

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18570084
 研究課題名（和文） 二次共生による葉緑体獲得に伴うクロララクニオン藻の植物への適応進化の研究
 研究課題名（英文） Evolution toward “plants” in the chlorarachniophytes which acquired plastids via a secondary endosymbiosis
 研究代表者
 石田 健一郎（ISHIDA KENICHIRO）
 筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授
 研究者番号：30282198

研究成果の概要：

二次共生で葉緑体を獲得したクロララクニオン藻について、核コード18S rRNA 遺伝子を用いて系統解析を行ない、群内に7主要系統群の存在を明らかにした。また、知見が不十分な7株について、形態、微細構造、タイムラプスビデオによる生活環の観察を行ない、6株（新属新種2株、新種2株、未記載種2株）が新規分類群であることを見いだした。さらに複数の形質について「植物」としての適応進化を考察した。本藻群に近縁な無色ケルコゾアの新規培養株も5つ確立し、うち2つが新規分類群であること明らかにし、一方は新種として記載した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,000,000	0	2,000,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	480,000	4,080,000

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：(1)進化 (2)植物化 (3)分類学 (4)クロララクニオン藻 (5)二次共生 (6)原生生物 (7)藻類 (8)生物多様性

1. 研究開始当初の背景

クロララクニオン藻は、ケルコゾア原生生物門に属する非光合成真核生物（無色ケルコゾア）が緑藻を細胞内に取り込んで葉緑体を獲得した、いわゆる二次共生由来の生物群であることが、研究代表者らの以前の研究などによって明らかとなっていた（Ishida et al. 1997, Ishida et al. 1999）。つまり、本藻群はかつては従属栄養性の“動物”であったが、二次共生によって葉緑体を獲得したこと

により光合成能を獲得し、“植物化”した生物群と言える。この、葉緑体の獲得が、分子、細胞、個体、生態の各レベルでどのように起こったかを明らかにすることが、“動物”から“植物”への進化を理解する上で非常に重要である。

二次共生由来の光合成真核生物には6つの系統群が知られているが、中でもクロララクニオン藻は、食作用の有無など“動物”から“植物”への様々な段階が存在することや、

起源となった生物群がほぼ特定できていること (Ishida et al. 1997, Ishida et al. 1999)、細胞形態、細胞の挙動、生活環が著しく多様であること (Ishida et al. 1999) など、二次共生後の植物化に伴う進化を追う上で好適なモデル生物群である。

2. 研究の目的

本研究は、「個体」および「生態」レベルの適応進化に焦点を絞り、クロララクニオン藻について特に二次共生後の植物化過程における細胞形態と挙動、生活環の多様化を明らかにすることを目的とした。

上記の目的を達成するため、以下の4項目について調査した。1) 既存のクロララクニオン藻のほぼ全ての培養株、および近縁の無色ケルコゾアについて「細胞形態」、「微細構造」、「生活環」の詳細な観察を行ない、群内におけるそれらの多様性を把握する。生活環の観察には、タイムラプスビデオ観察法を新規に導入し、細胞ステージの移行を確実に観察する。2) 利用可能なほぼ全ての培養株について、18S rDNA の配列を決定し、分類群全体を網羅した、これまでよりも詳細で信頼性の高い系統樹を得る。3) 祖先形質状態を知るため、クロララクニオン藻の祖先生物群である無色ケルコゾアを野外から採集し、培養株の確立を進め、クロララクニオン藻と同様のデータを取得する。4) 最後に、形態、微細構造、生活環、食作用等の観察結果と分子系統解析の結果を合わせることで、各形質の進化を明らかにするとともに、各クロララクニオン藻の生育場所の情報等を加味し、光合成生物としての適応進化を考察する。

3. 研究の方法

本研究では、クロララクニオン藻で見いだされた形質の祖先状態を推定するため、クロララクニオン藻に近縁な無色ケルコゾアの採集と培養株の確立を試みた。採集には主に採泥器を使用した。サンプルは実験室に持ち帰り、培地を加えて数日培養した後、無色ケルコゾアの細胞を単離し、培養株を確立した。確立できた培養株については、順次「細胞形態・微細構造の観察」、「生活環のタイムラプスビデオ観察」、「18S rDNA による分子系統解析」に用いた。

