

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月28日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：21244079

研究課題名（和文） 嫌気環境で促進される生命史一現場観測・培養・遺伝子から解く有孔虫進化のパラドクス

研究課題名（英文） Biotic history has accelerated under anoxic environments – Paradox of Foraminifera evolution can solve through field observation, laboratory culture and genomic analyses.

研究代表者

北里 洋 (KITAZATO HIROSHI)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・領域長

研究者番号：00115445

研究成果の概要（和文）：本研究は嫌気環境が卓越する時代に海生真核単細胞の進化が飛躍的に促進されていることに着想を得て、真核単細胞生物が嫌気環境に積極的に適応し、進化が促進される仕組みを明らかにすることを目的とした。研究は現場観測を相模湾、下田湾、日本海、八戸沖、鹿児島県甌島なまこ池、アラビア海等で実施した。現場で溶存酸素やpHなどの環境情報を取得した上で、試料を採取した。得られた試料はゲノム解析、精密飼育実験、細胞生物学的観察、有機物の同位体分析を軸として展開した。結果は論文29報、学会発表42報を中心として広く内外の専門研究者に報告するとともに、web、講演、プレスリリースなどを通じアウトリーチにも務めた。

研究成果の概要（英文）： We hypothesized that the evolution of marine protists might been enhanced by active microbial symbiosis. The symbiotic relationships with microbes were suitable to survive during the crisis when the anoxic environments were dominant in the ocean. The crisis is not really crisis for eukaryotic unicellular organisms because they may potentially positively adaptable to this anoxia by various types of symbiosis. We have tested the hypothesis through field surveys, accurate environment assessments, genomics, precise laboratory culture and biogeochemical measurement. Field studies were carried out at Sagami Bay, Shimoda Bay, Pacific Ocean (off Hachinohe), Namako-ike lake of Kamikoshiki-jima island, etc. The results are reported through 29 papers, 42 presentations and others for science community. Meanwhile, the knowledge has immediately transferred to society by Internet, seminars, press release and other occasions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	14,400,000	4,320,000	18,720,000
2010年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2011年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
総計	32,000,000	9,600,000	41,600,000

研究分野：古生物学、地球生命科学

科研費の分科・細目：地球惑星科学・層位・古生物学

キーワード：無酸素環境、真核単細胞生物、進化、適応生態、有孔虫

## 1. 研究開始当初の背景

化石として残る生物群の進化は、時代を追った化石記録に基づいて編纂している。化石記録に基づくと、生物の進化は漸進的でなく、時に飛躍的に進化するように見える。とくに、海洋無酸素事件における大量絶滅とその後の適応放散とをセットにして捉えることに主眼を置いていた。しかし、これは多細胞生物に注目した話である。有孔虫などの真核単細胞生物については、フズリナ、ヌメリテスなどの大型有孔虫などの例外はあるが、海洋無酸素事件で絶滅する割合は、思いの外少なく、むしろ、それをきっかけとして新しい進化が起こっている場合が多く見られる。実は、単細胞生物は無酸素環境に適応していると思われる種類が多いからである。実際、私たちが開発した、酸素の二次元センサー (Oguri et al., 2006) で海底の酸化還元境界部を観測すると、酸素浸透深度以下の堆積物内で多くの底生有孔虫が活発に活動している (Kitazato et al., 2008; Kitazato et al., in prep.; Oguri et al., in prep.)。では、有孔虫類はどのように無酸素環境に適応しているのだろうか？また、どのようにして無酸素環境下で進化が起こるのだろうか？2005 年以降、この疑問に答えるいくつかの状況証拠が見つかってきた。その一つは、嫌気環境に於けるバクテリアの共生と有孔虫自身の脱窒によるエネルギー獲得である。貧酸素環境に於ける有孔虫のバクテリアとの共生は、Bernhard et al. (2002)および Tsuchiya et al. (in press) による報告がある。嫌気環境において有孔虫類が脱窒を行うことは、Riesgaard-Petersen et al. (2005) によって報告されて以来、数例報告されるようになった (たとえば Hoegslund, 2008)。また、Bernhard and Bowser (2008) は、貧酸素環境に適応する有孔虫類が、ペルオキシゾーム-粗面小胞体コンソーシアが生産した酸素をミトコンドリアが利用するという細胞内器官の連携があり、少ない酸素を活用しているというモデルを示した。Kitazato (2008), Tsuchiya et al. (2008) は、このペルオキシゾーム-粗面小胞体-ミトコンドリアコンソーシアは、嫌気環境に適応する有孔虫に共通して見られることを第33回 IGC において報告した。このように、真核単細胞生物 (とくに有孔虫類) は、無酸素環境に適応していることが明らかになってきた。すなわち真核生物は、一部の嫌気性生物を除くと好気環境に適応しているという考え方は、真核単細胞生物にとっては一般的ではなかったのである。本研究では、このパラダイムシフトを一步進め、「真核単細胞生物は嫌気環境に積極的に適応している」ということと、「真核単細胞生物が無酸素環境下で進化が促進される」しぐみを明らかにすることに挑戦することにした。

