

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 瀬戸内海における貧栄養化と強光ストレスの組み合わせが
代表的な植物プランクトン種に及ぼす影響に関する研究

広島大学大学院統合生命科学研究科
生物資源科学プログラム
学生番号 D213815
氏名 矢野 諒子

海洋の基礎生産者として重要な植物プランクトンの増殖と動態は、海水中の栄養塩濃度に大きく依存する。瀬戸内海では近年栄養塩環境が劇的に変化し、高度経済成長期の富栄養化を経て、瀬戸内海環境保全特別措置法による水質規制により現在は貧栄養化状態にあるとされる。水質改善の結果、赤潮の発生件数は減少したものの、基礎生産低下による漁業生産の減少が指摘されている。代表的な基礎生産者である珪藻類の構成種も大きく変化し、1980年代半ばを境にかつての優占種であった *Skeletonema* 属から *Chaetoceros* 属に遷移したとされる。また、現在でも年間100件程度の赤潮が依然として発生し、特に有害鞭毛藻類のラフィド藻 *Chattonella* 属による赤潮は夏季に猛威を振るっている。

上記の珪藻優占種の変化は貧栄養化と関連して議論されることが多く、*Chattonella* 属の赤潮も珪藻衰退後のニッチ獲得として説明されている。一方で、*Skeletonema* 属の衰退や *Chattonella* 属の優占はしばしば夏季の強光下で確認されているが、これら生物種の強光ストレスに対する応答はこれまで着目されてこなかった。近年の瀬戸内海は大気の大気清澄化による日射量の増加や海水の透明度上昇によって、植物プランクトンが強光に曝されやすい環境に変化していると考えられ、貧栄養化だけでなく強光イベントの増加も相乗的に植物プランクトンの動態に影響している可能性がある。

本研究では、栄養塩制限に加え強光の要素を組み合わせた環境下における植物プランクトン種ごとの光合成応答の違いを調べることで、珪藻 *Skeletonema* 属から *Chaetoceros* 属への遷移や、ラフィド藻 *Chattonella* 属の依然として高い出現の説明を試みた。本論文では第1章の緒言に続き、第2章で栄養塩制限および強光下での各種の光合成応答を調べた。その結果、ストレス環境毎の光合成電子伝達効率と、熱放散によって強光防御を担う非光化学消光 (Non-photochemical quenching, NPQ) の誘導には種ごとに違いがみられた。第3章では珪藻 *Skeletonema* とラフィド藻 *Chattonella* の強光下での NPQ 誘導機構を色素分析に加え分子生物学的にも明らかにし、第4章で栄養塩制限および強光下での NPQ 誘導機構の発現・制御状態を調べた。第5章の総合考察では各植物プランクトン種の栄養塩制限および強光下での光合成特性を踏まえ、近年の瀬戸内海の環境変化がもたらす植物プランクトンの出現動態・構成種の変化を新たな視点から考察した。

第2章 パルス変調型蛍光法による植物プランクトン各種の栄養塩制限下での光合成応答

目的とする栄養塩種の枯渇状態を任意に調節できる連続培養 (ケモスタット培養) を用いて各植物プランクトン種を培養し、パルス変調 (PAM) 型蛍光法を用いて光化学系 II (Photosystem II, PSII) の実効量子収率 (ϕ_{II})、光化学消光 (qP)、非光化学消光 (NPQ) を測定した。

珪藻 *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros lorenzianus* について、窒素あるいはリン制限培地の供給量を2段階に設定し連続培養した。これら栄養塩制限細胞に強光 ($800 \mu\text{mol-photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を1時間照射すると ϕ_{II} の低下および NPQ の上昇が観察されたが、この時窒素制限下では高希釈率よりも低希釈率

