

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：21247005

研究課題名（和文）琵琶湖のクロロフィル *d* 生産生物の実体とクロロフィル *d* の生態学的意義に関する研究研究課題名（英文）Studies on the identification of chlorophyll *d* producer and the ecological significance of chlorophyll *d* in Lake Biwa

研究代表者

宮下 英明（MIYASHITA HIDEAKI）

京都大学大学院人間・環境学研究科・教授

研究者番号：50323746

研究成果の概要（和文）：本研究では、琵琶湖に検出されるクロロフィル *d* 生産者が淡水性の *Acaryochloris* 属シアノバクテリアであること、成層期には水深0 - 20 mおよび40 - 50 m付近に *Acaryochloris* spp. の分布ピークが出現することを明らかにした。また、クロロフィル *d* が水深の深い場所での生残に有利に働いている可能性を示した。さらに、この過程においてクロロフィル *f* を生産するシアノバクテリアの分離に成功した。

研究成果の概要（英文）：We identified that the Chl *d*-producer in Lake Biwa was freshwater cyanobacteria in the genus *Acaryochloris*. Their distribution was detected in two independent depths at 0 - 20 m and 40 - 50 m during the stratified periods. The possession of Chl *d* might have advantage to absorb blue-green light which remained at the deeper water. We also isolated Chl *f*-producing cyanobacterium during this study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2010年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2011年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2012年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
年度			
総計	27,700,000	8,310,000	36,010,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学，生態・環境

キーワード：クロロフィル *d*，微生物生態，琵琶湖，生態的地位，シアノバクテリア

### 1. 研究開始当初の背景

クロロフィル *d*（以降 Chl *d* と略記）は、さまざまな大型紅藻類から微量に検出される Chl *a* とは異なる第二のクロロフィルとして1943年に報告された。その後、必ずしも特定の紅藻類から常に検出されるわけではないこと、また、Chl *a* の酸化によって生成されることが報告され、色素抽出過程において生成する副産物であり天然には存在しないという理解が広まっていた。研究代表者は、Chl *d* を主要光合成色素とするシ

シアノバクテリア *Acaryochloris marina* を世界に先駆けて発見し、Chl *d* が天然に存在する色素であること、Chl *d* を主クロロフィルとして生存するシアノバクテリアが存在することを明らかにした（Nature 1996）。*A. marina* が熱帯海域であるパラオ諸島沿岸に棲息する群体ホヤ体腔内の共生生物として分離されたことから、当時はその分布が限られていると考えた。しかしその後、淡路島沿岸で採取した紅藻から Chl *d* を検出し、ここから検出される Chl *d* の真の生産

者が、紅藻自体でなく紅藻に付着する *Acaryochloris* 属のシアノバクテリアであることを突き止めた (Science 2004)。これにより Chl *d* が紅藻類に不安定に検出されたことが説明可能になったとともに、紅藻類の着生生物として *Acaryochloris* 属のシアノバクテリアが沿岸域に広く分布していることが容易に類推できた。そこで *Acaryochloris* 属のシアノバクテリアを特異的に検出できる PCR-DGGE 系を構築し、分布調査したところ、日本沿岸のみならず世界の沿岸域に広く分布すること、分子系統解析の上では種レベルで異なる多様性があることが明らかになった。さらに、ベーリング海、日本沿岸、琵琶湖、南極湖沼から採取した底泥コア表層には、いずれのサンプルにも Chl *d* およびその分解生成物が、Chl *a* 量に対して数パーセント存在していたことから、Chl *d* を含む生物が海洋だけでなく淡水湖沼を含めた様々な水圏環境に広く分布していることを明らかにした (Science 2008)。

