

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06090

研究課題名(和文) 沖縄の建造物の黒い着色に関連した気生シアノバクテリア株コレクションの構築

研究課題名(英文) Culture collection of terrestrial cyanobacteria related to black stains on Okinawa buildings

研究代表者

須田 彰一郎 (Suda, Shoichiro)

琉球大学・理学部・教授

研究者番号：00359986

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)：気生シアノバクテリアは増殖が遅く、純化はもちろん、単一化も困難で、真菌類の排除に時間を要した。確立された株は、分子遺伝学的に未記載分類群が大半を占め、非常に多様性が高いことが明らかになった。ネンジュモ様分類群、スキトネマ様分類群、単細胞分類群などは、それぞれ個別の分類学的研究の途上である。気生シアノバクテリア株の整備は順調に行うことができたが、それぞれの株について、生理活性物質生産性についても寄託前に検討する必要があることから、関連研究者と検討し、公的株保存機関への寄託を見合わせている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

沖縄の建造物の黒い着色のほとんどは、気生シアノバクテリアの増殖で、分子遺伝学的に非常に多様で未記載分類群が含まれ、世界的にはほとんど利用できる培養株がないことから学術的には分類学的な研究材料として、有効利用の点では紫外線吸収物質や生理活性物質などの有用物質の利用研究に用いることが可能となる培養保存株の確立に成功した。さらに、登録分子情報から、人類が火星で暮らすための研究を行っている米国研究グループからも連携依頼があるなど広がりを見せ、将来にも重要な研究となった。

研究成果の概要(英文)：Terrestrial cyanobacteria grew very slowly, were difficult to purify, and took time to eliminate contaminating fungi. It was revealed that the established strains are highly diverse, with the majority of taxa not described in molecular phylogenetically. Nostoc-like, Scytonema-like, and unicellular taxa are necessary to do taxonomic studies. Although the establishments of terrestrial cyanobacteria strains were successful. It is necessary to examine the secondary metabolites for them before deposition. So we postponed deposit the strains to the public culture collection.

研究分野：藻類学

キーワード：シアノバクテリア ラン藻 気生 カルチャーコレクション 分子系統解析 未記載分類群 分類 16S rRNA

## 1. 研究開始当初の背景

沖縄の琉球石灰岩製の石垣や石積みの黒い着色の主な原因は気生シアノバクテリアの生育であることが知られているが、どのような種類が、どのような生育過程を経て黒い着色に至っているのかに関する情報はほとんどなく、世界的にも情報は少ない。本研究は、琉球大学構内から確立した気生シアノバクテリア株をもとに新たな株の採集・分離も行い、分子系統解析(特に16S rRNA遺伝子塩基配列に基づく)と詳細な形態観察(光学・電子顕微鏡観察)による多相分類法により分類し、正確で利用可能な分類・培養情報を付与した、気生シアノバクテリア株コレクションを確立する。

## 2. 研究の目的

沖縄の世界遺産として知られる首里城や多くのグスクの琉球石灰岩製の石垣や石積みの黒い着色は歴史を感じさせる一方、一般住宅のブロック塀や壁面の黒い着色は、汚れとして認識される場合が多い。その主な原因は気生シアノバクテリアの生育であることが知られているが、どのような種類が、どのような生育過程を経て黒い着色に至っているのかに関する情報はほとんどなく、世界的にも情報は少ない。本研究は、琉球大学構内から確立した気生シアノバクテリア株をもとに新たな株の採集・分離も行い、分子系統解析(特に16S rRNA遺伝子塩基配列に基づく)と詳細な形態観察、光学・電子顕微鏡観察による多相分類法により分類し、正確で利用可能な分類・培養情報を付与した、気生シアノバクテリア株コレクションを確立する。また、分離培養株の生育実験と、石材タイル等を自然条件にさらし、着色過程(増殖過程)を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、ほとんど研究されてこなかった建造物の黒い着色の原因となる気生シアノバクテリアの多相分類学的研究を行う。また、分離培養方法や純化方法の検討を行い、気生シアノバクテリア株コレクションを確立する。このコレクションは、世界的にもユニークで将来的な遺伝子資源として有用と考えられる。本研究で培った方法や技術は東南アジアや太平洋島嶼国など諸外国での研究の発展が期待でき、国際的な研究にもつながる意義深いものとなる。なお、研究は所属する学部生と大学院生(留学生を含む)を指導しながら行う。

