

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30日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2012

課題番号：21247010

研究課題名（和文） 藻類・プロティスト複合系の多様性研究の基盤構築

研究課題名（英文） Basal construction studies for the diversity of algae-protist complexes.

研究代表者

井上 勲 (INOUE ISA0)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：70168433

研究成果の概要（和文）：水圏生態系における真核微生物と環境物質の多様性の形成・維持・崩壊に関わる要因や関係性を包括的に理解するための手法開発を目的とし、環境サンプルの顕微鏡観察、メタボローム解析、クロロフィル代謝物分析、メタゲノム解析を実施した。総合解析の結果、生物相の時空間変動に伴って変動する有機成分の存在や、プロティストの捕食活性指標となりうる代謝物質を特定した。また調査地から単離した培養株を用いて、未記載種や再考が必要な分類群の系統分類学的研究を行った。

研究成果の概要（英文）：Understanding the dynamics of establishment, maintenance and collapse of the diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic ecosystems, and the interaction among those organisms and interrelation between the organisms and environmental organic matter, are important issues of aquatic microbial biology. To evaluate factors that determine these dynamics, we conducted analyses of metabolomics, metagenomics and chlorophyll derivatives, along with microscopic observations. We identified some organic matter whose quantities increased or decreased coupled with the spatio-temporal changes of the biome. We also found a metabolite that can be a new biomarker to detect the predatory activity of protists. Furthermore, algae and protists requiring taxonomic re-evaluation were examined using established cultures.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	12,400,000	3,720,000	16,120,000
2010年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2011年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2012年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
総計	34,700,000	10,410,000	45,110,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：環境，進化，分類学，生態学，原生生物

1. 研究開始当初の背景

真核生物の研究は、動物、植物、菌類のモデル生物を対象にして発展してきたが、微細

構造と分子系統研究から、真核生物多様性の大部分は、藻類とプロティストが占めていることがわかってきた(e.g. Baldauf 2003)。これ

らのいわゆる真核微生物は、現在でも多くが未知の生物であり、分類、多様性、系統など基礎的な情報が極端に不足している。これらは、自然環境中で微生物食物連鎖(microbial food web)を介して緊密に相互作用し、地球生態系の重要な要素として機能しているにもかかわらず (e.g. Arndt et al.2000)、培養法の確立など研究の遅れから、その生態の詳細はブラックボックスに包まれたままである。したがって、藻類とプロティストの多様性と生態の解明が急務かつ不可欠である。一方で、環境中でのプロティストの実態が未解明であるということは、藻類・プロティストが巨大な未開拓バイオリソースであることを意味している。世界に先駆けて藻類・プロティストの多様性研究の基盤構築を行うことは、後の有用資源開発に不可欠である。しかし、藻類とプロティストの研究は、医学、農学、水産学、基礎生物学で、隔離的に進められてきた。この現状を打開するためには、プロティスト研究を新たな学問領域として再構築することが不可欠である。その基盤を構築するために、藻類・プロティスト複合系の多様性を様々な最先端技術を駆使して、包括的に理解することが求められていた。

2. 研究の目的

本研究は、光学顕微鏡レベルの形態、運動などの記載、細胞微細構造、分子系統、環境DNA解析、メタボローム解析を総合的に組み合わせ、微生物食物連鎖網の実態に迫ることを目的とする。すなわち真核微生物をシステムとして認識し、総体として理解することに重点をおく。特に本研究では、時間と空間という2つの変動軸、環境中の有機物質と生物相の関連という観点から藻類・プロティストの多様性と生態構造を解明することを目指すものである。またこのような包括的な解析を進めて行く一方で、生物多様性の基本要素である真核微生物の新種記載や分類学的整理も行い、生物学の基盤となる情報の収集にも努める。

3. 研究の方法

(1) モデル空間でのプランクトンコミュニティ解析

環境中の微生物群集構造の変動とそれに伴う様々な分子レベルでの環境メタボライトの動態の理解は、環境中で多様な生物が織りなす生態的事象をマクロな視点を持ちつつ分子レベルで記述するのに必須の技術である。そこで、まず東京湾の海水を出発サンプルとした人工的閉鎖生態系を作成し、人工海水の構成要素の変化に伴う微生物相と、メタボライトの動態を解析することを試みた。リン酸塩濃度およびケイ酸塩の比率を変えた3種類の人工海水で天然海水を希釈し、25°C一定光条件下で1週間培養を行った。一定間隔で採水を行い、それぞれのサンプルについてDNA抽出と変性剤濃度勾配電気泳動法(DGGE)と¹H-NMRおよび2D-HSQC法によって、それぞれ微生物集団構造とメタボライトの変動の追跡を行った。

