

無殻渦鞭毛藻類のクレプトクロロプラストにおけるクリプト藻取り込み後の微細構造的变化 Morphological changes in kleptochloroplasts after ingestion in the unarmored dinoflagellates

大沼 亮^{1*}, 堀口健雄²Ryo Onuma^{1*}, HORIGUCHI, Takeo²¹ 北海道大学理学院自然史科学専攻, ² 北海道大学大学院理学研究院自然史科学部門¹Dept. Nat. His. Sci., Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., ²Dept. Nat. His. Sci., Fac. Sci., Hokkaido Univ.

渦鞭毛藻類は海水、淡水に広く生息する単細胞性原生生物で、現在記載されている約2000種のうち約半数が光合成性で、その葉緑体は紅藻に由来するものと考えられている。渦鞭毛藻類の残りの半数は、渦鞭毛藻類の多様化の過程で葉緑体を二次的に失った従属栄養性種である。渦鞭毛藻類の中には紅藻由来の葉緑体を珪藻、ハプト藻、緑藻の葉緑体と取り替えた種もあり、葉緑体の進化という観点から見ると、渦鞭毛藻類は複雑な進化史を辿った生物群である。このような永続的な葉緑体の他に、'クレプトクロロプラスト(盗葉緑体)'と呼ばれる特殊な葉緑体をもつ種もいる。クレプトクロロプラストとは、もともと葉緑体をもたない生物が他の光合成藻類から盗んだ葉緑体のことで、その葉緑体は細胞内で一時的に保持・使用されるが、宿主との共生関係が確立していないためにやがては失われてしまう。無殻渦鞭毛藻、*Amphidinium poecilochroum* (海産)、*Gymnodinium aeruginosum* (淡水産)は互いに近縁な種であり、クリプト藻に由来するクレプトクロロプラストをもつ。海産の*A. poecilochroum*は、クリプト藻の種を問わず取り込み、クレプトクロロプラストの分裂は確認されていない。一方で、淡水産の*G. aeruginosum*は*Chroomonas*属を特異的に取り込む。細胞内のクレプトクロロプラストは1つのみであるが、渦鞭毛藻の細胞分裂に合わせてクレプトクロロプラストも分裂させ、娘細胞に受け継ぐことができる。このようなことから、*G. aeruginosum*の示すクレプトクロロプラスト現象は*A. poecilochroum*より進化的であり、クレプトクロロプラスト性無殻渦鞭毛藻の系統内でクレプトクロロプラストから'真の葉緑体'へと進化しつつあると考えられる。それゆえ、本系統の渦鞭毛藻類は細胞内共生確立の研究をする上では格好の生物であると言える。しかしながら、これまでの研究では一般的な微細構造の研究はなされているものの、クリプト藻の取り込み後、そのクレプトクロロプラストが細胞内でどのように変化し、消失していくのかはわかっていない。そこで、本研究では、飢餓状態にして無色化した渦鞭毛藻にクリプト藻を与えて、クレプトクロロプラストの微細構造を光学顕微鏡、単細胞TEM法を用いた透過型電子顕微鏡によって経時的に観察し、海産種と淡水産種の差異を比較した。

取り込まれた直後のクリプト藻の細胞を比較してみると、両種ともクリプト藻の葉緑体、核、ミトコンドリア、エジェクソームがクリプト藻の細胞質と共に取り込まれており、クリプト藻の細胞質と渦鞭毛藻の細胞質の間には1枚の膜が観察された。*A. poecilochroum*は、クリプト藻の取り込み後、葉緑体は次第に拡大されるものの、取り込み1時間後までにクリプト藻のミトコンドリア、エジェクソームを細胞質ごと食胞に移し、3時間後にはクリプト藻の核も葉緑体から切り離され、消化されることが明らかとなった。一方、*G. aeruginosum*では細胞質は葉緑体の周縁に残存し、クリプト藻のミトコンドリア、核は細胞質に残されたままであった。葉緑体は取り込み後6時間から急激に拡大を始め、取り込み後3日後にはクレプトクロロプラストは多数のピレノイドを形成しながら細胞全体に広げられた。クリプト藻核は杯状に広げられたクレプトクロロプラストの内側に位置していた。5日後にはクリプト藻核の周囲でヌクレオモルフの分裂も確認された。本研究によって、*G. aeruginosum*の方が*A. poecilochroum*よりもクレプトクロロプラストを大きく拡大することができ、クリプト藻の核などのオルガネラをより長く温存できることが明らかとなった。細胞内共生における共生体の核の役割についてはまだ解明されていない問題が多数あるが、クリプト藻に由来するクレプトクロロプラストをもつ織毛虫*Mesodinium rubrum*ではクリプト藻の核がクレプトクロロプラストの維持に重要であることが明らかとなっている。また、珪藻の葉緑体を獲得した渦鞭毛藻類は細胞内に珪藻の核も保持しており、細胞分裂時に珪藻の核も同調して分裂させることができる。このように、クレプトクロロプラストから真の葉緑体獲得への進化過程では、共生体の核を保持する方向に進化する傾向にあり、クリプト藻核を長く温存する*G. aeruginosum*のクレプトクロロプラストは*A. poecilochroum*よりも進んだ進化段階にあると考えられる。

キーワード: 渦鞭毛藻, クレプトクロロプラスト, 微細構造

Keywords: dinoflagellate, kleptochloroplast, ultrastructure

動物が葉緑体を細胞内に一時的に取り込み光合成を行う盗葉緑体現象の野外での適応的意義

Algivore or Phototroph? *Plakobranthus ocellatus* (Gastropoda) Continuously Acquires Kleptoplasts and Nutrition

前田 太郎^{1*}, 広瀬 裕一², 力石 嘉人³, 河戸 勝³, 瀧下 清貴³, 吉田 尊雄³, Heroen Verbruggen⁴, 田中 次郎⁵, 島村 繁³, 高木 善弘³, 土屋 正史³, 岩井 憲司⁶, 重信 秀治¹, 丸山 正²

Taro Maeda^{1*}, Euichi Hirose², Yoshito Chikaraishi³, Masaru Kawato³, Kiyotaka Takishita³, Takao Yoshida³, Heroen Verbruggen⁴, Jiro Tanaka⁵, Shigeru Shimamura³, Yoshihiro Takaki³, Masashi Tsuchiya³, Kenji Iwai⁶, Shuji Shigenobu¹, Tadashi Maruyama²

