

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370046

研究課題名(和文) パルマ藻と原始型中心珪藻との比較による珪藻の進化機構の探究

研究課題名(英文) Parmales: an insight into the origin and evolutionary success of diatoms

研究代表者

桑田 晃 (Kuwata, Akira)

独立行政法人水産総合研究センター・その他部局等・主任研究員

研究者番号：40371794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：珪藻は、全地球の炭酸固定の20%以上を担う海洋で最も重要な微細藻類であるが、その起源・繁栄機構は依然不明である。我々は培養の成功により、珪藻同様シリカの殻を持つパルマ藻が非常に限られた海域で生存しながらも珪藻と極近縁で共通祖先を持つことを明らかにした。本研究では、珪藻の起源・繁栄機構の解明にとって格好の対照生物であるパルマ藻の生態学・生理学・藻類学・ゲノミクス・生物地球化学による多面的な解明を目的とし、パルマ藻・珪藻間の系統関係、葉緑体・ミトコンドリアゲノム、亜寒帯域における個体群維持機構、パルマ藻のシリカの殻形成機構、パルマ藻の生活史、特異的なバイオマーカー(分子化石)の解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Parmales are an unknown small marine phytoplankton group with a silicified cell wall. Based on similarities in cell wall structure, Parmales has been proposed as a close relative of diatoms, the most successful microalgal group in modern oceans, and may play a key role in understanding their origin of silica cell wall and early evolution, which have not yet been clearly established. Recently, we isolated the first ever culture of Parmales in the Oyashio region of Japan. Molecular phylogenetic analysis of this culture indicated that Parmales was within the bolidophyceyan clade of autotrophic naked flagellates and a sister group of diatoms. We have studied on Parmales using ecological, physiological, genomic and biogeochemical approaches and analyzed their phylogenetic relationship between Bolidophyceya and diatoms, chloroplast and mitochondria genomes, silica cell wall formation process, population dynamics in the Oyashio region, life cycle and specific biomarkers (molecular fossils).

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

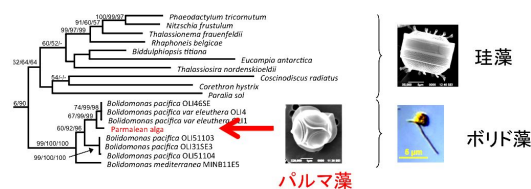
キーワード：藻類 進化 珪藻 海洋生物学 ゲノム パルマ藻 プランクトン

1. 研究開始当初の背景

珪藻は、シリカの殻を持つという特徴を持ち、推定 10 万種以上と最も多様性が高く、海洋生態系においては一次生産者として熱帯雨林と同等の地球全体の 20% 以上の炭酸固定量を担う、現在最も繁栄している微細藻類である。その重要性のため、現在珪藻は世界的に注目されており、珪藻の繁栄機構・シリカの殻の形成機構・進化過程の解明を目指した研究が世界的に盛んになりつつある。現にその目的のため珪藻類 2 種の全ゲノム解読が既に終了している。しかしながら、珪藻のグループ内での解析に留まり、さらにはゲノムが解読された珪藻が実際の現場では非常に稀な実験室内のモデル生物で、珪藻固有の生活史を持たない特殊な種であることから、珪藻グループ全体がいかに出現し、いかに固有の生活史を持ちながら現在の繁栄を遂げるまで進化したのか？その起源と繁栄機構は依然不明のままである。

珪藻の起源に関しては、1999 年にボリド藻が分子系統解析により珪藻の姉妹群であることが示された。しかし、ボリド藻は珪藻とは全く形態の異なるシリカの殻を持たない微小鞭毛藻であり、珪藻の起源は依然不明となっている。一方、サイズは 2-5 μm と小型で亜寒帯域を中心とする限られた海域に生存する微細藻類のバルマ藻が、珪藻同様にシリカの殻を持つため、珪藻と密接な関係を持つと推測されてきたが、1979 年の北西太平洋での発見以来 30 年経ってもなお培養不能なためバルマ藻の実体は全く不明であった。

