

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840133

研究課題名(和文) アルベオラータ下界ミゾゾア門内の初期分岐系統に関する分類学的研究

研究課題名(英文) Taxonomic studies on early-branching myzozoan protists

研究代表者

矢吹 彬憲 (Yabuki, Akinori)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生物多様性研究分野・研究員

研究者番号：20711104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：助成期間中に合計59株の培養株を確立することに成功した。それらを用いた分類学的な研究から、過去にミゾゾア内のメンバーとして記載された *Hemistasia phaeocysticola* が系統分類学的には、ユーグレノゾアに属することを明らかにし、分類学的な組み替えを行った。その他の培養株についても分類学的な研究を行い、真核微生物の多様性に関する理解を推し進めた。難培養性の祖先的ミゾゾア類については、単離細胞を用いた解析を行い多様性把握に向けた研究を行った。得られた培養株を用いて、ミトコンドリアゲノム・遺伝子構造が複雑化するプロセスに関する研究を行い、知見を得た。

研究成果の概要(英文)：We successfully established 59 cultures of microbial eukaryotes in total and taxonomic studies have been conducted using these cultures. For instance, one culture was of *Hemistasia phaeocysticola* which was originally described as a member of Myzozoa. The phylogenetic analyses newly revealed that *H. phaeocysticola* does not belong to Myzozoa, but to Euglenozoa. Hence, *H. phaeocysticola* was taxonomically transferred into Euglenozoa in the published paper. By the further and continuous taxonomic studies using other cultures, the diversity of eukaryotic microbes will be understood more properly. When it was difficult or impossible to establish the cultures of the target protists, we conducted the taxonomic studies with the isolated cells. We also conducted the study to understand how complex structural mitochondrial genome and genes have been established by analyzing the established cultures during this period.

研究分野：進化原生生物学

キーワード：系統分類 真核微生物 多様性

## 1. 研究開始当初の背景

真核微生物の多様性に関する研究の歴史は長く、これまでに様々な系統に属する真核微生物についてその系統分類学的な研究が進められてきた。その結果、現在では真核微生物は真核生物ドメイン内に幅広く分布し真核生物が独自に獲得してきた様々な形質の成立プロセスとメカニズムを理解する上で極めて重要な研究対象として認識されている。その一方で、近年盛んに行われるようになった環境クローン解析の結果から、真核微生物の多様性に関する理解は未だ十分ではなく、野外環境中には数多くの真核微生物が未発見、あるいは十分な研究がされないまま残されていることが明らかとなってきた。環境クローン解析では、その手法の特性上、対象とする環境に生息する生物の遺伝情報は収集できるものの、その生物が有していた形態や性質に関する情報を得ることができない。そのため、それら環境クローン解析から存在が示唆されているものの実体が不明な真核微生物については伝統的な手法、すなわち顕微鏡下での丹念な観察と単離による培養株の確立から始まる系統分類学的な手法による研究の遂行とその理解が期待されていた。

アルベオラータ生物群(アルベオラータ下界)は、光合成性・捕食性・寄生性といった幅広い性質の真核微生物より構成される真核生物ドメイン内の巨大生物群である。水圏の重要な一次生産者である渦鞭毛藻や人獣に重篤な感染症を引き起こすアピコンプレクサ類を含み、生態学的にも疫学的にも重要な生物群として認識されている。分類学的には、ミゾゾア門と繊毛虫門を内包し(Cavalier-Smith and Chao 2004. Eur. J. Protistol. 40: 185-212),ミゾゾア門内には多数の下位分類群が提唱されており、その整理が課題として認識されていた。また、ミゾゾア門の初期分岐系統と考えられる配列も環境クローン解析から報告されており(Janouškovec et al. 2012. Current Biology. 22: R518-R519),それらの配列を担う真核微生物の同定とその知見に基づく新たな分類体型の提唱、さらにはミゾゾア門内の初期進化の解明が待たれていた。

## 2. 研究の目的

生物学における基盤情報であり、頑健な分類体型を構築する上でも必須な正確な多様性の把握をアルベオラータ下界のサブグループであるミゾゾア門内の初期分岐系統、特にプロトアルベオラータ類・アピコモナス類に属する真核微生物に特に着目し推し進める。またそれによって得られた知見を基に、ミゾゾア門内の系統分岐関係を理解し新たな分類体型の提唱を目指す。確立された培養株を用いて、真核生物が有するユニークな特徴(例えば、栄養摂取様式の変化や特殊な遺伝子発現様式の成立プロセスなど)の成立し

たプロセスやメカニズムに関する知見を得る。

## 3. 研究の方法

(1) 様々な環境においてサンプリングを行い多数の真核微生物培養株を確立した。サンプリングは、幅広い環境を対象とすべく、干潟・湾内・海水湖・外洋海水・沿岸海水・深海試料等の多岐にわたるものを用いた。様々な栄養培地や培養条件を検討するとともに、確立された培養株を用いた培養実験を行い、より効率的な培養株の作成方法を検討した。また、より発展的な研究(RNA/DNA-seqやプロテオーム解析等)を実施する際に必要となる単相無菌株を構築すべく複数の抗生物質(例えば、アンピシリン、カナマイシン、ストレプトマイシンなど)を用いた培養実験を行った。これにより、対象生物には影響の出ない(出にくい)抗生物質の至適濃度を検討した。

確立した培養株は、分子系統解析による系統的位置の推定とともに、光学・電子顕微鏡下での観察を行い形態情報の収集を行った。また、細胞分裂の様式は生活環における細胞挙動の変化の有無を確認した。得られた知見に基づき、分類学的処置を施した。また一部は現在進行中であり、十分な情報が得られ次第、報告していく予定である。

(2) 確立された培養株を用い、真核生物が独自に確立した形質の成立プロセスの理解に向けた研究を行った。予備的な解析から、YPF1303株はミゾゾア類・ユーグレノゾア類の特徴である断片化した遺伝子を有していることが示唆されていた。そこでYPF1303株(のちに*H. phaeocysticola*と同定)のミトコンドリアゲノムの増幅とシーケンスを行うとともに、複数のミトコンドリア遺伝子のcDNA配列の全長を取得した。得られたゲノム情報をcDNA情報の比較から、ゲノム上での遺伝子の分布様式(断片化の程度や染色体上での位置)を解析した。またゲノムから転写されたmRNAが翻訳可能なmRNAに成熟するまでのプロセスや特定の塩基の挿入や置換といったRNA編集の有無を確認した。遺伝子構造を近縁種、および類似の構造が知られている生物種のものと比較し、その成立に至るプロセスについて議論した。

(3) 難培養性のミゾゾア類については、培養を介さず、発見した細胞を直接用いて系統分類学的研究を行った。干潟、および深海底泥より多毛類の探索を行い、これまでに祖先的アピコンプレクサ類であるグレガリン類のホストとしての報告がない多毛類の選定を行った。顕微鏡下で、多毛類を解剖したのちに腸管内からグレガリン類の探索を行った。発見されたグレガリン類は、マイクロキャピラリーを用いて単離したのちに、DNAを抽出しマーカー遺伝子の増幅・シーケンス

を行い、その系統的位置を解析した。形態情報は、光学顕微鏡下での観察に加え、単離細胞を用いた電子顕微鏡による観察も行った。得られた知見に基づき、分類学的結論を導き出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) *Hemistasia phaeocysticola* の系統的位置の解明と分類学的組み替え、その他培養株を用いた研究

*Hemistasia phaeocysticola* は、プロトアルベオラータの一種として記載された珪藻寄生性の鞭毛虫である。過去に微細構造の観察は行われていたものの、その系統的位置を分子情報を用いて検証した研究はなく、その実施が待たれていた。新たに確立した培養株 (YPF1303) を用いて系統的位置を検証したところ、本生物はプロトアルベオラータ下門ではなくユーグレノゾア門に属することが明らかとなった。本知見を基に、*H. phaeocysticola* の所属分類群の組み替えを行い、その成果を原著論文として公開した (Yabuki & Tame 2015 *Journal of Eukaryotic Microbiology* 62: 426-429.)

