

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24年 6月30日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21540489

研究課題名（和文） 深海底生物群集における有孔虫ゼノフィオフォアの生態的な役割と有孔虫初期進化の解明

研究課題名（英文） Ecological roles of Xenophyophorean foraminifera in the deep-sea biological communities and early evolution of foraminifera

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：本研究では、ゼノフィオフォアの餌資源利用形態や他の微小生物との生態的な関係を明らかにするために、分子系統解析、細胞な微細構造の観察、炭素・窒素安定同位体比分析を行った。現場培養実験では、炭素ラベルしたグルコースと窒素ラベルした珪藻（*Pseudonitzschia* sp. NIES-1383）を現場培養装置に添加し、2日間の培養を試みた。その結果、ゼノフィオフォアは、突発的な沈降有機物に素早く反応し、餌資源を効率的に捕集し利用することで、急速な成長を促すことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to clarify ecological roles of xenophyophorean foraminifera in the deep-sea biological communities and early evolution of foraminifera, we carried out molecular phylogenetic analyses, ultrastructural observations and stable isotope analyses. The result of molecular phylogenetic analyses of nuclear ribosomal RNA indicates that *Shinkaiya lindsayi*, xenophyophore, indicates sister clade with other xenophyophore, *Syringamina corbicula*, shows monophyly relationships. We carried out *in situ* incubation experiments for two days at east off Torishima Is. at a depth of 5,371 m. Xenophyophore rapidly fed both dissolved and particulate organic materials. Although limited food materials reached to the deep-sea floor in the oligotrophic region, xenophyophore have a potential for rapid growth, they indicate rapid uptake of food materials.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生態学・同位体生態学

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：ゼノフィオフォア、底生有孔虫、深海底層生態系における役割、安定同位体生態学、単細胞真核生物、ステルコマータ、種多様性、進化

1. 研究開始当初の背景

本研究で対象とする軟質殻底生有孔虫は、

化石として保存されにくいものの、5.4～10億年前の先カンブリア紀には、軟質殻底生有

孔虫に酷似する袋状の細胞と推測される化石が見つかっており(Vidal, 1976), 古生物学的な観点からも重要な分類群であると言える。また, 軟質殻底生有孔虫は, 炭酸カルシウム補償深度(CCD)以深においても, その種数や生物量が多く, 深海底における物質循環の重要な担い手になっていることは明らかである。単細胞真核生物(原生生物)は物質循環においてマクロベントスとバクテリアを繋ぐ重要な生態学的な位置にあるものの, その研究は充分であるとはいえない。現在や過去の深海環境において, 軟質殻底生有孔虫を含む有孔虫類の物質循環への貢献度は, 過小評価されている可能性が高い。

底生有孔虫類は深海底において, 全生物量の55%を占め, そのほとんどは軟質殻底生有孔虫である(Snyder, 1984)。軟質殻底生有孔虫は, 処理の過程で破壊されてしまうことが多かったが, Snyder(1984)やGooday(1984)による湿潤試料を用いた記載や群集解析の結果, 軟質殻底生有孔虫は深海底で多様性が高いことが示され, その中には本研究で対象とするゼノフィオフォアが含まれている。

上記の研究は主に大西洋に限られていたが, 近年, 太平洋域(マリアナ海溝, 日本海溝, 北西太平洋)においても群集解析が進められている(Todo et al., 2000; Nozawa et al., 2006)。しかし, 深海での生態的な調査や遺伝的な研究例が少なく, 不明な点が多い。

ゼノフィオフォアや軟質殻底生有孔虫は, 有孔虫類の進化だけではなく, リザリア生物群の初期進化を追跡できる重要な分類群である。軟質殻底生有孔虫は, 硬い殻を持つ有孔虫の起源的なグループであり(Pawlowski et al., 2003), また, 有孔虫類はケルコゾア生物群を構成するリザリア生物群の起源的な生物に近い(Bass et al., 2005; Takishita et al., 2005)。ゼノフィオフォアは, 様々な生物種に分類される所属不明の分類群であったが, 単室形の軟質殻底生有孔虫のクレードに含まれることが明らかになっている(Pawlowski et al., 2003)が, 深海底での調査機会の制約から解析を行うための試料が少なく, その生態の多くは不明なままである。

