

平成 22 年 9 月 13 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770072

研究課題名 (和文) シアノバクテリアの分枝形成の分子機構と系統進化

研究課題名 (英文) Mechanism and evolution of cyanobacterial branching formation

研究代表者

富谷 朗子 (TOMITANI AKIKO)

独立行政法人海洋研究開発機構・地球内部変動研究センター・研究員

研究者番号：60392940

研究成果の概要 (和文)：糸状性シアノバクテリアに見られる分枝形成の起源とその形態的多様化の進化過程を明らかにするため、現性種の分子系統学的解析を行った。またその系統発生時期を推定するため、化石記録との対比を行った。一方で、分枝形成の分子機構を明らかにすることをめざし、非モデル生物株に分子遺伝学的手法を導入し、変異体の解析を行った。

研究成果の概要 (英文)：Molecular-phylogenetic analysis was carried out to reveal evolution of branching forms in filamentous cyanobacteria. Paleontological records provide time limit of evolutionary diversification. Molecular-genetic technique was introduced to non-model strains to investigate molecular mechanisms that control their branching formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総 計	3,400,000	420,000	3,820,000

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：系統進化、発生・分化、微生物、シアノバクテリア

1. 研究開始当初の背景

シアノバクテリア (=ラン色細菌、ラン藻) は原核生物の中でも形態的多様性に富む分類群である。そのため、形態的特徴はシアノバクテリアの分類を行う上で重要な形質のひとつとされてきた。特に糸状性シアノバクテリアは、細胞分化や分枝形成といった多細胞生物的な性質を持ち、発生学的・進化学的

にも興味深い。しかし、糸状性シアノバクテリアの多様な形態が、どのように形成されているのか、また、進化過程でどのように獲得されてきたかについては不明な点が多い。

これまでに 16S rRNA をはじめとする遺伝子の分子系統学的研究から、シアノバクテリアにおいて糸状性の形態を持つ種は単細胞性のもののなかに多系統的に分布する一方、

分化細胞を持つグループは単系統であることが示されている。また、研究代表者により、シアノバクテリアにおける分化細胞の獲得は約 23.5-21 億年の間にただ 1 度起こったことが示唆されている。しかし、分枝を形成するグループが単系統・多系統のどちらなのかは、解析する遺伝子によって異なり、結論は出ていなかった。また、その形態的多様化の過程について、分子系統樹と形態情報を合わせた議論が行われたが、分枝様式の進化過程については不明であった。さらに、従来の糸状性シアノバクテリアの形態形成の分子機構に関する研究は、モデル生物を材料に細胞分化を対象として進められてきたが、分枝の形成機構を遺伝子レベルで扱った研究はほとんどなかった。

そこで研究代表者は、スチゴネマ目シアノバクテリアを材料に、その分枝形成の進化過程を明らかにし、またその形成機構を遺伝子レベルで調べることにによりシアノバクテリアの形態的多様性の進化的背景の解明を目指し、本研究を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分子系統解析を通じてスチゴネマ目シアノバクテリアの単系統／多系統性を検証し、さらにその分枝様式の進化過程を検討すること、また、スチゴネマ目シアノバクテリアに分子遺伝学的実験手法を導入し、分枝形成を制御する遺伝子の特定を進め、分枝形成の分子機構と系統進化を解明することである。

3. 研究の方法

(1) スチゴネマ目の単系統／多系統性の検証と分枝様式の進化過程

材料として形態的多様性を考慮して 5 属 13 株のスチゴネマ目シアノバクテリアを選択し、培養株コレクションから入手した。各株からゲノム DNA を抽出し、16S rRNA と *hetR* を PCR により増幅・クローニング後、塩基配列した。これに、データベースから収集した既知のシアノバクテリアの遺伝子配列を合わせて、近隣接合法、最節約法、最尤法により分子系統樹を作成し、スチゴネマ目シアノバクテリアの単系統／多系統性を検証した。

また、分枝様式の進化過程を明らかにするため、各株の分枝の発生様式の分子系統樹上での分布を調べ、分枝様式の進化過程を考察した。また、分枝形態の系統進化と化石記録と対比し、分枝様式の獲得時期について検討した。

(2) 分枝形成機構の解明に向けた分子遺伝学的手法の開発と適用

非モデル生物の実験株としての適性を調べるため、スチゴネマ目シアノバクテリア 5 属 8 株について、異なる温度・照度・培地等の培養条件における増殖速度および特性を観察した。培養・観察に基づいて選択された株を材料に、モデル生物 *Nostoc* sp. で用いられている分子遺伝学的手法を適用し、形質転換を行った。変異体の選別には抗生物質（ネオマイシン）耐性遺伝子を使用した。さらに選択された実験株・条件の下、トランスポゾン変異体を作成し、分枝形成の変異体の単離を進めた。

また、分枝形成過程を詳細に観察するため、自家蛍光タンパク質 GFP をレポーターとした実験系を構築した。

4. 研究成果

(1) スチゴネマ目の単系統／多系統性の検証と分枝様式の進化過程

① 単系統／多系統性の検証

5 属 14 株のスチゴネマ目シアノバクテリアを含むシアノバクテリアの 49 株の 16S rRNA 配列に基づく分子系統樹を近隣接合法、最節約法、により作成した（図 1）。その結果、これまでの解析と同様、糸状体制の多系統性、および分化細胞を持つ種の単系統性を支持した。さらにスチゴネマ目についても NJ, MP, ML 法で単系統性が支持され、ブーツストラップ値は 99%(NJ)、93%(MP)であった。さらにスチゴネマ目の系統進化を調べるため、*hetR* 遺伝子に基づき糸状性シアノバクテリア 12 属 25 株の分子系統解析を行ったところ、同様に NJ, MP, ML 法で単系統性が支持され、ブーツストラップ値は 100%(NJ)、99%(MP)であった。なお 2 遺伝子の塩基配列の比較から、*Westiellopsis* 属に分類されて