そのような状況の中、2008 年に我々は、親潮域で生育するバルマ藻を対象とし細胞内に取り込んだケイ素を特異的に染色する蛍光色素 PDMPO を利用して単離することにより、世界で初めてバルマ藻の培養株の確立に成功した。取得した培養株を用いて電子顕微鏡による形態観察、分子系統解析および光合成色素分析を行った結果、バルマ藻が従来考えられていた黄金色藻には属さず、珪藻の姉妹群であるボリド藻と同じクレードに入るほど極近縁であり、バルマ藻がボリド藻同様、珪藻と共通の祖先を持つことが示唆された(図 1)。



培養実験によるパルマ藻のシリカの殻形成機構の解明

パルマ藻のシリカの殻形成と海水中のシリカ濃度の関係について培養実験により解析を行った。培養実験により得られたパルマ藻のシリカの殻形成と海水中のシリカ濃度の関係に関する解析結果をふまえ、パルマ藻のシリカの殻形成を海水中のシリカ濃度により制御し、パルマ藻の細胞分裂過程に伴うシリカの殻形成過程を蛍光顕微鏡観察および電子顕微鏡観察により調べた。

生活史の解明

パルマ藻の生活史を解明するため、様々な温度環境・光環境・栄養環境下で培養し、パルマ藻の生活史のステージの変化を検出した。電子顕微鏡観察、フローサイトメータによる解析、遺伝子解析を行い、パルマ藻の生活史の各ステージの特定を行った。

(3) 分子化石を用いた生物地球化学的解析：分子化石(バイオマーカー)の検出

パルマ藻、珪藻それぞれのグループが特徴的にもつバイオマーカー成分を明らかにするため、それぞれの培養株を培養し、培養サンプルを対象にそれぞれ固有のバイオマーカー成分の検出を有機化学分析により行った。分析は主にガスクロマトグラフィー(GC)、ガスクロマトグラフ質量分析(GC/MS)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて化合物の検出・同定・定量を行った。

4. 研究成果

(1) パルマ藻のゲノム解析

パルマ藻のゲノム解析により、葉緑体とミトコンドリアのゲノム解読を終了した(図2)。各ゲノムの遺伝子は珪藻の遺伝子と非常に相同性が高く、各ゲノム構造が珪藻類に酷似することを明らかにしたさらに、パルマ藻の葉緑体とミトコンドリアゲノムの多数の遺伝子を用いて分子系統解析を行った結果、パルマ藻は珪藻の姉妹群であることの確証を得た。

また、核ゲノムについては、ゲノムサイズが約40Mb、約11000の遺伝子を持つことが推定された。この核ゲノムのドラフト配列から得られる推定タンパク質配列のすべてを用いて、光合成生物・非光合成生物169種の全タンパク質とともに、Gclustによるタンパク質クラスタリングを行った。その結果、2種の珪藻とパルマ藻のみに存在する539個の相同タンパク質クラスタを同定した。その中には、ケイ酸トランスポータと推定されるタンパク質などが含まれていた。

(2) フィールド調査・培養実験による亜寒帯海域における個体群維持機構

パルマ藻は、主に冬季~春季の低水温期に

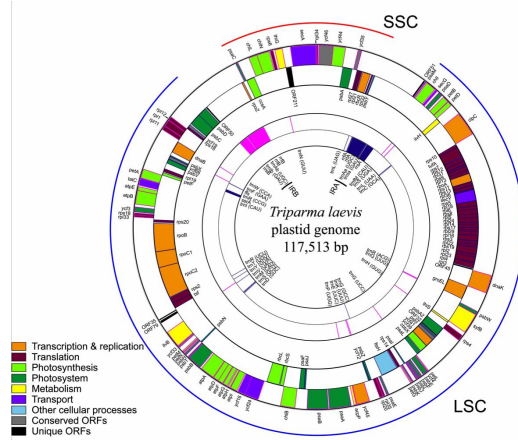


図2 パルマ藻の葉緑体ゲノム

有光層中で増殖し、夏季-秋季にかけ成層が発達し表層水温が15を越えると増殖が不可能となり、表層から消失する。その間、個体群は水温15以下の水温躍層下の亜寒帯で生残する。秋から冬にかけ水が混合し、低水温期に入ると再び増殖を開始し、個体群を維持することを明らかにした(図3)(Ichinomiya et al. *Aquat. Microb. Ecol.* 2013)。

