

発表番号 32 (0324)

緩傾斜人工護岸に生育する真正紅藻類の着生微細藻の生理生態学的研究
(海産紅藻類の光合成色素クロロフィルdの起源の解明)

助成研究者：村上明男（神戸大学内海域環境教育研究センター）

共同研究者：宮下英明（京都大学大学院地球環境学堂）

：三室 守（京都大学大学院地球環境学堂）

淡路島北部の花崗岩で造成された緩傾斜人工護岸には周辺の自然岩礁地帯とは異なった海藻植生が見られ、特徴的な生態系を形成している可能性がある。この緩傾斜人工護岸に大繁茂する海藻類についての予備調査から、春から夏にかけての潮間帯では、周囲の自然岩礁地帯より海藻の被度が顕著に高く、特定の紅藻類数種が優先種になっていることが解った。この研究の過程である種の紅藻類から、60年間の謎であった特殊な光合成色素“クロロフィルd”が大量に検出された。そこで、本研究では、海産の真正紅藻類の生理生態的特徴を明らかにするための基礎として、緩傾斜人工護岸に繁茂する紅藻類の光合成色素の組成などを詳細に検討し、特にクロロフィルdの存在の確証とその起源（起源生物）の解明を進めた。

多数の紅藻類の藻体メタノール抽出液の吸収スペクトルの解析から、オキツノリとコメノリ、およびホソバノトサカモドキからクロロフィルdが豊富に検出された。特にオキツノリからは、通常クロロフィルaの吸収帯の長波長側にクロロフィルdの独立した吸収極大が見られ、過去の論文データの中で最も高含量のクロロフィルdをもつことが明らかになった。しかし、このオキツノリでもクロロフィルd含量は個体ごとに変動し、さらに全く検出されない場合もあったため、紅藻におけるクロロフィルdの存在と機能についての解析は、結果の解釈に困る状態であった。

そこで、オキツノリの藻体を実体顕微鏡下で丹念に観察したところ、表面に様々な微細藻が付着していることに気が付いた。オキツノリの小断片や切片について、顕微分光装置を装着した生物顕微鏡を用い、吸収・蛍光スペクトルを測定した。その結果、ある種の付着藻にクロロフィルdが局在していることに気が付き、単離培養を行った。培養株について、細胞形態、分光特性、SSU rDNAの塩基配列による分子系統解析を行ったところ、1996年に熱帯パラオのサンゴ礁に生育する群体ホヤの共生藻の中から分離された*Acaryochloris marina*と近縁であることが解った。酸素発生光合成生物として唯一クロロフィルdを持つアカリオクロリス属の藍藻は、分布や生育場所などの点からもユニークな存在である。また本研究は、沿岸環境や藻場生態を考える上でも、海藻付着微細藻の重要性を示している。

緩傾斜人工護岸に生育する真正紅藻類の着生微細藻の生理生態学的研究
(海産紅藻類の光合成色素クロロフィル *d* の起源の解明)

助成研究者：村上明男（神戸大学・内海域環境教育研究センター）

共同研究者：宮下英明（京都大学・大学院地球環境学堂）

共同研究者：三室 守（京都大学・大学院地球環境学堂）

1. 研究目的

淡路島をはじめ瀬戸内海各地の沿岸域には人工護岸が多く、自然海岸は年々少なくなっている。しかし近年、環境保全・藻場育成・親水機能などの観点から、従来のコンクリート製の直立護岸に替わり、自然石を用いた緩傾斜護岸が導入される傾向がある。播磨灘に面した淡路島の西海岸には、波浪による浸食対策も踏まえ、花崗岩で造成された比較的規模の大きな人工海浜が造成されている。理由は不明であるが、この緩傾斜人工護岸には、周辺に残された小規模の天然の岩礁地帯とは異なった海藻植生が見られる。淡路島北部周辺の海岸は潮汐による干満の差が小さいため潮間帯の幅は狭いが、緩傾斜で造成された護岸では高潮線と低潮線との間の潮間帯の幅が広くなり、季節毎に異なった海藻類の带状分布が形成される。また、一辺が1 m前後の不定形の岩石を敷き詰めているので、岩石間に形成される深い間隙に潮の干満に伴い海水が出入りすることで、海藻類や海岸動物にとって格好の生育環境を提供していると思われる。このように、緩傾斜人工護岸では多様性に富んだ生態系が形成されている可能性がある。

