

学位論文題名

A systematic study of Japanese freshwater dinoflagellates

(日本産淡水渦鞭毛藻類の系統分類学的研究)

学位論文内容の要旨

淡水渦鞭毛藻類については、ヨーロッパ・北アメリカを中心に分類学的研究が行われており、日本での研究は非常に遅れているのが現状であった。我が国では現在まで約58種(全体約200種)の記録があるが、そのほとんどが古いもので走査型電子顕微鏡を用いた観察は少ない。また、世界的に見ても海産種に比べて淡水産種の研究は遅れており、分子系統学的研究も少ない。そこで本研究は、1) 我が国の淡水渦鞭毛藻類の種多様性を明らかにし、2) 分子系統学的手法を用いてそれらの系統関係を明らかにし、3) 分類体系の再検討を行うとともに淡水産種の進化過程を明らかにすることを目的としておこなった。

第一章では、近年広く用いられ始めた単細胞 PCR 法に関して新たな手法の確立を行った。単細胞 PCR 法は、培養の難しい淡水種や従属栄養種については非常に有用な DNA 配列決定法であるが、一方細胞を丸ごと解析に用いてしまうために証拠標本を残せないという重大な欠点があった。本研究では、光学顕微鏡で観察・記録した個体をさらに走査型電子顕微鏡を用いて詳細に表面構造を観察・記録し、その個体を PCR に用いるという方法を確立した。これにより PCR に用いた個体の詳細な形態情報を残すことが可能となった。さらに、同時に複数のプライマーセットを用いることで、核とミトコンドリアゲノムにコードしている複数の遺伝子(領域)の DNA 配列を一個体から決定できることを示した。本手法は原生生物の多様性研究のスピードアップを可能にするものである。

第二章では、日本産の淡水渦鞭毛藻類について光顕および走査電顕レベルの詳細な記載をおこなった。研究に用いたサンプルは、北海道を中心とした日本各地の池沼において約280カ所460回の採集に基づく。特に、電子顕微鏡を用いた観察から apical groove や細胞外被などの形態について新たな知見を数多く得る事が出来た。本研究の結果14属に属する62種(日本新産種29種を含む)が観察され、我が国で確認された淡水渦鞭毛藻類の数は全部で87種となった。

第三章では、分子系統学的手法を用いて、淡水産種同士の、また、海産種との系統関係の解明を行った。淡水産種62種、海産種9種の SSU rDNA 配列を、また淡水産種60種、海産種19種の LSU rDNA 部分配列(D1-D6)を決定した。

第三章第一節では、淡水産の *Gymnodinium helveticum* が *Gyrodinium* の形態形質をもつことを明らかにし、さらに *Gyrodinium* のタイプ種を含む海産種4種(*G. spirale*, *G. fusiforme*, *G. rubrum*, *G. aureum*) との系統解析を行った結果、これら5種は単系統群となることが示された。これらの結果から新組み合わせ

Gyrodinium helveticum, *Gyrodinium rubrum*, *Gyrodinium aureum* を提唱した。

第三章第二節では、Daugbjerg ら (2000) によって定義された *Gymnodinium* の 1 つの特徴である馬蹄形の apical groove を持つ、淡水産 10 種 (タイプ種含む) と海産種 5 種 (*Amphidinium latum*, *Lepidodinium viride*, *Nematodinium armatum*, *Spiniferodinium galeiforme*, *Polykrikos kofoidii*) の配列を、既存の分子データに加えて系統解析を行った。結果、これら全ては単系統群となり、馬蹄形の apical groove がこの系統群に特有の形質であることが、さらに多くの種について示された。しかし、この系統群を 1 属にまとめることは明らかに不適當であり、本研究でも、いくつかのサブグループの存在が新たに明らかとなった。クレプトクロロプラスト (盗葉緑体现象) を持つ無殻の 4 種もその一つで、この特異な栄養摂取様式がこの系統の中から進化したものであることを初めて明らかにした。

