

平成21年6月15日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580225

研究課題名（和文） マイクロサテライトマーカーによる *Chattonella* の生活史解明研究課題名（英文） Study of *Chattonella* life cycle by using microsatellite markers

研究代表者

河地 正伸 (KAWACHI MASANOBU)

独立行政法人国立環境研究所・生物圏環境研究領域・主任研究員

研究者番号：80311322

研究成果の概要： *Chattonella* 3種 115株の核相解析を行った結果、すべてがヘテロ接合体であり、栄養細胞は接合（有性生殖）で生じたと考えられた。また小型細胞の細胞レベルの核相解析を行った結果、ヘテロ接合体とその半数体の2タイプの存在が明らかになった。減数分裂で小型細胞が形成され、小型細胞同士の接合の結果としてシストが形成される可能性に加えて、ヘテロ接合体の小型細胞から直接シストが形成される経路が推察された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：水産学、プランクトン、マイクロサテライト、赤潮、生活史

1. 研究開始当初の背景

不等毛藻類ラフィド藻綱の *Chattonella antiqua*、*C. marina*、*C. ovata* の3種は、大量繁殖して赤潮を形成することで養殖魚等の大量斃死を引き起こし、水産業に甚大な被害をもたらしてきた。そのため、*Chattonella* の赤潮対策研究として、季節的な消長、温度や栄養塩類といった環境要因への応答、そして生活史に関する研究など様々な研究が行われてきた。

生活史研究として Nakamura *et al.* (1990) と Yamaguchi and Imai (1994) の2つの研究がある。ともに核量の変化に着目して、microfluorometric analysis（蛍光染色した核DNAの蛍光強度を基に核DNA量について解析する手法）により、生活史解明を試みているが、各々の結論には矛盾点が認められる。

Nakamura *et al.* (1990) は、*C. antiqua* 株の混合実験から、細胞サイズの小さな細胞（小型細胞）同士の接合と思われる過程を観察・記録し、また人工的に形成された休眠細胞（シスト）の核量が栄養細胞の2倍であることから、シストは接合子であると結論づけた。一方、Yamaguchi and Imai (1994) は、*C. antiqua* と *C. marina* の栄養細胞と海底堆積物から得た天然シストの核量測定を行い、シストの核量が栄養細胞の半分であること、そしてシストから発芽した遊泳細胞の核量はシストの2倍であることから、1) 栄養細胞は複相であること、2) シスト形成の際に減数分裂が行われ単相化すること、そして3) シストから発芽する際に無性的な複相化が起こり、複相の栄養細胞になると結論づけた。栄養細胞が複相の世代である点では共通した見解であるが、有

性生殖の一種である接合が行われているのかどうか、そしていつ減数分裂が行われているのか、また無性的な複相化という現象が本当に起きているのか、といった疑問、問題点が現在も未解決のまま残されている。

2. 研究の目的

生活史の中でも特に有性生殖の有無に関しては、*Chattonella* の自然集団の遺伝的多様性とも大きく関わり、赤潮発生について集団遺伝学的アプローチから研究する上でも、解明されなくてはならない課題である。

そこで核相解析が可能であるマイクロサテライトマーカーを用いてゲノムレベルで栄養細胞の核相を決定すること、そして生活史の各ステージの細胞を1細胞ずつ分離して、細胞レベルで核相を解析し、減数分裂時期を特定すること、また Yamaguchi and Imai (1994) において提唱されたシストからの発芽細胞が無性的な複相化によるものかどうかを検証することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 栄養細胞の核相解析

C. antiqua 44 株、*C. marina* 38 株、*C. ovata* 33 株の各培養株について集藻して DNA を抽出した後、Demura et al. (2007) において開発された 14 セットのマイクロサテライトマーカーによって遺伝子型を決定した。

(2) 減数分裂時期の推定

2 倍体生物に対してマイクロサテライトマーカーを用いると、減数分裂した個体では、2 本のバンドが 1 本のバンドとして検出されることを利用して、減数分裂の有無を確認できる。*Chattonella* のような単細胞生物の場合、単一の細胞を分離して直接的に核相追跡を行う必要がある。一細胞からマイクロサテライト領域を PCR 増幅するのは、通常、困難とされているが、最近考案された単一細胞の全ゲノム増幅の手法を活用することで、単一細胞の *Chattonella* についてもマイクロサテライト領域の PCR 増幅を可能にした。*C. antiqua*、*C. marina* は栄養塩の欠乏、暗条件による培養などによって、通常の栄養細胞と比べ、細胞サイズの小さな「小型細胞」となることが明らかにされている (Nakamura et al. 1990、Yamaguchi and Imai 1994)。減数分裂は栄養細胞から小型細胞へ移行する際に起きると考えられているが、これについてマイクロサテライトマーカーを用いて、通常の栄養細胞と小型細胞を各々細胞分離し、各々の核相を決定し、減数分裂の有無を確認した。本研究では栄養細胞と小型細胞が明確に識別できる *C. antiqua* 培養株を用いて、マイクロピペット法により各細胞を単離して、解析に供した。解析には、まず全ゲノム増幅試薬キット

