

平成 2 6 年 6 月 1 7 日現在

機関番号： 8 2 7 0 6

研究種目： 挑戦的萌芽研究

研究期間： 2012 ～ 2013

課題番号： 2 4 6 5 7 0 6 7

研究課題名（和文）非酸素発生型－酸素発生型光合成の過渡段階の探索と検証：シアノバクテリアの初期進化

研究課題名（英文）Early evolution of cyanobacteria: investigation into evolutionary transition between non-oxygenic and oxygenic photosyntheses

研究代表者

富谷 朗子（TOMITANI, Akiko）

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： 6 0 3 9 2 9 4 0

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）：シアノバクテリアは地球史上に初めて出現した酸素発生型光合成生物であり、その進化は地球環境および生物の初期進化を考える上で最も重要な課題の一つである。シアノバクテリアの起源については、光化学系の構造や分子系統学的解析などから、非酸素発生型の光合成細菌から進化したと考えられてきた。しかしその詳細はよくわかっていない。

本研究では、酸化還元変動環境下のシアノバクテリアの培養実験および微生物群集解析から得られた生理学的・分子系統学的な情報と、環境条件・地史学的知見と統合を通じ、シアノバクテリアの初期進化過程とその背景についての考察を行った。

研究成果の概要（英文）：Cyanobacteria are the first oxygenic photosynthetic organisms on earth and have significant effects on organismic and environmental history. Elucidation of their evolution thus is one of key questions in the study of early life and earth. Based on structural analyses of photosynthetic apparatuses and molecular phylogenetic studies, cyanobacteria are generally considered to have originated from non-oxygenic photosynthetic bacteria; however, how and when they evolved has remained unclear.

This study aimed at revealing early evolution of cyanobacteria and its relation to the earth's environmental change, through integration of physiological and molecular-phylogenetic analyses of modern cyanobacteria under the oxic-anoxic interface, with environmental and geological information.

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： 進化 シアノバクテリア 環境 多様性 酸素

1. 研究開始当初の背景

シアノバクテリアは地球上に最初に登場した酸素発生型光合成生物であり、地球史を通じて環境や生物進化に大きな影響を与えてきた。シアノバクテリアの進化過程の解明は、地球環境の変遷や生物進化を理解する上で最も重要な課題の一つである。

光合成生物は電子供与体の種類により、水を利用して光合成を行う酸素発生型光合成生物（シアノバクテリア・藻類・植物）と、水以外の物質を用いる非酸素発生型光合成生物（光合成細菌）の2グループに大別される。非酸素発生型光合成に必要な硫化水素や水素等の分布は嫌気環境に限られるのに対し、地球に豊富に存在する水を利用する酸素発生型光合成生物は、生存範囲を拡大し、バイオマスの増大を導いた。電子供与体の転換は光合成生物の進化の要であり、その生理・生態・系統的多様化を考える上で重要なイベントである。

これまでシアノバクテリアの起源については、光化学系の構造の類似性や分子系統学的解析などから、非酸素発生型の光合成細菌から進化したと考えられてきた。しかし、その進化過程や時期について詳しいことはわかっていない。

研究代表者は、シアノバクテリアの非酸素発生型光合成に着目した。これは酸化還元変動環境下などに見られる反応で、光合成細菌と同様、水以外の電子供与体を利用することから、非酸素発生型と酸素発生型光合成生物の進化の過渡段階を結ぶ鍵であると予想される。これまでの研究では、培養株を用いた生理実験や野外での生態学的調査が行われていたが、野外微生物群集における系統解析、また生理活性と環境条件の対応付けはなされておらず、その多様性や進化過程についても詳細は不明であった。

そこで、シアノバクテリアの初期進化過程やその背景を解明することを目指し、潮間帯の微生物マットを対象に、酸化還元環境変動が光合成微生物群集の構造と生理・生態学的特性に与える影響を調査することにした。

2. 研究の目的

本研究は、酸化還元変動環境下でのシアノバクテリアの多様性と光合成特性の関係を調べるため、潮間帯微生物群集を対象に(1)

野外の生態学的調査と(2)室内での生理学的実験の両面から行い、さらに(3)分子系統学的な情報や地史学的知見と統合することで、光合成細菌とシアノバクテリアの進化の過渡段階を明らかにし、シアノバクテリアの初期進化過程とその背景の解明を目的として行われた。