これまで知られている Chl *d* 生産生物は *Acaryochloris* 属シアノバクテリアのみである。いずれの分離株も海洋や塩湖など塩分を含む環境から分離されているうえ、基準株は 1.5% 以下の塩濃度環境では生育できない。これらのことから琵琶湖で検出された Chl *d* について、1) その Chl *d* 生産生物は何か、2) その生物は琵琶湖において、いつ、どこに、どれくらい出現するのか、一次生産にどの程度寄与しているのか、3) 琵琶湖において Chl *d* がどのように優位に働いているのか、4) 他の陸域水圏には分布しないのか、についての疑問が発生した。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、琵琶湖において検出された Chl *d* について、1) その生産生物の実体を解明し、2) その生物の分布状況を明らかにするとともに、その生物の光合成特性から Chl *d* 生産生物が果たしている一次生産量を見積る、同時に、3) Chl *d* 生産生物がニッチ (生態的地位) を獲得する際の Chl *d* の優位性を明らかにする、さらに、4) 琵琶湖以外の陸域水圏における Chl *d* 生産生物の分布とその多様性を明らかにする、ことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 湖水サンプルの定期層別採水と環境計測

琵琶湖における採水には、滋賀県琵琶湖環境科学研究センターの「はっけん号」を利用させていただいた。採水ポイントは琵琶湖北湖の湖心付近 (N4 地点: 35° 22' 44" N, 136° 5' 43" E, 水深約 90 m) とした。表層からか

ら 10 m ごとに 90m まで採水した。採水時の層別の水温、濁度、溶存酸素濃度、pH、Chl *a* 濃度、電気伝導度は、CTD (Conductivity Temperature and Depth profiler) により測定した。

### (2) 深度別 PCR-DGGE による微細藻類群集構造解析

深度別に採水した湖水を GF/F ガラス濾紙 (φ 25 mm) で吸引ろ過し、濾紙上の細胞から全 DNA を抽出した。これを鋳型 DNA として、シアノバクテリアおよび真核藻類葉緑体の 16S rRNA 遺伝子の部分断片を PCR によって特異的に増幅した。その際フォワードプライマーに GC-341F (Muyzer, 1995)、リバープライマーに CYA781R (Nübel, 1997) を用いた。得られた PCR 産物を DGGE によって分離し、互いに移動度の異なるバンドを切り出してその塩基配列を決定した。得られた塩基配列情報を用いて、BLAST 検索によって相同性の高い配列を検索し、生物種の推定を行った。

### (3) Chl *d* 生産生物の分離と培養株の確立

琵琶湖沿岸の湖水ならびに石やコンクリートブロック等の構造物に付着する藻類マットを採集し、ピーク波長 726 nm の LED 光源を用いた遠赤色光射下において、BG-11 培地中で集積培養した。生育した微細藻類をピペット法で単離した。培養後に HPLC による色素組成分析によって Chl *d* の有無を調べ、Chl *d* を含むものを琵琶湖における Chl *d* 生産生物とした。

### (4) DNA 解析と分子系統解析

Chl *d* 生産生物培養液から細胞を回収し DNA を抽出した。これを鋳型としてフォワードプライマーに PLG1.1 (Urbach ら, 1992)、リバープライマーに CYA1371Rmix (Murakami ら, 2006) を用いて 16S rRNA の部分断片を PCR 増幅した。得られた DNA 断片の塩基配列を決定し、BLAST 検索によって相同性の高い配列を検索したうえで、近縁と考えられる生物種の配列とともに、分子系統解析をおこなった。

### (4) リアルタイム PCR 法を用いた *Acaryochloris* sp. の特異的定量

琵琶湖湖水 1 L を GF/F ガラス濾紙 (φ 25 mm) で吸引ろ過し浮遊生物を回収・洗浄後、ビーズ破砕法により DNA を抽出した。これを鋳型 DNA として *Acaryochloris* 属シアノバクテリアに特異的であるフォワードプライマー AcaryoSPF (5' -AGGAGCTTGCTCCTTGGTGG-3') ならびに本研究によって新たに開発した *Acaryochloris* 属シアノバクテリア特異的リアルタイム PCR 用リバープライマー R5 (5' -GTATTAGCAGTCGTTTCCAAGT-3') を用

