様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２５年５月３０日現在

機関番号：12102
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2008～2012
課題番号：20570082
研究課題名（和文）　クリプト藻プラギオセルミス系統群の多様性と進化

研究課題名（英文）　Diversity and evolution of *Plagioselmis*-clade (Cryptophyceae)

研究代表者
中山　剛（NAKAYAMA TAKESHI）
筑波大学・生命環境系・講師
研究者番号：40302369

研究成果の概要（和文）：日本各地の沿岸域サンプルより、形態的に *Plagioselmis* sp.および *Teleaulax* sp. と同定できるプラギオセルミス系統群のクリプト藻の培養株を多数得ることができた。これらの株は ITS を含む rDNA の塩基配列ではほとんど差異が存在せず、また *Teleaulax* sp. 株が *Plagioselmis* sp.に遷移したことが確認されたことから、日本沿岸域に普遍的なプラギオセルミス系統群は、生活環によって形態が異なるただ１種であると考えられる。またクリプト藻全体の系統解析からは、プラギオセルミス系統群を含むゲミニゲラ科が祖先的な側系統群であることが示唆され，クリプト藻の進化について重要な初めて知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：Many strains that could be identified as *Plagioselmis* sp. and *Teleaulax* sp. based on morphological characters were isolated from various coastal waters of Japan. Because rDNA sequences including ITS of these strains were nearly identical and the cells of a strain of *Teleaulax* sp. transferred to those of *Plagioselmis* sp., only one species of *Plagioselmis*-clade that possessed life cycle composed of *Plagioselmis* sp. stage and *Teleaulax* sp. stage was common in Japanese coastal waters. In addition, the phylogenetic analysis suggested that the family Geminigeraceae (including *Plagioselmis*-clade) was ancestral paraphyletic group in the Cryptophyceae. This finding provided various insights to consider the evolution of the Cryptophyceae.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総　計	3,000,000	900,000	3,9000,000

研究分野：原生生物系統分類
科研費の分科・細目：生物多様性・分類
キーワード：分類体系、系統、進化、クリプト藻

１．研究開始当初の背景

クリプト藻は共生体（紅色植物）の核をヌクレオモルフという形で残している、葉緑体２次共生起源の生きた証拠として著名である。さらにクリプト藻自身が取り込まれ、一時的な葉緑体（盗葉緑体）として機能している例が渦鞭毛藻や繊毛虫で多く知られている。また一般的にはあまり認識されていないようだが、クリプト藻は淡水・海水域を問わず通常の水圏には極めて普遍的な存在であり、特に貧栄養、深水、冷水では優占していることが多く、生態的に重要な地位を占め

ている（e.g. Spaulding et al. 1994）。

このような進化生物学的、生態学的な重要性にもかかわらず、クリプト藻の分類学的基盤は極めて貧弱である。光学顕微鏡レベルでの分類学的研究は古くから存在するが、微小であることや固定によって細胞が破壊されやすいなどの理由から、他の藻類群にくらべて研究例が少ない。特に海産種に関してはButcher (1967)のみであるといってよい。その後、Hill らによって微細構造学的形質を用いたクリプト藻の整理が行われ、属レベルの分類が一新された（e.g. Hill & Wetherbee 1986, 1989; Hill 1991）。この新たな分類体系はある点を除いて（後述）分子系統学的研究からも支持されており（Dean et al. 2002; Hoef-Emden et al. 2002）、クリプト藻の分類の基準となるべきものである。しかし古典的な分類学的研究が貧弱なことから、これをもとにした種レベルの分類がほとんど進んでいないのが現状である。唯一、淡水産の *Cryptomonas*（*Campylomonas, Chilomonas* を含む）に関しては、Hoef-Emden らによって形態・分子形質をもとにした総括的な研究がなされているが（Hoef-Emden 2005; Hoef-Emden & Melkonian 2003）、海産属に関しては皆無である。

さらにクリプト藻の系統分類には、形態と分子の興味深い不一致がみられる。分子系統解析からはクリプト藻に８つの系統群が存在していることが示されているが、その系統群の多くには複数の属が混ざり合った状態で存在する。これは属の分類に一部不備があることを示しているが、興味深いことに混在している属は基本的には互いによく類似しており、ペリプラスト(クリプト藻特有の細胞外被)の特徴（屋根瓦状 vs シート状）のみが異なっている。クリプト藻 *Proteomonas* ではシート状ペリプラストをもった複相細胞と屋根瓦状ペリプラスとをもった単相細胞が存在することが知られており(Hill & Wetherbee 1986)、このことから類推して私は系統群内で混在している属は同じ生物群の複相と単相世代を示していると考えている。この仮説は *Cryptomonas* では確かめられているが（Hoef-Emden & Melkonian 2003）、他の系統群では調べられていない。もしこれが事実であれば、クリプト藻は種(または株)によって単相世代と複相世代のどちらかが主要な世代になっているという極めて興味深い生物群であるということになる。