第三章第三節では、生活史の一部分に特徴的な不動細胞を持つ淡水産種 *Cystodinium cornifax*, *Glenodiniopsis steinii*, '*Hemidinium nasutum*' var. *tatricum*, *Tetradinium intermedium* について、同様の特徴をもつ海産種と共に系統解析を行った。その結果、それぞれの近縁性は示されなかった。よって、特徴的な形態をもつ不動細胞はそれぞれ独立に進化したことが示された。

第三章第四節では、多数の多角形の鎧板を持つ、*Woloszynskia*-type の形態を持つ淡水産種 15 種について系統解析を行った。このグループは、眼点とシストの特徴によっていくつかの系統群に分けられることが示されていたが、さらに多くの種を解析に加えることによって、新たにいくつかの系統群の存在が明らかとなった。

第三章第五節では、*Peridinium* に属する 20 種と *Peridiniopsis* に属する 4 種について系統解析を行った。これらの属は、従来は前挿間板の枚数のみで区別されていた。しかし、従来の定義によるこの 2 属は多系統となった。一方、この 2 属のメンバーは 7 つの系統群のいずれかに分かれることが明らかとなった。しかもそれぞれの系統群は、鎧板表面の模様の有無、頂孔の有無、前挿間板の枚数、横溝板の枚数、シストの特徴、眼点の特徴、葉緑体の有無を組み合わせることで、形態的にも区別し得ることが明らかとなった。

第三章第六節では、珪藻を細胞内共生体として持つ淡水産 3 種、海産 1 種を新たに加え、宿主細胞と共生体の系統解析をそれぞれ行った。宿主細胞は同様の特徴を持つ他の種と共に単系統群となった。しかし、共生藻の系統関係は宿主のそれとは一致しなかった。このことから一部の系統で、共生藻 (珪藻) の置き換わりが起こったことが強く示唆された。また、*Durinskia baltica* は海水域と淡水域から報告されている種で、両者に形態的な違いはない。一方、両者は遺伝的にはすでに分化していることが明らかとなり、生育環境の違いが種分化を促進していることが示唆された。

以上、本研究の最大の特徴は、調べたほとんどの種に分子情報が付随しているという点である。これは独自に確立した方法の成果であり、比較的短期間に多くの淡水産種の詳細な外部形態だけでなく系統関係をも同時に明らかにすることができた。それらの結果に基づき、いくつかの分類群では分類系の見直しを行った。また、海水域から淡水域への移入は、それぞれの系統群において複数回起こったであろうことも明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 堀 口 健 雄

副 査 教 授 増 田 道 夫

副 査 教 授 本 村 泰 三 (北方生物圏フィールド

科学センター)

副 査 助 教 授 小 亀 一 弘

学 位 論 文 題 名

A systematic study of Japanese freshwater dinoflagellates

(日本産淡水渦鞭毛藻類の系統分類学的研究)

淡水渦鞭毛藻類については、ヨーロッパ・北アメリカを中心に分類学的研究が行われており、日本での研究は遅れていた。本邦では 58 種 (全体約 200 種) の記録があるが、そのほとんどが古いもので走査型電子顕微鏡を用いた観察は少ない。また世界的にも海産種に比べて淡水産種の研究は遅れており分子系統学的研究も少ない。そこで本研究は、1) 我が国の淡水渦鞭毛藻類の種多様性を明らかにし、2) 分子系統学的手法を用いてそれらの系統関係を明らかにし、3) 分類体系の再検討を行うとともに淡水産種の進化過程を明らかにすることを目的としておこなった。

