

論文内容の要旨

論文題目 Taxonomic re-evaluation of *Chlorogonium* (Volvocales, Chlorophyceae) and related phytoflagellates based on molecular phylogenetics and subcellular morphology.

(分子系統と細胞形態に基づくヤリミドリ属 (緑藻綱オオヒゲマワリ目) および近縁鞭毛藻類の属階級の分類学的再検討)

氏名 仲田崇志

緑藻綱オオヒゲマワリ目 (Volvocales, Chlorophyceae) は主に淡水産の鞭毛藻からなり、少なくとも 800 種以上を含む多様性の高い群で、研究者によって範囲や分類が大きく異なっている (例: Silva, 1982)。近年の分子系統解析の発展と培養株を用いた微細構造の研究によって種階級の自然分類研究は進展しているが (Nozaki *et al.*, 1998; Nakazawa *et al.*, 2001; Nakada *et al.*, 2007), オオヒゲマワリ目の範囲や種より上位の分類群の多くで分子系統との矛盾が指摘されている (Buchheim *et al.*, 1990, 1996, 1997; Nozaki *et al.*, 2000; Pröschold *et al.*, 2001)。特に属は二名法の学名の一部を構成し、種間関係を表現する階級として重要である。しかし鞭毛性オオヒゲマワリ目の属階級の分類研究には、これまで培養株の不在、分子系統との矛盾、識別形質の欠如 (微細構造が研究されていない), などの問題があった (例えば Pröschold *et al.*, 2001)。本研究ではこれらの問題点を踏まえ、オオヒゲマワリ目における属定義の標準を確立するため、ヤリミドリ属 (*Chlorogonium*) の属階級の分類学的整理を目的とした。ヤリミドリ属は顕著な紡錘形の細胞と「真の横分裂」で定義され (Ettl, 1980, 1983; Nozaki *et al.*, 1998), 細胞形態の進化の面からも興味深い。しかしヤリミドリ属では種の分類学的整理が進んでいる一方で多系統性が指摘されており (Nozaki *et al.*, 1998), 近縁な紡錘形鞭毛藻類と併せて (以下「ヤリミドリ様藻類」と総称) 属階級の分類学的整理が必要である。本研究では、網羅的な系統解析に基づいて、オオヒゲマワリ目内部に複数の系統群を定義し、研究対象であるヤリミドリ様藻類の属する系統群を示した。次に 3 遺伝子の結合解析に基づいてこの系統群内部の詳細な系統関係を調べ、電子顕微鏡および蛍光顕微鏡などを用いてヤリミドリ様藻類の細胞構造を比較し、系統を反映した識別形質に基づく属階級の分類学的再編を行った。

1. 18S rRNA 遺伝子に基づくオオヒゲマワリ目の網羅的系統解析

これまでオオヒゲマワリ目全体については妥当な系統分類体系が存在せず、研究を始めるに際して内部系統群の客観的定義が必要であった。そこで PhyloCode (Cantino & de Queiroz, 2007) に準拠し、*Volvocales* を「*Volvox carteri* を含み *Sphaeroplea annulina* を含まない最も包括的な単系統群」と再定義した上で (PhyloCode に従った属より高位の分類群名はイタリック表記とした)、GenBank の網羅的な BLAST 検索 (Altschul *et al.*, 1990) により 1,400 塩基対以上の *Volvocales* の配列を 449 配列特定し、その系統関係を推定した。*Volvocales* には強く支持 (事後確率 0.95 以上、最尤法ブーツストラップ確率 75% 以上) される 21 系統群と所属不明の 4 配列が認められた (図 1)。また事後確率でのみ支持された 2 系統群 (*Xenovolvox*, *Caudivolvox*) についても、他の複数遺伝子解析の結果 (Buchheim *et al.*, 2002; Nozaki *et al.*, 2003) とよく一致したため、信頼できるものと見なした。これらの系統群は樹形に基づいて PhyloCode に準拠して定義・命名した (図 1)。

