

### 海産紅藻類に着生する新規微細藻の生理生態学的研究

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：三室 守（京都大学・大学院地球環境学堂）

研究協力者：浅井智宏（神戸大学・理学部）

我々は、淡路島北部の播磨灘沿岸において花崗岩で造成された緩傾斜人工護岸に繁茂する紅藻オキツノリ *Ahnfeltiopsis flabelliformis* からクロロフィル *d* を主要色素とする特殊なシアノバクテリア（ラン藻）を発見し、その成果を 2004 年の SCIENCE に報告した（平成 15 年度ソルト・サイエンス研究助成の成果）。そのシアノバクテリアを分離培養し 16S-rDNA の塩基配列を解析した結果、熱帯サンゴ礁に生育する群体ホヤから 1996 年に発見されていた *Acaryochloris marina* と極めて近縁であることが判明し、淡路島の海藻から分離された新規シアノバクテリアを *Acaryochloris sp. strain Awaji* と暫定的に命名した。我々の報告が契機となり、2005 年になってアメリカの研究グループが塩湖から発見した *Acaryochloris* 属シアノバクテリアを用いて遺伝子レベルでの進化的特徴を報告した。また、オーストラリアの研究グループはホヤ組織における *Acaryochloris* 属シアノバクテリアの真のニッチを解明した。このように、付着微細藻の研究が活発になっている。

平成 16 年度の研究助成では、紅藻オキツノリの藻体組織や群落が形成する環境要因、特に光環境についての解析、*Acaryochloris* を含む着生微細藻の紅藻組織内での着生部位の局在性と着生機構についての研究を進めた。紅藻オキツノリの組織切片を用いて着生の細胞学的、分光学的な解析を光学顕微鏡レベルで進めた。その結果、研究の初期にクロロフィル *d* 生産者として我々が提示し、その後自ら否定していた別属のシアノバクテリアが、珪藻や緑藻などの多様なオキツノリ着生微細藻群の中でも最優占種であることが明らかになった。この着生シアノバクテリアの細胞形態について詳しく解析したところ、一般のシアノバクテリアと比較して細胞サイズが大きい、個々の細胞に先端部と付着基部の極性が見られる、個々の細胞毎に多数の内生子を形成して増殖するなど、いくつかの点で特異な形質をもつことが明らかになった。次に、紅藻の皮層組織内部に内生するシアノバクテリアについて解析したところ、細胞サイズやコロニー形状が異なるものの光合成色素の組成や光環境応答能は外生シアノバクテリアと類似する結果が得られた。一方、16S-rDNA の塩基配列に基づいた分子系統的は、両種は極めて近縁である結果を示した。今回の解析結果は、特定の紅藻類に親和性をもつと推定される付着シアノバクテリアが、紅藻組織内外の微環境の違いに対応して、同一起源の種が適応的に分化している可能性を強く示唆しているものと思われる。今後は、紅藻組織内の局所的領域で形成される微環境の測定や微細藻の定量的な解析が必要である。



26

助成番号 0426

## 海産紅藻類に着生する新規微細藻の生理生態学的研究

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：三室 守（京都大学・大学院地球環境学堂）

研究協力者：浅井智宏（神戸大学・理学部）

## 1. 研究の背景

淡路島北部の播磨灘沿岸において花崗岩で造成された特定の緩傾斜人工護岸には、近隣の自然岩礁地帯などとは大きく異なった豊富な海藻植生が見られ、特異な沿岸生態系を形成していると考えられる。この人工護岸では紅藻類が優占種になっており、その中でもオキツノリ *Ahnfeltiopsis flabelliformis* がバイオマスは多い（生重量換算で 20～40%）。1999年に淡路島の紅藻類にクロロフィル *d* を検出して以来、クロロフィル *d* の実体や起源について解析を進めていた。その中でオキツノリが最も大量のクロロフィル *d* を含有し、研究材料として優れていることに気が付いた。しかし、クロロフィル *d* の存在量はオキツノリ藻体毎に大きく変動する（全クロロフィル量の 0～30%）ことの原因が解明できないまましばらくの間は、野外試料に依存して定量性解析実験を進める展望を見いだせなかった。また研究を進める上での資金などの問題もあったため、紅藻のクロロフィル *d* 研究は停滞していた。