また前述のように分子系統解析からクリプト藻内には８つの系統群の存在が知られるようになったが、それぞれの系統群間の関係についてはいまだ明らかではない。そのためクリプト藻における光合成補助色素（フィコビリン）の進化や前述のペリプラストの進化に関して考察するための基盤が不十分である。さらにこのことはクリプト藻綱内の分類体系の評価が困難なことにもつながっている。

クリプト藻の中で、*Plagioselmis* と *Teleaulax* は *Geminigera* とともにクリプト藻の中で１つの系統群を形成している。私の予備的な調査では、*Plagioselmis* と *Teleaulax* は沿岸域プランクトンとして、最もふつうに見られるクリプト藻であった。これまでの数少ない報告から、世界中でもこのことは同様だと思われる。このような普遍性にもかかわらず、*Plagioselmis* と *Teleaulax* に関する分類学的研究はほとんど無く、わずか数種が記載されているに過ぎない（Butcher 1967; Hill & Wetherbee 1989）。また私が行った研究も含めて分子系統解析（Takahashi et al. 2005）からは、両属が同じ系統群の単相世代と複相世代であることが示唆されるが、このことは確かめられていない。

分子系統学的研究から、赤潮形成繊毛虫として著名な *Myrionecta rubra* (= *Mesodinium rubrum*) や、貝毒生成渦鞭毛藻として水産上重要な *Dinophysis* spp. の葉緑体様構造が *Plagioselmis-Teleaulax* complex に起源をもつことが示されている(e.g. Takahashi et al. 2005)。現在では *Myrionecta* と *Teleaulax* の二員培養が可能であり、*Myrionecta* が取り込んだ *Teleaulax* を盗葉緑体として利用していることが示されている（Gustafson et al. 2000）。さらに近年、*Dinophysis* は直接 *Teleaulax* を取り込むのではなく、*Myrionecta* を介して取り込んで利用していることが報告された（Park et al. 2006）。また興味深いことに、*Dinophysis* などの盗葉緑体には遺伝的多様性が存在することが示唆されている。しかし *Plagioselmis-Teleaulax* complex の分類ができていないため、取り込まれているクリプト藻の同定が極めて不完全である。

２．研究の目的

クリプト藻の中で、*Plagioselmis* と *Teleaulax* は *Geminigera* とともにクリプト藻の中で１つの系統群を形成している。私の予備的な調査では、*Plagioselmis* と *Teleaulax* は沿岸域プランクトンとして、最もふつうに見られるクリプト藻であった。これまでの数少ない報告から、世界中でもこのことは同様だと思われる。このような普遍性にもかかわらず、*Plagioselmis* と *Teleaulax* に関する分類学的研究はほとんど無く、わずか数種が記載されているに過ぎない（Butcher 1967; Hill & Wetherbee 1989）。また私が行った研究も含めて分子系統解析（Takahashi et al. 2005）からは、両属が同じ系統群の単相世代と複相世代である

ことが示唆されるが、このことは確かめられていない。

３．研究の方法

(1) 採集・株確立

日本各地（東京湾、瀬戸内海、九州沿岸等）からプラギオセルミス系統群を中心にクリプト藻を採取し、マイクロピペット法により株を確立する。

(2) 光学・電子顕微鏡観察

通常の光学顕微鏡観察により確立株の形態形質を把握する。特に *Plagioselmis-Teleaulax* 系統群における細胞相の推移に注目する。光学顕微鏡観察および後述の分子系統解析の結果も参照にして株を選択し、いくつかの株について透過型電子顕微鏡観察を行う。特にペリプラストの形態については重要視しており、Hoef-Emden & Melkonian (2003) の方法を用いる。

(3) 分子系統解析

確立株から DNA を抽出し、rDNA（18S, ITS, 28S）を増幅、塩基配列決定を行う。系統解析により、*Plagioselmis-Teleaulax* 系統群内の大まかな枠組み・種構成を把握する。同時に、同じ情報を用いてクリプト藻全体の系統関係、特に現在認識されている系統群間の関係について解析を行う。