この緩傾斜人工護岸に大繁茂する海藻類について数年前より予備的に調査したところ、春から夏にかけての潮間帯では、周囲の自然岩礁地帯より海藻の被度（密度）が顕著に高くなる傾向があり、また特定の紅藻類数種が優先種になっていることが解った。さらにこれらの紅藻類のある種から、意外なことに60年間の謎であった特殊な光合成色素であるクロロフィル *d* が大量に検出された。クロロフィル *d* は、米国スタンフォード大学カーネギー研究所の化学者 Strain らが1943年にカリフォルニア沿岸の紅藻類から初めて検出・同定し、紅藻類の2番目のクロロフィルとして記載されている⁽¹⁾。その後、クロロフィル *d* の化学構造の決定も行われた⁽²⁾ (Fig. 1)。しかし、紅藻類からのクロロフィル *d* の検出に再現性が著しく低い上、検出された場合でも光合成反応に寄与しているとは考えられない程度の微量しか存在しなかったため、今日まで紅藻のクロロフィル *d* の研究はほとんど進展していなかった。この60年間の議論の中には、クロロフィル *d* は潮間帯での強光や高温条件下で、あるいは色素抽出処理の過程で生じた人工産物であるとの意見もあった。一方で、クロロフィル *d* の構造を決定したカナダの化学者 Holt は、紅藻由来の天然物であると強く主張していた⁽³⁾。そこで、

本研究では、海産の真正紅藻類の生理生態的特徴を明らかにするための基礎として、淡路島の緩傾斜人工護岸に繁茂する海藻類の光合成色素の組成などを詳細に検討し、特にクロロフィル *d* の存在の確証とその起源（起源生物）の解明について重点的に進めた。

2 研究方法

2.1 材料

海藻類は、瀬戸内海播磨灘に面した兵庫県北淡町江崎（人工護岸と自然岩礁）および、紀伊水道に面した洲本市由良（自然岩礁）で採集した。採集した海藻類は、直ちに神戸大学臨海実験所（淡路町）に持ち帰り、濾過した天然海水で何度も洗浄しながら、砂泥や微少な付着動物などを入念に除去した後で、以下の実験に用いた。

2.2 クロロフィルの抽出と同定

海藻類に付着している海水を出来るだけ拭き取った後、藻体の適当量を試験官に入れ、100%メタノールを加えて数時間浸漬することでクロロフィルとカロテノイドを抽出した。抽出液を遠心（3000rpm, 15min）して懸濁物質を除いた後、上清について吸収スペクトル（日立 340 分光光度計, Cary 500 分光光度計）と蛍光スペクトル（日立 F4500 蛍光分光光度計）を室温で測定した。クロロフィル *d* の最終的な同定のためには、有機溶媒抽出した色素分画を DEAE-Sepharose CL-6B と Sepharose CL-6B カラムで精製し、核磁気共鳴スペクトル（NMR, Varian Unity 500）と高速原子衝撃質量分析法（FABMS, 日本電子 JMS-SX102）で確認した。

2.3 藻体の形態観察

紅藻の藻体表面に付着する微細藻の観察には、実体顕微鏡（オリンパス SZX-12）と生物顕微鏡（オリンパス BX-50）を用い、写真は顕微鏡専用デジタルカメラ（オリンパス DP-11）を顕微鏡に装着して撮影した。

