

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：82617

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510021

研究課題名(和文)植物プランクトンモニタリングのための優占種遺伝子情報の整備

研究課題名(英文)Improvement of molecular information of dominant species for phyto-plankton monitoring

研究代表者

辻 彰洋(Tuji, Akihiro)

独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・研究主幹

研究者番号：40356267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：1. ダム湖を中心とした湖沼に優占的に出現する植物プランクトンの分類学的検討を進め、現場のアセスメントやモニタリングで使えるチェックリストとしてまとめ、論文やHPとして公表した。
2. 日本および世界各地の水域から藍藻20株、珪藻360株を確立し、230株について遺伝子解析を行った。これらについては、gene bankに登録されていない多くの新規分類群を含んでいる。
3. 珪藻葉緑体rbcl遺伝子を用いて、霞ヶ浦の1年間の試料のメタゲノム解析を行った。優占種についてはおおむね整合性がとれていたが、gene bankに登録されている遺伝子情報だけでは半分程度しか分子同定が出来なかった。

研究成果の概要(英文)：1. The check list for phyto-plankton monitoring on artificial reservoir has build up and published as academic paper and home page.
2. About 20 cyanobacteria strains and 360 diatom strains were isolated from Japan and world-wide water bodies, and molecular analysis of 230 strains were done. It include many newly obtained sequences without deposited gene bank.
3. A meta-genome analysis on Lake Kasumigaura was performed on planktonic diatoms using rbcl-3P gene. Comparing meta-genome analysis and normal microscopic counting (analysis), the trend of dominant species was fitted. Less than half species of rbcl molecular information in the analysis had deposited in gene bank.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学

キーワード：モニタリング 植物プランクトン メタゲノム解析 バーコーディング

1. 研究開始当初の背景

淡水域のブルーム(着色現象)を引き起こす藻類は、その毒性が引き起こす直接的影響、景観や食物連鎖などの生物間相互作用に与える間接的影響、あるいは水系のモニタリングの対象生物として非常に重要である。このようなブルームを引き起こす種の分類学的研究については、1970年代以降の研究によって相当進歩してきた。

アオコを形成する藍細菌(藍藻)についての研究については、渡辺(2007)が日本産の種のほとんどについてまとめており、この図鑑を元に辻らがアオコをつくる藍藻についてのHPを作成・管理している。赤潮を形成する渦鞭毛藻類については、安達(2000)が日本産種を幅広く網羅している。プランクトン性の珪藻については申請者がまとめたもの(辻・伯耆 2001)が参考書として広く利用されてきている。

しかしながら、過去に行われた植物プランクトンアセスメントの報告書について、申請者らが2008年に行った調査によれば、藍細菌が310分類群、珪藻が1176分類群、緑藻が1227分類報告されている。これは、現在知られている種の数倍にもなり、海産種や化石種などの明らかな誤同定種を多く含み、アセスメントの結果が科学的に信頼できるデータとなっていない可能性があった。

このことは、分類研究者の研究結果が、アセスメントのような応用現場に届いていないことを示している。そのため、申請者らはダム源地センター・国立環境研究所らと共同で、全国のダム湖の調査を行い、応用現場で利用しやすいモノグラフの作成に取り組んできている。

一方、バクテリアやクリプトスポジウム(原虫)などの同定には、分子生物学的手法による同定が一般化している。分子生物学的手法は、顕微鏡を用いた古典的手法に比べ、経験があまり必要とされず、また、同定者による違いが生じにくいなど優れた特徴を持つ。

しかし、微細藻類での分子同定にも現状で大きな問題点がある。著者らが行った螺旋状の形態を持つ藍細菌の研究(Tuji & Niiyama 2010)の結果、既存の遺伝子情報のデータベースには、多くの誤った情報が登録されていることが分かった。*Anabaena spiroides*とされる種と関連種について、遺伝子データベースに登録されている情報から、作成した系統樹を下頁に示す。

このように *A. spiroides* とされてきた種は多くのクラスターに分かれ、現在の Komarek 氏らの体系では属レベルで異なるものが同一種名で登録されている。