４．研究成果

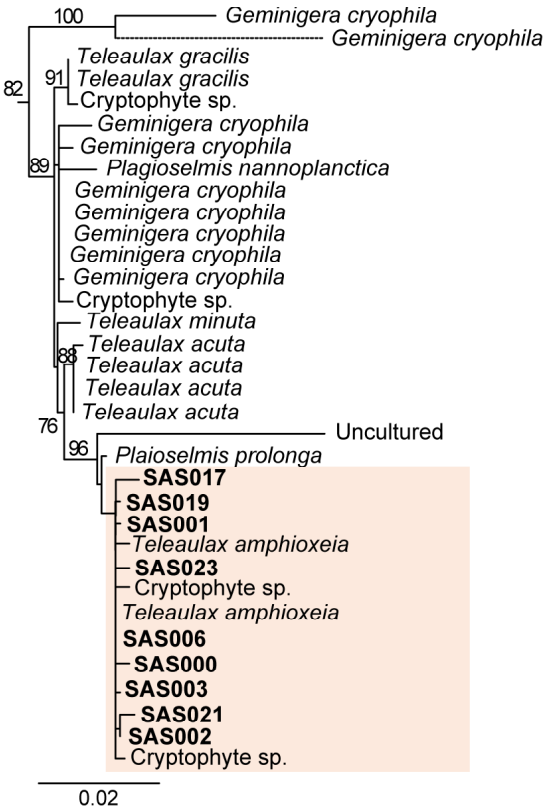

図１．プラギオセルミス系統群の 18S rDNA 系統樹（太字は本研究の株）

東京湾、瀬戸内海、北九州沖を含む日本各地から海水鎖プルを採取し、プラギオセルミス系統群のものを含む多くのクリオ疎そう培養株を確立した。そのうちプラギオセルミス系統群に属すると思われる株の形態形質を観察したところ、多くは *Plagioselmis prolonga* と同定できる小形種（< 10 μm）であったが、一部は *Teleaulax amphioxeia* と同定できる比較的大形の細胞であった。これらの株の 18S rDNA 塩基配列を決定し、系統解析を行ったところ、全ての株間で差異がほとんど無く、系統的にも明瞭な単系統群を形成した（図１）。さらに種のマーカーとして藻類で一般に用いられる ITS2 の塩基配列を決定し比較したところ、この部分でも差異はほとんど見られず、特に種の基準として重要視される CBC（compensatory base changes）は認められなかった。このことから、日本沿岸域で普遍的に見られるプラギオセルミス系統群は､おそらく１種であると考えられる。

これらの株は、*Teleaulax amphioxeia* として登録されておいる配列とほとんど同一の配列を有していた。しかし前述のように、形態的にはこれらの株のほとんどは *Plagioselmis prolonga* と同定される小形種であり、分子形質との間には大きな齟齬がある。この齟齬は、おそらく *Plagioselmis* 形の細胞と *Teleaulax* 形の細胞が同一種の異なる世代であると考えることによって説明がつく。実際に、本研究において確立した *Teleaulax* 形の株が *Plagioselmis* 形へと移行することが観察された（ただし移行条件や逆方向への移行は確認できなかった）。

日本沿岸域に普遍的なプラギオセルミス系統群の種は、以下の理由から分類学的には *Teleaulax amphioxeia* または“*Plagioselmis amphioxeia* ”とすべきであると思われる。①*Teleaulax amphioxeia* (Conrad) Hill 1992 と *Plagioselmis prolonga* Butcher ex Novarino, Lucas & Morrall 1994 では前者が先行名である。②*Plagioselmis prolonga* として登録されている株（MUCC012）とは塩基配列の上で若干の差異がある。③*Teleaulax* 属のタイプ種である *Teleaulax acuta* として登録されている配列とは若干距離がある（ただし *Teleaulax amphioxeia* および MUCC012 と単系統群にはなる）。

また本研究で単離した株および株保存施設の株を用いて、現在までにクリプト藻内に認識されている８系統群の内６系統群の系統関係を探るために rDNA（18S, ITS1, 5.8S, ITS2, 28S)に基づく系統解析を行った（図２）。その結果、*Rhodomonas*（*Rhodomonas* 系統群）、*Cryptomonas*（*Cryptomonas* 系統群）、*Hemiselmis*, *Chroomonas*（共に *Chroomonas* 系統群）および *Proteomonas*（*Proteomonas*

系統群）が比較的高い統計的信頼度の本で単系統群であることが示された。つまり *Plagioselmis*（*Plagioselmis* 系統群）および *Guillardia*（*Guillardia* 系統群）がクリプト藻綱内で初期に分岐していた。

