

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23405013

研究課題名(和文)ミトコンドリアをもたない真核微生物群フォルニカータの多様性の解明

研究課題名(英文) Diversity and evolution of a canonical mitochondrion-lacking protist group, Fornicata

研究代表者

橋本 哲男 (HASHIMOTO, Tetsuo)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：50208451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：フォルニカータ生物群は嫌気環境に生育する鞭毛虫からなる系統群であり、環境DNA解析から多様な生物種の存在が示唆されている。これまでに調べられたいずれの生物も、酸素呼吸を行う典型的なミトコンドリアをもたず退化型のミトコンドリアをもっているため、ミトコンドリアの縮退進化を解明する上で適切なモデル系と考えられる。しかしながら、実際に単離・培養されているフォルニカータ生物の種類は必ずしも多くないため、自然環境中から新奇フォルニカータ生物を見出すことを目的として研究を行った。これまでに数種のフォルニカータ生物を含む10種以上の新規嫌気性真核微生物の単離・培養株化に成功し、一部については記載を行った。

研究成果の概要(英文)：Fornicates are a micro aerophilic or anaerobic flagellate group of which diversity has been revealed by environmental DNA analyses. All fornicate organisms whose cellular structures were investigated up to recently have no canonical mitochondria with aerobic respiration, but instead have reduced mitochondria, suggesting that fornicates are an appropriate model system to understand cellular evolution of the reducing process of mitochondria. However, since there still are a few fornicate organisms which have already been isolated and cultured in laboratories, we tried to establish novel cultures for fornicate organisms by exploring natural environments. In this project, we established more than 10 novel cultures for micro aerophilic or anaerobic eukaryotic organisms including several fornicates, and we described a part of them.

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：フォルニカータ 嫌気・微好気環境 退化型ミトコンドリア 新奇真核微生物 培養株

1. 研究開始当初の背景

フォルニカータ生物群は嫌気性の真核微生物からなる系統群であり、ディプロモナス、レトルタモナス、カルペディエモナスなどの鞭毛虫からなる小分類群を含んでいる。いずれの分類群も典型的なミトコンドリア (mt) をもたない生物のみから構成されている。フォルニカータは、トリコモナスなどを含む mt を持たない鞭毛虫グループであるパラバサリアと姉妹群を形成する。フォルニカータ・パラバサリアに含まれる現生物種は mt を 2 次的に喪失したと考えられている。実際、mt が退化 (進化) してできたオルガネラとして、ディプロモナスに属するランブル鞭毛虫 (*Giardia*) においてはマイトソームが、トリコモナス (*Trichomonas*) ではヒドロゲノソームが研究されている。

研究代表者の橋本らは、これまでに mt をもたない真核微生物、特に寄生性生物とその関連生物を中心に分子系統学的研究に携わってきた。一方、研究分担者の稲垣らは、mt をもたない自由生活性の真核生物の多様性研究に参画し、国内の複数の嫌気性海水環境の調査を通じて、フォルニカータ生物群に所属するカルペディエモナス様鞭毛虫 (*Carpediemonas*-like organisms, CLO) をいくつか単離・株化し一部を記載した。それら記載種・分離株に関する SSUrRNA による詳細な分子系統解析は、稲垣およびカナダ・ダルハウジー大学の A. Roger と A. Simpson らとの共同研究により行われ、CLO がこれまでの我々の予想を超えて非常に多様であることを明らかにしてきた (Kolisko et al. 2010 *Env. Microbiol.*)

CLO は、これまで日本、北米、地中海、インド、オーストラリアの嫌気的海水/塩水環境から単離されており、CLO は地球上の嫌気環境において普遍的に存在する可能性がある。一方、これまでの真核微生物の多様性調査は必ずしもフォルニカータ生物群のみを対象としたものではないため、フォルニカータ生物群の真の系統的多様性はさらに巨大である可能性がある。フォルニカータ生物群の多様性の実態を明らかにするためには、この生物群に焦点を合わせた綿密な嫌気水圏環境の調査が必要であると考え、自然環境中の微生物調査の専門家である石田とともに本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

真核生物の中には、嫌気適応によってミトコンドリア (mt) を二次的に失った生物群が多数存在し、系統樹上に散在している。これらの生物は退化 (進化) 型の mt と考えられるヒドロゲノソームやマイトソームなどのオルガネラをもっている。mt からこのようなオルガネラへの進化の変遷を辿ることは真核生物の細胞進化史を明らかにする上で重要であるが、それらの機能の詳細や普遍性・多様性に関する知見は極めて乏しい。本

研究では mt をもたないものだけから構成される真核微生物のグループであるフォルニカータ生物群に注目し、その多様性と系統進化を解明することにより mt 関連オルガネラの進化史研究の基盤構築を行なう。そのため、これまでにフォルニカータが検出されていない海外および国内の嫌気水圏環境を調査し、環境 DNA 解析や嫌気・微好気培養により新たなフォルニカータ生物を多数見出し、それらをもとに系統分類・進化的な解析を行う。