いて *Acaryochloris* 属シアノバクテリアの定量を行った。定量の際には、内部標準として鋳型 DNA サンプルに対して一定量の *Synechocystis* PCC6803 の DNA を加えて同時に定量した。

(5) 下方放射スペクトルおよび細胞の吸収/励起/蛍光スペクトルの測定

水深ごとの下方放射スペクトルの測定は、小型マルチチャンネル分光器 (OP-USB4000, Ocean Optics Inc 製) に光ファイバーを接続して行った。シアノバクテリア細胞の吸収スペクトルの測定には積分球をとりつけた UV2450 (島津製作所製) を用いた。励起スペクトルならびに蛍光スペクトル測定には、蛍光分光光度計 (F-2700, 日立ハイテクノロジーズ製) を用いた。

(6) 琵琶湖以外の古代湖における *Acaryochloris* spp. の有無の検出

琵琶湖と同様に古代湖として知られているタンガニーカ湖およびバイカル湖のサンプルを許可を得て譲り受け、DNA 抽出後、*Acaryochloris* 属シアノバクテリア特異的フォワードプライマー AcaryoSPF, リバースプライマーに CYA1371Rmix (Murakami ら, 2006) を用いて PCR 増幅し、増幅産物の有無によって *Acaryochloris* 属シアノバクテリアの有無を評価した。

4. 研究成果

(1) 琵琶湖北湖湖心における藻類群集構造解析

2009 年 4 月から翌年 3 月に琵琶湖北湖 N4 地点において表層から湖底直上まで 10 m おきに植物プランクトンの多様性とその周年変動を PCR-DGGE によって解析した (図 1)。

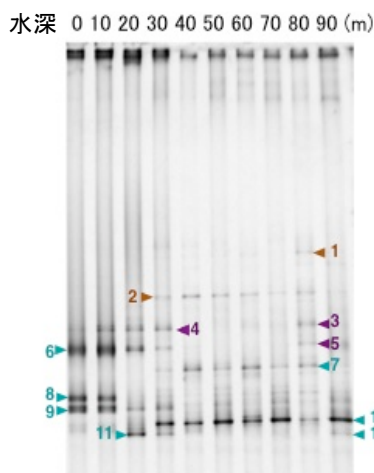


図 1 琵琶湖北湖における植物プランクトンの垂直分布 (2009 年 8 月 24 日採取)  
矢頭 7 のバンドが *Acaryochloris* sp.

その結果、5 月から 10 月のサンプルから *Acaryochloris* sp. が検出され (図 1, バンド 7), 琵琶湖に浮遊性の *Acaryochloris* sp. が存在することが明らかになった。特に成層期の 8 月および 9 月には、光合成に有効な光が殆どないと考えられる水深 40 m~80 m にも広く検出された。

(2) 琵琶湖から分離された *Acaryochloris* sp.

北湖沿岸の岩に付着したバイオフィームならびに琵琶湖湖水を BG-11 培地に接種し、遠赤色 LED 光源下での集積培養によって生育藻類の色素組成分析によって、Chl *d* 含有生物を 1 株の分離に成功した。この生物は、1.4-1.6 μm の球形あるいは楕円球形の単細胞原核生物で、付着性の黄緑色のコロニーを形成した (図 2)。この株は淡水藻類用培地である BG-11 培地に生育し、NaCl 濃度 1.0% 以上の培地中では生育が見られなかった。色素組成は、Chl *d* を主要色素とし微量の Chl *a* を含み、海産の *Acaryochloris marina* とほぼ同じであった。16SrRNA の部分配列約 1.3k を決定し BLAST によって相同性検索したところ、海洋や塩湖から分離された *Acaryochloris* と 96.5-97.0% の相同性をもち、分子系統解析では、*Acaryochloris* クレードの最も根元から分岐した (図 3)。これらの結果は、琵琶湖底泥に検出される Chl *d* の生産者がこれまで淡水域での分布が知られていなかった *Acaryochloris* 属シアノバクテリアであることを示すとともに、淡水環境にも *Acaryochloris* 属シアノバクテリアが広く分布する可能性を示唆した。

