

博士学位論文

Doctoral Thesis

ラビリンチュラ綱ヤブレッツボカビ科の

属と種に関する分類学的研究

Taxonomic study on the genera and species of the family

Thraustochytriaceae (Labyrinthulomycetes)

土井 耕作

Kosaku Doi

2017年1月

January, 2017

甲南大学大学院 自然科学研究科 生命・機能科学専攻

Graduate School of Natural Science, Konan University

## 要旨

ヤブレッツボカビ科は、ストラメノパイル生物群ラビリンチュラ綱に位置する単細胞真核微生物である。この科の属や種は、生活史に見られる形態に基づいて分類体系が構築されてきたが、系統関係を反映しておらず、系統樹上で多系統群を形成することが明らかとなったため、近年では形態と系統関係を総合的に考慮した分類学的な整理が進められてきている。しかしながら、基準属である *Thraustochytrium* 属は、分類学的な措置が行われないうまま、現在も多系統群を形成している。また、単系統群を形成している属内には、種が未同定の生物株が多数存在しており、種レベルの整理も十分とはいえない。そこで本研究では、ヤブレッツボカビ科の属・種の形質と系統関係を総合的に考慮した分類学的な整理を行うことを目的に、1) 多系統群を形成している *Thraustochytrium* 属の属レベルの分類、2) *Aurantiochytrium* 属内の種レベルの分類を行った。1) では、分類学的な再検討を行う上で、まず *Thraustochytrium* 属の基準種 (*T. proliferum*) の系統的位置を把握することに着手した。この生物は 1936 年に記載されたが、この時に観察された生物は、分離株として保存されていない。そこで、この種を再発見することを目的に、日本各地、この種のタイプ産地であるアメリカ、ウッズホールでサンプリングを行った。残念ながら、基準種と同定できる株は分離できなかったが、タイプ産地で採取した海藻の環境 DNA 解析を行ったところ、ヤブレッツボカビ科内に新たな系統群を形成する DNA 配列が確認された。次に、他の *Thraustochytrium* 属の種とこれまで基準種が示した形質の比較を行った。本研究で注目したのが、多くの形態形質で基準種と区別できる *T. globosum* である。この種は、基準種と同じく海藻表面での形態が原著論文に記載されて

いるのみで、生物株は保存されていない。そこで、タイプ産地である千葉県、太海での分離を試みた。その結果、原著論文に記載された形態を示す株を発見し、これまで確認されていない形態が観察された。これらの形態は、基準種やヤブレッツボカビ科の属と明確に区別することができ、基準種と同じ系統群に位置するとは考えにくいことから、*T. globosum* に対して新属 *Monorhizochytrium* を設立した。2) では、*Aurantiochytrium* 属の種である *A. mangrovei* の系統的位置が不明だったことから、タイプ産地であるインド、ゴアから分離された株の中から同種の形態を示す株を探索した。その結果、記載論文と同じ形態を示す株を発見し、系統的位置を確認したところ、*Aurantiochytrium* 属内に位置した。そこで、*Aurantiochytrium* 属内の系統関係を詳細に解析し、この属内の株は形態形質でまとめられる 3 つの独立した系統群として認識することが可能であることから、それぞれを 2 既知種と 1 新種として分類した。これらを総合すると、ヤブレッツボカビ科の属・種は、それぞれを単系統群として捉えることができ、形態を形質に基づいて、系統関係に矛盾しない分類学的な整理が行えることを明らかにした。

## 目次

要旨	1
目次	3
総合序論	4
ヤブレッツボカビ科の属, 種の分類学的背景	7
1 章 多系統群を形成している <i>Thraustochytrium</i> 属の属レベルの分類	
序論	19
材料と方法	21
結果	25
考察	30
分類学的措置	37
2 章 <i>Aurantiochytrium</i> 属内の種レベルの分類	
序論	40
材料と方法	41
結果	44
考察	49
分類学的措置	52
総合考察	54
謝辞	60
引用文献	62
図表	75

## 総合序論

分類学では、共通祖先から派生した（＝単系統の）生物を、分類群としてまとめる「自然分類」を目指している。これまでは、生物の形態的、生理的、生態的特徴に基づいて、分類体系が構築されてきたが、1990年代以降、分子系統学的な解析手法が発達し、様々な生物の遺伝子配列に基づいた分子系統関係が報告されている。そこで、多くの生物において、分子系統樹によって示唆された系統関係、形態あるいは物質の特徴などから考察される形質を総合的に評価して、必要に応じて分類学的な変更を行っている。

例えば、モグラ類は伝統的に、食虫目として扱われてきたが、分子系統樹では、2つに分かれた（Springer et al. 1997）。両者は、土中に適した共通した特徴（前足のかぎ爪や目の機能が低下している）を持っていたが、これらは収斂と考えられることから、新食虫目と、アフリカ食虫目に分割された（Springer et al. 1997, Madsen et al. 2001）。また、水生植物であるスイレン科やハス科は、スイレン目に属すると考えられてきたが、分子系統樹では2つに分かれた（Ito 1987, Les and Schneider 1995）。両者は、水中での環境に適した特徴を持っていたが、分子系統関係からハス科はヤマモガシ目に近縁であることから、この目に位置づけられた（The Angiosperm Phylogeny Group 1998）。さらに、真核単細胞生物である *Euglena* 属は、これまで、細胞形態や葉緑体の形状などで分類体系が整理されてきたが、分子系統樹では、多系統群を形成することが明らかとなった（Linton et al. 1999）。そのため、複数の遺伝子を使用した系統関係を把握し、18S rDNA の2次構造解析や、これまで種の形態として注目されていた形態を組