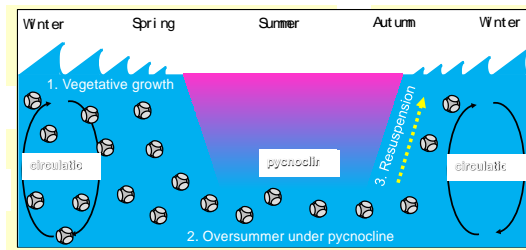


図3 亜寒帯海域におけるパルマ藻の個体群維持機構

(3) シリカの殻形成機構

パルマ藻は珪藻と大きく異なり、ケイ酸塩欠乏下でも無殻の細胞のまま増殖する。ケイ酸塩存在下では、シリカの殻形成を開始する(図4)。殻形成は、細胞内部で形成されたシリカのプレートが細胞外に送り出され、細胞表面で規則正しく配置されることにより特徴的なシリカの殻が形成されることが明らかとなった。

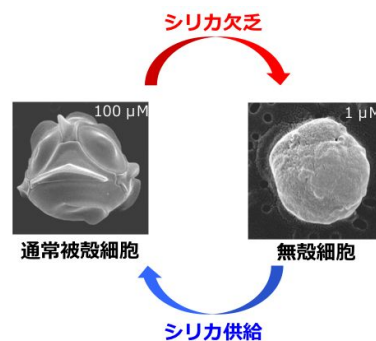


図4 パルマ藻の殻形成に対するケイ酸塩濃度の影響

(4) 生活史

パルマ藻の生活史には、シリカの殻を持つ通常のステージとともに、ボリド藻に類似した鞭毛細胞ステージを持つことが複数種で明らかとなった(図5)。またこのステージは主に増殖停滞期に出現することも明らかとなった。約2億年前に最初に出現した原始的珪藻である中心珪藻は、有性生殖過程において、鞭毛を持つステージの精子とシリカの殻を持つ卵細胞に分化して卵生殖を行う。よってパルマ藻の生活史は、シリカの殻のステージと鞭毛ステージ両者を持つと言う点で、原始的珪藻である中心珪藻の生活史と類似性を持つことが示された。

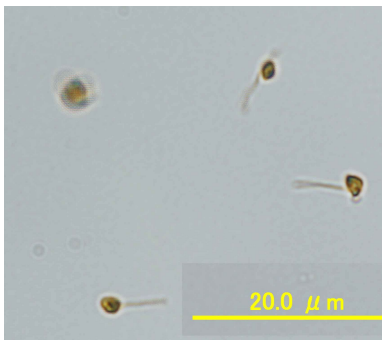


図5 シリカの殻を持つ通常細胞(左上)より出現したボリド藻状鞭毛細胞

(5) 生物地球化学的解析によるバイオマーカー(分子化石)の探索

パルマ藻の培養株を用いて固有の脂質バイオマーカー成分の検出を行った結果、パルマ藻バイオマーカーとして、C21:6 n-アルケンや、C20:5、C22:6 脂肪酸、C27-C29 ステロイドを同定した。特にステロールにおいてはC29 -シトステロールが圧倒的に卓越することが明らかとなった。よって、パルマ藻は原始的な中心珪藻と共通の脂質バイオマーカーを持つ一方、比較的高分子量のパルマ藻固有の脂質バイオマーカーも持つことが示された。

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6件)

Mutsuo Ichinomiya, Miwa Nakamachi, Yugo Shimizu, Akira Kuwata. Growth characteristics and vertical distribution of *Triparma laevis* (Parnales) during summer in the Oyashio Region, western North Pacific. *Aquatic Microbial Ecology*, 査読有, 68, 2013, 107-116.