2.4 顕微分光スペクトル測定

顕微鏡下での藻体微小領域の蛍光スペクトルを測定するため、蛍光顕微鏡（オリンパス BX-50）にマルチチャンネルホトダイオードアレイ検出器（浜松ホトニクス PMA-11）を装着して、420-440nm 励起による発光スペクトルを測定した。このシステムでは直径 10 μ m 領域での吸収・蛍光スペクトルが測定可能である。

2.5 付着微細藻の単離培養

紅藻表面に付着している藻類を様々な手段で掻き取り、その一部をマイクロプレートに分取した。IMK 培地（日本製薬）を用い、25 $^{\circ}$ C, 10~50 μ mol photon/m²/sec（蛍光灯）下で培養した。培養株の分光測定は、蛍光顕微鏡（ニコン E600）にマルチチャンネルホトダイオードアレイ検出器（大塚電子 MCPD-7000）を装着して行った。

2.6 付着微細藻の分子系統解析

単離したシアノバクテリアなど付着藻類の分類と系統位置を明らかにするため、ゲノムDNAを Genomic Prep (アマシャムファルマシアバイオテク) を用いて抽出した。シアノバクテリア特異的の混合プライマーセットを用いてリボソーム遺伝子の SSUrDNA 断片を PCR 増幅した。塩基配列は、BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit v3.0 (アプライドバイオシステム) を用いたダイデオキシ法とキャピラリーシーケンサー (ABI PRISM3100, アプライドバイオシステム) で解析した。

3. 研究結果

3.1 クロロフィル *d* の抽出と同定

クロロフィル *d* は、淡路島南部で採集した真正紅藻ホソバノトサカモドキ *Callophyllis japonica* から抽出した色素溶液中に混在する、クロロフィル *a* とは明らかに異なるマイナー成分としてはじめて気づいた。その後、淡路島北部の花崗岩で造成された緩傾斜人工護岸に海藻が繁茂している場所があり (Fig 2-1), そこで採取した真正紅藻オキツノリ *Ahnfeltiopsis flabelliformis* (Fig, 2-2) から色素を有機溶媒抽出したところ、クロロフィル *d* の吸収極大 (700nm) が明瞭な吸収スペクトルが得られた (Fig. 3)。このデータは、クロロフィル *d* 含量が非常に高いことを示している。しかし、そのオキツノリでさえクロロフィル *d* 含量が個体毎に大きく変動し、時にはまったく検出されないこともあった。

オキツノリから精製したクロロフィル *d* について、HPLC で純度を確認した上、NMR と FABMS で化学構造を確認した。

3.2 オキツノリ藻体の付着藻の観察

オキツノリを顕微鏡下で観察すると、表面は一様ではなく、所々に緑色や深緑色をした、大きさが30ミクロンから100ミクロン程度の球形や時には不定形のコロニーが存在することに気づいた (Fig. 4, A, B, E, F)。その実体を確かめるために、顕微分光装置によりコロニーの吸収・蛍光スペクトルを丹念に測定した結果、クロロフィル *d* 由来の蛍光はそのコロニーに局在し、葉状体からはクロロフィル *a* 由来の蛍光しか観測されなかった。この結果からクロロフィル *d* の生産者は紅藻そのものではなく、コロニーを構成する付着微細藻であることが示唆された (Fig. 4, C, D, G, H)。

3.3 オキツノリ付着藻の単離培養と系統解析

オキツノリ藻体表面の付着微細藻のコロニーから微細藻を分離・培養を行ったところ、シアノバクテリア (藍藻) と思われる生物が増殖してきた (Fig. 5, A)。リボソーム遺伝子を用いた系統解析を行った結果、意外にも宮下がパラオで発見した *Acaryochloris marina*⁽⁴⁾ に極めて近縁であることが判明した (Fig. 5, C)。SSU rDNA の塩基配列の変異の程度からは、新種と言えるほどの差異は無かったので、取り敢えず *Acaryochloris* sp. 淡路株と名付けた⁽⁵⁾ (Fig. 5)。

