

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：23401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15585

研究課題名(和文) 極小の単細胞ピコ藻類における生活史ステージ転換現象の究明

研究課題名(英文) Life cycle stage transition in the tiny phytoplankton

研究代表者

山田 和正 (Yamada, Kazumasa)

福井県立大学・海洋生物資源学部・助教

研究者番号：20778401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：パルマ藻の一部は、生活史中に二つのステージ、すなわち、シリカの殻を持ち無鞭毛の不動性ステージと、鞭毛を持ち無殻の遊泳性ステージを持つ。本研究では、両ステージの生理学的な違いとステージ転換の仕組みを理解するため、培養株の性状解析を進めた。葉緑体の自家蛍光強度にステージ間差があることに基づいてセルソーターで両ステージを区別して分取する方法を確立した。株は、遊泳性ステージが出現しない株と、常に遊泳性ステージが存在する株の2つに分けられ、少なくとも本研究に用いた継代培養条件下では、ステージの転換は誘導されないことが示唆された。また、増殖速度の解析から光強度への適応性にステージ間の違いが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物プランクトンの多くは栄養世代が1つで、世代交代をするグループは例外と考えられてきた。しかし近年、多様な系統において世代交代の現象が見出されており、それらの生物が世代交代をする意義や仕組みの解明が求められている。本研究で対象としたパルマ藻は、寒冷海域の基礎生産者としての重要性が示されつつある生物である。本生物には不動性と遊泳性の2つのステージの存在が知られていたものの、両ステージの培養株中の動態や生理学的な違いは不明であった。本研究では培養株中の両ステージの出現動態を長期モニタリングすることに成功し、ステージ間の光環境への適応に違いを見出した。

研究成果の概要(英文)：Some bolidophytes have two stages in their life cycle: a non-motile stage with a siliceous cell wall, and a naked motile stage. To reveal the physiological differences between the two stages and the mechanism of stage transition, we analyzed the characteristics of the culture strains. Based on the differences in chloroplast autofluorescence intensity between the two stages, we established a method to distinguish the stages using a cell sorter. The strains were classified into two types: strains without the motile stage and strains with the motile stage, suggesting that stage transitions are not induced, at least under the culture conditions used in this study. In addition, the growth rate analysis revealed differences in the adaptation to light intensity between the two stages.

研究分野：藻類生理学、細胞生物学

キーワード：植物プランクトン 生活史 世代交代 パルマ藻 ポリド藻

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ピコ藻類(細胞直径が3 µmにも満たない極微小な単細胞藻類)の生活史として、休眠期の報告はあったが、栄養細胞期は単に細胞分裂による増殖を繰り返すと考えられてきた。しかし、ピコ藻類の一種でシリカの殻を持つパルマ藻の生活史には、殻を持つ不動性の細胞以外にも、無殻で鞭毛を持つ遊泳性の細胞や、オルガネラ数が増大した細胞が確認されており、それらの一部は増殖能を有する可能性が示されてきた。これは、1種のピコ藻類が環境条件の変化に応じて生活史期を転換し、まるで別生物かのように形態を変化させ増殖し得ることを示唆している。しかし、パルマ藻のステージ転換の仕組みや意義には不明点が多かった。

2. 研究の目的

予備的な解析において、パルマ藻の培養株中には、形態や運動性の異なる複数のステージが貧栄養の培養条件下で見出されていたが、ステージ間の生理特性の違いは不明であった。本研究では、パルマ藻の生活史の実態、具体的には、各生活史期の適応環境と遺伝子発現パターンの違いの解明を目指し、培養株中に少量出現する遊泳性ステージの出現動態のモニタリングや、両ステージの分取手法の確立、不動性ステージとの適応環境の違いの解明に取り組んだ。

3. 研究の方法

実験には主にパルマ藻 *Triparma laevis* f. *longispina* 株を用いた。また、遊泳性ステージの蛍光顕微鏡下での見え方や、セルソーターによる細胞解析時の散乱光・自家蛍光強度の特徴を理解するための比較対象として、遊泳性ステージのみからなるボリド藻 *Triparma* sp. RCC1657 株を利用した。培養には人工海水培地を用い、実験はバッチ培養で実施した。細胞形態は、正立顕微鏡および走査型電子顕微鏡(SEM)、透過型電子顕微鏡(TEM)で評価した。また、細胞分取機能のついたフローサイトメーターを用いて、不動性ステージと遊泳性ステージそれぞれの割合の算出や分取を行った。

