

学 位 論 文 題 名

A molecular phylogenetic study of the heterotrophic
dinoflagellate genus *Protoperidinium* (Dinophyceae)

(従属栄養性渦鞭毛藻プロトペリディニウム属 (渦鞭毛藻綱) の
分子系統学的研究)

学位論文内容の要旨

Protoperidinium 属は 260 種以上が知られる渦鞭毛藻最大の属である。本属は細胞全体を覆うセルロース質の鎧板の枚数に基づいて亜属に、さらに、特定の鎧板や細胞全体の形などの複数の形質の組み合わせによって節に細分されている。しかし、形態が非常に多様であることから、実際はどの形質が系統を反映しているのか判定が難しい。また、一部の種は生活環中にシスト (休眠胞子) 期をもつが、遊泳細胞とは形態が大きく異なることから両者の対応関係は明らかでない場合が多い。さらに、シストに見られる形態変異が種内変異か、あるいは種の違いを反映しているのかについても十分な知見がない。このような問題の解決には分子系統学的方法が有効であるが、本属に関してはそのような研究がほとんどなされていなかった。このような背景から本研究は、1) 分子系統学的手法を用いて、本属の進化過程を推定し、属内の種間の系統関係を明らかにして現在提唱されている分類体系を再検討する、2) 発芽実験、形態観察と分子系統解析を組み合わせることによりシストと遊泳細胞の対応関係を解明することを目的とした。

第 1 章では、単細胞 PCR 法を用いて、小サブユニット・リボソーム RNA 遺伝子 (SSU rDNA) と大サブユニット・リボソーム RNA 遺伝子 (LSU rDNA) (D1-D6 領域) の配列を本属 26 種ずつについて決定し、最近公表された本属 12 種の配列を加え、合計で 4 亜属 10 節に属する種について系統解析をおこなった。また、同じく最近公表された本属に近縁と考えられている海産有殻従属栄養性種のグループ (まとめてディプロプサリス類と呼ぶ) 7 種の配列もデータセットに含めた。系統樹は最大節約法、近隣結合法、最尤法を用いて構築した。SSU rDNA データセットによる解析結果では、*Oceanica* 節がディプロプサリス類とクレードを形成するため、本属の単系統性は示されなかった。一方、LSU rDNA データセットによる解析では本属は単系統となった。この SSU と LSU rDNA 解析結果の違いは、各データセットに含まれるディプロプサリス類の種が異なるためと考えられ、「ディプロプサリス類クレード」、「*Oceanica* 節 (*Testeria* 亜属を含む) クレード」、「その他の *Protoperidinium* クレード」の系統関係については結論が出なかった。

しかしながら、全ての解析において、本属は「*Oceanica* 節/*Testeria* 亜属クレード」と「その他の種のクレード」に分かれることが示された。「その他の種のクレード」内では、前挿間板が 1 枚少ないことから *Archaeoperidinium* 亜属に分類される 2 つの節 (*Avellana* と *Excentrica* 節) が *Conica* 節のメンバーからそれぞれ独立して派生する

ことが示唆された。さらに、*Avellana* 節、*Excentrica* 節とは別に *Divergentia* 節/*Humilia* 節/*Protoperidinium* 節/*Pyriformia* 節/*Minusculum* 亜属のクレード (Meta/para クレード) も派生することから、「その他の種のクレード」内では *Conica* 節が原始的な種の集まりであることが示唆された。また、前挿間板が 2 枚少ない *Testeria* 亜属の種は *Oceanica* 節に含まれ、前帯板の枚数が 1 枚少ない *Minusculum* 亜属の種は Meta/para クレード内に位置し、さらに *Protoperidinium* 節と近縁であることが支持された。*Conica* 節、*Oceanica* 節、*Protoperidinium* 節を除く各節の単系統性は強く支持された。以上のことから、伝統的な分類体系が節レベルでほぼ妥当である一方、本属内の複数の系統で鎧板枚数の減少が散在的に起こったことが示唆されたため、鎧板枚数の違いによって分類される亜属は系統を反映しないことが明らかになった。

