

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2005～2008

課題番号：17370029

研究課題名（和文）エクスカベート類の微細構造・分子形質比較解析による初期真核生物像の探究

研究課題名（英文）Search for the view of early eukaryotes based on the comparisons of ultrastructural and molecular characters of excavates

研究代表者

井上 勲（INOUE ISAO）

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：70168433

研究成果の概要：

自然界より多数のエクスカベート、新規分類群を含むさまざまなプロティストを単離し、培養株を作成した。作成株を含む多様なプロティストに関して分子系統・微細構造解析を行った結果、エクスカベート類はさまざまな特徴（特に鞭毛根系）を共有するものの、その単系統性は支持されなかった。詳細な比較検討から、このようなエクスカベートの微細構造的特徴は、部分的にさまざまな真核生物にも見られることが判明した。このことはエクスカベートに見られる共通性が多くの真核生物の共通祖先に起因するものであることを示唆しており、原始真核生物はエクスカベート様の細胞構造をもった捕食性鞭毛虫であったと考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2005 年度	6,600,000	0	6,600,000
2006 年度	3,200,000	0	3,200,000
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
総 計	13,800,000	1,200,000	15,000,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：エクスカベート、系統分類、微細構造、分子系統

1. 研究開始当初の背景

真核生物の多様性の大部分を占めるのは原生生物（プロチスタ）であり、多細胞動物や陸上植物はその系統的多様性のごく一部にすぎない。したがって、真核生物の進化と系統の理解には、プロチスタの理解が前提になるが、その系統的多様性については未知の部分が多い。プロチスタの中に、細胞腹面に大きな“捕食口”をもつという特徴を有するエクスカベート類がある。エクスカベート類の間には微細構造上の類似点が多いが、ミトコ

ンドリアの有無や退化程度、クリステの形態などは極めて多様である。またエクスカベート類の1種のミトコンドリアゲノムが、真核生物の中で最も原始的（原核生物的）であることも明らかとなっている。さらに、形態の類似にもかかわらず、分子系統はエクスカベート類が単系統群ではないことを示唆している（図参照、赤矢印がエクスカベート）。このことは、エクスカベート類に共通に見られる細胞形態や分裂、運動の諸性質が、真核生物の共通祖先に起因する共有原始形質で

ある可能性を示している。したがって、エクスカバートと他の原生生物を比較解析することで初期の真核生物の細胞の特性を推定できる可能性が高い。**エクスカバートは真核生物の系統を理解するための鍵となる生物群である。**

2. 研究の目的

以上を背景に、本研究では分子系統解析によるエクスカバート類各群の系統上の位置を明らかにするとともに、日本ではじめてエクスカバートを自然界より採集、培養し、捕食様式、細胞微細構造、分裂様式を調査する。これらの比較解析から原始真核生物のもつ細胞特性を明らかにする。

3. 研究の方法

1) **エクスカバート類を中心としたプロティストのカルチャーコレクションを確立する**
自然環境からエクスカバート類を中心とした鞭毛虫および鞭毛藻の採集し、株確立を行う。特にエクスカバート類には嫌気的環境に生育するものが多いため、そのような環境からの単離、株確立を重視する。重要株については国立環境研究所のバイオリソースセンターに寄託する。

2) **エクスカバート類を中心としたプロティストの系統的位置づけ**
エクスカバート類を中心とした鞭毛虫・鞭毛藻において rRNA, actin, tubulin, EF-1 α , HSP70 等の遺伝子を単離、分子系統解析を行う。またデータベース検索によって利用可能と判断される遺伝子の解析結果を総合評価し、真核生物全体の系統およびそこのエクスカバート類の位置づけを検討する。

3) **エクスカバート類を中心としたプロティストの細胞構造の解析**
本研究で確立した株や株保存施設のある株を用いて、エクスカバート類および鞭毛虫・鞭毛藻数種の微細構造解析を行う。特に連続切片の観察から鞭毛装置を中心とした細胞微細構造の三次元立体構築をめざす。また微細構造と捕食様式など運動様式との関連性を検討する。

4) 総合考察

以上の結果から、エクスカバート類を鍵として真核生物全体の進化、特に真核生物の初期像について考察する。

4. 研究成果

海洋および淡水域からさまざまな鞭毛虫および微細藻類を採集し、多数の培養株を確立した。重要と思われる株については国立環境研究所のバイオリソースセンターに寄託した。

この研究を通して多数の新規プロティストを発見した。例えば不等毛植物の新綱であ

る *Aurearena*, 円石藻に近縁と思われる鞭毛ハプト藻 *Chrysoculter*, 珪酸質の鱗をもったハプト藻 *Hyalolithus*, プラシノ藻やヌクレアリア (オピストコンタ) の新種等である。これらの発見・研究は真核生物各グループでの進化の理解に大きく貢献した。またエクスカバートにおいても新属新種 *Dysnectes brevis* を含むフォルニカータ類の新期株複数 (おそらく複数の新綱レベル), 盤状クリステ類+ジャコバ類に近縁な新奇株