本研究課題では、このような混乱を回避するために日本産のブルームを形成する優占的に出現する微細藻類についての確かなデータベースを構築することを目的とした。

2. 研究の目的

生物のバーコーディングは多くの生物群において、試行されているが、微細藻類については、前述したデータベースの問題により、様々な混乱が生じている。また、先駆的な例は散在するものの同定の問題や、対象を特定の属に絞っている等の問題により、応用的に使える物となっていない。

本研究では、対象種を人工水系に優占する種に絞り、分類学的に確かな遺伝子データのデータセットを構築することとした。

このことで少なくとも水系で着色現象を起こすような問題のある藻類について、専門的知識がなくとも、簡易同定が可能になる。また、分子同定は従来のアセスメントにおける同定の品質管理(QC)に用いることも可能となると考えられた。

3. 研究の方法

(1) ダム湖植物プランクトンチェックリスト

平成21年~22年に収集した全国のダム湖のサンプルについて、分類学的検討を行い、応用研究や現場で同定可能なレベルも考慮し、チェックリストを作成した。また、このチェックリストについては、HP、学会発表や、アセスメント関係者のヒアリングをおこない、フィードバックを得た。

(2) 応用的に重要な微細藻の分類学的新知見

上記のダム湖の調査に加え、霞ヶ浦において、国立環境研究所の毎月の定期調査サンプルの分譲を受け、分類学的検討を行った。また、全国の湖沼でサンプリングを行った。これらの試料について形態学的検討を行うと共に、遺伝子解析を行い、分類学的検討を行った。

(3) バーコード情報の蓄積

全国(霞ヶ浦・支笏湖および近郊河川・琵琶湖・余呉湖および内湖・池田湖・恐山個・皇居・穴道湖・印旛沼・中池見湿地・屋久島河川・奈良県内河川・伊豆沼・富士五湖および近郊河川・沖縄県 ダム湖および河川)および世界各地(Ghent 近郊河川・タイ・チェンマイ近郊河川・止水域・モンゴル フブスグル湖および北部淡水域)から採集された試料をもとに、ピペット洗浄法またはKTプレート法によって、株を分離し、d培地(tuji 2000: 改変WC培地)によって培養を行った。

培養は種として6穴のマルチウェルにより行い、その一部をCTAB法またはChelex法(Walsh et al. 1991)によって遺伝子抽出を行った。PCR増幅に用いたプライマーおよび条件・シーケンスはTuji et al. (2014)に掲載したものを主として用いた。遺伝子抽出を行った以外の培養株はエタノール固定を行い、証拠標本とした。また、その一部を灰化処理し、LM, SEMにより観察し同定を行った。

(4) 霞ヶ浦における植物プランクトンのメタゲノム解析

珪藻メタゲノム解析は次の方法により行った。

霞ヶ浦湖心の試水 1L を冷蔵し持ち帰った。

その日のうちに、冷却遠心により濃縮 (250ml→15ml→ペレット) を行った。

ペレットを 1.5ml チューブに入れ、GITC バッファを加え、冷凍保存した。

保存した試料について、80 度 20 分の熱処理を行い、磁気ビーズ処理により、DNA を抽出した。

rbcL 珪藻特異プライマとタグ付きストラメノパイルプライマにより 1 段階目の増幅を行った。

上記の産物について、rbcL-3P 領域のストラメノパイルプライマ (+ LIB-B) と tag+MID+LIB-A 付ストラメノパイルプライマを用い、2 回目の増幅を行った。

今回は MID (multiplex identifier) タグによりサンプルを 14 分割 (各月に相当) している。

Flash GEL system による精製を行った

ライブラリ調整 (emPCR Kit: Lib-L) をメーカーマニュアルの通りに行った。

ロッシュ社 GS junior によりパイロシーケンスを行った。

[Assams]+[Claident] (田辺晶史さん開発) による解析 (短断片の除去・99% 類似度による結合) を行った。

(5) SC-PCR 手法の確立

ある程度細胞数が取れる場合は Chelex 法により遺伝子を抽出した (Tuji et al. 2014)。非常に小さな細胞については、コート付スライドガラスを用い、5 μ l の GITC 溶液で抽出を行い、20 μ l の磁気ビーズ法を行う事で良好な結果が得られた。

