

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19370031

研究課題名 (和文) 土壌性原生生物、特に「鞭毛虫類」の多様性と系統の解明

研究課題名 (英文) Studies on biodiversity and phylogeny of soil protists, with special reference to soil flagellates.

研究代表者

堀口 健雄 (HORIGUCHI TAKEO)

北海道大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：20212201

研究成果の概要 (和文)：鞭毛虫類は鞭毛をもつ単細胞生物の総称である。土壌性鞭毛虫類は生態系で重要な役割を果たすが、その多様性の知見は特に我が国で少なかった。本研究では我が国の土壌性鞭毛虫類の多様性解明と進化過程解明を目的とした。各地の土壌サンプルより約 180 株の培養株を確立し形態観察および分子系統解析をおこなった。結果、原生生物の 5 門にまたがる 24 属 (50 種以上、正確な種数は未確定) の鞭毛虫の存在を明らかにした。またパラフィソモナス類は土壌環境中で独自の進化を遂げたことを見いだすなど成果を挙げた。

研究成果の概要 (英文)：The flagellates are an assemblage of unicellular organisms with flagella. Our knowledge on the flagellates inhabiting soil habitats in Japan was rather poor. We aimed to investigate biodiversity and phylogenetic affinities of Japanese soil flagellates. We have established over 180 culture strains and studied them with light and electron microscopy. We also investigated phylogenetic relationships by molecular phylogeny. As a result, we identified 24 genera (>50 spp., but exact species number is still to be determined) representing 5 protistan phyla. We also demonstrated that extensive diversification of *Paraphysomonas* took place in soil, independent of marine or freshwater habitats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2008 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	11,500,000	3,450,000	14,950,000

研究分野：藻類・原生生物分類学

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：土壌性鞭毛虫類, 原生生物, 多様性, 分子系統解析,

1. 研究開始当初の背景

原生生物は、主に単細胞生物から構成される真核生物の生物群を包括的に指し示す概

念で、進化的には異質な系統群を多数含む。多くの原生生物は水圏に生息するが、土壌に生息する原生生物も質・量ともに多く、たっ

た 1 グラムの土壤中（乾重）に 10^4 - 10^7 個体の原生生物が生息しているという推定もある。一般に土壤原生生物には大きく分けて、アメーバ類、繊毛虫類、鞭毛虫類が含まれる（ここでは土壤藻類や菌類は除外している）。これらは、土壤中では細菌等の捕食者であり、大型の原生生物や後生動物の餌にもなるもので、生態的に重要な役割を果たしている。土壤性原生生物については、土壤性細菌類とともに農業・畜産・林業上などの重要性から多くの研究があるが、それらは主に生態学的な観点からのものである。分類学的研究も行われているが、その中心はアメーバ類あるいは繊毛虫類であって、細胞サイズが小さいこともあってか、いわゆる鞭毛虫類に関する研究は世界的に見ても少ない。従って、土壤性鞭毛虫類の多様性については未知の部分が多い。特に、鞭毛虫類の分類学的研究の欠如は我が国において顕著であり、生態学的な研究の中で鞭毛虫類の名前が散見されることもあるが、土壤中にどのような分類群の鞭毛虫類が生息しているかについては、我が国でもある程度研究が進んでいる土壤性繊毛虫類やアメーバ類（特に有殻アメーバ類）（島野，土壤原生生物データベース）と比較すると、全く何もわかっていないに等しいのが現状であった。

以上、土壤に生息する鞭毛性の原生生物を「鞭毛虫類」と一括して述べてきたが、「鞭毛虫類」という単系統群が存在するわけではなく、実際には多くの系統群を含んでいる。土壤中だけでなく、水棲性あるいは寄生性のものなど鞭毛虫類は多様である。最近の分子系統学や微細構造学の成果に基づく真核生物の高次分類系によれば真核生物は、アメーバゾア生物群、オピストコンタ生物群、プランタ生物群、リザリア生物群、クロモアルベオラータ生物群、エクスカバート生物群の 6 つのスーパーグループに分類されるが、一般に鞭毛虫類とされる生物はこのうちのほとんどの生物群に所属しており、鞭毛虫類という概念がいかに幅広いものであるかがわかる。上述のように鞭毛虫類の系統関係の大枠はわかってきたとはいえ、種多様性や種間・属間の系統関係などに関しては、分子系統学的データも微細構造学的データも圧倒的に不足しているというのが研究開始時の現状であり、その事情は土壤性鞭毛虫類に限ってみても同様であった。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では