同様の結果は、同一護岸に生育する他の真正紅藻類コメノリ *Carpopeltis prolifera*,でも観測され、オキツノリに特有の現象ではないことが確認された。

以上の結果から、60年前の発見以来の紅藻におけるクロロフィル *d*の存在に関する謎が解明された。

4. 考察

本研究により明らかになった結果から、以下の重要な情報もたらされた。

- 1)海産の真正紅藻類に検出されるクロロフィル *d*は、紅藻そのものではなく藻体表面に着生する特殊なシアノバクテリアが生産していたこと、
 - 2)今のところクロロフィル *d*を生合成する能力はアカリオクロリス属のシアノバクテリアに限られること、
 - 3)アカリオクロリス属シアノバクテリアは亜熱帯(サンゴ礁)海域から温帯(沿岸)海域にかけて広く生育していること、
 - 4)真正紅藻の藻体表面に着生するシアノバクテリアは、従来知られていない新たなニッチェでの分布を示していること、
 - 5)真正紅藻類の中にはシアノバクテリアの着生が容易な種とそうではない種が存在すること、ただし、紅藻類に何らかの付着特異性があること、
- などである。

さらに、クロロフィル *d*がシアノバクテリアと真正紅藻類には存在するが原始紅藻類には存在しない、という本研究以前に議論されていたクロロフィル *d*生合成系の獲得と進化を考える上での「系統的不連続性」の疑問も解決した。

5. 今後の課題

我々は紅藻表面に、クロロフィル *d*を生合成する *Acaryochloris* sp.の他にも多くの着生藻(シアノバクテリア)がいることを見いだしている¹³⁾。また、同地域の海岸に繁茂している紅藻類の中で、種毎に着生藻の多寡があることも見出している。これらのことは、*Acaryochloris* sp.の紅藻への着生における紅藻特異性、自由生活型(フリーリビング)の存在の可能性も含め海洋(沿岸)生態系でのニッチェと一次生産への寄与、酸素発生型光合成生物の唯一の例外として可視光(400~680nm)ではなく遠赤色光(680~750nm)を用いることの生態学的意味、エネルギーの低い遠赤色光による酸素発生型光合成系の反応機構など、今後解決しなければならない多くの課題があると考えられる。

また、このような海藻付着微細藻の生理・生態・種間相互作用などの解析も踏まえて、人工護岸も含む沿岸海域での藻場生態系を広い意味での環境要因との関係から明らかにすることも重要な課題である。

6. 謝辞

本研究の一部は、伊関峰生博士（科学技術振興機構・さきがけ，基礎生物学研究所）と足立恭子博士（海洋バイオテクノロジー研究所）との共同研究の成果である。また，研究を進める中で，藤田悟史（神戸大学），坂和貴洋（山口大学），大久保智史（京都大学），牛原康博（神戸大学），中野有（神戸大学）の各氏にご支援頂きました。

7. 文献

- 1) Manning, W. M. and Strain, H. H.: Chlorophyll *d*, a green pigment of red algae, *J. Biol. Chem.* 151, 1-19 (1943) .
- 2) Holt, A. S. and Morley, H. V.: A proposed structure for chlorophyll *d*. *Can. J. Chem.* 37, 507-514 .
- 3) Holt, A. S.: Further evidence of the relation between 2-desvinyl-2-formyl-chlorophyll-*a* and chlorophyll-*d*. *Ca. J. Botany.* 39, 327-331 (1961)
- 4) Miyashita, H., Ikemoto, H., Kurano, N., Adachi, K., Chihara, M. and Miyachi, S.: Chlorophyll *d* as a major pigment. *Nature* 383, 402 (1996)
- 5) Murakami, A., Miyashita, H., Iseki, M., Adachi, K. and Mimuro, M.: Chlorophyll *d* in an epiphytic cyanobacteria of red algae. *Science*, 303, 1633 and Supporting Online Material (2004) .

