

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26400501

研究課題名(和文) 浮遊性有孔虫の新規環境指標の確立：遺伝子・安定同位体・形態の複合解析から

研究課題名(英文) Establishment of novel environmental proxies based on syncretical analysis for DNA, isotopes, and morphology of planktonic foraminiferal single-cell

研究代表者

氏家 由利香(Ujiie, Yurika)

高知大学・教育研究部自然科学系理学部門・准教授

研究者番号：20573041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：海洋環境指標として最も活用される微化石・浮遊性有孔虫は、近年の研究から生物種の分類、それら種の生態的特徴の見直しが指摘されてきた。本研究は、最先端技術を応用して、1mm以下の微小な浮遊性有孔虫個体について、遺伝子・形態・同位体の主要な分析を行うことを可能にする方法を編み出した。まず遺伝子抽出行程が殻への物理的・化学的影響を及ぼし、その後の分析に弊害をもたらすことがないか厳密に検証し、実際の浮遊性有孔虫の生物種間での形態や同位体比の特徴を検出した。本研究による同時複数分析の手法は、汎用性が高く、かつ生物の実態に即した生態情報の獲得、それらを応用した環境指標の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：Planktonic foraminifers are the most useful microfossil as ocean environmental proxy. However, the previous biological studies have pointed out that their taxonomic complexity veil the true ecological trait of each biological species. This study aimed to develop and apply the new approach, which comprehensively conduct the molecular, morphometric, and geochemical analyses, on an individual of planktonic foraminifers. First, we precisely examined the DNA extraction method has no physical or chemical damages to the foraminiferal shells, by using the leading-edge technologies. Then, we measured the morphological characters of the shells, and oxygen and carbon stable isotopes for each individual. Finally, we succeeded to detect morphological and isotopic differences between different biological species. Our novel approach is available for broad fossilized organisms to advance the understanding of their ecological characters, which could be worked for development of new multiple proxies.

研究分野：分子古生物学

キーワード：海洋環境指標 浮遊性有孔虫 分子系統解析 形態分析 安定同位体比

### 1. 研究開始当初の背景

海洋生命圏の生物活動は、海洋だけでなく地球全体の環境と大いに関係する。どのように海洋と生物が相互に作用し、進化してきたかを理解する上で、世界の海洋に広く分布する真核単細胞プランクトン・浮遊性有孔虫は、非常に有用な研究材料・研究対象である。浮遊性有孔虫は「殻をもつ」ため、殻の形態に基づいて種の分類(形態種)が容易にでき、殻の化学組成には生息域の化学的情報が反映され、さらにその殻は海底堆積物中に化石として残存するため、過去の環境・生態の情報を記録している。こうした特性から、浮遊性有孔虫の種組成や殻の化学組成(酸素・炭素安定同位体比： $^{18}\text{O}$ ・ $^{13}\text{C}$ )は、過去の水温や海洋循環などの復元に利用されてきた。しかし、先行研究などから浮遊性有孔虫を環境指標として用いるには、以下の大きな問題点が指摘されてきた。

(1) 浮遊性有孔虫の分子系統解析が進み、形態種は1つの生物学的種ではなく、遺伝的に異なる複数の種(遺伝子型)が含まれていることがわかってきた。遺伝子型ごとに生息範囲や季節性が異なるため、形態種の分類に基づいた種組成変化や生態情報は、実際より過小評価されている。

(2) 浮遊性有孔虫の $^{13}\text{C}$ は、生息環境の水温や一次生産性を反映していると考えられている。しかし、浮遊性有孔虫は細胞内に共生藻を有する事が多く、それらの光合成に伴う vital effect による同位体非平衡があるため、ほとんどが環境指標として活用されていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、浮遊性有孔虫を生物学的種として分類し、それら種ごとの殻形態や殻の $^{18}\text{O}$ ・ $^{13}\text{C}$ の特徴を再構築し、さらに $^{13}\text{C}$ と共生藻の違いに関係性があるかを検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

