

第3回「理想の追求」研究報告

研究期間：2011年4月1日～2015年3月31日

未知の藻類：パルマ藻が解き明かす海洋を支える珪藻の進化

プロジェクトリーダー

桑田 晃 国立研究開発法人水産総合研究センター



プロジェクトメンバー

一宮睦雄 熊本県立大学
吉川伸哉 福井県立大学
河地正伸 国立環境研究所
佐藤直樹 東京大学
斉藤憲治 国立研究開発法人水産総合研究センター
沢田 健 北海道大学



プロジェクトグループ

集合写真：左から田島、佐藤(東大グループ)中村・斉藤・桑田(水研センターグループ)
沢田(北大)吉川・佐藤(福井県立大) 右上：一宮(熊本県立大)右下：河地(国立環境研)

1. 研究の背景と達成目標

珪藻は、美しいシリカの殻を持つ2 μm から2 mmの顕微鏡サイズの単細胞性の微細藻類であり、推定10万種以上と最も多様性が富み、海洋における炭酸固定量は熱帯雨林にも匹敵する地球全体の約1/5におよび海洋生態系全体を支えている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、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的とした研究が近年世界的に盛んになりつつある。既にその目的のため珪藻類数種の全ゲノム解読が終了しているが、珪藻グループ内での解析に留まり、珪藻グループ全体がどのように出現し、進化して現在のように繁栄してきたのか？その起源と進化過程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、我々は、2009年に親潮域より世界で初めて親潮域よりバルマ藻の単離培養に成功した。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を明らかにした。これは、珪藻の繁栄機構と進化過程の解明にとって格好の対照生物を手に入れたことを意味する。

本研究は、生態学・生理学・藻類学・ゲノミクス・生物地球化学のエキスパートが分野を超えて集まり、珪藻と共通の祖先から進化したバルマ藻を対象に、フィールド調査、培養実験による生物学的特性（系統関係、増殖特性・個体群維持機構、シリカの殻形成、生活史）の解析、ゲノム解析、生物地球化学的解析を行い、未知の藻類：バルマ藻の全貌解明を目標とする。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

主な研究成果

本研究の多面的なアプローチにより、珪藻の進化の秘密の鍵を握る未知の藻類：バルマ藻に関して以下の知見を得ることができた。

- (1) 新規バルマ藻株の単離と分子系統解析によるバルマ藻・ボリド藻・珪藻間の系統関係の確定
- (2) 全球的なメタゲノムデータを利用したバルマ藻・ボリド藻の全球的な分布の推定
- (3) 亜寒帯海域におけるフィールド調査と培養実験によるバルマ藻の個体群維持機構の解明
- (4) 培養実験と電子顕微鏡観察による珪藻とは異なるバルマ藻独自のシリカの殻形成機構の解明
- (5) 培養実験とフローサイトメトリーによるバルマ藻の特異的な生活史の発見
- (6) 次世代シーケンサーを用いたゲノムシーケンシングによるバルマ藻ゲノムの解読
- (7) 生物地球化学的解析によるバルマ藻固有のバイオマーカー(分子化石)の検出

社会、学術へのインパクト

本研究により未知の藻類：バルマ藻の生物情報が蓄積され、共通祖先を持ちながら珪藻のように繁栄していないバルマ藻と現在最も繁栄している珪藻の生物特性を比較対照することが可能となった。これにより、珪藻の繁栄機構と進化過程を珪藻の外側から解析することが世界で初めて可能となり、この問題の理解に飛躍的な前進が期待できる。また、本研究は、バルマ藻という一つの未知の生物を対象に、生態学・分子生理学・藻類学・ゲノミクス・生物地球化学分野の各エキスパートがそれぞれの最新の技術を駆使し、集中的かつ多面的に解析するという特徴を持っている。このような共同研究は今後、新しい研究分野の想起・発展につながり、生物学全体にも大きなインパクトを与えることが期待される。