このような状況の中で、ソルト・サイエンス研究財団のご理解により平成15年度助成研究が認められ、その助成期間中に研究が飛躍的に進展した。多数のオキツノリ藻体を顕微鏡と生物顕微鏡で丹念に観察し、また顕微分光法を駆使して藻体表面の局所部位の吸収・蛍光スペクトルを膨大に計測した。その結果、クロロフィル *d* は紅藻の細胞自身には全く存在せず、紅藻の藻体表面に着生する特殊なシアノバクテリア（ラン藻）に局在することを見いだした。そのシアノバクテリアを分離培養し遺伝子（16S-rDNA）の塩基配列を解析した結果、紅藻着生シアノバクテリアはパラオ諸島のサンゴ礁に生育する群体ホヤから1996年に発見されていた *Acaryochloris marina* と極めて近縁であることが判明した。これらの結果をもとに、淡路島の紅藻から発見されたクロロフィル *d* をもつシアノバクテリアを *Acaryochloris* sp. strain Awaji と暫定的に命名し、全体の成果を2004年3月12日号の米国科学誌 *Science* に報告した（Murakami et al. 2004）。

熱帯の無脊椎動物の共生藻と温帯海域の紅藻の着生藻として比較すると、両 *Acaryochloris* 株がニッチェや環境条件が大きく異なるにも関わらず、分子系統的に近縁であることは非常に驚きであった。一方2005年になって米国カリフォルニア州において100

年前の洪水で出現した塩湖 Salton Seas の湖底の岩表面に形成されているマット状藻類群の中に *Acaryochloris* が発見された。分子系統解析から、Salton Sea 産の種は、*Acaryochloris* sp. strain Awaji の場合と同程度に *Acaryochloris marina* と近縁であることが判明し PNAS に報告された (Miller et al. 2005)。さらに、オーストラリアのサンゴ礁から採集したホヤ組織の形態学的、分光学的解析から、*Acaryochloris* はホヤ体内に共生するのではなく、体の表面に外生する (epizoid) ことが示され、Nature に報告された (Kuhl et al. 2005)。これらの成果は我々の昨年論文発表が契機となり達成されたものといえる。ところで、同じ *Acaryochloris* が Epiphyte 及び Epizoid、あるいは Epilithos と生育形態が類型化されるように、他(生)物に付着あるいは接着するという共通の生育形態を示している点でも非常に興味深い実態が明らかになりつつあり、今後の展開が十分期待される。

平成16年度の本助成研究では、紅藻付着微細藻の生育環境の特徴と生育の特異性を解明するため、淡路島産紅藻類に着生する *Acaryochloris* を含めた付着ラン藻について基礎的な生理生態学的解析を進めた。

## 2. 材料と方法

### 2.1 紅藻

真正紅藻オキツノリ *Ahnfeltiopsis flabelliformis* は、瀬戸内海播磨灘に面した兵庫県淡路市江崎の人工護岸 (Fig. 1) で、年間を通じて干潮時に採集した。採集した紅藻は、直ちに臨海実験所に持ち帰り、ポンプで汲み上げた大阪湾の表層海水をかけ流しすることにより洗浄した。さらに、微少な無脊椎動物 (主にワレカラなどの節足動物、巻き貝などの軟体動物) をピンセットで除去した後、オートクレーブ滅菌海水に浸漬した状態で 15°C の培養庫で一定期間保存した。



Fig. 1 Habitat of *Ahnfeltiopsis flabelliformis* in Awaji Island.

### 2.2 培養条件

付着ラン藻は紅藻組織切片ごと、あるいは組織から分離した状態のものを、マイクロプレートあるいはチャンバースライドに一切片ずつ入れ、IMK 培地添加海水あるいは ASN-III 人工海水培地を用い 22°C、12 時間明 - 12 時間暗の光条件で培養した。

### 2.3 藻体の形態観察

付着微細藻の観察は、オキツノリの組織切片の状態でもマイクロプレートあるいはチャン

バースライドに入れた状態で顕微鏡観察した。

#### 2.4 顕微分光スペクトル

紅藻組織切片と培養株についての定常的吸収スペクトルと蛍光スペクトルは、正立型蛍光顕微鏡（オリンパス BX-50）と倒立型顕微鏡（オリンパス IX70）にグラスファイバーの光ガイドを用いたマルチチャンネル・ホトダイオードアレイ検出器（浜松ホトニクス PMA-11）を装着して測定した。

#### 2.5 分子系統解析

付着ラン藻の分類や系統位置を調べるため、紅藻藻体組織切片から丁寧に分離したラン藻からゲノム DNA を抽出し、特異的プライマーを用いて 16S-rDNA 断片を PCR 増幅した。塩基配列は、BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit（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 PRISM 3100，アプライドバイオシステム）で解析した。

### 3. 結果

紅藻オキツノリの藻体表面を実体顕微鏡で丁寧に観察したところ、中心目珪藻類、羽状目珪藻類、糸状の緑藻類と紅藻類、ラン藻類など、多種類の付着微細藻が観察された。時には藻体表面を覆い尽くす例も認められた。これらの付着微細藻の中でも、*Acaryochloris* を含めたラン藻類が圧倒的に多いことが判明した（Fig 2. & Fig. 3）。