## 2. 研究の目的

「海成真核単細胞生物は無酸素環境に適応している」ために、「無酸素海洋で海成真核単細胞生物は進化する」ことができるメカニズムを明らかにすることを目的として、貧酸素環境に生息する真核単細胞生物の適応生態を明らかにする。

## 3. 研究の方法

無酸素環境で真核生物はどのような代謝システムを持っているのか？真核単細胞生物はバクテリアとどのように共生しているのか？を検証するために、1) 現場観測、2) ゲノム解析、3) 飼育実験、4) 電子顕微鏡観察を実施し、遺伝子流動、突然変異などをきっかけにして新しい代謝系を獲得することを通じて真核単細胞生物が無酸素環境を境に飛躍的に進化することを検証する。また、堆積物中に長期間保存される石灰質の殻に残された有孔虫の代謝系に関する証拠をつかみ、化石記録からも追跡できるように、5) 殻内有機物の同位体分析を実施し、プロキシーを検討する。

## 4. 研究成果

好気-嫌気環境の環境測定と有孔虫解析などを実施するため、酸素レベルの異なる相模湾、下田湾、野島干潟、日本海、八戸沖、鹿児島県甕島なまこ池、仙台沖、日本海溝、アラビア海、マリアナ海溝チャレンジャー海淵を対象として、バリエーションに富んだ環境で野外調査を実施した。野外調査では、底層の環境計測と各種飼育実験、および飼育用個体の採取を行った。飼育実験では、酸素濃度の異なる海域の有孔虫の有機物消費の定量や、細胞内小器官の観察を行った。

現場観測：太平洋三陸沖、相模湾、日本海、アラビア海という溶存酸素レベルが異なる海底に於いて炭素安定同位体C-13でラベルした餌を添加した現場実験とoptode sensorを用いた現場計測を行い、炭素固定能を観測した。また、硝酸、亜硝酸、アンモニアなどの栄養塩、嫌気環境の指標となる鉄、マンガンなど元素濃度分布、陸域に近く、有機物の負荷が高い相模湾底は地積物内の嫌気度が高く、そこに住む生物も有機物が多いことによる貧酸素環境に適応した種類が多く見られる。一方、同じ嫌気環境でもアラビア海は硫化水素が湧くような場ではなく、生物相も異なっている。この構成の違いが炭酸固定に影響するかを見積もっている。また、相模湾の堆積物群集を例としてLinear Inverse Model解析を試みた。

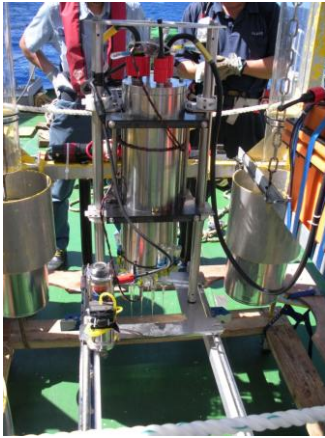


図 1 酸素濃度測定プロファイラー

酸素濃度測定プロファイラー（プロファイラーランダーに搭載：マックスプランク海洋微生物学研究所製）（図1）直径数十 $\mu\text{m}$ の微小電極を使い、堆積物-水境界の酸素濃度プロファイル（図2）を100 $\mu\text{m}$ 間隔で測定する。センサには全部で10個の電極が付き、これが横方向に移動することで、複数のプロファイルを取得できる。これによってプロファイルのほか、拡散に伴い海底に移動する酸素のフラックスを求める。