4. 研究成果

既存のパルマ藻 *T. laevis* f. *longispina* の培養株の内、一部の株に遊泳性ステージが不動性ステージと混在していることが示されていたが、バッチ培養による継代培養期間中に不動性ステージからの転換で遊泳性ステージが生じているのか、それとも細胞分裂により不動性ステージとは独立に遊泳性ステージが増殖しているのかは明らかでなかった。この点を検証するため、約130日間の継代培養期間中、不動性ステージと遊泳性ステージを区別した細胞計数を実施し、出現頻度をモニタリングした。

その結果、既存の培養株は、培養期間を通して不動性ステージのみが存在する株と、不動性ステージと遊泳性ステージが混在する株の2つのタイプに分けられた。混在株において、遊泳性ステージの存在比率は0.2~3.9%と常に遊泳性ステージよりも割合が低かった。新しい培地へ移行した後の両ステージの細胞増殖を解析すると、どちらも指数関数的な増殖が認められ、それぞれが細胞分裂により増殖している可能性が示された。顕微鏡観察では、核や鞭毛の数が倍加した分裂細胞と考えられる遊泳性ステージの細胞が確認された。以上の結果は、本研究に用いた培養条件下では、少なくともステージの転換は誘導されず、各ステージはそれぞれ独立に分裂で増殖していることを示唆した。ステージ転換の起こらない培養条件は、両ステージの細胞増殖解析に活用可能であると考えられた。

そこで異なる光強度条件下で混在株を培養し、両ステージの細胞増殖速度を評価した。その結果、不動性ステージの最大比増殖速度は弱光条件の1.5倍に留まったが、遊泳性ステージの最大比増殖速度は弱光条件の3.2倍にまで高まった($n=3$, $P<0.01$)。この結果は、遊泳性ステージが不動性ステージよりも強光条件に適応的であることを示唆した。

ゲノム解析からはボリド藻は捕食性の混合栄養能を持つことが示唆されている。*Triparma* sp. RCC1657 株は、*T. laevis* f. *longispina* 株と分子系統的にごく近縁で、不動性ステージを進化の過程で二次的に失ったと推測されている。両株の遊泳性ステージについて形態学的な比較を進めた結果、少なくとも本研究で用いた培養条件下では、*Triparma* sp. RCC1657 株と比べ混在株中の遊泳性ステージは葉緑体の体積が顕著に小さいという結果が得られた。混在株中の遊泳性ステージは、貧栄養下を細菌捕食等の不動性ステージにはない機能を用いて生存するために出現するという作業仮説を立て、蛍光ビーズおよびシアノバクテリアを餌とした混合栄養能の検証を目指した。フローサイトメーターを用いて、各生物種および蛍光ビーズの散乱光と蛍光のプロパティを特徴付けることで、混合栄養性の検証手法を概ね確立するに至ったが、細胞固定液の組成と固定時間が蛍光強度に影響することが示されたため、この点については今後追加の検討が必要である。また、混在株中の鞭毛ステージの割合を高める代替の手法として、葉緑体の自家蛍光強度と前方散乱光強度(細胞サイズ)に基づくセルソーティングを試みた結果、鞭毛ステージの割合を分取前の3.5%から $91.7 \pm 6.2\%$ ($n=3$)にまで濃縮することが可能であった。ステージ別の分取方法は今後、本生物の世代交代研究を進展させる上での活用が期待される。

その他、両ステージの転換条件や世代交代の意義を探る実験として、ステージ間の発現遺伝子の比較や元素組成解析を進めている。微量元素を含む 15 元素を対象とした ICP-MS による定量分析の予備的な結果では、遊泳性ステージの細胞が、他の植物プランクトンよりも顕著に高い Ni 含量を示すことが見出されている。現時点では、遊泳性ステージとの比較が不十分であるため、今後、解析数を増やすことで、ステージ間の生理学的な差異の解明につなげることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yamada K., Sato S., Yamazaki M., Yoshikawa S., Kuwata A., Ichinomiya M.	4. 巻 68
2. 論文標題 New clade of silicified bolidophytes that belong to Triparma (Bolidophyceae, Stramenopiles)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Phycological Research	6. 最初と最後の頁 178 ~ 182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pre.12413	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 0件）

1. 発表者名 桑田晃, 伴広輝, 中村洋路, 山田和正, 佐藤晋也, 吉川伸哉, 緒方博之, 一宮睦雄
2. 発表標題 珪藻の進化・繁栄の謎を握る未知の藻類: パルマ藻の生物学
3. 学会等名 日本海洋学会2023年度秋季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田和正, 佐藤晋也, 吉川伸哉, 桑田晃, 一宮睦雄
2. 発表標題 パルマ藻と未記載藻スケールパルマ藻の微細構造学的比較
3. 学会等名 2020年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新川裕大, 山田和正, 吉川伸哉, 桑田晃, 一宮睦雄, 佐藤晋也
2. 発表標題 新規に分離されたパルマ藻Tetraparma属の分子系統解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020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
---------	---------