4. 研究成果

(1) ダム湖植物プランクトンチェックリスト

2 年間の日本国内のダム湖の横断調査の結果に基づいて、ダム湖のモニタリングにおいて重要な優占種を確認し、第一次のチェックリストを作成し、学会発表などで公表した (日本珪藻学会・日本陸水学会 2011)。そこで得られた意見を元に第二次のチェックリストを作成し、国立科学博物館の HP (ダム湖のプランクトン) として公表し、また、2013 年度のダム湖のアセスメントにおいて試行していただいた。このアセスメントの試行結果と水源地環境センターより提供を受けた全国のモニタリング結果を基に、チェックリストを再度見直し、2014 年度より第三次のチェックリストとして HP に掲載すると共に、ダム湖のモニタリングで活用してもらっている。

(2) 応用的に重要な微細藻の分類学的新知見

本邦のアオコ形成藍藻について、幅広く用いられている「日本アオコ大図鑑」(渡辺 2007) について、その後の分類学の変更の現状や新知見について辻・新山 (2012) においてチェックリストとしてまとめて発表し、そ

の背景について新山・辻 (2013) などで解説を行った。また、カビ臭の原因となる *Phormidium tenue* とされていた藍藻 (*Pseudoanabaena* 属) について、琵琶湖と霞ヶ浦産の株について分類学的検討を行ったところ、琵琶湖でカビ臭の原因となっているものは新種であると判明した (新山ら 2013 口頭発表、投稿中)。また、琵琶湖の固有種で冬季の優占種であるスズキケイソウについて、分類学的検討を加え、新属を記載した (Tuji et al. 2014)。また、2011 年の冬季に余呉湖で優占した *Aulacoseira* 属が *A. subctica* 群の新種であることを明らかにした (辻ら 2012 口頭発表)。

(3) バーコード情報の蓄積

シアノバクテリアにおいては、上記の研究において、形態学的検討と並行して 16S rRNA 遺伝子を解析しており、日本湖沼で出現するアオコ形成藍藻の 16S rRNA 遺伝子のほとんどを自前で保有している。現在、DDBJ や NCBI などの gene bank は、藍藻については、悟道的のシーケンスが多量に登録されており、リファレンスとしての利用が難しくなりつつある。その中で形態情報 (含: 標本の保有) も含めた日本のアオコ形成藍藻の遺伝子情報を蓄積していることが大きな成果であると言える。

珪藻については、淡水域のものを中心に、約 360 株を今回の研究期間中に確立し、遺伝子抽出を行った。

そのうち、研究期間中に 214 株について rbcL 遺伝子のほぼ全長の解析を成功させた。系統樹の遺伝距離から検討したところ、すくなくとも 214 株に 38 属 120 分類群が含まれている。培養株は殻が薄く、収量が少ないため、手間取っているが、現在までに、そのうち 130 株について同定が終わっている。SSU, ITS, LSU 遺伝子は rbcL 遺伝子解析の結果、既存データがないか少ないものについて重点的に解析を行い、現在までに 70 株について解析を行った。大型珪藻の場合、珪藻以外の藻類のコンタミを避けることが出来ないため、ユニバーサルプライマによる PCR では成功率が低い、現在、珪藻用の特異プライマを開発して使っているが、依然として成功率が高くなく、更なる改良が必要である。

遺伝距離が近く、優占する多種が、出現する中心類珪藻については、psbA, psbC 遺伝子による解析を行った。(Tuji et al. 2014)

(4) 霞ヶ浦における植物プランクトンのメタゲノム解析

2012 年度の 1 年間の解析の結果、珪藻 rbcL-3P 遺伝子によるメタゲノム解析の結果と、従来の顕微鏡下でのカウントについては、優占種についてはおおむね整合性がとれていた。しかし、以下のような違いも見られた。