SSU と LSU rDNA それぞれにおいて、配列の種内変異がいくつかの種で見つかった。特に *P. conicum* では大きな割合で塩基置換があり、隠蔽種の存在が示唆された。また、渦鞭毛藻綱全体における本属の系統的位置については、用いた遺伝子の解像度が系統樹の深い位置で低く、明確な結論は得られなかった。

第 2 章では、本研究で用いた本属合計 27 種の形態的特徴を記載した。単細胞 PCR 法ではその性質上、証拠標本を残すことが不可能であるため、実際に PCR に用いた細胞それぞれについて高品質の光学または蛍光顕微鏡写真を記録として残すことが重要である。本章に掲載した写真は分子データの種名確認のための証拠写真としても機能する。

第 3 章では、*P. oblongum* のものと同定されてきたシストの発芽実験をおこない、発芽遊泳細胞の形態観察と分子系統解析によってシスト-遊泳細胞の対応関係を調べた。その結果、シストには 2 つの形態タイプが見られ、それぞれのシストからは遺伝的に異なる遊泳細胞が発芽し、その遊泳細胞同士も観察しにくい部位の鎧板の形が明確に異なることが明らかになった。従って、*P. oblongum* のシストに見られる形態変異は種内変異ではなく、種の違いを反映していることが判明した。これら 2 種の遊泳細胞の形態はいずれも *P. oblongum* の原記載とは異なっていた。これらはそれぞれ種として認識されるべきであり、1 種は過去に記載されていた変種を種に格上げし、新組み合わせ *Protoperidinium inaequale* comb. et stat. nov. とすることを提案した。もう一種は *Peridinium oblongum* var. *symmetricum* Dangeard に類似しており、この変種をもとに種に格上げすることを検討したが、本変種に類似した形態を持ちながら遺伝的に異なる種が海外から報告されており、どちらが *P. oblongum* var. *symmetricum* に近いのか判断できず、分類学的措置については保留とした。本研究は、遊泳細胞では形態的差異を認識しにくい種同士でも、シスト形態が種の違いをより明確に反映することを本属において初めて分子レベルで実証した。

第 4 章では、本属の種の摂餌実験をおこなった。本属は「pallium feeding」と呼ばれる特殊な細胞外消化機構を持つことで知られる。今までの本属の種の培養は、珪藻や光合成性渦鞭毛藻などの生物餌料を与えることで確立されてきた。しかし、このような混合培養では、餌生物からの DNA や有機化合物の混入が避けられず、本属の種の分子生物学的な研究や生化学的研究には不适当である。この点を克服するために本研究では非細胞性餌料を用いた培養を試みた。様々な種と様々な餌の組み合わせによる培養実験の結果、*P. crassipes* に白玉餅粉を与えて増殖させ、培養株を確立することに成功した。興味深いことにこの組み合わせでは再現性があったが、それ以外の種の培養は全く成功しなかった。

以上、本研究は現行の属内分類体系で提唱される全ての亜属とほぼ全ての節に属する種を網羅した系統解析をおこない、本属の進化過程、形態進化の理解に貢献した。その結果は大規模な分類学的改変の必要性を示唆するものであり、より自然な

分類系を構築するための基礎を提供した。また、本属の種の分類におけるシスト形態の重要性を初めて分子レベルで明らかにすることができた。

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 molecular phylogenetic study of the heterotrophic dinoflagellate genus *Protoperidinium* (Dinophyceae)

(従属栄養性渦鞭毛藻プロトペリディニウム属 (渦鞭毛藻綱) の
分子系統学的研究)

Protoperidinium 属は 260 種以上が知られる渦鞭毛藻最大の属である。本属は細胞全体を覆うセルロース質の鎧板の枚数に基づいて亜属に、さらに、特定の鎧板や細胞全体の形などの複数の形質の組み合わせによって節に細分されている。しかし形態が非常に多様であることから、実際はどの形質が系統を反映しているのか判定が難しい。また、一部の種は生活環中にシスト (休眠胞子) 期をもつが、遊泳細胞とは形態が大きく異なることから両者の対応関係は明らかでない場合が多い。さらに、シストに見られる形態変異が種内変異か、あるいは種の違いを反映しているのかについても十分な知見がない。このような問題の解決には分子系統学的方法が有効であるが、本属に関しては先行研究がほとんどなかった。以上の背景から本研究は、1) 分子系統学的手法を用いて、本属の進化過程を推定し、属内の種間の系統関係を明らかにして現在提唱されている分類体系を再検討する、2) 発芽実験、形態観察と分子系統解析を組み合わせることによりシストと遊泳細胞の対応関係を解明することを目的としたものである。