浮遊性有孔虫は実験室での飼育・系統維持が難しいことから、野生個体を用いた研究が必要である。そのため、浮遊性有孔虫の生物学的種の分類に基づき、それら殻の形態や化学組成を検証するには、同一個体で遺伝子・形態・同位体の分析を行わなくてはならない。そこで、遺伝子と殻の分離、マイクロフォーカス X 線 CT スキャンによる非破壊の殻形態分析、微量炭酸塩の同位体分析法・MICAL3による1個体ごとの $^{18}\text{O}$ ・ $^{13}\text{C}$ 測定、という方法を考案した。

研究対象としては古海洋環境学などで頻繁に用いられる浮遊性有孔虫 *Globigerinoides ruber* を用い、手法の確立と適用を行った。

#### (1) 手法の確立

本研究グループの研究者を含め、国際的な

研究協力のもと、グアニジン酸ベースの抽出試薬を使用することによって、炭酸塩の殻を保存したまま遺伝子抽出をすることができるようになった。しかしこの抽出行程は試薬内での加熱作業が伴うため、殻への物理的・化学的ダメージがないことが本研究の前提となる。そこで、各々のダメージを検証する比較実験を行った。

(2) 遺伝子型ごとの形態・同位体比の検証  
同一地点で採取した *G. ruber* の遺伝子型を同定し、同じ遺伝子型内、異なる遺伝子型間で殻の形態的特徴を調べた。また、1個体ごとに $^{18}\text{O}$ ・ $^{13}\text{C}$ 測定を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 手法の確立

遺伝子抽出行程が、殻へ与える影響を以下のように厳密に精査した。

#### A. 物理的ダメージの検証

##### 測定条件の設定

マイクロフォーカス X 線 CT スキャンは、試料に対して全方位(360°)から X 線を照射し、試料の特定位置での X 線吸収率の差を白黒の濃淡(グレースケール)として表現する。通常、このグレースケールは空気を 0、水を -1000 として medical CT 値 (HU: Hounsfield Unit) に換算され、既知の物質(ファントム)を用いた比重から、得られた CT 値は試料の相対的密度を示す。しかし、有孔虫試料に対するファントムは存在しないため、既知の密度の炭酸塩結晶(カルサイト)をファントムとして使い、空気を 0、カルサイトを 1000 とするカルサイト CT 値を新たに定義した。そして毎回同一ファントムを測定することによって、測定間での試料の密度を比較することを可能とした。また、試料の表面積と体積を算出し、体積/表面積で殻の平均の厚さを算出した。

上記の測定条件を整え、同一地点で採取した *G. ruber* 20 個体を用意し、遺伝子抽出の「前」と「後」の殻をマイクロフォーカス X 線 CT スキャンで測定した。

##### 測定方法の違い

X 線照射をする試料台に、複数の個体をセットした場合と、1個体のみをセットした場合で、得られる CT 値に違いがあるか検討した。その結果、複数個体を同時測定すると、X 線の透過する距離の違いによる減衰(ビームハードニングアーチファクト)が起き、測定間の誤差が大きくなる事がわかった。

##### 遺伝子抽出の「前」と「後」の比較

の結果を踏まえ、20 個体の試料を全て単体で測定した。同一個体間で、遺伝子抽出の「前」と「後」の状態の CT 値や殻の厚さを比較すると、有意な差がないことがわかった(図 1)。

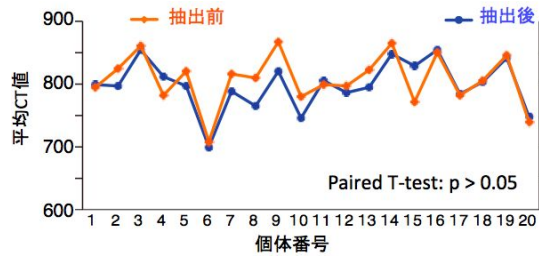


図1 . 遺伝子抽出前と後のCT値

B. 化学的ダメージの検証

<sup>18</sup>O・<sup>13</sup>C測定は殻をリン酸反応で溶かすため、Aのような遺伝子抽出前後で比較することができない。そこで、同時採取した*G. ruber* 50個体を3つのグループに分け、比較実験を行った。