ゼノフィオフォアは, その個体サイズが10cmにもなる単細胞真核生物であり, 記載や観察が行われているが(Tendal, 1972), その生態については不明な点が多い。Gooday et al. (1993)は, 深海底に設置したカメラにより, ゼノフィオフォアの行動を観察し, 堆積物食であることや, その成長が散発的に起こることなどを報告した。この成長様式は, 貧栄養かつ高い溶存酸素環境に適応したゼノ

フィオフォアの成長戦略と密接に関係している可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では, 有孔虫類の一種である単細胞真核生物ゼノフィオフォア(Xenophyophore)を含む軟質殻底生有孔虫について, 深海底生物群集内における生態学的な役割の解明と, 地球史を通じた有孔虫類の初期進化の解明を目的としている。解析では, 深海環境への適応機構に関わる分子生態学的研究を行うとともに, 細胞生物学的な観察および安定同位体比分析による栄養段階の推定を行い, 細胞内のステルコマータの成因と役割の解明および, 体サイズが10cmにも成長するゼノフィオフォアが, 深海底においてどのようにして個体を維持しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では, 地球史を通じた進化と深海底生物群集内における生態学的な役割の解明を目指すため, (1) 分子系統解析, (2) 炭素・窒素同位体比分析, (3) 電子顕微鏡による細胞構造の観察, (4) 新たな遺伝子領域の解析を行った。

(1) ゼノフィオフォアおよび軟質殻底生有孔虫, 内生生物の分子系統解析

核内小サブユニットリボソームRNA(SSU rRNA)の解析から, 真核生物におけるゼノフィオフォアおよび軟質殻底生有孔虫の系統学的位置を確定し, 分子系統学的手法を用いて単系統性を検証するとともに, 有孔虫細胞内の内生生物の分子系統解析を行い, ステルコマータの成因を推定する。また, 個体間の遺伝的変異を分子系統解析により明らかにする。

(2) 安定同位体比・微量元素分析

ゼノフィオフォア細胞内には, ステルコマータやバクテリアに関係すると考えられる顆粒の存在する黒色と白色の部位とがあり, 両者の同位体組成は異なることが予想される。炭素・窒素同位体分析から餌資源利用形態を明らかにするとともに, アミノ酸の窒素同位体比分析から栄養段階を推定し, 深海底においてどのような資源を利用しているのかを明らかにする。また, 2種類の細胞がどのような役割を持つのか, 機能的に分化しているのか, 細胞内の元素濃集が何に起因しているのかを明らかにする。

(3) 細胞内微細構造の観察

透過型・走査型電子顕微鏡により、細胞内のバクテリアやステルコマータの存在を明らかにし、細胞生物学的な視点からステルコマータの成因を探る。

(4) 新たな遺伝子領域の解析

有孔虫の分子系統解析は、おもに核内のリボソーム遺伝子を用いているが、遺伝子のコピーが多く存在することから、種内や種間の遺伝的変異が大きく、分子系統解析を行う上での問題となる。このため、ミトコンドリア遺伝子のようにコピー数の少ない遺伝子領域を用いた解析が必要である。ゼノフィオフォアの2種類の細胞のうち白色の細胞は、細胞量が多いため、この細胞を用いることで、ミトコンドリアを効率よく抽出できる可能性が高い。ミトコンドリアの分画を遠心分離により分画し、その塩基配列を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 有孔虫ゼノフィオフォアの分子系統学的位置

YK07-15「よこすか」航海における三陸沖北海道海膨東側のS2サイト(39°06' N, 143°53' E, 5349m)にて採取した既存試料(図1)の分子系統解析を行った結果、既知のゼノフィオフォア(*Syringamina corbicula*)と姉妹群を形成し、単室形有孔虫との近縁性を示した(図2)。



