

令和 元年 6 月 21 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00532

研究課題名(和文) 原核藻類と原生動物の光共生に関する研究

研究課題名(英文) Study on the photosymbiosis between cyanobacteria and planktonic protozoa

研究代表者

藤木 徹一 (FUJIKI, Tetsuichi)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・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：30598248

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)：本研究は、細胞内共生という現象の解明を目指し、原生動物の体内から新たに発見されたラン藻と宿主原生動物の関係を光合成に着目して明らかにするものである。このため、高速フラッシュ励起蛍光法による宿主内ラン藻の光合成活性測定法を開発し、ラン藻と宿主原生動物の関係解明に向けた研究を行った。また、原生動物の体内からラン藻を取り出し、単離培養することに成功し、本種の光合成特性をより詳細に明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラン藻には、光合成システム、窒素固定、嫌気代謝、従属栄養性などの生理的性質に様々なものいることが知られている。しかし、原生動物の体内から新たに発見されたラン藻の生理特性や宿主との関係については全く不明である。本研究で開発した手法を用いて、ラン藻と原生動物の関係を明らかにすることで、まだまだ謎の多い海洋での細胞内共生という現象の解明に新たな知見を与えることができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cyanobacteria-bearing planktic protozoans are newly discovered in the euphotic zone of the tropical and subtropical ocean. In the present study, we improved the fast-repetition-rate fluorometry to examine the photosynthetic activity of symbiotic cyanobacteria within host planktic protozoan. In addition, we succeeded in isolating the cyanobacteria from the planktic protozoan and revealed the photosynthetic characteristics of symbiotic cyanobacteria.

研究分野：生物海洋学

キーワード：細胞内共生 FRR法 原生動物 原核藻類 光合成

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海洋の藻類は、太陽光が届く表層で単体または群体を形成し、浮遊した状態で生息している。しかし、藻類の中には、他の生物(宿主)と結び付き、その体内に生息する藻類(共生藻)もいる。共生藻は、光合成で生産した有機物の一部を宿主に供給し、宿主から代謝産物(栄養塩・二酸化炭素)を受給する光共生関係にあると考えられている。この光共生は、貧栄養の熱帯・亜熱帯海域で多く見られ、共生藻をもつ宿主として、浮遊性原生動物の有孔虫や放散虫などが知られている。浮遊性有孔虫や放散虫の共生藻として、真核藻類の渦鞭毛藻、ペラゴ藻、ハプト藻などが確認されている。共生藻の光合成が、宿主の生育・生存状況にも深く関わっていると考えられてきたが、宿主内に共生した状態での光合成の測定が困難なため、共生藻と宿主原生動物の関係について十分な理解が得られていなかった。この問題を解決するため、科研費(若手研究(B), H25~27年度: 課題番号 25740014)の助成のもと、研究代表者は高速フラッシュ励起蛍光法(FRR法)を応用し、宿主内の共生藻の光合成を測定する方法を開発した。この方法を用いて、宿主の体サイズと共生藻の生物量の間に有意な正の相関関係があること、宿主の成長期は共生藻の光合成活性が高く維持されていること、さらに宿主の性生殖期直前に共生藻の生物量の急激な減少と光合成活性の低下が確認されるなど、共生藻が宿主の生活史に密に関係していることを実証した。そのような中、最近、亜熱帯海域に生息する原生動物の体内から原核藻類のラン藻が発見された。ラン藻には、光合成システム、窒素固定、嫌気代謝、従属栄養性などの生理的性質に様々なものいることが知られている。しかし、発見されたラン藻の特性や宿主との関係については分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、細胞内共生という現象の解明を目指し、原生動物の体内から新たに発見されたラン藻と宿主原生動物の関係を光合成に着目して明らかにするものである。このため、平成28年度から30年度までの3年間の計画で、宿主内ラン藻の光合成活性を測定できるようにFRR法を改良し、その光合成特性を明らかにすることで、ラン藻と宿主原生動物の関係解明に向けた研究を行った。

3. 研究の方法

(1) FRR法を用いたラン藻の光合成活性測定法の検討

ラン藻の光合成活性を測定する方法を検討するため、FRR法で照射する励起光源を藻類の光吸収効率が高い青色発光ダイオード(LED)に加え、ラン藻が特异的に吸収する光波長域のLEDを選定した。また、ラン藻から放射される蛍光を精度よく測定するため検出器の改良を行った。これらの光源変更と検出器改良を行い、代表者がこれまで取り組んできた共生藻でのFRR法の測定プロトコル(励起光の強度や時間、検出器の感度調整等)を基に、ラン藻の光合成活性測定に適した測定プロトコルの検討を行った。

