

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 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21370031

研究課題名（和文） ハプト・クリプト藻類を含む新奇巨大生物群の提唱とクロムアルベオラータ仮説の検証

研究課題名（英文） Studies on a novel eukaryotic assemblage containing haptophytes and cryptophytes: Possible impact on the Chromalveolata hypothesis.

研究代表者

稲垣 祐司 (INAGAKI YUJI)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：50387958

研究成果の概要（和文）：光合成性真核生物群であるハプト藻とクリプト藻は、光合成をおこなわない捕食性真核生物種とともに単系統群（ハプト+クリプト生物群）を形成する可能性が示唆された。そこでハプト+クリプト生物群に含まれると予想された新奇な捕食性真核微生物 *Palpitomonas bilix* をふくめ、複数の捕食性メンバーを網羅的発現遺伝子（EST）解析に供した。本計画では EST データの解析を中心として、(1) ハプト+クリプト生物群の多様性とメンバー間の系統関係、(2) ハプト+クリプト生物群における光合成能力の進化、(3) ハプト+クリプト生物群の系統学的位置の確定を目的とし、研究をおこなった。

研究成果の概要（英文）：Recent studies proposed a novel monophyletic assemblage of two of major eukaryotic algal groups, haptophytes and cryptophytes, together with miscellaneous heterotrophic species. In this study, we conducted deep mRNA sequencing on heterotrophic members of the haptophyte + cryptophyte (H + C) assemblage including an enigmatic heterotrophic flagellate *Palpitomonas bilix*. By analyzing the mRNA sequence data, we addressed three issues described below; (1) the diversity and detailed relationship between the phototrophic and heterotrophic members in H + C assemblage, (2) the evolution of photosynthesis and plastids in H + C assemblage, and (3) the phylogenetic position of H + C assemblage in the tree of eukaryotes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、多様性・分類

キーワード：真核生物系統・葉緑体・クロムアルベオラータ仮説・遺伝子水平移動・2次共生

1. 研究開始当初の背景

全真核生物は、6つの「スーパーグループ」、すなわちオピストコンタ、プランテ、クロムアルベオラータ、リザリア、エクスカベ

ート、アマーボゾア、のいずれかに分類できると考えられている。特に、クロムアルベオラータには、クリプト藻類、ハプト藻類、ストラメノパイル生物群、アルベオラータ生物群が含まれ、その祖先細胞は葉緑

体を持つ光合成性生物であったと提唱されている。クロムアルベオラータには水圏一次生産者としての真核藻類が多数含まれるため、クロムアルベオラータが単系統か否かは真核生物における葉緑体進化、引いては地球環境進化を考察する上で極めて重要である。これまでの分子系統解析では、クリプト藻類とハプト藻類との姉妹群関係 (Patron, Inagaki, Keeling. *Cur Biol* 2007 17:887-891)、ストラメノパイル生物群とアルベオラータ生物群との姉妹群関係は確定しているが、4つの生物群全体が単系統となるのかは不明である。本計画では、ハプト+クリプト生物群に焦点を絞り進化学的な研究を行ったが、その背景として以下(1)~(3)が特に重要である。

(1) ハプト+クリプト生物群の多様性とメンバー間の系統関係が未解明

これまで系統的位置が不明だったカタブレファリス類 (Okamoto, Inouye. *Protist* 2007 156:163-179)、ピコビリ藻類 (Not et al. *Science* 2007 315:253-255)、テロネマ類および有中心粒太陽虫類 (Burki, Inagaki et al. *Genome Biol Evol* 2009 1:231-238) が実はクリプト藻類あるいはハプト藻類に近縁であることが、本研究計画を開始する前までに明らかとなった。従って、未知のハプト+クリプト生物群のメンバーが上記以外にも存在する可能性は高く、計画開始時点のデータはハプト+クリプト生物群の多様性を十分に把握しているとは言い切れなかった。また、この生物群メンバーの多くについて遺伝子データが不足していたため、分子系統解析によるハプト+クリプト生物群メンバー間の系統関係が確定されていなかった。