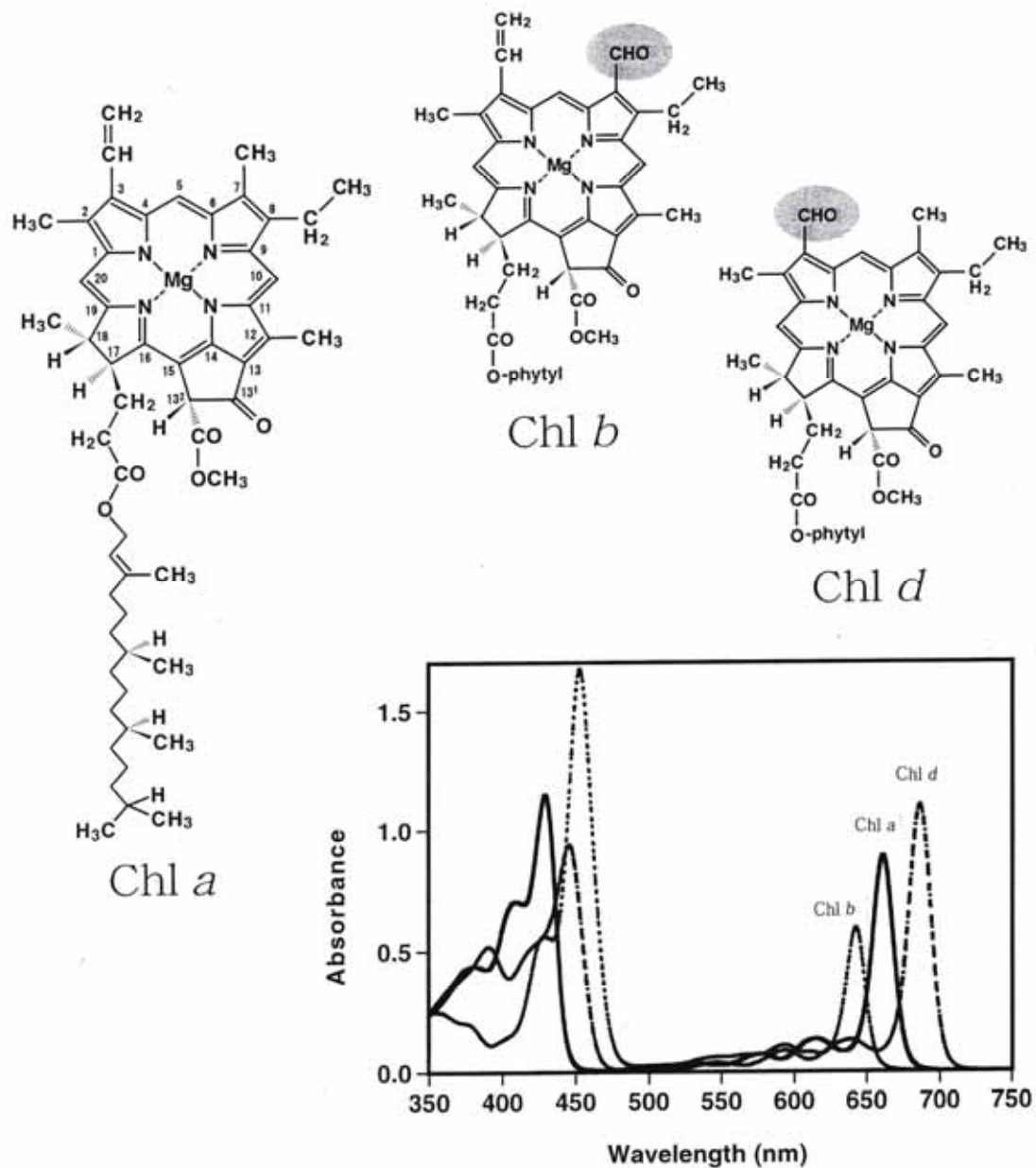


Fig. 1 Chemical structures and absorption spectra of chlorophyll *d* and other chlorophylls.



