

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15173

研究課題名（和文）従属栄養性底生渦鞭毛藻の系統関係の解明と遊泳性渦鞭毛藻と統括した分類体系の再構築

研究課題名（英文）A molecular phylogenetic study of the heterotrophic and benthic dinoflagellates and reconstruction of their classification system

研究代表者

山口 愛果 (Yamaguchi, Aika)

北海道大学・理学研究院・学術研究員

研究者番号：80467860

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：従属栄養性底生渦鞭毛藻の多様性と系統関係の解明を目的とした。分類学的に所属不明で出現報告の少ない *Cabra matta* を発見し、世界初の分子系統学的解析を行った。本種は他の底生渦鞭毛藻1種と外洋性渦鞭毛藻ポドランプス科の数種と近縁であることが示された。これらは各鎧板の形態や枚数が共通する一方、横溝と縦溝に明確な相違が見られた。また、底生渦鞭毛藻アンフィディニオプシス属の新種を発見し、鎧板配列を決定して同属の既存種や別産地の標本と比較した。本属の種と遊泳性渦鞭毛藻プロトペリディニウム科、他の底生渦鞭毛藻を中心とした分子系統学的解析を行い、その結果と形態的特徴から分類学的再検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

底生渦鞭毛藻は形態・生理・生態的に多様で、遊泳性渦鞭毛藻には見られない特異な形態や生活環をもつ種が存在する。現在認識されている渦鞭毛藻の分類体系は、分類学的研究の歴史の長い遊泳性渦鞭毛藻の研究に基づいている。本研究では形態情報からのみでは系統的位置を推察することが難しい底生渦鞭毛藻に重点を置いて分子系統学的解析を行った。その成果は、別々に確立されてきた底生渦鞭毛藻と遊泳性渦鞭毛藻の分類体系を統括的に再検討する糸口を与えた。また、本研究成果は分類学的な意義に加えて、多様性に富み繁栄に成功した生物群である渦鞭毛藻全体の進化過程や水圏生物の進化パターンを知る面からも有用である。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to clarify the biodiversity and phylogenetic relationships of the heterotrophic and benthic dinoflagellates. The cells of *Cabra matta*, which has the peculiar shape and uncertain taxonomical affiliation, were found from Okinawa. It was suggested that the benthic *C. matta* and *Roscoffia capitata* and the oceanic species of the Podolampadaceae formed a clade. These species share the certain shapes and the numbers of their thecal plates, while there was the clear difference between these two benthic species and the Podolampadaceae for their cingulum and sulcus. The new species of the genus *Amphidiniopsis* was found and its thecal plate formula was determined. The molecular phylogenetic study was performed including *Amphidiniopsis* spp., the species of the planktonic *Protoperiidiniaceae* and the other benthic species. Their classification system was reconsidered from the phylogenetic results and their morphological characters.

研究分野：多様性生物学

キーワード：渦鞭毛藻 形態 系統 従属栄養 底生生物 生物多様性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究の研究対象である底生渦鞭毛藻は、海藻の表面やサンゴの表層、タイドプール、海底堆積物の表層等に生息し、形態・生理・生態的に多様な幅広い系統が含まれる。底生渦鞭毛藻の記載は1920年代に始まったが(Kofoed and Swezy 1921)、その後の数十年は関連研究は盛んではなかった。しかし、1970年代後半に底生渦鞭毛藻のガンビエルディスカス属が強い毒生産能をもつことが明らかになり、再び底生渦鞭毛藻に注目が集まるようになった。その結果、底生渦鞭毛藻には様々な有毒種が存在することや、遊泳性(プランクトン性)渦鞭毛藻には見られない特異な形態や生活環をもつ種が多数見られることが明らかになってきた。一方で、遊泳性渦鞭毛藻の分類学的研究は古くからコンスタントに進められてきた。よって、現在認識されている渦鞭毛藻類の分類体系は、主に遊泳性渦鞭毛藻の研究に基づいている。底生渦鞭毛藻には系統的位置を推察することが難しい特異な形態をもつ種が多く存在しているが、遊泳性渦鞭毛藻に比べるとこれらの分子系統学的情報が著しく欠けている。世界中のあらゆる水界に存在し、多様性に富む渦鞭毛藻類全体の進化過程を探るために底生渦鞭毛藻各種の分子系統学的解析が待たれる。

