

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570219

研究課題名(和文) フォルニケータ生物群の分子系統進化

研究課題名(英文) Molecular Phylogeny of Fornicata

研究代表者

橋本 哲男 (HASHIMOTO TETSUO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50208451

研究成果の概要(和文)：典型的なミトコンドリアをもたないもののみから構成される鞭毛虫の分類群であるフォルニケータの系統関係を明らかにすることを目的として、自由生活性のフォルニケータ生物を対象に系統マーカー遺伝子の配列解析を行い、既存のデータを含めて複数遺伝子分子系統解析を実施した。その結果、フォルニケータ生物群内部の系統関係を明確にすることができ、ミトコンドリア関連オルガネラの進化を研究するための基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：To infer a robust phylogenetic tree of the group Fornicata, which comprises exclusively of amitochondriate flagellates, we sequenced several phylogenetic marker genes from free-living Fornicata organisms, and underwent multi-gene phylogeny. The tree finally obtained robustly reconstructed the relationships among subgroups of Fornicata. The tree could be a backbone for evolutionary comparison analyses of the mitochondrion-related organelles in Fornicata.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：分子進化学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：系統進化、真核生物、複数遺伝子分子系統解析、フォルニケータ、カルペディエモナス様生物、ミトコンドリア関連オルガネラ、*Dysnectes brevis*、*Giardia intestinalis*

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物のスーパーグループの1つであるエクスカベータに属するフォルニケータ生物群は、典型的なミトコンドリアをもたず、嫌気・微好気性で寄生性もしくは自由生活性

の鞭毛虫から構成される。そのサブグループとして、ディプロモナス、レトルタモナス、および暫定的なグループ「カルペディエモナス様生物 (*Carpediemonas*-like organisms, CLOs) の存在が知られている。研究開始当

初は、主として光学顕微鏡レベルの比較形態解析からフォルニケータ生物群の多様性の一端が明らかとなり、SSUrRNAに基づく分子系統解析によりそれまでに知られていたフォルニケータ生物群の系統樹が公表されたという段階にあった。しかしながらSSUrRNAの系統樹はCLOsにいくつかの単系統群が存在することを示唆しただけのものであり、それらの間の関係やディプロモナス、レトルタモナスとの関係については全く解像度がなく、フォルニケータの系統関係は不明なままであった。

これまで微細構造が調べられたフォルニケータ生物には、いずれもミトコンドリアに関連すると考えられるオルガネラが見つかっている。それらの中でも腸管寄生虫であり医学的重要性から研究が進んでいる *Giardia intestinalis* (ディプロモナス) に関しては、マイトソームと名付けられたオルガネラが存在し、それが退化型ミトコンドリアであることが示されている。したがってフォルニケータ生物群はミトコンドリアおよびその関連オルガネラの進化(退化)プロセスを解明するためのモデル系として適切であると考えられる。しかしながら、進化学的比較の基盤となる系統樹が存在しておらず、信頼できる系統樹の構築が急務であった。

## 2. 研究の目的

フォルニケータ生物群の系統関係を明確にし、ミトコンドリア関連オルガネラの進化研究を推進するための基盤構築を行うことを目的とした。そのため、研究室で培養株を保持している4つのフォルニケータ生物について、系統解析用のマーカー遺伝子を複数単離・配列解析し、データベース配列および他の研究グループから報告される配列を含めて、複数遺伝子分子系統解析を行うこととした。

## 3. 研究の方法

先行研究によってCLOsに形態的に類似していることが明らかとなった、*Dysnectes brevis*, *Kipferlia bialata* (NY0166株およびNY0173株)、および未記載NY0171株を対象に、チューブリン $\alpha$ ,  $\beta$ 鎖、細胞質型HSP70, HSP90、およびペプチド鎖伸長因子EF1 $\alpha$ , EF2で配列データ未知のものについての遺伝子解析を行なった。これらデータをもとに、共同研究を行っている、海洋研究開発機構やカナダ・ダルハウジー大学のグループが遺伝子解析した他の生物種や未記載株のデータも含めて、さまざまなデータセットに対して複数遺伝子分子系統解析を行った。解析はRAxMLプログラムを用いて最尤法で行った。置換モデルや複数遺伝子の結合法に関するモデルを最適化し、内部枝の信頼性の評価にはブートストラップ値を用いて行った。