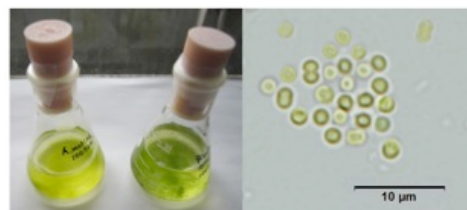


図 2 琵琶湖から分離された Chl *d* 生産生物

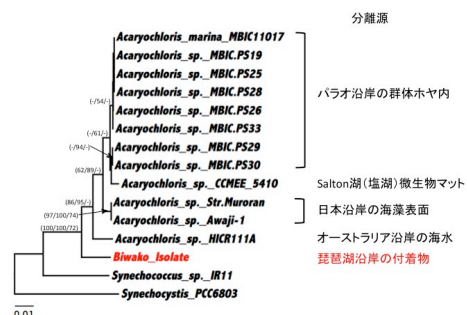


図 3 琵琶湖から分離された Chl *d* 生産生物の分子系統関係  
NJ 法 (1252 塩基) HKY85, ブートストラップ 1000 回試行 (MP/NJ/ML)

(3) 琵琶湖北湖湖心における *Acaryochloris* sp. の垂直分布

琵琶湖の湖水を深度別に採取し、Real-time PCR 法を用いて *Acaryochloris* spp. 16SrRNA 遺伝子の検出・定量を行ったところ、成層期における *Acaryochloris* spp. の分布極大が、温度躍層よりやや浅い表層-10m と温度躍層より深い 40-50m に検出された(図4)。両ピークにおける *Acaryochloris* spp. 検出量は、表層および水深 50m においてそれぞれ  $9.3 \times 10^3$ ,  $1.2 \times 10^3$  copies/L であった。これに対して、シアノバクテリアおよび葉緑体の同じ水深における検出量はそれぞれ  $1.5 \times 10^7$ ,  $0.13 \times 10^7$  copies/L であった。従って総藻類 DNA コピー数に占める *Acaryochloris* spp. の割合はそれぞれの水深において 0.06%, 0.09% であった。

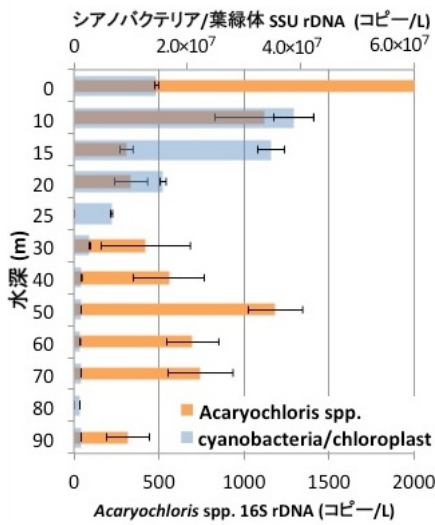


図4 リアルタイム PCR 法による *Acaryochloris* spp. と藻類総量の定量 (2011年8月11日採取サンプル)

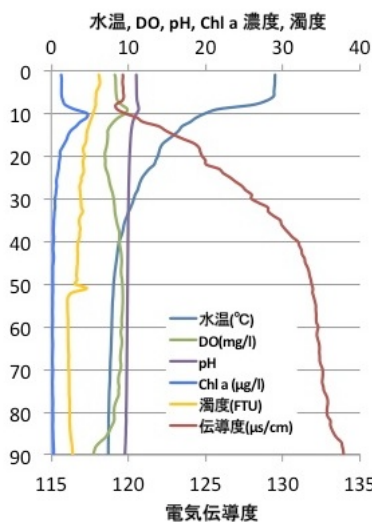


図5 湖水採取時の物理化学環境データ (2011年8月11日調査)

