

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (B) (1)

研究期間：平成 18 年度～平成 20 年度

課題番号：18340166

研究課題名 (和文) 分子系統解析手法を用いた現生渦鞭毛藻シストと遊泳細胞対応関係の再検討

研究課題名 (英文) Re-examination of the motile-cyst form relationship based on molecular phylogenetic analysis

研究代表者：研究者番号：00047416, 松岡, 数充；長崎大学・環東シナ海海洋環境資源研究センター・教授

研究分担者：研究者番号：50423645

岩滝, 光義；長崎大学・環東シナ海海洋環境資源研究センター・助教

研究成果の概要：

1. 従来の研究でも生シストから遺伝子情報を取得する方法はあり、それによって栄養細胞（プランクトン）とシストの対応関係を明らかにする研究はあった。しかし、それらは人工培養が可能な独立栄養性種のみであり、従属栄養性種について遺伝子情報の抽出は困難とされてきた。本研究ではこの点を改良すべく単細胞 PCR 法を活用して渦鞭毛藻の生シストから遺伝子情報を取得する方法の確立に取り組んだ。その結果、独立栄養性、従属栄養性を含む 8 種について生シストから遺伝子情報を取り出すことができた。
2. この方法を用いてより精度の高い、確実な遊泳細胞と休眠細胞との対応関係を確立することができた。上記の種に加え、*Cochlodinium cf. geminatum* の栄養細胞とシストの対応関係が明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
平成 19 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
平成 20 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	16,640,000	1,280,000	3,840,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：地球惑星科学, 層位・古生物学

キーワード：分子系統解析, SSUrDNA, LSUrDNA, 系統分類, 渦鞭毛藻, シスト, 単細胞 PCR

1. 研究開始当初の背景

堆積物中には様々な微化石と呼ばれる微小な生物遺骸が含まれている。渦鞭毛藻シストもその一員で、物理的・化学的耐性がある有機質の細胞壁を備えている。確実に渦鞭毛藻類と識別される化石は中生代初期の堆積物から産し、それ以降、時代とともに多様な形態変化を示すことから、生層序学や古海洋学に活用されるとともに、渦鞭毛藻の系統進化考察の基礎情報として注目されてきた。渦鞭毛藻シストは一般的に水中に浮遊している栄養細胞ではなく、多くの場合、有性生殖によって形成される休眠細胞である。しかし、渦鞭毛藻類は浮遊細胞と休眠細胞の形態が著しく異なるため、一つの生物が二つの異なる生物名一すなわち浮遊細胞と休眠細胞が異なった生物名を持つこととなった。このことが渦鞭毛藻シスト研究に混乱をもたらしてきた。渦鞭毛藻古生物学をさらに進展させるためには、化石として保存される休眠シストとその栄養細胞との対応関係をより確実に確立していくことが重要な研究課題となる。

2. 研究の目的

本研究ではこれまで蓄積した形態学に、分子生物学的手法を組み合わせることによって、より精度の高い、確実な遊泳細胞と休眠細胞との対応関係を確立し、渦鞭毛藻の系統分類と進化過程の考察に寄与する。

3. 研究の方法

・渦鞭毛藻シスト試料は、主にセディメントトラップを用いて採集する。試料はこれまでに継続してきた大村湾南部沿岸域に設置した調査点で採集し、回収は2週間に1回の割合

で行う。

・従属栄養種のシストは、これまでの調査研究結果から餌生物（特に珪藻類）の卓越する海域に多いことを把握している。

・セディメントトラップ試料と表層堆積物試料から生シスト分離する。超音波とステンレス製の篩で処理した後に20 μ mの篩上の残渣を検鏡し、キャピラリーピペットを用いて渦鞭毛藻シストを分離する。

・微分干渉顕微鏡（Olympus BX51, IX70）を用いて形態観察を行い、シスト種としての同定を行うとともに写真記録をとる。

・単細胞PCR技術を用いて、単離したシストと遊泳細胞のSSUおよびLSUrDNA塩基配列を決定する。

・得られた渦鞭毛藻シストの塩基配列を、相同性検索により国際塩基配列データベース（DDBJ/EMBL/GenBank）の登録データと比較する。さらに独自に蓄積したシスト形成種の塩基配列とも比較し、最終的に遊泳細胞との対応関係を決定する。

・解析した配列を保存するとともに、類縁の想定される渦鞭毛藻を選択してマルチプルアライメントを取り、ガンマ補正後に近隣結合法（NJ法）と最尤法（ML法）により系統樹を構築する。

4. 研究成果

4-1. 従来の研究でも生シストから遺伝子情報を取得する方法はあり、それによって栄養細胞（プランクトン）とシストの対応関係を明らかにする研究はあった。しかし、それらは人工培養が可能な独立栄養性種のみであり、従属栄養性種について遺伝子情報の抽出は困難とされてきた。本研究ではこの点を改良すべく単細胞 PCR 法を活用して渦鞭毛

藻の生シストから遺伝子情報を取得する方法の確立に取り組んだ。その結果、独立栄養性、従属栄養性を含む以下の種について生シストから遺伝子情報を取り出すことができた。

生シストから遺伝子情報を取り出すことができた種

独立栄養種 ; *Pyrophacus steinii*,
Alexandrium hiranoi,

従属栄養種 ; *Protoperidinium thulesense*,
Oblea acanthocysta, *Protoperidinium tricingulatum*,
Protoperidinium parthenopes,
Polykrikos kofoidii, *Polykrikos schwartzii*.