(2) 宿主内ラン藻の光合成活性の評価

本研究では、3地点の貧栄養海域(相模湾真鶴沿岸域、沖縄県瀬底島沿岸域、及び西太平洋亜熱帯循環域)で、プランクトンネットを用いて生物試料を採集した。この採集試料から、実体顕微鏡を用いて、ラン藻が共生する有孔虫と放散虫を単離し、FRR法を用いて、ラン藻の生光合成活性の測定を試みた。有孔虫と放散虫は検鏡とDNA解析により、種の分類・同定を行った。また、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、有孔虫と放散虫に共生する藻類由来の色素の測定を行った。

(3) 原生動物に共生するラン藻の光合成特性の解明

原生動物に共生するラン藻の光合成特性とその役割についてより詳細に調べるため、沖縄県瀬底島沿岸域で採取した放散虫からラン藻を生きのまま取り出し、培地中で増殖させ、単離培養株を作成した。そのラン藻の培養株のDNA解析、分光光度計による光吸収スペクトル測定、FRR法による光合成活性測定を行った。

4. 研究成果

(1) FRR法を用いたラン藻の光合成活性測定法の検討

平成28年度は、浮遊性ラン藻の培養株(*Phormidium persicinu*)と相模湾真鶴沿岸域で採取されたラン藻が共生するアメーバ状の大型放散虫を用いて、原生動物の体内にいるラン藻の光合成活性を評価する方法を検討した。改良した方法では、石英セルに入れたラン藻が共生する原生動物の個体に、緑色LEDによるマイクロ秒オーダーのフラッシュを連続照射し、それに伴ってラン藻が発する可変蛍光を検出することに成功した(図1)。その可変蛍光から、宿主内のラン藻の光合成の量子収率(F_v/F_m)、有効光吸収断面積(σ_{PSII})、再酸化時定数(τ_{QA})などを算出できる(図2)。

(2) 宿主内ラン藻の光合成活性の評価

相模湾沿岸域では、成層の強化により海洋表層が貧栄養になる夏季にラン藻が共生する原生動物が出現するが、採集される個体数が極めて少なかったため、平成29年度以降は、ほぼ年間を通じて目的の生物試料が出現する沖縄県瀬底島沿岸域、西太平洋亜熱帯循環域

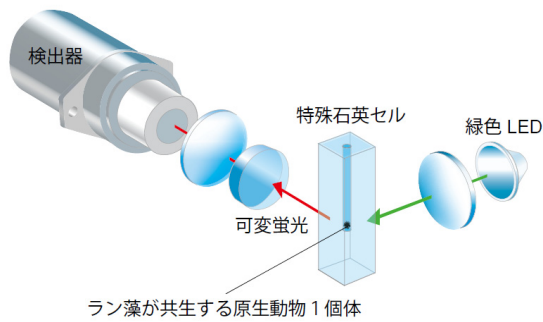


図 1. 原生動物に共生したラン藻の光合成活性測定法の概念図.

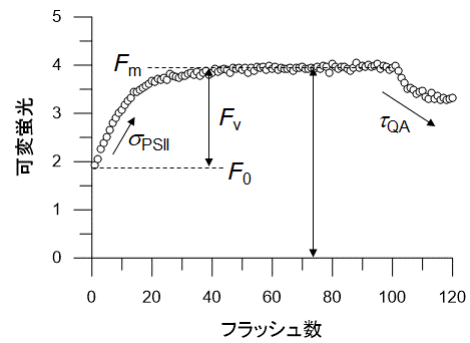


図 2. FRR 法(緑色 LED)で測定された原生動物内ラン藻の可変蛍光.

を研究対象海域として、研究に取り組んだ。ラン藻が共生するとされる放散虫 (*Dictyocoryne profunda*) (写真 1) と有孔虫 (*Globigerina bulloides*) を両海域で季節を変えて複数回採集し、FRR 法を用いてその光合成活性の測定を試みた。しかし、予想に反し、この 2 種の原生動物からは、ラン藻の可変蛍光は検出されなかった。そこで、この 2 種の体内にラン藻が含まれるのかを調べるため、HPLC を用いて、ラン藻由来の色素の有無を調べた。その結果、2 種の内、*D. profunda* の個体から、ラン藻がもつ色素であるゼアキサンチンが検出された。さらに、電子顕微鏡を用いて、*D. profunda* の体内にラン藻が存在することを確認した。*D. profunda* においては、個体サイズが小さく、その体内に含まれるラン藻も少ないため、現有の FRR 法の測器では可変蛍光を検出できなかったと判明した。一方で、*G. bulloides* の個体からは、ラン藻由来の色素が検出されなかった。DNA 解析の結果、本研究で採集された *G. bulloides* は、カルフォルニア沖で発見されたラン藻が共生する *G. bulloides* とは遺伝子型が異なるタイプで、共生藻をもたないことが明らかとなった。