成層期の *Acaryochloris* spp. の分布極大が表層から温度躍層と水深 40 m - 50 m 付近に存在することは2011年-2012年の夏季調査において同様の結果が得られた。また、40-50 m 付近に濁度や温度の変化等の物理化学的変動が見られない(図5)ことから、琵琶湖にはニッチの異なる *Acaryochloris* spp. が存在することが示唆された。

(4) 琵琶湖湖水中における下方放射スペクトルと *Acaryochloris* sp. の光吸収

2011年8月11日調査の深度別下方放射スペクトルを図6に示した。水深4mでは波長700nm以上の遠赤色光が大幅に減衰し、水深8m以深では検出限界以下であった。水深12m以深では、波長450-600nmの青緑色光が優勢していた。

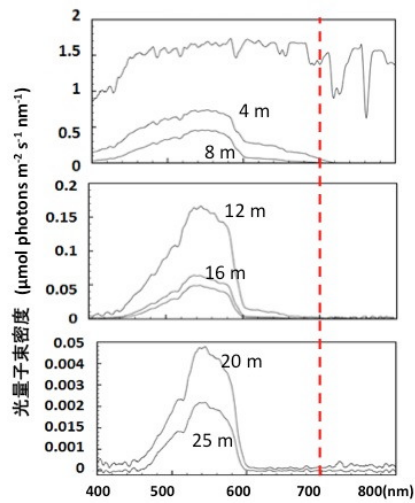


図6 湖水中における下方放射スペクトル (2011年8月11日調査：晴れ)

この下方放射スペクトルデータから40m以深に分布する *Acaryochloris* spp. が Chl *d* を利用することが、少なくとも遠赤色光の吸収に有利に働いているとは考えられないことから、琵琶湖から分離された *Acaryochloris* sp. の蛍光/励起スペクトルの測定を行い光合成に利用可能な光の推定を行った(図7)。

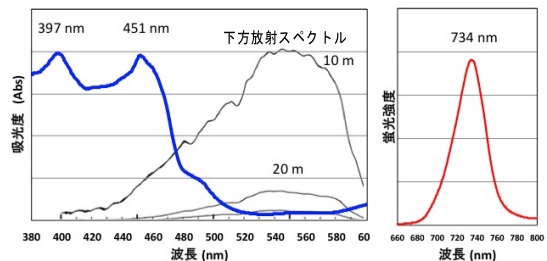


図7 琵琶湖から分離された *Acaryochloris* sp. の室温における光励起スペクトル(em. 734 nm) (左)と蛍光スペクトル(右)



図 7 の励起スペクトルを測定結果から、*Acaryochloris* spp. は、深層に透過してくる光のうち 460 nm 付近の光を Chl *d* の吸収によって利用できることがわかった。一方で、Chl *a* を利用する他のシアノバクテリアには効率的に利用できないこともわかった。これらのことから、琵琶湖の浮遊性 *Acaryochloris* spp. が Chl *d* をもつことの適応的意義は、遠赤色光を利用することよりはむしろ 460 nm 付近の青色光を吸収・利用することによって、ニッチを獲得することにあると考えられた。

#### (5)他の古代湖における *Acaryochloris* 検出の試み

タンガニーカ湖およびバイカル湖の微生物マットサンプルについて、特異的プライマーを用いて *Acaryochloris* spp. の増幅を試みたところ、増幅断片が得られなかった。このことはすべての湖沼に存在するわけではないこと、また古代湖であることが重要なわけではないことを示唆する。

#### (6)Chl *f* 生産生物の単離と特性解析

Chl *d* を利用する淡水藻類の分離を目的として、琵琶湖沿岸で採取した付着藻類を近赤外光 LED を光源として集積培養したところ、淡水性の *Acaryochloris* 株に加えて、別のシアノバクテリア KC1 株が分離された (図 8)。色素分析の結果、KC1 株には Chl *d* が含まれていなかったものの、主要色素の Chl *a* に加えて近赤外領域に吸収をもつ未知のクロロフィルが検出された。KC1 株は直径 2-3 μm の単細胞球形で、分子系統解析の結果から新属新種のシアノバクテリアであると考えられた。