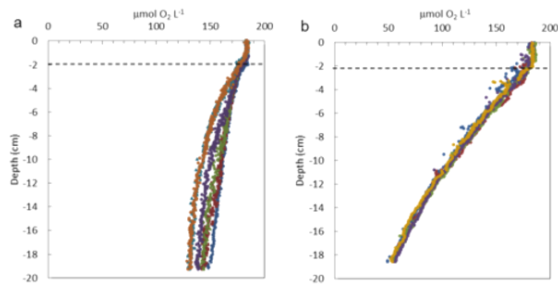


図 2 酸素濃度プロファイルと、拡散に伴い海底に移動するフラックス (a: リファレンスサイト、b: チャレンジャーサイト)

- ・微小電極プロファイラーで測定。a:36点、b:51点のプロファイル。
- ・チャレンジャーサイトのプロファイルは、リファレンスサイトより急なプロファイルを描く。つまり海底での酸素消費が大きいことを示す。

初島沖においては、二次元酸素オプトードシステムを深海ステーションにつなぎこむことで、堆積物および底生生物の生態と溶存酸素の二次元分布を8ヶ月にわたって計測した。25,000枚にも及ぶ観察結果の取得に成功した。（図3-1, 3-2）堆積物中の溶存酸素は潮汐などの影響で底層流が脈動するのに呼応して変動した。

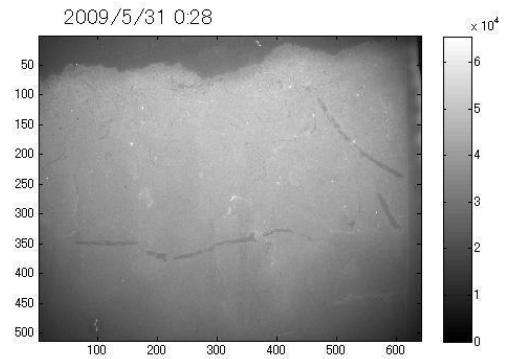


図 3-1 二次元酸素オプトードイメージ (5月31日)

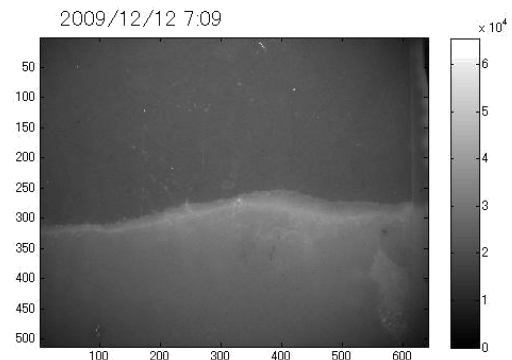


図 3-2 二次元酸素オプトードイメージ (12月12日)

また、生物が鉛直移動するのに応じて、酸素が堆積物に鋤き込まれる様子が観察された。また、得られた二次元酸素濃度像の処理法を工夫し、濃度分布から酸素消費速度の計算方法を確立した。（図3-3）酸素極小層(OMZ)が卓越するアラビア海ゴア沖水深800mでの観察結果に応用したところ、酸素濃度が極めて少ない底層環境においても、酸素消費が堆積物表面に集中することが分かった。また酸素消費速度はパッチ状であることから、生物活動の偏在性が明らかになった。

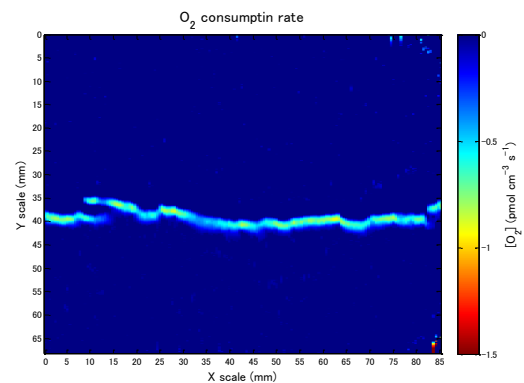


図 3-3 二次元酸素オプトードから計算によって求めた酸素消費速度



透過型電子顕微鏡観察を行い、さまざまな環境に生息する有孔虫の食性、細胞内小器官の分布を明らかにし、生息環境との関連を考察した。生息環境ごとに細胞小器官の分布などが異なることが示唆された。鹿児島県甕島なまこ池の湖底では通年で嫌気環境が発達している。ここに生息する底生有孔虫 *Virguinella fragilis* について透過電子顕微鏡観察を行った。細胞内には通常の細胞構造の他に、バクテリアと葉緑体様構造が観察された。(図4) バクテリアは細胞表面に配置されていた。葉緑体様構造はバクテリアに準じて細胞の外側に観察された。多くのバクテリアや葉緑体様構造はしっかりとした構造を保ち、細胞内においても機能しているように見えた。一方で一部のバクテリアや葉緑体様構造については食胞内で分解されつつあるものも観察された。湖底には酸素はなく、光も届かないことから、有孔虫がバクテリアや葉緑体様構造を細胞内に取り込み、呼吸に役立てた後に、栄養として摂餌している可能性が強く示唆される。この有孔虫種は世界中の嫌気環境から報告されるが、核内小サブユニットリボゾームDNAの解析から、遺伝的には極めて均一であることがわかった。

