

平成22年5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580349

研究課題名（和文）草食動物消化管内原虫のデータベース化ならびに分子系統学的検討

研究課題名（英文）Making of data base and molecular phylogenetic analyses of the ciliates inhabiting the alimentary tracts of herbivores

研究代表者

今井 壯一（IMAI SOICHI）

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：90120758

研究成果の概要（和文）：各種大型草食動物の消化管内に見られる固有の繊毛虫類について、研究代表者の業績を含む約500編の文献を検索し、シノニム関連を考慮しつつ、449種をデータベース化した。併せてこれらの約8割の種についての顕微鏡写真をデジタルファイル化した。この間、チンパンジーから得られた新属新種およびシロサイから得られた2新種を記載した。また、これらの繊毛虫グループの中で、系統学上重要と思われた種についてSSU rDNAを用いた遺伝子解析を行い、鍍銀法を用いた形態学的系統解析による仮説と比較し、信頼度の高い系統樹を作成した。

研究成果の概要（英文）：Four hundred and forty nine ciliate species inhabiting the alimentary tracts of various herbivores were gathered from 500 articles up to this time, including the author's achievements, and pigeonholed as a database with the photomicrographs of respective species. In this study, one new species of a new genus from chimpanzee and two new species from white rhino were described. The other study revealed the phylogenetic relationship among the genera of these ciliates based on the sequences of SSU rDNAs and the comparative morphological findings of them stained by silver impregnation method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：寄生体生物

1. 研究開始当初の背景  
大型の草食動物の消化管内には固有の一群から成る原生動物（主としてエントディニオ

モルファ目繊毛虫類）が多数生息しており、宿主の栄養に強い影響力を及ぼしていることは周知の事実である。牛を代表とする反芻

動物の飼育形態については、BSE 問題、メタン排出問題等から根本的な改善が迫られているが、これらの動物体内に生息する絨毛虫に関する詳細な基礎的研究は世界的に見ても必ずしも多くない。研究代表者はこれまでこれらの絨毛虫の形態学的分類と、宿主間分布ならびに地理的分布に関する研究を推進し、併せてこれらの知見を基礎としてそれらの系統学的関係を考察してきた。これらの知見と文献上これまでに記載された各種草食動物に見られる絨毛虫構成をデータベース化することは、反芻動物をはじめとする草食動物の栄養学的、飼養学的な研究の基礎的知見として役立つものと考えられた。因みに、これまで反芻動物第一胃内に見られる絨毛虫構成およびウマの大腸内に見られる絨毛虫構成については、いくつかのまとまった報告があるが、いずれも記載が古く、草食動物消化管内絨毛虫全体をまとめた報告は現在もなされていない。

一方、これらの絨毛虫群は草食動物の消化管内という極めて限定された生息域をもつ特徴ある一群であり、隔離された環境の中で宿主の進化と共に独自の進化を歩んできたと考えられる。近年の系統進化学的研究には分子生物学的手法を用いた解析が多用されているが、これまでこの群の絨毛虫の遺伝子配列を決定することは困難とされており、不完全な分子系統樹が報告されているのみであった。これら解析困難であった絨毛虫種の遺伝子解析法の開発ならびに分子系統学的検討は、これら一群のデータベースを作成する上で極めて有用であるものと考えられた。

## 2. 研究の目的

今回の研究の目的は、大型草食動物の消化管内に認められる固有の絨毛虫類の種に関するデータベースの作成、ならびにこれまで解析困難とされていたこれらの絨毛虫の SSU rDNA の解析法の開発およびそれを用いた分子系統学的知見と鍍銀法を用いた形態学的系統解析とを比較し、より信頼度の高い系統樹を作成することにある。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず、データベース作成のための文献蒐集ならびに未研究の宿主材料の確保が極めて重要であった。これらの分子系統学的研究のためには、材料中に混在している多種類の絨毛虫を同定したのち、単一種の分離が必要である。これらの諸問題を念頭に、以下の方法を用いて解析を行った。

(1) 各種草食動物からの絨毛虫材料の採取：研究代表者らはこれまでに世界各地で飼育されていた各種反芻家畜ならびに野生動物、ウマ、ラクダ、ゾウ、カバ、ゴリラ等の消化管内に見られる絨毛虫類の同定と分類

を行ってきたが、さらに不完全、もしくは未知の宿主としてサイおよびチンパンジーの材料を採取した。材料は新鮮糞便で、採取後直ちに MFS 液、または無水エタノールで固定し、分類・形態学的観察および遺伝子解析に供した。