また、無色ケルコゾアの探索と培養株の確立を行いつつ、クロララクニオン藻の既存の培養株のうち調査が不十分なもの (BC52、CCMP242、CCMP622、Hajime、P314、P329、RCC365) について、1) 細胞形態・微細構造の観察、2) 生活環のタイムラプスビデオ観察を実施した。また、確立した無色ケルコゾアの培養株 (YPF501、YPF502、YPF609、YPF610、YPF611) についても、順次同様の観察を行なった。1) 細胞形態・微細構造の観察：倒立

顕微鏡と微分干渉装置付き正立生物顕微鏡を使用して、細胞形態の観察を行なった。微細構造については、本藻群内で多様であることが知られているピレノイド、ヌクレオモルフ、葉緑体、細胞壁、射出装置、等を中心に透過型電子顕微鏡 (学内共同利用設備) を用いて詳細な観察を行った。2) 生活環のタイムラプスビデオ観察：生活環を構成する細胞ステージの移行および細胞分裂を中心に、新規に導入した正立微分干渉顕微鏡で使用できる「高解像度ビデオカメラ」を用いてタイムラプスビデオ観察を行なった。

まだ配列決定がなされていないクロララクニオン藻の培養株と新規無色ケルコゾアの培養株について、18S rDNA の配列を PCR 法で増幅し、クローニングした後、塩基配列を決定した。塩基配列決定は、業者委託により行なった。配列決定された 18S rDNA は、データベースに登録されている利用可能な相同遺伝子配列とともにアライメントを作成し、近年最も信頼性が高いとされている複数の手法 (ガンマ補正を行なった最尤法、近隣結合法、ベイズ法など) を用いて分子系統解析を行なった。得られた系統樹についてブーツストラップテスト、AU テストなどを行ない、信頼性を検定し、最も確からしいクロララクニオン藻の系統関係を推定した。

4. 研究成果

1) 無色ケルコゾアの探索と培養株の確立：本研究において、無色ケルコゾアの培養株を新たに5株 (YPF501、YPF502、YPF609、YPF610、YPF611) 確立した。このうち YPF502 はケルコゾア内の *Endomyxa/Reticulosida* に属する *Filoreta* 属の新種であることが判明し、イギリスの Thomas Cavalier-Smith 博士、David Bass 博士らと共同で *Filoreta japonica* として新種記載を行なった (Bass et al. 2009)。また、YPF610 はケルコゾア内の *Thecofiocsea* に属する新規分類群であることが判明しており、現在詳細な分類学的研究を開始している。

2) 18S rRNA 遺伝子によるクロララクニオン藻の系統解析：これまで系統的な位置が不明であったクロララクニオン藻の培養株 (CCMP622、Hajime、P314、P329、RCC365) について核コード 18S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、既報の他の培養株の配列とあわせて最尤法で系統樹を作成した。その結果、クロララクニオン藻内に大きく7つの主要系統群 (*Bigelowiella* 系統群、BC52 株系統群、*Chlorarachnion* 系統群、RCC365 株系統群、*Lotharella* 系統群、*L. amoebiformis* 系統群、*Gymnochlora* 系統群) が存在することが判明した。また、CCMP622 株は *Lotharella* 系統群に、Hajime 株と P329 株は *L.*

amoebiformis 系統群に、P314 株は *Gymnochlora* 系統群にそれぞれ所属し、RCC365 株は独自の新規系統群を形成することが示された。BC52 株と CCMP242 株については、先行研究の結果と同様に、BC52 株は独自の系統群、CCMP242 株は *Bigelowiella* 系統群にそれぞれ属するという結果が再現された。

3) クロララクニオン藻の細胞形態、微細構造、およびタイムラプスビデオ観察による生活環の観察：これまで観察が不十分であった BC52、CCMP242、CCMP622、Hajime、P314、P329、RCC365 の各株について、細胞形態、微細構造、およびタイムラプスビデオ観察による生活環の観察を実施した。

BC52株：栄養細胞は球状で、自生孢子形成あるいは遊走子形成によって増殖する。細胞は1-2個の葉緑体を持ち、各葉緑体には1個の突出したピレノイドが存在する。ピレノイドには葉緑体包膜の内側2枚による先端からの薄板状の浅い貫入が見られる。また、分子系統解析において、クロララクニオン藻の中で *Bigelowiella* 系統群に近縁な独自の系統群を形成することから、本研究において、新属新種 *Norrisiella sphaerica* として正式に記載した (Ota et al. 2007b)。