(2) ハプト+クリプト生物群における光合成能力の進化は未解明

ハプト+クリプト生物群多様性において興味深い点の1つは、ゴニオモナス類、カタブレファリス類、テロネマ類、有中心粒太陽虫類は光合成をせず捕食性という点である。祖先細胞は葉緑体を持ち光合成していたとするクロムアルベオラータ仮説を仮定すると、捕食性メンバーは2次的に光合成能力を失ったはずである。しかし、本研究計画開始時点ではこれら捕食性メンバーが光合成を行っていたかどうかは不明であった。またこの生物群の光合成能力進化を考察する上での「土台」となる、光合成性・捕食性メンバー間の系統関係が未解明だったため、光合成性↔捕食性という生活様式の進化についての議論ができなかった。

(3) 真核大系統中でのハプト+クリプト生物群の位置は未解明

「光合成色素クロロフィル *c* をもつ葉緑体

を有する光合成性真核生物は共通祖先を持ち、その葉緑体獲得イベントは共通祖先での1回のみである」とするクロムアルベオラータ仮説では、宿主細胞、葉緑体の系統共にハプト+クリプト生物群、ストラメノパイル生物群、アルベオラータ生物群は互いに近縁となるはずである。しかし、これまでの大規模分子データに基づく宿主系統の解析はクロムアルベオラータ仮説を積極的に支持せず、ハプト+クリプト生物群の系統学的位置は不明である。ただし本研究計画開始時点までの解析では、関連する生物種の多様性を十分にカバーしていなかったため、真の系統関係を反映できなかった可能性がある。特に、ハプト+クリプト生物群多様性をカバーした大規模解析はクロムアルベオラータ仮説の検証に必須である。

2. 研究の目的

研究代表者の行った研究により、葉緑体をもち光合成を行う単細胞真核生物 (いわゆる藻類) であるクリプト藻類とハプト藻類が単系統群を形成することが明らかとなった (Patron, Inagaki, Keeling. *Cur Biol* 2007 17:887-891)。さらに研究代表者は、これまで系統的位置が不明だった捕食性真核生物である有中心粒太陽虫類やテロネマ類が、クリプト藻類・ハプト藻類に近縁であることを示唆する結果を得ることができた (Burki, Inagaki et al. *Genome Biol Evol* 2009 1:231-238)。従って、クリプト藻類・ハプト藻類とその近縁種を含む「ハプト+クリプト生物群」が、これまでの予想以上に多様性に富むことを示唆した。しかしこの生物群の真の多様性、メンバー間の系統関係、光合成能力の進化、真核生物大系統内での位置は不明である。そこで、ハプト+クリプト生物群に近縁だと考えられる捕食性メンバーを網羅的発現遺伝子解析 (EST 解析) に供し、大量の配列データを獲得することを計画した。EST データ取得後は、それを元に大規模分子系統解析を行い、ハプト+クリプト生物群と解析対象生物との系統関係の解明を目指した。また、EST データ中に葉緑体関連遺伝子を探索し、2次的に光合成能力を失った否かを分子データの的に検証した。

3. 研究の方法

本研究では、新奇捕食性鞭毛虫 YPF602 株 (のちに *Palpitomonas bilix* と正式記載)、ゴニオモナス類 *Goniomonas* sp.、カタブレファリス類 *Leucocryptos marina* を解析対象のハプト+クリプト生物群捕食性メンバーとした。ただし *L. marina* の増殖速度が遅く、

EST 解析用の RNA サンプル調製に足る細胞を調製することが困難であることが判明したので、同じカタブレファリス類 *Roombia* sp. の解析を行った。これらの生物種を対象に、以下の解析を行った。

(1) 新奇捕食性鞭毛虫 YPF602 株の正式記載

YPF602 株の小サブユニットリボソーム RNA (SSU rRNA)、翻訳伸長因子 1 α (EF-1 α)、翻訳伸長因子 2 (EF2)、90kDa 熱ショックタンパク質 (Hsp90)、 α ・ β チューブリンの遺伝子配列を決定した。これらの配列データを用いた分子系統解析と、電子顕微鏡による細胞内微細構造解析をあわせて、YPF602 株を正式に記載を行った。YPF602 株の電子顕微鏡観察では鞭毛装置等の微細構造を詳細に調査し、既知のハプトクリプト生物群に含まれる鞭毛虫類と共通性の有無を確認した。分子系統解析では、YPF602 株がハプトクリプト生物群の新奇メンバーかどうかを検討した。