2. *Caudivolvox* 内部の系統解析とヤリミドリ様藻類の多系統性の検証

ヤリミドリ様藻類は新規株も含めていずれも *Caudivolvox* に属し、多系統群となる可能性が示唆されたため、*Caudivolvox* 内部の系統推定を行った。*Caudivolvox* 全属を含めた解析として 18S rRNA 遺伝子の系統解析を行い、さらにヤリミドリ様藻類の多系統性を高い信頼性で示すため、18S rRNA、*rbcL* および *psaB* 遺伝子の結合系統解析を行った。その結果ヤリミドリ様藻類は高い信頼度で 6 群 (A-F 群) に分かれ、A 群は着生性の藻類と、B, C, D 群はいずれも顕著に細胞形態が異なる藻類と、E 群は様々な形態の属 (D 群も含む) を含む単系統群と、それぞれ姉妹群となり、F 群は A-E 群のいずれとも姉妹群とならないことが示された (図 2)。

3. *Caudivolvox* に含まれる紡錘形鞭毛藻類系統群の形態的識別

ヤリミドリ様藻類の A-F 群を形態的に識別するため、光学・電子顕微鏡による比較観察を行った。これまでヤリミドリ属の種分類には眼点顆粒の層の数とピレノイドへのチラコイド膜の陥入の有無が重視されていた (図 3-4; Nozaki *et al.*, 1998)。A-F の各系統群内部ではこれらの微細構造は保存的で、A-F 群それぞれの間で差が見られた (表 1)。加えて新しい分類形質として、ピレノイドに陥入するチラコイド膜の形態 (図 4)、ピレノイドのデンプン鞘の形態 (図 5)、ミトコンドリアの配置 (図 6) にも群の間で差が示され、A-F 群が細胞構造において明確に異なることが示された (表 1)。これらの細胞構造は *Caudivolvox* の内部系統をある程度反映していると推測された。一方で従来ヤリミドリ属の特徴とされた「真の横分裂」(Ettl, 1980, 1983; Nozaki *et al.*, 1998) には形質状態が曖昧なものが存在し、属階級の識別形質には不適當であることが示された。ヤリミドリ様藻類 E 群については形態的に 3 型が区別されたが (表 1)、2 型は各 1 種よりなり、残りは単系統群に対応していた。

4. 分類学的見直し

本研究の結果、ヤリミドリ様藻類は *Caudivolvox* の中で 6 つの系統群 (A-F 群) に分かれ (図 2)、細胞構造からはいずれも単系統群となる 8 型が認められた (表 1)。各型は互いに区別されるだけでなく、ヤリミドリ様藻類以外の *Caudivolvox* の藻類とも形態的に明らかに区別された。これらの結果を踏まえると、分類群の単系統性を満足させ、同時に各分類群が形態的に明瞭に定義されるためには、こ

これらの 8 型をそれぞれ独立した属に分類する必要があると考えられる。そこで本研究では、ヤリミドリ様藻類をヤリミドリ属 (*Chlorogonium*; 新定義) および 7 新属 (*Tabris*, *Gungnir*, *Hamakko*, *Rusalka*, *Leucogonium*, *Niesia*, *Fusichlamys*) へと再整理し、必要な分類学的変更を提唱した (図 2, 表 1)。

考察

Caudivolvoxa には複数の多系統分類群が含まれていたが、本研究においてヤリミドリ様藻類の整理がなされたことにより、*Caudivolvoxa* のほとんどの遊泳性藻類が単系統の属へと整理された。18S rRNA 遺伝子の系統樹上で単系統群とならなかったシオヒゲムシ属 (*Dunaliella*)、アカヒゲムシ属

(*Haematococcus*)、コナミドリムシ属 (*Chlamydomonas*)、*Chloromonas* のうち、シオヒゲムシ属については系統群の間の形態的差異 (ピレノイドの配置) が指摘されており (Melkonian & Preisig, 1984)、アカヒゲムシ属については本研究でヤリミドリ様藻類の識別形質に用いたピレノイドのデンプン鞘の形質によって各系統群が区別される可能性が示唆されている (仲田, 未発表)。従ってヤリミドリ様藻類以外の *Volvocales* 藻類においても、細胞構造の差異に着目し、その組み合わせによって属を再定義することで分子系統によって多系統であることが示されている伝統的な属を再整理できるものと期待される。