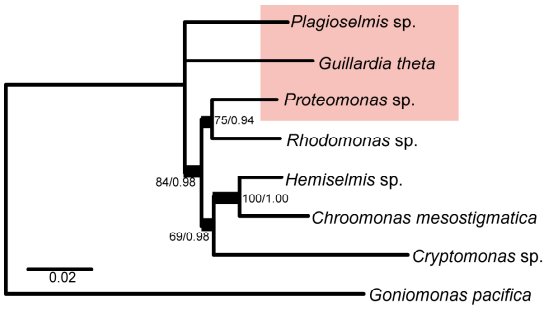

図２．クリプト藻の rDNA 系統樹（赤四角はゲミニゲラ科）

この結果は、ゲミニゲラ科（*Plagioselmis* 系統群、*Guillardia* 系統群、*Proteomonas* 系統群からなる）が祖先的な側系統群であることを示している。このことは、クリプト藻の進化においてゲミニゲラ科の特徴（世代によって異なるペリプラスト、ピレノイド外のヌクレオモルフ、光合成補助色素として Cr-PE545）がクリプト藻全体における祖先形質である可能性を示唆している。また興味深いことに、本解析では Cr-PE545 以外の色素をもつ系統群（*Cryptomonas* 系統群、*Chroomonas* 系統群）が単系統であることを示しており、色素の変化に関して共通の基盤があったことを示唆しているのかもしれない。

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６件）

① Yamaguchi H, Nakayama T, Kai A, Inouye I. (2011) Taxonomy and Phylogeny of a New Kleptoplastidal Dinoflagellate, *Gymnodinium myrio pyrenoides* sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae), and its Cryptophyte Symbiont. Protist 162: 650-667. http://dx.doi.org/10.1016/j.protis.2011.01.002 査読有

②中山　剛（2011）生物学の一大フロンティア：原生生物の多様性．日本プランクトン学会報．58: 2－10. http://ci.nii.ac.jp/naid/10027957015 査読有

③ Yamaguchi H, Suda S, Nakayama, T, Pienaar R. N, Chihara M & Inouye I. (2011) Taxonomy of *Nephroselmis viridis* sp. nov. (Nephroselmidophyceae, Chlorophyta), a sister marine species to freshwater *N. olivacea*. J. Plant Res. 124: 49–62. DOI: 10.1007/s10265-010-0349-y　査読有

④Suzuki M, Hashimoto T, Nakayama T & Yoshizaki M. (2010) Morphology and molecular relationships of *Leptofauchea rhodymenioides* (Rhodymeniales, Rhodophyta), a new record for Japan. Phycological Research 58: 116-131. DOI: 10.1111/j.1440-1835.2010.00569.x 査読有

⑤Yoshida M, Nakayama T & Inouye I. (2009) *Nuclearia thermophila* sp. nov. (Nucleariidae), a new nucleariid species isolated from Yunoko Lake in Nikko (Japan). European Journal of Protistology 45: 147-155. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejop.2008.09.004 査読有

⑥Atsushi K, Yoshii Y, Nakayama T & Inouye I. (2008) Aurearenophyceae classis nova, a new class of Heterokontophyta based on a new marine unicellular alga *Aurearena cruciata* gen. et sp. nov. inhabiting sandy beaches. Protista 159: 435-457. http://dx.doi.org/10.1016/j.protis.2007.12.003 査読有

〔学会発表〕（計４件）

①川口明音・横山亜紀子・山口晴代・中山剛「海産ユークレナ藻ユートレフチア目の分類学的研究 」日本植物分類学会第 11 回大会、2012. 3. 24、大阪学院大学

②中山剛「原生生物分類学の現状と展望」日本分類学会連合第10回公開シンポジウム. 2011.1.8. 国立科学博物館新宿分館

③中山剛「生物学の一大フロンティア：原生生物、特にエクスカヴァータについて」2010年度日本プランクトン学会春季シンポジウム. 2010.3.30. 東京海洋大学

④中山剛・山口晴代・甲斐厚・井上勲「スベリコガネモ（*Olisthodiscus*）の系統的位置について：ラフィド藻綱からペラゴ藻綱へ」日本藻類学会第 34 回大会. 2010.3.20. 筑波大学

〔図書〕（計１件）

①中山剛（2012)「クリプト藻」藻類ハンドブック、エヌ・ティー・エス、768 pp.

６．研究組織

(1)研究代表者

中山　剛（NAKAYAMA TAKESHI）
筑波大学・生命環境系・講師
研究者番号：40302369