(2) 絨毛虫の同定と鍍銀染色による系統解析：採材したサンプルについては、光学顕微鏡下で同定を行い、エタノール固定したものについては、キャピラリーを用いて、単一種を分離して遺伝子解析の材料とした。また、一部の MFS 固定材料については、これまでに我々が開発した鍍銀法による染色を行い、これまでに得られている知見と比較して、形態による系統学的解析を行った。

(3) SSU rDNA 遺伝子の配列決定と系統解析：エタノール固定材料からマイクロキャピラリーを用いて分離した虫体を凍結融解により DNA 抽出し、ProK 処理したのち、template DNA, primer I, II, Takara Ex Taq, Ex Taq buffer, d NTP Mixture, DW を所定量混合してサーマルサイクラーで DNA の増幅を行った。Primer I には 82F (既知の近縁虫体の配列の始めから約 80bp 内側)、primer II には B (ユニバーサルプライマー) を用いた。反応終了後アガロースゲル泳動でバンドの確認を行ったのち、ExoSAP-IT で PCR 産物を精製し、BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit を用いてサーマルサイクラーで反応させ、シーケンサー (ABI3100) でシーケンスを行った。配列のアライメントには Clustal W を用い、MEGA (v. 4) により系統樹を作成した。分岐の信頼性については、1,000 回のブートストラップ検定を行った。

(4) 草食動物消化管内絨毛虫類のデータベース化：これまでに研究代表者ら、および過去の記載文献によって蓄積された、各種草食動物に見られた絨毛虫種および本研究で得られた追加種について、整理、ファイル化し、データベース作成を試みた。併せて研究代表者らがこれまでに得た材料中に見られた種についての光学顕微鏡写真のデジタルファイル化を行い、データベースの資料とした。

## 4. 研究成果

(1) シロサイから得られた 2 新種の記載：南アフリカに生息していたシロサイの大腸内容を検索したところ、*Triplumaria* 属の 2 新種が認められ、それぞれ *T. grypoclonis*, *T. alluvia* として記載した。これらの種の鍍銀染色による口部絨毛列の観察では、前者は *Triplumaria* 属と、後者は *Cycloposthium* 属と類似していたが、前庭内に絨毛を欠いている点で共通しており、これらはいずれも同一の科 (*Cycloposthiidae*) に含めるべきものと考えられた。キクロポスチウム科絨毛虫は反芻動物第一胃内には認められない一方、単胃

草食動物の大腸内からは広い宿主範囲で認められ、系統学上古いものであることが予想された。

(2) チンパンジーから得られた1新種の記載：ウガンダ産チンパンジーの新鮮糞便材料から得られた小形の繊毛虫を *Troglocorys cava* と命名して記載した。本種は極めて珍奇な形態を有しており、当初いずれの科にも属さない独自の種と考えられたが、鍍銀染色および走査電子顕微鏡の観察により、ウマ、ゾウの盲結腸内から頻繁に見られるブレファロコリス科に属することが判明した。本記載はゴリラ、チンパンジーから報告された初めてのブレファロコリス科繊毛虫である。

(3) SSU rDNA 遺伝子の配列決定と系統解析：草食動物消化管内には、リトストマテア綱のエントディニオモルファ目、前庭目、マクロポディニウム目の3目に属する繊毛虫が知られている。マクロポディニウム目は全てワラビーなどの有袋類から認められるものであり、オーストラリアで遺伝子解析が進められている。エントディニオモルファ目は原始口垂目、ブレファロコリス垂目、エントディニオモルファ垂目に細分され、反芻動物の第一胃にはエントディニオモルファ垂目のオフリオスコレックス科を中心として、少数のブレファロコリス垂目および前庭目が記載されており、代表的な種については遺伝子解析も行われている。一方、ウマを始めとする単胃草食動物の大腸内からは少数の前庭目に加え、多種の原始口垂目、ブレファロコリス垂目、エントディニオモルファ垂目繊毛虫が報告されている。これらのいくつかは遺伝子解析がなされているが、ブレファロコリス垂目、原始口垂目についてはほとんど解析がなされていない。今回の研究において、原始口垂目の *Bundleia postciliata*, *B. nana*, *B. benbrookii*, ブレファロコリス垂目の *Blepharocorys uncinata*, *B. curvigula* (以上宿主はウマ), *Raabena bella* (宿主はゾウ) エントディニオモルファ垂目の *Entodinium longinucleatum*, *Eudiplodinium rostratum*, *Metadinium medium*, *Ostracodinium gracile* (以上宿主はウシ), *Spirodinium equi*, *Triadinium caudatum* (以上宿主はウマ), *Polydiniella mysorea* (宿主はゾウ) の SSU rDNA 配列を初めて明らかにし、それぞれ GENBANK に登録した。また、これまでに報告されている近縁種に今回のデータを加え、系統樹を作成、解析した結果 (図1)、*E. longinucleatum*, *Eu. Rostratum*, *Met. Medium*, *O. gracile* が所属するオフリオスコレックス科は既知の種と併せて単系統を形成した。ウマの盲結腸に生息する *Spirodinium equi* および *Triadinium caudatum* は *Tripalmaria dogieli*, *Cochliatoxum periachtum* とともに単系統を