(QIAGEN 社) を用いて単一細胞の全ゲノムを増幅し、マイクロサテライト領域の PCR 増幅におけるテンプレートを作成した後、6 セットのマイクロサテライトマーカーによる解析を行った。

(3) シストの核相解析

Chattonella のシスト (休眠細胞) は、直径約 30 μ m の半球の形態で、海底堆積物中の珪藻の殻などに付着した状態で存在する (図 1、今井 1990)。そこで *Chattonella* が毎年確認されている瀬戸内海播磨灘から採取した海底堆積物を使用して、シストの分離と核相解析を試みた。まず 100 μ m のプランクトンネットで堆積物をろ過し、更に 20 μ m のプランクトンネットでろ過した後、20 μ m のネットに残った堆積物を滅菌した海水で洗浄、倒立顕微鏡下でシストの観察、収集を行った。その後、細胞分離を行い、前述の方法と同様にゲノム増幅を行い、マイクロサテライトマーカーによる単一シストの核相解析を試みた。

4. 研究成果

(1) 栄養細胞の核相解析

C. antiqua 44 株、*C. marina* 38 株、*C. ovata* 33 株に含まれる栄養細胞を対象として、マイクロサテライトマーカーによる遺伝子型解析を行った。表 1 にその結果の一部を示す。

表 1. 各株の遺伝子型解析結果 (一部のみを示す)
1: 1 本バンド、2: 2 本バンド、-: 増幅されなかったマーカー

株名	マーカー名							
	48	52	58	59	60	65	66	67
<i>C. antiqua</i>								
D124	1	1	1	1	1	2	2	2
N2	2	1	1	2	1	2	1	1
N83	2	1	1	1	1	2	2	1
N84	2	1	1	1	1	1	1	2
N85	2	1	1	1	1	1	1	1
<i>C. marina</i>								
N3	-	-	1	1	1	2	1	2
N14	2	1	1	1	1	1	1	2
N115	1	-	1	-	1	-	1	2
N116	1	-	1	1	2	1	1	1
N117	1	-	2	1	1	1	1	2
<i>C. ovata</i>								
N603	2	-	1	1	-	2	1	2
N671	1	-	2	1	-	1	1	1
N849	1	-	1	1	1	1	1	1
D101	1	-	1	1	-	2	1	2
D103	2	-	1	1	-	2	1	1

3種全ての株において、14セットのマーカーの全てではないが、いずれかのマーカーで、必ず2本のバンドが検出された。このことから、栄養細胞は、接合の結果生じた2倍体ヘテロ接合体であることが強く示唆された。

(2) 減数分裂時期の推定

C. antiqua DEM-124株の栄養細胞17細胞と小型細胞20細胞、*C. antiqua* DEM-3011株の栄養細胞17細胞と小型細胞19細胞をマイクロピペット法により単離し、全ゲノム増幅キット (QIAGEN社製) を用いて全ゲノムを増幅した後、6セットのマイクロサテライトマーカーで遺伝子型を決定した。その結果、解析したすべての栄養細胞において、マイクロサテライトマーカーによる増幅断片が2本検出され、栄養細胞が2倍体ヘテロ接合体であることが示唆された。すなわち栄養細胞は、接合の結果生じたことが強く示唆された。この結果は株レベルの結果と一致するものであった。

一方、小型細胞の解析では、マイクロサテライトマーカーによる増幅断片が1本しか検出されないタイプ (DEM-124株の8細胞とDEM-3011の9細胞) と栄養細胞と同じ2本の増幅断片をもつタイプ (DEM-124株の12細胞とDEM-3011の10細胞) の2つのタイプの存在が明らかとなった。前者のタイプの場合、減数分裂の結果生じた可能性が考えられ、後者のタイプは、減数分裂を行う前の段階の可能性か、あるいは減数分裂を行わずにそのままシスト化する可能性が考えられた。

(3) シストの核相解析

瀬戸内海の海底堆積物より合計8細胞の *Chattonella* のシスト (図1) を分離して、核相解析に用いた。いずれも写真のように内容物を含んでいる細胞であった。



図1. 海底堆積物中から単離した *Chattonella* のシスト (スケールバー=30 μ m)

同細胞のゲノム増幅実験で、ゲノムの増幅は確認されたが、いずれのマイクロサテライトマーカーでも増幅断片を得ることはできなかった。 *Chattonella* のシストは珪酸質で出来ており、 *Chattonella* のDNAがうまく抽出されず、代わりにシスト表面に付着する微生物ゲノムが抽出・増幅された可能性、そして単離したシストが *Chattonella* のシストではなかった可能性が考えられた。実験的に誘