Ken Sawada, Hideto Nakamura, Takaki Arai, Minoru Tsukagoshi. Evaluation of paleoenvironment using terpenoid

biomarkers in lignites and plant fossils from the Miocene Tokiguchi Porcelain Clay Formation at the Onada mine, Tajimi, central Japan. *International Journal of Coal Geology*, 107, 2013,78-89.

Naoki Sato, Naoyuki Tajima. Statistics of N-terminal alignment as a guide for refining prokaryotic gene annotation. *Genomics*, 査読有, 99, 2012, 138-143.

[学会発表](計44件)

桑田 晃, パルマ藻から珪藻の進化の秘密を探る, 日本植物学会第77回大会 2013.9.13, 北海道大学, 札幌.

山田和正, 神谷充伸, 大城香, 吉川伸哉, パルマ藻から見た珪藻の細胞外被形成機構, 日本植物学会第77回大会 2013.9.13, 北海道大学, 札幌.

佐藤直樹, 斉藤憲治, パルマ藻のゲノム解析, 日本植物学会第77回大会, 2013.9.13, 北海道大学, 札幌.

沢田健, 加納千紗都, 吉川伸哉, 一宮睦雄, 桑田晃, パルマ藻の脂質バイオマーカー:珪藻との関連性, 日本植物学会第77回大会 2013.9.13, 北海道大学, 札幌.

河地正伸, 佐藤真由美, Mary- Helene Noel, 生活史からみたパルマ藻の多様性, 日本植物学会第77回大会, 2013.9.13, 北海道大学, 札幌.

一宮睦雄, 親潮および親潮-黒潮混合域におけるパルマ藻の分布と季節変化, 日本植物学会第77回大会 2013.9.13, 北海道大学, 札幌.

Tajima N, Saito K, Sato S, Maruyama F, Ichinomiya M, Yoshikawa Y, Kurokawa K, Ohta H, Tabata S, Kuwata A, Sato N. Sequence and analysis of the chloroplast and mitochondrial complete genomes of the parmales *Triparma laevis*. The 12th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, 2013.8.18 Dalhousie University, Halifax, Canada

Kuwata A, Ichinomiya M, Yoshikawa S, Kawachi M, Saitoh K, Sato N, Sawada K. Exploring the Evolutionary Link Between Parnales and the Success of Diatoms in Marine Ecosystems. EMBO Workshop "Molecular Life of diatoms", 2013.6.28, Collège de France, Paris, France.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑田 晃 (KUWATA AKIRA)
水産総合研究センター・東北水産研究所・
主任研究員
研究者番号: 40371794

(2) 研究分担者

佐藤 直樹 (SATO, Naoki)
東京大学・総合文化研究科・教授
研究者番号: 40154075

斉藤 憲治 (SAIYO, Kenji)
水産総合研究センター・中央水産研究所・
グループ長
研究者番号: 40154075

吉川 伸哉 (YOSHIKAWA, Shinya)
福井県立大学・海洋生物資源学部・講師
研究者番号: 20405070

沢田 健 (SAWADA, Ken)
北海道大学・理学研究科・准教授
研究者番号: 20333594

(3) 連携研究者

一宮 睦雄 (ICHINOMIYA, Mutsuo)
熊本県立大学・環境共生学部・講師
研究者番号: 30601918

河地 正伸 (KAWACHI, Masanobu)
国立環境研究所・生物生態系研究センター
室長
研究者番号: 50260469

大城 香 (OHKI, Kaori)
福井県立大学・海洋生物資源学部・
名誉教授
研究者番号: 90101104

中村 洋路 (NAKAMURA, Youji)
水産総合研究センター・中央水産研究所・
研究員
研究者番号: 90463182