3. 研究成果

(1) パルマ藻・ボリド藻・珪藻間の系統関係の確定

親潮域の調査航海により単離用の試水を採取し、新規の複数種のパルマ藻の単離培養に成功した(図1)。次にフランスロスコフ海洋研究所と共同で、取得したパルマ藻の複数株とロスコフ海洋研究所所有のボリド藻の複数株を対象に複数の遺伝子の配列情報を取得し、分子系統解析を行った。その結果、パルマ藻とボリド藻は同じクレードを形成し、珪藻の姉妹群であることの確証を得た。

(2) メタゲノム解析によりパルマ藻・ボリド藻の全球的な分布の推定

次に得られたパルマ藻とボリド藻の遺伝子情報と、ロスコフ海洋研究所所有の全球的なメタゲノムデータを利用し、パルマ藻とボリド藻の全球的な分布を推定した。その結果、同一クレードのパルマ藻とボリド藻のグループ全体は全球的に普遍的に分布するが、グループ内の各グループはそれぞれ固有の分布域を持つことが推定された。

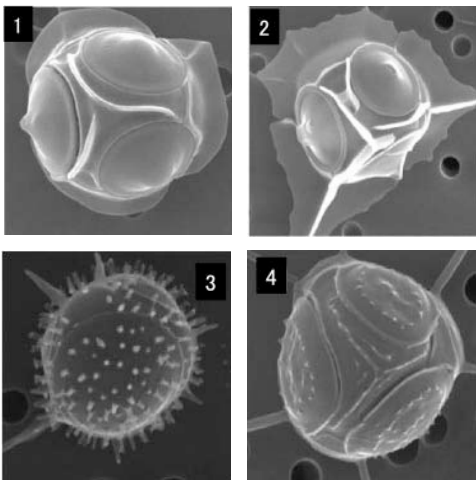


図1 パルマ藻(*Triparma* 属)の単離株

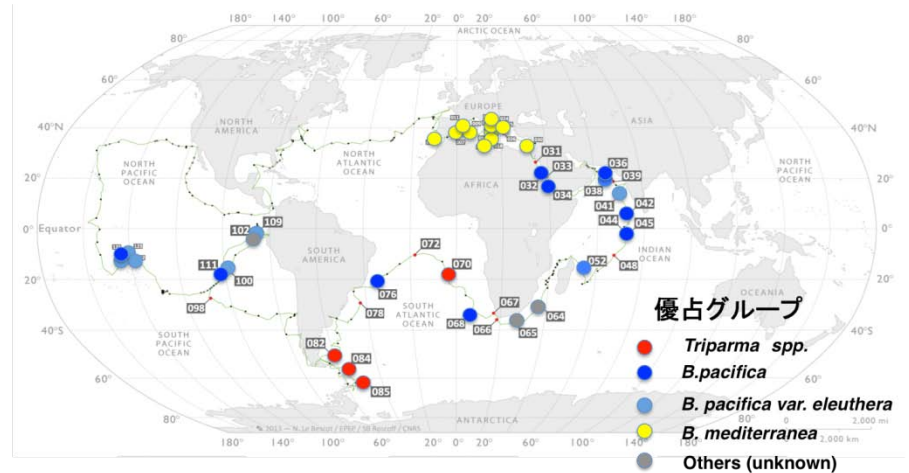


図2 メタゲノム解析によるパルマ藻・ボリド藻の全球分布

(3) 亜寒帯海域におけるフィールド調査と培養実験によるパルマ藻の個体群維持機構の解明

パルマ藻の増殖特性を明らかにするため、パルマ藻の培養株を用いた室内実験により増殖速度の温度・光・栄養環境依存性を解析した。次に、パルマ藻の主な生育地である亜寒帯海域の親潮域をフィールドとし、1年を通して各季節のパルマ藻の親潮域における空間分布を電子顕微鏡下での計測により解析し、個体群維持機構を解析した。

その結果、パルマ藻は、主に冬季～春季の低水温期に有光層中で増殖し、夏季～秋季にかけ成層が発達し表層水温が 15°C 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°C 以下の水温躍層下の亜表層で生残する。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 2015 (in press))。