み合わせて、属の再編成がおこなわれている (Marin et al. 2003, Triemer et al. 2006, Karnkowska-Ishikawa et al. 2012)。

本研究で材料としたラビリンチュラ類は、沿岸域の海水から容易に分離できることから、海洋に普遍的に存在している単細胞真核微生物である (Porter 1990, Raghukumar 2002)。この生物群は、生活史の一部で 2 本の鞭毛を持つ遊走細胞を形成することや、分子系統解析から、真核生物のスーパーグループ、ストラメノパイル生物群に位置することが明らかとなっている (Patterson 1989, Adl et al. 2012)。また、ラビリンチュラ類は、分類学的には綱のグループとして認識されており、原形質状の構造 (外質ネット) を細胞外に展開し、根元にボスロソームという構造を持つこと、硫酸多糖類からなる多重鱗片状の細胞壁を持つことで特徴づけられている (Porter 1969, Perkins 1972, Alderman et al. 1974, Olive 1975)。現在、ラビリンチュラ綱は、現在 2 目 1 上科 8 科から構成されており (Anderson and Cavalier-Smith 2012)、本研究では、その 1 科であるヤブレッツボカビ科に注目した。

ヤブレッツボカビ科は 1943 年に設立され、この科に位置する属と種は、これまで生活史で観察される細胞形態に基づいて分類形態が構築されてきた (Sparrow 1943)。しかしながら、分子系統関係が明らかになると、系統樹上でいくつかの属が多系統群を形成することが明らかとなった (Honda et al. 1999)。そこで、多系統群を形成していた *Schizochytrium* 属、*Ulkenia* 属の細胞形態を改めて観察し、新たに注目した脂肪酸組成などの化学的分類形質を加え、比較することで、各系統群を明確に区別できたことから、それぞれの基準種 (最初に記載された種) を狭義の属とし、その他を全て新属とする分類学的再編成が行

われてきている (Yokoyama and Honda 2007, Yokoyama et al. 2007)。しかしながら、基準属である *Thraustochytrium* 属は多系統群を形成しており、自然分類群であるとはいえない。そのため、分類学的な検討を行う必要がある。また、系統樹上には属や種が未同定の生物株が多数存在しており、単系統群を形成している。さらに、単系統群を形成している複数の属内にも、種が未同定の生物株が多数存在し、それらの中には単系統群を形成している場合もある。

本研究では、ヤブレッツボカビ科の属と種の形態と系統関係などの形質を総合的に考慮した分類学的な整理を行うことを目的に、以下の 2 つの研究、1) 多系統群を形成している *Thraustochytrium* 属の属レベルの分類、2) *Aurantiochytrium* 属内の種レベルの分類を行った。

## ヤブレッツボカビ科の属，種の分類学的背景

ヤブレッツボカビ科は，“ツボカビ類のような細胞形態を持つ生物で，2本鞭毛を有する遊走細胞を形成する”生物が位置づけられる科として，1943年に卵菌綱ミズカビ目に設立された。設立当初，この科には，*Thraustochytrium* 属のみが位置づけられていた (Sparrow 1936, 1943)。その後，この科には，生活史に見られる形態形質によって，*Japonochytrium* 属 (包囊 (膨らんだ外質ネット) を形成する)，*Schizochytrium* 属 (栄養細胞が2分裂を繰り返す増殖様式を示す)，*Althornia* 属 (外質ネットを有しない)，*Aplanochytrium* 属 (不動胞子を形成する)，*Labyrinthuloides* 属 (外質ネットを使用して，栄養細胞が運動する)，*Ulkenia* 属 (アメーバ状細胞を形成する) が設立された (Kobayashi and Ookubo 1953, Goldstein and Belsky 1964, Bahnweg and Sparrow 1972, Perkins 1973a, Gaertner 1977)。

その後，分子系統関係が明らかになり，いくつかの属で分類学的な再編成が行われた。これまで別属として考えられていた *Aplanochytrium* 属の種と *Labyrinthuloides* 属の種が 18S rDNA 配列による比較によって，16塩基の違いしか見られなかったことや，細胞壁に含まれる多糖類が類似していたことから，2属に位置した種をすべて *Aplanochytrium* 属に位置づける分類学的な措置が行われた (Ulken 1985, Leander and Porter 2000, Bahnweg 未発表)。また，18S rDNA 配列による系統解析によって，多系統群を形成することが明らかとなった *Schizochytrium* 属，*Ulkenia* 属に位置する複数の生物株のこれまで確認されていない形態形質の探索と，ドコサヘキサエン酸 (DHA) やアラキドン酸 (AA) などの脂肪酸組成，アスタキサンチンやカンタキサンチンなどのカロテノイドの



種類と系統関係を総合的に考慮し、各属の基準種 (*S. aggregatum*, *U. visurgensis*) が位置する系統群を狭義の属とし、他の系統群の属を新属 (*Aurantiochytrium*, *Oblongichytrium*, *Botryochytrium*, *Parietichytrium*, *Sicyoidochytrium*) とする分類学的な措置が行われた (Yokoyama and Honda 2007, Yokoyama et al. 2007)。