- (1) 我が国でほとんど知見のない土壤性鞭毛虫類の多様性を明らかにする。
- (2) 分子系統解析により土壤性鞭毛虫類の系統関係を明らかにし、土壤という特殊な環境に生育する鞭毛虫類の進化過程を探る。

(3) 形態学的に種名を同定した種の DNA 配列（例えば SSU rRNA 遺伝子）のデータを蓄積する（形態と分子を対応させる）。ことを目的とした。

3. 研究の方法

北海道を中心として、福島、神奈川、静岡、香川、徳島、京都、沖縄など日本各地から採集をおこなった。基本的には、表層土壤（深さ 5-10cm 程度）を採取し実験室に持ち帰った。土壤サンプルは、土壤浸出液を含む培養液で予備培養をおこない、出現した鞭毛虫類を倒立顕微鏡で確認して、単離をおこなった。培養株が確立したものについては、光学顕微鏡観察で形態の観察をおこなうとともに、必要に応じて、走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いて微細な構造の観察をおこなった。培養株から抽出した全 DNA または単細胞 PCR 法を用いて PCR 法により遺伝子増幅をおこない塩基配列の決定をおこなった。基本的にはダイレクトシーケンス法を用いたが必要に応じてクローニングの後シーケンスを実施した。用いた遺伝子は主に SSU rRNA 遺伝子であるが、分類群によってはアクチン遺伝子の解析もおこなった。系統解析は、最尤法、最大節約法、近隣結合法およびベイズ法を用いた。

4. 研究成果

本研究により、盤状クリステ門、クロミスタ門、アルベオラータ門、ケルコゾア門、オピストコント門の 5 つの原生生物を含む門にわたる 24 属の鞭毛虫類の存在を明らかにした。種数は 50 種以上あることは確実であるが、正確な数値は現時点では未定である。以下にいくつかのグループ毎に主な結果を示す。

(1) 細胞鱗片をもたない土壤性従属栄養性黄金色藻類 (*Spumella*-like flagellates)

北海道から 63 株の従属栄養性黄金色藻類に属する鞭毛生物の培養株を確立した。いずれも単細胞性で典型的な鞭毛運動をおこなっていた。これらは、すべて細胞鱗片をもたずいわゆる *Spumella*-like flagellates と総称されるものであった。このうち 36 株についてはほぼ全長の SSU rRNA 遺伝子配列を解析することが出来た。系統解析の結果、*Spumella*-like flagellates は多系統となり、これらは 6 つの異なるクレード（グループ 1-6）を形成した。グループ 1（図 1A）は独自のクレードで、既知の種とはクレードを形成しなかった。グループ 2（図 1B）は *Ochromonas danica* (M32704) のクレードに含まれた。グループ 3（図 1C）は *Poteriochromonas malhamensis* (AB023070)

と姉妹群を形成し、グループ 4 (図 1D) は *O. tuberculata* (AF12393) と姉妹群となった。また、グループ 5 は *Spumella elongata* (AJ236859) と近縁性を示し、グループ 6 (図 1EF) は *S. oblique* (AJ236860) と近縁性を示した。残念ながら、*Spumella*-like flagellates 全体の分類学的再検討がおこなわれていないことから、日本産の株の種名の確定までは至らなかった。*Spumella*-like flagellates の問題は、系統解析で示されるように系統的に離れている株同士でもそれらを区別する形態的な形質に乏しい点であり、本群の分類が進まない理由でもある。今後はスタト胞子の形態も含めて形態形質の解析を進める必要がある。