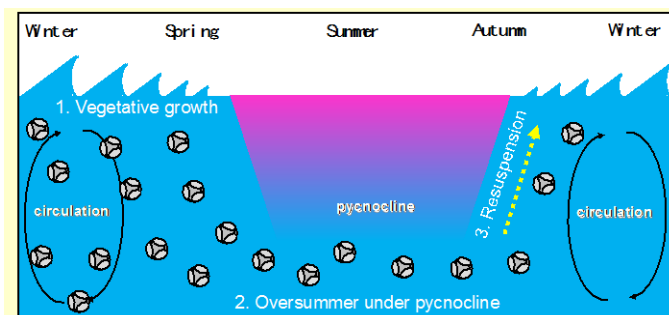


図3 亜寒帯海域におけるパルマ藻の個体群維持機構

(4) 培養実験と電子顕微鏡観察による珪藻とは異なるパルマ藻独自のシリカの殻形成機構の解明

パルマ藻の増殖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い、次にシリカの殻形成と海水中のシリカ濃度の関係を解析した。さらに、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。

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ことを明らかにした。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。

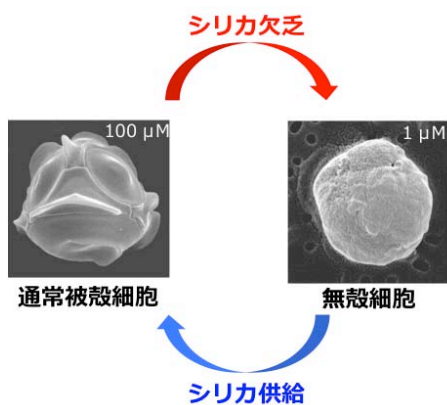


図4 パルマ藻の殻形成に対するケイ酸塩濃度の影響

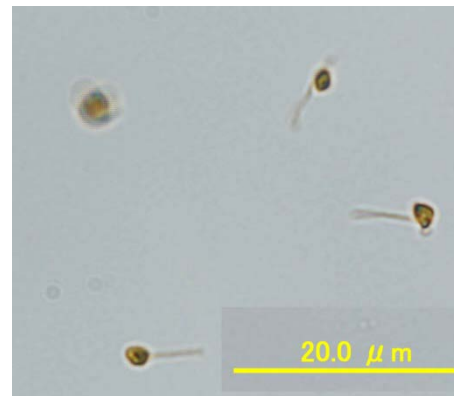


図5 シリカの殻を持つ通常細胞(左上)より出現したボリド藻状鞭毛細胞

(5) 培養実験とフローサイトメトリーによるパルマ藻の特異的な生活史の発見

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、遺伝子マーカーによる解析を行い、パルマ藻の生活史の各ステージの特定を行った。

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。

(6) 次世代シーケンサーによるゲノムシーケンシングによるパルマ藻のゲノム解析

パルマ藻の培養株(図1)を大量培養し、ゲノム解析用のDNAサンプル、cDNAサンプルを取得し、パルマ藻ゲノムの全塩基配列を次世代シーケンサー(Roche454、illumina)により決定した。シーケンスデータをアセンブリしたデータから、葉緑体ゲノム、ミトコンドリアゲノムそれぞれを含む scaffold を取り出し、PCRを使って互いの結合部の配列と、内部の未解読部分の配列をそれぞれ増幅したうえで、Sanger法により配列を決めた。ゲノムのアセンブリデータをバイオインフォマティクスにより核ゲノム遺伝子の特定を行い、Gclustにより特定された遺伝子の機能予測を進めた

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関性が高く、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実証を得た。次に核ゲノムについて解析を進め、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170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い、機能予測を進めている。現在、ケイ酸トランスポータの遺伝子等の珪藻に特徴的な遺伝子がパルマ藻にも見出されている。

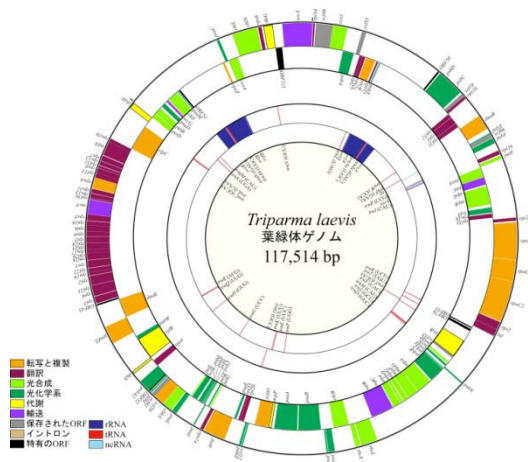


図2 パルマ藻の葉緑体ゲノム

(7)有機化学分析によるパルマ藻固有のバイオマーカー(分子化石)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。

