

平成 30 年 8 月 30 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291085

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文)Biology of Parmales, a sister picoplanktonic group of diatoms

研究代表者

桑田 晃 (Kuwata, Akira)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・東北水産研究所・グループ長

研究者番号：40371794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：珪藻は、全地球の炭酸固定の20%以上を担う海洋で最も重要な微細藻類であるが、その起源・繁栄機構は依然不明である。我々は、珪藻同様シリカの殻を持つパルマ藻が非常に限られた海域で生存しながらも珪藻と極近縁で共通祖先を持つことを明らかにした。本研究では、珪藻の起源・繁栄機構の解明にとって格好の対照生物であるパルマ藻の生態学・生理学・藻類学・ゲノミクス・生物地球化学による多面的な解明を目的とし、パルマ藻のシリカ殻形成と分裂機構の解析、パルマ藻・ポリド藻の全球分布の解析、パルマ藻の核ゲノムの解読、生活史と応答過程と各ステージの核相の解析、パルマ藻の分子化石を用いた生物地球化学的解析を進めた。

研究成果の概要(英文)：Parmales are an unknown small marine phytoplankton group with a silicified cell wall. Based on similarities in cell wall structure, Parmales has been proposed as a close relative of diatoms, the most successful microalgal group in modern oceans, and may play a key role in understanding their origin of silica cell wall and early evolution, which have not yet been clearly established. Recently, we isolated the first ever culture of Parmales in the Oyashio region of Japan. Molecular phylogenetic analysis of this culture indicated that Parmales was within the holidophycean clade of autotrophic naked flagellates and a sister group of diatoms. We have studied on Parmales using ecological, physiological, genomic and biogeochemical approaches and analyzed their silica cell wall formation and mitosis process, global oceanic distribution, life cycle, genome, life cycle and specific biomarkers (molecular fossils).

研究分野：生物学

キーワード：藻類 進化 珪藻 パルマ藻 ゲノム 海洋生物学 プランクトン

1. 研究開始当初の背景

シリカの殻を持つ「珪藻類」は、海洋生態系における主要一次生産者として、地球全体の20%以上の炭酸固定を担う。また、推定10万種以上と最も多様性が高く、珪藻は、現在最も繁栄している微細藻類といえる。その生態的重要性ゆえに、珪藻は世界中で注目され、その繁栄機構・シリカの殻の形成機構・進化過程の解明等を目的とした研究が、近年、世界的に盛んになりつつある。既にそれらの目的達成のため、珪藻類2種の全ゲノムが解読された (Armbrust *et al.* *Science* 2004, Bowler *et al.* *Nature* 2008)。しかし、これらの研究は、珪藻グループ内での解析に留まっており、珪藻類がどのように出現し、進化して、現在の卓越に到った過程は依然として不明のままである。1999年に、分子系統解析により、地中海と太平洋亜熱帯域で単離されたポリド藻が珪藻の姉妹群であることが示された。しかし、ポリド藻は珪藻とは全く形態の異なるシリカの殻を持たない微小鞭毛藻であり、珪藻の起源は依然不明のままであった (Guillou *et al.* *J. Phycol.* 1999)。一方、シリカの殻を持つ微小藻類パルマ藻 (2-5 μm) が亜寒帯・極地で約30年前に発見された。しかし、発見から最近に到るまで、パルマ藻の培養系を確立することはできず、謎の微細藻として位置付けられていた (Booth & Marchant *J. Phycol.* 1987)。

そのような状況の下、2009年に我々は、世界で初めてパルマ藻 *Triparma laevis* の単離培養に成功し、取得した培養株を対象に電子顕微鏡による形態観察、分子系統解析および光合成色素分析を行った。その結果、パルマ藻は黄金色藻のメンバーではなく、珪藻の姉妹群であるポリド藻と同じクレードに入るほど極近縁であること、すなわちパルマ藻が珪藻と共通の祖先を持つことが示唆された。これは、パルマ藻が、珪藻の繁栄機構と進化過程を解明する上で必要不可欠な相互比較対象生物として格好の生物材料であることを意味する。そこで、生態学・生理学・藻類学・ゲノミクス・生物地球化学から多面的なアプローチによる未知の藻類：パルマ藻の全貌解明を進めた。その結果、パルマ藻に関し、以下の生物学特性が明らかとなってきた。

