノバクテリアと生物時計
3. 学会等名 CyanoClock 1.0
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	吉山 浩平  (Yoshiyama Kohei)  (90402750)	滋賀県立大学・環境科学部・准教授    (24201)	

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
---------	---------