¹ 基礎生物学研究所, ² 琉球大学, ³ 海洋研究開発機構, ⁴ メルボルン大学, ⁵ 東京海洋大学, ⁶ 沖縄県水産海洋研究センター
¹National Institute for Basic Biology, ²University of the Ryukyus, ³Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, ⁴The University of Melbourne, ⁵Tokyo University of Marine Science and Technology, ⁶Okinawa Prefectural Fisheries and Ocean Research Center

盗葉緑体現象とは、藻類食者の一部の種が、摂食した藻類の葉緑体を自らの細胞内に取り込み、数日から数ヶ月間保持し、その葉緑体が生産する光合成産物を栄養として利用する現象である。葉緑体は次世代には受け継がれず、毎世代ごとに新規に獲得される。軟体動物門嚢舌目に属するウミウシ類は、後生動物で唯一本現象が観察されるグループである。中でもインド洋・太平洋の熱帯域に分布するチドリミドリガイ (*Plakobranthus ocellatus*) は、最も長期間光合成能を保持し、その期間は10ヶ月にも及ぶ。本種では、葉緑体の形態観察等から、緑藻類のアオサ藻類を摂食し葉緑体源とすることがわかっていたが、野外では摂食行動が観察されないことから、摂食と葉緑体の獲得は生活史の初期等に稀にしか行わず、多くの時期を、葉緑体の光合成から得た栄養に依存して過ごしていると考えられてきた。

我々は、この仮説を検証し、盗葉緑体現象の適応的意義の解明を試みた。最初に、今まで種レベルでは不明であった自然環境下での葉緑体源を、チドリミドリガイが持つ葉緑体の *rbcl* 遺伝子のクローニング解析から同定し、その季節変化を t-RFLP 法により調査した。結果、チドリミドリガイはアオサ藻類の中でもサボテングサ科に属する8種の藻類を摂食し、複数種の藻類の葉緑体がチドリミドリガイ一個体中に共存することがわかった。また体内の葉緑体組成は季節によって異なっていた。これら葉緑体組成の特徴は摂食による葉緑体補充が頻繁に行われた結果と考えられた。また明らかになった葉緑体源は、アオサ藻類の中では微小な種類であり、これが野外での摂食観察を困難にしていた可能性が示唆された。

次に、アミノ酸の窒素安定同位体比から栄養段階を計測する手法を用いて、野外個体の光合成への依存度を解析した。結果、飼育下で光合成にのみ依存させた個体は、同位体比から算出した栄養段階が1.3と、生産者に近い値となったが、野外から採集直後の個体は栄養段階1.9と植物食者の値を示した。この値は野外個体が光合成よりも摂食から多くの栄養を得ていることを示しており、葉緑体組成の結果と同様に、頻繁に摂食を行なっていることを示している。

本結果から、野外のチドリミドリガイの光合成に対する栄養依存は小さく、頻繁に摂食を行い葉緑体を更新していることが明らかになった。これは盗葉緑体現象を示す生物において、生息環境での光合成への依存程度を初めて明らかにしたものである。今後、ウミウシにおける盗葉緑体現象の適応的意義は、摂食に対する補助としての観点(ビタミン様物質の生産や、短期間の飢餓時期の栄養源)からも研究する必要があると考えられる。

キーワード: 盗葉緑体, 嚢舌目ウミウシ, アオサ藻, 共生

Keywords: kleptoplasty, sacoglossan, ulvophyceae, symbiosis

細胞内共生クロレラが原生動物・後生動物に創出するシンクロロソームの進化 Evolution of symchlosomes driven by endosymbiosis of zoochlorellae in freshwater protozoa and metazoa

早川 昌志^{1*}, 洲崎敏伸¹

Masashi Hayakawa^{1*}, Suzaki Toshinobu¹

¹ 神戸大学大学院理学研究科生物学専攻

¹Department of Biology, Graduate School of Science, Kobe University

淡水環境では、細胞内に共生クロレラ（単細胞緑藻類）を持つ捕食性のマイクロ生物が、多くの原生動物や後生動物で知られている。さまざまな宿主生物における共生クロレラの細胞ない共生について共通する特徴を調べる為に、4種の緑色生物：ミドリマヨレラ（アメーバ類）、ミドリゾウリムシ（繊毛虫類）、ミドリラップムシ（繊毛虫類）、グリーンヒドラ（刺胞動物）について、凍結置換法による透過型電子顕微鏡観察を行った。細胞内共生クロレラは、とても制御された膜で覆われた光合成オルガネラ構造を形成しており、我々はこれをシンクロロソームと名付けた。シンクロロソームは、PV膜と呼ばれる宿主食胞膜由来の1重の生体膜で覆われた共生クロレラの複合構造であり、疑似的な葉緑体として見ることができる。我々が観察した4種緑色生物における全てのシンクロロソームにおいて、PV膜と共生クロレラの間隔は均一で25-50 nm程度であること、宿主ミトコンドリアと相互作用しているという、普遍的特徴が得られた。シンクロロソームは、淡水における多くのマイクロ生物の捕食者でみることができ、それらは広い真核生物の系統群で、多発的に創出されてきている。また、未報告の共生クロレラを持つ宿主種や、未報告共生クロレラも数多く存在しており、我々も、未報告宿主種のハリタイヨウチュウや、これまでに報告のないサイズを持つ“巨大な”共生クロレラなどを発見してきた。シンクロロソームを持つ生物は、淡水の微小環境における複合栄養生物としての、これまであまり議論されてこなかったニッチを持つため、生態学的にも重要である。我々がこれまでに行ってきた微細構造学的な研究を通して、シンクロロソームの生態学的・進化学的研究の可能性を紹介したい。

キーワード: 原生動物, 藻類, 細胞内共生, 共生クロレラ, シンクロロソーム

Keywords: protozoa, algae, endosymbiosis, zoochlorella, symchlosome

放散虫に共生する藻類の微細構造および分子解析 Fine-structure and molecular analyses of symbiotic algae in Radiolaria