グループ1：コントロール（海水を洗い落としただけの乾燥試料）

グループ2：試薬に入れ、70℃で40分間加熱（通常の遺伝子抽出行程を行った試料）

グループ3：試薬に入れ、70℃で120分間加熱（通常の3倍の時間をかけ遺伝子抽出行程を行った試料）

これら3つのグループ間で、<sup>18</sup>O、<sup>13</sup>C値各々の分散分析を行った結果、いずれも有意な差がないことが実証された（図2）。

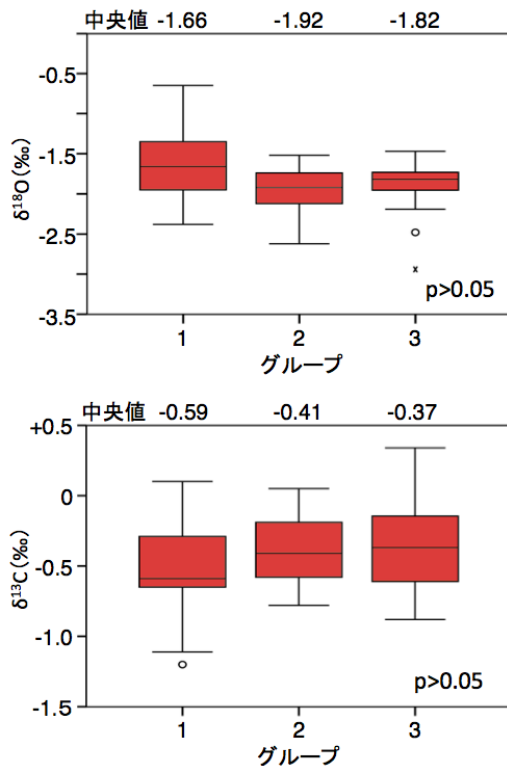


図2 . 3グループ間の<sup>18</sup>O(上段) <sup>13</sup>C(下段)値の箱ひげ図

AとBの比較実験から、本研究で用いた遺伝子抽出行程は、殻へ物理的・化学的影響を及ぼすことなく、遺伝子と殻試料を分離する最も有効な手法であると実証された。

(2) 遺伝子型ごとの形態・同位体比の検証  
高知沖で採取した*G. ruber*のSmall Subunit ribosomal DNA (SSUrDNA)の分子系統解析を行った結果、現在世界各地で見ついている6つの遺伝子型のうち、4遺伝子型（Type Ia, Type Ib-1, Type Ib-2, Type IIb）が産出することがわかった。

A. 殻形態の違い

浮遊性有孔虫は、細胞の成長時にチャンバー（殻室）の数を増やして外骨格である殻を大きくする。したがって、殻の内容積はほぼ細胞の大きさに等しい。遺伝子型間でチャンバーごとの内容積の増加をみると、増加率に大小の違いがみられた。統計的な検証にはN数がまだ少ないが、遺伝子型間での成長の違いなどが形態に反映されている可能性が示唆された。

B. <sup>18</sup>O・<sup>13</sup>Cの違い

1個体ごとの<sup>18</sup>O・<sup>13</sup>C値は、ばらつきが大きく、<sup>18</sup>Oで約1.3‰、<sup>13</sup>Cで約1.5‰の幅があった。さらに、殻の重さ（殻の大きさに等しい）と同位体値を比較すると、<sup>18</sup>Oは殻の重さとの関係性がないが、<sup>13</sup>Cは殻が重いほど値が大きくなる正の相関が認められた。殻の重さと<sup>13</sup>Cについて、N数の多い遺伝子型（Type IaとType IIb）別に見ると、両者とも正の相関があるだけでなく、2群間の傾きが有意に異なる結果が得られた（図3）。