図1. 三陸沖S2サイトで採取したゼノフィオフォア(*Shinkaiya lindsayi*)。個体の直径は、約8cmであり、個体は、樹枝・網状のネットワークから形成されている。

このクレードは有孔虫類の系統樹の中でも根元に近く、また、単室形の有孔虫から複雑な形態を示す種に派生する過程のものであり、有孔虫の様々な殻形質への進化や房室形成の意味あるいは石灰化過程の進化を考察する上で有効な材料となりうる。これらの成果のう

ち、分子系統解析および形態解析、細胞内の元素濃集の特徴を統合し、新属新種の記載を行った(Lecroq et al., 2009)。

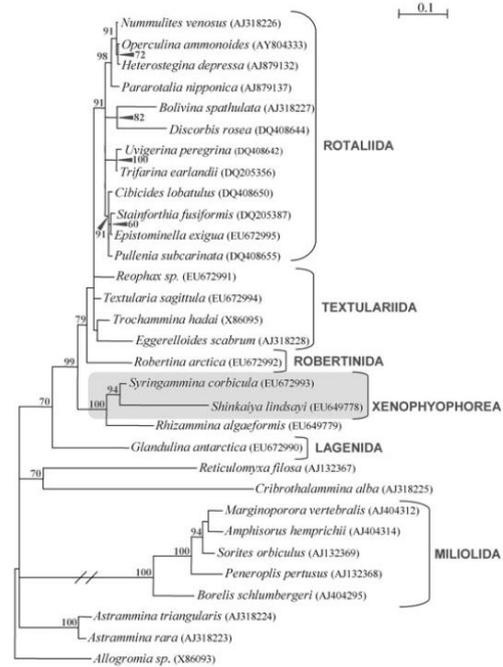


図2. 最尤法に基づく分子系統樹。

(2) 深海底生物群集内におけるゼノフィオフォアの生態的な位置と周囲に生息する生物間との関係

ゼノフィオフォアの資源利用や他の微生物の生息場所としての生態学的な意味について、先述の試料を用いてアミノ酸窒素同位体によるゼノフィオフォアおよび共存する後生動物の栄養段階推定から、次のことが明らかになった。



図3. *Shinkaiya lindsayi* の細胞には、白い部位と黒い部位とが存在する。

① ゼノフィオフォア細胞のうち、黒色の細胞質のアミノ酸窒素同位体比(フェニルアラニ

ンとグルタミン酸の窒素同位体)から栄養段階(ATL)を決定した結果、その値は1.1となり一次生産者と同等の値を示した。

② S2サイトに共存する刺胞動物門の八放サンゴとシンカイスナギンチャクのATLは、それぞれ2.6, 3.6であった。

*Shinkaiya lindsayi*の細胞は、白色と黒色の2種類の部位が存在する。黒色の部位は、餌として濾しとった堆積物残渣を溜めている。一方、白色の部位には、原形質が密に存在することから、黒色の部位に比べて高い栄養段階が示唆される。深海帯は、表層からのフラックスの集積場であることを考えると、フラックスを利用するゼノフィオフォア細胞は、ATLが2あるいはそれ以上の値を示す可能性が高い。黒色と白色の細胞質の栄養段階を明らかにすることで、個体(細胞)内での物質の流れを理解することができる。しかし、白色を呈する細胞については、アミノ酸窒素同位体分析を行うためには、さらにサンプルの量が必要であるなどの問題点も明らかとなった。

ゼノフィオフォアは、その大きさや複雑な形態ゆえに、他の生物の基質となることが知られている。また、単細胞真核生物は、バクテリアと動物を繋ぐ重要な生態的な位置にあるが、食物連鎖構造の解析はほとんど行われていない。本解析では、単細胞生物であるゼノフィオフォアと後生動物の間で、捕食-被食の関係がみられ、深海帯での単細胞真核生物の生態的な役割を解釈する上でのひとつの指標となる。