湯浅 智子^{1*}
Tomoko Yuasa^{1*}

¹ 東京学芸大学
¹Tokyo Gakugei University

海洋性プランクトンである放散虫は細胞内に藻類を共生させている。放散虫は、これら藻類から光合成産物を受け取り、貧栄養下の環境に適応してきており、この共生藻の存在が地質時代の数々の生物絶滅イベントを放散虫が乗り越えられた理由の一つであると考えられている。放散虫の共生体にはこれまで、シアノバクテリア、渦鞭毛藻、ハプト藻、およびブラシノ藻が報告されているが、放散虫内に共生している状態では、これらは数 μm のプロトプラスト状で、たとえば鎧板や鞭毛といった藻類を同定するための形質や形態が観察できない。そのため、これまで種レベルでの同定することは困難であったが、今回、放散虫に共生する藻類を培養し、その微細構造観察と SSU rDNA を用いた分子系統解析を行った結果、放散虫にはペリディニウムタイプの渦鞭毛藻が共生していることが明らかになった。また、いくつかの放散虫種において、細胞質内に共生している状態での他の共生藻の微細構造観察と SSU rDNA の解析を行なったところ、シアノバクテリア (*Synechococcus* sp.)、ハプト藻 (*Chrysochromulina* sp.)、および緑藻が共生していることがわかった。同じ Rhizaria の有孔虫と同様に、この共生体の多様性は、サンゴが渦鞭毛藻 (*Symbiodinium*) しか共生させていないのと対照的である。放散虫の共生体のひとつのシアノバクテリア *Synechococcus* sp. および *Prochlorococcus* sp. が、海洋環境下において普遍的に存在するもので、それらを放散虫が共生体としてとりこんでいることから、ひとつの仮説として、放散虫の藻類の共生は自由生活をしている藻類を外界から取り込むことで成立しているのかもしれない。しかしながら、私たちが知る限り、今回報告する放散虫特有の共生渦鞭毛藻が海洋環境下で自由生活をしているという報告はない。

キーワード: 放散虫, 共生, 藻類, 微細構造, 分子系統

Keywords: Radiolaria, Symbiosis, algae, ultrastructure, molecular phylogeny

円石藻 *Braarudosphaera bigelowii* の進化史とシアノバクテリアとの共生 Symbiotic relationship between *Braarudosphaera bigelowii* and cyanobacteria

萩野 恭子^{1*}, 河地正伸²

Kyoko Hagino^{1*}, Masanobu Kawachi²

¹ 岡山大学地球物質科学研究センター, ² 国立環境研究所

¹Institute for Study of the Earth's Interior Okayama University, ²National Institute for Environmental Studies

円石藻 *Braarudosphaera bigelowii* (ハプト植物門プリムネシオ藻綱) は海洋の沿岸性の単細胞性微細藻類で、細胞の表面をペンタリスと呼ばれる正五角形の石灰質鱗片 12 枚で覆われている。ペンタリスは化石として保存されやすく、*Braarudosphaera* 科の化石記録は白亜紀前期、*B. bigelowii* の化石記録は白亜紀後期まで遡ることができる。*B. bigelowii* のペンタリスの形態は、白亜紀から現在まで、全くと言ってもいいほど変化していない。その一方で、地質時代と現生のいずれにおいても、同種のペンタリスの大きさにはバリエーションがあることが知られている。現生の *B. bigelowii* は、ペンタリスの大きさの違いに基づいて 4 つの morphotype に分類されており、morphotype はそれぞれ、18S rDNA 塩基配列に基づいて分類された genotype と対応している。そのため現生の *B. bigelowii* は、サイズが異なった複数 (4 種以上) の cryptic species から成る、species complex であると考えられている (Hagino et al. 2009)。

最近の研究により、*B. bigelowii* sensu stricto (morphotype Intermediate form-B, 18S rDNA Genotype III) と石灰質鱗片をもたない *Chrysochlomulina parkeae*、そして、窒素固定型シアノバクテリア UCYN-A と共生関係を持つ未知のハプト藻 (未同定) が、18S rDNA 塩基配列において非常に近縁であることが明らかになった (Thompson et al. 2012)。*B. bigelowii* と *C. parkeae* は共にハプト藻であるという点では同じだが、細胞の外観は全く似ていない。また、沿岸生の *B. bigelowii* と外洋生の UCYN-A (ならびに UCYN-A と共生関係にあるハプト藻) では、地理分布が一致していない。そのため、*B. bigelowii* と *C. parkeae*、そして、UCYN-A と共生関係にあるプリムネシオ藻が近縁であるということは、Thompson et al. (2012) の研究まで全く予想されていなかった。

B. bigelowii と *C. parkeae* の関係を明らかにするために、私達は、*B. bigelowii* (Intermediate form III) と *C. parkeae* の細胞構造を透過型電子顕微鏡下で観察した。その結果、*B. bigelowii* と *C. parkeae* の両方の細胞内から、形態的特徴がよく似た未知のオルガネラを発見した。このオルガネラの起源を特定するために、別の *B. bigelowii* (Intermediate form B) の細胞から 18S rDNA と 16S rDNA 塩基配列を取得して、分子系統解析を行った。

本発表ではまず、*Braarudosphaera* 科の化石記録の変遷と地球環境変動の関連について紹介する。また、電子顕微鏡観察と分子系統解析の結果に基づいて、*B. bigelowii* と *C. parkeae* の系統関係、シアノバクテリアとの共生関係について議論する。その上で、*Braarudosphaera* 科の進化史とシアノバクテリアとの共生について考えたい。

References:

Hagino, K., Takano, Y. and Horiguchi, T., 2009. Pseudo-cryptic speciation in *Braarudosphaera bigelowii* (Gran and Braarud) Deflandre. *Marine Micropaleontology*, 72: 210-221.

Thompson, A.W. et al., 2012. Unicellular Cyanobacterium Symbiotic with a Single-Celled Eukaryotic Alga. *Science*, 337: 1546-1550.