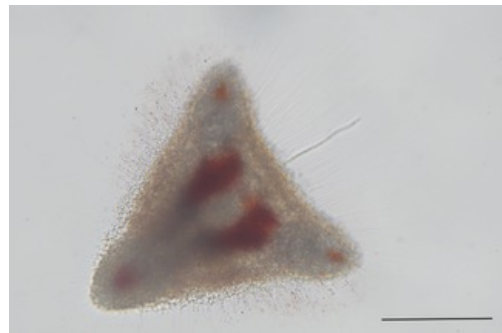


写真 1. ラン藻が共生する放散虫 *Dictyocoryne profunda*. 棒線は 100 μm .

(3) 原生動物の体内にいるラン藻の光合成特性の解明

D. profunda に共生するラン藻の光合成特性を調べるため、*D. profunda* からラン藻だけを取り出し、培地中で増殖させることに成功した(写真 2)。このラン藻の培養株の DNA 解析の結果、本種が *Synechococcus* WH8109 に属することが明らかとなった。また、本種の光利用特性を調べるため、光吸収スペクトル測定を行い、光合成に利用できる 400~700nm の可視光内に 4 つの吸収ピーク (443, 495, 543, 679 nm 付近) をもつことが示された(図 3)。また、真核藻類が吸収しにくい緑色の光を効率的に吸収するフィコエリスリン色素をもつ種であることも分かった。



写真 2. *D. profunda* に共生するラン藻 *Synechococcus* WH8109 の培養株.

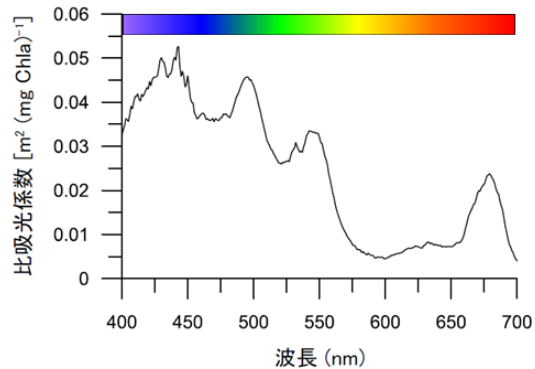


図 3. *Synechococcus* WH8109 の光吸収スペクトル.

次に、FRR 法(青色 LED、緑色 LED)を用いて本種の光合成の波長別の量子収率 (F_v/F_m) を測定した。藻類の F_v/F_m の最大値は 0.65 で、この値が高いと藻類が吸収した光エネルギーが効率良く光合成に利用されていることを示す。緑色 LED で測定された本種の F_v/F_m は 0.54

±0.01 で、青色 LED で測定した F_v/F_m (0.48 ± 0.01) より高かく、緑色光を効率的に光合成に利用することが明らかとなった。貧栄養海域では、青緑色光が有光層下限まで透過するため、フィコエリスリン色素をもつことで低光量下でも光を効率良く利用し、表層から有光層の下限まで鉛直方向に広く分布することが出来ると考えられる。本種の光合成特性が宿主である *D. profunda* の生息深度に関係があるのかは、今後、更なる研究が必要だが、原核藻類と原生動物の関係を明らかにすれば、まだまだ謎の多い海洋での細胞内共生という現象の解明に新たな知見を与えることができる可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- (1) Haruka TAKAGI, Katsunori KIMOTO, Tetsuichi FUJIKI, (他 1 名). 2018. Effect of nutritional condition on photosymbiotic consortium in cultured *Globigerinoides sacculifer* (Rhizaria, Foraminifera). *Symbiosis*. 76: 25-39. [doi.org/10.1007/s13199-017-0530-3] (査読有).
- (2) Keisuke SHIMIZU, Katsunori KIMOTO, Koji NOSHITA, (他 3 名、研究代表者 5 番目). 2018. Phylogeography of the pelagic snail *Limacina helicina* (Gastropoda: Thecosomata) in the subarctic western North Pacific. *Journal of Molluscan Studies*. 84: 30-37. [doi.org/10.1093/mollus/eyx040] (査読有).

