

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H04325

研究課題名(和文) 海洋の微生物への温暖化の影響の解明

研究課題名(英文) Reconstruction of phytoplankton floral distribution before modern Ocean Warming

研究代表者

萩野 恭子 (Hagino, Kyoko)

高知大学・海洋コア国際研究所・客員講師

研究者番号：90374206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、海洋温暖化以前の海洋における微細藻の生物地理を明らかにするために、1960-70年代前半に世界中の様々な海域の海水から作成された、海水ろ過フィルター試料に保存された微細藻類群集を、形態分類と遺伝子情報に基づいて調べた。そして、北太平洋における円石藻群集を調べた上で同じ試料を用いてDNA解析を行い、その関係を調べた。また、大西洋低緯度域の円石藻群集組成ならびに、北太平洋と南大洋におけるパルマ藻群集組成を解明した。さらに、DNA解析結果の解釈の為に、以前は分子情報が得られていなかった円石藻について、培養実験ならびに単離細胞からの直接的な分子情報取得を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、海洋の温暖化が進行する以前の1960年代から1970年代初頭の円石藻の太平洋と大西洋における広域分布と、亜極域におけるパルマ藻や珪藻の群集分布が明らかになった。本研究結果で得られた情報と、現在ならびに未来の海洋における円石藻とパルマ藻と珪藻の群集情報を比較検討することにより、温暖化の進行が海洋の微細藻生態系にどのような影響を与えたかを、検討することが出来るようになった。

研究成果の概要(英文)：Global ocean warming has accelerated since the 1990s, resulting in the modification of marine phytoplankton habitats. However, the evidence of such an environmental impact on marine phytoplankton is limited. During the 1960s-70s, a huge collection of filter samples was obtained throughout the world's oceans by Profs. McIntyre of the Lamont-Doherty Earth Observatory and Prof. Okada of Hokkaido Univ. In this study, we assess the diversity of coccolithophores and pamales through morphological and eDNA metabarcoding studies using the filter samples. Our comprehensive survey employing morphological-molecular approaches provide important information on the phytoplankton community structure in the 1960s-70s, and enabled us to make a comparison with that found in the modern ocean. We also conducted culture and molecular phylogenetic studies of several coccolithophore species to be use the data for interpretation of the obtained metabarcoding data.

研究分野：微古生物学

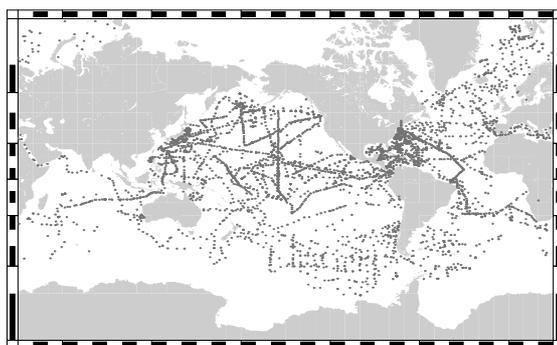
キーワード：温暖化 円石藻 パルマ藻 珪藻

## 1. 研究開始当初の背景

人為的に放出された温室効果ガスによって、産業革命以来、地球の平均気温は上昇傾向にある。それに伴い、海洋の温暖化も 1970 年代後半から顕著になってきた。全球の炭素固定の約半分を担っている海洋の微生物は、温暖化の影響をダイレクトに受ける。こうした温暖化の生態系への影響を正しく評価するには、温暖化の前(過去)と後(現在・未来)の群集を比較して、変化を調べる必要がある。しかしながら、温暖化以前の生態系の情報は限られている。その上、形態情報のみに基づいている温暖化以前の研究と、DNA を重視した最近の研究では直接的な比較ができない。この問題を解決するため、海洋の温暖化以前に作成された試料からの形態と分子の両方の情報が求められていた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、1960～1970 年代前半に世界用の海洋の表層水(図 1)から作成された海水ろ過フィルター試料の、形態観察に基づいた群集解析と、同じフィルター試料の別の断片から抽出した環境 DNA の解析を行い、温暖化が顕著になる「前」の微生物(微細藻・共生細菌)の多様性と地理分布を、形態分類と DNA の両方に基づいて明らかにすることである。