パルマ藻の培養株に対し、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 β -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。

4. 今後の展開

今後の研究展開として現在、1)パルマ藻・ボリド藻のさらに統合的な系統関係の理解のため、これまで単離されたTriparma 属とは別属の単離培養。2) 遺伝子発現解析によりパルマ藻のシリカの殻形成に関与する遺伝子の同定。3)パルマ藻で発見された生活史の各ステージの核相の同定。4)パルマ藻の核ゲノムの遺伝子の機能予測による、光合成過程・栄養塩取り込み過程などの主要代謝経路およびパルマ藻と珪藻に特異的なシリカの殻形成過程等の構築および、珪藻との比較検討。5) 加熱による人工的な続成シミュレーション実験による古代堆積物中で検出され得るバイオマーカー(分子化石)の推定が進行中である。

5. 発表実績

学術論文 (全3件)

Ichinomiya M., Nakamachi M., Shimizu M., Kuwata A. (2013) Growth characteristics and vertical distribution of *Triparma laevis* (Parmales) during summer in the Oyashio region, western North Pacific. *Aquatic Microbial Ecology* 68: 107–116.

Yamada K., Yoshikawa S., Ichinomiya M., Kamiya M., Kuwata A., Ohki K. (2014) Effects of silicon-limitation on growth and morphology of *Triparma laevis* (Parmales, Heterokontophyta). *PLoS ONE*, 9, e103289.

Ichinomiya M., Kuwata A., (in press) Seasonal variation in the abundance and species composition of the Parmales community in the Oyashio region, western North Pacific. *Aquatic Microbial Ecology*.

出版 (全3件中)

Kuwata A., Jewson D. (in press) Ecology and evolution of marine diatoms and Parmales. In Ohtsuka, S., Suzaki, T., Horiguchi, T., Suzuki, N. and Not F. (eds.) *Marine Protists: Diversity and Dynamics*. Springer, Tokyo.

学会発表 (全45件中)

Ichinomiya M., Kuwata A. Seasonal variation of the Parmales assemblage in the Oyashio region, western North Pacific. 2012 ASLO Aquatic Science Meeting, July 11 2012, Ohtsu, Japan.

Tajima N., Saito K., Sato S., Maruyama F., Ichinomiya M., Yoshikawa S., 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*. 12th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, 18-21 August 2013, Halifax, Canada.

Kanou C., Sawada K., Kuwata A., Yoshikawa S., Ichinomiya, M. Lipid biomarker compositions in culture strains of marine microalgae Parmales. 18-19 September 2013. The 26th International Meeting of Organic Geochemistry, Costa Adeje (Tenerife), Spain.

Yamada K., Yoshikawa S., Ichinomiya M., Kuwata A., Kamiya M., Ohki K. Cell wall formation and growth of *Triparma laevis* (Parmales, Heterokontophyta) under silicon-limitation. The 7th Asian Pacific Phycological Forum (APPF 2014), 20-24 September, 2014, Wuhan, China.

A. Kuwata, M. Ichinomiya, S. Yoshikawa, K. Yamada, M. Kawachi, K. Saitoh, Y. Nakamura, N. Sato, N. Tajima, K. Sawada, D. Vault, A. Lopes, S. Audic, C. de Vargas.

Exploring the evolutionary link between Parmales and the success of diatoms in marine ecosystems. 26 February 2015, 2015 ASLO Aquatic Science Meeting, Granada, Spain.

日本植物学会第77回大会 シンポジウム「珪藻の進化・繁栄の謎を握る未知の藻類：パルマ藻の生物学」
2013年9月13日，北海道大学（6件発表）。

2011年 Provasoli 賞(米国藻類学会年間最優秀論文賞)受賞 (一宮睦雄・吉川伸哉・桑田晃)