CCMP242株：生活環は基本的にアメーバ状細胞で構成される生活環と遊泳細胞で構成される生活環とからなる。CCMP242 株の遊泳細胞は無性的に増殖を行うことができ、*Bigelowiella* 属としての特徴を持っている。さらに、分子系統解析の結果においても、*Bigelowiella* 属の基準種 *B. natans* と CCMP242 株は同一クレードに入ることが、既に示されていた。*Bigelowiella* 属唯一の既知種である *B. natans* と比較したところ、光学顕微鏡レベルの形態形質・生活環において、明瞭に区別できることが判明した。すなわち、①CCMP242 株の生活環には、アメーバ状ステージが存在し、かつ、そのアメーバ状細胞は栄養細胞であるのに対して、*B. natans* の生活環には栄養細胞と考えられるアメーバ状ステージは無い。②CCMP242 株は培養令が進むと、浮遊性のゼラチン状細胞集塊を形成するが、*B. natans* はそのような細胞集塊を作らない。③ *B. natans* の生活環に見られるアメーバ鞭毛ステージ、触手を放射状に伸ばした細胞は、CCMP242 株の生活環には出現しない。これらの結果から本研究でCCMP242株を *Bigelowiella* 属の新種として正式に記載した (Ota et al. 2007a)。

CCMP622 株：
Moestrup and Sengco (2001) が *Bigelowiella*

natans を記載した際にそれと同種であると扱ったサルガッソー海産のクロララクニオン藻培養株 (CCMP621, CCMP622, CCMP623) の一つである。を詳細に観察し、それらを基に新属新種を記載した。ところが、核コード18S rDNA に基づいた分子系統解析は、CCMP622 がクロララクニオン植物の別の属で構成される *Lotharella* クレードに高い統計的支持をもって含まれることを示した。形態・微細構造的観察の結果、CCMP622 株の栄養細胞は細胞壁のない球状細胞で、遊泳細胞も放出するがそれらは分裂能を欠く。葉緑体には突出した1個のピレノイドが存在する。ピレノイドは、4枚の葉緑体包膜のうち内側の2枚が長軸方向に深く陥入するタイプ (深裂型) であることが判明した。深裂型ピレノイドは *Lotharella* 属の主要な識別形質であるため、CCMP622 株を *Lotharella* 属の新種 *Lotharella oceanica* として正式に記載した (Ota et al. 2009b)。また、*Bigelowiella* 属においてもピレノイドの微細構造を識別形質として導入し、*Bigelowiella* 属の再定義を行なった。

RCC365株：イタリア南部イオニア海 (地中海) の海洋表層水のピコサイズのフラクションから分離されたプランクトン性のクロララクニオン藻である。クロララクニオン藻には、他にプランクトン性の属として、*Bigelowiella* 属が記載されている。RCC365 株の栄養細胞は基本的に鞭毛と細胞壁を持たない球状細胞で、平均直径3 μm と小さい。一方、*Bigelowiella* 属の遊泳細胞は鞭毛を持ち、大きさは5 μm を超え、種によっては、生活環において糸状仮足を持ったアメーバ状ステージを出現させる点で異なる。さらに、これまで報告されたのクロララクニオン藻には葉緑体に突出型ピレノイドが例外なく付随しているが、RCC365 株に突出型ピレノイドは付随していない。これはクロララクニオン藻として新規の特徴である。本研究における分子系統解析の結果 RCC365 株は、既知系統群には入らず独自の系統群を形成することが示されている。したがって、RCC365 株をクロララクニオン藻の新属新種 *Partenskyella glossopodia* として正式に記載した (Ota et al. 2009a)。

P329株：パラオ共和国独自に確立した培養株である。栄養細胞は独立したアメーバ状細胞である。本藻のピレノイドは葉緑体包膜の内側の二枚が板状にピレノイド先端からピレノイド基部付近まで縦方向に陥入する「深裂型」であることが判明した。また、ヌクレオモルフはピレノイドの基部付近の葉緑体周縁区画内に位置していた。さらに、分子系統解析では *L. amoebiformis* 系統群の中に位置することが示された。従って、P329 株は *Lotharella*