いる1株が、*Fischerella* 属に属する株と同一である可能性が示唆された。

②分枝様式の進化過程

解析した14株のうち、X(不規則)型の分裂を行う株は単系統群をなし、スチゴネマ目のなかでもっとも早く分岐したグループであることが両遺伝子の分子系統解析より示唆された。一方で、Y型、T型をなすグループは多系統的で、属レベルでも多系統的な分布をなすことから、これらの細胞分裂様式を持つものは進化的に新しく進化したことが示唆されるものの、Y型、T型の進化過程を明らかにするには、さらに解析対象およびマーカー遺伝子を拡大する必要があることが示唆された。約400万年前のチャートに保存された微生物化石の分枝様式は、YまたはV型と推察されることから、少なくともこの時期までに、X型からその他の分枝様式が分岐したことが推定される。

なお、異なる属に分類されている株が両遺伝子とも同一の配列を持つ場合があること、同じ属に分類されている株でも系統樹上で多系統的な分布を示すことから、X型以外の株を材料とする場合には注意が必要である。

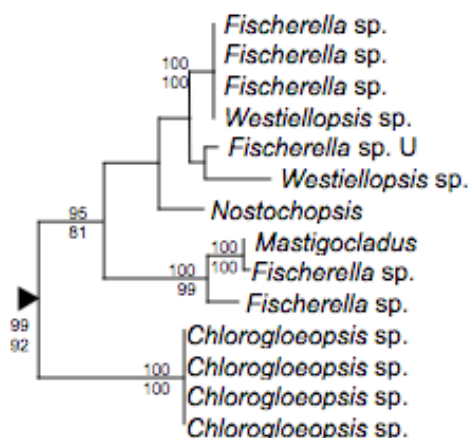


図1 16S rRNA配列に基づくスチゴネマ目シアノバクテリアの系統樹。ML法。各分岐の数字はブーティストラップ値を示す(上段: NJ法、下段: MP法)

(2)分枝形成機構の解明に向けた分子遺伝学的手法の開発と適用

①実験生物の選択・効率化と変異体の単離

実験生物としての適性を検討するため、5属8株のスチゴネマ目シアノバクテリアを温度・照度・培地の条件を変えて培養し、増殖速度・形態形成の観察への適性を考慮して実験株を選択した。続いて、異なる培地で培養した培養株と対照として *Nostoc* sp. を材料に、大腸菌を介した接合法により形質転換を行った。その結果、*Nostoc* sp. に比べて確率は低いものの、非モデル生物であるスチゴネマ目でも形質転換が可能なことを確認した。これは、糸状性シアノバクテリアに見られる複雑な形態の形成機構、およびその多様性の進化的背景の解明の基礎となると考えられる。

②分枝形成の変異体の単離

スチゴネマ目シアノバクテリアの分枝形成に関与する遺伝子の同定のため、①で選択された培養株を材料・実験条件を用いて、トランスポゾン変異体を作成した。得られた変異体の形態形成、特に分枝形成を光学顕微鏡下で観察したが、得られた変異体の中には分子形態に異常の見られる個体は含まなかった。本実験で使用した株はモデル生物に比べ成長が遅いことを考慮すると、さらに形質転換効率をあげ変異体の作成・検証を進める一方、変異体の発生過程の詳細な検証ため、形態形成を3次元空間的・継時的に観察する手法を導入することで、目的とする個体の単離が期待される。

③分枝形成過程の可視化

スチゴネマ目にみられる分枝形成過程を観察するため、自家蛍光タンパク質 GFP をレポーターとして利用し、特に細胞分裂過程の可視化し分枝形成過程の3次元空間的・継時的な観察を可能にするため、モデル生物である *Nostoc* sp. で利用されているベクターを用いてコンストラクトを作成した。しかし、シアノバクテリアの自家蛍光の影響の元で、十分なシグナルを得るためには、観察環境の改善に加え、gfp の遺伝子改変等が必要ながことが判明した。

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0件)

〔学会発表〕（計 3 件）

① 富谷朗子、Duggan, P. S., Adams, D. G. シ
アノバクテリアー植物共生系の進化 第 50
回日本植物生理学会 2009 年 3 月 22 日（名
古屋大学） 口頭発表

② Tomitani, A., Duggan, P. S., Adams, D.
G.
Isolation and characterization of the
genes involved in hormogonia formation
from *Nostoc punctiforme*, a diazotrophic
symbiotic cyanobacterium. The 8th
European Nitrogen Fixation Conference.
Sep. 1, 2008 (University of Ghent) 口頭発
表

③ Tomitani, A.
Time calibration of the early
cyanobacterial evolution. Society of
Molecular Biology and Evolution 2007
Meeting, June 26, 2007 (Dalhousie
University) 口頭発表

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富谷 朗子 (TOMITANI AKIKO)
独立行政法人海洋研究開発機構・地球内部変
動研究センター・研究員
研究者番号：60392940

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者