キーワード: 円石藻, シアノバクテリア, 共生

Keywords: coccolithophores, cyanobacteria, symbiosis

底生有孔虫にみられる盗葉緑体の獲得機構とその機能 Putative functions of kleptoplast in *Planoglabratella opercularis* (foraminifera)

土屋 正史^{1*}, 宮脇 省次², 力石 嘉人¹, 小栗 一将¹, 多米 晃裕³, 植松 勝之³, 三宅 裕志², 丸山 正¹, 大河内 直彦¹
Masashi Tsuchiya^{1*}, Seiji Miyawaki², Yoshito Chikaraishi¹, Kazumasa Oguri¹, Akihiro Tame³, Katsuyuki Uematsu³, Hiroshi Miyake², Tadashi Maruyama¹, Naohiko Ohkouchi¹

¹ 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, ² 北里大学大学院水産学研究所, ³ 株式会社マリン・ワーク・ジャパン

¹Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, ²Kitasato University, ³Marine Works Japan Ltd.

宿主-共生系は、生物の多様性を生み出す要因のひとつであり、多様な共生様式を持つ有孔虫進化のドライビングフォースとなる。有孔虫類には、多様な藻類を藻類のまま共生させる種がいる一方で、盗葉緑体と呼ばれる特殊な共生様式を持つ種が存在する。盗葉緑体とは、従属栄養生物が外来性の藻類の葉緑体だけを細胞内に保持する現象で、宿主は、横取りした葉緑体をあたかも自分のオルガネラであるかのように利用する。有孔虫にみられる共生藻類のさまざまな存在形態は、宿主の依存度や機能・役割に変化をもたらす。

有孔虫類の共生藻類には、おもに2つの役割があると考えられている。1つは、グルコースやアミノ酸といった光合成産物の産生であり、宿主の生存と成長を助ける。もう1つは、炭酸カルシウム殻の形成に関与すると言うものである。本研究では、細胞内に盗葉緑体を共生させる石灰質底生有孔虫 *Planoglabratella opercularis* について、盗葉緑体現象の理解(盗葉緑体の獲得と維持)・背景(盗葉緑体遺伝子の役割と進化)・機能(資源の利用形態)・役割(光合成と石灰化への寄与)から読み解き、共生による有孔虫の多様化メカニズムの解明を目的に研究を行っており、本発表では、特に、盗葉緑体現象の理解と機能について、アミノ酸窒素同位体比分析に基づく栄養段階推定、超微細構造観察、微小酸素電極の測定から、宿主による盗葉緑体への依存度と役割を推測した。

アミノ酸窒素同位体比に基づく栄養段階推定の結果、*P. opercularis* の栄養段階は、天然の個体で1.2となり、光合成によって得られたアミノ酸を、ほぼ100%利用していることが示唆された。一方、異なる季節に採取した天然の個体では、栄養段階が1.9となり、捕食者の値を示す。

培養実験および透過型電子顕微鏡による細胞内の超微細構造の観察では、周囲に盗葉緑体の起源生物である珪藻が存在しない場合、盗葉緑体は10日程度で消化することが明らかになったが、餌がある場合や暗環境では、盗葉緑体は10日を超えても消化されない。このように短期間しか保持できないにもかかわらず、細胞の表面付近に盗葉緑体を配置させ、酸素発生型の光合成を活発に行っていることが明らかになった。また、細胞内にはペルオキシソームが多数見られることから、盗葉緑体と宿主有孔虫細胞との密接な関係が示唆される。

これらのことから、本種の栄養依存形態が混合栄養性である可能性が高く、季節や天候、微小生息環境あるいは生息姿勢、周囲の餌の状況に応じて速やかに栄養依存形態を変化させていることが示唆される。発表では、貧酸素環境下で、光が十分に届かない環境に生息する *Virgulina fragilis* の特徴とあわせて紹介する。

キーワード: 盗葉緑体, 底生有孔虫, アミノ酸窒素同位体比, 微小酸素電極測定, 透過型電子顕微鏡

Keywords: Kleptoplast, benthic foraminifera, nitrogen isotope of amino acid, oxygen micro-sensor, transmission electron microscope

ハプト藻 *Chrysolita lamellosa* の長鎖アルケノン・アルケン組成と生育温度の関係 The effect of temperature on the composition of lipid biomarkers produced by *Chrysolita lamellosa*

中村 英人^{1*}, 沢田 健¹, 新家 弘也², 鈴木 石根², 白岩 善博²
Hideto Nakamura^{1*}, Ken Sawada¹, Hiroya Araie², Iwane Suzuki², Yoshihiro Shiraiwa²

¹北海道大学大学院理学研究院, ²筑波大学大学院生命環境科学研究科, ³JST CREST

¹Faculty of Science, Hokkaido University, ²Graduate School of Life and Environmental Science, University of Tsukuba, ³CREST, Japan Science and Technology Agency (JST)

世界各地の湖(特に塩湖)の堆積物からアルケノンの検出が相次ぎ、陸域の古水温指標として検討されている。現場のアルケノン組成と温度データから求められたアルケノン不飽和度($U^{K'}_{37}$, $U^{K'}_{37}$)-水温関係式は、海洋で一般的に用いられる式(Prahl and Wakeham, 1987)とは大きく異なり、中国・ヨーロッパ・北米といった地域間での差異も見られる(Zink et al., 2001; Chu et al., 2005; Toney et al., 2010)。湖のアルケノン組成は4不飽和アルケノンが多く、一部の湖からは*Chrysolita lamellosa*が単離されることから、湖におけるアルケノン生産者として*C. lamellosa*が重要な種であると考えられている。最近になって分子系統解析(Theroux et al., 2010)から、アルケノンが検出される湖において実際に*C. lamellosa*や*Isochrysis galbana*に近縁なハプト藻が生育していることが報告されている。しかしながら、単離された*C. lamellosa*の培養株を用いて体系的に水温と脂質組成の関係を報告した例は少なく、Rontani et al. (2004)でフランス沿岸で採取された株の10, 20 °C条件における脂質組成が、Sun et al. (2007)では中国内陸の塩湖Xiarinur湖から単離された株でアルケノン不飽和度-水温換算式が報告されているのみにとどまる。このため、湖における式の多様性を与える要因については十分に理解されていない。本研究では、*C. lamellosa*の生育温度に対する脂質組成の変化を明らかにし、湖の式と対比されるデータセットを与えるため、これまでに脂質組成の報告されていない*C. lamellosa*株の培養実験を行い、アルケノンおよび長鎖アルケノンの不飽和度と組成比を調べた。