第一章では、近年広く用いられ始めた単細胞 PCR 法に関して新たな手法の確立を行った。単細胞 PCR 法は有用な DNA 配列決定法であるが証拠標本を残せないという欠点があった。本研究では、光学顕微鏡で観察・記録した個体をさらに走査型電子顕微鏡を用いて表面構造を観察・記録し、その個体を PCR に用いるという方法を確立した。これにより PCR に用いた個体の詳細な形態情報を残すことが可能となった。さらに、核とミトコンドリアゲノムにコードしている複数の遺伝子の DNA 配列を一個体から決定できることを示した。

第二章では、日本産の淡水渦鞭毛藻類について光顕および走査電顕レベルの詳細な記載をおこなった。用いた試料は日本各地の池沼約 280 カ所 460 回の採集に基づく。走査電顕を用いた観察から apical groove や細胞外被などの形態について新たな知見を数多く得た。結果 14 属 62 種 (日本新産種 29 種を含む) が観察され、本邦の淡水渦鞭毛藻類の数は全部で 87 種となった。

第三章では、分子系統学的手法を用いて淡水産種同士の、また海産種との系統関係の解明を行った。淡水産種 62 種、海産種 9 種の SSU rDNA 配列を、また淡水産種 60 種、海産種 19 種の LSU rDNA 部分配列 (D1-D6) を決定した。第一節では、淡水産の *Gymnodinium helveticum* が *Gyrodinium* の形態形質をもつことを明らかにし、さらに *Gyrodinium* のタイプ種を含む海産種 4 種との系統解析を行い、これら 5 種が単系統群となることを示した。この結果から 3 種に対して新組み合わせを提唱した。第二節では、*Gymnodinium* の 1 つの特徴とされる馬蹄形の apical groove を持つ淡水産 10 種と海産種 5 種の配列を、既存の分子データに加えて系統解析を行った。結果、これら全ては単系統群となった。しかし、この大系統群を 1 属にまとめることは明らかに不适当であり、本研究でもいくつかのサブグループの存在が新たに明らかとなった。盗葉緑体現象を持つ無殻の 4 種もその一つで、この特異な栄養摂取様式がこの系統中から進化したものであることを初めて明らかにし、新属 *Nusuttodinium* を提唱した。第三節では、生活史の一部分に特徴的な不動細胞を持つ淡水産 4 種について、同様の特徴をもつ海産種と共に系統解析を行った。その結果、それぞれの近縁性は示されずそれぞれ独立に進化したことが示された。第四節では、*Woloszynskia*-type の形態を持つ淡水産種 15 種について系統解析を行った。このグループは、眼点とシストの特徴によっていくつかの系統群に分けられることが示されていたが、さらに多くの種を解析に加えることによって、新たにいくつかの系統群の存在が明らかとなった。第五節では、*Peridinium* に属する 20 種と *Peridiniopsis* に属する

4 種について系統解析を行った。従来の定義によるこの 2 属は多系統となったが、一方これらは 7 つの系統群のいずれかに分かれることが明らかとなった。しかもそれぞれの系統群は、鎧板表面の模様、頂孔の有無、前挿間板の枚数、横溝板の枚数、シストの特徴、眼点の特徴、葉緑体の有無を組み合わせることで、形態的にも区別し得ることを示した。第六節では、珪藻を細胞内共生体として持つ淡水産 3 種、海産 1 種を新たに加え、宿主細胞と共生体の系統解析をそれぞれ行った。宿主細胞は同様の特徴を持つ他の種と共に単系統群となった。共生藻の系統関係は宿主のそれとは一致しなかったことから一部の系統で、共生藻（珪藻）の置き換わりが起こったことが強く示唆された。

これを要するに、筆者は、淡水産渦鞭毛藻類の系統分類学的研究において、形態観察と組み合わせた単細胞 PCR 法を駆使することにより単細胞生物のフロラ研究の新しい方向性を示し、さらに日本産淡水渦鞭毛藻類の多様性の理解を促進し、あわせて現行の分類体系の見直しを提唱するなど、淡水渦鞭毛藻類の多様性に関して多くの新知見を得たもので、生物学に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。