(2) 連続空間における環境変化がもたらす生物多様性と生態構造への影響

河川上流から河口、さらには海に至るまでの連続した水圏環境では、周囲の陸域環境の影響をうけて、河川水内の環境物質が、連続的に変化していく。これに対応するように、環境水中の生物相も変化して行くことは古くから知られている。しかし、このとき生物相はどのような環境物質の変化に呼応しているのかはわかっていない。そこで、本研究では、人的な影響を殆ど受けない西表島西部のクイラ川をモデルとし、海水の遡上限界点から、マングローブ林からの支流の合流点2カ所を経て深い内湾部へ、そして最終的に外洋へ至るセンサスラインを設け、それに沿って9つのプロットを設定した。

その上で、モデル空間におけるプランクトンコミュニティ解析で用いた方法に基礎を置きつつ、メタボロームの変動を捉えるNMR解析については2DJ解析法、微生物コミュニティの解析については18S rRNA配列V4領域のPCR法による網羅的取得を行い、得られたrDNAを元にイルミナ社製MiSeqによってシーケンス情報を得た。得られた配列はOTUsのクラスタリングとアノテーションを行い、サンプル別に各OTUsの出現割合を計算した。

(3) 時系列変化に伴う環境中有機物質と真核微生物の相関解析

東京湾沿岸 1 地点 2 水深を調査地とし、環境中物質と真核微生物がどのような相関で変動するかを分析した。2010 年度は月 1 回（2010 年 3 月～2011 年 3 月）、表層 1m と 3.5m の 2 水深、2011 年度は夏期の赤潮形成期に、連続して毎日あるいは数日間隔で表層 1m と海底 50cm 上部（水深 5m 付近）の 2 水深で採水を行った（2011 年 6 月～2011 年 10 月）。

①形態観察による生物量推定

グルタルアルデヒドおよび酸性ルゴールで採水サンプルの固定を行い、倒立顕微鏡を用いて、生物種ごとの細胞計数を行った。

②環境メタボローム解析

採取した海水は、オムニポアフィルターで濾過し、得られた濾液とフィルターを、重水リン酸バッファーや重メタノールで成分抽出し、¹H-NMR 分析を行った。

③クロロフィル代謝物の検出

GF/F フィルターで濾過したフィルターを、有機溶媒にて抽出し、HPLC 分析を行った。

④サンガー法による環境配列取得

2010 年 5 月-12 月に東京湾沿岸より採取した $0.22 < x < 80 \mu\text{m}$ のフィルター濾過物は、DNA 抽出後、2 組の 18S rDNA ユニバーサルプライマーを用いて約 1.6kbp を PCR 増幅し、TA クローニングした。このうち約 650bp を約 2500 クローンで解読し、BLAST 検索後、系統解析を実施した。

⑤環境メタゲノム解析

2010 年 4 月から 2011 年 3 月までの 2 水深合計 24 サンプルと、2011 年 6 月から 8 月中旬までの 24 サンプルは DNA 抽出後、18S rDNA の V4 領域約 500bp をユニバーサルプライマーで PCR 増幅し、454 GS Junior を用いてパイロシーケンスを行った。得られた配列は OTUs のクラスタリングとアノテーションを行い、サンプル別に各 OTUs の出現割合を計算した。

(4) 細菌相の環境メタゲノム解析

(2) および (3) において、イルミナ社の MiSeq を用いた解析パイプラインによって、環境中における 16S rRNA の V4 領域の網羅的解析を行った。これについては (2) (3) の解析と同様にメタボロームとの相関解析を実施した。

(5) 培養株の作出と利用

①培養株の作出と系統分類学的研究

実験室に持ち帰った採水物は、藻類培地での予備培養を行った後、マイクロキャピラリー法で細胞単離し、様々な藻類・プロティストの培養株作出を行った。また、藻食性プロティストについては、同所から確立した藻類培養株を餌として、2 員培養系での培養株作出を試みた。得られた培養株は、光学顕微鏡や電子顕微鏡による微細構造観察や 18S rDNA などによる系統解析を実施した。