(2) *P. bilix* (YPF602 株)、*Goniomonas* sp. およびカタブレファリス類の大量培養と全 RNA サンプルの調整

次世代シーケンサーを使用した EST 解析を目指し、*P. bilix*、*Goniomonas* sp. およびカタブレファリス類 *L. marina* の大量培養を行った。*P. bilix* と *Goniomonas* sp. については EST 解析用ライブラリー調整に十分な細胞を取得することができ、全 RNA サンプルを精製しライブラリー作成を行った。次世代シーケンサー用ライブラリー作成には、約 1 mg の RNA サンプルを使用した。

カタブレファリス類 *L. marina* は細胞の増殖速度が遅く、培養条件の検討等を行ったが改善が見られなかった。そこで同じカタブレファリス類であるが、*L. marina* より増殖速度が速い *Roombia* sp. の培養と全 RNA サンプル精製を行った。次世代シーケンサー用ライブラリー作成には、約 20 μ g の RNA サンプルを使用した。

(3) 次世代シーケンスによる EST 解析

P. bilix と *Goniomonas* sp. に関しては Roche 454 Life Sciences 社の GS FLX Titanium を用いていた。*P. bilix* については約 10 万リード、*Goniomonas* sp. については約 13 万リード(平均リード長~250 塩基対)をそれぞれ取得した。2 種のシーケンスデータは、アセンブルプログラム MIRA を用い独立にコンティグ化した。*P. bilix* については約 8,600 コンティグ、*Goniomonas* sp. については約 8,400 コンティグを得ることに成功した。

Roombia sp. の EST 解析は Illumina 社の Hi-seq 2000 を用いて行い、約 2 億リード(平均リード長~100 塩基対)を取得、これらを

コンティグ化プログラム Velvet により解析し、約 36 万コンティグを取得した。

(4) EST データ中の葉緑体関連遺伝子の探索

本研究計画で EST データを取得した *P. bilix*、*Goniomonas* sp.、*Roombia* sp. は何れも捕食性であり、葉緑体をもたない。しかしクロムアルベオラータ仮説に基づけば、これらのハプトクリプト生物群捕食性メンバーは過去に葉緑体を保持し光合成を行っていた可能性がある。この場合光合成能力を失った後でも、他の葉緑体機能に関連した遺伝子をゲノム中に保持し続ける可能性がある。そこで上記 3 生物からの EST データ中に、既知の葉緑体の保持および光合成に関連する遺伝子配列を探索した。

研究代表者が本計画以前の研究で、ハプトクリプト生物群捕食性メンバーであることが判明したテロネマ類 *Telonema subtilis* と有中心粒太陽虫類 *Raphidiophrys contractilis* に関しても、葉緑体関連遺伝子が存在するか検討した。*T. subtilis* と *R. contractilis* の EST データは、Burki および Inagaki ら (*Genome Biol Evol* 2009 1:231-238) で調製したものを解析対象とした。

(5) 大規模分子系統解析

P. bilix、*Goniomonas* sp.、*Roombia* sp. からの EST データ内を慎重に探索し、真核生物系統に広く保存されている 159 個のタンパクコード遺伝子を選び出し、アミノ酸アライメントを作製した。この“159 遺伝子”アライメントは系統的に広範な 63 生物種をカバーし、合計 42,518 アミノ酸座位からなる巨大データである。現時点ではハプトクリプト生物群メンバーを最も多く含み、光合成性メンバーとしてハプト藻類とクリプト藻類、捕食性メンバーには *P. bilix*、*Goniomonas* sp.、*Roombia* sp. の他にテロネマ類 *T. subtilis*、有中心粒太陽虫 *R. contractilis* までを含む。

この 159 遺伝子アライメントを、系統解析プログラムは RAxML を用いた最尤法により解析した。置換モデルとしては、LG モデルを基にアライメント座位間の置換速度差をガンマ分布により補正し、アミノ酸頻度を配列データから推定した“LG+ Γ +F”モデルを使用した。RAxML を用いた系統樹の推測には、10 個の異なる初期系統樹から独立に樹形探索を行い、最も尤度が高かった系統樹を最尤系統樹として選んだ。