DDBJ などの gene bank では、霞ヶ浦のメタゲノム解析で得られた分類群の半分程度しか、当てはまらなかった。優占種でも一致

しない物が多かった。一方、上記の自前遺伝子を用いることで、ほとんどの優占種について、種を推定する事が可能となった。現段階では、メタゲノム解析を成功させるためには、前段階として、その地域の出現種の遺伝子解析を行っておく必要があることが明らかになった。

計数では出現しないもののメタゲノム解析で出現が見られる事があった。試料を高倍の光学顕微鏡やSEMで詳細に検討したところ、多数の破片が混入していたことから、底泥の巻き上げによる、遺伝子のコンタミが示唆された。底泥の巻き上げはこの様な遺伝子のコンタミだけではなく、死細胞の混入によるカウントの誤差にもつながり、霞ヶ浦のような浅い湖沼では、従来法の計数・メタゲノム解析の両方で大きな誤差の原因となると考えられ、比較が困難になりやすい。

霞ヶ浦のような浅い湖沼では *Stephanodiscus* や *Nitzschia* 属は、極めて形態および遺伝子が似た複数種が同時に優占する。底泥からの死細胞をカウントから除くために酸処理ではなく生サンプルを計数することが、このような湖沼では必要であり、これらの類似種を計数時に区別することは難しい。

10 μ m以下の小型の中心類珪藻は、計数法に比較し、メタゲノム解析では多く出現した。これら小型の中心類珪藻は、浅い湖沼では優占するが、通常の計数では評価が難しい。これらの評価については、メタゲノム解析が優れていることが明らかになった。

(5)SC-PCR手法の確立

単細胞あるいは、少数の細胞によるPCRは、難培養性の藻類の遺伝的多様性を明らかにするためには重要である。いくつかの方法を試し、Tuji et al. (2014)はスズキケイソウについて5細胞からDNAを抽出し、SSU, ITS, LSU, rbcL, psbA, psbC 遺伝子の解析に成功した。また、*Stephanodiscus akanensis* のような5 μ m程度の小型珪藻からも遺伝子抽出に成功している。

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10件)

Tuji, A., Mohri, Y., KI, J.S., Jung, S. W. & Julius, M. 2014. Phylogeny of *Praestephanos* gen. nov. (Thalassiosirales, Bacillariophyceae) based on *Stephanodiscus suzukii*, and related freshwater thalassiosiroid diatoms. *Plankton Benthos Res* 9(2): 132-140.

Tuji, A. and Niiyama, Y. 2013. Morphology and molecular phylogenetics of *Sphaerospermopsis oumiana* (M.Watan.) Tuji et Niiyama compared

with *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Komárek) Werner et al. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B*, 39: 101-105

Tuji, A. and Williams, D. M. 2013. Examination of Types in the *Fragilaria vaucheriae-intermedia* Species Complex. *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B*, 39: 1-9,

Tuji, A., Leelahakriengkrai, P. and Peerapornpisal, Y. 2012. Distribution and Phylogeny of *Spicaticribrakingstonii-rudis* Species Complex. *Mem. Natl. Mus. Nat. Sci., Tokyo*, 48: 139-148.

Tuji, A. and Niiyama, Y. 2012. Three New Combinations of Japanese Planktonic Cyanobacteria Species. *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B*, 38: 37-38.

辻 彰洋 2011. 日本における *Didymosphenia geminata* (Lyngb.) Mart. Schmidt の出現について. *Diatom* 27: 65-68.

Tuji, A. 2011. Transfer of *Cymbella koidzumiana* Skvortsov to the genus *Navicula*. *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci. ser. B*. 37: 113-115.

Niiyama, Y., Tuji, A. & Tsujimura, S. 2011. *Umezakia natans* M.Watan. does not belong to Stigonemataceae but to Nostocaceae. *Fottea* 11(1): 163-169.

(下記は総説 査読あり)

新山優子・辻 彰洋 2013. 「総説」藍藻ネンジュモ目の浮遊性種の分類学的変更と類似種の比較. *陸水学会誌* 74:153-164.

