

論文の内容の要旨

論文題目 Delineating species of two glaucophyte genera, on the basis of molecular data and comparative ultrastructures

(灰色藻2属の分子情報と微細形態比較に基づく種分類学的研究)

氏名 高橋紀之

1. 研究背景

光合成を行わない原生生物にシアノバクテリアが取り込まれ色素体となった一次共生は10–20億年前に起きたとされ、現生の一次植物（紅色植物、緑色植物、灰色植物）の祖先が誕生したと考えられている。広汎に分布する他の2系統に対し、灰色植物門 *Glaucophyta* は単細胞～群体性の淡水産微細藻の稀産種しか知られていない¹。しかし葉緑体の色素組成や形態がシアノバクテリアに極めて類似しており、一次植物の最も原始的な形態を保持する系統群として葉緑体分裂の研究や全ゲノム解析が実施されている²。

Kies & Kremer³によれば、灰色植物門は1綱 *Glaucophyceae* から構成され、鞘被性、厚膜球状、遊泳性という大きく異なる形態形質によって3目に分類される。しかし、これまでの種分類学的研究は野外試料を直接用いた顕微鏡観察・記載が中心で、分子情報も用いられていない。2014年になって Chong ら⁴は灰色藻培養株の分子系統学的解析を実施し、複数の隠蔽種の存在を示唆したが、種の識別形質に関しては報告していない。

そこで本研究では再現性のある材料として世界の株保存機関の保存培養株を入手し、独自に確立した新規株を加えて、分子系統解析と比較顕微鏡観察・電顕観察を実施した。形態比較では細胞微細形態、特に原形質体の表層の外被構造に着目して複数の電子顕微鏡法による観察を実施した。この結果、灰色藻2属（図1）における微細構造上の形態的多様性が明らかとなり、これに基づいた種レベルの新分類体系を構築した。

2. *Cyanophora*属の分類学的再検討

単細胞遊泳性の *Cyanophora* 属（図1）の保存株7株では、*C. biloba* Kugrens et al. (1999)⁵ の原記載で使用された1株(UTEX 2766)以外に種同定に関する情報はなかった。そこで本研究では奈良県産新規株1株を含めた比較形態観察の結果、培養株は細胞中央に深い溝が走

り左右の両葉に分かれる双葉群 (NIES-764, UTEX 2766) と、長球状の単葉群 (その他 6 株) とに大きく分けられ、以下に述べる細胞微細形態上の特徴と分子情報から 5 種に分類された (図 2, 3)。

本属は細胞壁を持たず、プレートを含んだ扁平小胞であるプレート小胞が細胞膜を裏打ちする細胞外被を有するが、従来の SEM では細胞表面の微細構造は明らかではなかった⁵。SEM 観察の条件検討の結果、低加速電圧で細胞外被表面の微細構造が明らかになった。そこで低加速電圧でも高解像度の観察が可能な超高分解能 FE-SEM による表面観察を実施した (日立ハイテクデモルーム SU8020 利用)。この結果、細胞表面全体を覆う、嶺で縁どられた模様が認められた (図 3)。超薄切片 TEM 観察により、嶺はプレート小胞の境界における反り上がりによって形成されていた。双葉群はこの細胞表面の模様の差異で *C. biloba* と新形態種 *C. suda* sp. nov. に識別された (図 3)。

単葉群 6 株は SEM 写真上での細胞形状を反映する細胞長と幅の測定値の統計的差異に基づき、広卵球形の *C. paradoxa* Korshikov (1924) (CCAP 981/1, NIES-547, UTEX 555)、狭卵球形の新形態種 *C. kugrensis* sp. nov. (NIES-763)、広長球～広倒卵球形の新形態種 *C. cuspidata* sp. nov. (新規株 101, SAG 45.84) の 3 種に分類された (図 3)。

本研究により *Cyanophora* 属には従来の 2 倍にも相当する種が存在することが明らかになった。このことは灰色植物には光顕レベルでは判別が難しいが微細構造で識別できる未記載種がかなり存在することを示唆した。また、低加速電圧 FE-SEM 法は細胞全体の微細構造を直接観察することができ、微細藻類の種を識別するのに有効であった。

3. *Glaucocystis* 属の分類学的再検討

Komárek & Fott⁶ は不動厚膜球状性灰色藻 *Glaucocystis* 属 (図 1) に記載種 4 種 1 変種を認めている。Schnepf ら⁷ は本属培養株 3 株 (SAG 229-1, SAG 229-2, SAG 229-3) の TEM による比較を実施したが、微細構造上の差が認められなかったとし、現在これらは同一種 “*G. nostochinearum*” と表示されている。以後、複数の培養株を比較観察した種レベルの分類学的研究は実施されてこなかった。本研究では先行研究^{4,7} で用いられた *Glaucocystis* 属と表示されている保存株 10 株に加え、千葉県の同一地点から新規に確立した株 3 株 (118, 126, Thu10) を合わせて用いた。

psaB+psbA 結合分子系統解析の結果、Chong ら⁴ の系統群 G1-6 に相当する 6 つの系統が認められ、G1, G6 系統群が基部となることが明らかになった。また、同一地点から得られた新規株が末端の 3 系統群に分かれた。