推測された系統関係の頑健性は、最尤法を用いたブートストラップ解析 (100 回) により検討した。ブートストラップ解析でも置換モデルには LG+ Γ +F を用いた。各ブートストラップデータに対する樹形探索は

1つの初期系統樹だけから行った。

4. 研究成果

(1) YPF602 株の正式記載

光学顕微鏡および電子顕微鏡観察と分子系統解析の結果に基づき、YPF602 株を *Palpitomonas bilix* として記載した論文を発表した (Yabuki, Inagaki, Ishida 2010 *Protist* 10:523-538)。

(2) 159 遺伝子データセットに基づく *P. bilix* の系統的位置の解明

P. bilix、*Goniomona* sp.、および *Roombia* sp. の EST データを含む 161 遺伝子のアミノ酸配列データセットを整備した。単一遺伝子データ毎に系統解析し、系統的に離れた生物から水平的に伝播した可能性のある配列等を削除し、複数遺伝子の情報を連結解析した際「ノイズ」となる可能性の配列を取り除いた。最終的に 63 種の真核生物からサンプリングした 159 遺伝子配列を、系統解析に使用することに決定した。

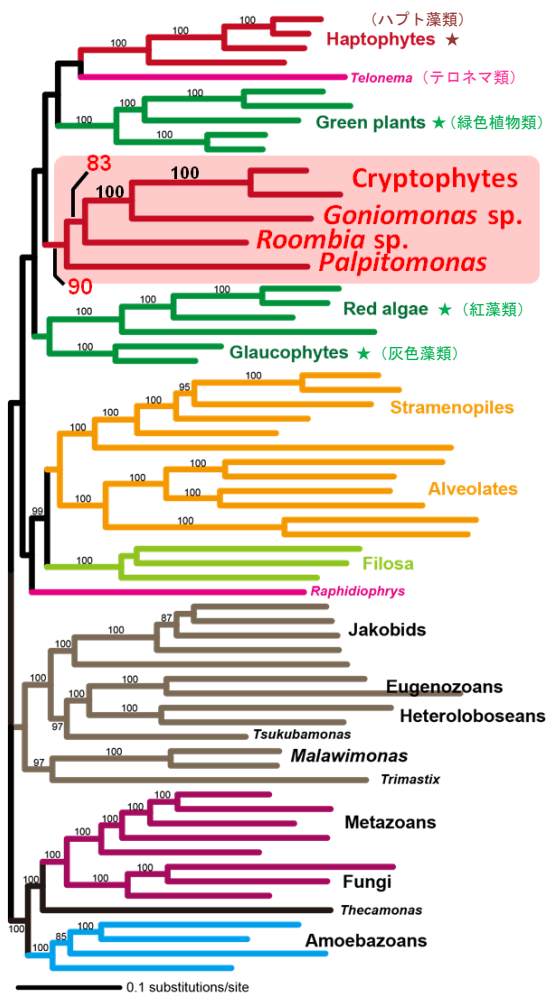


図 1: 159 遺伝子データに基づく最尤系統樹。赤くシェードをかけたクレードは“クリプチスタ生物群”である。光合成性生物群には星印を付けた。

この 159 遺伝子を連結したデータセットを最尤法を用いて解析した。159 遺伝子データセットから推測した最尤系統樹とブートストラップ値は次ページに示した [図 1]。推測された最尤系統樹は、先行研究の解析結果 (例えば Burki et al. *Proc R Soc B* 2012 279:2246-2254) と大きく異なる部分はなかった。本研究計画の解析対象である *P. bilix* と *Goniomona* sp.、および *Roombia* sp. を含む部分系統樹は背景を赤くした。これまでの系統解析と同様にクリプト藻類と *Goniomonas* sp. はブートストラップ値 100% で単系統となった。その外側には *Roombia* sp. が分岐し、この系統関係はブートストラップ値 83% で支持された。以上の系統関係は、カタブレファリス類として *Roombia truncata* を用いた Burki らによる一連の大規模系統解析結果と一致していた (Burki et al. *Proc R Soc B* 2012 279:2246-2254)。さらに *P. bilix* は、クリプト藻類、*Goniomonas* sp.、*Roombia* sp. から構成されるクレードの基部から分岐することが分かった。クリプト藻類、*Goniomonas* sp.、*Roombia* sp. および *P. bilix* のグルーピングはブートストラップ値 90% で支持された。我々はこの生物群を“クリプチスタ生物群”と呼ぶことを提唱する。