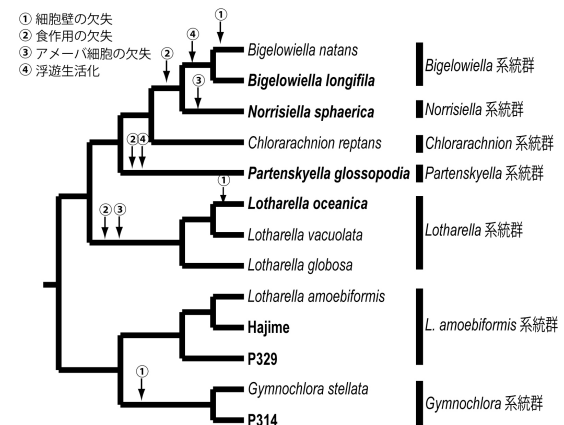
属に分類するのが妥当であるという結論を得ている。P329株は、栄養細胞がアメーバ状である点で*L. amoebiformis* と類似するが、継代培養を繰り返すと、細胞が集まりコンパクト状細胞集塊を形成する。その集塊を植え替えてさらに数週間培養すると、細胞集塊の周りに小突起を多数伸ばした樹枝状細胞集塊になる。このような特徴は、*L. amoebiformis* ではなく、したがって*L. amoebiformis*とP329株を区別する明瞭な形質になり得る。したがって、P329株は*Lotharella* 属の新種とするのが妥当であると結論し、正式な記載を準備中である。

P314株：パラオ共和国より独自に確立したクロララクニオン藻の培養株で、栄養細胞は糸状仮足を有する底生性アメーバ状細胞である。P314 株のピレノイドは、葉緑体包膜の最内膜が管状にピレノイドマトリックス内に陥入しており、ヌクレオモルフはピレノイドの基部近く内の葉緑体周縁区画内に位置していた。これらの形質は*Gymnochlora*属の判別形質に完全に合致するため、本藻は*Gymnochlora* 属として分類される。*Gymnochlora* 属の唯一の既知種である*Gymnochlora stellata*と比較したところ、P314株は*G. stellata*とは異なる生活環の様式を持つことが判明した。P314 株にはカルチャー内に常に存在する扁平アメーバ状細胞が存在するが、*G. stellata*にはそのようなステージは存在しない。この特徴をもって、両者は明瞭に区別可能であり、P314 株を*Gymnochlora* 属の新種とした。この結論は核コード18S rDNA の系統解析からも支持された。

Hajime 株：パラオ共和国から独自に確立した培養株で、栄養細胞はアメーバ状である。ピレノイドの微細構造は深裂型であり、ピレノイドマトリックス内へ葉緑体包膜の内側の2枚が板状にピレノイド先端から基部付近まで陥入していた。ヌクレオモルフはピレノイド基部付近の葉緑体周縁区画内に位置していた。これらの微細構造的特徴より、Hajime 株は*Lotharella* 属に分類される。栄養細胞がアメーバ状を呈する*Lotharella* 属の種は*L. amoebiformis* とP329株が存在するが、Hajime 株は、P329株に特有な細胞集塊を形成しない点でP329株とは異なる。Hajime 株のアメーバ状細胞は*L. amoebiformis* のアメーバ状細胞と酷似しており、栄養細胞の形態のみでは*L. amoebiformis* と区別不可能である。本藻は培養令初期に複数本の角状仮足を放射状に伸ばした浮遊細胞が出現させる。*L. amoebiformis* の原記載には浮遊ステージの報告はなく、したがって、本藻の生活環様式は*L. amoebiformis* の生活環とは異なる。ただし、本藻における浮遊ステージは、培養令

の初期に僅かしか出現せず、観察条件によっては、まったく浮遊ステージが出現しない場合もある。このため、*L. amoebiformis* の生活環に浮遊ステージがないとは言い切れず、今後の詳しい観察によっては、*L. amoebiformis* が浮遊ステージを出現させる可能性は十分にある。このため、本藻は*L. amoebiformis* と明瞭に区別することができない。したがって、現段階ではHajime 株は*L. amoebiformis* と考えるのが妥当である。今後の詳しい検討によっては、両者間には種内分類群程度の違いがあるかもしれないが、本研究では、Hajime 株を*L. amoebiformis* と同定した。