形成したが、同じくウマに認められる *Cycloposthium* spp. とは側系統を示したことから、これらは一括してキクロボスチウム科とするよりは、キクロボスチウム科とスピロディニウム科に分割すべきものと考えられた。また、一方では、*Cycloposthium* はスピロディニウム科より反芻動物に見られるオフリオスコレックス科に近い系統を持つことが認められた。ゾウに固有に見られる *Polydiniella mysorea* は、キクロボスチウム科およびオフリオスコレックス科に近い部位に位置した。ブレファロコリス類の *Blepharocorys uncinata* は、既知の *B. curvigula*, カバの前胃に見られるパレントディニウム科の *Parentodinium* sp. とともに別の単系統を形成した。原始口類に分類されている *Bundleia postciliata*, *B. nana*, *B. benbrookii* は単系統を形成し、有袋類から認められるマクロポディニウム目より外側に位置した。これらの結果は、鍍銀染色による所見を基にした系統仮説と概ね一致したが、マクロポディニウム目とエントディニオモルファ目原始口垂目との関係については再考が必要であると考えられた。また、形態学的には明らかに *Cycloposthium* 属との密接な関連が認められる *Triplumaria* 属繊毛虫が側系統を示したこと、ブレファロコリス科と考えられていた *Raabena bella* が *Blepharocorys* とは離れた系統に位置していたことなど、形態学的所見とは若干の齟齬が生じた。これらの問題点については、形態による分類についての再検討を図るとともに、遺伝子配列の再現性についてさらなる検討が必要と考えられた。

(4) 草食動物消化管内原虫のデータベース化：各種反芻動物、ウマ、カバ、サイ、ゾウ、ゴリラ・チンパンジー、バク、草食性有袋類、カピバラ、イボイノシシ、ハイラックスの消化管内繊毛虫について、研究代表者らの業績を含む約500編の文献を検索し、シノニム関連を考慮しつつ、449種をデータベース化した。各種の光学顕微鏡写真については、可及的多くの宿主の材料を入手し、8割程度の記載種について撮影し、デジタルファイル化した。現在さらに蒐集中である。作成されたデータベースについては、将来、草食動物消化管内繊毛虫の図鑑もしくはモノグラフとして刊行する予定である。

## 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3件)

- ① Toshihiro TOKIWA, David MODRY, Akira ITO, Katerina POMAJBIKOVA, Klara J.

PETRZELKOVA and Soichi IMAI. A new entodiniomorphid ciliate, *Troglocorys cava* n.g., n.sp., from the wild Eastern chimpanzee (*Pan troglodytes schweinfurthii*) from Uganda. Journal of Eukaryotic Microbiology, 査読有, Vol.57, No. 2, 2010, 115-120.

- ② David MODRY, Klara J.PETRZELKOVA, Katerina POMAJBIKOVA, Toshihiro TOKIWA, Jaroslav KRIZEK, Soichi IMAI, Peter VALLO, Ilona PROFOUSOVA and Jean SLAPETA. The occurrence and ape-to-ape transmission of the entodiniomorphid ciliate *Troglodytella abassarti* in captive gorillas. Journal of Eukaryotic Microbiology, 査読有, Vol. 56, No. 1, 2009, 83-87.