プロトアルベオラータ類と生活様式・栄養摂取様式が類似している *H. phaeocysticola* の培養株を用いた培養実験から効率的な培養株の樹立方法を確立。また本種は、ペニシリン・ストレプトマイシン・ネオマイシンの抗生物質混合液を培地 1 ml につき 10 µl 添加した培地中では影響を受けず増殖することが明らかとなり、この培養系から単相無菌株を確立することに成功した。本培養方法 (抗生物質濃度は、固定ではなく複数の濃度条件) の適用により、現在までに多数の培養株を確立することに成功した。得られた培養株を用いた系統分類学的研究は、現在進めている。

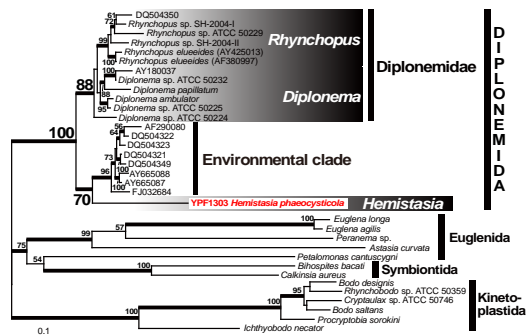


図1 18S rDNA 遺伝子の解析により示された YPF1303 株の系統的位置

##### (2) *Hemistasia phaeocysticola* のミトコンドリアゲノム・遺伝子に関する研究

*Hemistasia phaeocysticola* のミトコンドリア

ゲノムは、複数の環状染色体より構成され各染色体には断片化した遺伝子がコードされていることを明らかにした。遺伝子の断片化の程度はこれまでに知られている中で最も細かく *cox1* 遺伝子では断片の平均長が約 66 bp であった。さらにそれらの断片化した遺伝子は、独立に転写された後に連結し翻訳可能な mRNA へと成熟していく過程で、A → I, C → U, および U の挿入といった RNA 編集を受けている可能性が強く示唆された。またそれらの編集を受ける箇所は、既知のいずれの生物と比較しても多いことが確認された。この特殊なゲノム・遺伝子の構造は、ミゾゾア門、ユーグレノゾア門の生物からすでに報告がある特徴であるものの、その断片化の程度や編集部位の数がより際立ったものとなっており、遺伝子・ゲノム構造の複雑性がより進んだものであることが明らかとなった。断片化が進んだ理由は明確ではないものの、その進行の速度が系統により大きく異なることが明らかとなった。これらの知見は、既に原著論文としてまとめ、報告準備中である。この複雑性の増長が起こるメカニズムと転写された RNA の成熟に関わるメカニズムを解明し、生物進化のプロセス解明の一助とする予定である。

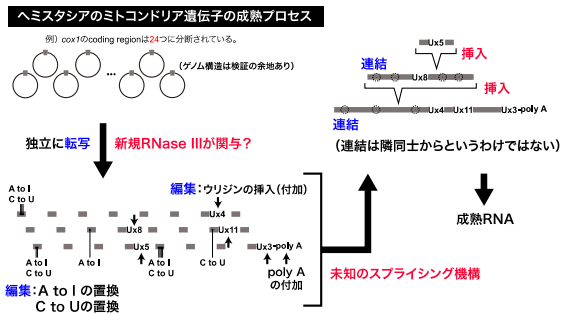


図2 *Hemistasia phaeocysticola* のミトコンドリア内で起こる遺伝子成熟の概略図

##### (3) 祖先的ミゾゾア生物であるグレガリン類の多様性理解に向けた研究

グレガリン類は、アピコンプレクサ亜門内の祖先的系統であり、様々な無脊椎動物の腸管に寄生している。その多様性の理解は未だ十分ではなく、グレガリン類の微細構造的特徴も含めた正確な多様性を理解することで、スポロゾア門、ミゾゾア門における形態・生活様式の進化に関する理解が大きく進むと期待されている。そこで、これまでグレガリン類の探索が行われていなかった干潟および深海域に生息する多毛類において新規グレガリン類の探索を行い、未記載種 (および新規系統) と考えられる複数のグレガリン類を得ることに成功した。現在までに得られた個体を用いた観察、および系統的位置の推定を行い、