その後、2012年にラビリンチュラ綱の高次分類群の再編成が行われ、系統関係と、形態の比較からアプラノキトリウム科 (Aplanochytriaceae)、オルソニア科 (Althorniaceae) とオブロングキトリウム科 (Oblongichytriaceae) が新たに設立され、それぞれに、*Aplanochytrium* 属、*Althornia* 属、*Oblongichytrium* 属が位置づけられた (Anderson and Cavalier-Smith 2012)。そのため、2017年1月の時点で、ヤブレッツボカビ科には、8属 (*Thraustochytrium*, *Japonochytrium*, 狭義の *Schizochytrium*, 狭義の *Ulkenia*, *Aurantiochytrium*, *Botryochytrium*, *Parietichytrium*, *Sicyoidochytrium*) が位置づけられている。

以下に、本研究で対象とした、*Thraustochytrium* 属と *Aurantiochytrium* 属の種についての詳細を記した。

### ***Thraustochytrium* (Sparrow) Johnson et Sparrow 1961**

ヤブレッツボカビ科の基準属 *Thraustochytrium* 属は、1936年に、“卵菌綱 *Thraustotheca* 属の特徴に似た遊走子形成様式、「孢子嚢から孢子が放出され、数時間後に2本の鞭毛を生やす」、 “放出後に細胞質（原基体）を残す” 生物が発見され、この生物の特徴が属レベルに相当すると判断されたことから、設立された経緯がある (Sparrow 1936)。その後、この属には原基体を持たない種、*Thraustochytrium globosum*, *Thraustochytrium pachydermum* が位置づけられたこと

から、1961年に“原基体を残す”ことが属の定義から除外され、新たに3種が示す形態“外質ネットの形状がシンプル、もしくは分岐する”，“遊走子嚢の細胞壁は厚い、もしくは薄い”，“包嚢を持つ、もしくは持たない”が定義に加えられた (Johnson and Sparrow 1961)。その後、この定義に基づき14種が位置づけられ、現在17種が位置づけられている。

### **1. *Thraustochytrium proliferum* Sparrow 1936**

この種は、1936年アメリカ、ウッズホール (Wood Hole) から採取された緑藻ハネモ、紅藻イギスに付着していた際に観察された形態から新種であると判断され、記載された *Thraustochytrium* 属の基準種である (Sparrow 1936)。この種の形態は、*Thraustochytrium* 属の定義となっているため、この種の定義には、“栄養細胞の大きさ”，“外質ネットの形状”，“孢子嚢から放出される、孢子の大きさ”が記載されている (Sparrow 1936)。記載後、この種と同定できる生物が、アメリカ・ボーフォート (Beaufort) で採取された緑藻ハネモから発見され、“包嚢 (膨らんだ外質ネット)”，“休眠細胞 (細胞壁が厚い栄養細胞)”という形態が観察された (Johnson 1957)。その後、さまざまな場所から観察、分離されている (Goldstein 1963a, Booth 1969, Sparrow 1969, Ulken 1970, Johnson 1974)。

### **2. *Thraustochytrium globosum* Kobayasi et M. Ôkubo 1953**

この種は、1953年千葉県・太海から採取された緑藻ヒビミドロ目に付着していた生物で、“遊走細胞を放出後、原基体を残さない”，“遊走細胞が、遊走子嚢内で形成され、運動する”，“外質ネットがシンプル”という形態が、基準種と区別できることから、*Thraustochytrium* 属の新種として記載された (Kobayashi and

Ookubo 1953)。記載後、同種と同定された生物が発見され、外質ネットを分岐することが観察された (Ulken 1964)。その後、さまざまな場所から分離されている (Sparrow 1969, Konno 1972)。

生理的な研究としては、この種と同定された生物株が、原生生物では珍しいグリコスフィンゴリピッド (Glycosphingolipids) を蓄積していることが報告されている (Jenkins et al. 1999)。

### **3. *Thraustochytrium pachydermum* Erh. Scholz 1958**

この種は、1958年フランス・モンペリエ (Montpellier) から採水された表層水に添加した松花粉に付着していた生物である (Scholz 1958)。この種は、“孢子囊の細胞壁が厚い”、“孢子囊から、孢子を放出した後、すぐに鞭毛を生やし、泳ぎ出す”という形態で、これまで記載された *Thraustochytrium* 属の種と区別できることから、新種として記載された。この種は記載以降、さまざまな場所から観察、分離されている (Sparrow 1969, Konno 1972, Lyons et al. 2006)。

### **4. *Thraustochytrium motivum* S. Goldst. 1963**

この種は、1963年アメリカ・ウッズホールで採水された表層水に松花粉を添加し、付着した生物である (Goldstein et al. 1963a)。この種は、これまで記載された種と、“遊走細胞は、不規則に崩壊した孔から放出される”という形態で区別できることから、新種とされた。また、記載論文やその後の研究で、栄養液体培地での形態観察、炭素・窒素の資化性試験、寒天培地での形態観察、塩濃度・温度による増殖速度の検証、酸素、オーキシシンに対する影響についても調べられている (Bahnweg 1979a, 1979b)。さらに、この種と同定された生物株の遊走細胞の微細構造、鞭毛装置、核分裂の過程など、数多くの電子顕微鏡観察が行われ