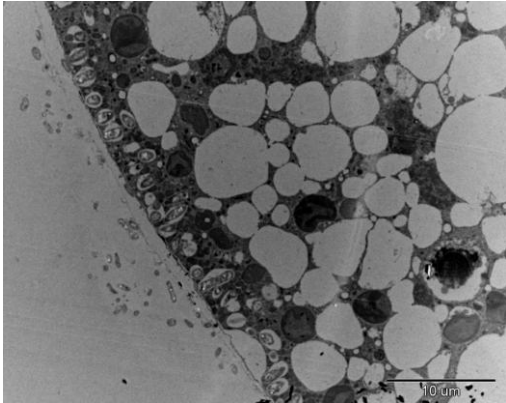


図 4 鹿児島県甕島なまこ池で採取された底生有孔虫の TEM 観察像。(Tsuchiya et al., MS)

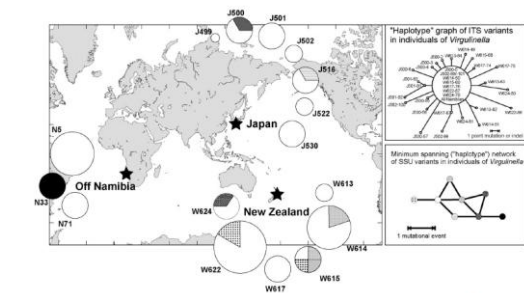


図 5 *Virguinella fragilis* の SSU rDNA 配列に基づく種内の変異。世界中で 4 塩基のみの違いが見られた。(Tsuchiya et al., 2009)

有孔虫類は堆積物深度で細かく住み分けている。生息分布と食性の関係について、安定同位体ラベルした二種類のエサ基質を用いた現場培養実験を行い、有孔虫を含む底生生物への取り込み量を観察した。エサは溶存有機物としてグルコース、粒子状有機物としてクロレラを用いた。(図6, 7) 同位体分析の結果、種類によって、また生息深度によって取り込み効率に差があった。グルコースを選択的に取り込んだ *Globobulimina*, *Chilostomella*, クロレラを選択的に取り込んだ *Uvigerina*, *Bolivina*、両方を取り込んだ *Cyclammina* に大別できる。 *Globobulimina* と *Chilostomella* については、細胞内の多くを液胞が満たしているのに対し、 *Uvigerina*, *Bolivina* では様々な固形物が食胞内に観察される電子顕微鏡観察の結果と調和的である。(Nomaki et al., 2011)