海水産の底生ハプト藻*C. lamellosa*を4, 5, 10, 15, 20, 25 °Cで培養した。グラスフィルタに漉しとった藻細胞をメタノール/ジクロロメタンで超音波抽出し、シリカゲルカラムで分離した後にGCおよびGC/MSで同定・定量した。

本研究で用いた*C. lamellosa*株のアルケノン組成は、海洋のアルケノン生産者である*Emiliania huxleyi*や*Gephyrocapsa oceanica*と比較して、4不飽和アルケノン($C_{37:4}$, $C_{38:4}$)を豊富に含み、 C_{38} メチルアルケノンを持たなかった。このような組成は*C. lamellosa*に共通の特徴であると考えられている(Marlowe et al., 1984; Rontani et al., 2004; Sun et al., 2007)。また、長鎖アルケンも検出され、そのうち大半を占める C_{31} アルケンの不飽和度も水温とよく相関した。本研究で得られた $U^{K'}_{37}$ -水温換算式は、海洋の式(Prahl & Wakeham, 1987)や中国の内陸湖の式(Chu et al., 2005)と比較して傾きと切片が小さく、ヨーロッパの湖の式(Zink et al., 2001)に近い。4不飽和アルケノンを含めた U_{K37} -水温換算式も海洋の式に対する大まかな傾向は変わらず、ヨーロッパや北米の湖の式(Toney et al., 2010)に近い領域にプロットされる。特に、Sun et al. (2007)と比較すると全ての温度で顕著に低い $U^{K'}_{37}$ 値をとることが分かった。本研究の結果から、*C. lamellosa*の生育条件に対する生理学的応答には顕著な種内多様性が存在し、これが各地の湖における水温換算式の多様性に寄与している可能性を指摘する。

[References]

- Chu et al., 2005. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 4985-5003.
Conte et al., 1998. *Geochim. Cosmochim. Acta* 62, 51-68.
Marlowe et al., 1984. *Br. Phycol. J.* 19, 203-216.
Prahl and Wakeham, 1987. *Nature* 330, 367-369.
Rontani et al., 2004. *Phytochemistry* 65, 117-126.
Sun et al., 2007. *Org. Geochem.* 38, 1226-1234.
Theroux et al., 2010. *Earth Planet. Sci. Lett.* 300, 311-320.
Toney et al., 2010. *Geochim. Cosmochim. Acta* 74, 1563-1578.
Zink et al., 2001. *Geochim. Cosmochim. Acta* 65, 253-265.

キーワード: アルケノン, ハプト藻, クリソティラ, アルケン, 古水温指標

Keywords: Alkenone, Alkene, Haptophyte, *Chrysolita lamellosa*, $U^{K'}_{37}$, U_{K37}

水月湖の酸化還元境界層における緑色硫黄細菌の生態学的役割 The ecological role of green sulfur bacteria in the chemocline of Lake Suigetsu

森 裕美^{1*}, 近藤 竜二¹
Yumi Mori^{1*}, Ryuji Kondo¹

¹ 福井県立大学 海洋生物資源学部

¹Department of Marine bioscience Fukui Prefectural University

光合成硫黄細菌は、紅色硫黄細菌と緑色硫黄細菌で構成され、還元型硫黄化合物を電子供与体として用いて酸素非発生源型の光合成を行う偏性嫌気性細菌である。光合成硫黄細菌は、部分循環湖の酸化還元境界層などの嫌氣的で還元型硫黄化合物が存在し、かつ光が届く環境でブルームを形成する。光合成硫黄細菌の生態調査と生理学的機能から、嫌氣的な有光層における炭酸固定の大部分は、光合成硫黄細菌が担っていると考えられてきた。しかしながら、その直接的な証拠は得られておらず、環境中の炭酸固定への光合成硫黄細菌による寄与は、推測の域を脱していないのが現状である。福井県に存在する水月湖は、典型的な部分循環湖である。分子生物学的手法や色素解析を用いた研究から、水月湖の酸化還元境界層には*Chlorobium*属や*Prosthecochloris*属の緑色硫黄細菌が一年を通して優占することが報告されている。そこで、本研究では、水月湖を研究フィールドとして、光合成硫黄細菌の炭酸固定への寄与を評価した。

夏季と冬季に酸化還元境界層から採水し、嫌気培養瓶に試水を分注後、炭素安定同位体 (¹³C) でラベルされた炭酸水素ナトリウムを添加し、明条件と暗条件で培養した。数日間培養した後、孔径 0.2 μm のヌクレオフィルフィルターで細菌画分をろ過捕集し、DNA を抽出した。密度勾配遠心分離によって ¹²C-DNA 画分と ¹³C-DNA 画分を分離し、¹³C-DNA 画分の 16S rDNA のクローニングを行い、炭酸固定を行った細菌群集組成を明らかにした。また、試水を嫌気培養瓶に分注後、炭素放射性同位体でラベルされた炭酸水素ナトリウムを添加した。環境中の光量子量と同じ光条件 (明条件) と暗条件で一定時間培養後、サンプルを少量抜き取り GF75 フィルターで細菌画分をろ過捕集し、細菌に同化された放射エネルギーを測定し、炭酸固定速度を算出した。光合成活性は、明条件で培養したサンプルの炭酸固定速度から暗条件の炭酸固定速度を差し引いた値とし、化学合成活性は、暗条件で培養したサンプルの炭酸固定速度とした。

酸化還元境界層の炭酸固定活性は、両季節とも約 80% を化学合成が占め、酸化還元境界層の炭酸固定の大部分は化学合成によって行われていることが明らかとなった。SIP 法を用いた 16S rDNA のクローン解析では、試水を暗条件で培養した場合、夏季では硫黄還元化学合成細菌の *Thioreductor* 属に近縁なクローンが、冬季では硫黄酸化化学合成細菌の *Thiomicrospira* 属に近縁なクローンが検出された。これらは、酸化還元境界層に存在する硫黄化合物を利用して化学合成独立栄養的に増殖したと考えられ、化学合成細菌が酸化還元境界層の高い化学合成活性を担っていると推測される。一方、明条件で培養した場合、両季節とも *Chlorobium* 属に近縁なクローンが検出されたことから、水月湖の酸化還元境界層では、優占種である *Chlorobium* 属の緑色硫黄細菌が、季節に関わらず、光合成によって炭酸固定を行っていることが示された。また、冬季の試水を明条件で培養した場合、硫黄不均化細菌の *Desulfocapsa sulfoexigens* に近縁なクローンが最も多く検出された。*D. sulfoexigens* は、硫黄を不均化して独立栄養的に増殖する嫌気性細菌であり、光を必要としないにもかかわらず、明条件で培養したサンプルのみから検出された。同じサンプルから、緑色硫黄細菌も多く検出されている。緑色硫黄細菌は硫化物酸化過程で硫黄を菌体外に蓄積することから、*D. sulfoexigens* は共存する緑色硫黄細菌が蓄積した硫黄を不均化して独立栄養的に増殖したのではないかと考えられる。