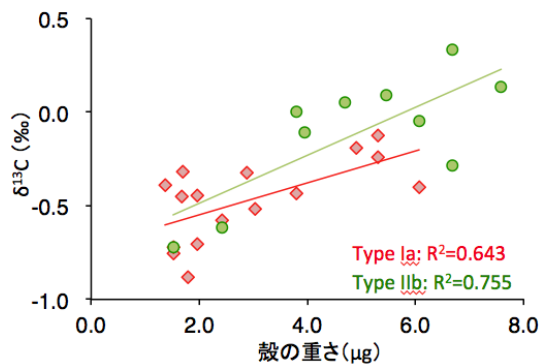
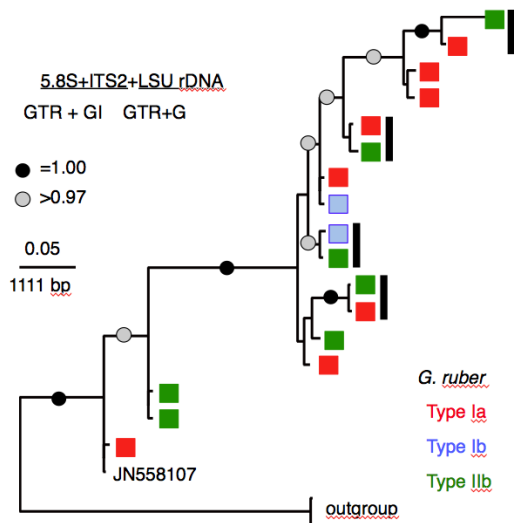


図3 . 殻の重さに対する遺伝子型 Type Iaと Type IIbの<sup>13</sup>C値

「2つの遺伝子型間で認められた<sup>13</sup>C値の違いは、異なる共生藻を細胞内にもつことによるのか？」という仮説のもと、先に分離した遺伝子試料から共生藻・*Pelagodinium beii*の5.8S、ITS2(Internal Transcribed Spacer-2)、LSU(Large Subunit)rDNAによる分子系統解析を行った。その結果、浮遊性有孔虫1個体内に複数の共生藻リボタイプが存在し、異なる浮遊性有孔虫の遺伝子型間で同じ共生藻リボタイプが確認された（図4）。

図4 . *G. ruber*細胞内から抽出した*P. beii*リボソームDNAの分子系統樹。黒いハッチは異なる浮遊性有孔虫の遺伝子型間に同じ共

生藻リボタイプが存在することを示す。



このような結果から、殻の重さと  $^{13}\text{C}$  値の相関関係について以下のような考察が得られた。

[ 殻の重さと  $^{13}\text{C}$  値の正相関 ]

浮遊性有孔虫は幼体から成体へ細胞サイズを大きく成長させる。一方、共生藻自体の体サイズは変化しないが、宿主（浮遊性有孔虫）の成長に伴い、共生藻の数が増加する。そのため、共生藻による  $^{12}\text{C}$  の消費が増大し、宿主の殻は  $^{13}\text{C}$  が相対的に増えることによって  $^{13}\text{C}$  値が大きくなったと考えられる。

[ 遺伝子型間での違い ]

共生藻にも複数のリボタイプがあり、複数のリボタイプが1宿主内に存在することから、上記の仮説「異なる共生藻種による  $^{13}\text{C}$  値の変化」は棄却される。一方で、宿主の遺伝子型ごとに  $^{13}\text{C}$  値は異なる傾向を示すことから、宿主の成長時に各々の共生藻種が異なる増加率を持つ可能性、共生藻種によって光合成などの活性度が異なることによる  $^{12}\text{C}$  の消費量の違いが予測される。このように、浮遊性有孔虫の遺伝子型間で、宿主による共生藻類のコントロールや栄養戦略に違いが  $^{13}\text{C}$  値に反映されている可能性が示唆された。

本研究は、最先端の技術を応用して、微小な生物について遺伝子・形態・同位体の高精度同時分析法を確立した。さらに、同方法論を実際の生物種に適用し、これまで難しかった生態情報と形態・同位体に関する知見を得る事ができた。今後も本手法を広く様々な生物種に適用することによって、生態を加味した新規の環境情報が得られ、より正確な環境指標の確立が期待される。

## 5. 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] (計5件)

Weiner, A.K.M., R. Morard, M.F.G.