・採集・分離培養: 黒変部分の付着藻類がマット状に生育している場合はピンセットなどで採集する。シミのような汚れとして生育している場合はメラミンスポンジに滅菌蒸留水か培養液を染み込ませ、擦り取る。穿孔している場合は一部基質ごと採集する。採集時に生態写真を撮影し、表面温度計などで環境データを計測する。同様の採集を沖縄県内の異なる場所・環境から行い比較する。採集物を実験室に持ち帰り、藻類マットの場合は、倒立顕微鏡か実体顕微鏡で観察しながらスライドガラス上でピンセットを用いて藻類マットを細かくほぐすなどし、メラミンスポンジの場合は絞り出すか直接スライドガラスに擦り付けるなどして、光学顕微鏡観察を行いデジタルカメラで撮影する。黒変部分の主要構成藻類を倒立顕微鏡下で単細胞、単一コロニー、単一糸状体などにほぐし、細く加工したキャピラリーで分離する(ピペット洗浄法)。基本的に培養液は、BG11とBG11-N培地を用い、単藻培養株(クローン株)にする。混在

細菌が多い場合は単離し直し、可能であれば純粋培養方法（抗生物質利用）も検討する。クローンは滅菌した培地に分散して寒天に埋め込む方法（寒天埋め込み法）と寒天プレート上を引きずって他の藻類や細菌を外し拾い上げる方法（引きずり法）、ピペット洗浄法などで行う。寒天の熱で増殖が阻害される場合は、低温アガロースを用いる。

・生育実験：石材タイル（白色の石灰岩製など）を滅菌しておき黒い着色が顕著な壁（大学構内を予定）などの部分の一部を清掃し、生育過程を掲示的に観察し、必要に応じて分離・培養する。

・気生シアノバクテリアコレクションの構築：未整理株と新規分離株から単一シアノバクテリアで16S rRNA遺伝子部分塩基配列情報のある株を少なくとも30株構築し公開する。公開は、公的株保存機関である国立環境研究所微生物系統保存施設への寄託をすることで行う。

#### 4. 研究成果

気生シアノバクテリア株の整備は順調に行うことができたが、それぞれの株について分類学的な結論を付与する必要があると、完全な形で公的株保存機関への寄託は見合わせている状況にある。また、生理活性物質生産性についての情報も合わせて付与することから、関連する研究者と今後について検討をしている。

気生シアノバクテリアは増殖が遅く、純粋培養株はもちろん、単一シアノバクテリア株にすることでさえも困難な場合が多く、真菌類の混入を排除するにも時間がかかった。

具体的に分類学的な状況についていくつか例をあげる。*Nostoc* 様分類群は、分子伝学的に真の *Nostoc* 属である、*N. commune* とは異なる系統群で構成されていることが明らかにできた。16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析により、*Desmonostoc* 属の未記載種が数株、Ryu12-5 株については最も近縁な分類群は *Violetnostoc minutum* ではあるが、16S-23S ITS 領域の二次構造解析により未記載分類群となる。系統的に *N. commune* と異なり分類学的な整理が必要な *Nostoc* 属とされている分類群に近縁な株、ブラジルから報告された *Amazonocrinis* 属に近縁な分類群などから構成されており、非常に多様性が高く、一つ一つについて分類学的な整理が必要な状況にある。現状では大学院の修士学生に *Nostoc* 様分類群に関する研究で修士論文をまとめている。一方、*Scytonema* 属および *Brasi Ionema* 属については、博士過程学生の主要な研究テーマとして進め、分子遺伝学的に既知分類群に一致する株は無く、これらについても同様に分類学的整理が必要な状況を明らかになった。単細胞のシアノバクテリアについても同様な状況で、それぞれ研究をまとめる必要がある。研究の一部は、沿岸域の糸状シアノバクテリアの分類学的研究と現状のシアノバクテリアの分類に関して研究報告を行なった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 須田彰一郎・Philipus Uli Basa Hutabarat・Nuryadi Handung・上原洋志	4. 巻 70
2. 論文標題 シアノバクテリア/ラン藻の分類の現状と今後	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 藻類	6. 最初と最後の頁 13-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Handung Nuryadi, Shoichiro Suda	4. 巻 70
2. 論文標題 Revealing the species diversity of Neolyngbya (Cyanobacteria, Oscillatoriales) from subtropical coastal regions of Okinawa, Japan, with descriptions of Neolyngbya intertidalis sp. nov. and Neolyngbya latausa sp. nov.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Phycological Research	6. 最初と最後の頁 69-80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pre.12482	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Handung Nuryadi, Shipei Sumimoto, Shoichiro Suda
2. 発表標題 Undescribed speices of Nodisilinea isolated from terrestrial habitat in University of the Ryukyus campus area, Okinawa
3. 学会等名 12th International Phycological Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須田彰一郎、Hutabarat P.U.B., Nuryadi H., 澄本晋平
2. 発表標題 琉球大学構内から分離培養された単細胞ラン藻 Ru3-11株について
3. 学会等名 日本藻類学会第44回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上原洋志・澄本慎平・須田彰一郎
2. 発表標題 琉球大学で確立されたVioletostoc 属に近縁な分離培養株について
3. 学会等名 日本藻類学会第46回大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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