パルマ藻・ポリド藻・珪藻間の系統関係
複数種のパルマ藻の単離培養に成功し、パルマ藻とポリド藻、それぞれ複数の株間で分子系統解析を行った結果、パルマ藻とポリド藻は同じクレードを形成し、珪藻の姉妹群であることの確証を得た。さらにパルマ藻の葉緑体とミトコンドリアのゲノム解読により、各ゲノムの遺伝子が珪藻の遺伝子と非常に相同性が高く、各ゲノム構造は珪藻類に酷似することが明らかとなった。

亜寒帯域における個体群維持機構

パルマ藻は、主に冬季～春季の低水温期に有光層中で増殖し、夏季-秋季にかけ成層が発達し表層水温が15℃を越えると増殖が不可能となり、表層から消失する。その間、個体群は水温15℃以下の水温躍層下の亜表層で生残する。秋から冬にかけ水が混合し、低水温期に入ると再び増殖を開始し、個体群を維持する (Ichinomiya *et al.* *Aquat. Microb. Ecol.* 2013, 2015)。

シリカの殻形成機構

パルマ藻は珪藻と大きく異なり、シリカ欠乏下でも無殻の細胞のまま増殖するが、珪酸塩存在下では、シリカの殻形成を開始する。殻形成は、細胞内部で形成されたシリカのプレートが細胞外に送り出され、細胞表面で規則正しく配置されることにより特徴的なシリカの殻が形成される (Yamada *et al.* *PLoS One* 2014)。

生活史

パルマ藻の生活史には、シリカの殻を持つ通常ステージとともに、ポリド藻に類似した鞭毛細胞ステージを持つことが複数種で明らかとなった。パルマ藻の生活史は、シリカの殻のステージと鞭毛ステージ両者を持つと言う点で、原始的珪藻である中心珪藻の生活史に類似性を持つ。

生物地球化学的解析によるバイオマーカー (分子化石)

パルマ藻は原始的な中心珪藻と共通の脂質バイオマーカーを持つ一方、比較的高分子量のパルマ藻固有の脂質バイオマーカーを持つ。

2. 研究の目的

本研究ではさらにパルマ藻の生物学特性の解明に向けて、パルマ藻のシリカ殻形成と分裂機構の解析、パルマ藻・ポリド藻の海洋全球分布の解析、パルマ藻の核ゲノムの解読、生活史と応答過程と各ステージの核相の解析、パルマ藻の分子化石を用いた生物地球化学的解析を主な目的とした。

3. 研究の方法

シリカ殻形成と分裂機構の解析

パルマ藻を培養し時系列的に採取した試料を透過型電子顕微鏡による観察により、パルマ藻のシリカの殻形成および細胞分裂機構を解析した。さらに培地中の珪酸塩濃度の制御により、シリカ欠乏下でシリカの殻を形成しない裸細胞と典型的な殻をもつ細胞でRna-seqによる遺伝子発現の網羅的解析を「ゲノム支援」の援助を受け行った。

パルマ藻・ポリド藻の海洋全球分布の解析

これまでに取得したパルマ藻とポリド藻の培養株の遺伝子情報と、Tara Ocean プロジェクトの全球的なメタゲノムデータを利用し、パルマ藻とポリド藻の海洋全球分布を推定した。

パルマ藻の核ゲノムの解読

これまでに次世代シーケンサーにより解読されたゲノム配列データをバイオインフォマティクスにより解析し、ゲノム内の遺伝子の特定、特定された遺伝子の機能予測を行った。機能予測には、核ゲノムのドラフト配列から得られる推定タンパク質配列を対象に BLAST 検索、さらには光合成生物・非光合成生物 170 種の全タンパク質とともに、Gclust によるタンパク質クラスタリングを行った。より精度の高い reference ゲノムデータを獲得するため、「先進ゲノム支援」の援助を受け、既に取得しているゲノム DNA サンプルを用いて、再シーケンシングを行った。

生活史と応答過程と各ステージの核相の解析

パルマ藻の生活史を解明するため、複数株を培養し、時系列的にパルマ藻の生活史のステージの応答を解析した。また、各ステージの性状を電子顕微鏡観察、フローサイトメータにより解析した。またパルマ藻の核相の推定のためこれまでに取得したゲノムデータを対象に SNP (一塩基多型) 解析を行なった。

分子化石 (バイオマーカー) の解析

パルマ藻の複数株を培養し、培養サンプルを対象にそれぞれ固有のバイオマーカー成分の検出をガスクロマトグラフィー (GC)、ガスクロマトグラフ質量分析 (GC/MS)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて行った。さらに、パルマ藻と珪藻の生体成分として検出されたバイオマーカー分子の海洋堆積物中での続成変化とその生成物を明らかにするために、おもに加熱による人工的な続成シミュレーション実験を行った。