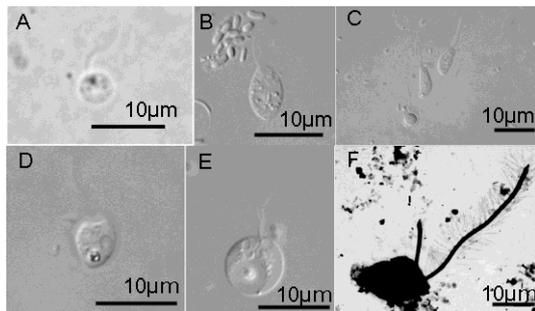


図 1. *Spumella*-like flagellates の多様性。

(2) 細胞鱗片をもつ土壌性従属栄養黄金色藻類～土壌性 *Paraphysomonas* の多様性と独自進化～

Paraphysomonas は従属栄養性の黄金色藻類の 1 属で、単細胞性の鞭毛生物で細胞表面に珪酸質の鱗片をもつことで特徴づけられる (図 2)。淡水から海水まで広く分布することが知られているが、土壌性の本属生物に関する知見は少ない。本研究では、北海道、徳島、福島などから確立した 16 の培養株を用いて研究をおこなった。透過型電子顕微鏡 (ホールマウントと切片) により細胞鱗片の形状を観察し、また、SSU rDNA を用いてこれらの系統解析をおこなった。その結果、興味深いことに、土壌性の *Paraphysomonas* は大部分の海産種や淡水産種とは異なり土壌性のものみのクレードを形成し、少なくとも 6 種が含まれることが明らかとなった。これらの細胞鱗片の構造等を精査したところ、既存の種類とはいずれも異なることが明らかとなり、これら 6 種は新種とすることが妥当であるとの結論を得た。現在、記載論文の用意中である。

本研究の注目すべき結果は、(1) 土壌性の *Paraphysomonas* は本属内において独自の進化を遂げている可能性を明らかにした点である。土壌環境と淡水環境は隣接しており、いずれの環境にも本属の生物が生息してい

るために、土壌にも基本的には淡水種が出現するものと思われがちであるが、今回の研究では、土壌性の本群は淡水種とはそれぞれ独自に進化した可能性が高い事を示した。さらに、(2) 土壌性の *Paraphysomonas* の種多様性は我々の今までの認識とは異なり、驚異的な種多様性を含んでいる可能性があることを示した点も興味深い。

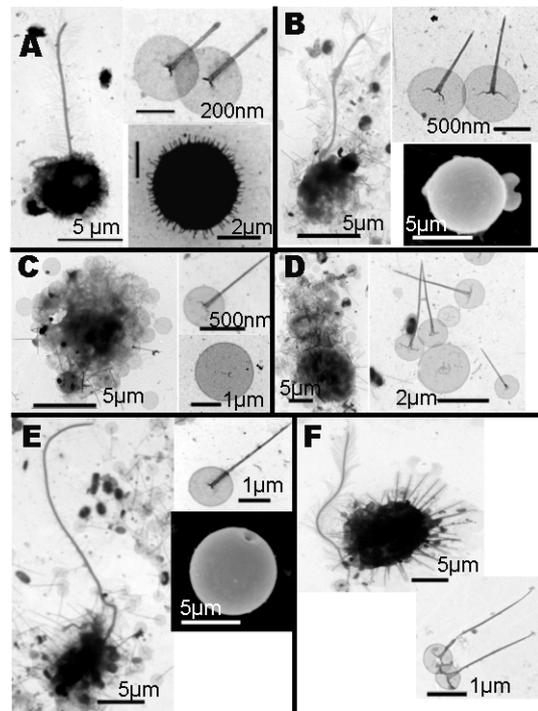


図 2. 土壌性 *Paraphysomonas* の多様性。

(3) 土壌性渦鞭毛藻類の発見

一般に渦鞭毛藻類は水圏の住人と考えられており、土壌のように環境変動の激しいハビタットについては、若干の報告はあるものの、ほとんど明らかになっていなかった。今回の研究により、真の土壌性渦鞭毛藻類と呼ぶべき種が見つかったことは興味深い。ここで言う、真の土壌性とは(1)池などの水源から全く離れた地域から分離された、(2)培養中で乾燥→水→乾燥・・・という条件を変化させるとそのたびに、シスト→遊泳細胞→シスト・・・と生活形を変えて環境変化に対応する能力を有する点である。本研究では 2 種の真正土壌性渦鞭毛藻類を発見した。これらを系統解析にかけたところ、一方の羅臼株は、フィエステリア科の *Tyrannodinium belorinense* と近縁であるが、形態が異なる事から本属の新種であることが明らかとなった。もう一方の香川株も形態的には既存の渦鞭毛藻類とは一致せず、新分類群である可能性が高いが、系統解析結果が安定せずに、系統的位地および分類学的な位置の確定には至っていない。