(3) クリプト藻とその近縁捕食性生物種における葉緑体関連遺伝子の探索

捕食性生物種 *P. bilix*、ゴニオモナス類、カタブレファリス類はクリプト藻に近縁である。興味深いことに、159 遺伝子解析ではクリプチスタ生物群は、解像度はないものの光合成を行うハプト藻類、緑色植物類、灰色藻類と近縁である可能性が示唆されている [図 1]。従って、クリプチスタ生物群の共通祖先は光合成性であり、*P. bilix*、ゴニオモナス類、カタブレファリス類は二次的に光合成能力を失った可能性がある。この可能性を検証するため、*P. bilix*、*Goniomonas* sp.、*Roombia* sp. の EST データ内に葉緑体関連遺伝子転写産物を探索した。

本解析ではとくにイソプレノイド合成系について着目した。一般に光合成真核生物は、葉緑体に局在する非メバロン産 (MEP) 経路でイソプレノイドを合成する。これまでの研究で 2 次的に光合成能力を失った生物種 (例えばパーキンサス類) でも、MEP 経路を構成する遺伝子を保持していることが分かっている (Matsuzaki et al. *Mol Biol Evol* 2008 25:1167-1179)。残念ながら *P. bilix*、*Goniomonas* sp.、*Roombia* sp. の EST データ内には MEP 経路関連遺伝子転写物は発見できず、2 次的に光合成能力を失ったかどうか判断することはできなかった。

Burki および Inagaki ら (Genome Biol Evol 2009 1:231-238) の解析により、テロネマ類 *Telonema subtilis* と有中心粒太陽虫類 *Raphidiophrys contractilis* は、ハプト藻あるいはクリプト藻に近縁である可能性が示唆された。そこでこの2生物種についても EST データ内に MEP 経路関連遺伝子転写物を探索したが、2次的な光合成能力(と葉緑体)の欠失を示唆する結果は得ることができなかった。

(4) クリプト藻とその近縁捕食性生物種における射出装置の進化

これまでの顕微鏡観察からクリプト藻類、ゴニオモナス類、カタブレファリス類は、電子顕微鏡観察によると「トイレットペーパー状」に見える射出装置 (ejectosomes) をもつことが分かっている [図2、左上、左下、右上参照]。クリプト藻ではその構成タンパクをコードする *tri* 遺伝子群が同定されている (Yamgishi et al. *J Mol Evol* 2012 74:147-157)。興味深いことに *tri* 遺伝子転写物が *Goniomonas* sp. および *Roombia* sp. の EST データ中に発見された。一方 *P. bilix* 細胞には射出装置はなく、EST データにも *tri* 遺伝子転写物は検出されなかった。

射出装置の有無を、159 遺伝子系統解析から推測されたクリプト藻類、ゴニオモナス類、カタブレファリス類、*P. bilix* の分岐順にあてはめると、*P. bilix* が分岐した後、クリプト藻類、ゴニオモナス類、カタブレファリス類の共通祖先が射出装置を獲得したと解釈できる [図2、右下の模式図参照]。

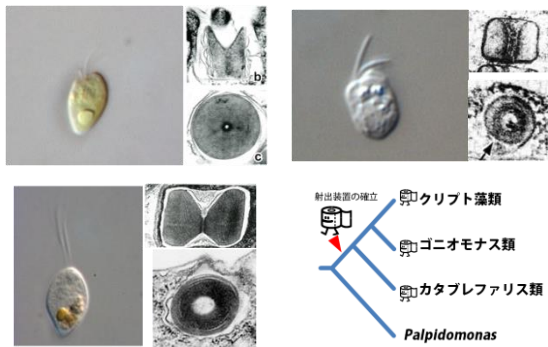


図2: クリプト藻 (左上)、ゴニオモナス類 (右上) およびカタブレファリス類 (左下) の射出装置とクリプト藻生物群における射出装置の進化 (右下)。光学得顕微鏡写真は矢吹彬憲博士から提供された。クリプト藻射出装置の電子顕微鏡写真 (左上) は Hausmann (*Int Rev Cytol* 1948 52:197-276) より、ゴニオモナス類射出装置の電子顕微鏡写真 (右上) は Mignot (*J Microscopie* 1965 4:239-252) より、カタブレファリス類射出装置の電子顕微鏡写真 (左下) は Lee & Kugrens (*J Phycol* 1991 27:505-513) および Okamoto & Inouye (*Protist* 2005 156:163-179) より抜粋した。