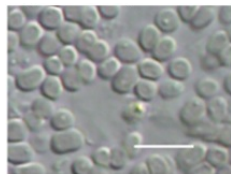


図 8 新規シアノバクテリア KC1 株の光学顕微鏡像 スケール：5μm

未知クロロフィルはメタノール中で波長 406, 708 nm に吸収極大を示し、吸収スペクトルと HPLC 分析での保持時間から Chl *f* であると考えられた (図 9)。Chl *f* は、オーストラリア沿岸のストロマトライトに生息するシアノバクテリアから近年新しく発見された光合成色素である。この色素は、波長 700-730 nm の遠赤色光を吸収することができる。

KC1 株を青色光、赤色光、遠赤色光の各 LED および蛍光灯を光源として培養し色素分析したところ、Chl *f* は遠赤色光で培養した細胞のみに検出された (図 10)。

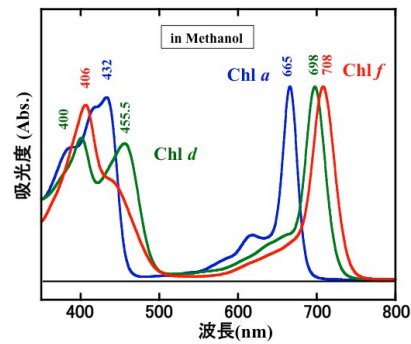


図 9 Chl *a*, *d*, *f* の吸収スペクトル (メタノール中)

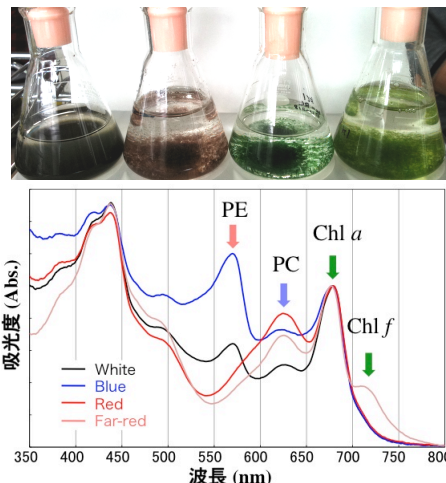


図 10 各種光質下で培養した KC1 株細胞懸濁液の写真(上)と細胞の吸収スペクトル(下)

さらに、白色光下で培養した細胞を遠赤色光下に移すと、Chl *f* の含有量が徐々に増加することがわかった。つまり Chl *f* は遠赤色光だけを照射した時につくられる誘導色素であった。以上の結果から、KC1 株は、遠赤色下において Chl *f* を合成するという新奇な光質適応によって、遠赤色光を光合成に利用するシアノバクテリアであると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. S Ohkubo, H Miyashita, Selective detection and phylogenetic diversity of *Acaryochloris* spp. that exist in association with didemnid ascidians and sponge, *Microbes and Environments*, 27; 217-225 (2012) 10.1264/jsme2.ME11295, 査読有
2. 宮下英明, 「光合成再考」-光エネルギー利用機構の多様性, 生物の科学「遺伝」66; 413-419 (2012) 査読無し
3. S Akutsu, D Fujinuma, H Furukawa, T

Watanabe, M Ohnishi-Kameyama, H Ono, S Ohkubo, H Miyashita, M Kobayashi, Pigment analysis of a chlorophyll *f*-containing cyanobacterium strain KC1 isolated from Lake Biwa, *Photomedicine and Photobiology*, 33:35-40 (2011) 査読有

〔学会発表〕(計 52 件)