ている (Kazama 1972a, 1972b, 1973, 1974, Perkins 1972, 1973b)。

#### **5. *Thraustochytrium aureum* S. Goldst. 1963**

この種は、1963年アメリカ・ウッズホールで採水された表層水に添加した松花粉に付着していた生物である (Goldstein 1963b)。この生物が、これまで記載された種と、“放出後に細胞質 (原基体) を残す”, “遊走細胞は、遊走子嚢内で運動する”, “栄養細胞の細胞質に、黄色の色素を含む”, “原基体は、遊走子を放出する前から観察される”ことで区別できたことから、新種とされた。また、*T. motivum* と同じく、記載論文やその後の研究で、栄養液体培地での形態観察、炭素・窒素の資化性試験、寒天培地での形態観察、塩濃度・温度による増殖速度の検証、酸素、オーキシシンに対する影響についても調べられている (Bahnweg 1979a, 1979b)。さらに、栄養細胞内の微細構造観察、遊走細胞の微細構造、鞭毛装置の観察が行われている (Goldstein 1964, Barr and Allan 1985)。

この種は、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などの高度不飽和脂肪酸を蓄積することが知られており、脂肪酸を合成する酵素の同定も行われている (Baipai et al. 1991a, 1991b, Iida et al. 1996, Kang et al. 2008, Matsuda et al. 2012)。

#### **6. *Thraustochytrium roseum* S. Goldst. 1963**

この種は、1963年アメリカ・ウッズホール、ニューヘブレン (New Haven) で採水された表層水に添加した松花粉に付着していた生物である (Goldstein 1963c)。この生物が、“ねばねばとした遊走細胞の集合体が、遊走子嚢の細胞壁を崩壊させる”, “栄養細胞が赤色を含んだオレンジ色の色素をもつ”, “遊走細胞放出後、原基体を残さない” という形態が、*Thraustochytrium* 属の他の種と区別できることから、新種として記載された。また、*T. motivum*, *T. aureum* と同じく、記載論

文やその後の研究で、栄養液体培地での形態観察、炭素・窒素の資化性試験、寒天培地での形態観察、塩濃度・温度による増殖速度の検証、酸素、オーキシンに対する影響についても調べられている (Bahnweg 1979a, 1979b)。さらにこの種と同定された生物株の細胞壁の成分が EDS 解析で確認されている (Chamberlain 1980)。

生理的な研究としては、DHA を高濃度に生産することが報告されている (Singh and Ward 1996)。

### **7. *Thraustochytrium aggregatum* Ulken 1965**

この種は、ドイツ、外ヴェーザー (ヴェーザー川の河口) の土壌から発見された (Ulken 1965)。この生物は、“遊走子の大きさ”、“外質ネットを分岐する”、“遊走細胞放出後、原基体を残さない”という形態で、これまで記載された生物と区別できることから、新種とされた。また、この記載以降、この種と同定された株が、“栄養細胞が2分裂を繰り返して、増殖する”という形態を示すことが報告されている (Gaertner 1968, Konno 1972)。さらに、この種と同定された生物株の栄養細胞内の微細構造、ボスロソーム、外質ネット内の構造が観察されている (Moss 1985)。

生理学的な研究としては、1979年に炭素、窒素の資化性試験が行われている (Bahnweg 1979a, 1979b)。

### **8. *Thraustochytrium kinnei* A. Gaertn. 1967**

この種は、1967年ドイツ・ヘルゴラント島 (Helgoland) で採水された表層水に添加した松花粉に付着した生物である (Gaertner 1967)。この生物が示した“放出後に原基体を残す”、“遊走子嚢内で遊走細胞が形成され、運動する”という

形態が、これまで記載された種と区別できることから、新種とされた。記載以降、この種を松花粉上で長期間培養した場合、“遊走子嚢を細胞壁が厚くなる”という形態が見られることが記載されている (Gaertner 1970)。また、外質ネットに、膨らみのような構造を持つことも分かっている (Harrison and Jones 1974a)。

また、この種と同定された生物株の微細構造観察は、数多く行われており、ボスロソーム、栄養細胞内の微細構造などが記載されている (Harrison and Jones 1974a)。生理学的な研究としては、1979年に炭素、窒素の資化性試験が行われている (Bahnweg 1979a, 1979b)

#### **9. *Thraustochytrium striatum* Joa. Schneid. 1967**

この種は、1967年、ドイツ、キール湾から採水した表層水に添加した松花粉に付着していた生物である (Schneider 1967)。この生物は、“遊走子嚢の細胞質が、中心に向かって亀裂が入る”、“遊走細胞が放出する際に、細胞壁が完全に崩壊する”という形態が、これまで記載された種と区別できることから、新種として記載された。記載以降、この種と同定された生物株は、外質ネットに膨らみのような構造を持つことが分かっている (Alderman et al. 1974)。また、微細構造観察も行われており、細胞壁やボスロソームなどの観察結果が記載されている (Harrison and Jones 1974b, Alderman et al. 1974)。

生理学的な研究としては、1979年に炭素、窒素の資化性試験が行われている (Bahnweg 1979a, 1979b)。また、バクテリアと2員培養することで、栄養細胞がアメーバ状細胞になり、バクテリアを取り込むことが報告されている (Raghukumar 1992)。

#### **10. *Thraustochytrium arudimentale* N. J. Artemczuk 1972**

この種は、1972年、ロシア、カンダラクシャ湾 (Kandalakshial bay) から採水した表層水に添加した松花粉に付着していた生物である (Artemtchuk 1972)。この生物は、“放出後に細胞質 (原基体) を残さない”、“遊走細胞は、遊走子囊の細胞壁の一部のみを崩壊させた孔を通った細胞質が、細胞外で分裂し、鞭毛を生やす” という形態が観察されたことから、新種として記載された。