第 1 章では、単細胞 PCR 法を用いて、小サブユニット・リボソーム RNA 遺伝子 (SSU rDNA) と大サブユニット・リボソーム RNA 遺伝子 (LSU rDNA) (D1-D6 領域) の配列を本属 26 種ずつについて決定し系統解析をおこなった。全ての解析において、本属は「*Oceanica* 節/*Testeria* 亜属クレード」と「その他の種のクレード」に分かれることが示された。「その他の種のクレード」内では、前挿間板が 1 枚少ないことから *Archaeoperidinium* 亜属に分類される 2 つの節 (*Avellana* と *Excentrica* 節) が *Conica* 節のメンバーからそれぞれ独立して派生することが示唆された。さらに、*Avellana* 節、*Excentrica* 節とは別に *Divergentia* 節/*Humilia* 節/*Protoperidinium* 節/*Pyriformia* 節/*Minusculum* 亜属のクレード (Meta/para クレード) も派生することから、「その他の種のクレード」内では *Conica* 節が原始的な種の集まりであることが示唆された。また、前挿間板が 2 枚少ない *Testeria* 亜属の種は *Oceanica* 節に含まれ、前帯板の枚数が 1 枚少ない *Minusculum* 亜属の種は Meta/para クレード内に位置し、さらに *Protoperidinium* 節と近縁であることが支持された。*Conica* 節、*Oceanica* 節、*Protoperidinium* 節を除く各節の単系統性は強く支持された。以上のことから、伝統的な分類体系が節レベルではほぼ妥当である一方、複数の系統で鎧板枚数の減少が独立的に起こったため鎧板枚数の違いによって分類される亜属は系統を反映しないことが明らかになった。

第 2 章では、本研究で用いた本属合計 27 種の形態的特徴を記載した。単細胞 PCR 法ではその性質上、証拠標本を残すことが不可能であるため、実際に PCR に用いた細胞それぞれについて高品質の光学または蛍光顕微鏡写真を記録として残すことが重要である。本章に掲載した写真は分子データの種名確認のための証拠写真としても機能するものである。

第3章では、*P. oblongum* のものと同定されてきたシストの発芽実験をおこない、発芽遊泳細胞の形態観察と分子系統解析によってシスト-遊泳細胞の対応関係を調べた。その結果、シストには2つの形態タイプが見られ、それぞれのシストからは遺伝的に異なる遊泳細胞が発芽し、その遊泳細胞同士も観察しにくい部位の鎧板の形が異なることが明らかになった。従ってシストに見られる形態変異は種内変異ではなく、種の違いを反映していることが判明した。本研究は、遊泳細胞では形態的差異を認識しにくい種同士でも、シスト形態が種の違いをより明確に反映することを本属において初めて分子レベルで実証したものである。

第4章では、本属の種の摂餌実験をおこなった。今までの本属の種の培養は、珪藻などの生物餌料を与えることで確立されてきた。しかし、このような混合培養では、餌生物からのDNAや有機化合物の混入が避けられず、本属の種の分子生物学的な研究や生化学的研究には不適當である。この点を克服するために本研究では非細胞性餌料を用いた培養を試み白玉餅粉を与えることにより *P. crassipes* の培養株を確立することに成功した。

これを要するに、著者は、渦鞭毛藻 *Protoperidinium* 属において現行の属内分類体系で提唱される全ての亜属とほぼ全ての節に属する種を網羅した系統解析をおこない、本属の進化過程、形態進化の理解に貢献し、さらに本属の種の分類におけるシスト形態の重要性を初めて分子レベルで明らかにするなど、渦鞭毛藻類最大属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。