Fig. 2-1 Photograph of artificial rocky seashore in Awaji Island.



Fig. 2-2 Photograph of seaweeds observed at artificial rocky seashore.

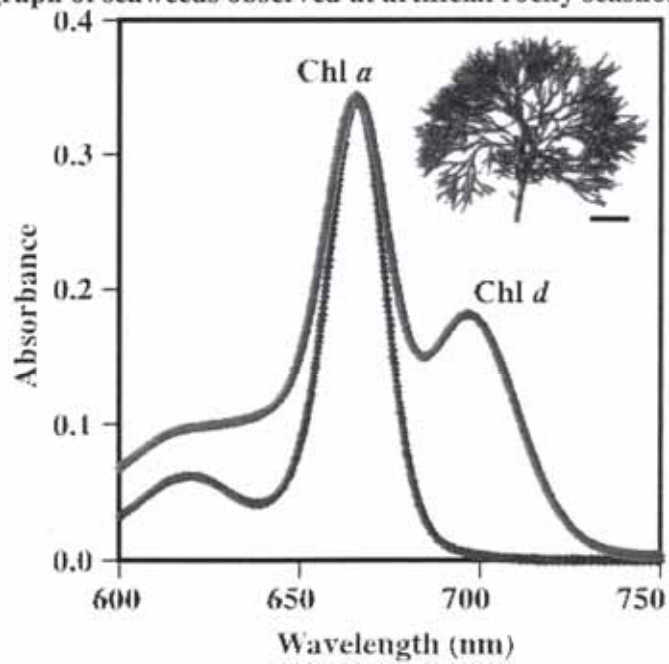


Fig. 3 Absorption spectra of methanol extracts from *Ahnfeltiopsis flabelliformis* with and without epiphytic microalga.