4-2. この方法を用いてより精度の高い、確実な遊泳細胞と休眠細胞との対応関係を確立することができた。上記の種に加え、*Cochlodinium cf. geminatum* の栄養細胞とシストの対応関係が明らかになった。

4-3. 今後の課題として、生活史段階が異なった栄養細胞（プランクトン）と生シストから得た遺伝子情報を照合して両者の対応関係を確立するには、当然のことながら栄養細胞の遺伝子情報が必須である。しかしながら、現時点では培養が困難な従属栄養性種の遺伝子情報は不十分である。シストを渦鞭毛藻進化の証拠として活用するためには、栄養細胞とシストの確実な対応関係を確立することが必須である。この観点からして、栄養細胞の遺伝子情報の収集と整備が強く望まれる。

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 6件)

松岡數充・野上規子・川見寿枝・岩滝光儀
2006 渦鞭毛藻シストー栄養細胞対応関係確立への新方法. 化石, No.80, p.33-40. (査読有り)

Kawami H., Iwataki, M., and Matsuoka, K. 2006 A new diplopsalid species *Oblea acanthocysta* sp. nov. (Peridinales, Dinophyceae). Plankton & Benthos Research, 1, p. 183-190. (査読有り)

Shin, H.-H., Yoon, Y.-H., Kawami, H., Iwataki, M., and Matsuoka, K. 2008 The first appearance of PSP causative dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Gonyaulacales, Dinophyceae) in Gamak, Bay Korea. Algae, 23, 251-255. (査読有り)

Matsuoka, K., Kawami, H., Nagai, S., Iwataki, M. and Takayama, H. 2009 Re-examination of cyst-motile relationships of *Polykrikos kofoidii* Chatton and *Polykrikos schwartzii* Bütschli (Gymnodinales, Dinophyceae). Review of Palaeobotany and Palynology. 154, 79-90. Doi:10.1016/j.revpalbo.2008.12.13. (査読有り)

Kawami, H. and Matsuoka, K. 2009 A new cyst-theca relationship for *Protoperidinium parthenopes* Zingone & Montresor 1988 (Peridinales, Dinophyceae). Palynology (Accepted). (査読有り)

Kawami, H., van Wezel, R., Koeman, R.P.T. and Matsuoka, K. 2009 *Protoperidinium tricingulatum* sp. nov. (Dinophyceae), a new motile form of a round brown, and spiny dinoflagellate cyst. Phycological Research, (Accepted). (査読有り)

〔学会発表〕（計 11 件）

2006 年度

2006 年度日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会，*Protoperidinium parthenopes* (Dinophyceae) のシスト形態と系統的位置. 川見寿枝・岩滝光儀・松岡數充，2006 年 9 月

日本藻類学会第 31 回大会，連鎖群体を形成する無殻渦鞭毛藻 *Cochlodinium* の形態と分類. 松岡數充・岩滝光儀・川見寿枝，2007 年 3 月.

2007 年度

東京大学海洋研究所共同利用研究集会，閉鎖系海域での貧酸素水塊が低次生産系に与える影響. 松岡數充・中田英昭・山口仁士・万田敦昌・岩滝光儀，2007 年 6 月.

2007 年日本ベントス・日本プランクトン学会合同大会，従属栄養性渦鞭毛藻 *Polykrikos kofoidii* Chatton と *Polykrikos schwartzii* Bütschli のシストと遊泳細胞の対応関係の再検討. 松岡數充・川見寿枝・岩滝光儀・長井敏・高山晴義，2007 年 9 月.

The 6th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, Eutrophication indicators of cysts: *Polykrikos kofoidii* Chatton and *Polykrikos schwartzii* Bütschli (Gymnodiniales, Dinophyceae). K. Matsuoka, H. Kawami, S. Nagai, M. Iwataki and H. Takayama, Nov. 2007.

日本藻類学会第 32 回大会，長崎五島産 *Cochlodinium* 様無殻渦鞭毛藻 1 種の形態と系統. 岩滝光儀・川見寿枝・高野義人・松岡數充，2008 年 3 月.

2008 年度

DINO8, Morphology and phylogeny of a

Cochlodinium-like unarmored dinoflagellate with reference to its cyst-motile cell relationship. M. Iwataki, H. Kawami, Y. Takano, S.P.C. Law, S. Lu, Y. Fukuyo and K. Matsuoka, May 2008.

DINO8, Re-examination of cyst-motile form relationships of *Polykrikos kofoidii* Chatton and *Polykrikos schwartzii* Bütschli (Gymnodiniales, Dinophyceae). K. Matsuoka, H. Kawami, S. Nagai, M. Iwataki and H. Takayama, May 2008.

IOC/WESTPAC 7th International Scientific Symposium, Vertical distribution of dinoflagellate cysts in a short core sediment collected from Kota Kinabalu, Malaysia. K. Mizushima, M. Iwataki, F. F. Elsa, A. Puyong, B. U. Iris, S. R. Boy, S. Dusit, Y. Fukuyo and K. Matsuoka, May 2008.

IOC/WESTPAC 7th International Scientific Symposium, Morphology and phylogenetic position of a *Cochlodinium*-like unarmored dinoflagellate forming resting cyst. M. Iwataki, H. Kawami, Y. Takano, S.P.C. Law, S. Lu, Y. Fukuyo and K. Matsuoka, May 2008.

2008 年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会，Apical型発芽孔シストをもつ渦鞭毛藻 *Protoperidinium americanum* の系統的位置. 川見寿枝・岩滝光儀・松岡數充，2008 年 9 月.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

研究者番号；00047416,
松岡， 數充；長崎大学・環東シナ海海洋環境
資源研究センター・教授

(2) 研究分担者

研究者番号；50423645
岩滝， 光義；長崎大学・環東シナ海海洋環境
資源研究センター・助教

(3) 連携研究者

なし