- ③ Akira ITO, Wouter Van HOVEN, Yutaka MIYAZAKI and Soichi IMAI. Two new entodiniomorphid *Triplumaria* ciliates from the intestine of the wild African white rhinoceros. European Journal of Protistology, 査読有, Vol. 44, 2008, 149-158.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 常磐俊大、Klara J. PETRZELKOVA, David Modry、伊藤章、今井壯一. ローランドゴリラ *Gorilla gorilla gorilla* から検出された *Troglodytella abassarti* (エントディニオモルファ目トログロディテラ科) の形態学的観察. 第 40 回日本原生動物学会、2007. 11、富山大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井壯一 (IMAI SOICHI)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：90120758

(2) 研究分担者

池 和憲 (IKE KAZUNORI)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50159597

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

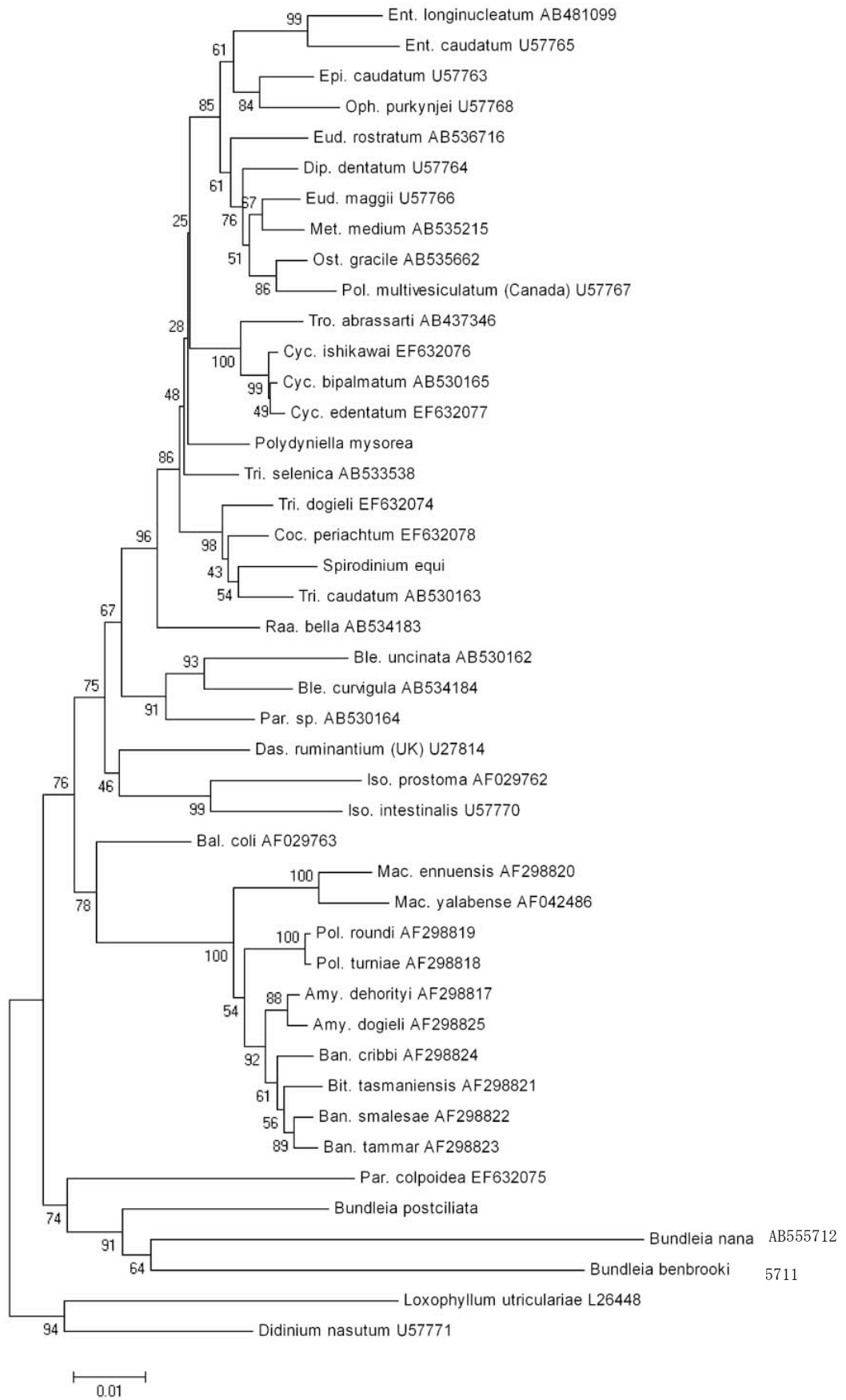


図 1. 草食動物消化管内繊毛虫類の分子系統樹 (NJ 法による)