

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19870018

研究課題名（和文） 外洋性渦鞭毛藻類の系統分類学的研究

研究課題名（英文） Molecular phylogeny and taxonomy of open ocean dinoflagellates

研究代表者

高野 義人（TAKANO YOSHIHITO）

長崎大学・環東シナ海海洋環境資源研究センター・産学官連携研究員

研究者番号：10435852

研究成果の概要：単細胞 PCR 法を用いて外洋性渦鞭毛藻類の形態記録を伴う DNA 配列蓄積と分子系統解析を行った。ディノフィシス目 6 属 32 種、*Ceratium* 属 29 種の観察・単細胞 PCR 処理を行った。系統解析結果から、ディノフィシス目の属分類の見直しを行い、さらに、藍藻類を細胞外共生体として持つものについては、ホストと共生藍藻は共に同じ 2 つの系統群に分かれたことからそれぞれ異なる共生藍藻を独立に獲得したと、共生藍藻とホストとの種特異性を明らかにした。*Ceratium* 属については、現在設立されている 4 つの亜属を初めて支持した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,320,000	0	1,320,000
平成 20 年度	1,310,000	393,000	1,703,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,630,000	393,000	3,023,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物多様性・分類

キーワード：分類学・系統進化・多様性・分子系統学

1. 研究開始当初の背景

渦鞭毛藻類は単細胞生物で、海水域から淡水域まで広く分布している。現在全体で約 2,000 種が知られており、その多くが海産種であり、約 1,800 種が知られている。そのうち、約半数が独立栄養性であり、約半数は従属栄養性である。海産渦鞭毛藻類は、熱帯から寒帯までの沿岸域、外洋域、タイドプール、砂地など様々な環境に生育している。沿岸域では、赤潮を形成し漁業被害を引き起こす種も知られている。そのため、沿岸性種については、生理学的にも系統分類学的にも良く研究されている。生理学

的・系統分類学的研究を行うためには、培養株の確立が基本的に不可欠であり、富栄養な環境を好む沿岸性種の培養は比較的容易であることもその理由の一つといえる。沿岸性種については近年の分子系統学的手法を用いた系統分類学的研究によって、系統関係を反映した分類体系の再構築が進んでいる。それに対して、貧栄養な外洋（特に暖海）に棲息する種については、古くから世界各地で観察・記載されており、形態分類学的知見は多く、形態的にも生活戦略的にも多様な渦鞭毛藻類が知られているが、外洋性種は葉緑体の有無に関わら

ず培養が非常に困難なことから、国内・国外ともに分子系統学的解析は行われておらず、外洋性種を主なターゲットとした系統分類学的研究は今までにない。そのため、我々は外洋性種の系統分類学的知見を欠いており、沿岸性種との比較ができず、渦鞭毛藻類の系統分類学的・進化的考察を行う上でネックであると言える。

2. 研究の目的

本研究では外洋性種に着目し、特に黒潮系水に棲息する暖海性の渦鞭毛藻類について、分子データの蓄積と分子系統解析を行うことによって、その系統学的位置と沿岸性種との系統関係を明らかにし、現在の分類体系が系統を反映しているのかを検証し、分類体系の再構築を行うことを目的とする。また、分子系統解析の結果から渦鞭毛藻類の進化、特に生育環境の変化（沿岸⇔外洋）に伴う形態の進化について考察することも目的とする。

3. 研究の方法

平成19年9月から平成21年3月まで、東シナ海海域（長崎県五島列島周辺海域）において合計78回、表層水20Lの採水を行った。研究室に持ち帰った後、目合い5 μ mのプランクトンネットを用いて濃縮した。また、広島大学練習船豊潮丸平成20年度第2次調査航海（広島県呉港～沖縄県那覇港往復、平成20年5月19～29日）において、汲み上げ海水を目合い10 μ mのプランクトンネットを用いて30～40分間濾過した29サンプルを得た。倒立型光学顕微鏡（オリンパスIX50）を用いて検鏡を行い、外洋性種を見出した。詳細な形態観察（正立型顕微鏡、オリンパスBX71）からDNA配列決定までは、Takano and Horiguchi (J. phycol. 42(1), 251-256, 2006)の方法に基づく単細胞PCR法を用いた。この方法により、培養株の確立に左右されずに一個体からの詳細な形態記録を伴うDNA配列データを得ることが可能である。分子系統解析には、主にSSU rDNA配列とLSU rDNA部分配列を用いた。また、分類群によっては、種間の関係をより良く解明するために、ITS1-5.8S-ITS2領域の配列を用いた。