4. 研究成果

シリカ殻形成と分裂機構の解析

パルマ藻のシリカの殻形成において、シリカの殻を構成するプレートのうち、円形のシールド・ベントラルプレートが放出された後に、非円形のガードルとドーサルプレートが円形のプレートの間に形成されることが明らかとなった。また、シリカの殻形成に必要な役割を担う珪酸沈着胞 (SDV: silica deposition vesicle) の形成位置がパルマ藻のシリカの殻を構成するプレートの種類によって異なり、非円形プレートは珪藻同様、細胞膜直下に形成されるが、円形プレートは珪藻とは異なり細胞内部の葉緑体 ER 付近で形成されることが明らかとなった (Yamada *et al.* *Phycologia* 2016)。

パルマ藻の細胞分裂過程においても珪藻との違いが明らかにされた。珪藻において間期に微小管形成中心として機能する微小管中心がパルマ藻では細胞周期を通じて観察されず、そのかわりに中心小体が観察された。また、分裂極に中心小体とミトコンドリアが位置し、珪藻の分裂極に見られる

極板は見られなかった (Yamada *et al.* *Protoplasma* 2016)。

パルマ藻のシリカの殻形成、細胞分裂機構は、珪藻よりは原始的な性質を示すことが示唆された。

また、現在 Rna-seq 解析で得られたデータを用いてシリカの殻形成に特異的な遺伝子の特定を進めている。

メタゲノム解析によりパルマ藻・ポリド藻の全球的な分布の推定

同一クレードのパルマ藻とポリド藻のグループ全体は全球的に普遍的に分布するが、植物プランクトン群集内では非優占グループであること。さらに、グループ内のパルマ藻とポリド藻の各サブグループはそれぞれ固有の分布域を持つことが推定された (Ichinomiya *et al.* *ISME journal* 2016)。

パルマ藻の核ゲノムの解読

核ゲノムは、ゲノムサイズが約 40Mb、約 13000 の遺伝子を持つことが推定された。珪藻ゲノムと遺伝子を比較すると、約 4000 遺伝子が共通で、半数の遺伝子がパルマ藻固有の遺伝子であることが示唆された。機能予測を進めた結果、ケイ酸トランスポータの遺伝子等の珪藻に特徴的な遺伝子がパルマ藻にも見出された。

生活史と応答過程と各ステージの核相の解析

パルマ藻の生活史には、シリカの殻を持つ通常のステージとともに、ポリド藻に類似した鞭毛細胞ステージを持つことが複数種で明らかとなった。電子顕微鏡観察の結果、鞭毛細胞はポリド藻に類似した形態を持つことが明らかとなった。また、鞭毛細胞の形成は、細胞の増殖が停止した定常期に形成されることが示唆された。また、SNP 解析の結果、パルマ藻は極めて低頻度の SNP を見出し、予想に反して半数体である可能性が示唆された。今後各ステージの核相の決定に、細胞内の DNA 含量の直接計測の必要性が示唆された。

分子化石 (バイオマーカー) の解析

パルマ藻の異なる 4 種の固有の脂質バイオマーカー成分を検出した結果、パルマ藻バイオマーカーとして、C21:6 n-アルケンや、C20:5、C22:6 脂肪酸、C27-C29 ステロイドが同定された。特にステロールの C29-シトステロールに珪藻との強い関連が見られた。さらに熱熟成実験の結果ステロイドが形成され、C29 ステランが卓越し、このステランは C29 ステロールが続成変化することが確認され、C29 ステランは中生代の海洋堆積物において、パルマ藻に特徴的なバイオマーカーとなることが示唆された。

総括

これまでの研究の総括として、これまでに得られた系統・多様性・全球分布・生態・シリカの殻形成等の知見を総括し、パルマ藻と珪藻両者の生物学的特性を比較し、両

者の進化過程と繁殖機構を考察し、パルマ藻の生物学に関する総説論文をまとめた。

本研究により未知の藻類：パルマ藻の生物情報が蓄積され、共通祖先を持ちながら珪藻のように繁殖していないパルマ藻と現在最も繁殖している珪藻の生物特性を比較対照することが可能となった。これにより、珪藻の繁殖機構と進化過程を珪藻の外側から解析することが初めて可能となり、この問題の理解の深化が期待できる。

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8件)

Yamada K, Yoshikawa S, Ichinomiya M, Kamiya M, Kuwata A, Ohki K. Effects of Silicon-Limitation on Growth and Morphology of *Triparma laevis* NIES-2565 (Parmales, Heterokontophyta). PLoS ONE, 査読有, 9, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0103289.