②培養株の ¹H-NMR 分析

東京湾から分離した培養株のうち、赤潮形成に関与する種を中心に選出した珪藻 2 族 2 種、ラフィド藻類 1 種、渦鞭毛藻類 2 属 4 種、ユーグレナ藻 1 属 2 種、プラシノ藻 1 種を用いて、¹H-NMR 分析を行った。

4. 研究成果

(1) モデル空間でのプランクトンコミュニティ解析

リン酸塩強化、珪酸塩強化、双方強化の 3 条件の実験区をそれぞれ 3 回繰り返して実験を行った。3 回の繰り返し実験においてはいずれも異なった微生物群が出現し、その差異は栄養塩類条件による差異と同等であった。すなわち、実験区毎に出現する微生物群の群集構造は詳細に見た場合全て異なっていた。しかしながら、いずれの実験区でも種は異なるものの、最初に珪藻類がブルームを起こし、その後群集構造が従属栄養性の原生生物とシアノバクテリアへとシフトし、最終的に崩壊するという経過は共通していた。

一方、メタボローム解析の結果は、異なる微生物種がブルームするにもかかわらず、各ブルームが起きるときと起きた後で非常に似たパターンの経過を示し、微生物の種構造に依らずブルームに伴う環境中の化合物群の挙動には共通性が高いことが示された。特に特徴的に見られるブルームに伴ったメタボライトのシグナルはグルコースであり、光合成生産に基づいた微生物群の相互作用が支配的であることを示している。

本実験より、環境中では微生物の種構成が異なっても、同一ブルーム条件下における化学的環境はきわめて安定的かつ再現的に推移する可能性が示された。

(2) 連続空間における環境変化がもたらす生物多様性と生態構造への影響

①得られた 18S rRNA の V4 領域配列 444,881 リードは、合計 112 OTUs に分類された (分類群レベルは解析ソフト QIIME での Level 4; 概ね科に相等)。これら OTU の出現頻度変動を OTU 毎に標準化を行った上でトランセクトラインに沿って可視化すると、各地点において出現する OTU には共通性がほとんど見られず、流下に伴って微細藻類および原生生物の構成種は連続的に変化していくことが明らかとなった。特に最上流部と外洋の貧栄養とみられる水域では確認される OTU 数が中流域から内湾の富栄養とみられる水域に比べて有意に多い傾向が見られた。

②一方で、メタボローム解析の結果は、途中 2 カ所のマングローブ林から流れ込む支流との合流点および合流点から 1 ポイント下流において、それぞれ明らかな共通性を示した。¹H-NMR による解析では分子に関する道程情報がほとんど得られなかったため、さらにケミカルシフトの値と J-coupling 値を用いて二次元にシグナルを展開する 2D-J 法を用いた解析を行ったところ、2 カ所の合流点至近ポイントにおいては、イソプレノイド系の化合物に由来すると見られる骨格内に二重結合を有する構造が共通して認められたのに対し、合流点から 1 ポイント下流のサンプリング地点では、二重結合が少なく、また、末端が水酸基へと変化した構造が多く認められたことから、マングローブ由来と考えられる多くの有機化合物が本流の好氣的微生物群によって利用・改変されている可能性が強く示唆された。ただ、前述の通りこの 2 つの合流点において類似の反応を行う微生物群に共通したプレイヤーは存在しないと考えられ、(1) で見られた「プレイヤーが異なっても、同じ "フェーズ" の生態系ではよく似た環境化学的反応が進行する」という現象が、全く異なる環境下で再現的に観測されたことは非常に興味深い。

(3) 時系列変化に伴う環境中有機物質と真核微生物の相関解析

①細胞計数により、東京湾沿岸の藻類・プロテイスト相は、通常の沿岸海域と同様、珪藻・渦鞭毛藻がその大半を占め、生物多様性

および生物数は夏期に顕著に増大した。特に 2010 年 5 月、2011 年 6 月から 7 月にラフィド藻類 *Heterosigma akashiwo* や、珪藻 *Skeletonema spp.* による赤潮が確認された。2010 年 9 月から 10 月にかけては生物量が激減した。また形態観察による生物同定で、2010 年度の観察では、生物相が月ごとに大きく変動すること、2011 年の赤潮形成期には、数日間での生物相の劇的な入れ替りを確認した。

②¹H-NMR によって得られた環境メタボロームデータの主成分分析によれば、2010 年度における環境中の有機物は、年間を通じて組成が大きく変わる一方で、同月あるいは隣接月には、水深にかかわらず比較的類似した組成となる傾向がみられた。また 2011 年の夏の赤潮形成時期には、連続した数日といった短期間でも、環境水を構成する有機物質組成が激しく変動していることが明らかとなった。