TKB055 (おそらく新門レベル) を確立した。これらを含めてさまざまなプロティストの分子系統および微細構造解析を行った。

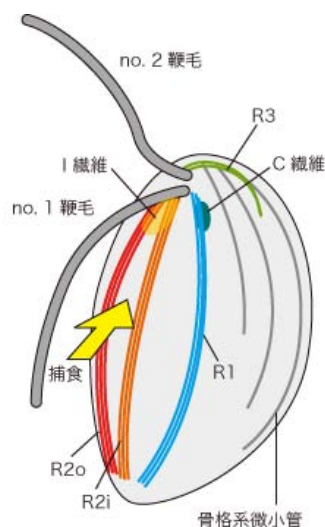
本研究で得られた情報も含めて真核生物全体の分子系統解析を行ったところ、エクスカバート類には少なくとも4つのグループが存在することが明らかとなった (盤状クリステ類+ジャコバ類, パラバサリア+フォルニカータ, マラウイモナス, アナエロモナス類)。これら4系統群の単系統性は強く支持されたが、エクスカバート全体の単系統性は再現されず、むしろ多系統群であることが示唆された。*Dysnectes* を含むいくつかの株はフォルニカータ (ディプロモナス類+レトルタモナス類) の初期分岐群であることが示された。また TKB055 は盤状クリステ類 (ユーグレノゾア+ペルコロゾア) やジャコバ類に近縁であるが、明確にはどちらにも含まれない新規エクスカバートであることが判明した。

いくつかのエクスカバート (TKB055, フォルニカータ, ペルコロゾ) およびストラメノパイル, ハプト植物, アプソゾア, 緑色植物等の微細構造, 特に鞭毛装置構造について調査した。また詳細な比較検討から, これまでアマーボゾア (粘菌) およびユーグレノゾアの鞭毛および鞭毛根のナンバリングに関しては誤った解釈がされていたことが判明した。それを考慮して検討した結果, 真核生物の多くのグループ (オピストコンタを除く全ての真核生物) で共通する以下のような微細構造的特徴が判明した (図参照)。

- ・ 前方へ伸びる no. 2 鞭毛 (分裂時に新生される鞭毛) と後方へ伸びる no. 1 鞭毛 (母細胞から受け継ぐ鞭毛)
- ・ no. 1 基底小体から腹面左側を後方へ伸びる R1。ときに R1 基部に層状構造 (C 繊維) が付随する (エクスカバート, 緑色植物, ユーグレナ藻, 渦鞭毛藻, アマーボゾア?)
- ・ no. 1 基底小体から腹面右側を後方へ伸びる R2。ときに R2 は 2 つに分かれ (R2i, R2o), そこで捕食 (エクスカバート, ストラメノパイル, アプソゾア, コロディクティオン類?) または R2 に捕食装置が関与 (ユーグレノゾア, 渦鞭毛藻?)。R2

基部腹面にはときにI繊維が存在（エクスカベート、ストラメノパイル、リザリア）

- no. 2 基底小体から生じて時計回りに配行する R3。R3 には MTOC が付随し、しばしば細胞骨格系微小管の基点となる（エクスカベート、ストラメノパイル、渦鞭毛藻、コロディクティオン類、アメーボゾア）。



仮想的原始真核生物の細胞構造

分子系統解析を考え合わせると、このような複雑な構造の共通性は、これら真核生物の共通祖先がもっていたものであり、それがさまざまな系統群に残されていると考えることができる。つまりほとんどの真核生物の共通祖先は複雑な鞭毛根系とそれに関与した腹面の捕食装置をもった従属栄養性鞭毛虫であったと推察できる。エクスカベート類はこのような真核生物の原始形質をほとんど保持している生物群であり、このような形質によって定義されるエクスカベートという生物群が単系統群である必然性はないものと思われる。ただしこの検証のためには鞭毛根系の構成タンパク質等の相同性の確認などが必要である。また真核生物を構成する大系統群の中でオピストコンタ（菌類、多細胞動物など）のみは上記のような形質を示さないことから、真核生物の中で最も初期に（上記のような形質を獲得する前に）分化した可能性と、上記のような原始形から二次的に単純化した可能性がある。これらについては今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 26 件）