Fig. 2 Thallus of *Ahnfeltiopsis flabelliformis*

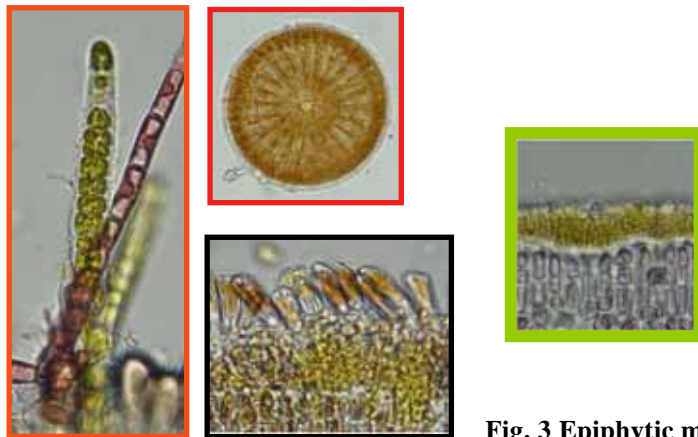


Fig. 3 Epiphytic microalgae on *A. flabelliformis*

オキツノリ表面に付着するラン藻にはクロロフィル *d* をもつ *Acaryochloris* 属以外に, *Dermocarpa* 属が豊富に見られた (Fig. 4)。この属のラン藻の特徴として, 細胞サイズが通常のラン藻より大きい, 付着性である, 細胞極性が見られる, 内生孢子を形成する, などの文献記載があり, 紅藻の付着ラン藻と特徴が一致した。

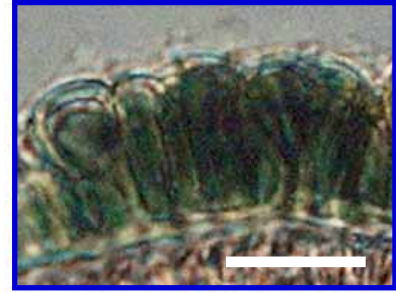


Fig. 4 *Dermocarpa*-like epiphytic microalgae on *A. flabelliformis*. (scale 30µm)

オキツノリ藻体に着生するこの *Dermocarpa* 属ラン藻には色調の異なる (青緑, 黄緑, 赤茶) ものが見られたので, 顕微分光法により個々の細胞毎の吸収スペクトルを測定した。その結果, 全ての細胞はクロロフィル *a*, フィコシアニン, フィコエリスリンをもつ共通の特徴があり, これら 3 種の光合成色素の相対含量の違いが細胞の色調に反映していることが示唆された (Fig. 5)。

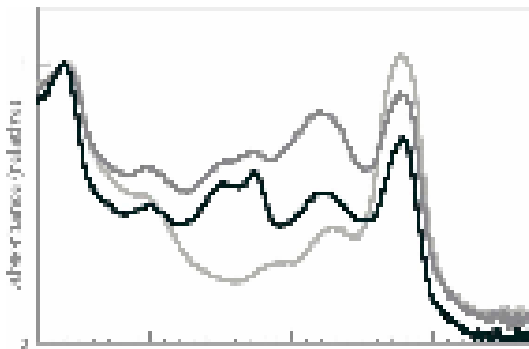


Fig. 5 Absorption spectra of epiphytes

この結果は, 色素組成は同じものの色素の量的構成が異なる複数の *Dermocarpa* 属ラン藻が共存することも考えられたが, ある種のラン藻には補色適応 (赤色光領域を吸収するフィコシアニンと緑色光領域を吸収するフィコエリスリンの量比が, 細胞に与えられる光質に依存して適応的に調節される現象) が知られているので, *Dermocarpa* 属ラン藻についてこの適応能を調べた。オキツノリ切片に *Dermocarpa* 属ラン藻が付着している状態のサンプルを蛍光

灯 (赤色光より緑色光成分が多い) 下で 1 週間培養したところ, フィコシアニンは時間とともに減少し, これとは逆にフィコエリスリンが増加する結果が得られ, この付着ラン藻は補色適応能をもつ可能性が強く示唆された。

ところで, オキツノリに着生する微細藻のほとんどは藻体表面に見られる。すなわち微細藻は外生という特徴をもつ。しかし, 希にオキツノリの皮層細胞の中に生育する緑色の微細藻が観察されることがある。この内生微細藻に着目し, 多数のオキツノリ藻体から膨大が切片を作成し, 内生微細藻を集めて分光特性と補色適応能の解析を行ったところ, 細胞のサイズやコロニーの形状は異なるものの, 外生 *Dermocarpa* 属ラン藻と分光特性や補色適応能などが極めて類似する結果が得られた。そこで, 予備的に, 両種の分子系統解析を行ったところ, 両種は極めて近縁であることが判明した。