4) 光合成生物としての適応進化：本研究により多くの新規分類群が発見され、クロララクニオン藻の様々な形質（底生性か浮遊性か、細胞壁の有無、生活環のパターン、食作用の有無、など）の多様性が明らかとなってきた。これらの形質と本研究で行なった詳細な分子系統解析の結果を重ね合わせることにより、クロララクニオン藻における「植物」としての適応進化について考察を行なった。まず、主に系統的証拠から、クロララクニオン藻の祖先状態はアメーバ、球状、遊泳性の3つの細胞ステージが存在していたと想定した。その結果、*Gymnochlora/L. amoebiformis* 系統群では、細胞壁を失いアメーバ状で底生性の生活を営む方向への進化がおこっていることが予想された。また、細胞が比較的大きく食作用も維持している傾向が見られる。一方、*Lotharella* 系統群および*Norrisiella* (BC52) 系統群では、アメーバ細胞を失い厚い細胞壁を形成する不動性の生活様式へと進化していると考えられる。



図：クロララクニオン藻の主要系統群間の系統関係と植物化に伴う形質の進化。
太字：本研究で扱った種／培養株。

さらに*Partenskyella* (RCC365)、*Bigelowiella* 両系統群は小型化して浮遊生活に適応した形態・生活様式へと進化したと考えられる。また、クロララクニオン藻の多様化の過程で、少なくとも細胞壁の縮小／消

失が3回、アメーバ細胞の消失が2回、食作用能の欠失が3回独立におこったことも示された(図)。クロララクニオン藻が二次共生により葉緑体を獲得して以来、各系統群が光合成生物として独自の様々な方向へ進化してきた軌跡が読み取れる。本研究は、クロララクニオン藻が葉緑体獲得により原生生物が「植物化」する過程で細胞形態や生活様式がどのように変化するかを見る上で最適な生物群の一つであることを示しており、今後より詳細で深いレベルでの研究を継続していく価値があることを提示している。

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8件: 全て査読あり)

- (1) Bass D., Chao E., Nikolaev S., Yabuki A., Ishida K., Berney C., Pakzad U., Wylezic C., and Cavalier-Smith T. (2009) Phylogeny of novel naked filose and reticulose cercozoa: Granofilosea cl. n. and Proteomyxidea revised. *Protist* 160(1):75-109.
- (2) Ota S., D Vaultot, Le Gall F., Yabuki A. and Ishida K. (2009) *Partenskyella glossopodia* gen. et sp. nov., the first report of a chlorarachniophyte that lacks a pyrenoid. *Protist* 160(1):137-150.
- (3) Ota S., Ueda K. and Ishida K. (2007) *Norrisiella sphaerica* gen. et sp. nov., a new coccoid chlorarachniophyte from Baja California, Mexico. *J. Plant Res.* 120(6):661-670.
- (4) Ota S., Ueda K. and Ishida K. (2007) Taxonomic study of *Bigelowiella longifilata* sp. nov. (Chlorarachniophyta) and a time lapse video observation on the unique migration manner of amoeboid cells. *J. Phycol.* 43:333-343.

[学会発表] (計16件)

- (1) Ishida K. Chlorarachniophytes. The Tree of Life Web Project Protist Diversity Workshop, 19-20 July (2008), Lord Nelson Hotel, Halifax, Nova Scotia, Canada
- (2) Yabuki A., Ota S. and Ishida K. Phylogeny and classification of chlorarachniophytes. 16th Meeting of the International Society for Evolutionary Protistology, 1-5 August (2006) Wroclaw, Poland
- (3) Ishida K., Yabuki A. and Ota S. The evolution and diversity of chlorarachniophytes. The symposium on "Unravelling the algae - the past, present and future of algal molecular systematics" 11-12 April (2006) Natural History Museum,

London, UK

[図書] (計3件)

- (1) Ota S. and Ishida K. (2008) Chlorarachniophytes. In: *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester <http://www.els.net/> [DOI: 10.1002/9780470015902.a0003060.pub2]
- (2) Ishida K., Yabuki A. and Ota S. (2007) The chlorarachniophytes: evolution and classification. In Brodie J. and Lewis J. (eds) *Unravelling the Algae: The Past, Present, and Future of Algal Systematics*. CRC Press, Boca Raton, FL., pp. 171-182.
- (3) 石田健一郎、小池さやか、平川泰久 (2007) 葉緑体の誕生と水平伝播. 細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ 23 「植物の進化」 (清水健太郎、長谷部光泰 監修) 秀潤社 P. 183-191.

[その他]

- (1) アウトリーチ: 石田 健一郎 「へんてこ生物」が人類を救う? 自然に学ぶ循環型社会—藻類編—サイエンスアゴラ 2008、国際研究交流大学村、東京 (講演)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 健一郎 (ISHIDA KENICHIRO)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授
研究者番号: 30282198

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし