

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440224

研究課題名(和文) ラビリントチュラ類の網羅的分離法の開発と、分離株に基づく分類体系の再整理

研究課題名(英文) Development of the isolating method and taxonomical rearrangement of thraustochytrids (Labyrinthulea)

研究代表者

本多 大輔 (Honda, Daisuke)

甲南大学・理工学部・教授

研究者番号：30322572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラビリントチュラ類の特にThraustochytrium属は、生活史にみられる形態形質によって分類されているが、多系統群であることが知られていた。そこで、この属のタイプ種の再発見を試みたが、これについては分離することができなかった。しかし、2番目に記載されたT. globosumの再分離に成功し、この種の形態形質の把握と分子系統学的位置の決定を行った。その結果と、Thraustochytrium属の全ての種との比較から、この種に対して新属Monorhizochytriumを設立する分類学的整理を行った。

研究成果の概要(英文)：Thraustochytrium is the type genus of the family Thraustochytriaceae in the class Labyrinthulomycetes. This genus is characterized by morphological features, however, there are several issues associated with the taxonomy of this genus, and these include polyphyletic taxa and overlapping of taxonomic features among species. In this study, we make the attempt to find out the type species of this genus, but we could not isolate the strain of type species. On the other hand, we successfully isolated the strain, which exhibited characteristic features of second species of the genus Thraustochytrium, T. globosum. Based on comparison of the morphological characteristics of all the species in the genus Thraustochytrium and the molecular phylogenetic information, we propose the establishment of a new genus, Monorhizochytrium, for the species T. globosum in the family Thraustochytriaceae.

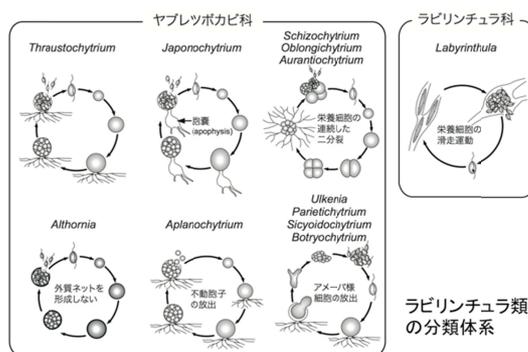
研究分野：系統分類学，微生物生態学

キーワード：系統分類 形態形質 分子系統 生活史 新属

1. 研究開始当初の背景

ラビリンチュラ類は, Cienkowski によって 1867 年に最初の報告がなされて以来, これまで, 15 属, 約 60 種が記載され, 主に光学顕微鏡レベルの形態に基づいて分類がなされてきた。しかしながら, 1999 年の申請者らによる分子系統解析の結果は, 特にヤブレッツボカビ科 (Thraustochytriaceae) の中で, 同属と同定されている株が, 系統を異にしていることが示され (Honda et al. 1999), このことは, 複数遺伝子による解析でも確認された (Tsui et al. 2009)。これは, ヤブレッツボカビ科の生物が, 基本的には栄養細胞が球形であり, 形態的な特徴をとらえにくいことや, 培養条件によって形態的な可塑性が大きいことなどが原因であると考えられた。

そこで, 申請者らは, 再現性の高い培養条件を工夫した上で, 安定して確認することができる新たな形態的特徴を見出しさらに脂肪酸とカロテノイド色素組成を分類学的形質として導入することで, これまで, *Schizochytrium* 属と同定されていた 3 系統群に対し, *Aurantiochytrium* 属と *Oblongichytrium* 属を新たに設立し, 狭義の *Schizochytrium* 属との 3 属に分割する分類学的整理を行った (Yokoyama & Honda 2007)。また, 同様に従来 of *Ulkenia* 属についても, *Botryochytrium* 属, *Parietichytrium* 属, *Sicyoidochytrium* 属, 狭義の *Ulkenia* 属の 4 属に分割する整理を行った (Yokoyama et al. 2007, 下図参照)。



しかしながら, ヤブレッツボカビ科の基準属であるヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium* 属) については, 少なくとも 5 つの系統群に分かれて位置しているにも関わらず, 未着手の状態のままである。この理由としては, *Schizochytrium* 属と *Ulkenia* 属のそれぞれの基準種とされる株が存在し, その系統的位置から, 狭義の属を指定できたことに対し, ヤブレッツボカビ属では基準種とされる株が存在しないことが挙げられる。また, ヤブレッツ

ボカビ科の生物の中で, ヤブレッツボカビ属は最初に記載されたため, それ以降に比較的異なる形質をもつと判断された生物は別属とされたが, それ以外は全てヤブレッツボカビ属の種として扱われてきたため, 現在は 17 種と最大の属となっており, その整理は大がかりなものとなることも予想される。ただし, ヤブレッツボカビ属が整理されれば, ラビリンチュラ類の属に関する分類学的な問題点の解決については大きく前進することとなり, 記載された株が失われている単独種の属である *Japonochytrium* 属と *Althornia* 属を再発見することが残るのみとなる。

2. 研究の目的

ヤブレッツボカビ属の基準種である *Thraustochytrium proliferum* と同定される株を取得することを目指す。Sparrow (1936) による原記載では, 基準産地であるアメリカ, マサチューセッツ州のウッズホールで採取された緑藻ハネモを海水中に放置している中で観察されたとされているため, 現地で原記載と同様の時期に採集を行い, 分離を試みる。また, ウッズホールだけでなく, 日本国内でもハネモなどを採取し, 分離を試みる。さらに, これらのハネモや海水, 海砂, 落ち葉などの基質から DNA を抽出し, この環境 DNA に対して, 18S rRNA 遺伝子の網羅的分析を次世代シーケンサーで行って, 遺伝子の情報と分離されるラビリンチュラ類とを比較して, 分離できていない系統群の有無について調査する。分離できていない系統群があった場合には, これについての分離法を検討し, 網羅的な分離株の確立を目指す。

T. proliferum として同定される株が分離された場合には, この分子系統学的位置を確定させ, 同じ系統群内で確認される分類学的な形質について検討し, 狭義のヤブレッツボカビ属として認識可能かを検討する。また, ヤブレッツボカビ属として同定されている他の系統群について, 分類学的な形質について検討し, 狭義のヤブレッツボカビ属と分割して新属を設立することが妥当かどうかを検討し, ラビリンチュラ科内の分類学的整理を試みる。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサー (NGS) による試

料中の網羅的な系統群解析

国内で緑藻ハネモや海水、海砂、落ち葉などを採集し、これらに対してDNAを抽出した。これに対して、次世代シーケンサーによって、18S rRNA 遺伝子の特異的に増幅させたPCR産物について配列決定を行った。特に、ハネモなどについては、緑藻の18S rRNA 遺伝子が増幅しないようにプライマーを設計して、ラビリンチュラ類についての情報をより得られるように工夫した。18S rRNA 遺伝子の前半領域を用いることで、約500塩基の長さがあれば、系統群の特定ができることを確認し、Blast 検索などによってラビリンチュラ類と思われる全ての配列について、分子系統学的解析を行った。

上記のノウハウを得た上で、基準種 *T. proliferum* の基準産地であるアメリカ、マサチューセッツ州のウッズホールで2回の採集を行った。原記載には、ウッズホールの地点かについての記述はないが、ウッズホール海洋生物学研究所の近くの Eel Pond という汽水環境に、ハネモが生息している情報をアメリカの藻類学者から得たため、ラビリンチュラ類は特に汽水を好む性質があり、そこを重点的に調査した。

(2) NGS 解析を行った同じ試料からの分離とその系統群解析

次世代シーケンサーの解析を行った試料から分離を行った。ラビリンチュラ類の分離では松花粉を用いた釣り餌法が主流であるが、これに加えて、動物性の魚粉やアルテミア幼生、緑藻の青のり、紅藻のスサビノリ、髪の毛など、様々な釣り餌によって分離を行った。また、本研究の主目的であるヤブレッツボカビ属の基準種 *T. proliferum* の分離に向けて、本種の前記載では、生きたハネモを海水中で維持している中から観察されたとされているため、同様のハネモの観察からの直接分離や、クロレラなどの単細胞緑藻を生き餌にすることなども実施した。さらに、それぞれの系統群に対する抗生物質に対する耐性試験から、有効な生育可能な条件の検討を行った。分離された株については、18S rRNA 遺伝子の配列を決定し、分子系統学的解析から系統群を把握した。

(3) 環境 DNA と分離株の系統群の比較

環境 DNA と分離株の系統群を比較した。採集物（例えばハネモ）に対しては、少なくとも表面の付着物、原形質、細胞壁に分けて抽出し、分離されていない系統群に対する特異

プライマーを作成して、それぞれのDNAに対してPCRによって、当該生物の存在位置をできるだけ絞り込むようにした。また、環境DNAのみで認識された系統群が、申請者のこれまでの分離作業の中で出現していないかを確認し、維持している分離株の中にあれば、その株について、形質の把握を行った。

(4) 分離株の形質把握

得られた分離株について、培養チャンバーでの長時間にわたるタイムラプス撮影などを組み合わせた生活史の観察や、それぞれのステージにおける詳細な観察などを行い、形態的な形質を把握した。特に、生きている海藻の上の形態が原記載されているものがあるため、海藻との2員培養などを行って慎重に観察を行った。また、従来のヤブレッツボカビ属として認識される系統群についても、*T. proliferum* との比較をするために、形質情報の蓄積を行った。