本属の細胞は厚い細胞壁で囲まれているので、その内側の細胞外被構造を FE-SEM によって直接観察するのは困難である。しかし、3 次元微細構造が観察できる超高压電子顕微鏡を用いれば細胞壁内側の細胞外被を直接観察できると思われた。そこで、*Glaucocystis* の各系統群を代表する株を用いて、超高压電顕トモグラフィ (図 4) に基づく立体微細構造の比較形態観察を行った (阪大・超高压電顕センターの H-3000 を共同利用)。試料作製には微細構造の保存性の良い加圧凍結・凍結置換法を用いた。この結果、外被立体微細構造の 3 タイプが識別された (図 5)。外被の微細構造が立体的に示されたので、超薄切片 TEM 観察データでもこのタイプが識別でき、全 13 株は 3 群に分類された (図 5)。

一方、比較光顕観察の結果、楕円体の細胞の両極の形状に差が認められた (図 6)。また、本属は細胞分裂後にも母細胞壁が残り娘細胞を囲んで群体を形成するが、この母細胞

壁にも差が認められた(図7)。G5,G6では常に母細胞壁が娘細胞に密接している一方、他の系統ではしばしば母細胞壁が膨張し、群体が広がった。低加速電圧 FE-SEM 法で群体表面を観察すると、これら母細胞壁の差異はセルロース繊維の配列の差異として確認された(図7)。

以上の比較形態観察の結果、微細構造レベル・光顕レベルの分類形質が明らかとなり、*Glaucocystis* 属培養株 13 株は原記載との比較に基づき 3 新種 1 新階級を含む 6 種に再編された(図8)。タイプ種 *G. nostochinearum* とされる藻類はこれまで汎存種と考えられてきた⁸。過去の観察は本研究の微細構造上の差異で認識された複数の種に渡って実施されていた可能性があり、光顕レベルで明瞭な識別形質が認められない場合は全てタイプ種と同定されてきたとも推測されるが、培養株が維持されておらず分類学的な再検討ができない。更に本研究で千葉県産の同一試料中に 3 種が含まれていたように、過去の研究では同所的に複数の隠蔽種が混合している可能性もあったと考えられる。

4. 総合考察

灰色植物では今回扱った 2 属以外に、寒天状の細胞外基質(細胞壁)を持つ不動栄養細胞の時期と細胞壁を持たない遊走子の時期とがある鞘被性灰色藻の 2 属 *Gloeochaete*, *Cyanoptyche* でそれぞれタイプ種と表示された培養株が確立されている。しかし、保存株数は少なく、遺伝的・微細形態的多様性については知られていない。これら 2 タイプ種も世界各地から採集報告があり、実際には複数の隠蔽種を含み、本研究の様な新規株の確立に基づくクローン株を用いた微細構造レベルの種分類学的研究が必要であると考えられる。その結果を今回の研究で確立した 2 属の種レベルの新分類体系と合わせることで、灰色植物門全体の新しい高次分類体系の構築が実現できるものと考えられる。

本研究では灰色植物全体の 2 大系統を代表する *Cyanophora* と *Glaucocystis* の両属で基本的には同じ「細胞膜の内側で小葉状の扁平小胞が密に裏打ちする」細胞外被立体微細構造をもつことを明らかにした。従って、灰色植物の共通祖先はこのような立体微細構造を既に獲得していた鞭毛虫であった可能性があり、更には最初の一次植物にまで遡るとも推測される(図9)。鞘被性灰色藻を含めた真核生物の更なる立体微細構造レベルの形態観察によって、形態の多様化や不動化といった進化過程の解明に繋がると期待される。

引用文献

- 1 Kies L *In* Reisser W 1992 *Algae and symbioses* 353–77
- 2 Price DC *et al* 2012 *Science* **335**: 843–7
- 3 Kies L & Kremer BP 1986 *Taxon* **35**: 128–33
- 4 Chong J *et al* 2014 *Mol Phylogenet Evol* **76**: 181–8
- 5 Kugrens P *et al* 1999 *J Phycol* **35**: 844–54
- 6 Komárek J & Fott B 1983 Chlorophyceae (Grünalgen); Ordnung: Chlorococcales
- 7 Schnepf E *et al* 1966 *Arch Microbiol* **55**: 149–74
- 8 Bourrelly P 1961 *BIFAN, Sér A* **23**: 243–374