導したシストを用いた研究が必要と言えるが、現段階では、実験室内でのシスト形成には成功していない。

(4) *Chattonella* の生活史

先行研究と本研究の結果を総合した生活史を図2に示す。Nakamura *et al.* (1990)は、小型細胞の接合観察とシストの核量計測結果に基づいて、シストが接合子であると結論づけている。本研究においても栄養細胞は全て2倍体のヘテロ接合体であることが明らかとなり、栄養細胞が接合の結果生じた可能性が極めて高いと考えられた。また小型細胞には複相 (2n) と単相 (n) の2タイプの細胞が確認されたことから、少なくとも一部の小型細胞は、減数分裂の結果生じた可能性が示唆された。2nの小型細胞の場合、減数分裂を行う前の段階の可能性と減数分裂を行わずにそのままシスト化する可能性が考えられた。残念ながらシストの直接解析では、核相に関する結果を得ることが出来なかった。しかしながら、栄養細胞と小型細胞の核相に関する本研究の解析結果は、Nakamura *et al.* (1990)とは矛盾しないものであり、シストが2nの核相である可能性が高いことを示した。

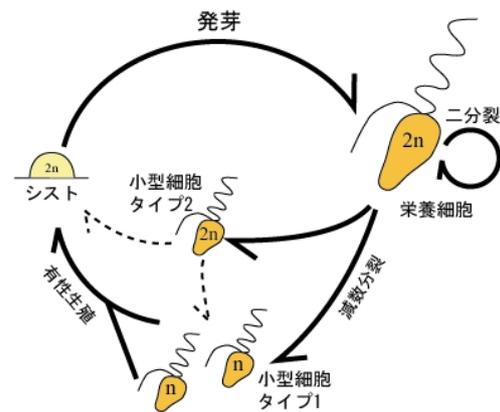


図2. 先行研究と本研究の結果から推定した *Chattonella* の生活史。実線は実験的に確認された経路、破線は推定される経路を示す。

一方、Yamaguchi and Imai (1994)は、栄養細胞は複相で、減数分裂によりシストを形成して単相化すること、そしてシストから発芽する際に無性的な複相化が起きて栄養細胞になると結論づけている。しかし本研究で明らかとなったヘテロ接合体という栄養細胞の核相状態は、有性生殖の関与を強く示唆しており、無性的な複相化では起こり得ないものである。従って、現時点での知見を総合すると、ヘテロ接合体の栄養細胞から、減数分裂で小型細胞が形成され、その接合 (有性生殖) の結果としてシストが形成され、後にシスト

から発芽した細胞が栄養細胞となる一連の生活史が導き出される (図 2)。

本研究によって *Chattonella* の生活史に減数分裂や有性生殖というイベントが含まれていることが、ゲノムレベルの解析から確認できた。しかしこれは Yamaguchi and Imai (1994) の無性的な複相化現象を完全に否定するものではない。実験的に小型細胞や有性生殖の誘導を行い、形成されたシストの直接的な核相解析を行う、あるいは自然界のシストをより詳細に解析することで、*Chattonella* の生活史に関する決定的な証拠が得られるものと期待している。本研究を実施することで、主要な研究手法を確立出来たことから、今後はシストの核相解明に焦点を絞って、生活史の全容解明に向けて取り組んでいきたい。

引用文献

- Demura, M., Kawachi, M., Kunugi, M., Nishizawa, T., Kasai, F. & Watanabe, M.M. (2007) Development of microsatellite markers for the red tide-forming harmful species *Chattonella antiqua*, *C. marina*, and *C. ovata* (Raphidophyceae). *Molecular Ecology Notes*, 7, 315-317.
- 今井 一郎 (1990) 有害赤潮ラフィド藻 *Chattonella* のシストに関する生理生態学的研究. 南西海区水産研究所研究報告. No.23.
- Nakamura, Y., Umemori, T., Watanabe, M., Kulis, D.M., and Anderson, D.M. (1990) Encystment of *Chattonella antiqua* in laboratory cultures. *Journal of the Oceanographical Society of Japan*, 46, 35-43.
- Yamaguchi, M. and Imai, I. (1994) A microfluorometric analysis of nuclear DNA at different stages in the life history of *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* (Raphidophyceae). *Phycologia*, 33, 163-170.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Demura, M., Noël, M.-H., Kasai, F., Watanabe, M. M. and Kawachi, M. (in press) Taxonomic revision of *Chattonella antiqua*, *C. marina* and *C. ovata* (Raphidophyceae) based on their morphological characteristics and genetic diversity. *Phycologia*.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 出村幹英・河地正伸・笠井文絵・渡邊信、マイクロサテライトマーカーを用いた *Chattonella antiqua* (ラフィド藻綱) にお

ける有性生殖の検証、日本藻類学会第 31 回大会、2007 年 3 月 25 日、神戸大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河地 正伸 (KAWACHI MASANOBU)
独立行政法人国立環境研究所・生物圏環境
研究領域・主任研究員
研究者番号：80311322

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし