

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657060

研究課題名(和文) 真核微生物のかたちとゲノムを繋ぐ新規生物プロファイリング法の開発

研究課題名(英文) Developmental studies of a new bio-profiling method for linking morphology and genomic information of eukaryotic microorganisms.

研究代表者

横山 亜紀子 (YOKOYAMA, Akiko)

筑波大学・生命環境系・研究員

研究者番号：30466601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：真核微生物には環境配列のみで知られる多数の未知生物が存在し、中には既存系統群のいずれにも当てはまらない全くの未知生物も報告されている。その一方で、既に分類学的には記載されているものの、塩基配列情報が取得されていないために未知生物と判断されている場合も少なからず存在する。本研究では実体未知生物、あるいは難培養や高速遊泳が原因で遺伝情報が欠失している真核微生物での網羅的かつ効率的な生物プロファイリングを目指し研究を実施した。

研究成果の概要(英文)：Metagenomic studies using environment sequences reveals that huge numbers of unknown species, including completely new phylogenetic groups, existed in the eukaryotic microorganisms. On the other hand, some of taxonomically described species might be recognized as unknown organisms because their sequences data have not been accumulated. In this study, we performed trial investigations to make a comprehensive and efficient bio-profiling method for unknown, hardly culturable, or high speed swimming eukaryotic microorganisms.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物多様性・分類

キーワード：藻類 プロティスト

1. 研究開始当初の背景

近年の環境メタゲノム解析は、膨大な環境配列情報をもたらし、真核微生物（藻類やプロティスト）の多様さだけでなく、多数の未知生物の存在を明らかにした。環境配列と FISH (fluorescent in situ hybridization) により色素体の存在が示唆されていたピコビリ藻 (Not et al. 2007) は、その後、FACS (fluorescence activated cell sorting) での生物単離と、WGA (Whole Genome Amplification) によるゲノム解析で、従属栄養生物と推測された (Yoon et al. 2011)。最終的に実体が顕微鏡で観察されるに至り、この系統群の少なくとも1種は、色素体を持たない生物であることが判明し、*Picomonas judraskeda* として記載された (Seenivasan et al. 2013)。しかし、本研究の開始当初には、その実体(形態)は依然不明のままであった。同様に、各スーパーグループ(真核微生物の上位分類群)の基部という進化的に重要な位置にありながら、形態情報が不明な生物群も多数存在するものが現状である(例えばラッペモナス, MAST; 海産ストラメノパイル, MALV; 海産アルベオラータなど)。このような実体が未知生物の多くは、従属栄養性プロティストである可能性が高い。従属栄養真核微生物は、消費者や分解者として、生態学的にも非常に重要であるにもかかわらず、分類・生態学的情報が欠如しているものが多い。そのため、既に形態に基づき分類学的記載が行われ、学名が付与されているにも拘らず、遺伝子配列が取得されず、系統的位置が不明なままとなっている生物も多数存在する。このような形態情報と分子情報の不一致、あるいは真に未発見な未知生物が多数存在する理由は、これらの生物が希少、難培養性、細胞が微小、高速運動性、不定形態(多形態)、あるいは化学固定困難などが原因であると考えられている。したがって、これらの未知生物の実体(実態)を明らかにするための、新し

い視点に立った形態観察方法の確立が必要とされていた。

2. 研究の目的

本研究では、形態と塩基配列情報の不一致解消、あるいは未知生物の記載のための効率的な生物プロファイリング法の確立を目的とした。特に、難培養、高速遊泳性の藻類やプロティストなどの形態情報を効率的に取得するためのプロトコル作りを目指すものである。

3. 研究の方法

真核微生物の形態情報を効率的に取得する手段として、本研究では、高速ビデオ撮影を用いた顕微鏡観察を試みた。効率的な形態情報取得のためのプロトコル作りの端緒として、(1) 既存培養株による形態観察法の検討(2) 観察チャンバーの検討、(3) 未記載種の鞭毛運動観察、(4) 野外採集物の観察、(5) 単離細胞からの塩基配列情報取得法の検討を実施した。なお、高速度撮影には FASTCAM FA3 (フォトロン社) を使用し、観察に用いた顕微鏡は所属研究室に既設の倒立顕微鏡 IX71 (OLYMPUS) を用いた。