(=より厳しい窒素制限)でNPQが低下し、リン制限の場合は逆に上昇した。その際、リン制限細胞ではqPが著しく低下し、特に*S. costatum*において顕著であった。この結果から、リン制限状態の*S. costatum*では積極的なNPQ誘導による強光防御が不十分であり、深刻な光阻害が引き起こされる可能性が示唆された。制限栄養塩の添加によって損傷したPSIIはリカバリーし、NPQの緩和と ϕ IIおよびqPの上昇が見られたが、この回復は*Chae. lorenzianus*の方が早く、*S. costatum*が光合成回復の点でも不利であることが示唆された。さらに、夏季の瀬戸内海を模したリン制限下で両種の混合連続培養を行った結果、*S. costatum*の衰退と*Chae. lorenzianus*の優占は強光によって加速した。

窒素あるいはリン制限で連続培養したラフィド藻*Chattonella marina* var. *antiqua*では、30秒の強光照射下で10~20日目にかけてNPQが顕著に上昇した。最終的に30日目では1時間の強光照射でも高いqPを維持する一方でNPQは低い値となり、*Chat. antiqua*は貧栄養環境に馴化しNPQをほぼ誘導せずにPSII下流の電子伝達を維持できることが示唆された。*Chat. antiqua*と珪藻2種それぞれをリン制限下で混合連続培養すると、適光条件下で*Chat. antiqua*は*S. costatum*を凌いで優占し、強光条件下では*Chat. antiqua*がリン制限と強光環境に馴化する様子が再度示された。*Chat. antiqua*と*Chae. lorenzianus*の混合培養では*Chae. lorenzianus*が*Chat. antiqua*を駆逐し、強光によって両種の遷移は加速した。以上の結果は、かつての優占珪藻*Skeletonema*は栄養塩制限、特にリン制限下で強光阻害を受けやすい一方で、*Chaetoceros*や*Chattonella*は栄養塩制限下でも強光に耐性をもつ、あるいは強光を利用し有利に増殖出来ることを示唆した。

第3章 非光化学消光NPQに関わるキサントフィルサイクルとLhcx遺伝子

第2章で示した珪藻*S. costatum*とラフィド藻*Chat. antiqua*のNPQ誘導の違いを踏まえ、両種のNPQ誘導機構を調べた。珪藻の主要なNPQの要素である熱放散qEには以下3つの相互作用が存在するとされる：(1)チラコイド膜内外のプロトン勾配、(2)キサントフィルサイクルを担うジアジノキサントチン(Dd)からジアトキサントチン(Dt)への脱エポキシ化(Dd-Dtサイクル)、(3)Lhcxタンパク質の関与である。なお、珪藻とラフィド藻は同じ不等毛植物門に属しながら、後者においては主要なキサントフィルサイクルがデオラキサントチンサイクル(VAZサイクル)であることが知られ、Lhcx遺伝子については本研究で対象とした何れの属においても報告がない。

本章では、まず培養株についてのRNA-seqで得たトランスクリプトームより、*S. costatum*では6配列(*ScLhcx1~6*)、*Chat. antiqua*では5配列(*CaLhcx1~5*)のLhcx遺伝子を同定した。その上で、適光および強光に順次1時間ずつ曝した両種の細胞に対して、PAM蛍光法による光合成パラメーターの測定、HPLCによるキサントフィル色素の定量を行い、RT-qPCRにより各Lhcx遺伝子の発現を定量した。実験に供した細胞は非栄養塩制限の連続培養により得られたが、両種ともに適光照射下(150 $\mu\text{mol-photon m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)で0.6以上の比較的高い ϕ IIを維持していた一方で、*S. costatum*は適光でもNPQを誘導した。強光下(800 $\mu\text{mol-photon m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)では*Chat. antiqua*もNPQ誘導を示したが、NPQ値は*S. costatum*の0.6、*Chat. antiqua*の0.3と2倍の差があった。色素分析の結果、*S. costatum*はDd-Dtサイクル、*Chat. antiqua*はVAZサイクルを主に有していた。また、*S. costatum*では強光下において3つのLhcx遺伝子(*ScLhcx2~4*)の高い発現量と、DdからDtへの脱エポキシ化を示すDES(De-epoxidation state)の上昇が観察された。*Chat. antiqua*では、光強度の変化に応じたLhcx遺伝子の発現量変化はみられなかったが、強光下でVAZサイクルとDd-Dtサイクル両方のDESが上昇し、2つのキサントフィルサイクルによる高いNPQ誘導能が示唆された。