得られた個体の多くが未記載種であるとの結論を得た。さらなる詳細な観察を行い祖先的特徴の把握を目指すとともに、分類学的処置の報告を含む原著論文を準備中である。

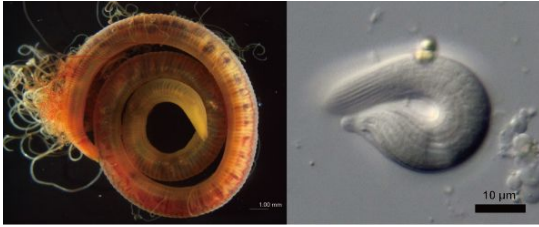


図 3 ミズヒキゴカイとそこから発見した未記載種と考えられるグレガリン

#### 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 1件)

Yabuki A. and Tame A. Phylogeny and Reclassification of *Hemistasia phaeocysticola* (Scherffel) Elbrächter & Schnepf, 1996. 2015 *Journal of Eukaryotic Microbiology* 62: 426-429. 査読あり DOI: 10.1111/jeu.12191

[学会発表](計 5件)

Lukeš J., Flegontova O., Flegontov P., Factorová D., Kaur B., Votýpka J., Tashyreva D., Yabuki A., Malviya S., de Varga C., Bowler C., Burger G. and Horák A. Diplonemids - New kids on the block. PROTIST-2016. 9<sup>th</sup> June 2016. Moscow State University (Moscow, Russia)

Yabuki A., Kusaka C., Votýpka J., Horák A. Lukeš J. and Fujikura K. Unravelling the diversity of diplomonads by culture-based taxonomic study. PROTIST-2016. 7<sup>th</sup> June 2016. Moscow State University (Moscow, Russia)

Butenco A., Yabuki A., Flegontova O., Horák A. Flegontov P. and Lukeš J. Genome and transcriptome of *Hemistasia phaeocysticola*, a flagellate related to a novel hyper-diverse clade of marine protists. PROTIST-2016. 7<sup>th</sup> June 2016. Moscow State University (Moscow, Russia)

矢吹 彬憲, 日下 智保, 藤倉 克則 一大未知生物群プランクトン性ディプロネマ類(ユーグレノゾア)の多様性解明に向けた研究 日本藻類学会第40回大会 2016年3月19日 日本歯科大学(東京都千代田区)

矢吹 彬憲, 谷藤 吾朗, 日下 智保, 瀧下 清貴, 藤倉 克則 *Hemistasia phaeocysticola* のミトコンドリアゲノムにコードされた遺伝子の構造に関する研究 第48回日本原生生物学会大会 2015年11月8日 国立感染症研究所戸山庁舎(東京都新宿区)

Yabuki A. and Kusaka C. Mitochondrial genome architecture of a newly identified diplomonid *Hemistasia phaeocysticola*. The Society for General Microbiology Annual Conference 2015. 1<sup>st</sup> April 2015. The ICC Birmingham (Birmingham, UK)

矢吹 彬憲 “みなしご”原生生物の研究によりあぶりだされる真核生物進化 第84回日本寄生虫学会大会 原生生物学会出張シンポジウム「原生生物における多様性と普遍性」(招待講演) 2015年3月21日 杏林大学(東京都三鷹市)

矢吹 彬憲 *Hemistasia phaeocysticola* のミトコンドリア遺伝子の構造と trans-splicing に関する研究 第3回マトリョーシカ型生物学研究会 2014年7月13日 神戸大学(兵庫県神戸市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

矢吹 彬憲 (Yabuki, Akinori)  
国立研究開発法人 海洋研究開発機構・  
海洋生物多様性研究分野・研究員  
研究者番号: 20711104

##### (2) 連携研究者

Kevin Wakeman  
北海道大学・国際本部・助教  
研究者番号: 70760221

##### (3) 研究協力者

日下 智保 (Kusaka, Chiho)  
多米 晃裕 (Tame, Akihiro)  
自見 直人 (Jimi, Naoto)