Ichinomiya M, Kuwata A. Seasonal variation in abundance and species composition of the Parmales community in the Oyashio region, western North Pacific. Aquatic Microbial Ecology, 査読有, 75, 2015, 207-223. doi: 10.3354/ame01756.

Ichinomiya M, Lopes A, Gourvil P, Yoshikawa S, Kamiya M, Ohki K, Audic S, deVargas C, Noel M, Vaulot D, Kuwata A. Diversity and oceanic distribution of the Parmales (Bolidophyceae), a picoplanktonic group closely related to diatoms. ISME Journal, 査読有, 10, 2016, 2419-2434. doi:10.1038/ismej.2016.38

Tajima N, Saitoh K, Sato S, Maruyama F, Ichinomiya M, Yoshikawa S, Kurokawa K, Ohta H, Tabata S, Kuwata A, Sato N. Sequencing and analysis of the complete organellar genomes of Parmales, a closely related group to Bacillariophyta (diatoms). Current Genetics, 査読有, 62, 2016, 887-896. doi: 10.1007/s00294-016-0598-y

Yamada K, Nagasato C, Motomura T, Ichinomiya M, Kuwata A, Kamiya M., Ohki K, Yoshikawa S. Ultrastructural analysis of siliceous cell wall regeneration in *Triparma laevis* NIES-2565 (Parmales, Stramenopiles). Phycologia, 査読有, 55, 2016, 602-609. http://dx.doi.org/10.2216/16-32.1

Yamada K, Yoshikawa S, Ohki K, Ichinomiya M, Kuwata A, Motomura T, Nagasato C. Mitotic spindle formation in *Triparma laevis* NIES-2565 (Parmales, Heterokontophyta). Protoplasma, 査読有, 254, 2017, 461-471. doi: 10.1007/s00709-016-0967-x

[学会発表] (計39件)

Ichinomiya M, Kuwata A. Seasonal variation of the Parmales assemblage in the Oyashio region, western North Pacific. The 7th Asian Pacific Phycological Forum, 2014.

Kuwata A. Exploring the evolutionary link between Parmales and the success of diatoms in marine ecosystems. Gordon Research Conference "Marine Molecular Ecology", 2015

Yamada K, Nagasato C, Motomura T, Ichinomiya M, Kuwata A, Kamiya M, Ohki K, Yoshikawa S. Ultrastructural analysis of mitosis in *Triparma laevis* (Parmales, Heterokontophyta). 6th European Phycological Congress. 2015

Kuwata A. Biology of a picoeukaryotic phytoplankton, Parmales, a sister group of diatoms. EMBO | EMBL Symposium: A New Age of Discovery for Aquatic Microeukaryotes, 2016.

Yoshikawa S, Sato S, Yamazaki S, Yamada K, Ichinomiya M, Saitoh K, Nakamura Y, Sato N, Kuwata A. Morphological and transcriptome analysis in cell wall formation of *Triparma laevis*. The IVth International Conference "Molecular Life of Diatoms", 2017.

[図書] (計3件)

桑田 晃, 朝倉書店, 「海洋の珪藻」環境と微生物の事典, 2014, 108-109.
Kuwata A, Jewson D. Springer, Ecology and evolution of marine diatoms and Parmales. In Marine Protists: Diversity and Dynamics. 2015, 251-275.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑田 晃 (KUWATA Akira)
国立研究開発法人水産研究教育機構・
東北区水産研究所・グループ長
研究者番号: 40371794

(2) 研究分担者

吉川 伸哉 (YOSHIKAWA Shinya)
福井県立大学・海洋生物資源学部・
准教授
研究者番号：20405070

佐藤 直樹 (SATO Naoki)
東京大学・大学院総合文化研究科・
教授
研究者番号：40154075

中村 洋路 (NAKAMURA Yoji)
国立研究開発法人水産研究教育機構・
中央水産研究所・主任研究員
研究者番号：90463182

沢田 健 (SAWADA Ken)
北海道大学・理学研究院・准教授
研究者番号：20333594

一宮睦雄 (ICHINOMIYA Mutsuo)
熊本県立大学・環境共生学部・准教授
研究者番号：30601918

(3)連携研究者

河地 正伸 (KAWACHI, Masanobu)
国立環境研究所・生物生態系研究センタ
ー・室長
研究者番号：50260469