1. 宮下英明, シアノバクテリアの光合成色素の多様性とニッチ, 第 28 回日本微生物生態学会大会, 2012. 9. 21. 豊橋技術科学大学
2. 酒井翔太, 成田隆造, 大久保智司, 石川可奈子, 宮下英明, 琵琶湖における *Acaryochloris* spp. の鉛直分布とクロロフィル *d* の適応的意義, 第 28 回日本微生物生態学会大会, 2012. 9. 20-21, 豊橋技術科学大学
3. 成田隆造, 大久保智司, 石川可奈子, 宮下英明, 琵琶湖湖心の鉛直方向における *Acaryochloris* spp. の量的分布, 日本地球惑星科学連合 2012 年大会, 2012. 5. 20. 幕張メッセ国際会議場
4. 大久保智司, 宮下英明, クロロフィル *d* 含有シアノバクテリアの分布と多様性, 日本地球惑星科学連合 2012 年大会, 2012. 5. 20. 幕張メッセ国際会議場
5. 成田隆造, 大久保智司, 石川可奈子, 宮下英明, 琵琶湖湖心における Chlorophyll *d* 含有シアノバクテリア *Acaryochloris* spp. の鉛直分布, 日本陸水学会近畿支部会第 23 回研究発表会, 2012. 3. 4, 奈良教育大学
6. 成田隆造, 大久保智司, 石川可奈子, 宮下英明, 琵琶湖湖心における *Acaryochloris* spp. の垂直分布 -Chl *d* の有するもう一つの生態学的意義について-, ラン藻の分子生物学 2011, 2011. 12. 2. かずさアカデミアホール
7. 宮下英明, すべては偶然から -クロロフィル *d* をもつシアノバクテリアの発見と微生物生態学-, 第 27 回日本微生物生態学会大会, 2011. 10. 10. 京都大学
8. 細川由貴, 大久保智司, 石川可奈子, 宮下英明, 分子生物学的手法を用いた琵琶湖北湖の植物プランクトンの多様性解析, 日本地球惑星科学連合 2011 年度大会, 2011. 5. 26. 幕張メッセ国際会議場
9. 宮下英明, 光合成生物の多様性と一次生産者のパラダイムシフト, 日本地球惑星科学連合 2011 年度大会, 2011. 5. 26. 幕張メッセ国際会議場
10. 細川由貴, 大久保智司, 石川可奈子, 宮下英明, HPCR-DGGE 法を用いた琵琶湖北湖の植物プランクトンの多様性と周年

変動解析, 日本藻類学会第 35 回大会, 2011. 3. 28. 富山大学

11. 宮下英明, 森涼子, 大久保智司, 琵琶湖から分離した *Acaryochloris* sp. (シアノバクテリア), 日本藻類学会第 35 回大会, 2011. 3. 27. 富山大学
12. 大久保智司, 細川由貴, 石川可奈子, 宮下英明, 琵琶湖湖水中におけるクロロフィル *d* 含有シアノバクテリアの分布と遺伝的多様性, 第 26 回微生物生態学会, 2010. 11. 24. 筑波大学
13. 細川由貴, 大久保智司, 石川可奈子, 宮下英明, 琵琶湖湖心における植物プランクトン群集構造の垂直分布と周年変動, 日本陸水学会 第 75 回大会, 2010. 9. 18. 弘前大学
14. 宮下英明, 森涼子, 薄井寛子, 大久保智司, 琵琶湖から分離された chlorophyll *d* 含有シアノバクテリア, 日本植物学会第 74 回大会, 2010. 9. 9. 中部大学
15. H Miyashita, Distribution of *Acaryochloris* species and possible contribution of chlorophyll *d* to the global carbon cycle, The 5th German-Japan Binational Seminar "From Photoreaction to Biomass: Phototrophs in Ecosystems and Biotechnology", 6 June, 2009, Tsukuba University
16. 宮下英明, クロロフィル *d* の検出, 第 70 回分析化学討論会, 2009 年 5 月 16 日, 和歌山大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮下 英明 (MIYASHITA HIDEAKI)

京都大学大学院人間・環境学研究科・教授  
研究者番号: 50323746