### 2. 研究の目的

本研究は、底生渦鞭毛藻のうち鎧板と呼ばれるセルロース質の殻をもつ有殻種であり、かつ葉緑体を持たない従属栄養性の種を中心としてその多様性と系統関係を解明することを目的とした。そして、今まで遊泳性渦鞭毛藻を中心に確立されてきた渦鞭毛藻類の分類体系を、底生渦鞭毛藻の情報を加えることにより見直し、分類体系の再構築をおこなうことを目指した。

### 3. 研究の方法

各地の海岸域(砂浜やタイドプールおよび漁港など)から得られた砂浜の砂や海水を、直接倒立顕微鏡で観察するか、粗培養株を作成後に観察をおこなった。砂サンプルについては、「Uhlig method」(Hoppenrath *et al.* 2014)と呼ばれる凍らせた滅菌海水を利用して底生生物を効率的に抽出する方法を用いて目的の底生渦鞭毛藻を探索した。粗培養株の作成には、主にダイゴIMK培地(海産微細藻類培養用、日本製薬株式会社)を用い、これを様々な濃度で添加することにより作成した。

目的の細胞を倒立顕微鏡観察下で単離した後、滅菌済み濾過海水を入れた培養プレートに置いて数日様子を見ながら餓状態にした後、適宜形態観察と分子系統学的解析をおこなった。光学および蛍光顕微鏡を用いて形態を多方向から詳細に観察し、写真記録を残した。また、カルコフロール染色による蛍光顕微鏡像により、分類形質として重要視される鎧板配列を明確に観察した。同一採集サンプルより複数個体を得られた種については、走査型電子顕微鏡を用いて細胞表面の模様や微細構造を記録した。また、透過型電子顕微鏡観察のための試料を作成し、微細構造の観察もおこなった。分子系統学的解析には、光学顕微鏡観察により写真記録を残した個体をそのまま単細胞PCRに用いた。核コード18S rDNAの5'末端側から28S rDNAのD1-D6領域を含む範囲までをPCR増幅し、ダイレクトシーケンシングをおこなった。得られた18S rDNA配列と28S rDNA配列を基に、分子系統学的解析を遂行した。また、並行して研究対象種のクローン培養株の確立も目指した。倒立顕微鏡下で細胞を単離し、滅菌済み濾過海水に移すことで数回洗浄した。海水培地の入った細胞培養プレートに細胞を一つずつ入れ、様々な餌の候補(微細藻の培養株や穀物の粉など)を与え、培養庫でインキュベートした。

### 4. 研究成果

稀有な細胞形態と鎧板配列を持つことから分類学的に所属不明とされ、世界でも出現報告の少ない従属栄養性の底生渦鞭毛藻 *Cabra matta* S.Murray and D.J.Patterson を、沖縄県の砂浜より採集したサンプルから発見した(図1)。本種は2004年に新属新種としてオーストラリアから記載され、2009年にフランスから2つ目の新種が発表されるまでの間、1属1種として知られていた。その後フランスとロシアからそれぞれ1種ずつ記載され、現在は4種が所属している。

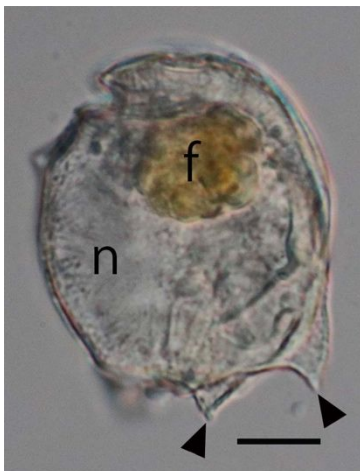


図1) 沖縄産 *Cabra matta* の細胞右側面の光学顕微鏡写真。fは食飽、nは核、矢頭は本種の細胞後部に見られる特徴的な突起を示す。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ 。

この沖縄産 *C. matta* について光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡による詳細な形態観察と鎧板解析をおこない、さらに世界で初めて本属の所属種を対象とした分子系統学的解析をおこなった。核コード 18S rDNA 配列を用いた分子系統学的解析の結果、*C. matta* は同じく底生渦鞭毛藻である *Roscoffia capitata* Balech、そして遊泳性渦鞭毛藻でかつ外洋を主な生息場所とするポドランパス科の種(*Podolampas bipes* F.Stein, *P. elegans* Schütt, *P. palmipes* F.Stein, *P. spinifera* Okamura, *Blepharocysta* sp.) との近縁性が示唆された。これら種の形態的共通点として、1) 非常に幅の狭い頂板 1'をもつ、2) 矮小な頂板 2'と 3'をもつ、3) 前帯板シリーズが頂板シリーズと比べて大きい、4) 3枚の横溝板をもつ、5) 5枚の後帯板と1枚の底板をもつ、ことが挙げられた。一方で、底生渦鞭毛藻である *C. matta* および *R. capitata* と、遊泳性渦鞭毛藻であるポドランパス科の種の間には横溝と縦溝に明確な形態的相違点が見られた。ポドランパス科の種では横溝が溝状に窪んでおらず平坦であり、横溝板が幅広い。さらに、ポドランパス科の種には明瞭な縦溝が見られない。このようなポドランパス科の横溝と縦溝の特徴とは異なり、*C. matta* および *R. capitata* には明瞭な横溝と縦溝が存在する。本研究による分子系統学的解析結果からは *C. matta*, *R. capitata*、ポドランパス科の種の分岐順序は明らかにすることができず、この点を解決することが今後の課題となった。