③本研究を通じて確立したプロテイスとと藻類でクロロフィル代謝物分析を行ったところ、プロテイスとと藻類の 2 員培養でのみ検出される 13², 17³-cyclophorbide *a enol* (cPPB-*aE*) を検出した。様々な状況証拠から cPPB-*aE* は藻食性プロテイスとにおけるクロロフィル光毒性回避機構の一種であることが示唆された(Kashiyama et al.2012)。さらに、東京湾沿岸の環境サンプルでもクロロフィル代謝物の分析を行った結果、cPPB-*aE* は、クロロフィル *a* に次ぐ代謝物で、冬期は夏期よりも含有量が少ないことが明らかとなった。これは cPPB-*aE* が、プロテイスとの捕食活性を示すバイオマーカーとして有効であることを示唆するものである。

④サンガー法で取得した 2380 リードの環境クローンは、東京湾での真核微生物相の約 3 割ずつをストラメノパイル、アルベオラータ、オピストコンタで等分していることを示した。またこの海域には、海産ストラノパイル (MAST)-1, 3, 4, 6, 12 やビリモナズ、ケルコゾア生物などの多様な未記載系統群が存在することを示した。

⑤パイロシーケンスでは、東京湾沿岸 2010 年度サンプル 717,966 reads、2011 年度サンプル 356,327 reads を取得し、各採集月日での OTUs の出現率を集計した。形態のみでは生

物量把握が困難であったプロティストでも、その出現動態を把握することができた。なかでも珪藻とケルコゾアの検出量が完全に同調しており、さらにケルコゾアの出現パターンが、クロロフィル代謝物の cPPB-aE 含有量と同調していることも明らかとなった。このことから、東京湾沿岸における cPPB-aE の大半は、ケルコゾア生物の珪藻補食によって産出されていることが示唆された。

(4) 細菌相の環境メタゲノム解析

西表島のクイラ川の 16S rRNA 配列から示された群集構造の変動は、サンプリング地点によってそれぞれ全く異なっており、18S rRNA の解析結果と同様の傾向を示した。しかし、OTU 構成の多様性に関しては、海洋での多様性は少なく、河川部の最上流域で特異的に多様性が大きいという特徴が見られた。OTU 数で見て、河川部最上流部は他のサンプリング地点に比較して 10 倍近くの OTU 数が観測された。本解析では 18S rRNA の解析同様、科レベルで OTU を定義しており、河川部最上流域での多様性の大きさは特筆に値する。一方で、マングローブ林からの支流合流点での多様性は非常に少なく、また前述のようにメタボライトについてみると合流点間で非常に類似したメタボロームプロファイルを示すにもかかわらず、二地点間の 16S rRNA の OTU プロファイルに共通性は認められなかった。すなわち、支流合流点における環境生化学的反応の共通性は (2) で述べたような真核生物の集団構造における共通性に起因するものではないという結論に加えて、原核生物の集団構造の共通性に依るものでもないということが示され、(1) の結果とも併せて考えると、環境中で起きる生化学反応は、生物種よりもその場に存在するインプットや物理的環境要因によって規定されるという興味深い可能性が示唆された。

(5) 各種培養株による分類学的研究

①東京湾から得られた珪藻捕食性のプロティストについて 18S rDNA による系統解析と形態情報による生物同定を行ったところ、本培養株がケルコゾアに属する未記載種であるとの結論を得た。また詳細な電子顕微鏡観察も行い、鞭毛装置構造を復元し、ケルコゾア生物の進化過程の解明に重要な形態学的

知見を取得できた。

②培養株ごとの NMR 分析によって、生物固有のケミカルシフトを得た。この解析データを、細胞数や環境メタゲノムによって推定された生物量や、MCR-ALS で解析した環境メタボロームデータと比較した。この結果、環境メタボロームで検出されていた有機物質成分の変化は、生物量の変動に伴う変化であったことを強く支持する結果が得られた。

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 23 件)