本研究によって、水月湖の酸化還元境界層では、優占する緑色硫黄細菌が光合成によって炭酸固定を行っているという直接証拠を得ることができた。また、化学合成独立栄養細菌が化学合成によって炭酸固定を行っており、その寄与は光合成よりも大きいことが明らかになった。緑色硫黄細菌は、光合成による一次生産の機能を担っているだけでなく、硫黄不均化細菌などの他の化学合成独立栄養細菌にエネルギーを供給するという、新たな生態学的役割を担っている可能性が示された。

キーワード: 部分循環湖, 炭酸固定, 緑色硫黄細菌, SIP 法

Keywords: meromictic lake, CO₂ fixation, green sulfur bacteria, stable isotoping method

パルマ藻培養試料におけるステロイド分析：パルマ藻バイオマーカーの探索 Steroid analysis in culture samples of Parmales: Search for Parmales biomarker

加納 千紗都¹, 沢田 健^{1*}, 桑田 晃², 吉川 伸哉³, 一宮 睦雄⁴

Chisato Kanou¹, Ken Sawada^{1*}, Akira Kuwata², Shinya Yoshikawa³, Mutsuo Ichinomiya⁴

¹北海道大学大学院理学院, ²東北区水産研究所, ³福井県立大学, ⁴熊本県立大学

¹Faculty of Science, Hokkaido University, ²Tohoku National Fisheries Res. Inst., ³Fukui Prefectural University, ⁴Prefectural University of Kumamoto

パルマ藻は珪質の殻をもつピコプランクトンであり、新生代の海洋における重要な基礎生産者である珪藻と密接な関係をもつことが推測されている。パルマ藻の珪質殻化石の研究例はまったく報告されていない。珪藻の珪質殻の化石は堆積岩に残されているが、それでも堆積後の続成作用によって溶解し失われることが多い。微小なパルマ藻の珪質殻は、堆積岩中に残らず出現時期の推定や生産性変動の復元がほぼ不可能であると考えてよい。そこで演者らは、パルマ藻のバイオマーカーを明らかにして、それを分子化石として利用して進化過程や生産性変動を解明しようと研究を進めている。本研究では、このパルマ藻の脂質バイオマーカー、とくにステロイドに着目してその組成や濃度を検討し、分類における多様性を明らかにする。

私たちは、パルマ藻の3つの培養株 *Triparma laevis*, *Triparma laevis f. longispina*, *Triparma strigata* 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。試料をメタノール/ジクロロメタンで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画した。極性画分はBSTFAでシリル化した後にGC/MSで測定した(Sawada and Shiraiwa, 2004, Phytochem. 65, 1299)。その結果、パルマ藻バイオマーカーとして、 $C_{21:6}$ n-アルケンや、 $C_{20:5}$ 、 $C_{22:6}$ 脂肪酸、 $C_{27-C_{29}}$ ステロイドを同定した。これらは珪藻の培養株の研究においても検出例のある化合物である(例えば、Rampen et al., 2010, Limnol. Oceanogr. 55, 91)。とくにステロールにおいては C_{29} -シトステロールが圧倒的に卓越し、珪藻との関連が興味深い。しかし、*T. strigata*においては C_{29} ステロールよりも C_{28} ステロールがより多量である。この結果は*Triparma*属の中でステロール組成が種間で多様であることを示している。加えて、未同定の高分子量の極性脂質が複数検出されていて、これらが独特の*Triparma*バイオマーカーとしての潜在性があるかもしれない。

キーワード: パルマ藻, バイオマーカー, 培養, ステロイド, 珪藻進化, 化学分類

Keywords: Parmales, biomarker, culture, steroid, evolution of diatom, chemotaxonomy

プロティストによる捕食生物中のクロロフィル解毒代謝機構と光合成細胞内共生 Chlorophyll detoxification catabolism associated with protistan phycophagy and evolution of phototrophic symbiosis

柏山 祐一郎^{1*}, 横山 亜紀子², 民秋均³

Yuichiro Kashiya^{1*}, Akiko Yokoyama², Hitoshi Tamiaki³

¹ JST さきがけ; 立命館大学院生命科学, ² 筑波大学生命環境系, ³ 立命館大学院生命科学

¹JST PRESTO; Ritsumeikan Univ., ²Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ³Grad. Sch. Life Sciences, Ritsumeikan Univ.

藻類の光合成においては、クロロフィルは光のエネルギーを化学ポテンシャルに転換する上で必要不可欠な有機分子であり、色素体内で多量に生合成・維持されている。しかし、クロロフィルは生物にとって猛毒の一重項酸素（活性酸素の一種）を発生させる高い光毒性を有するため、クロロフィルの生合成や分解代謝は、光毒性の中間生成物を蓄積することなく精密に制御されていることが被子植物やシアノバクテリアなどの研究から分かっている [1]。陸上で生産されるクロロフィルの多くは PAO 経路と呼ばれる多段階の代謝分解により無色無蛍光（従って光毒性がない）の化合物にまで植物自身によって分解されていると考えられるが、水圏環境では、微細藻類を捕食するプロティストがクロロフィルを無蛍光性でかつ光毒性を示さない ¹³², ¹⁷³-シクロフェオフォルバイドエノール（シクロエノールと略す）に分解代謝していることが報告された [2]。すなわち、様々なプロティストと藻類の二員培養株を抽出・色素分析すると、クロロフィルが減少し、シクロエノールが高濃度で蓄積する現象が観察された。さらに、プロティストのの食胞作用による藻類捕食過程を蛍光顕微鏡下で観察すると、クロロフィルの自家蛍光が消化の初期段階において速やかに消失することを確認できた。従ってシクロエノールは、光毒性であるクロロフィルのプロティストによる解毒代謝物であると結論された。