次に、砂サンプルから特徴的な鎧板をもつ従属栄養性種を発見し、その粗培養株を作成した。その後、光学・蛍光顕微鏡と走査型電子顕微鏡を用いた詳細な形態観察を行って鎧板配列を決定した。また、核コード 18S rDNA 配列および 28S rDNA 配列を用いた分子系統学的解析を施行し系統的位置を推定した。これらの結果から、本種は有殻の従属栄養性底生渦鞭毛藻の代表的な属であるアンフィディニオプシス属の新種であると結論した。同属の既存種および地理的に異なる砂浜の砂から採集した同じく新種と考えられる標本との詳細な形態比較をおこない、これらの結果のまとめと記載をおこなった。また、現時点で得られる全てのアンフィディニオプシス属種のデータと、アンフィディニオプシス属と近縁性があると考えられる遊泳性渦鞭毛藻プロトペリディニウム科の種や、底生渦鞭毛藻ヘルドマニア属を中心とした渦鞭毛藻類の分子系統学的解析を核コード 18S rDNA 配列と 28S rDNA 配列を用いて行い、得られた結果と対象種の形態的特徴を照合させて分類学的検討をおこなった。その結果、アンフィディニオプシス属の各系統グループとプロトペリディニウム科に属する一部のサブグループ、およびヘルドマニア属が互いに入り組みクレードを形成し、アンフィディニオプシス属やプロトペリディニウム科のサブグループ自体は単系統性を示さなかった。また、本研究で得られたアンフィディニオプシス属の新種の形態的特徴は Hoppenrath ら(2014)にて提案された3番目の形態グループ(アンフィディニオプシス属「形態グループ3」)に該当するが、本研究にて分子系統学的解析に含めた他の「形態グループ3」に属する種とは異なる系統であることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Yamaguchi Aika, Wakeman Kevin C., Hoppenrath Mona, Horiguchi Takeo, Kawai Hiroshi   | 4. 巻<br>57            |
| 2. 論文標題<br>Molecular phylogeny of the benthic dinoflagellate <i>Cabra matta</i> (Dinophyceae) from Okinawa, Japan   | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Phycologia  | 6. 最初と最後の頁<br>630-640 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.2216/18-7.1  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>該当する          |
| 1. 著者名<br>Wakeman KC, Yamaguchi A, Horiguchi T  | 4. 巻<br>169           |
| 2. 論文標題<br>Molecular Phylogeny and Morphology of <i>Haplozoon ezoense</i> n. sp. (Dinophyceae): A Parasitic Dinoflagellate with Ultrastructural Evidence of Remnant Non-photosynthetic Plastids | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Protist   | 6. 最初と最後の頁<br>637-647 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.protis.2018.04.008  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>Gurdebeke PR, Mertens KN, Takano Y, Yamaguchi A, Bogus K, Dunthorn M, Matsuoka K, Vrielinck H, Louwye S.  | 4. 巻<br>66            |
| 2. 論文標題<br>The affiliation of <i>Hexasterias problematica</i> and <i>Halodinium verrucatum</i> sp. nov. to ciliate cysts based on molecular phylogeny and cyst wall composition                 | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>European Journal of Protistology  | 6. 最初と最後の頁<br>115-135 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.ejop.2018.09.002  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>該当する          |
| 1. 著者名<br>Hoppenrath Mona, Rene Albert, Satta Cecilia Teodora, Yamaguchi Aika, Leander Brian S.   | 4. 巻<br>56            |
| 2. 論文標題<br>Morphology and molecular phylogeny of a new marine, sand dwelling dinoflagellate genus, <i>Pachena</i> (Dinophyceae), with descriptions of three new species                         | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Phycology  | 6. 最初と最後の頁<br>798-817 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/jpy.12984   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>該当する          |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|