



Title	Ultrastructural and phylogenetic studies of unarmoured kleptochloroplastidic dinoflagellates [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	大沼, 亮
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第11803号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58915
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryo_Onuma_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学）

氏 名 大沼 亮

学 位 論 文 題 名

Ultrastructural and phylogenetic studies of unarmoured kleptochloroplastic dinoflagellates (盗葉緑体性無殻渦鞭毛藻類の微細構造学的・系統分類学的研究)

渦鞭毛藻類は、水圏に広く生息する原生生物で、典型的な光合成性渦鞭毛藻は紅藻を二次共生させたことに由来する葉緑体をもつ。その他に、盗葉緑体とよばれる特殊な葉緑体を維持する種も存在する。盗葉緑体とは、もともと葉緑体をもたない生物が他の藻類から盗んだ葉緑体のことで、その葉緑体は細胞内で一時的に保持・使用されるが、やがて失われる。この現象は葉緑体獲得に至る細胞内共生の中間的段階であると解釈でき、細胞内共生確立過程を研究する上では非常に興味深い現象である。*Nusuttodinium* 属はクリプト藻から取り込んだ盗葉緑体を維持する渦鞭毛藻で、典型的な光合成性渦鞭毛藻を祖先種とした単系統となることが知られており、現在 6 種が記載されている。これらはクリプト藻の盗葉緑体をもつ他に、nuclear chamber（核膜上の小室）がないこと、反時計回りの上錐溝（細胞頂端を走る溝）をもつことで特徴付けられる。過去の文献には盗葉緑体性であると推察される特異な色彩をもつ渦鞭毛藻が多数記載されており、盗葉緑体渦鞭毛藻類には更なる多様性があることが見込まれる。また、*Nusuttodinium* 属における先行研究は一般的な微細構造を観察した例があるのみで、取り込まれた葉緑体が渦鞭毛藻細胞内でどのように変化していくかは不明である。さらに、淡水産種では取り込むクリプト藻が *Chroomonas* 属に限定されているという報告があるが、どの程度の範囲の種を盗葉緑体として使えるのかは不明である。

そこで本研究では、1)盗葉緑体性渦鞭毛藻類の更なる多様性を探索すること、2)クリプト藻を取り込ませた *Nusuttodinium* 属 3 種を経時的に形態観察することで、盗葉緑体の変化を明らかにし、種間比較をおこなうこと、3)淡水産種 *N. aeruginosum* におけるクリプト藻の種特異性を分子系統学的手法で明らかにすることを目的とした。

1 章では、各地の海岸の砂サンプルから盗葉緑体性渦鞭毛藻の探索し、発見した種を記載した。探索の結果、北海道内の海岸 2 ヶ所から *Nusuttodinium* 属に形態的に類似する種（仮に 2 種を DAI、DIS とする）の渦鞭毛藻を発見した。両種は葉緑体をもっておらず、クリプト藻との共培養実験から両種とも盗葉緑体現象を示さないと結論づけた。4 遺伝子を使った系統解析では、典型的な光合成性種が最も祖先的な位置を占め、DAI は *Nusuttodinium* と姉妹群になる一方、DIS は *Nusuttodinium* のクレードに含まれるという結果を得た。DAI には縦溝の伸長部と直角に交わる上錐溝、右上がりの横溝、nuclear chamber が観察され、この形態的特徴の組み合わせに合致する既存の属がないため、DAI を新属新種 *Pellucidodinium psammophilum* として記載した。また DIS は盗葉緑体をもたないが、nuclear chamber を欠くことと反時計周りの上錐溝という *Nusuttodinium* と共通した形質をもつことと系統的位置から、*Nusuttodinium* 属の新種 *N. desymbiontum* として記載した。この結果から、*P. psammophilum* は典型的な葉緑体を失い、盗葉緑体を得る前の進化段階にあり、*N. desymbiontum* は盗葉緑体を二次的に失ったものと考えられる。

2 章では、海産種 *N. poecilochroum*、*N. latum*、及び淡水産種 *N. aeruginosum* を用いて盗葉

緑体の経時的形態変化の観察を行った。先行研究では、海産の2種は一度に複数個の葉緑体を取り込むと報告されており、盗葉緑体と宿主の同調分裂は見られない。一方で *N. aeruginosum* は細胞全体に拡大した1つの盗葉緑体を細胞分裂時に同調分裂させ、両方の娘細胞に受け継ぐことが知られている。これらの違いは永続的な葉緑体確立への進化段階の違いを表していると考えられる。光顕および単細胞透過電顕法を用いた形態観察の結果、*N. poecilochroum* では、取り込み1時間後までにクリプト藻細胞質が消化され、3時間後からはクリプト藻核の消化も観察された。葉緑体は維持されるが、体積の増大は見られなかった。*N. latum* では葉緑体の外側の細胞質は消化されるが、葉緑体に囲まれた細胞質やクリプト藻核はそのまま残存し、120時間後までにはピレノイドとヌクレオモルフが増加し、葉緑体の体積も顕著に増大することが確認された。*N. aeruginosum* ではクリプト藻の細胞質の消化は起こらず、クリプト藻核などのオルガネラを温存することがわかった。120時間後には葉緑体は宿主細胞全体に拡大し、体積は元の20倍以上になった。葉緑体の拡大を見せる2種はクリプト藻核を残すことから、葉緑体の維持・拡大にはクリプト藻核が必要であることが示唆された。

Nusuttodinium aeruginosum の先行研究では盗葉緑体を維持しながらもクリプト藻核がない細胞が観察されているが、その喪失過程は不明である。そこで *N. aeruginosum* を引き続き観察し、宿主細胞分裂後にクリプト藻核がどのように受け継がれて行くのかを検証した。1回目の分裂を経た2娘細胞を観察したところ、盗葉緑体は両方に受け継がれるが、クリプト藻核は片方にしか受け継がれず、1細胞に由来する4娘細胞(2回分裂後)でもクリプト藻核をもつ細胞は1細胞のみであった。このことは宿主細胞中でクリプト藻核は分裂しないことを示す。さらに5回目の分裂を終えたすべての細胞のうち、クリプト藻核をもつ細胞が最も大きな盗葉緑体を持ち、早期の分裂でクリプト藻核を喪失した系統では盗葉緑体が著しく縮小していた。この結果はクリプト藻核が盗葉緑体の拡大に必要であることを強く示唆し、永続的な葉緑体獲得のためには共生藻の核も維持する必要があると考えられる。

3章では、淡水産種 *N. aeruginosum* におけるクリプト藻の種特異性を検証した。天然から採集した細胞からDNAを抽出し、渦鞭毛藻の Internal transcribed spacer (ITS) 領域と盗葉緑体中の16S rDNAの配列決定、系統解析を行った。その結果、採集した細胞はすべて既存の *N. aeruginosum* の配列とクレードを組み、すべて *N. aeruginosum* であると同定された。16S rDNA配列はすべて *Chroomonas* 属のサブクレード4に含まれ、取り込むことのできるクリプト藻は複数種存在することが明らかとなった。このことから、盗葉緑体として使うことのできるクリプト藻はサブクレード4に属する *Chroomonas* のみであるが、種レベルでは一定の可塑性があることが示された。

以上、本研究は *Nusuttodinium* 属とその近縁種を用いた分子系統解析によって、本属の進化過程の理解に貢献した。また、今まで知られていなかった盗葉緑体の細胞内での変化を詳細に記載し、共生藻の核が細胞内共生に重要であるという新たな知見を得た。さらに、淡水産種における宿主-クリプト藻間の種特異性の実態も明らかにすることができた。