これまでにシクロエノール代謝は、ストラメノパイル-アルペオラータ-リザリア群（SAR 群）とクリプト藻-有中心粒類-テロネマ類-ハプト藻群（CCTH 群）の 2 つの真核生物のスーパーグループからの報告があるが、二次共生藻であるユーグレナ藻類を含む、エクスカバータ群全体に関する知見はなかった。そこで我々は、ユーグレナ藻類とその外群に属する微細藻類食の無色ユーグレノイドに関して、クロロフィルの代謝分解物を分析したところ、光独立栄養のユーグレナ藻類を含む全ての生物からシクロエノールが有意な量検出された。すなわち、色素体を持つユーグレナ藻類は、一部色素体が褐色で無蛍光性の顆粒状に変化した細胞において、シクロエノールの有意な蓄積が確認され、老化あるいは不要となった色素体を処分するに際してシクロエノール代謝によりクロロフィルの光毒性を無効化していることが示唆された。ユーグレナ藻類の色素体は細胞内共生した緑藻を起源とすると考えられているが、細胞内共生やそれに続くオルガネラの過程において、ホスト生物が従来は植物食の目的で有していたシクロエノール代謝の仕組みが、光毒性のクロロフィルを多量に含有する共生体（色素体）の代謝分解に転用されたと考えられる。

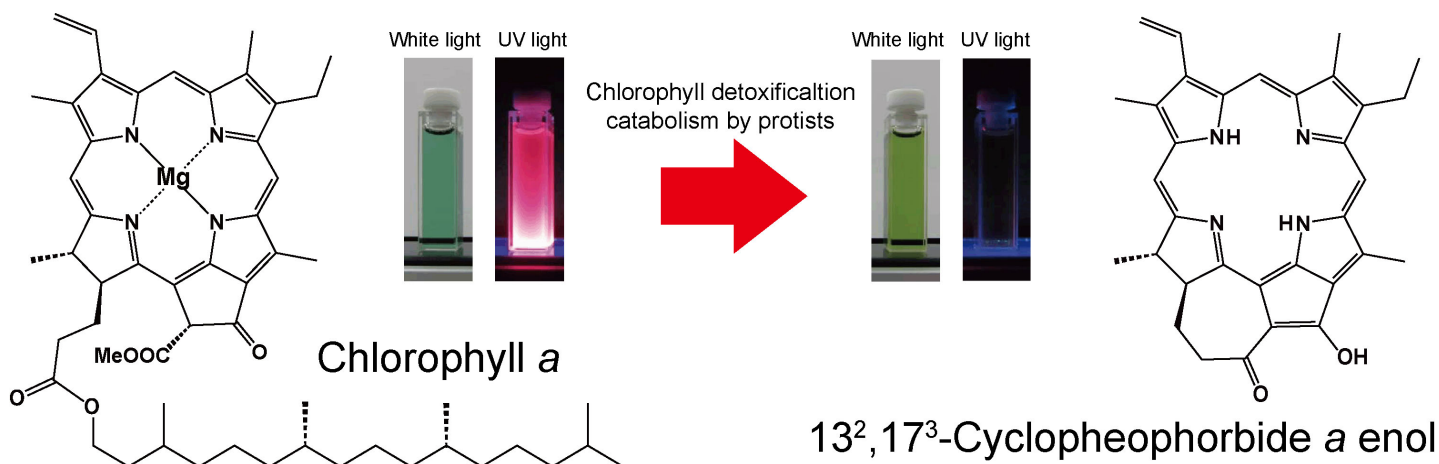
引用文献

[1] Scheer, H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012. 109, 17311.

[2] Kashiya, Y.; Yokoyama, A.; Kinoshita, Y.; Shoji, S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012. 109, 17328.

キーワード: クロロフィルの光毒性, プロティスト, 光合成細胞内共生, 二次植物進化, シクロエノール

Keywords: phototoxicity of chlorophyll, protists, phototrophic symbiosis, evolution of secondary algae, cyclophorbide enol



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 Spatio-temporal relationship between chlorophyll derivatives and eukaryotic microorganisms in a coastal water.

横山 亜紀子^{1*}, 柏山 祐一郎², 守屋 繁春³, 民秋 均⁴, 井上 勲¹

Akiko Yokoyama^{1*}, Yuichiro Kashiya², Shigeharu Moriya³, Hitoshi Tamiaki⁴, Isao Inouye¹

¹ 筑波大学・生命環境系, ²JST・さきがけ, ³ 理化学研究所・基幹研究所, ⁴ 立命館大学大学院生命科学研究科

¹Fac. Life Environ. Sci., University of Tsukuba, ²JST PREST, ³ASI, RIKEN, ⁴Grad. Sch., Life Sci., Ritsumeikan University

Chl-*a*, *b*, *c*, *d*, *f*などのクロロフィルは、水圏における光合成生物（藻類）の酸素発生型光合成において重要な色素である。光合成色素組成は、クロロフィル類のほか、脂溶性のカロチノイド類、あるいは水溶性のフィコビルタンパクといった光合成補助色素も含めて、生物群ごとに異なることから、分類学的な識別形質、あるいは生態系における優占生物群の指標として広く利用されてきた。ところが近年、自然界からごく稀に報告されていたクロロフィル起源の化合物のシクロフェオフォルバイド *a* エノール (cPPB-*a*E) が、実は外洋から淡水、表層水から堆積物に至るまでの多様な環境に遍在すること、藻類を補食したプロティストの体内で産生されることがわかってきた。このことから、cPPB-*a*E を水圏に生育するプロティストの捕食活動の指標として利用可能なのではないかと考え、東京湾沿岸 1 地点 2 水深における定期採水を行い、HPLC による色素分析と、顕微鏡下での細胞計数と環境 DNA による生物定量を行い、両者の時空間的変動パターンの解析を行った。