1. M Yoshida, T Nakayama, I Inouye *Nuclearia*

thermophila sp. nov. (Nucleariidae), a new nucleariid species isolated from Yunoko Lake in Nikko (Japan). *European Journal of Protistology* in press (2009) 査読有

2. Y Inagaki, Y Nakajima, M Sato, M Sakaguchi, and T Hashimoto. Gene sampling can bias multi-gene phylogenetic inferences: the relationship between red algae and green plants as a case study. *Mol. Biol. Evol.* 26: 1171-1178. (2009) 査読有
3. M Sakaguchi, K Takishita, T Matsumoto, T Hashimoto, & Y Inagaki. Tracing back EFL gene evolution in the cryptomonads –haptophytes assemblage: Separate origins of EFL genes in haptophytes, photosynthetic cryptomonads, and goniomonads. *Gene* 441: 126-131. (2009) 査読有
4. Yubuki N, Nakayama T, & Inouye I. A unique life cycle and perennation in a colorless chrysophyte *Spumella* sp. *Journal of Phycology* 44: 164-172. (2008) 査読有
5. K Takishita, M Kawachi, M-H Noël, T Matsumoto, N Kakizoe, M M Watanabe, I Inouye, K Ishida, T Hashimoto & Y Inagaki. Origins of plastids and glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase genes in the green-colored dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Gene* 410: 26-36. (2008) 査読有
6. T Makiuchia, T Annouraa, T Hashimoto, E Murata, T Aokia & T Nara, Evolutionary analysis of synteny and gene fusion for pyrimidine biosynthetic enzymes in Euglenozoa: an extraordinary gap between Kinetoplastids and Diplonemids. *Protist* 159: 459-470 (2008) 査読有
7. Y Nishimoto, N Arisuec, S Kawai, AA Escalante, T Horii, K Tanabe, T Hashimoto. Evolution and phylogeny of the heterogeneous cytosolic SSU rRNA genes in the genus *Plasmodium*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 47: 45-53. (2008) 査読有
8. A Kai, Y Yoshii, T Nakayama & I Inouye. Aurearenophyceae classis nova, a new class of Heterokontophyta based on a new marine unicellular alga *Aurearena cruciata* gen. et sp. nov. inhabiting sandy beaches. *Protist* 159: 435-457 (2008) 査読有
9. 橋本哲男, 有末伸子, 坂口美亜子, 稲垣祐司. 複数遺伝子の結合データに基づく分子系統樹の推測 —真核生物の大系統の解析を例として—. *統計数理* 56: 145-164. (2008) 査読無
10. Nakayama T, Suda S, Kawachi M, Inouye I. Phylogeny and ultrastructure of *Nephroselmis* and *Pseudoscourfieldia* (Chlorophyta),