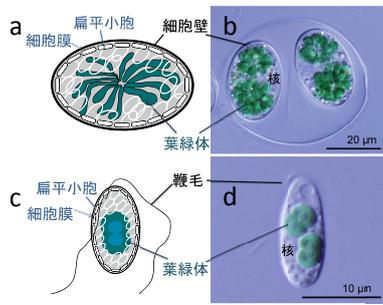


図1. 灰色藻の2属、*Glaucozystis*属(上図)、*Cyanophora*属(下図)。

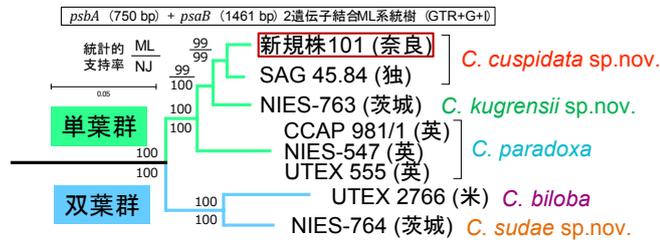


図2. *Cyanophora*属最尤法 $psbA+psbB$ 結合分子系統樹(計2211塩基対)。

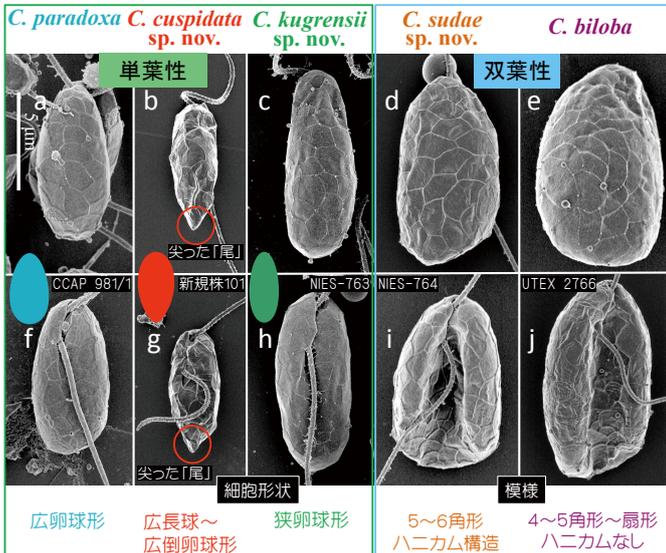


図3. *Cyanophora*属培養株8株は3新種を含む5種に分類(FE-SEM像)。

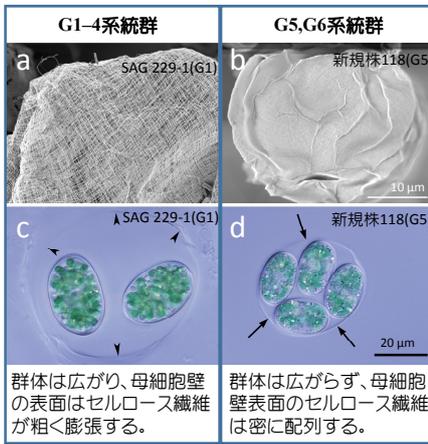


図7. *Glaucozystis*母細胞壁の特徴。群体の広がり方という光顕レベル(下)の特徴とセルロース繊維の配列というFE-SEMレベル(上)の特徴が相互に対応していた。