Volvocales にはヤリミドリ様藻類以外にも、多数の多系統属が含まれており、特に伝統的にコナミドリムシ属に分類されてきた種は 10 を超える系統群に分かれている。今後はこのような鞭毛藻や、着生

性、不動性の藻類についても微細構造の研究を含んだ詳細な形態学的研究を進めていくことにより、*Volvocales* 全体を自然な分類群へと再整理していくことが必要である。

- Altschul, S. F. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **215**, 403 (1990).
 Buchheim, M. A. *et al.*, *J. Phycol.* **26**, 689 (1990).
 Buchheim, M. A. *et al.*, *Mol. Phylogenet. Evol.* **5**, 391 (1996).
 Buchheim, M. A. *et al.*, *J. Phycol.* **33**, 1024 (1997).
 Buchheim, M. A. *et al.*, *J. Phycol.* **38**, 376 (2002).
 Cantino, P. D. & de Queiroz, K., *PhyloCode: International Code of Phylogenetic Nomenclature, Version 4b.* (2007).
 Ettl, H., *Nova Hedwigia* **33**, 709 (1980).
 Ettl, H., in *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, H. Ettl *et al.*, Eds. (Gustav Fischer, Stuttgart, 1983), vol. 9, pp. 1-807.
 Melkonian, M. & Preisig, H. R., *Pl. Syst. Evol.* **146**, 31 (1984).
 Nakada, T. *et al.*, *J. Phycol.* **43**, 397 (2007).
 Nakazawa, A. *et al.*, *Eur. J. Phycol.* **36**, 113 (2001).
 Nozaki, H. *et al.*, *J. Phycol.* **34**, 1024 (1998).
 Nozaki, H. *et al.*, *Mol. Phylogenet. Evol.* **17**, 256 (2000).
 Nozaki, H. *et al.*, *Mol. Phylogenet. Evol.* **29**, 58 (2003).
 Pröschold, T. *et al.*, *Protist* **152**, 265 (2001).
 Silva, P. C. in *Synopsis and Classification of Living Organisms*, S. P. Parker, Ed. (McGraw-Hill, New York, 1982), vol. 1, pp. 133-161.

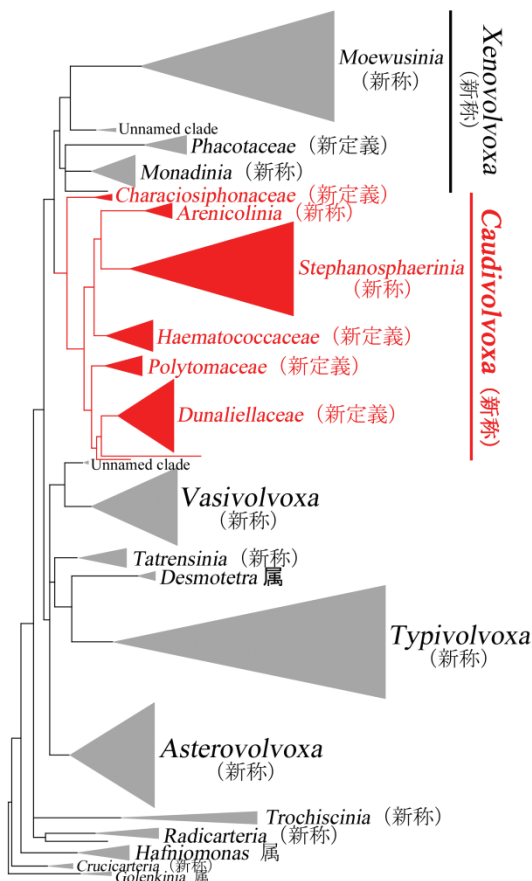


図 1: 18S rRNA 遺伝子 (1,856 塩基対) に基づく *Volvocales* の網羅的系統樹。449 配列を代表する 317 OTU の系統樹を基に作成。ベイズ法 100 万世代。事後確率 0.95 以上かつ最尤法のブーツストラップ確率 (1,000 回) 75% 以上で支持された系統群を三角形で表示。本研究で主に扱う *Caudivolvoxa* は赤字で強調。