#### **11. *Thraustochytrium antarcticum* Bahnweg et Sparrow 1974**

この種は、1974年、南極海 (Station 11) の水深 50 m から採取した海水から分離された生物である (Bahnweg and Sparrow 1974)。この生物は、“放出後に細胞質 (原基体) を残す”、“遊走細胞を放出する際に、遊走子囊の細胞壁を完全に崩壊させる” ことで、これまで記載された種と区別できることから、新種として記載された。この記載以降、“*Thraustochytrium* aff. *antarcticum*”、と同定された生物株が、アルゼンチンから分離されている (Rosa et al. 2006)。

生理学的な研究としては、1979年に炭素、窒素の資化性試験が行われている (Bahnweg 1979a, 1979b)。

#### **12. *Thraustochytrium rossii* Bahnweg et Sparrow 1974**

この種は、1974年、南極海 (Station 14) の水深 100 m から採水した海水から分離された生物である (Bahnweg and Sparrow 1974)。この生物は、“遊走細胞放出

後に、5-50 個の原基体を残す”，“遊走細胞が放出される細胞壁の孔は 1 ヶ所で、放出後も細胞壁を残す”という形態が観察されたことから、新種として記載された。

生理学的な研究としては、1979 年に炭素、窒素の資化性試験が行われている (Bahnweg 1979a, 1979b)。

### **13. *Thraustochytrium kerguelense* Bahnweg et Sparrow 1974**

この種は、1974 年、ケルゲレン諸島付近 (Station 17) の水深 90 m から採取した海水から分離された生物である (Bahnweg and Sparrow 1974)。この生物は、”遊走細胞放出後に、3-10 個の原基体を残す”，“遊走細胞が放出される際、遊走子嚢の細胞壁は完全に崩壊する”，“遊走細胞は、遊走子嚢内で形成される”という形態が見られたことから、新種として記載された。

生理学的な研究としては、1979 年に炭素、窒素の資化性試験が行われている (Bahnweg 1979a, 1979b)。

### **14. *Thraustochytrium indicum* D. K. Chakrav. 1979**

この種は、1979 年、インド、マドラスのエリオットビーチ (Elliot's beach) から採取された表層水などの基質に添加した松花粉に付着した生物である (Chakravarty 1979)。この生物は、“遊走細胞放出後に、原基体を残さない”，“遊走細胞が放出される放出孔が、1-4 個形成される”，“遊走細胞が放出される孔は、遊走細胞が放出されると同時に形成される”，“遊走細胞が放出された後も、遊走子嚢の壁が残る”という形態が観察されたことから、新種として記載された。

### **15. *Thraustochytrium benthicola* Raghuk. 1980**

この種は、1980 年、北海、Fladen Ground 周辺の海底堆積物に添加した松花粉に



付着した生物である (Raghukumar 1980)。この生物は，“遊走細胞形成時に，遊走子囊の細胞質が中心に向かって，亀裂が入る”，“遊走細胞の鞭毛の位置”でこれまで記載された種と区別できることから，新種として記載された。

**16. *Thraustochytrium gaertnerium* R. Jain, S. Raghuk. , L. Bongiorni et R. K. Aggarwal 2005**

この種は，2005 年，インド，ゴアのマングローブの葉に添加した松花粉に付着した生物である (Bongiorni et al. 2005)。この生物は，“遊走子囊が，アメーバ状細胞になる時期がある”，“系統関係”が，これまで記載された種と区別できることから，新種として記載された。

**17. *Thraustochytrium caudivorum* Scharer, Knoflach, Vizoso, Rieger, Peintner 2007**

この種は，ウミウシ (*Macrostomum lignano*) に付着していた生物である (Schrer et al. 2007)。記載論文では，この種がウミウシの tail-plate を失われせるなどの影響を与えることが示唆されている。形態は，“遊走細胞放出後に，原基体を残さない”，“栄養細胞が，仮足を伸ばすアメーバ細胞に変化する”“系統関係”で，これまで記載された生物と区別できる。この論文以降，“*Thraustochytrium aff. caudivorum*”と同定された生物が，兵庫県・夙川河口から分離されている (Ueda et al. 2015)。

***Aurantiochytrium* R. Yokoyama et D. Honda 2007**

この属は，2007 年に，多系統群を形成していた *Schizochytrium* 属の 1 系統群で，他の系統群に位置する種と“外質ネットが発達しにくい”，“栄養細胞の大きさが小さい”という形態，“高度不飽和脂肪酸組成では，アラキドン酸が少なく，

DHAが多い”, “カロテノイド色素として, アスタキサンチンまでの色素を全て持っている” ことで, 明確に区別できることから, 新たに新設された属である (Yokoyama and Honda 2007)。この属には, これまで記載されてきた種の形態や系統関係を参考に, 2種が位置づけられている。

### **1. *Aurantiochytrium limacinum* (D. Honda et Yokochi) R. Yokoyama et D. Honda 2007**

この種は, 1999年にミクロネシア, Yap島で採取された海水から, 分離された生物である (Honda et al. 1998)。この生物は, “栄養細胞が2分裂を繰り返す, 増殖様式を示す” ことから, *Schizochytrium* 属に位置づけられ, “仮足を形成するアメーバ細胞を形成する” ことで, 新種とされた。その後, 2007年に行われた分類学的再編成で, *Aurantiochytrium* 属とされた系統群に, この種のタイプ由来株が位置したことから, この属のタイプ種とされた (Yokoyama and Honda 2007)。この種は, 高濃度の DHA を生産することから, 応用面で特に注目されている (Nakahara et al. 1996, Yokochi et al. 1998)。