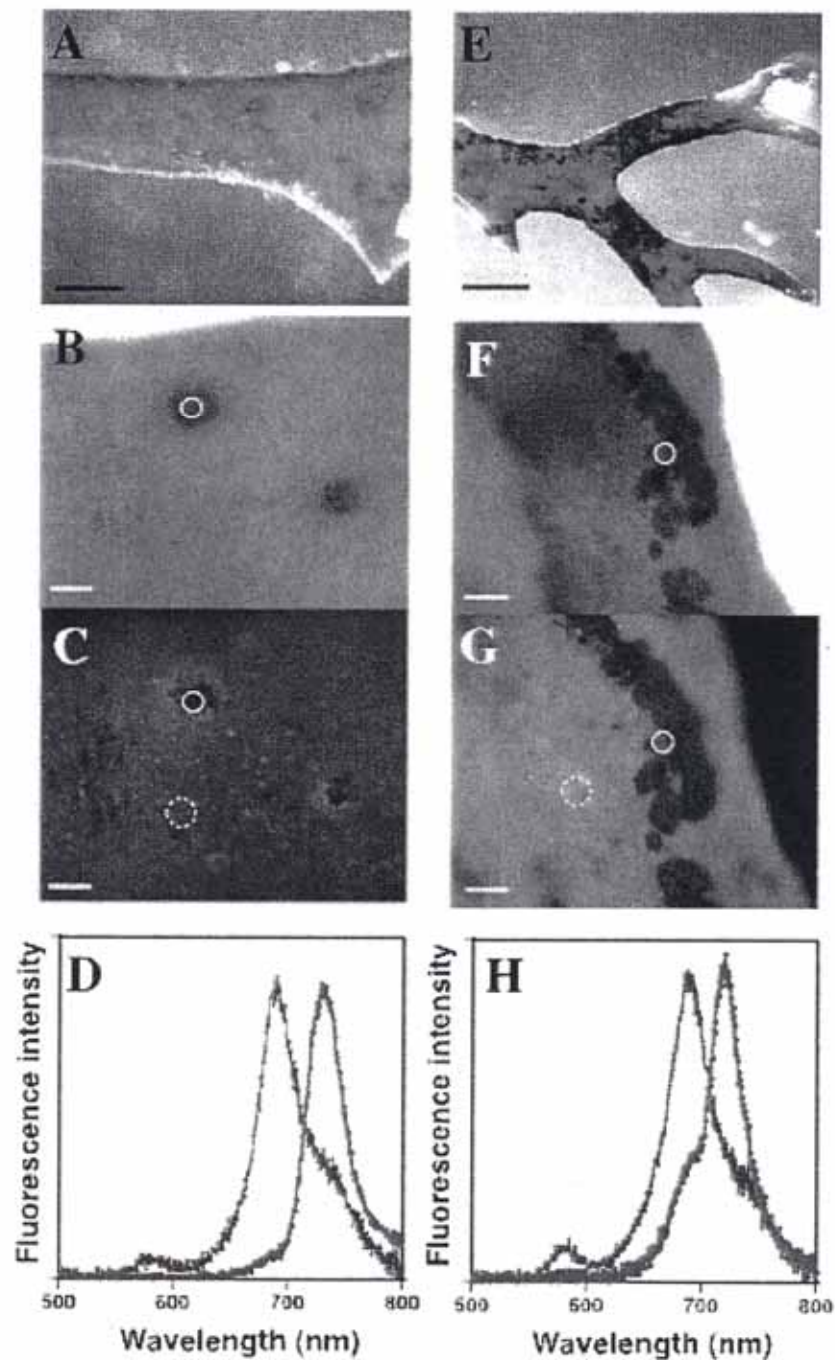


Fig. 4 Microscopic observation and fluorescence spectra of epiphytes on surface of red alga *Ahnfeltiopsis flabelliformis*. (A and E) Thallus under a stereo-microscope (scale bars, 1mm), (B and F) magnified photographs under a bright-field microscope (scale bars, 50µm), (C and G), fluorescence photographs under epi-fluorescence mode and (D and H) microscopic fluorescence spectra of epiphytes (the monitoring area are shown by circles of solid line in C and G) and red algal thallus (the monitoring area are shown by circles of broken line in C and G).