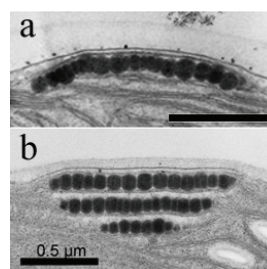


図 3: 眼点の微細構造。a: 顆粒 1 層 (*Chlorogonium elongatum*: E 群)。b: 3 層 (*Chlorogonium*-like strain NIES-1849: B 群)。スケールは 0.5 µm。

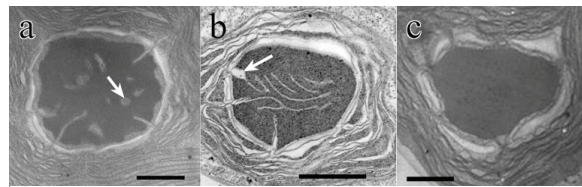
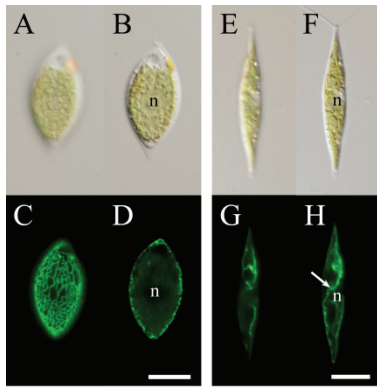


図 4: ピレノイドの微細構造。a: 管状チラコイド膜 (矢印は断面) の陥入 (*Chlorogonium elongatum*: E 群)。b: 扁平チラコイド膜 (矢印) の陥入 (*Chlorogonium*-like strain KzCl-4-1: C 群)。円形の断面が見られないことに注意。c: チラコイド膜の陥入なし (*C. kasakii*: B 群)。スケールは 1 μm。

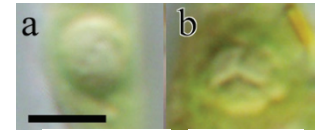


図 5: ピレノイドのデンプン鞘の構造 (上: 表面観。下: 模式図)。a: 一体型 (*Chlorogonium fusiforme*: D 群)。b: 分割型 (*C. elongatum*: E 群)。スケールは 3 μm。

←図 6: ミトコンドリアの 2 型。上段: 微分干渉顕微鏡像。下段: MitoTracker® Green 蛍光像。A, C, E, G: 表面観。B, D, F, H: 断面観。A-D: 表層網目型。細胞質表層に局在し、網目状に原形質を覆う (*Chlorogonium heimii*: A 群)。E-H: 細胞質内部陥入型。細胞表層を覆うことはあまりなく、しばしば細胞質内部の色素体と核の間を通る (矢印; *C. kasakii*: B 群)。スケールは 10 μm。