## 4. 研究成果

適度なタクサ数と遺伝子数を保持したうえで解析が可能である、5遺伝子結合データの分離モデルによる解析結果を以下に示す。用いた遺伝子は、SSUrRNA、EF1 $\alpha$ 、チューブリン $\alpha$ ,  $\beta$ 鎖、HSP90の5つである。

図より明らかのように、一部分を除き解像度の高い解析結果を得ることができた。まずフォルニケータの単系統性が明確に示された。またCL1~CL6はSSUrRNAの解析で判明したCLOsのグループであるが、それらの相互関係の一部についても明らかにできた。とくに今回の解析結果で重要な点は、*Dysnectes brevis*がディプロモナス/レトルタモナスに最も近縁で、その外側に*Kipferlia bialata*や従来レトルタモナス類に分類されていた*Chilomastix caulleryi*が、さらにその外側に他のCLOsが位置づけられるという点である。CLOsの中では*Dysnectes*

*brevis*が *Giardia intestinalis* に最も近縁であることが明らかになり、*D. brevis* にもミトコンドリア関連と考えられるオルガネラが存在するので、今後これら生物の比較解析により、ミトコンドリア関連オルガネラの進化に関わる新知見が得られることが期待される。

一方、本研究を遂行するにあたり、複数遺伝子のデータ解析を行う際のさまざまな方法論の問題点が明らかになったため、それらを克服して信頼性におけるデータ解析を実現するための方策についても具体的な検討を行った。

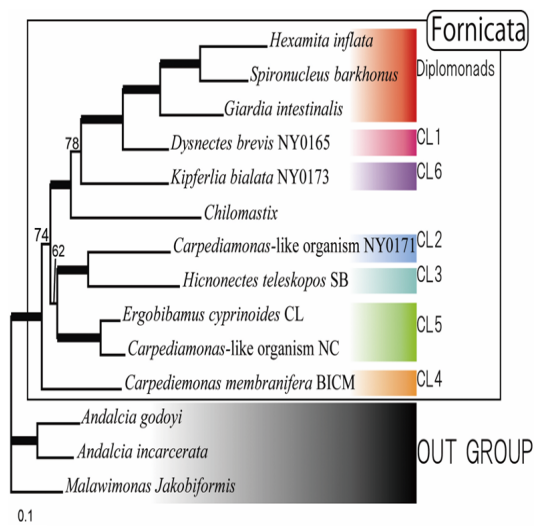


図. フォルニケータの最尤系統樹.

1502 アミノ酸ポジション+914 塩基ポジション、22 生物種の 5 遺伝子( $\alpha$ -tubulin,  $\beta$ -tubulin, EF1 $\alpha$ , HSP90, SSUrRNA) 配列に基づいて解析を行った。RAxML による最尤系統樹の推測、ブートストラップ解析ともに分離モデルを使用しそれぞれ $\alpha$ -tubulin, と $\beta$ -tubulin は LG+ $\Gamma$ +F モデル、EF1 $\alpha$  は LG+I+ $\Gamma$ モデル、HSP90 は LG+I+ $\Gamma$ +F モデル、SSUrRNA は GTR+I+ $\Gamma$ モデルを使用した。各分岐に示す値はブートストラップ値。太線は BP=100 を表す。60 以下の BP 値は省略した。