3. 研究の方法

(1)酸化還元変動環境下にある微生物群集の野外調査

酸化還元変動環境下のシアノバクテリアの生息環境の調査と、室内実験用試料の採集ため、潮間帯の微生物マットの調査を行った。微生物マットは底生微生物からなる層状の集合体で、しばしば光合成原核生物（シアノバクテリア、光合成細菌）で占有される。微生物マットは様々な環境に分布するが、中でも潮間帯では昼夜・潮汐・季節などの影響で酸素／硫化水素濃度の大きな変動が見られることから、酸化還元環境変動に応答した生物の適応進化を解明するモデル環境ととらえることができる。

微生物マットの物理環境や種構成は、生息域の地理的な影響を強く受けると予想されることから、潮汐の影響の異なる2地点（潮間帯の上・下部）を選び、マットの環境条件の測定とサンプリングを行った。

(2)野外微生物群集を材料とした群集構造および生理活性の解析

採取した微生物マットの構成微生物の多様性やバイオマスの概要を得るため、各サンプルについて生物顕微鏡による観察を行った。

続いて微生物マット内の群集構造を明らかにし、酸化還元環境の変化に応じた光合成活性を調べるため、安定同位体標識を行った。各地点から採取した試料に¹³C-炭酸水素ナトリウムを添加し、酸化還元条件の異なる培養条件に調整し、採集域の条件に近い光・温度に制御した環境で培養を行った。培養後のサンプルは分解・変性を防ぐため直ちに凍結保存した。各試料から全RNAを抽出した。

酸化還元環境下の微生物マットを構成する微生物、特にシアノバクテリアの生理活性を調べ、さらにその詳細な系統解析を行うため、ビオチンで修飾したオリゴヌクレオチド

プローブと磁性ビーズを用いて、分類群特異的な 16S rRNA の回収を行った。プローブには、真性細菌全般を標的にしたもの、またはシアノバクテリアを標的としたものの2種類を用いた。

各試料から抽出された全 RNA から、プローブを用いて回収された rRNA は精製の後、同位対比質量分析計で安定同位対比を測定した。また、各試料内での生物構成を調べるため、上記の分類群特異的に回収された rRNA を材料にライブラリーを構築し、塩基配列を決定、系統・群集解析を行った。

以上を通じて得られた、分子系統学的情報と安定同位対比測定の結果を統合し、酸化還元環境の変動が微生物組成および生理活性に及ぼす影響を明らかにし、酸化還元変動環境への適応能を考察した。また、環境-多様性-活性の関係を、酸化還元環境の異なる地点間で比較し、空間的な要素が微生物群集の系統学的・生理学的特性に与える影響について検討した。

(3) シアノバクテリアの酸化還元変動環境への適応史の復元

シアノバクテリアの酸化還元環境変動への適応史を探るため、酸化還元環境の変化に応答を示すシアノバクテリア種/株を、多様性を考慮して抽出したシアノバクテリアの 16S rRNA 配列と合わせて分子系統樹を作成した。この系統樹上に(2)で得られた光合成特性情報を組み入れ、シアノバクテリアにおける酸化還元変動への適応進化史について推察するとともに、シアノバクテリアの系統進化および過去の地球環境変動との関わりについて考察した。

4. 研究成果

(1) 微生物マットの構成微生物の形態的観察

潮間帯下部の微生物マットは、糸状性で分化細胞を持たないユレモ目(subsection III)のシアノバクテリアで占有され、単細胞性のクロオコッカス目(subsection I)や異質細胞を持つネンジュモ目(IV)も一部含まれた。一方、潮間帯上部では、下部に比べて多様なユレモ目を含む一方、クロオコッカス目やネンジュモ目は観察されなかった。

(2) 野外微生物群集を材料とした群集構造お

よび生理活性

回収された 16S rRNA から構築したライブラリーの配列解析から、プローブの特異性は、真性細菌、シアノバクテリアでそれぞれ 100%, 99.1%であった。このことから、プローブの分類群特異性は極めて高いことが示された。しかし真性細菌を標的としたライブラリーにおいても、非シアノバクテリア由来の配列は全配列の最大約3%にとどまり、採集した微生物マットで生理活性を持つ微生物はほぼシアノバクテリアであることが示唆された。

各試料の群集組成に基づくクラスター解析からは、群集組成はサンプルの採集地に大きく依存しており、培養条件による変化は副次的であった。また培養条件に対する応答は2地点で異なり、潮間帯上部では還元環境でより多様な生物種の活動が見られたが、下部ではその逆の傾向を示した。また多様度の面からは、酸化的条件では2地点での多様度は同等であるのに対し、還元条件では潮間帯下部の多様度は上部の3から4分の1にとどまった。