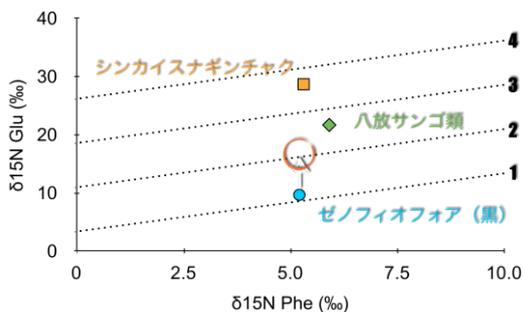


図4. ゼノフィオフォアとその周囲に生息する生物の栄養段階。栄養段階は、フェニルアラニンとグルタミン酸の窒素同位体比から求めた。

ゼノフィオフォア摂餌行動や成長は、深海底に設置したカメラにより観察されている(Gooday et al., 1993)。この観察の結果、ゼノフィオフォアが堆積物食であることや、その成長が散発的かつ急激に起こることなどが報告されている。この成長様式は、貧栄養か

つ高い溶存酸素環境に適応したゼノフィオフォアの成長戦略と密接に関係している可能性が高い。一方、Levin et al. (1999) や Levin and Gooday (1992) などは、北西大西洋の850 mにおける現場培養実験や多様性をなどを考慮した結果、ゼノフィオフォアは、深海底において物質循環には大きく貢献はしないが、ゼノフィオフォアとそれに集積する生物群集の地域的なホットスポットとしての重要性を指摘した。

以上のことを踏まえ、深海底におけるゼノフィオフォアの餌資源利用形態と深海底における生態を明らかにするために、現場培養ラベル実験を行い炭素・窒素同位体比分析を行った。解析に用いた試料は、鳥島東方沖深海底(5,371m)において、よこすかYK11-06/しんかい6500の潜航調査で採取した。現場培養実験では、炭素ラベルしたグルコースと窒素ラベルした珪藻(*Pseudonitzschia* sp. NIES-1383)を現場培養装置に添加し、2日間の培養を試みた。その結果、5,371mの深海帯でラベル実験が成功し、粒子状・溶存態有機物のどちらも短期間で取り込むことを明らかにした。また、真核生物に取り込まれた粒子状物質のうち、そのほとんどがゼノフィオフォアに捕集されている可能性がある。これらのことから、突発的な沈降有機物に素早く反応し、餌資源を効率的に捕集し利用することで、急速な成長を促すことが示唆された。また、ゼノフィオフォアの形態は、表層からの沈降有機物を効率よく補修するための機能的な意味が推測でき、特に、貧栄養海域においてその形態が非常に重要であることが示唆された。

(3) 2種類の細胞質部位の役割

ゼノフィオフォアには、白色と黒色を呈する2種類の細胞質部位が存在し、その機能的な違いや部位ごとの元素濃集の意味とその役割について、有孔虫細胞の細分化と特殊化に関する観察と分析を行った。黒色を呈する細胞は周囲の堆積物に比べAl, U, Baが濃集しているのに対して、白色の細胞にはHgの濃集が見られることから、何らかの元素濃集の機構が存在していると考えられる。これまでに、Swinbanks and Shirayama (1986)では、*Occultammina profunda*が、BaやPb, Ra, Poを濃集させているという報告をしたが、これが、種ごとに異なることを明らかにした。重金属の濃集は、微小環境が還元的になることで起こりうるが、生体内での代謝により濃集する可能性も考えられる。重金属や放射性物質の濃集では、生体側の防御機構も必要であ

り、重金属や放射性物質の濃集が微小環境によるものであるのか、あるいは、遺伝的に制御されているのか、また、いずれの場合であっても、何らかの生体側の防御機構が存在するはずである。遺伝子資源の探索を含めて、新たな研究の展開が期待できる。

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9件)