(図 1) サンプルの分布

## 3. 研究の方法

### 3-1. 顕微鏡観察に基づいた群集解析とデータベース作成

円石藻については、4500 試料から光学顕微鏡観察用試料を作成し、偏光顕微鏡でフィルター上のコッコリスの保存状態を調べ、保存状態が良好であることが確かめられた試料について、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて群集解析を行った。パルマ藻と珪藻については、ベーリング海と南大洋産の試料について、SEM 観察を行って群集解析を行った。

国内外の研究者と協力して、様々な論文で公表された円石藻の形態情報に基づいた群集分布データと、本研究で得られた群集データをとりまとめ、円石藻の生物地理の基本情報となるデータベースを構築した。

### 3-2. DNA 解析

群集解析の結果に基づいて選定したフィルターから DNA 抽出を行い、ミトコンドリアのシトクロム c オキシダーゼ I (COI) 遺伝子、および 18S rRNA 遺伝子を標的としたアンプリコンシーケンスを実施した。18S rRNA 遺伝子を増幅するプライマーセットとして Euk1391f-EukBr (Stoeck et al., 2010)、ミトコンドリアにコードされたシトクロム c オキシダーゼ I 遺伝子 (COI 遺伝子) を標的とする IntF-dgHCO2198 (Leray et al., 2013; Meyer, 2003) を使用した。PCR 後、Illumina Reagent kit V3 を使用し MiSeq (Illumina) によりシーケンシングを実施した。系統学的同定には 18S rRNA 遺伝子については SILVA 138SSU、COI 遺伝子については MIDORI2 GB248 データベースを使用した。

### 3-3. 単離細胞ならびに培養株からの分子情報の取得

DNA 解析で得られたデータを解釈するための、リファレンスデータが不足していたため、その問題を解決するために、これまでに未培養で分子情報が得られていない円石藻種を対象に、18S rDNA 塩基情報の取得を試みた。また、*Braarudosphaera bigelowii* の培養株を確立し、そこから *NifH* 塩基配列を取得するとともに、国内外の研究者と協力してその株の観察を行った。

## 4. 研究成果

### 4-1. 顕微鏡観察に基づいた群集解析とデータベース作成

円石藻については、偏光顕微鏡による予備調査の結果に基づいて、保存状態の良い試料を選定した。そして、偏光顕微鏡観察と SEM 観察に基づいて、北太平洋全域ならびに、南大洋、太平洋—インド洋—大西洋に渡る赤道域の群集分布を明らかにした。その結果、南大洋における円石藻群集の分布の南限が、以前は現在より赤道側(北側)にあることが分かった。この結果は、最近の温暖化による円石藻分布域の南方シフトの証拠である。これらの結果を踏まえた上で、英国、ドイツ、スペインの研究者と協力して、これまでに公表された円石藻の群集情報に関するデータベース CASCADE (Coccolithophore Abundance, Size, Carbon and Distribution Estimates) を構築し、

論文を執筆して Scientific Data 誌に投稿した。論文は、査読を経て小規模修正中である。

パルマ藻については、ベーリング海と南大洋を中心に群集解析を行った。その結果、これらの海域での 1960 年代の珪藻とパルマ藻の群集分布の詳細が明らかになるとともに、1960 年代後半～70 年代前半パルマ藻の生息密度が、現在よりも 10 倍から 100 倍高いことが明らかになった。また、産出した *Triparma* 属の種組成が、最近 20 年とは違っていることを明らかにした。さらに、*Triparma laevis* については、北半球と南半球では形態に違いがあることを明らかにした。その上で、*Triparma* 属については 2 種の新種を発見し、*Phycologia* 誌より論文発表した (Hoshina et al. 2021a-c)。

珪藻の研究過程では新種を発見し、*Proboscia macintyreii* sp. nov. として *Phycologia* 誌より論文発表した (Uetazo et al. 2021)。