4. 研究成果

(1) 既存培養株による形態観察法の検討

培養株として確立した *Pyramimonas* sp., *Symbiodinium* sp. を用いて高速度撮影を実施した。*Symbiodinium* sp. の回転遊泳運動や *Pyramimonas* sp. の鞭毛運動は 1500fps の撮影速度で、高解像な静止画として撮影できることを確認した。一方、葉緑体の自家蛍光や核酸蛍光染色などにより、オルガネラの位置も同時取得する方法についても検討した。明視野から蛍光へ切り替えることで、同一細胞の明視野像と蛍光像の両方を取得できた。しかし、観察倍率の上昇とともに、光量が大幅に減少するため、得られた蛍光像は明瞭ではなく、今後、画像解析などを組み合わせた改良が必要であることも確認された。

(2) 観察チャンバーの検討

本研究では形態観察後に塩基配列取得のため再単離するため、上方が大きく開口している市販のガラスボトムディッシュを用いた。しかし、高倍率での観察時に高速遊泳細胞を観察視野に留めることが困難で、チャンバーの改良が必要となった。そこで、様々なチャンバー作成を試みた。チャンバーは浅い方が明瞭な観察像が得られるが、区画が浅く、小さくなるほど、蒸発と表面張力の影響が大きくなり良好な結果が得られなかった。今後更なるチャンバー改良を行うことで、観察後の再単離作業がさらに効率化できることが明らかとなった。

(3) 未記載種の鞭毛運動観察

クロララクニオン藻類の未記載種の遊走子を高速ビデオで観察した。その結果、クロララクニオン藻の既知種と同様に、一本鞭毛を体に巻き付けた遊泳を行うことが明らかとなった。

(4) 野外採集物の観察

難培養性のラフィド藻、渦鞭毛藻、広義の緑色藻類、ケルコゾア、エクスカバータ類などの野外採集サンプルの遊泳形態、鞭毛運動の観察を実施した。

(5) 単離細胞からの塩基配列情報取得法

単一細胞からの塩基配列取得方法について検討した。

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3件)

Kashiyama Y., Yokoyama A., Shiratori T., Inouye I., Kinoshita Y., Mizoguchi T. and Tamiaki H. 2013.

13²,17³-Cyclophorbide b enol as a catabolite of chlorophyll b in phycophagy by protists. FEBS Letters

587: 2578-2583. 査読有. DOI:

10.1016/j.febslet.2013.06.036

横山亜紀子・柏山祐一郎.2013. 藻類食プロティストが関与するクロロフィルの「解毒」代謝. 藻類, 61(1):6-10. 査読無.

Kashiyama Y., Yokoyama A., Kinoshita Y., Shoji S., Miyashiya H., Shiratori T., Suga H., Ishikawa K., Ishikawa A., Inouye I., Ishida K., Fujinuma D., Aoki K., Kobayashi M., Nomoto S., Mizoguchi T. and Tamiaki H. 2012. Ubiquity and quantitative significance of detoxification catabolism of chlorophyll associated with protistan herbivory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(43): 1728-1735. 査読有. DOI: 10.1073/pnas.1207347109

[学会発表](計16件)

柏山祐一郎,横山亜紀子,白鳥峻志,中澤昌美,鈴木利幸,土屋正史,鏡味麻衣子,柴田あいか,早川昌志,川原純,梅谷貴大,民秋均.藻類・プロティストの代謝分解と共生進化との関連. 日本藻類学会第38回大会 2014年3月16日, 東邦大学(船橋)

横山亜紀子.真核生物のかたちとゲノムをつなぐ~高速度撮影による形態観察の有用性と問題点~. 第1回コンタ研究会,2014年1月30日,筑波大学下田臨海実験センター(下田)

柏山 祐一郎, 横山亜紀子, 民秋均. 光合成内部共生進化に関わったユーグレノイドのクロロフィル解毒代謝. 第2回マトリョーシカ型生物学研究会 2013年7月25日, ホテル京都ガーデンパレス(京都)

柏山 祐一郎, 横山亜紀子, 民秋均. 光

合成内部共生進化に関わったユーグレ
ノイドのクロロフィル解毒代謝 .日本地
球惑星連合 2013 年大会 ,2013 年 5 月 19
日 ,幕張メッセ (千葉)