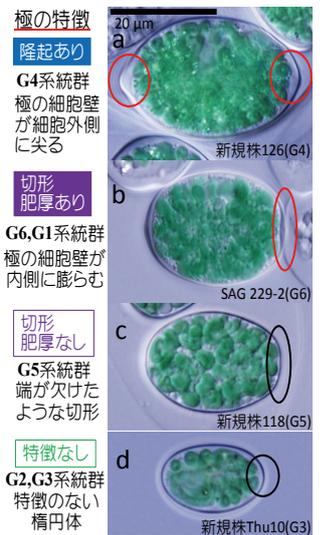


図6. *Glaucozystis*比較光顕観察の結果。細胞の極に特徴(丸囲み)が認められ4タイプが区別された。

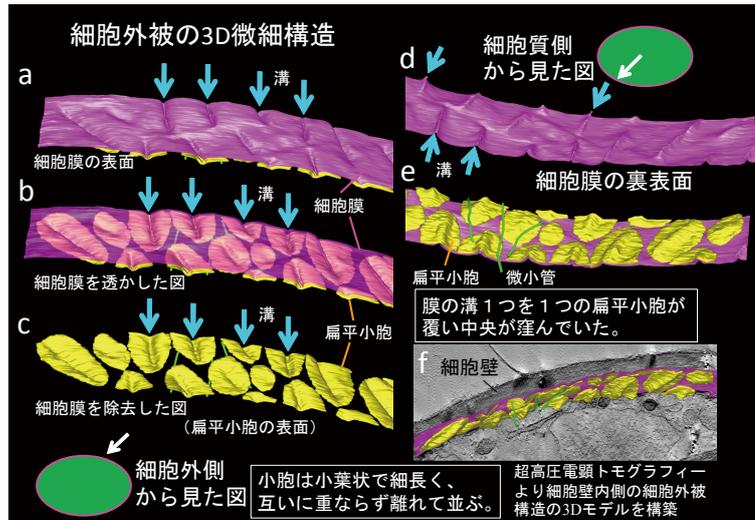


図4. *Glaucozystis geitleri* sp. nov. SAG 229-1 (G1) の外被立体構造。

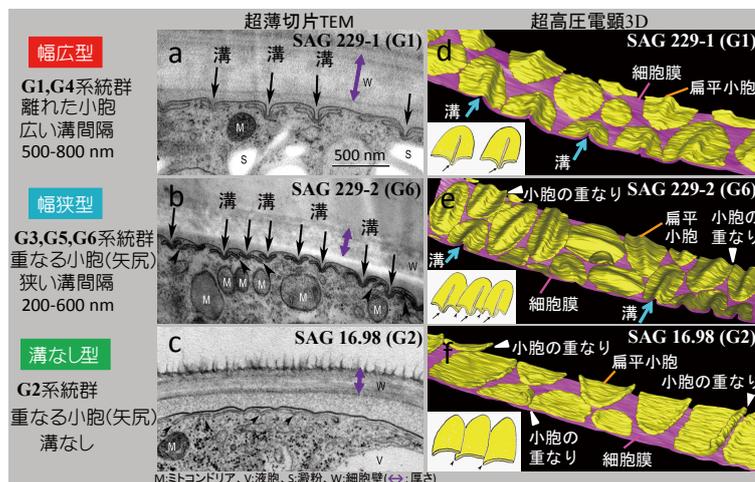


図5. *Glaucozystis*外被微細構造の3タイプ。*Glaucozystis*培養株の細胞外被微細構造は超高压電顕3D(右)及びTEM(左)によって3タイプに分類された。

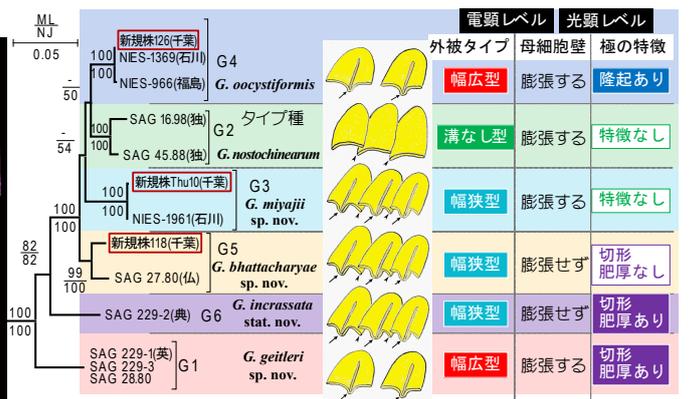


図8. *Glaucozystis*属の最尤法 $psbA+psbB$ 結合分子系統樹(計2211塩基対)と形態的分類形質。本属培養株13株は3新種1新階級を含む6種に分類。

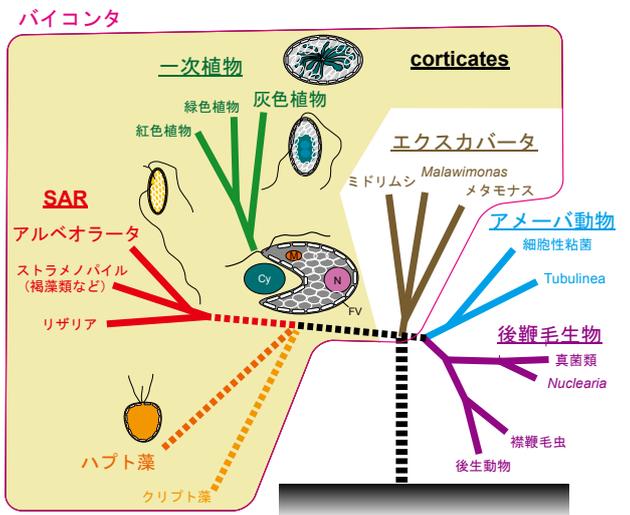


図9. 現生の真核生物への外被の進化。本研究によって灰色植物の共通祖先は*Cyanophora*様の鞭毛虫であって、既に「細胞膜の内側で小葉状の扁平小胞が密に裏打ちする」立体微細構造を獲得していた可能性があり、更には最初の一次植物にまで遡るとも推測された。