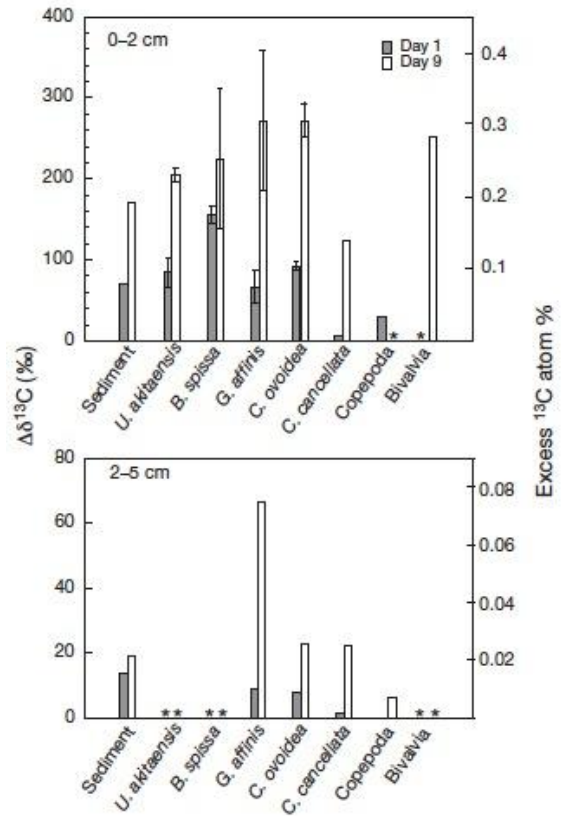


Fig. 3. Enrichment in  $^{13}\text{C}$  of sedimentary total organic carbon, benthic foraminifera, and other meio- and macrofauna from cores to which glucose was added. Top: samples from sediments at a depth of 0 to 2 cm; bottom: samples from sediments at a depth of 2 to 5 cm. Error bars: SD (only for cores with replicate samples); \*: no data. See Table S2 in the supplement at [www.int-res.com/articles/suppl/m431p011\\_supp.pdf](http://www.int-res.com/articles/suppl/m431p011_supp.pdf) for raw data

図 6-1 グルコースを与えた結果

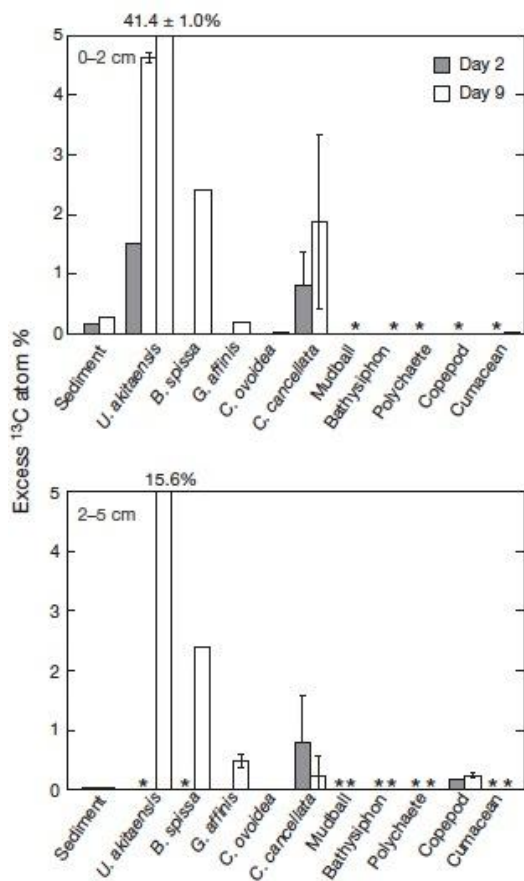


Fig. 4. Enrichment in <sup>13</sup>C of sedimentary total organic carbon, benthic foraminifera, and other meio- and macrofauna from cores to which *Chlorella* sp. was added. Top: samples from sediments at a depth of 0 to 2 cm; bottom: samples from sediments at a depth of 2 to 5 cm. Error bars: SD (only for cores with replicate samples); \*: no data. Two different Day 9 columns for *Uvigerina akitaensis* in the top panel indicate values for specimens with brown cytoplasm (left column) and green cytoplasm (right column). Values above graphs show the extent of bars with excess <sup>13</sup>C atom% > 5. See Table S3 in the supplement at [www.int-res.com/articles/suppl/m431p011\\_supp.pdf](http://www.int-res.com/articles/suppl/m431p011_supp.pdf) for raw data

図 6-2 クロレラを与えた結果



図 7 室内における環境勾配実験の様子

好気環境から無酸素環境～還元環境という幅広い酸素環境に生息できる有孔虫 *Ammonia beccarii* の代謝を明らかにするため室内で精

密飼育系を確立し実験を行った。窒素同位体比分析の結果、無酸素環境では硝酸塩を用いた呼吸系の存在が示唆された。(Nomaki, MS)

## 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 29 件)

① Tsuchiya, M., Gooday, A. J., Nomaki, H., Oguri, K., Kitazato, H., Genetic diversity and environmental preferences of monothalamous foraminifers revealed through clone analysis of environmental small-subunit ribosomal DNA sequences. *Journal of Foraminiferal Research*, 査読有, 43, 2013, 3-13.  
Doi:10.2113/gsjfr.43.1.3

② Glud Ronnie N., W. Frank, M. Mathias, Oguri, K., T. Robert, Canfield. E, Kitazato, H., High rates of microbial carbon turnover in sediments in the deepest oceanic trench on Earth, *Nature Geoscience*, 査読有, 6, 2013, 284-288  
DOI: 10.1038/NGEO1773