横山 亜紀子, 柏山 祐一郎, 守屋 繁春,
民秋 均, 井上 勲 .沿岸域におけるクロ
ロフィル誘導体と真核微生物相の時空
間変動解析 .日本地球惑星連合 2013 年
大会 ,2013 年 5 月 19 日 ,幕張メッセ(千
葉)

横山 亜紀子, 柏山 祐一郎, 守屋 繁春,
民秋 均, 井上 勲 .プロティスト捕食活
動の指標としてのシクロエ ノールの可
能性を探る .日本藻類学会第 37 回大会 ,
2013 年 3 月 28 日 ,山梨大学 (甲府)

柏山 祐一郎, 横山 亜紀子, 白鳥 峻志,
川口 明 音, 中沢 昌美, 井上 勲 , 民
秋 均 .色素体獲得を可能にしたユーグ
レノイドによるク ロロフィルの解毒代
謝分解 .日本藻類学会第 37 回大会 ,
2013 年 3 月 28 日 ,山梨大学 (甲府)

Kashiyama Y., Yokoyama A. and Tamiaki
H. Chlorophyll catabolism in aquatic
ecosystems: Physiology, ecology, and
evolution. CER International
workshop on Biogeochemical cycling
and Microbial Ecology for Young
Scientists. 2013 年 3 月 19 日, 京都大
学生態学研究センター (大津)

Kashiyama Y., Yokoyama A. and Tamiaki
H. Detoxification catabolism of
chlorophyll associated with
protistan herbivory in aquatic
ecosystems. 2012 年 12 月 1 日, 立命館
大学 (草津)

Yokoyama A., Kikuchi J., Tsuboi Y.,
Moriya S., Inagaki Y., Hashimoto T.
and Inouye I. Seasonal succession of
eukaryotic community detected by
environmental sequences in Tokyo Bay,

Japan. Protist 2012. 2012 年 8 月 2 日 ,
Oslo, Norway.

Shiratori T., Yokoyama A. and Ishida
K. Morphology and phylogeny of a new
imbricatean flagellate (phylum
Cercozoa). Protist 2012, 2012 年 8 月
2 日 ,Oslo, Norway.

Kashiyama Y., Yokoyama A., Miyashita
H., Ishikawa K., Ishikawa A., Inouye
I. and Tamiaki H. Ecological
significance of chlorophyll
metabolism of herbivorous protists in
aquatic ecosystems. Protist 2012,
2012 年 8 月 1 日 ,Oslo, Norway.

Kashiyama Y., Yokoyama A., Shiratori
T., Inouye I., Ishida K. and Tamiaki
H. Evolutionary significance of
chlorophyll metabolisms of
herbivorous protists in aquatic
ecosystems. Protist 2012, 2012 年 7
月 30 日 ,Oslo, Norway

柏山 祐一郎 横山 亜紀子 木下 雄介,
庄司 淳, 宮下 英明, 白鳥 峻志, 菅 寿
美, 石川 可奈子, 石川 輝, 井上 勲,
石田 健一郎, 藤沼 大幹, 青木 啓介
7・小林 正美, 野本 信也, 溝口 正,
民秋 均. 微細藻類捕食プロティストに
よるクロロフィルの解毒代謝.

日本藻類学会第 36 回大会, 2012 年 7 月
15 日, 北海道大学 (札幌)

横山 亜紀子, 守屋 繁春, 稲垣 祐司,
橋本 哲男, 井上 勲. 塩基配列情報で
探る東京湾沿岸の真核微生物相とその
季節変動. 日本藻類学会第 36 回大会,
2012 年 7 月 14 日, 北海道大学 (札幌)

Kashiyama, Y., Yokoyama, A.,
Kinoshita, Y., Miyashita, H.,
Ishikawa, K., Ishikawa, A, Mizoguchi,
T., Tamiaki, H. Occurrence and
distribution of Chlorophyll

catabolites in aquatic environments.
2012 ASLO. Aquatic Sciences meeting,
Voyages of Discovery. 2012年7月12
日, 滋賀県立びわ湖ホール(大津)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 亜紀子 (YOKOYAMA, Akiko)

筑波大学・生命環境系・研究員

研究者番号: 30466601

(2) 連携研究者

中山 剛 (NAKAYAMA Takeshi)

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号: 40302369