#### 4-2 . DNA 解析

解析に用いたほとんどの試料から 18S rRNA, COI 遺伝子共に増幅産物が取得できた。18S rRNA では得られた配列の 10-50%程度が同定されず、また、サンプルの長期保存に起因する汚染由来だと思われる菌類 (Basidiomycota) が最大で 60%を占めていた。一方で、明らかに海産性であるカイアシ類や、藻類 (Dinoflagellata, Retaria, Diatomea) も検出された。このうち、ハプト藻の存在の有無は種によって異なり、*Emiliania* は 45%のサンプルで検出された一方で、Haptolina は 5%のサンプルでしか検出されなかった。この分布が当時の海洋環境をどのように反映しているのかについては将来研究を進める予定である。また、COI 遺伝子に基づく生物群集組成解析では、汚染に起因する配列の割合が非常に多く、サンプルによってはほぼ 100%であった。また、18S rRNA 遺伝子と比較して同定不能な配列の割合も多く、これは COI 遺伝子のデータベースが不十分であることに起因していると思われた。一方で、割合が少ないものの海産性であるカイアシ類、藻類 (Haptophyta, Bacillariophyceae) の存在も確認することができた。上記の結果により、フィルター当時の海水に生息していた生物の DNA が残存していることがわかったが、汚染も一定程度観察された。当時の海水に生息していた生物相の高精度な復元は、海産性の生物のみを標的とした PCR およびシーケンス解析により実現可能であると考えられる。

#### 4-3 . 培養・分子実験

DNA 解析で得られた配列情報をより深く考察するために、円石藻や珪藻のリファレンスデータの拡充を試みた。具体的には、高知県沖の海水中から採取した円石藻や珪藻の培養実験や、難培養種の単離細胞からの分子情報の取得を行った。特に、配列が得られたコッコリサス目を中心に実験を進めた。その中で、*Hayaster perplexus* の単離細胞の 18S rRNA 塩基配列を決定し、従来の形態分類ではカルシディスカス科に属すると考えられていた同種が、カルシディスカス属のクレードからは完全に外れ、コッコリサス科のクレードに近いことを明らかにした (Hagino et al. 2023) 。さらに、カルシディスカス科 *Umbilicosphera anulus* の培養に成功し、分子情報を取得した結果、同種もカルシディスカス科ではなくコッコリサス科に近いことが分かった。これらの結果から、コッコリサス目における、コッコリサス科とカルシディスカス科の分類に問題があることが明らかになった (論文準備中)。

さらに、イソクリシス目の円石藻 *Reticulofenestra sessilis* と共生関係にある珪藻 (*Thalassiosira* 属とみられるが種名不明) から 18S rRNA 塩基配列を取得した。得られた配列は、*Thalassiosira* 属のクレードに含まれるものの、新規の配列であり、配列情報から種名を限定することは出来なかった。現在、その形態情報と分子情報に基づいて、新種としての記載をすすめている (論文準備中)。

フィルターから得られた DNA 試料の *NifH* 塩基解析の可能性を広げるために、円石藻 *Braarudosphaera bigelowii* の培養実験ならびに、*B. bigelowii* の単離細胞からの *NifH* 塩基配列の取得を行った。確立した培養株の観察を行ったところ、*B. bigelowii* の細胞内に共生すると考えられていた窒素固定細菌 UCYN-A のオルガネラ化が進行していることが推定されたため、共同研究者らと共に、軟 X 線トモグラフィー観察とプロテオーム解析を行った。その結果、UCYN-A は共生という段階を超えて初期のオルガネラの状態にあることが分かった。これらの結果に基づいて、*B. bigelowii* の窒素固定を行う小器官をニトロプラストと名付け、*B. bigelowii* は窒素固定を行うことが確認出来たはじめての真核生物であることを、共同研究者らとともに、*Science* 誌に発表した (Coale et al. 2024)。

#### <文献>

Coale, T. H., Loconte, V., Turk-Kubo, K. A., Vanslebrouck, B., Mak, W. K. E., Cheung, S., Ekman, A., Chen, J.-H., Hagino, K., Takano, Y., Nishimura, T., Adachi, M., Gros, M. L., Larabell, C., and Zehr, J. P., (2024) Nitrogen-fixing organelle in a marine alga: *Science*, 384: 217-222.