4. 研究成果

(1) 採取した海水の中から、藍藻を細胞外共生体として持つものを含むディノフィシス目について6属32種、*Ceratium*属について29種の観察・単細胞PCR処理を行った。日本における定期的な外洋性渦鞭毛藻類の出現調査・観察記録はなく、今回の結果は東シナ海日本周辺域における外洋性渦鞭毛藻類相とその多様性を示す、また、各種の季節

的消長をも示すものとして重要である。

(2) ディノフィシス目渦鞭毛藻類については、沿岸域において良く見られる *Dinophysis* については貝の毒化の原因生物と言うこともあり良く研究されている。しかし、それ以外は外洋性種であるため入手が困難なことから、ほとんど研究されておらず分子系統解析は行われていない。また、ディノフィシス目の外洋性種である *Ornithocercus*, *Histioneis*, *Parahistioneis*, *Citharistes* は横溝の前後に付属する翼片を極端に発達させ、その空間に単細胞の藍藻類 (*Synechococcus* や *Synechocystis*) を細胞外共生体としているものが知られている。これまで、透過型電子顕微鏡観察によって、形態学的に4タイプの藍藻類が共生していること、同一ホストに形態学的に異なる2タイプの藍藻類が共生していることが明らかになっている。しかし、培養が困難であることから、この特徴的な共生現象を見せるグループについて、ホストである渦鞭毛藻類の、さらには細胞外共生体である藍藻類の分子系統学的アプローチは未だ為されていない。

ディノフィシス目渦鞭毛藻類6属32種 (*Dinophysis* 5種, *Ornithocercus* 3種, *Histioneis* 2種, *Parahistioneis* 1種, *Amphisolenia* 1種, *Triposolenia* 1種) のSSU rDNA配列とLSU rDNA部分配列の決定に成功した。系統解析の結果、ディノフィシス目の単系統性が示され、5つのクレード; (1: *Amphisolenia*, *Triposolenia*, (2: *D. rotundata*, *D. rudgei*, (3: *D. schuetti*, *D. fortii*, *D. infundibulus*, 4: *Ornithocercus* spp., 5: *Histioneis* spp., *Parahistioneis*))) に分かれた。クレード2は *Phalacroma* の特徴を有しており、*Phalacroma* は近年 *Dinophysis* のシノニムとして扱われているが属としての独立性が示された。

藍藻類を細胞外共生体として持つグループは、その特異的な特徴から起源を共にすると考えられてきたが、2つのクレード(4と5)に分かれた。*Ornithocercus* の単系統性は示されたが、*Histioneis* と *Parahistioneis* が単系統群となり属の有用性についてはそれぞれの種数を増やしたさらなる解析が必要である。また、共生藍藻のSSU rDNA配列

の決定にも成功し解析したところ、ホストのクレードと対応して2つに分かれた。これらの結果から、それぞれ異なる藍藻類を細胞外共生体として独立に獲得したことが明らかとなった。さらに、種間について見てみると、*Ornithocercus* 3種(*O. magnificus*・12細胞, *O. steinii*・6細胞, *O. thumi*・4細胞)では18S rDNA 配列ではほとんど変異が無く種の識別は行えなかったが、ITS 領域を用いた系統解析の結果、3種はそれぞれ単系統群となった。また、*O. magnificus*では、2つのクレードに分かれ、それぞれに形態的差異が認められた。共生藍藻の16S rDNA 配列の解析の結果、今回得られたサンプルでは一つの宿主細胞のものからは単一の配列が得られ、その系統樹の樹形はホストの樹形と一致していた。また、*Histioneis*と*Parahistioneis*についても、ホストの18S rDNA 配列に基づく系統樹と共生藍藻の16S rDNA 配列に基づく系統樹の樹形は一致していた。これらのことから、ホストと共生藍藻との種特異性が示され、それぞれが一度共生藍藻を獲得した後に、ホストは共生藍藻と共に種分化していることが明らかとなった。