- ① Date Y, Sakata K and Kikuchi J. (2012) Physicochemical characterization of complex biochemical mixtures from diversified seaweeds. *Polymer J.* 44: 888-894. 査読有 10.1038/pj.2012.105
- ② Shiratori T, Yabuki A, Ishida K. (2012) *Esquamula lacrimiformis* n. g., n. sp., a New Member of Thaumatomonads that Lacks Siliceous Scales. *The Journal of Eukaryotic Microbiology.* 59 : 527-536. 査読有 10.1111/j.1550-7408.2012.00635.x
- ③ Kashiyama Y, Yokoyama A, Kinoshita Y, Shoji S, Miyashiya H, Shiratori T, Suga H, Ishikawa K, Ishikawa A, Inouye I, Ishida K. Fujinuma D, Aoki K, Kobayashi M, Nomoto S, Mizoguchi T and Tamiaki H. (2012). Ubiquity and quantitative significance of detoxification catabolism of chlorophyll associated with protistan herbivory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (43):1728-1735. 査読有 www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1207347109
- ④ Ogata Y, Chikayama E, Morioka Y, Everroad RC, Shino A, Matsushima A, Haruna H, Moriya S. Toyoda T, and Kikuchi J. ECOMICS: A web-based toolkit for investigating the biomolecular web in ecosystems using a transomics Approach. (2011) *PLoS ONE*, 7 : e30263. 査読有

10.1371/journal.pone.0030263.

- ⑤ Kikuchi J, Ogata Y and Shinozaki K. (2011) ECOMICS: Ecosystem Trans-OMICS Tools and Methods for Complex Environmental Samples and Datasets. *J. Ecosys. Ecogr.* S2:1. 査読有 10.4172/2157-7625.S2-001.

[学会発表] (計 54 件)

- ① 横山亜紀子, 柏山祐一郎, 守屋繁春, 民秋均, 井上勲. 沿岸域におけるクロロフィル誘導体と真核微生物相の時空間変動解析. 日本地球惑星科学連合 2013 年大会, 千葉, 2013 年 05 月 19 日
- ② Yokoyama A, Kikuchi J, Tsuboi Y, Moriya S, Inagaki Y, Hashimoto T and Inouye I. Seasonal succession of eukaryotic community detected by environmental sequences in Tokyo Bay, Japan. *Protist 2012*, Oslo, 2012 年 08 月 02 日
- ③ Shiratori T, Yokoyama A and Ishida K. Morphology and phylogeny of a new imbricatean flagellate (phylum Cercozoa). *Protist 2012*, Oslo, 2012 年 08 月 02 日
- ④ 横山亜紀子, 守屋繁春, 稲垣佑司, 橋本哲男, 白鳥峻志, 中山剛, 石田健一郎, 井上勲. メタゲノミクスで探る東京湾沿岸の藻類・プロティスト相. 日本地球惑星科学連合 2012 年大会, 千葉, 2012 年 05 月 20 日
- ⑤ 菊地淳. 単離操作を経ない生体分子群および微生物叢複合系解析がもたらすインパクト. 日本農芸化学会 2012 年度京都大会, 京都, 2012 年 03 月 25 日
- ⑥ 横山亜紀子, 守屋繁春, 菊地淳, 兪一雯, Evarroad C, Ogawa D, 皿井千裕, 稲垣祐司, 中山剛, 石田健一郎, 橋本哲男, 渡辺信, 井上勲. オミクス情報に基づく藻類・プロティスト複合系の多様性解明へのアプローチ. 日本藻類学会 35 回大会, 富山, 2011 年 3 月 28 日
- ⑦ Moriya S. Comprehensive understanding of eco-system by omics science. Memorial Symposium for the 26th International Prize for Biology. *Biology of Symbiosis*. Tsukuba, 2010 年 12 月 7-8 日

[図書] (計 5 件)

- ① 井上勲. 藻類ハンドブック. NT 出版, 2012 年, 4-10

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 勲 (INOUE ISAQ)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号: 70168433

(2) 研究分担者

渡辺 信 (WATANABE MAKOTO)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号: 10132870

橋本 哲男 (HASHIMOTO TETSUO)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号: 50208451

石田 健一郎 (ISHIDA KENICHIRO)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号: 30282198

稲垣 祐司 (INAGAKI YUJI)
筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号: 50387958

中山 剛 (NAKAYAMA TAKESHI)
筑波大学・生命環境系・講師
研究者番号: 40302369

菊地 淳 (KIKUCHI JUN)
独立行政法人理化学研究所・植物科学研究センター・チームリーダー
研究者番号: 00321753

守屋 繁春 (MORIYA SHIGEHARU)
独立行政法人理化学研究所・基幹研究所・専任研究員
研究者番号: 00321828