### **2. *Aurantiochytrium mangrovei* (S. Raghuk.) R. Yokoyama et D. Honda 2007**

この種は, 1988年にインド・ゴアで採取されたマングローブの葉 (*Avicennia officinalis*) に添加した松花粉に付着した生物である。この生物は, 栄養細胞が2分裂を繰り返す, 増殖様式を示す”, “栄養細胞が2分裂を繰り返して分裂し, 分裂した細胞が直接遊走細胞になる” という形態が, これまで記載された種と区別できることから, *Schizochytrium* 属の新種として記載された (Raghukumar 1998a)。その後, 行われた分類学的再編成で, *Aurantiochytrium* 属と位置づけら

れた系統群に、この生物と同定された株 (RCC 893) が位置していたことから、この属に位置づけられた (Yokoyama and Honda 2007)。

## 第 1 章 多系統群を形成している *Thraustochytrium* 属の属レベルの分類

### 序論

*Thraustochytrium* 属は、1936 年にツボカビ類に似た仮根様構造をもつ球状の単心性の栄養細胞をもつが、2 本の不等毛の鞭毛をもつ遊走細胞を形成することから、新たに設立された属である (Sparrow 1936)。当初、この属は 2 本の不等毛の鞭毛遊走細胞を形成することから、卵菌綱に位置づけられた (Sparrow 1943)。また、設立された当時、ツボカビ綱や卵菌綱では遊走細胞が放出された後の遊走子嚢の壁の残り方や、栄養細胞の仮根の形態で、科や属が分けられていたため、この属の定義には基準種にみられる、遊走細胞放出後に遊走子嚢の細胞壁が破れるという形質が含まれている (Fischer 1892, Coker 1923)。その後、記載された 17 種は、上記のような Sparrow (1943) の属の定義に従って、この属に含められてきた。しかしながら、この形態は培地によって、遊走子嚢の細胞壁の破れ方が変化することが明らかとなっている (Booth and Miller 1968, Gaertner 1972)。また、この属には複数の属に分かれる可能性について、分子系統解析の情報が報告される前から指摘されていた。例えば、この属には遊走細胞の放出後に栄養細胞の一部を原基体として残す種と残さない種があり、この形態が培養条件などでも影響を受けない形態であることが示唆されていることから、この形態でグループ分けできることが複数の著者が提案している (Sparrow 1968, Gaertner 1972, Alderman et al. 1974)。また、基準種 *T. proliferum* の栄養細胞は成熟すると、無鞭毛の胞子が放出され、数時間後にそれぞれに鞭毛が生じて遊走細胞へと変態すると記載されているが、他の種は最初から遊走細胞とし

て放出されるという違いも見受けられる。

*Thraustochytrium* 属の分類学的な検討を行うにあたっては、基準種の形質のより詳細な検討と、系統学的位置の確定をした上で、他の系統群の形質比較することが望ましい。しかしながら、基準種の記載論文では観察のみで、培養株は作製されておらず、少なくとも *T. proliferum* として同定されている株は、株保存施設にも存在しない。そこで、タイプ産地であるアメリカ・ウッズホールで基準種の探索を行ったが、相当する株を見つけ出すことはできなかった（第一章の結果を参照）。ただし、現場の海藻から抽出された環境 DNA から 18S rDNA を網羅的に読み取ることで、基準種の可能性のある複数の配列を得た。

そこで、多くの形態形質で基準種と区別できる、*Thraustochytrium* 属で 2 番目に記載された *T. globosum* に注目した。この種は、基準種とは異なり、原基体を残さないこと、遊走子嚢から遊走細胞が放出されること、外質ネットの形態で区別される (Kobayashi and Ookubo 1953)。一方で、その後に記載された種が培養下での観察結果が記載されているのに対し、*T. globosum* は基準種と同様に海藻表面に着生している様子のみが記載されている。

そこで、本研究では、*T. globosum* のタイプ産地から多数の分離株を得て、その中からこの種の形質と合致する株を見つけ出した。その株について、海藻表面と無菌培養における形態形質を比較し、改めてこの種のもつ形質を整理し、分子系統学的位置について、すでに報告のある他のラビリントウ類およびタイプ産地で得られた配列を含めて解析し、*Thraustochytrium* 属の全ての種とも総合的に比較することで、この種の分類学的な立ち位置について考察した。