- including the description of *Nephroselmis anterostigmatica* sp. nov. *Phycologia* 46: 680-697. (2007) 査読有
11. Yubuki, N., Inagaki, Y., Nakayama, T. & Inouye, I. Ultrastructure and Ribosomal RNA Phylogeny of the Free-Living Heterotrophic Flagellate *Dysnectes brevis* n. gen., n. sp., a New Member of the Fornicata.. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54: 191-200. (2007) 査読有
 12. T Makiuchi, T Nara, T Annoura, T Hashimoto & T Aoki. Occurrence of multiple, independent gene fusion events for the fifth and sixth enzymes of pyrimidine biosynthesis in different eukaryotic groups. *Gene* 394: 78-86. (2007) 査読有
 13. M Sakaguchi, Y Inagaki, T Hashimoto. Centrohelida is still searching for phylogenetic home: molecular data analyses of seven Raphidiophrys contractilis genes. *Gene* 405: 47-54. (2007) 査読有
 14. Yoshikawa H, Wu Z, Howe J, Hashimoto T, Geok-Choo N, Tan KS.. Ultrastructural and phylogenetic studies on *Blastocystis* isolates from cockroaches. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54: 33-37. (2007) 査読有
 15. K Tanabe, A Escalante, N Sakihama, M Honda, N Arisue, T Horii, R Culleton, T Hayakawa, T Hashimoto, S Longacre, S Pathirana, S Handunnetti & H Kishino. Recent independent evolution of msp1 polymorphism in *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 156: 74-79. (2007) 査読有
 16. Yoshida, M., Noel, M-H., Nakayama, T. & Inouye, I. A haptophyte bearing siliceous scales: ultrastructure and phylogenetic position of *Hyalolithus neolepis* gen. et sp. nov. (Prymnesiophyceae, Haptophyta). *Protist* 157: 213-234. (2006) 査読有
 17. Watanabe S, Mitsui M, Nakayama T & Isao Inouye. Phylogenetic relationships and taxonomy of sarcinoid green algae: *Chlorosarcinopsis*, *Desmotetra*, *Sarcino-chlamys* gen. nov., *Neochlorosarcina*, and *Chlorosphaeropsis* (Chlorophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology* 42: 679-695. (2006) 査読有
 18. Okamoto, N. & Inouye, I. *Hatena arenicola* gen. et sp. nov., a katablepharid undergoing probable plastid acquisition. *Protist* 157: 401-419. (2006) 査読有
 19. 井上 勲. シアノバクテリアが歩んだ道ー真核光合成生物の進化と多様化ー. 遺伝 60: 15-20. (2006) 査読無
 20. 岡本典子・井上 勲. 二次共生による植物の多様化. 化学と生物 44: 785-789. (2006) 査読無
 21. Okamoto N & Inouye I. The katablepharids are a distant sister group of the Cryptophyta: A proposal for Katablepharidophyta divisio nova/Kathablepharida phylum novum based on SSU rDNA and beta-tubulin phylogeny. *Protist* 156: 163-179. (2005) 査読有
 22. Okamoto N & Inouye I. A secondary symbiosis in progress?. *Science* 310: 287-287. (2005) 査読有
 23. M Sakaguchi, T Nakayama, T Hashimoto, I Inouye. Phylogeny of the centrohelida inferred from SSU rRNA, tubulins, and actin genes. *J. Mol. Evol.* 61: 765-775 (2005) 査読有
 24. T. Suzuki, T. Hashimoto, Y. Yabu, P.A. Majiwa, S. Ohshima, M. Suzuki, S. Lu, M. Hato, Y. Kido, K. Sakamoto, K. Nakamura, K. Kita and N. Ohta, Alternative oxidase (AOX) genes of African trypanosomes: phylogeny and evolution of AOX and plastid terminal oxidase families, *J. Eukaryot. Microbiol.* 52: 374-381. (2005) 査読有
 25. Y Yoshii, S Takaichi, T Maoka, S Suda, H Sekiguchi, T Nakayama & I Inouye. Variation of siphonaxanthin series among the genus *Nephroselmis* (Prasinophyceae, Chlorophyta), including a novel primary methoxy carotenoid. *J. Phycol.* 41: 827-34. (2005) 査読有
 26. T. Nakayama, M. Yoshida, M.-H. Noël, M. Kawachi & I. Inouye. Ultrastructure and phylogenetic position of *Chrysoculter rhomboideus* gen. et sp. nov. (Prymnesiophyceae), a new flagellate haptophyte from Japanese coastal waters, *Phycologia* 44: 369-383 (2005) 査読有
- 〔学会発表〕(計 17 件)
1. 篠崎文彦・中山剛・矢吹彬憲・井上勲. ペディノ藻綱(緑藻植物門)の系統. 日本藻類学会第33回大会. 琉球大学. 2009.3.28
 2. 中山剛・佐藤真由美・山口晴代・井上勲: 新規ビコソエカ類 *Gyroflagellum natans* の微細構造と系統. 日本藻類学会第32回大会. 東京海洋大学. 2008.3.22
 3. 千國友子・中山剛・井上勲. 6種の遺伝子を用いたプラシノ藻の分子系統解析. 日本藻類学会第32回大会. 東京海洋大学. 2008.3.22
 4. 井上勲. 1 + 1 = 1 : 植物になる進化. 日本進化学会第9回大会. 京都大学. 2007.9.1
 5. 中山剛・河地正伸・井上勲. 新規ディクティオカ藻 *Florenciella uniflagellata* の分類とディクティオカ藻の進化. 日本藻類学会第31回大会. 神戸大学. 2007.3.25
- [他 12 件]
- 〔図書〕(計 2 件)
1. 井上 勲. 藻類 30 億年の自然史ー藻類から

みる生物進化. 東海大学出版会. 472 pp.
(2006/第二版 2007)

2. 宮道慎二・奥田 徹・井上 勲・後藤俊幸
(編) 微生物の世界. 筑波出版会. 213 pp.
(2006)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 勲 (INOUE ISAO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号：70168433

(2) 研究分担者

橋本 哲男 (HASHIMOTO TESTSUO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号：50208451

中山 剛 (NAKAYAMA TAKESHI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・講師
研究者番号：40302369