環境サンプルから検出されたクロロフィル類は、それらを含む藻類群の変動と同期した季節変動傾向を示した。Chl-*a*量は、調査期間を通して他のクロロフィル誘導体に比べて顕著に多く、水深が浅い方で多い傾向がある。一方、cPPB-*a*E量は、Chl-*a*と同期して増減する。ただし、夏期の藻類ブルーム時期から生物量が激減しつづけた晩秋までは、水深が深い方で cPPB-*a*E 量が多いという特徴が観察された。さらに冬期には、夏期と同等量の Chl-*a*が含まれているにもかかわらず、cPPB-*a*E の含有率は低下する。これらの結果は cPPB-*a*E を産生するプロティスト量と相関することも明らかとなった。

キーワード: クロロフィル誘導体, シクロフェオフォルバイド *a* エノール, プロティスト, 藻類

Keywords: Chlorophyll derivatives, Cyclophorbide *a* enol, Protist, Algae

温泉微生物マットにおけるクロロフィル *f* の分布 Distribution of chlorophyll *f* within hot spring microbial mat

大久保 智司^{1*}, 宮下 英明¹

Satoshi Ohkubo^{1*}, Hideaki Miyashita¹

¹ 京都大学大学院 人間・環境学研究所

¹ Grad. Sch. of Human Environ. Stud., Kyoto Univ.

クロロフィル (Chl) *f* は近年新たに発見された光合成色素で、波長 700-750 nm の遠赤色光を吸収することができる。我々はこれまでに複数種の Chl *f* 産生シアノバクテリアを分離してきた。これらの分離株において、Chl *f* は遠赤色光下で培養した時のみ合成が誘導され、白色光培養ではつくられないことがわかっている。したがって、自然界において Chl *f* は遠赤色光の優占する環境に存在し、遠赤色光を利用した光合成に寄与していると考えられた。そのような環境として、本研究では微生物マットに注目した。シアノバクテリアなどの微生物がマットを形成した場合、波長 400-700 nm の光合成有効放射 (PAR) は表層に存在する光合成生物に吸収されるため、マット内では遠赤色光が相対的に多くなり、Chl *f* が存在していると推測された。本研究ではこの仮説を確かめるため、温泉で採取した微生物マット中の Chl *f* の垂直分布と光環境を明らかにした。

長野県および岐阜県にある 6ヶ所の温泉で、シアノバクテリアを含む微生物マットを 20 サンプル採取した。メタノール抽出と HPLC によってこれらの色素組成を分析したところ、5つのサンプルから Chl *f* が検出された。このうち長野県中房温泉の砂防ダムで採取した厚さ約 7 mm のサンプルについて、マットの付着面と平行に厚さ 0.5 mm の凍結切片を作製し、各切片の色素組成を分析した。その結果、表面から深さ 0-4.0 mm の範囲では Chl *f* は検出されなかったが、深さ 4.0-6.5 mm で検出され、その量は Chl *a* の 2-3% であった。同じサンプルについて、ファイバ式分光光度計を用いてマット内の光環境測定を行った。表面から深くなるにつれて、遠赤色光よりも PAR が先に減衰し、特に光合成生物の吸収する青色光および赤色光が大きく減衰していた。深さ 4.0 mm では、遠赤色光が表面に入射する光の数%残っていたのに対し、青色光および赤色光は 0.01% 以下まで減少していた。したがって、このマット内の深さ 4.0 mm 以深では遠赤色光が優占し Chl *f* の合成が誘導され得る光環境になっていたと考えられた。以上の結果から、微生物マットは自然環境中で Chl *f* が分布する場所の 1つであることが明らかとなった。Chl *f* 産生シアノバクテリアは、自己遮蔽や他生物との共存による光の競合を回避することができ、微生物マット内において他の光合成生物よりも深い場所での生育が可能になっていると考えられる。

キーワード: クロロフィル *f*, シアノバクテリア, 微生物マット

Keywords: chlorophyll *f*, cyanobacteria, microbial mat

琵琶湖おけるクロロフィル類とクロロフィル代謝産物の時空間変動 Spatio-temporal dynamics of chlorophylls and chlorophyll-derived catabolites in Lake Biwa

柏山 祐一郎^{1*}, 石川可奈子², 宮下 英明³
Yuichiro Kashiya^{1*}, Kanako Ishikawa², Hideaki Miyashita³

¹ JST さきがけ, ² 琵琶湖環境科学研究センター, ³ 京都大学人間・環境
¹JST PRESTO, ²LBERI, ³Human Environ., Kyoto Univ.

水圏の光合成生物(シアノバクテリアや光栄養性のプロティスト)が生産するクロロフィル類はこれら生物の重要なバイオマーカーである。特に、光合成に必須であるクロロフィル a (Chl- a)量は、水圏環境の基礎生産量を推定する指標として利用されてきている。一方、Kashiya, Yokoyama et al. (2012) [1]では、Chl- a に由来する $13^2,17\{3\}$ -シクロフェオフォルバイド a エノール(「cPPB- aE 」ないし「シクロ a エノール」と省略)という色素が、水圏環境に偏在することが報告された。琵琶湖湖心部においては、有光層内の水柱で7~16%、直下の底泥中では51%のChl- a 誘導体がcPPB- aE であった。さらに、これまでの研究から、cPPB- aE とその相同体(総称として「シクロエノール類」)は、主に藻類を捕食したプロティストの体内で産生される二次代謝物であり、これらプロティストによるクロロフィル類の解毒代謝産物であることが示された[1]。このため、琵琶湖の水柱から検出されるシクロエノール類は、現場におけるプロティストの捕食活動の指標として捉えることが可能であると考えた。そこで、定期観測で湖心観測点N4における深度別の採水を行い、あわせて水中下方放射スペクトルの強度、水温、溶存イオン濃度などを深度別に計測し、また、採水試料各1LをGF/Fフィルターで濾過したサンプルから色素類を含む脂質成分を抽出し高速液体クロマトグラフィーを用いて定量分析を行った。本講演では、約2年間にわたる月ごとの色素組成プロファイルの変動に基づいた生物相の遷移に関して討論する。

引用文献

[1] Kashiya, Y.; Yokoyama, A.; Kinoshita, Y.; Shoji, S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012. 109, 17328.

キーワード: 琵琶湖, プロティスト, シクロエノール, 藻類, マイクロbialループ
Keywords: Lake Biwa, Protists, cycloenls, algae, microbial loop