## 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 9 件)

- ① Kamikawa R, Inagaki Y, Roger AJ, Hashimoto T. 2011. Splintrons in *Giardia intestinalis*: Spliceosomal introns in a split form. Communicative and Integrative Biology in press (査読無).
- ② Kamikawa R, Inagaki Y, Tokoro M, Roger AJ, Hashimoto T. 2011. Split introns in the genome of a divergent eukaryote *Giardia intestinalis* are excised by spliceosome-mediated trans-splicing. Current Biology 21(4): 311-315 (査読有).
- ③ Ishida K\*, Inagaki Y\*, Sakaguchi M, Oiwa A, Kai A, Suzuki M, Nakayama T, Chikuni T, Yabuki A, Yamaguchi H, Yubuki N, Yoshida M, Nakayama T, Inouye I, Hashimoto T. 2010. Comprehensive SSU rRNA phylogeny of Eukaryota. 【\*Joint 1st authors】 Journal of Endocytobiosis and Cell Research 20:81-88 (査読有).
- ④ Kolisko M, Silberman JD, Cepicka I, Yubuki N, Takishita K, Yabuki A, Leander BS, Inouye I, Inagaki Y, Roger AJ, Simpson AGB. 2010. A wide diversity of previously undetected relatives of diplomonads isolated from marine/saline habitats. Environmental Microbiology 12(19):2700-2710 (査読有).
- ⑤ Mitsui H, Arisue N, Sakihama N, Inagaki Y, Horii T, Hasegawa M, Tanabe K, Hashimoto T. 2010. Phylogeny of Asian primate malaria parasites inferred from apicoplast genome-encoded genes with special emphasis on the positions of *Plasmodium vivax* and *P. fraglie*. Gene 450(1):32-38 (査読有).

⑥ Inagaki Y, Nakajima Y, Sato M, Sakaguchi M, Hashimoto T. 2009. Gene sampling can bias multi-gene phylogenetic inferences: the relationship between red algae and green plants as the case study. *Molecular Biology and Evolution* 26(5):1171-1178 (査読有).

⑦ 橋本哲男, 有末伸子, 坂口美亜子, 稲垣祐司. 2008. 複数遺伝子の連結データに基づく分子系統樹の推定 - 真核生物の大系統の解析を例として. *統計数理* 56:145-164 (査読有).

[学会発表] (計 12 件)

① 神川龍馬、稲垣祐司、Andrew J Roger、橋本哲男. 寄生性真核微生物Giardiaの縮退ゲノムにおける複雑な遺伝子発現. Jun 11-12, 2011 (富山・富山・富山大学) 第5回日本進化原生生物学研究会

② Ryoma Kamikawa, Yuji Inagaki, Masaharu Tokoro, Andrew J. Roger, Tetsuo Hashimoto. Trans-splicing in the intron-poor eukaryotic parasite *Giardia intestinalis*. Dec. 7-8, 2010 (茨城・つくば・国際会議場) 2010 Memorial Symposium for the 26th International Prize for Biology.

③ Ryoma Kamikawa, Yuji Inagaki, Masaharu Tokoro, Andrew J. Roger, Tetsuo Hashimoto. Spliceosome-mediated trans-splicing produces the complete mRNA for heat shock protein 90 in *Giardia intestinalis*. Jul. 2-7, 2010 (石川・金沢・県立美術館) 2010 ISEP XVIII.

④ 稲垣祐司、辻美和子、Laurent Choy、佐藤三久、橋本哲男. 202 万樹形に対する網羅的探索結果に基づく発見的樹形探索法の効率評価. Sep. 2-4, 2010 (北海道・札幌・

北海道大) 第 11 回日本進化学会.

⑤ 小松崎洋志、稲垣祐司、瀧下清貴、古我友樹、矢吹彬憲、松本拓也、神川龍馬、雪吹直史、Martin Kolisko、Alastair Simpson、Andrew Roger、橋本哲男. 複数遺伝子解析による Fornicata 生物群の系統進化の解明. Sep. 2-4, 2010 (北海道・札幌・北海道大) 第 11 回日本進化学会.

⑥ 小松崎洋志、稲垣祐司、瀧下清貴、古我友樹、矢吹彬憲、松本拓也、神川龍馬、雪吹直史、Martin Kolisko、Alastair Simpson、Andrew Roger、橋本哲男. 複数遺伝子解析による Fornicata 生物群の系統進化の解明. Jul. 4-5, 2009 (宮城・仙台・宮城教育大) 第 4 回日本進化原生生物学研究会.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 哲男 (HASHIMOTO TETSUO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号 : 50208451

### (3) 連携研究者

稲垣 祐司 (INAGAKI YUJI)

筑波大学・計算科学研究センター・准教授

研究者番号 : 50387958