【160】

氏　名（本籍）	雪 吹 直 史（島 根 県）
学 位 の 種 類	博　　士（理　　学）
学 位 記 番 号	博　甲　第　4300　号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科
学 位 論 文 題 目	**Ultrastructure and Molecular Phylogeny of Two Novel Excavate Protists** （微細構造および分子系統解析に基づく新規エクスカベート類 2 種の研究）

主　査	筑波大学教授	理学博士	井　上　　勲
副　査	筑波大学教授	理学博士	沼　田　　治
副　査	筑波大学教授	学術博士	橋　本　哲　男
副　査	筑波大学教授	理学博士	白　岩　善　博

論 文 の 内 容 の 要 旨

真核生物の初期進化を理解することは生物学の最大の目標の一つで，それを可能にするには，真核生物の初期に分岐した生物群の系統関係と諸性質を明らかにすることが求められる。この点で，エクスカベート生物は最も注目すべき真核微生物群の一つである。エクスカベート類の細胞構造は他に例をみない複雑なもので，エクスカベートの間では類似性が極めて高く，明瞭な相同性を示す。しかし一方で，エクスカベートではミトコンドリアに関連する特徴は極めて多様であり，真核生物の原始形質を残す生物群の集合であると考えられるようになった。真核生物の初期系統と形質の進化を考察する上で，エクスカベート類は極めて重要な位置を占めている。

エクスカベートの一群である Fornicata は典型的なミトコンドリアを欠くことから，ミトコンドリアの進化に関する重要な研究対象である。しかし，解析に使用できる生物種が絶対的に不足していることに加えて，既知の Fornicata のほとんどが寄生性で代謝の多くを宿主に依存しているために，自由生活性の生物に比して遺伝子の進化速度が速く，変異が蓄積されやすいことから，現在でも Fornicata の系統関係には不明な点が多い。この状態を克服するためには，寄生生活によるバイアスを排除できる自由生活性の種をできるだけ多く用いた解析が必要とされるが，嫌気環境に適応した種が多く，自然環境から単離，培養することが困難で，国内外を問わず培養株として確立されている種は極めて少ない。自由生活性 Fornicata 類の新規培養株を確立することは，それだけで真核生物の初期進化，多様化のプロセス，ミトコンドリアの進化という重要な課題に大きく貢献することになる。

本研究では，このような観点から，Fornicata に属する自由生活性のエクスカベートを自然環境に探索して，分離・培養を試みた。そして，新たに確立された培養株について，分子系統解析および細胞構造の解析を行い，結果をもとに，エクスカベート多様性研究の現状と課題について考察している。

鹿児島湾山川港（2005 年 3 月）および静岡県相模湾（2006 年 3 月）の底泥サンプルより細胞腹部に大きな溝を有する自由生活性・従属栄養性の原生生物を発見し，マイクロピペットを用いて一細胞ずつ単離し，培養株の確立を試みた。その結果，山川港から 2 株（NY0165，NY0166）の培養株を，相模湾からは 1 株（NY0173）の培養株を確立することに成功した。NY0165 は他の株に比べて後鞭毛の長さが短いが，それ以

外は，光学顕微鏡レベルの観察では，これら3株は互いによく似た形態形質をもっていた。3株は微好気条件下で生育し，バクテリアを捕食する栄養摂取を行った。腹側に大きな溝を持つことからエクスカベート類に属する原生生物であることが想定されたが，いずれも過去に記載のない原生生物と判断された。

3株の18SrDNA配列を決定し，分子系統解析（ML法・解析モデルはGTR+G+Iを選択）を行った。その結果，これらはすべてFornicataに含まれ，さらにFornicataの根元から分岐することが明らかとなった。特にNY0165はこれまで報告のあるどのFornicataよりも枝が短く，進化速度が遅いことがわかった。進化速度の遅いエクスカベートの培養株を確立することは国際的に求められていることであり，今後，これがFornicataを代表する株として使用されると思われる。

NY0165について，電子顕微鏡による微細構造観察を行った。細胞内にはゴルジ体やミトコンドリアは観察されなかった。一方で，エネルギー生産器官であると思われるハイドロジェノソーム様の細胞小器官がみられた。このことも本種がエクスカベートの一員であることを示している。様々な角度の細胞連続切片を作成することで，この鞭毛装置構造を詳細に観察し，立体構築を行った。鞭毛装置構造は2本の鞭毛の基底小体とそれに付随する4種類の微小管性鞭毛根，それらを架橋する3種類の繊維構造からなっていた。また前鞭毛の基底小体の根元付近から細胞後方に向かって放射状に伸びる多数の微小管が見られた。この鞭毛装置は，Fornicataだけでなくそれ以外の系統群に属するエクスカベート類とも高い共通性を持つことがわかった。微小管束に付随する繊維構造（B fiber）はエクスカベート類Fornicataの特徴と一致した。しかし，その他の微細構造からエクスカベートに属する既知種との類縁性は示されなかった。微細構造と分子系統解析の結果からこの生物をエクスカベート類Fornicataの新属・新種として扱い，*Dysnectes brevis*（Dysnectes：bad swimmer，brevis：short）と命名・記載した。*D. brevis*は，Fornicataのみならず既知のエクスカベート生物の一般的な構造を有しているが，どのエクスカベートとも近縁でなく，既知のエクスカベートの10グループに加えて，11番目のエクスカベート群として認識すべき生物と判断された。

NY0166とNY0173は互いに非常に近縁であることが分子データからも示され，同種と判断された。さらに，BLAST検索から，これらの18SrDNA配列が，国内外の様々な地域（相模湾，アメリカ・カリフォルニア湾，カナダ東岸ハリファクス）から取得された環境DNAの遺伝子配列と一致することも示された。このことから，自由遊泳性のエクスカベート類の認識がほとんど未知の領域であることが示された。これは，これらのFornicata類が様々な地域に普遍的に生息する原生生物であることを示している。未知の真核生物が多数存在することは，最近の環境DNAの研究から明らかになっており，これらのなかには未知のエクスカベートが含まれているものと思われる。今後新たな培養株が確立されることで，自然界におけるエクスカベートの多様性や分布，生態的役割が明らかにされていくと思われる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究の最も優れた点は，これまでほとんど成功していない自由遊泳性のエクスカベート類の培養を試み，3株を確立することに成功したことである。これらを用いた微細構造と分子系統解析から，エクスカベート類の新たなグループの存在が明らかにされた。また，2株については，BLAST検索の結果，環境DNA中に近縁のエクスカベート類が普遍的に存在することが明らかになった。これらは，エクスカベートの多様性の認識がまだ十分でないことを示している。特に自由遊泳性のエクスカベートの研究はまだ端緒についたばかりであり，今後の研究でさらに多くのグループの存在が明らかにされていくものと思われる。本研究は，エクスカベートの多様性の認識を一歩進めたもので，こうした研究が蓄積することで，ミトコンドリアの進化過程を含めて，真核生物の初期系統と初期の真核生物の形態や細胞機能が明らかになっていくものと思われる。本研究はこの重要な課題の一端を担ったものとして高く評価できる。

よって，著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。