## 材料と方法

### サンプリングと分離

基質は、日本国内では以下の10ヶ所、2013年4月27日に太海海岸（千葉県、*T. globosum* のタイプ産地）、沖の島（千葉県）、2013年4月28日に金沢八景（神奈川県）、2013年7月11日に室蘭（北海道）、2013年7月12日に蘭島海水浴場（北海道）、忍路臨海実験所前（北海道）、2013年7月13日に石狩浜海水浴場（北海道）、2013年12月15日に若狭町（福井県、海藻は福井県立大学、神谷教授より提供いただいた）、2014年1月31日に下田（静岡県）、2015年4月7日に大洗（茨城県）、アメリカ内では以下の4ヶ所、2014年5月25日～27日にウッズホール周辺（マサチューセッツ州、*T. proliferum* のタイプ産地）、2015年8月24日～26日にウッズホール周辺、マーサズ・ビニヤード島周辺（マサチューセッツ州）、スワンスコット周辺（マサチューセッツ州）から採取した。この研究では、3種類の分離法を使用した。① 基質を滅菌海水入りプラスチック容器に入れ、松花粉（Gaertner 1968）、もしくは乾燥クロレラ（インターネットサイト、「わむし屋」で購入：<http://www8.plala.or.jp/wamushiya/>）を添加した。これは、ヤブレッツボカビ類の遊走細胞の走化性を利用した方法である。② 海藻と滅菌海水をビニール袋の中に入れ、海藻表面を洗う。洗った滅菌海水を15 ml ファルコンチューブに移し、670 ×g で5分間遠心分離した。沈殿物を抗生物質入り d-GPY 寒天培地（抗生物質は、500 pmol/μL のアンピリシリンとストレプトマイシン）に塗布した。また残った上澄み液には、松花粉を添加した。この方法は、海藻表面に付着しているヤブレッツボカビ類の分離を試みた方法である。③ 海藻を滅菌海水入りプラスチック容器に入れ、1ヶ月間培養した後、松花粉

を添加した。この方法は、海藻表面で生きながらえたヤブレッツボカビ類を分離することを目的に行った。基質は、サンプリング地点の水温が 17.5°C以下のときは 15°Cの培養庫、17.5~22.5°Cのときは 20°Cの培養庫で、22.5°C以上のときは 25°Cの培養庫で培養した。

松花粉やクロレラを添加した全てのサンプルは、1 週間培養し、d-GPY 寒天培地 (Ueda et al. 2015)、KMV 寒天培地 (Porter 1990)、1%ウマ血清寒天培地 (Watson and Raper 1957) に塗布し、それぞれ培養を行っていた温度で 4-7 日間培養した。その間に、生育したヤブレッツボカビ類を抗生物質入り d-GPY 液体培地が入った Falcon-24 ウェルセルカルチャープレート (BD Falcon Labware, Franklin Lakes, NJ) に移し、生育してきたヤブレッツボカビ類をそれぞれ生物株とした。

## DNA 抽出と PCR 反応条件

生物株の 18S rDNA 配列の決定は、まず DNA 抽出を行わず、細胞を鋳型として PCR 反応を行い、18S rDNA 配列 (約 1800 bp) を増幅した。細胞は、d-GPY 液体培地で 1 週間培養したものを使用した。DNA ポリメラーゼは、MightyAmp™ DNA Polymerase Ver. 2 (Takara, Ohtsu, Japan)、プライマーは SR01 (Nakayama et al. 1996)、SR12L1 (Ueda et al. 2015) を使用した。目的配列の増幅確認は、電気泳動を使用した。

上記の方法で目的の配列が増幅されていない場合は、CTAB 法を用いて DNA 抽出を行い、DNA 抽出物を鋳型として PCR 反応を行った (Murray and Thompson 1980)。この方法で使用した DNA ポリメラーゼは、TaKaRa Ex Taq™

Hot Start Version kit (Takara, Tokyo, Japan) を使用した。

PCR 精製物の精製は, Illustra ExoProStar (GE Healthcare Life Science, USA) を使用した。目的配列の塩基配列の決定は, BigDye 反応を利用し, シーケンサーは PRISM 3730 DNA analyzer を使用した。BigDye 反応以降の解析は, 北海道システムサイエンス株式会社に委託した。解析に使用したプライマーは, SR01 もしくは SR05 を使用し, 18S rDNA 配列の前半部分 (約 600 bp) を決定した (Nakayama et al. 1996)。

## 系統解析

DNA 配列は, Ueda et al. 2015 で使用されたアライメントファイルを使用し, Clustal X 2.1 を使用して, アライメントを実施した (Larkin et al. 2007)。系統解析は, Mega 6.06 を使用し, 近隣結合法 (neighbor-joining, NJ), 最尤法 (maximum likelihood, ML), 最小進化法 (minimum evolution, ME) を使用して系統樹を作成した (Tamura et al. 2013)。全ての系統樹は, Tamura-Nei model + gamma distribution (G) + evolutionarily invariable sites (I) で解析した。ブートストラップは, 1000 回試行した。

## 形態観察

培養株の形態観察を行うため, 海水+松花粉 培地 (Raghukumar 1988a), d-GPY 培地 (Ueda et al. 2015), 海水+海藻 培地 (5 × 5 mm 間隔に刻んだ海藻切片を 10-15 個を 20 ml の滅菌海水に加えた培養液) を使用した。遊走細胞のステージからの観察を行うために, 以下の方法で遊走細胞を準備した: ① 培養細



胞を d-GPY 寒天培地に塗布した。② 3-4 日培養し、滅菌海水を加えた ③ 約 5-7 時間後に、液体部分に遊走細胞が泳ぎ出すため、これを培地に添加し、培養を行った。海水+松花粉 培地と d-GPY 培地は、4-7 日間培養した細胞を形態観察に用いた。海水+海藻 培地に使用した海藻は、*Pyropia* sp. と *Monostroma* sp. で、2 週間培養した細胞を観察対象とした。光学顕微鏡は、BX60 微分干渉顕微鏡を用い、画像は、AxioCam HRc カメラを用いた。連続観察は、Axiovert 200 微分干渉顕微鏡を用い、MC170 camera でイメージ画像を取得した。