第4章 栄養塩制限下における植物プランクトンのNPQ誘導機構

第3章で示した*S. costatum*と*Chat. antiqua*の強光下でのNPQ誘導機構を踏まえ、栄養塩制限および強光下での両種の光合成応答およびNPQ誘導機構の変動を調べた。

*S. costatum*については、非栄養塩制限(Control)、窒素制限、リン制限の3つの栄養条件で、適光および強光下で連続培養した。第2章と同様に、窒素制限下での低いNPQとリン制限下での積極的なNPQ誘導が観察された。Dd-Dtサイクルを担う各色素量(プールサイズ)はいずれの栄養塩条件でも強光下で増加したが、栄養塩制限区のプールサイズはControl区よりも有意に小さかった。一方で、DESは強光条件下のリン制限区で最も高く、窒素制限区で低い傾向にあった。このことから本種の

NPQ 誘導能には脱エポキシ化の活性化 (DES の上昇) が重要であると考えられた。加えて, *S. costatum* の 6 つの *Lhcx* 遺伝子のうち特に *ScLhcx2* がリン制限区で発現上昇したことから, *ScLhcx2* タンパク質はリン制限下での NPQ 誘導に特に重要であることが示唆された。

Chat. antiqua については, 強光下で Control, 窒素制限, リン制限の栄養条件で連続培養した。リン制限下で NPQ が上昇し, この時 VAZ サイクルと Dd-Dt サイクルのプールサイズに栄養塩条件間で大きな差は無かったが, 両キサントフィルサイクルの DES はリン制限下で上昇した。*Lhcx* 遺伝子発現は, 栄養塩条件に関わらず *CaLhcx1* が常に高い発現量を示し, 2 つのキサントフィルサイクルによる高い NPQ 誘導能と共に, 本タンパク質の強光防御への関与が示唆された。

以上の結果を踏まえ, 第 5 章では総合考察を行った。まず, 瀬戸内海で近年減少している珪藻 *Skeletonema* 属は栄養塩制限, 特にリン制限と強光の組み合わせに対して強光阻害を受けやすいことが確認された。*S. costatum* はリン制限と強光の複合ストレス下での PSII 全体の電子伝達の阻害が顕著であるため, 積極的に NPQ を誘導して光合成系を保護しようと試み, この時 Dd-Dt サイクルの脱エポキシ化と複数の *Lhcx* 遺伝子の発現上昇が NPQ に寄与すると考えられた。しかし, このような複合ストレス環境での *S. costatum* の積極的な NPQ 誘導は光合成系を保護するに十分ではなく, その結果として qP の低下が見られた。近年増加している *Chaetoceros* 属もリン制限および強光下で PSII の電子伝達が阻害されたが, 栄養塩の再供給によって素早く光合成系をリカバリー出来る点で, *S. costatum* よりも有利であることが示唆された。加えて競合実験の結果より, リン制限下での *S. costatum* の衰退は強光によって加速し, 近年の強光イベントの増加が *Skeletonema* 属から *Chaetoceros* 属への遷移に関与していることが示された。ラフィド藻 *Chat. antiqua* は栄養塩制限と強光の複合ストレス下でも珪藻 2 種より高い電子伝達効率を維持し, さらに VAZ サイクルと Dd-Dt サイクルの両方の寄与による高い NPQ 誘導能を持つことが示唆された。

以上の結果は, 近年瀬戸内海で顕著な貧栄養化, 特にリンの不足に加え, これも近年顕著な強光イベントの増加が相乗的に働き, かつての優占種である *Skeletonema* 属に不利な状況を生み出していること, 一方同じ珪藻でも *Chaetoceros* 属は栄養塩の再供給により素早く回復可能であること, 依然として赤潮を形成するラフィド藻 *Chattonella* 属はストレス環境への高い馴致能力と強光防御機構により, 栄養塩が枯渇しやすく強光に曝されやすい夏季の表層で有利に増殖が可能であることを, 各々の生理学的・分子生物学的特徴から明らかにしたものである。同時に, 今後の瀬戸内海における基礎生産構造の変化や有害赤潮の予測などに資するものである。