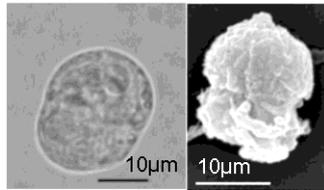


図 3. 土壌性渦鞭毛藻類。左：羅臼株，右：香川株

(4) ケルコゾア類

ケルコゾア類は分子系統解析の結果認識された系統群であり、ケルコモナス類などを含む。ケルコモナス類はアメーバ性鞭毛虫類で、土壌性原生生物の主要メンバーであり、土壌生態系で細菌食者として果たす役割も大きい。ところがケルコモナス類に関しては、形態が可塑性を有することなどからその分類は非常に不安定なものであった。2009年になって Cavalier-Smith のグループ (Bass et al. 2009, Protist 160:483-521) が *Cercomonas* とその近縁の生物群について、形態および分子系統解析をおこない、その結果に基づき大規模な分類学的な再検討をおこなった。その結果、従来の *Cercomonas* 属は *Eocercomonas*, *Paracercomonas*, *Cavernomonas* などの属に分割されることとなった。さらに彼らは培養株を元に形態観察と特徴的な塩基配列の部分をもとに 66 種の種を記載している (内 56 種が新種)。しかしながら形態が非常に可塑的で変異に富む為に、結局、種の境界の判定は形態と言うよりは、特徴的な塩基配列の組み合わせに頼らざるを得ないところがこの分類系の問題点である。

本研究では 35 株のケルコゾア類 (ケルコモナス類+その他) の培養株を確立した。このうち、16 株について SSU rDNA 塩基配列を解析し、ケルコモナス類に関しては Bass et al. (2009) の結果と照合した。ケルコモナス類以外では、*Thumatomonas* sp. *Aurigamonas solis*, *Heteromita* sp., *Spongomonas* cf. *minima* の存在が確認された。

我が国で発見されたケルコモナス類については、遺伝子配列レベルで Bass et al. (2009) に完全に一致する (あるいは近縁性を示す) 株はひとつも無かった。この事はとりもなおさず、ケルコモナス類の種多様性の解明が異なる地域において必要であることを示している。以上のような状況から我が国の株についても種名は特定できる状況にないが、我が国で確認されたケルコモナス類は系統解析をおこなったほとんどすべての培養株が *Cercomonas* 属のメンバーであって (北海道大黒島および静岡県沼津市からの 2 株のみが *Neocercomonas* sp. strain8-3.1 に近縁性を示した), *Eocercomonas*, *Paracercomonas*

に属する種は発見されていない。本研究において、土壌においてはケルコモナス類の出現が多いことは明らかとなったが、今後さらに培養株を用いた形態および遺伝子解析が必要である。

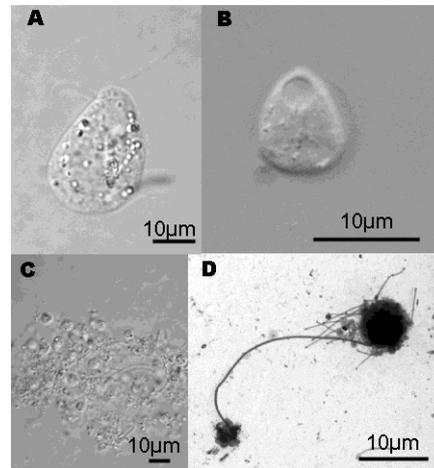


図 4. ケルコゾア : A: *Cercomonas*, B: *Thumatomonas*, C: *Spongomonas*, D: *Aurigamonas*

(5) その他の土壌性鞭毛虫類

上述の分類群に加え、光学顕微鏡レベルで確認した土壌性鞭毛虫類を以下に列挙する。なおこのうちボド類に関しては 35 株中 16 株で遺伝子の部分配列の解析をおこない、主に遺伝子情報に基づいて近縁の種を同定を試みた。ウトロ産の襟鞭毛虫 *Monosiga* sp. は遺伝子および形態情報から新属新種であると考えられる。