4. 研究成果

(1) *Thraustochytrium proliferum* の探索

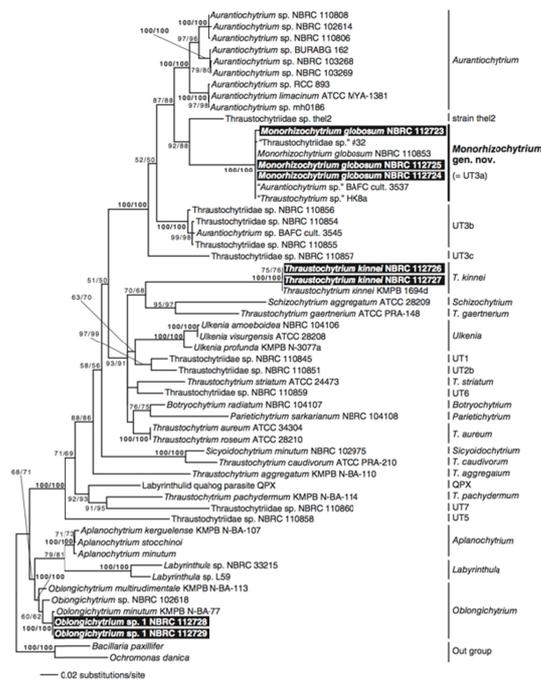
T. proliferum の再分離を目指して、アメリカ・ウッズホールのタイプ産地を含め、国内外から1600株以上の分離株を確立した。これらの株の予備的な観察から多様性を減じないように選択された100以上の株について、19S rRNA 遺伝子配列を決定して、分子系統解析をしたところ、13の系統群に分かれて位置することを明らかにした。これら13系統群から代表株を選択し、タイムラプス撮影などを含む、より詳細な観察を行った。特に、2回目のウッズホールでの分離作業では、新たに開発した難培養性の系統群に対する培養法を適用することで、従来よりも多様性のある培養株を得られるようにした。しかしながら、*T. proliferum* として同定される株は得られなかった。

また、ウッズホールの紅藻などからDNAを抽出し、含まれる18S rRNA 遺伝子配列を次世代シーケンサーによって分析し、ラビリンチュラ類の配列として同定されたものを系統解析したところ、11の既知の系統群に加え、これまでに認識されていなかった系統群が多数認識された。既知の11系統群については、今回の作業で分離された株が位置したり、これまでに分離されて確立された培養株が位置したりしたため、より詳細に形態観察を行ったが、やはり *T. proliferum* として同定

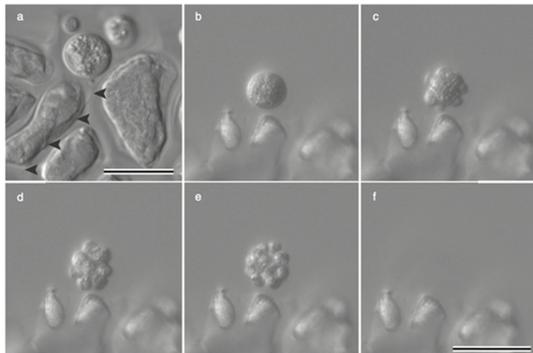
されるものは存在しなかった。

(2) *Thraustochytrium globosum* の探索

T. globosum は, *Thraustochytrium* 属の中で 2 番目に記載された種であり, *T. proliferum* と同様に, 海藻表面で観察された形態情報のみが記録されている。この種のタイプ産地は千葉県太海であり, ここで採取した緑藻から分離株を確立した。それぞれの株の 18S rRNA 遺伝子配列を決定したところ, *Thraustochytrium kinnei* 系統群, *Oblongichytrium* sp. 系統群, および未同定の系統群の 3 つに分かれて位置した(下図)。

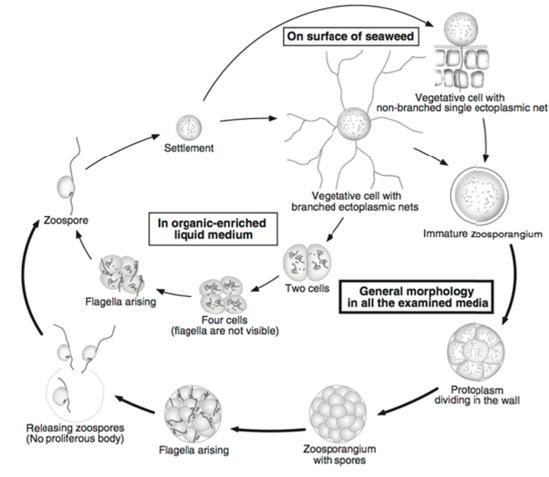


この未同定の系統群に位置する株について, 生活史を通して, 詳細に観察したところ, 海藻表面では, 細い枝分かれしない外質ネットを伸ばさせること, 成熟して遊走細胞を放出した後, 原基体を残さないこと, 遊走細胞内に 2~3 個の顆粒状構造が確認できることなどの形態形質が確認されたことから, この株を *T. globosum* として同定した(下図)。



(3) 新属 *Monorhizochytrium* 属の設立と *Thraustochytrium* 属に関する分類学的考察

T. globosum は, 野外から採取された海藻表面で観察された形態形質のみが記載されている。そこで, 新たにタイプ産地から確立できた培養株を用いて, 人工培地を用いた無菌培養の条件下で詳細な観察を行い, この種がもっている形態形質の総合的な把握を行った。その結果, 外質ネットの形態や, 遊走細胞の形成様式などに, これまでに知られていなかった特徴が確認された(下図)。



これらの *T. globosum* と, *T. proliferum* の形態形質を比較したところ, 両者は, 培養条件を変化させても, 明確に区別できることが確認された。また, 比較すべきヤブレッツボカビ類の既知属と, 生活史を通して観察される形態形質を比較した結果, *T. globosum* と, *T. proliferum* で確認できる形質の違いは, 種というよりはむしろ, 属の違いに相当することが確認され, *T. globosum* に対して, 新属を設立することが妥当として判断された。そこで, 現在印刷中の *Phycological Research* 誌において, *Monorhizochytrium* 属の設立の記載論文を公表した。また, 本研究の中で, *T. globosum* の holotype の所在が不明となっていることが判明したため, Lectotype 指定を行い, されに, タイプ産地からの分離株を製品評価技術基盤機構 (NBRC) に寄託し, その凍結株を epitype 指定した。

さらに, *Thraustochytrium* 属の記載されている全ての種についても, 形態形質の比較を行った。その多くの種は, *T. globosum* と同様に属として独立させることが, 分類体系のバランスとして適当であることが示唆された。個々の種について, 本研究と同様に培養条件を変化させたときの形態形質の総合的な把握をして, その分子系統学的な位置を明確にした上で, 分類学的な再編成をしていく

ことが望ましいと考えられた。これまで *Thraustochytrium* 属の分類については問題点が指摘されながらも、対象とすべき種が多いこともあって、手が付けられない状況となっていた。今回の *Monorhizochytrium* 属の設立が、このような分類学的処置を行う根拠として用いられ、一歩ずつ問題の解消に向けて進むことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Doi K, Honda D. (2017) Proposal of *Monorhizochytrium globosum* gen. nov., comb. nov. (Stramenopiles, Labyrinthulomycetes) for former *Thraustochytrium globosum* based on morphological features and phylogenetic relationships. Phycological Research (in press). 査読有 DOI: 10.1111/pre.12175

Iwata I, Kimura K, Tomaru Y, Motomura T, Koike K, Honda D. (2017) Bothrosome formation in *Schizochytrium aggregatum* (Labyrinthulomycetes, Stramenopiles) during zoospore settlement. Protist 168: 206-219. 査読有 DOI: 10.1016/j.protis.2016.12.002

〔学会発表〕(計15件)

土井耕作, 本多大輔. ラビリントチュラ類 *Thraustochytrium globosum* の分類 ~ 新属 *Monorhizochytrium* の設立~. 日本藻類学会(高知大学, 高知市). 2017.3.23-25

土井耕作, 本多大輔. ヤブレッツボカビ科のタイプ属(*Thraustochytrium*)のタイプ種 *T. proliferum* の探索. 日本プランクトン学会(熊本県立大学, 熊本市). 2016.9.8-9.

高橋和也, 土井耕作, 岩田いづみ, 浜本洋子, 石橋真由, 秋山達哉, 伊野部真緒, 佐藤正和, 池田啓二, 河地正伸, 本多大輔. 西表島を対象としたラビリントチュラ類の分離法検討と増殖評価. 日本藻類学会(日本歯科大学, 東京都). 2016.3.18-20

Doi K, Ueda M, Raghukumar S, Raghukumar C, Honda D. Taxonomy and phylogeny of the genus *Aurantiochytrium* (Labyrinthulomycetes, stramenopiles). Asian Mycological Congress 2015. Goa University (Goa, India). 2015.10.7-10.

Iwata I, Honda D. Observation on the development of the bothrosome after zoospore settlement, which characterized the Labyrinthulomycetes (Stramenopiles). Protist 2014. Banff Center (Banff, Canada). 2014.8.3-8.

〔図書〕(計1件)

本多大輔(分担執筆)(2014). 菌類の生物学. 共立出版. 総ページ数: 473.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ: LabyBase
<http://syst.bio.konan-u.ac.jp/labybase/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 大輔 (HONDA, Daiske)
甲南大学 理工学部 教授
研究者番号: 30322572

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者: なし

(4) 研究協力者: なし