#### 4. 考察と今後の課題

以上のように, クロロフィル *d* をもつラン藻が発見された紅藻オキツノリには, クロロフィル *d* をもつ *Acaryochloris* sp. 以外にも, 特殊なラン藻がニッチをもつことが示された。またそのラン藻は紅藻組織が形成する微環境に適応し, 分化している可能性が示唆された。今後は培養条件の工夫により *Dermocarpa* 属ラン藻の培養株の確立させることが今後の研究を進展させるために重要である。

#### 謝 辞

本研究を進める中で, 小菅桂子 (神戸大学), 伊関峰生 (PRESTO), 内田博子 (神戸大学), 牛原康博 (神戸大学) のご協力を頂きました。

なお, 2 年間に渡る本財団の助成研究による得られた成果 (紅藻のクロロフィル *d* の起源生物の解明) が認められ, 平成 17 年度の科学研究費補助金, 学術創成研究『地球環境を支える酸素発生光合成系の解明—反応機構, 獲得, 継承, 代表者: 京都大学・三室守』に採択されました。ここに本財団へ感謝の意を表するとともにご報告させていただきます。

#### 文 献

- Murakami, A. et al. (2001) Chlorophyll *d* in Rhodophyceae: Presence and function. In. **PS2001 Proceedings:12th International Congress on Photosynthesis** S31-004(6pp).CSIRO Publishing (Australia) (Online and CD - ISBN 0643 067116)
- Murakami, A. et al. (2002) A novel chlorophyll *d* -containing organism: Discovery and its significance. **J. Photoscience** 9:74-77.
- Murakami, A. et al. (2004) Chlorophyll *d* in an epiphytic cyanobacterium of red algae. **Science** 303:1633 (and Supporting Online Material, 3 pp.).
- Murakami, A. et al. (2005) Chlorophyll *d* is not of red algal origin but from an epiphytic cyanobacterium. In **Photosynthesis: Fundamental Aspect to Global Perspectives**. “Proceedings of 13<sup>th</sup> International Congress of Photosynthesis”. pp. 170-172 (in press).
- Miyashita et al. (1996) Chlorophyll *d* as a major pigment. **Nature** 383:402.
- Kuhl et al. (2005) Ecology: a niche for cyanobacteria containing chlorophyll *d*. **Nature** 433:820.
- Miller et al. (2005) Discovery of a free-living chlorophyll *d*-producing cyanobacterium with a hybrid proteobacterial/cyanobacterial small-subunit rRNA gene. **PNAS** 102:850-855.

## Eco-physiological Study of Novel Epiphytic Cyanobacteria on Marine Red Algae in Awaji Island

Akio Murakami

Kobe University Research Center for Inland Seas

Mamoru Mimuro

Hall of Global Environmental Research, Kyoto University

Chihiro Azai

Department of Science, Kobe University

### Summary

In 2004, we reported a novel chlorophyll *d*-producing cyanobacterium, *Acaryochloris* sp. strain Awaji, which was isolated as epiphytic microorganism on the thalli of macrophytic red seaweed, *Anfeliopsis flabelliformis* in artificial rocky seashore of Awaji Island in Seto Inland Sea (Murakami et al. (2004) Science 303:1633). Molecular phylogenetical analysis depending on 16S-rDNA sequence indicated that the cyanobacterium was closely related to *Acaryochloris marina* isolated as supposed symbiont of colonial ascidian in tropical coral reef in 1996. Very recently, another similar cyanobacterium was discovered at the hypersaline lake (ca. 45‰), Salton Sea in the California state (Miller et al. (2005) PNAS 102:850-855). Moreover, the genuine niche of *Acaryochloris marina* of didemnid ascidians was revealed to be underside of didemnid ascidians by microscopic and spectrometric analyses (Kuhl et al. 2005, Nature 433:820). These results confirmed that *Acaryochloris* spp. have epiphytic, epizoic or epilithic nature as we found in the red algae in 2004.

In this study, microenvironment of red algal thalli such as light condition (intensity and light quality) and microhabitat of epiphytic microalgae in red algal thalli were analyzed by spectroscopic observation of thin section of red algal thalli containing micro-algae. We found that *Dermocarpa*-like cyanobacterium predominantly occupied the surface of the thalli. Our results indicated that this epiphytic cyanobacterium is characteristic in pigment composition and physiological and morphological nature.