3. 研究の方法

海外 2 か所 (パラオ、ノルウェー) および国内数カ所の嫌気水圏環境において採集したサンプルを嫌気的に粗培養した。粗培養によって生育してきた真核微生物種のうち、光学顕微鏡観察にてフォルニカータ生物および新奇真核生物と考えられる生物を分離・培養株化した。株化できた生物種について、光学顕微鏡観察、透過型電子顕微鏡観察により、詳細な形態情報を取得した。また、株化できたもののうち、解析上重要と考えられたフォルニカータ生物および新奇性の高い真核生物について、網羅的発現遺伝子 (EST) 解析を行った。EST データに基づき複数遺伝子からなる巨大アライメントを作成し、大規模分子系統解析 (phylogenomics) を行うことにより各生物種の系統的位置を検討した。また、一部の生物種については mtDNA のゲノム解析も行った。

4. 研究成果

(1) フォルニカータ生物群の系統関係の解明。これまでの SSUrRNA に基づく系統解析において、CLO には 6 つのサブグループ (CL1 ~ CL6) がありそれらのいずれもがレトルタモナスやディプロモナスに至る系統より先に分岐したことが明らかとなっていた。しかし、これら 6 グループの関係については解像度が低いために不明であった。そこで我々は、本研究のもとでダルハウジー大学との共同研究を実施し、新奇に単離し培養株化した CLO 生物種を含めて複数遺伝子の連結分子系統解析を行い、解像度の高いフォルニカータ系統樹を得ることに成功した。その結果、*Giardia* を含むディプロモナスの外側にレトルタモナス (*Retortamonas* sp.) が位置付けられ、それらの姉妹群として CL1 (*Dysnectes brevis*) が位置付けられること、その外側に CL6 (*Kipferlia bialata*) もしくはレトルタモナスと考えられてきた *Chilomastix* が位置付けられること、すなわち、レトルタモナスは多系統群であること、CL2 と CL3 が単系統群となることなどが明らかとなった (Takishita et al. 2012 *Protist*)。その後さらに、大量の EST データに基づく phylogenomics 解析により完全に解像されたフォルニカータ系統樹を得ることに成功した (投稿準備中)。この成果は、今後フォル

ニカータ生物群をモデル系として mt の縮退進化の過程を分子細胞生物学的に解析するための基盤を与えたものであり重要である。

(2) *Palpitomonas bilix* の系統的位。 *P. bilix* はパラオの海水湖から単離された従属栄養性鞭毛虫である。微細構造解析および複数遺伝子連結分子系統解析からは、 *P. vilix* を真核生物の系統樹上に位置付けることはできなかった (Yabuki et al. 2010 Protist)。そこで、本研究のもとで大量 EST データに基づく phylogenomics を行い、 *P. vilix* がクリプト藻類やゴニオモナス類に至る枝の根もとから分岐した生物であることを明確に示した (Yabuki et al. 2014 Sci. Rep.)。この成果は、今後未解明であるハクロピア生物群の系統進化を解明するために重要な知見である。

(3) *Tsukubamonas globosa* の系統的位。 *T. globosa* は筑波大学キャンパスの兵太郎池から単離された従属栄養性鞭毛虫である。微細構造解析および複数遺伝子連結分子系統解析からは、 *T. globosa* がジャコバ、ユーグレノゾア、ヘテロロボサからなるディスコバ生物群に属することが明らかとなったが、その中の正確な系統的位を明らかにすることはできなかった (Yabuki et al. 2011 J. Euk. Microbiol.)。そこで、本研究のもとで大量 EST データに基づく phylogenomics を行い、 *T. globosa* がユーグレノゾアとヘテロロボサの共通祖先に至る枝から分岐した祖先的生物であることを明確に示した。また、 *T. globosa* の mt ゲノムの全塩基配列を決定し、ディスコバ生物群の他生物の mt ゲノムと比較解析することにより、遺伝子レパートリーの変遷プロセスを明らかにすることができた (Kamikawa et al. 2013 Genome Biol. Evol.)。この成果は、今後さらにディスコバ生物群の系統進化を解明するとともに、原始的と考えられているものから縮退的なものまで広範な遺伝子レパートリーをもつディスコバ生物群の mt ゲノム進化を解明するために重要な知見である。