[学会発表] (計 13 件)

- (1) 藤木徹一、木元克典、高木悠花、他 1 名. FRR 法を用いた浮遊性原生動物と藻類の共生関係の解明. 名古屋大学宇宙地球環境研究所研究集会「水圏クロロフィル蛍光に関する知識統合と研究戦略」. 2018 年 11 月 6 日. 名古屋大学 (愛知県名古屋市)
- (2) Haruka TAKAGI, Tetsuichi FUJIKI, Katsunori KIMOTO, 他 1 名. Experimental study of growth and photophysiology of *Globigerinoides sacculifer* to understand host-symbiont nutritional interactions. FORAMS2018. 22 June 2018. John McIntyre Conference Centre (Edinburgh, UK)
- (3) Yoshiyuki ISHITANI, Yurika UJIIE, Euki YAZAKI, 他 3 名. #phylogenomic approach to the early evolution of Foraminifera. FORAMS2018. 19 June 2018. John McIntyre Conference Centre (Edinburgh, UK)
- (4) Haruka TAKAGI, Tetsuichi FUJIKI, Katsunori KIMOTO, 他 2 名. Disclosing photosymbiosis in modern planktic foraminifers. FORAMS2018. 19 June 2018. John McIntyre Conference Centre (Edinburgh, UK)
- (5) 高木悠花. 化石に残るプランクトン浮遊性有孔虫～その生き様を探る～. 海洋生物シンポジウム 2018. 2018 年 3 月 24 日. 東京海洋大学 (東京都港区) (招待講演)
- (6) Yoshiyuki ISHITANI. Molecular marker to identify radiolarian species -toward establishment of paleo- environmental proxy-. American Geophysical Union Fall Meeting 2017. 14 December 2017. New Orleans Morial Convention Center. (New Orleans, USA)
- (7) Tetsuichi FUJIKI, Naomi HARADA, Hideshi KIMOTO, 他 2 名. Development of a fast repetition rate fluorometer for autonomous ocean observation platforms. AQUAFLUO II Chlorophyll Fluorescence in Aquatic Sciences. 7 December 2017. University of Technology Sydney (Sydney, Australia) #
- (8) Haruka TAKAGI, Tetsuichi FUJIKI and Katsunori KIMOTO. Light dependent photophysiology and carbon fixation in symbiont bearing planktic foraminifers. AQUAFLUO II Chlorophyll Fluorescence in Aquatic Sciences. 4 December 2017. University of Technology Sydney (Sydney, Australia)
- (9) 石谷佳之. いがいと流されない海の原生生物. 原生生物学会&共生生物学会合同シンポジウム. 2017 年 11 月 19 日. 筑波大学 (茨城県つくば市) (招待講演)
- (10) Yoshiyuki ISHITANI, Yurika UJIIE, Yuji INAGAKI, 他 1 名. Speciation and dispersal pattern of marine protists in the vertical dimension. InterRad XV. 24 October 2017. Niigata University (Niigata, Japan)
- (11) Haruka TAKAGI, Katsunori KIMOTO, Tetsuichi FUJIKI, 他 1 名. Carbon fixation by endosymbiotic algae within protistan microzooplankton. Japan Geoscience Union & American Geophysical Union Joint Meeting 2017. 20 May 2017. Makuhari Messe (Chiba, Japan)
- (12) 石谷佳之. 単細胞ってすばらしい!! . 東京大学大気海洋研究所オープンキャンパス. 2016 年 10 月 22 日. 東京大学大気海洋研究所 (千葉県柏市)
- (13) 高木悠花、木元克典、藤木徹一、他 1 名. 浮遊性有孔虫各種の光共生性と光合成生理特性. 日本海洋学会秋季大会. 2016 年 9 月 13 日. 鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市) (特記事項: 若手優秀口頭発表賞受賞)

〔図書〕（計1件）

(1) 永宗喜三郎、島野智之、矢吹彬憲（他17名、石谷16番目）. アメーバのはなし－原生生物・人・感染症－. 朝倉書店. 2018年9月15日. 152(84～90)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：木元 克典

ローマ字氏名：(KIMOTO, Katsunori)

所属研究機関名：国立研究開発法人海洋研究開発機構

部局名：地球環境観測研究開発センター

職名：主任技術研究員

研究者番号（8桁）：40359162

研究分担者氏名：石谷 佳之

ローマ字氏名：(ISHITANI, Yoshiyuki)

所属研究機関名：筑波大学

部局名：計算科学研究センター

職名：主任技術研究員

研究者番号（8桁）：40359162

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：高木 悠花

ローマ字氏名：(TAKAGI, Haruka)

研究協力者氏名：植田 正人

ローマ字氏名：(UEDA, Masato)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。