本研究でのディノフィシス目内の属の分岐順はこれまでの研究において形態を基に考えられてきた進化の道筋とは大きく異なり、ディノフィシス目渦鞭毛藻類の形態進化は複雑であり、形態の変異は突発的であり、我々の想像を超えるものであった。また、装飾物が良く発達しており華美である外洋性種から一度だけ装飾物のほとんどない沿岸性種(*Dinophysis*)が進化した。貧栄養な外洋では、なるべく表層を漂うための装飾物と共生藍藻を獲得することで生存し、富栄養な沿岸域では装飾物と共生藍藻に依存するのではなく、*Dinophysis*に良く見られるクリプト藻類を捕食しその葉緑体を利用して織毛虫類を捕食しさらにその葉緑体を利用するというクレプトクロプラストを行うことで適応したと考えられる。渦鞭毛藻類と共生藍藻の進化的関係の解明はこれまで行われていなかったが、本研究での一対一観察による宿主の種同定とDNA配列と、共生藍藻のDNA配列とを同時に入手することで初めて可能となった。

(3) *Ceratium*は、最も古い属の一つで1793年に設立されて以降、120種以上が記載され、さらに80以上のシノニムとして扱うべきか曖昧な種名や変種名が存在し、属内の分類は混乱の中にあると言える。この属の種を特徴づける主な分類形質は、細胞のサイズ、細胞上方に伸びる前角と後方に伸びる2~3本の後角の伸びる向きと長さ、鎧版表面の模様や度合いである。しかし、前後角の向きや長さには中間的と考えられる個体が多数存在し、その形質の差異は連続的であると言える。そのため、それぞれの形態が種として扱われることや、種内の季節的な形態変異と見なされることがあり、種レベルでの分類が混乱している。また、*Ceratium*は4つの亜属に分けられている。しかし、これまで7種のリボゾーマルDNA配列が決定されているのみであり、属内の分類体系を見直すには不十分である。本研究では、できるだけ多くの種・個体について形態観察を行い、単細胞PCR法を用いてDNA配列を決定することによって、*Ceratium*の種レベルでの分類学的問題の解決、属内分類体系の再評価と再構築を行い、形態の進化についての考察を行う。さらに、研究代表者のこれまでの研究において淡水産*Ceratium*3種のリボゾーマルDNA配列を決定しているため、そのデータも含めて解析することにより、海産種と淡水産種との系統関係を明らかにし、本属の淡水への移入についても考察する。

*Ceratium*についての系統解析の結果は、現在設立されている4つの亜属(*Ceratium*亜属、*Amphiceratium*亜属、*Archaeoceratium*亜属、*Tripoceratium*亜属)を初めて支持した。また、*Tripoceratium*亜属においては後角の長さは個体変異が多く、後角の伸びる向きが種を識別するのに重要であることが明らかとなった。*Ceratium*の淡水への移入は一度であることも示された。

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)

[学会発表] (計 3件)

① 高野義人・岩滝光儀・松岡数充、黒潮及び対馬暖流域のディノフィシス目渦鞭毛藻類の出現とその分子系統学的研究、日本藻類学会第33回大会、2009年3月27日、琉球大学

② Yoshihito Takano, Mitsunori Iwataki and Kazumi Matsuoka, Molecular phylogeny of both host and cyanobiont of the genus *Ornithocercus*, Eight International Conference on Modern and Fossil Dinoflagellates, DIN08, 2008年5月6日, Université du Québec à Montréal (UQAM), Montreal, Quebec, Canada

③ 高野義人・岩滝光儀・松岡數充, *Ornithocercus* 属渦鞭毛藻類とその共生藍藻の系統学的研究, 日本藻類学会第32回大会, 2008年3月22日, 東京海洋大学品川キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 義人 (TAKANO YOSHIHITO)

長崎大学・環東シナ海海洋環境資源研究センター・産学官連携研究員

研究者番号: 10435852