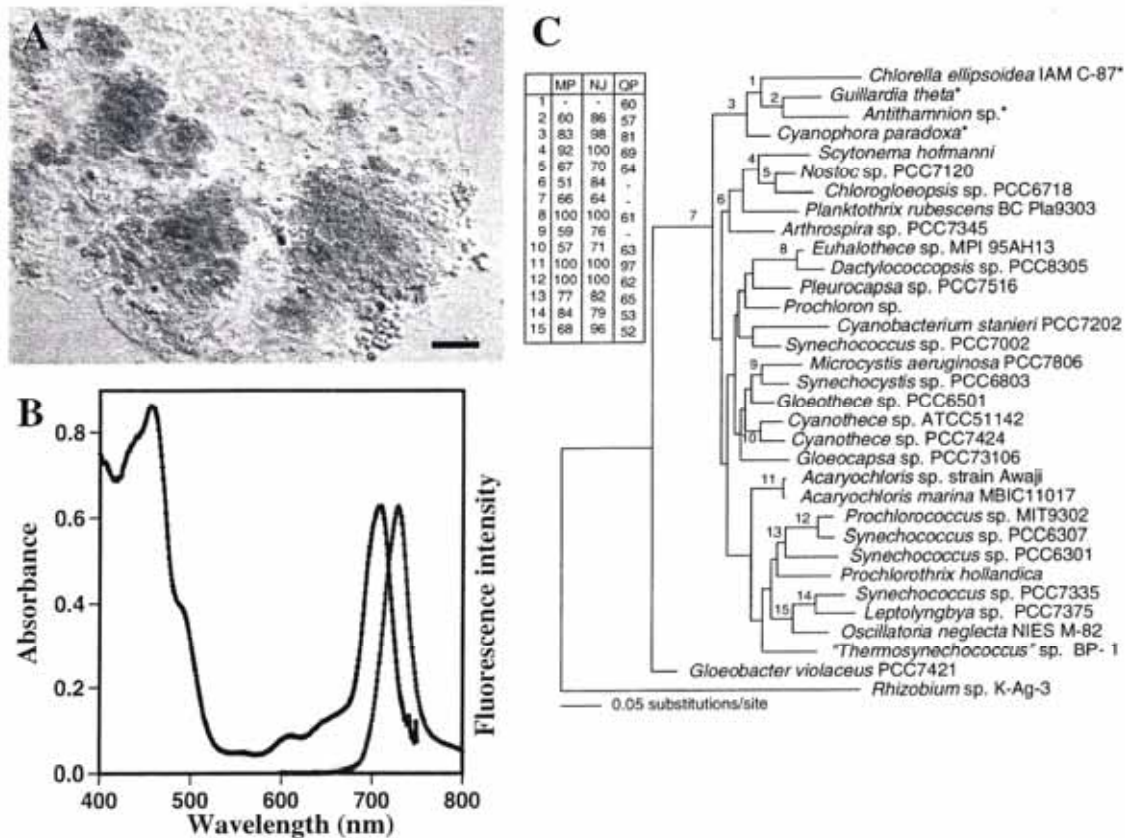


Fig. 5 Characterization of chlorophyll *d*-dominating epiphytic cyanobacterium *Acaryochloris* sp. strain Awaji. (A) Microphotograph of cells of cultured *Acaryochloris* sp. (scale bar, 10µm). (B) Absorption and fluorescence spectra of the clonal culture by micro-photometry. (C) The maximum likelihood (ML) tree showing the phylogenetic relationships among *Acaryochloris* sp. strain Awaji, selected cyanobacteria, and plastid SSU rDNA.

Study of Epiphytic Microalgae on Macrophytic Red Algae in Artificial Rocky Seashore (Chlorophyll *d* Is Not of Red Algal Origin but from an Epiphytic Cyanobacterium)

Akio Murakami (Kobe University Research Center for Inland Seas)

Hideaki Miyashita (Hall of Global Environmental Research, Kyoto University)

Mamoru Mimuro (Hall of Global Environmental Research, Kyoto University)

Photosynthetic pigments including chlorophyll *d* (3-desvinyl-3-formyl chlorophyll *a*) were studied in macrophytic seaweeds and their epiphytic microalgae harvested at artificial rocky seashore in Awaji island (Hyogo, Japan). Three red algae, *Ahnfeltiopsis flabelliformis*, *Callophyllis japonica* and *Carpopeltis prolifera*, contained a very large amount of chlorophyll *d*. Microscopic observation revealed several types of pigmented colonies on thallus surface of the red alga *Ahnfeltiopsis flabelliformis* comprising cyanobacteria, diatom and other eukaryotic microalgae. Typical cyanobacterial colony shows a specific fluorescence at 729 nm at room temperature, characteristic of chlorophyll *d*. Phylogenetic position analyzed by SSU rDNA sequences indicates that this epiphytic cyanobacteria is closely related to *Acaryochloris marina*, strange symbiont of colonial ascidian in tropical sea water.

We verified that the putative Chlorophyll *d* of red algae originates from the epiphytic cyanobacterium *Acaryochloris* sp. srtain Awaji on red algal thalli, and settled the chlorophyll *d* distribution in photosynthetic organisms (**Murakami et al. (2004) Science 303:1633**). We have thus solved the 60-year-old enigma since the discovery of chlorophyll *d*. *Acaryochloris*, which is unique in its use of far-red light and its habitat, is widely distributed in unexplored niches and is suggested to contribute to primary production in the coastal water.