構成要素の面からは、いずれの採集地・培養条件においても最優占種は共通しており、この種/株の優勢は場所・培養条件に依存せず普遍的であった。この種/株は特に潮間帯株で構成種の約60%を占めた。これに続く構成種は、潮間帯の上部と下部で大きく異なり、下部では第二優勢種を合わせると約90%が占められるのに対し、上部では二位以下は主に5種/株によって構成され、組成は培養条件によって変動を見せ、うち2種/株は時期特異的な出現傾向を示した。これらの優勢株の系統分類学情報を得るため、遺伝子データベースに対してBLAST検索を行ったところ、これら6種/株すべて、ユレモ目のシアノバクテリアであり、4属に属すると推定された。

次に、各試料の生理活性を調べ、構成微生物組成と対応付けるため、系統解析に供した回収 rRNA の一部を精製し炭素安定同位対比の測定を行った。

炭素安定同位対比の測定結果によると、潮間帯下部では、 N_2 による気相の置換や硫化水素の添加による影響を受けなかったが、潮間帯上部では、 N_2 置換によって炭酸固定が同等かやや促進される傾向を示したものの、硫化水素の添加により活性が低下した。いずれの

場合も、DCMU(光化学系 II の反応の阻害剤)の添加により活性が2ないし3分の1になるものの、光合成機能を維持していた。これは、光化学系 II に依存しない光合成、すなわち非酸素発生型光合成の活性を示唆する。

(3) シアノバクテリアの酸化還元変動環境への適応進化

群集解析から同定された微生物マットの主要構成6種/株について、その系統進化関係を復元するため、系統的多様性を考慮して抽出したシアノバクテリアの16S rRNA 配列と合わせて分子系統解析を行った。先行研究(e.g. Tomitani *et al.* 2006)でも示されているように、ネンジュモ目とスチゴネマ目(subsection V: 細胞分化能と分枝構造を持つ)はクラスターをなす一方、クロオコッカス目とユレモ目は多系統的な起源を示し、また、系統樹の基部には *Gloeobacter* 属が位置した。本研究で同定された6種/株はBLAST検索の結果からも示されたように、ユレモ目4属に含まれた。これらはユレモ目内で多系統的な分布を示した。ユレモ目内での進化過程については、同定された6種/株を含め、当該目を構成する種の広範で詳細な生理特性の解析が必要となるが、異質細胞を持つグループ(ネンジュモ目とスチゴネマ目)の進化が地球環境の酸素濃度の上昇に対応すると考えると(Tomitani *et al.* 2006)、酸化還元環境の変動への適応は、約24億年前の地球規模での酸素濃度の上昇に伴い生じた環境変化に、酸素への適応性の高い異質細胞を持つグループと異なるニッチへの適応として多系統的に進化した、という仮説が立てられる。

しかし、この多系統的分布については、生理機能の二次的消失が系統内で独立に何度も起きることでも説明されるので、いずれの進化過程が実際に起こったかは、生理学的実験に加え、機能遺伝子の比較や詳細な系統解析など、分子レベルでのさらなる検証が必要である。

シアノバクテリアではすでに、海産あるいは微生物構成種を含む多様な種についてゲノム配列が決定されている。さらに近年の解析手法の発達によりゲノムや環境遺伝子の解析はますます身近なものとなった。本研究の発展として、こうしたゲノム情報と生理・

生態学的アプローチを結ぶことで、環境応答遺伝子の網羅的探索や、新規の光合成関連遺伝子の単離など、研究の展開が見込まれる。

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)

[学会発表] (計3件)

① 富谷朗子、H. T. S. Boschker, L. J. Stal
酸化還元変動環境下におけるシアノバクテリアの環境応答 日本地球惑星科学連合2013年大会 2013年5月19日、幕張メッセ、千葉県

② Tomitani, A., Boschker, H. T. S., Stal, L. J. Photosynthetic activity and community structure in coastal microbial mats: stable-isotope probing combined with magnetic-bead capture of taxon-specific SSU rRNA. The 14th International Symposium on Microbial Ecology 2012年8月19日-24日、Copenhagen, Denmark

③ 富谷朗子 シアノバクテリアの多細胞体制の分子機構と系統進化 日本地球惑星科学連合2012年大会 2012年5月24日、幕張メッセ、千葉県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富谷 朗子 (TOMITANI, Akiko)

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：60392940