- ① 土屋正史, 貧酸素環境の小さな生物: 細胞内の小さな生物との相互作用. 生物科学, 査読有, 62, 2011, 143-150.
- ② 力石嘉人, 高野淑識, 小川奈々子, 佐々木瑠子, 土屋正史, 大河内直彦, アミノ酸の窒素同位体比を用いた生物の栄養段階の解析: 陸上環境を含めた生物生態系の解明に向けて. Researches in Organic Geochemistry, 査読有, 27, 2011, 3-11.
- ③ 力石嘉人, 小川奈々子, 高野淑識, 土屋正史, 大河内直彦, アミノ酸の窒素同位体比を用いた水棲生物の栄養段階の解析. 地球化学, 査読有, 44, 2010, 233-241.
- ④ Lecroq, B., Gooday, A. J., Tsuchiya, M., Pawlowski, J., A new genus of xenophyophores (Foraminifera) from Japan Trench: morphological description, molecular phylogeny and elemental analysis. The Zoological Journal of the Linnean Society. 査読有, 12, 2009, 455-464.
- ⑤ 土屋正史, 浮遊性有孔虫の分子系統解析からみた両極性分布の成立過程. 化石, 査読有, 85, 2009, 14-24.
- ⑥ Tsuchiya, M., Grimm, G. W., Heinz, P., Stögerer, K., Ertan, K. T., Collen, J., Brüchert, V., Hemleben, C., Hemleben, V., and Kitazato, H., Ribosomal DNA shows extremely low genetic divergence in a world-wide distributed, but disjunct and highly adapted marine protozoan (*Virgulinema fragilis*, Foraminiferida). Marine Micropaleontology, 査読有, 70, 2009, 8-19.

[学会発表] (計28件)

- ① 土屋正史, 宮脇省次, 野牧秀隆, 深海帯におけるゼノフィオフィアの資源利用: 有孔虫類の餌の嗜好性は、同所的・生態的種分化を引き起こすのか? 2012 MRC/有孔虫研究集会. 2012年3月4日, 東北大学.
- ② 野牧秀隆, 井上健太郎, 菅 寿美, 豊福高志, 土屋正史, 北里 洋, 深海底での炭素固定量の現場測定実験. ブルーアース 2012,

2012年2月22日, 東京海洋大学品川キャンパス.

- ③ 土屋正史, 宮脇省次, 多米晃裕, 植松勝之, 三宅裕志, 単細胞真核生物の多細胞性: 有孔虫細胞の細分化と特殊化. MRC2011/有孔虫研究集会, 2011年3月4日, 東北大学.
- ④ 土屋正史, 力石嘉人, 大河内直彦, 高野淑識, 小川奈々子, 藤倉克則, 吉田尊雄, 喜多村稔, Dhugal J. Lindsay, 藤原義弘, 野牧秀隆, 豊福高志, 山本啓之, 丸山 正, 和田英太郎, アミノ酸窒素同位体比に基づく海洋生態系食物網構造の解析. 日本地球化学会年会, 2010年9月8日, 立正大学熊谷校舎(招待講演).
- ⑤ 土屋正史, Béatrice Lecroq, Jan Pawlowski, Andrew J. Gooday, 北里 洋, 北西太平洋深海底における有孔虫ゼノフィオフィアの分布と遺伝的多様性. '10 Blue Earth シンポジウム 2010年3月3日, 東京海洋大学.
- ⑥ Tsuchiya, M., Gooday, A. J., Nomaki, H., Oguri, K., Kitazato, H., Cryptic biodiversity and habitat preferences of soft-shelled foraminifera in various oceanographic environments. International Symposium on Chemosynthesis-Based Ecosystems (4th CBE), 2009年7月2日, 名護市, 万国津梁館.
- ⑦ Hori, S., Tsuchiya, M., Nishi, S., Arai, W., Yoshida, T., Takami, H., Bacteria diversity surrounding a new candidate genes Xenophyophores (Foraminifera) discovered at a depth 7111 m near the Boso Peninsula. International Symposium on Chemosynthesis-Based Ecosystems (4th CBE). 2009年7月2日, 名護市, 万国津梁館
- ⑧ 土屋正史, 原始的な単細胞真核生物 *Gromia* の生態・共生・進化. 地球惑星科学連合大会, 2009年5月19日, 幕張メッセ.

[図書] (計1件)

- ① 土屋 正史 (分担執筆), 朝倉書店, 古生物学辞典, 2010, p. 148, 151, 283, 344.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

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

(4) 研究協力者

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
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