(4) 自由生活性 *Entamoeba* の発見。 *Entamoeba* 属はヒトの赤痢アメーバの病原体 (*E. histolytica*) を含む寄生性の生物からなる分類群である。本研究のもとで行われた鹿児島県西表島の嫌気的水圏環境調査において、マングローブ林から得られたサンプルの嫌気培養により自然環境からの自由生活性の *Entamoeba* を単離・培養株化することができた。SSU rRNA に基づく分子系統解析と微細構造解析はこの生物を明確に *Entamoeba* 属に位置づけた (記載論文の投稿準備中)。現在、大量 EST データの解析と全ゲノム解析を進めている。今後、 *E. histolytica* をはじめとする寄生種との比較解析を行うことにより、寄生適応の鍵となった遺伝子の解明に向

けた研究を展開できるものと期待している。

(5) 新奇の嫌気・微好気性真核微生物の単離と培養株化。本研究のもとで行われた、パラオ、ノルウェー、国内数カ所の嫌気水圏環境調査において、フォルニカータ生物を含む 10 種以上の新奇嫌気・微好気性生物を獲得することができた。今後、これらの培養株を用いて、微細構造解析、phylogenomics 解析を進めていく予定である。

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)

Yabuki A*, Kamikawa R*, Ishikawa SA, Kolisko M, Kim E, Tanabe AS, Kume K, Ishida K, Inagaki Y. 2014. *Palpitomonas bilix* represents a basal cryptist lineage: Insight into the character evolution in Cryptista. 【*equally contributed authors】 Scientific Reports 4:4641. doi:10.1038/srep04641 査読有。

Kamikawa R, Kolisko M, Nishimura Y, Yabuki A, Brown MW, Ishikawa SA, Ishida K, Roger AJ, Hashimoto T, Inagaki Y. 2014. Gene-content evolution in discobid mitochondria deduced from the phylogenetic position and complete mitochondrial genome of *Tsukubamonas globosa*. Genome Biology and Evolution 6:306-315. 査読有。

Kamikawa R, Brown MW, Nishimura Y, Sako Y, Heiss AA, Yubuki N, Gawryluk R, Simpson AGB, Roger AJ, Hahimoto T, Inagaki Y. 2013. Parallel re-modeling of EF-1 α function in eukaryotic evolution: Divergent, low-expressed EF-1 α genes co-occur with EFL genes in diverse distantly related eukaryotes. BMC Evol Biol 13:131. doi:10.1186/1471-2148-13-131 査読有。

Takishita K, Kolisko M, Komatsuzaki H, Yabuki A, Inagaki Y, Cepicka I, Smejkalova P, Silberman JD, Hashimoto T, Roger AJ, Simpson AGB. 2012. Multigene phylogenies of diverse Carpediemonas-like organisms identify the closest relatives of 'amitochondriate' diplomonads and retortamonads. Protist 163:344-355. 査読有。

Nishimura Y*, Kamikawa R*, Hashimoto T, Inagaki Y. 2012. Separate origins of group I introns in two mitochondrial genes of the katablepharid *Leucocryptos marina*.

【*Joint 1st authors】 PLoS One 7(5):e37307.DOI: 10.1371/journal.pone.0037307 査読有。
Ishikawa SA, Inagaki Y, Hashimoto T. 2012. RY-coding and non-homogeneous models can ameliorate the maximum-likelihood inferences from nucleotide sequence data with parallel compositional heterogeneity. *Evolutionary Bioinformatics* 8:357-371. 査読有。

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

〔学会発表〕(計6件)

橋本哲男. 生命の樹 昔と今. 日本進化学会第15回大会 進化生物学夏の学校, つくば, 2013.8.31.

Shiratori T, Ishida K. A novel endomyxan amoeboflagellate isolated from Pacific ocean. International Congress of Protistology (ICOP) XIV, Vancouver, Canada, 2013.7.28

橋本哲男, 神川龍馬, 林奈々子, 稲垣祐司. 嫌気性寄生原虫におけるエネルギー代謝関連酵素の分子進化. 第82回日本寄生虫学会, 東京, 2013.3.29.

神川龍馬, Kolisko M, Andersson J, Simpson AGB, Roger AJ, 稲垣祐司, 橋本哲男. 嫌気環境に適応したフォルニカータ生物群におけるミトコンドリア関連オルガネラのトランスクリプトーム比較解析. 第35回日本分子生物学会, 福岡, 2012.12.11.

神川龍馬, Kolisko M, Andersson J, Simpson AGB, Roger AJ, 稲垣祐司, 橋本哲男. フォルニカータ生物群におけるミトコンドリア関連オルガネラの縮退進化 ハイドロジェノソームからマイトソームへ. 第72回日本寄生虫学会東日本支部会・第10回分子寄生虫マリアフォーラム合同大会, 前橋, 2012.10.12.

Nishimura Y, Kamikawa R, Inagaki Y, Hashimoto T. A new strategy of organellar genome sequencing incorporating rolling circle amplification: protist mitochondria genomes. *Protist* 2012, Oslo, 2012.7.29.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 哲男 (HASHIMOTO, Tetsuo)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号：50208451

(2) 研究分担者

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