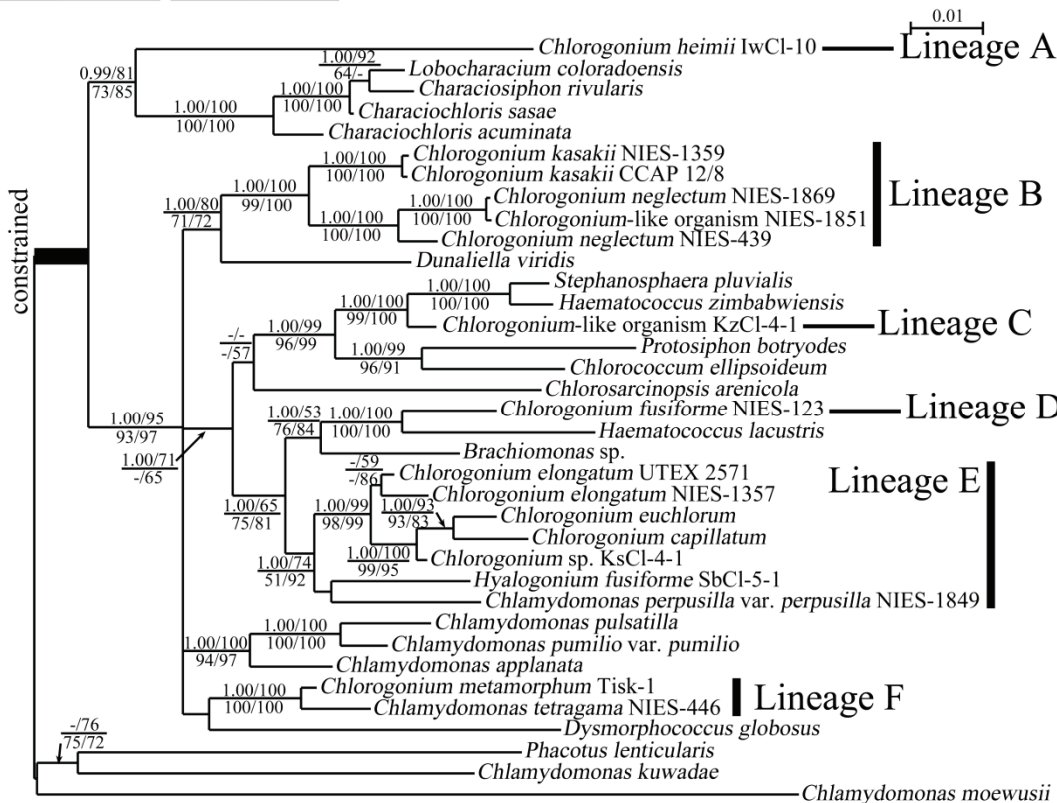


図 2: 18S rRNA, *rbcl*, *psaB* 遺伝子の結合解析に基づく *Caudivolvax* の系統樹。*rbcl*, *psaB* 遺伝子の第 3 コドンを除く 3,392 塩基対を使用。ベイズ法 100 万世代。外群は固定。事後確率 (左上), 最尤法 (右上), 最節約法 (左下), 近隣結合法 (右下) のブーツストラップ確率 (最尤法のみ 100 回, ほか 1000 回) を各枝に示した。ヤリミドリ様藻類の各系統群 (A-F 群) を示している。

表 1: ヤリミドリ様藻類の各系統群 (図 2 における A-F) の識別形質と属階級の新分類体系。

系統群	A	B	C	D	E			F
新しい属分類	<i>Tabris</i>	<i>Gungnir</i>	<i>Hamakko</i>	<i>Rusalka</i>	<i>Chlorogonium</i>	<i>Leucogonium</i>	<i>Niesia</i>	<i>Fusichlamys</i>
色素体 (栄養細胞)	葉緑体	葉緑体	葉緑体	葉緑体	葉緑体	白色体	葉緑体	葉緑体
収縮胞	2 個	> 4 個	> 4 個	2-3 個	> 4 個	> 2 個	2 個	2 個
	前端	散在	散在	散在	散在	散在	前端	前端
ピレノイド	個数	なし	1-2 個	2 個	1 個	2- 多数	なし	1 個
	チラコイドの陥入	—	なし	あり	あり	あり	—	あり
	デンプン鞘	—	—	扁平	管状	管状	—	管状
	デンプン鞘	—	分割型	分割型	一体型	分割型	—	一体型
眼点	1 層	2-3 層	2 層	1 層	1 層	1 層	1 層	1 層
ミトコンドリア	表層	細胞質内部に陥入	細胞質内部に陥入	細胞質内部に陥入	表層または細胞質内部に陥入	表層	細胞質内部に陥入	細胞質内部に陥入