Adriamonas peritocrescens, *Allantion tachiyploon*, *Apusomonas probosidea*, *Bodo* cf. *caudatus*, *Bodo* cf. *curvifilis*, *Chodosiga botrytis*, *Chodosiga* sp., *Entosiphon sulcatus*, *Goniomonas truncata*, *Goniomonas* sp., *Monosiga* cf. *ovata*, *Monosiga* sp. (ウトロ), *Monosiga* spp., *Neobodo* cf. *designis*, *Peltomonas volitans*, *Ploetia obliqua*, *Protaspis metarhiza*, *Protaspis simplex*

(6) 今後の展望

本研究によって、我が国の土壌性鞭毛虫類の多様性が明らかとなったが、実際に存在するであろう (真の) 多様性と比較すると限られた期間での研究成果は途中経過であると言わざるを得ない。土壌性鞭毛虫類の土壌における役割の重要性を考えると、引き続き土壌性鞭毛虫類の多様性研究は推進する必要がある。また、本研究におけるインパクトのある研究成果としてパラフィソモナス類の土壌における独自進化と土壌性渦鞭毛藻類の発見がある。これらについても引き続き研究を継続する予定である。また、土壌鞭毛虫

類では種同定に際し、DNA 配列データが重要視される傾向があるが、本研究でも確立したすべての株で DNA 情報が得られた訳ではなく、その点の克服のために今後の方法の改善などが重要な観点となる。

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 5 件)

- ① Tamura, M., Y. Takano and T. Horiguchi: Discovery of a novel type of body scale in the marine dinoflagellate, *Amphidinium cupulatisquama* sp. nov. (Dinophyceae). *Phycol. Res.* 57: 304-312. (2009) 査読あり
- ② Yamaguchi, A. and T. Horiguchi: Culture of the heterotrophic dinoflagellate *Proto-peridinium crassipes* (Dinophyceae) with noncellular food items. *J. Phycol.* 44(4): 1090-1092. (2008) 査読あり
- ③ H. Yamaguchi, M. Hoppenrath, K. Takishita and T. Horiguchi: *Haramonas pauciplastida* sp. nov. (Raphidophyceae, Heterokontophyta) and phylogenetic analysis of *Haramonas* species using SSU rDNA. *Phycol. Res.* 56: 127-138. (2008) 査読あり
- ④ Y. Takano, G. Hansen, D. Fujita and T. Horiguchi: Serial replacement of diatom endosymbionts in two freshwater dinoflagellates, *Peridiniopsis* spp. (Peridinales, Dinophyceae) *Phycologia* 47: 41-53. (2008) 査読あり
- ⑤ S. Shimano and T. Horiguchi: Soli protists and soil animals on Daikokujima. Proceedings of the International Symposium "The Origin and Evolution of Natural Diversity". 1-5 October 2007, Sapporo, Japan. 151-152. (2007) 査読なし

[学会発表] (計 4 件)

- ① 花房友香里、高野義人、堀口健雄：土壌性の *Paraphysomonas* 属 (黄金色藻綱) と渦鞭毛藻類の分類学的研究。日本藻類学会第 34 回大会, 2010 年 3 月 20 日, 筑波大学。
- ② 花房友香里・堀口健雄：土壌に生息する従属栄養性黄金色藻類の分類学的研究。日本植物学会第 73 回大会, 2009 年 9 月 19 日, 山形大学。
- ③ Hanafusa Y, Ohuchi M and Horiguchi T : Diversity of soil flagellates in Japan.

9th International Phycological Congress, Tokyo, 6th August 2009.

- ④ 花房友香里・堀口健雄：土壌性鞭毛虫類の多様性。日本藻類学第 33 回大会, 2009 年 3 月 27 日, 琉球大学。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀口 健雄 (HORIGUCHI TAKEO)

北海道大学大学院理学研究院・教授

研究者番号：20212201

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

大内 真理子 (OHUCHI MARIKO)

北海道大学・大学院理学院・大学院生修士課程

研究者番号：なし

花房 友香里 (HANAFUSA YUKARI)

北海道大学・大学院理学院・大学院生修士課程

研究者番号：なし