辻 彰洋・新山優子. 2012. 日本産アオコ形成藍藻種のチェックリストおよび分類学的コメント(短報). *日本プランクトン学会報* 59: 30-34.

〔学会発表〕(計13件)

外丸裕司・木村圭・辻 彰洋 2013. 新奇凸凹表面寒天プレート(KTプレート)を用いた珪藻の培養と応用例. *藻類学会*

辻 彰洋・新山優子・中川恵・高村典子 2013 次世代シーケンサーによる湖沼プランクトン珪藻モニタリングの可能性. *日本珪藻学会第34回大会*, 埼玉. *Diatom* 29: 75 (18).

辻 彰洋 2013. 海外調査で必要になる様々な手続きについて. *日本珪藻学会第33回研究集会*, 瀬底. *Diatom* 29: 91 (22).

Niiyama, Y., Tuji, A. and Ichise, S. 2013. A new species *Pseudanabaena foetida* sp. nov. producing 2-methylisoborneol (2-MIB) from Japan. *The 19th Symposium of International Association for*

Cyanophyte Research, Cleve Land, U.S.A.
新山優子・辻彰洋・一瀬諭・中川恵・高村典子 2013. Phormidium tenue とされてきた Pseudanabaena 属の数種について. 日本陸水学会大津大会

辻彰洋・新山優子・中川恵・高村典子, 2013
霞ヶ浦におけるプランクトン珪藻のメタゲノム解析とモニタリングへの応用の可能性. 日本陸水学会大津大会

辻彰洋・藤原直樹・一瀬諭 2012. 余呉湖に出現した *Aulacoseira subarctica* 種群 日本珪藻学会第 33 回大会 (つくば) Diatom, p.42.

Tuji, A. 2012. Phylogeny of genus *Spicaticribra* and related taxa International Diatom Symposium 2012 (Ghent) Oral and poster program IDS2012, p. P39.

辻彰洋・新山優子・一柳英隆・高村典子, 2011, ダム湖における植物プランクトンのモニタリングチェックリスト. 日本珪藻学会第 31 回研究集会 (田沢湖). 講演要旨集 p. 12.

辻彰洋・毛利由華, 2011, 微細藻類モニタリングのための遺伝子バーコーディングの可能性と限界. 日本珪藻学会第 31 回研究集会 (田沢湖). 講演要旨集 p. 19.

新山優子・辻彰洋・一柳英隆・高村典子, 2011, ダム湖における植物プランクトンのモニタリングチェックリスト 1. 日本陸水学会第 76 回大会 (島根). 講演要旨集 P13.

辻彰洋・新山優子・一柳英隆・高村典子, 2011, ダム湖における植物プランクトンのモニタリングチェックリスト 2. 日本陸水学会第 76 回大会, (島根). 講演要旨集 P14.

辻彰洋, 2011. 琵琶湖固有種 *Stephanodiscus suzukii*, *Aulacoseira nipponica* の系統的位置. 日本珪藻学会第 32 回大会 (東京). 講演要旨集 p. 24.

[図書] (計 3 件)

高村典子・中川恵・一柳英隆・辻彰洋. 2011. ダム湖のプランクトン群集の特徴. p. 107-129. 大森浩二・一柳英隆編. ダムと環境の科学 II. 京都大学学術出版会.

辻彰洋. 2011. コラム 4 植物プランクトン種群の設定. p. 131-134. 大森浩二・一柳英隆編. ダムと環境の科学 II. 京都大学学術出版会.

辻彰洋. 2011. 湖沼の酸性化. Topics 2 p. 82-83. 日本陸水学会編. 川と湖を見る・知る・探る 陸水学入門. 地人書館.

[その他]

ホームページ等 (計 2 件)

・ダム湖のプランクトン

<http://research.kahaku.go.jp/botany/dam>

[/about.html](#)

・アオコをつくる藍藻

<http://research.kahaku.go.jp/botany/aoko/aoko.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻 彰洋 (TUJI, Akihiro)

国立科学博物館・植物研究部・研究主幹

研究者番号: 40356267