Weinkauff, K.F. Darling, A. Andre, F. Quillevère, Y. Ujiie, C.J. Douady, C. de Vargas, and M. Kucera, Methodology for single-cell genetic analysis of planktonic foraminifera for studies of protist diversity and evolution, *Frontiers in Marine Science*, 査読有, 2016. DOI:10.3389/fmars.2016.00255  
岸本直子, 木元克典, マイクロX線CTで取得した3次元形状情報に基づく有孔虫骨格モデルのパラメータ同定, 化石, 査読有, 99巻, 53-61, 2016.

Ujiie, Y. and Y. Ishitani, Evolution of a planktonic foraminifer during environmental changes in the tropical oceans, *PlosOne*, 査読有, 2016. DOI:10.1371/journal.pone.0148847  
Morard, R., K.F. Darling, F. Mahe, S. Audic, Y. Ujiie, et al., PFR<sup>2</sup>: a curated database of planktonic foraminifera 18D ribosomal DNA as a resource for studies of plankton ecology, biogeography and evolution, *Molecular Ecology Resources*, 査読有, 15巻, 1472-1485. DOI:10.1111/1755-0998.12410

Takagi, H., K. Moriya, T. Ishimura, A. Suzuki, H. Kawahata, and H. Hirano, Exploring photosymbiotic ecology of planktic foraminifers from chamber-by-chamber isotopic history of individual foraminifers, *Paleobiology*, 査読有, 41巻, 108-121, 2015.

[ 学会発表 ] (計11件)

木元克典, 佐々木理, 岸本直子, 微化石研究におけるバイオメトリックス: マイクロX線CTの活用 MRC微化石研究集会, 2017年3月2日, 山形.

氏家由利香, 木元克典, 石村豊穂, 浮遊性有孔虫1個体からわかる遺伝子・形態・同位体-3要素同時解析の実現-, 日本古生物学会, 2017年1月29日, 東京.  
石村豊穂, 生物源炭酸塩に記録された生態履歴の高解像度抽出への挑戦: 魚類耳石を例として, 日本古生物学会シンポジウム, 2017年1月27日, 東京.

石村豊穂, 長谷川四郎, 池原研, 有孔虫安定同位体組成のバラツキを活かす: 海洋環境指標としての信頼性評価とアーカイブ試料の活用, 日本地球化学会, 2016年9月13日, 大阪.

Ujiie, Y., K. Kimoto, T. Ishimura, and N. Kishimoto, Approach to comprehensive analyses of molecular phylogeny, morphometrics, and geochemistry of planktonic foraminifera, 日本地球惑星科学連合, 2016年5月22日, 千葉.

木元克典, 中村由里子, 佐々木理, 鹿納晴尚, 岩崎晋也, マイクロX線CT法による生物骨格の3次元計測, 日本サンゴ礁学会(招待講演), 2015年11月26日, 東京.  
Kimoto, K., T. Kihara, S. Iwasaki, O. Sasaki, H. Kano, M. Wakita, and T. Irino, Microfocus X-ray computed tomography technique: Applications for the ocean acidification study, 日本地球惑星科学連合, 2015年5月28日, 千葉.  
Ujiie, Y. and H. Ueda, Seasonal variation in genetic types of a planktonic foraminifer, 日本地球惑星科学連合, 2015年5月26日, 千葉.  
Kimoto, K., CT analysis reveals shell density of marine calcifiers and its seasonal changes, 国際北極研究シンポジウム(国際学会), 2015年4月27日, 富山.  
Ujiie, Y. and Y. Ishitani, How do the unicellular zooplankton diverge in pelagic ocean? World Conference on Marine Biodiversity(国際学会), 2014年10月13日, 青島・中国.  
石村豊穂, 微小領域における炭酸塩の安定同位体比分析の現状, 日本地球化学会(招待講演), 2014年9月16日, 富山.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

氏家 由利香 (UJIE, Yurika)  
高知大学・教育研究部自然科学系理学部門・准教授  
研究者番号: 20573041

### (2) 研究分担者

木元 克典 (KIMOTO, Katsunori)  
海洋研究開発機構・地球環境観測研究開発センター・主任技術研究員  
研究者番号: 40359162

### (3) 研究分担者

石村 豊穂 (ISHIMURA, Toyoho)  
茨城工業高等専門学校・物質工学科・准教授  
研究者番号: 80422012