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3件)

1. Yuki Nishimura, Ryoma Kamikawa, Tetsuo Hashimoto, Yuji Inagaki. Separate origins of group I introns in two mitochondrial genes of the katablepharid *Leucocryptos marina*. 2012 *PLoS One* 7:e37307. 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0037307
2. Ken-Ichiro Ishida, Yuji Inagaki, その他13名. Comprehensive SSU rRNA phylogeny of Eukaryota. 2010 *Journal of Endocytobiosis and Cell Research* 20:81-88. 査読有
3. Akinori Yabuki, Yuji Inagaki, Ken-Ichiro Ishida. *Palpitomonas bilix* gen. et sp. nov.: A novel deep-branching heterotroph possibly related to Archaeplastida or Hacrobia. 2010 *Protist* 210:523-538. 査読有

[学会発表] (計8件)

①発表者名 (講演者には○を付けた)、②発表表題、③学会等名、④発表年月日、⑤発表場所

1. ① ○神川龍馬、矢吹彬憲、橋本哲男、西村祐貴、稲垣祐司
② 新奇真核微生物がもたらす新しい真核生物大系統像
③ 第28回日本微生物生態学会
④ 2012年10月19-22日
⑤ 豊橋技術科学大学
2. ① ○稲垣祐司、矢吹彬憲、神川龍馬
② 新奇真核微生物からの大規模配列データで変貌し続ける、我々の真核生物大系統像
③ 第31回微生物系統分類研究会
④ 2011年11月25日
⑤ 理化学研究所 (和光)
3. ① ○稲垣祐司
② Recent progress in placing newly-discovered lineages of protists in the deep tree of eukaryotes
③ The meeting of the Center for Comparative Genomics and Evolutionary Bioinformatics
④ 2011年8月6日
⑤ Dalhousie 大学 (ハリファックス, カナダ)
4. ① ○西村祐貴、神川龍馬、稲垣祐司、橋本哲男
② The phylogenetic position of the katablepharid *Leucocryptos marina* based on seven mitochondrial gene sequences
③ SMCBE2011
④ 2011年7月26-30日
⑤ 京都大学
5. ① ○矢吹彬憲、神川龍馬、Martin Kolisko、石田健一郎、田辺晶史、橋本哲男、稲垣祐司

- ② 159 遺伝子データに基づく従属栄養性真核微生物 *Palpitomonas bilix* の系統的位置
- ③ 第5回日本進化原生生物学研究会
- ④ 2011年7月11-12日
- ⑤ 富山大学(富山, 富山)
- 6. ① ○稲垣祐司、矢吹彬憲、神川龍馬、西村祐貴、石田健一郎、橋本哲男
- ② 無色系統群の研究から炙り出される真核藻類の進化—ゲノミクスの視点を含めて
- ③ NBRP「藻類」シンポジウム『未来を支える藻類, その多様性—ゲノミクス・ポストゲノミクスの視点から』
- ④ 2011年1月29日
- ⑤ 新宿住友ビルスカイルーム
- 7. ① ○稲垣祐司, 他12名
- ② 127 遺伝子データ解析によるテロネマ類と有中心粒太陽虫の系統的位置
- ③ 第4回日本進化原生生物学研究会
- ④ 2009年7月4-5日
- ⑤ 宮城教育大学
- 8. ① ○稲垣祐司
- ② The possible link among two enigmatic heterotrophic eukaryotic lineages, telonemids, centrohelids and "chromalveolate" groups
- ③ つくば藻類・プロティスト研究フォーラム
- ④ 2009年4月20日
- ⑤ 筑波大学

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/yujiswebsite/Home>

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲垣 祐司 (INAGAKI YUJI)
筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号: 50387958

(2)研究分担者

石田 健一郎 (ISHIDA KEN-ICHIRO)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号: 30282198