- Hagino, K., Young, J. R., and Morono, Y. (2023) Molecular phylogenetic affinity of *Hayaster cf. perplexus* based on 18S rDNA sequences: *Journal of Nannoplankton Research*, 41(2) : 98-104.
- Hoshina, K., Uezato, Y. & Jordan, R.W. (2021a). Parmales (Bolidophyceae) assemblages in the subarctic Pacific Ocean during the mid-1960s. *Phycologia*, **60**(1): 35-47.
- Hoshina, K., Narita, H., Harada, N. & Jordan, R.W. (2021b). *Triparma laevis* f. *marchantii* f. nov. (Bolidophyceae) from the Southern Ocean, and comparison with other infraspecific taxa of *T. laevis*. *Phycologia*, **60**(2): 180-187.
- Hoshina, K., Narita, H., Harada, N. & Jordan, R.W. (2021c). Diversity within the *Triparma strigata*-*Triparma verrucosa* group (Bolidophyceae), including five new taxa from polar-subpolar regions. *Phycologia*, **60**(3): 215-224.
- Leray M, Yang JY, Meyer CP, Mills SC, Agudelo N, Ranwez V, et al. (2013) A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Front Zool*, **10**:34.
- Meyer CP. (2002) Molecular systematics of cowries (Gastropoda: Cypraeidae) and diversification patterns in the tropics: COWRIE SYSTEMATICS and DIVERSIFICATION PATTERNS. *Biological Journal of the Linnean Society*. **79**(3):401–59.
- Stoeck T, Bass D, Nebel M, Christen R, Jones MDM, Breiner H-W, et al. (2010) Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular Ecology*. **19**(s1):21–31.
- Uezato, Y., Hoshina, K. & Jordan, R.W. (2021). *Proboscia macintyreii* sp. nov. (Bacillariophyceae) from the subarctic Pacific, and new observations on *P. eumorpha*. *Diatom Research*, **36**(1): 11-22. doi: 10.1080/0269249X.2021.1872708