③ Ishimura T, Tsunogai U, Hasegawa S, Nakagawa F, Oi T, Kitazato, H., Suga H, Toyofuku, T., Variation in stable carbon and oxygen isotopes of individual benthic foraminifera: tracers for quantifying the vital effect, *Biogeosciences Discuss*, 査読有, 9, 2012, 6191-6218.  
Doi:10.5194/bgd-9-6191-2012

④ Akoumianaki I, Nomaki, H., Pachiadaki M, Kormas KA, Kitazato, H., Tokuyama H., Low bacterial diversity and high labile organic matter concentrations in the sediments of the Medee deep-sea hypersaline anoxic basin, *Microbes and Environments*, 査読有, 27, 2012, 504-508.  
DOI : 10.1264/jsme2.ME12045

⑤ Hunter, W., Oguri, K., Kitazato, H., Ansari, Z.A., and Witte, U., Epi-benthic megafauna zonation across an oxygen minimum zone at the Indian continental margin, *Deep-Sea Res. I*, 査読有, 58(6), 2011, 699-710.  
Doi: 10.1016/j.dsr.2011.04.004

⑥ Toyofuku, T., M. Suzuki, H. Suga, S. Sakai, A. Suzuki, T. Ishikawa, L. Nooijer, R. Schiebel, H. Kawahata, H. Kitazato,

Mg/Ca and  $\delta$  180 in the brackish shallow-water benthic foraminifer *Ammonia 'beccarii'*, *Marine Microplaeontology*, 査読有, 78, 2011, 113-120.

DOI: 10.1016/j.marmicro.2010.11.003

⑦ Nomaki H., Ogawa NO, Takano Y, Suga H, Ohkouchi N, and Kitazato H. Differing utilization of dissolved and algal particulate organic matter by the deep-sea benthic ecosystem of Sagami Bay, Japan., *Marine Ecology Progress Series*, 査読有, 431, 2011, 11-24.

⑧ Nomaki H., N Ogawa NO, Ohkouchi N, Toyofuku T., Kitazato H. The role of meiofauna in deep-sea benthic food webs revealed by carbon and nitrogen stable isotope analyses, *Earth, Life, and Isotopes*, 査読有, 119-138, 2010.

⑨ Kitazato H., New species of *Leptohalysis*, (*Rhizaria*, *Foraminifera*) from an extreme hadal site in the western Pacific Ocean, *Zootaxa*, 査読有, 2059, 2009, 23-32.

⑩ Nomaki H., Ohkouchi N, Heinz P, Suga H, Chikaraishi Y., Ogawa NO, Matsumoto K, and Kitazato H. Degradation of algal lipids by deep-sea benthic foraminifera: an in situ tracer experiment., *Deep-Sea Research Part I*, 査読有, 56, 2009, 1488-1503.

⑪ de Nooijer, L. J., Toyofuku T., Kitazato H., *Foraminifera promote calcification by elevating their intracellular pH*, *Proc. Nat. Ac. Sci.*, 査読有, 106, 2009, 15374-15378.

[学会発表] (計 42 件)

① Kitazato H., Live (Rose-bengal stained) foraminifera from deep-sea anoxic salt brine in the Eastern Mediterranean: toward understanding limit of life for single-celled eukaryotes (foraminifera), *European Geophysical Union 2012 General Assembly*, 2012 年 4 月 22 日~27 日, Vienna /Austria.

[図書] (計 3 件)

① 北里洋, 岩波書店, *日本の海はなぜ豊かなのか*, 2012, 120.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 光源システム及び撮像システム

発明者: 小栗一将

権利者: 独立行政法人海洋研究開発機構

種類: 特許

番号: 2012-150771, 2012

出願年月日: 2012 年 07 月 04 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.jamstec.go.jp/biogeos/j/elhrp/geobiology/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北里 洋 (KITAZATO HIROSHI)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・領域長

研究者番号: 00115445

### (2) 研究分担者

土屋 正史 (TSUCHIYA MASASHI)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・チームリーダー

研究者番号: 00435835

小栗 一将 (OGURI KAZUMASA)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・技術研究主任

研究者番号: 10359177

豊福 高志 (TOYOFUKU TAKASHI)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・チームリーダー

研究者番号: 30371719

力石 嘉人 (CHIKARAISHI YOSHITO)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・主任研究員

研究者番号: 50455490

野牧 秀隆 (NOMAKI HIDETAKA)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・研究員

研究者番号: 90435834