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Dmitry A. Filatov El Mahdi Bendif Odysseas A. Archontikis Kyoko Hagino Rosalind E.M. Rickaby	4. 巻 31 (4)
2. 論文標題 The mode of speciation during a recent radiation in open-ocean phytoplankton	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 5439-5449.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.09.073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tomohiro Nishimura Hajime Uchida Ryoko Noguchi Hiroshi Oikawa Toshiyuki Suzuki Hiroshi Funaki Chiho Ihara Kyoko Hagino Shingo Arimitsu Yuta Tanii Shota Abe Kana Hashimoto Katsuya Mimura Kouki Tanaka Ippei Yanagida Masao Adachi	4. 巻 96
2. 論文標題 Abundance of the benthic dino agellate <i>Prorocentrum</i> and the diversity, distribution, and diarrhetic shell toxin production of <i>Prorocentrum lima</i> complex and <i>P. caipirignum</i> in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Harmful Algae	6. 最初と最後の頁 101687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hal.2019.101687	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kuroda Junichiro, Hagino Kyoko, Usui Yoichi, Bown Paul R., Hsiung Kan-Hsi, Sakai Saburo, Hackney Ron, Saito Saneatsu, Murayama Masafumi, Ando Takuto, Ohkouchi Naohiko	4. 巻 134
2. 論文標題 Stratigraphy around the Cretaceous-Paleogene boundary in sediment cores from the Lord Howe Rise, Southwest Pacific	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 GSA Bulletin	6. 最初と最後の頁 1603 ~ 1613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1130/b36112.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Utsunomiya Masayuki, Hagino Kyoko, Tanaka Yuichiro	4. 巻 169
2. 論文標題 Speciation of extant <i>Umbilicosphaera</i> (Prymnesiophyceae) during the Pliocene	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Marine Micropaleontology	6. 最初と最後の頁 102037 ~ 102037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.marmicro.2021.102037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Shigekatsu, Kawachi Masanobu, Tsukakoshi Chinatsu, Nakamura Atsushi, Hagino Kyoko, Inouye Isao, Ishida Ken-ichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Unstable Relationship Between Braarudosphaera bigelowii (= Chrysochromulina parkeae) and Its Nitrogen-Fixing Endosymbiont	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.749895	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Turk-Kubo Kendra A, Loconte Valentina, Vanslebrouck Bieke, Mak Wing Kwan Esther, Ekman Axel, Chen Jian-Hua, Takano Yoshihito, Horiguchi Takeo, Nishimura Tomohiro, Adachi Masao, Gros Mark Le, Hagino Kyoko, Zehr Jonathan P, Larabell Carolyn	4. 巻 29
2. 論文標題 Soft X-ray Tomography Enables New Insights into the Coordinated Division of Organelle-like Symbiont in a Globally Distributed Unicellular Marine Haptophyte Alga	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microscopy and Microanalysis	6. 最初と最後の頁 1165 ~ 1165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/micmic/ozad067.596	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ijiri Akira, Setoguchi Ryoma, Mitsutome Yuki, Toki Tomohiro, Murayama Masafumi, Hagino Kyoko, Hamada Yohei, Yamagata Takeyasu, Matsuzaki Hiroyuki, Tanikawa Wataru, Tadaï Osamu, Kitada Kazuya, Hoshino Tatsuhiko, Noguchi Takuro, Ashi Juichiro, Inagaki Fumio	4. 巻 11
2. 論文標題 Origins of sediments and fluids in submarine mud volcanoes off Tanegashima Island, northern Ryukyu Trench, Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Earth Science	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/feart.2023.1206810	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hagino K., Young J. R., Morono Y.	4. 巻 41
2. 論文標題 Molecular phylogenetic affinity of Hayaster cf. perplexus based on 18S rDNA sequences	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Nanoplankton Research	6. 最初と最後の頁 98 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.58998/3439	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hoshina Kazuki, Uezato Yuki, Jordan Richard W.	4. 巻 60
2. 論文標題 Parmales (Bolidophyceae) assemblages in the subarctic Pacific Ocean during the mid-1960s	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Phycologia	6. 最初と最後の頁 35 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00318884.2020.1845046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uezato Yuki, Hoshina Kazuki, Jordan Richard W.	4. 巻 36
2. 論文標題 Proboscia macintyreii sp. nov. (Bacillariophyceae) from the subarctic Pacific, and new observations on P. eumorpha	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diatom Research	6. 最初と最後の頁 11 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/0269249X.2021.1872708	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hoshina Kazuki, Narita Hisashi, Harada Naomi, Jordan Richard W.	4. 巻 60
2. 論文標題 Triparma laevis f. marchantii f. nov. (Bolidophyceae) from the Southern Ocean, and comparison with other infraspecific taxa of T. laevis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Phycologia	6. 最初と最後の頁 180 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00318884.2021.1883365	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hoshina Kazuki, Narita Hisashi, Harada Naomi, Jordan Richard W.	4. 巻 60
2. 論文標題 Diversity within the Triparma strigata-Triparma verrucosa group (Bolidophyceae), including five new taxa from polar-subpolar regions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Phycologia	6. 最初と最後の頁 215 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00318884.2021.1888241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kyoko Hagino, Yurika Ujiie, Masao Iwai, Tatsuhiko Hoshino, Richard Jordan, Masayuki Utsunomiya, Yuichiro Tanaka, Jeremy Young, El Mahdi Bendif, Ian Probert
2. 発表標題 Marine phytoplankton biogeography before the recent global ocean warming
3. 学会等名 18th International Nannoplankton Association (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 星野辰彦、萩野恭子、氏家由利香
2. 発表標題 温暖化以前の海洋微生物群集復元の試み -PCR発明前のフィルターからの環境DNA分析-
3. 学会等名 環境DNA 学会オンラインワークショップ「あなたが主役のワークショップ」
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宇都宮 正志  (Utsunomiya Masayuki)  (10738313)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・地質調査総合センター・主任研究員   (82626)	
研究分担者	氏家 由利香  (Ujiie Yurika)  (20573041)	高知大学・教育研究部自然科学系理工学部門・教授   (16401)	
研究分担者	星野 辰彦  (Hoshino Tatsuhiko)  (30386619)	国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(高知コア研究所)・主任研究員   (82706)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	Jordan Richard  (Jordan Richard)  (90260455)	山形大学・理学部・教授    (11501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関