### 次世代シーケンサー解析

サンプルは、ウッズホール（マサチューセッツ州）で採取した紅藻（*Ceramium* sp.）を使用した。この試料は洗わず、現地でシリカゲル入りチューブで保存し、DNA 抽出を行うまで、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。全 DNA は、0.05 g のサンプルから抽出した。サンプルは、チューブ内にメタルコーン（Yasui Kikai, Osaka, Japan）を入れ、液体窒素で 5 分間凍結処理を行った後、マルチビーズシヨッカー（Yasui Kikai, Osaka, Japan）を使用して、粉砕した。粉砕したサンプルは、ISOPLANT II（Nippon Gene, Tokyo, Japan）を用いて、DNA 抽出物とした。

標的配列は、18S rDNA の前半部分（約 400 bp）とした。DNA ポリメラーゼは、KAPA-HiFi DNA Polymerase（Nippon Genetics, Tokyo, Japan）を使用した。PCR 産物を電気泳動にかけたところ、目的以外のバンドが確認された。そのため、予想されるバンド（約 400 bp）のみを含むゲルを切り出し、GENECLEAN Turbo Kit（Funakoshi, Tokyo, Japan）を用いて精製した。これを Aplicon-PCR

精製物とした。その後の、アダプター配列の付加、PCR産物の精製試薬は、16S Metagenomic Sequencing Library Preparation ([http://jp.support.illumina.com/downloads/16s\\_metagenomic\\_sequencing\\_library\\_preparation.html](http://jp.support.illumina.com/downloads/16s_metagenomic_sequencing_library_preparation.html)) に従った。標的配列を増やすためのプライマーは、illumina-SR01 (5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-TACCTGGTTGATCCTGCCAG 3'), illumina-AntiCera04 (5' GTCTCTGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-CCGGARTCRARCCCTRAYT 3') を使用した。illumina-SR01 は、Nakayama et al. 1996 の SR01 にアダプター配列を付加した、多様な真核生物に結合するプライマーである。illumina-AntiCera04 は、紅藻（主に *Ceramium* sp.）を増幅させず、他の真核生物に対して結合しやすいように設計した。この解析は、ペアエンド（paired-end 300 bp）で解析した。Miseqでの解析は、北海道システムサイエンス株式会社に委託した。

## 結果

### サンプリング株の系統的位置

各サンプリング地点で、さまざまな基質をサンプリングした（表1）。太海海岸では、表層水、シオグサ、アオサ、マクサ、ムカデノリ。沖の島では、表層水、ハネイギス、マクサ、スギノリ、アマモ。金沢八景では、ハネモ、オゴノリ。室蘭では、表層水、ハネモ。蘭島海水浴場では、表層水、アマモ、ツルモ。忍路臨海実験所前では、表層水、シオグサ。石狩浜海水浴場では、表層水と砂。若狭町ではハネモ。下田では表層水、シオグサ。大洗では表層水、アオサ、ハネモ、アマモ。2014年度のウッズホールでは、表層水、シオグサ、ミル、アオサ、アマモ、イギス、砂。2015年度のウッズホールでは、表層水、シオグサ、

ミル, アマモ, イギス, 砂。マーサズ・ビニヤード島では, 表層水, シオグサ, ミル, アマモ, イギス, 砂。スワンスコットでは, 表層水, シオグサ, ミル, 砂を採取した。これらの基質を使用して, 各サンプリング地点 (太海海岸で 15 株, 沖の島で 37 株, 金沢八景で 69 株, 室蘭で 168 株, 蘭島海水浴場で 24 株, 忍路臨海実験所前 32 株, 石狩浜海水浴場で 7 株, 若狭町で 10 株, 2014 年度のウッズホールで 1105 株, 2015 年度のウッズホールで 48 株, マーサズ・ビニヤード島で 8 株, スワンスコットで 8 株) で生物株を作製した (表 1)。これらの株で観察される形態 (例えば, コロニー形態や遊走子の形態) から各地点の代表株を選出し, それぞれの株の系統的位置を決定した。各地点の代表株は, *Thraustochytrium kinnei* (太海海岸, 沖の島, 金沢八景, 室蘭, 蘭島海水浴場, 2014 年度ウッズホール), *Schizochytrium* sp. (忍路), *Ulkenia* sp. (2015 年度ウッズホール), 未同定系統群 2 (2014 年度ウッズホール, 蘭島海水浴場, 石狩浜海水浴場), *Thraustochytrium striatum* 1 (2014 年度, 2015 年度ウッズホール), *Thraustochytrium striatum* 2 (沖の島), *Thraustochytrium aggregatum* (2014 年度ウッズホール), *Aurantiochytrium* sp. (2015 年度ウッズホール), the12 株系統群 (金沢八景), 未同定系統群 3a (太海海岸, 金沢八景, 忍路臨海実験所前, 2014 年度ウッズホール), 未同定系統群 7 (金沢八景, 2014 年度ウッズホール), *Oblongichytrium* sp. 1 (太海海岸, 金沢八景, 室蘭, 忍路臨海実験所前, 2014 年, 2015 年度ウッズホール), *Oblongichytrium* sp. 2 (室蘭, 蘭島海水浴場, 2014 年度ウッズホール), *Aplanochytrium* sp. (室蘭, 2014 年, 2015 年度ウッズホール) に位置した (図 1, 表 2)。海水+海藻培地において, *Thraustochytrium kinnei*, 未同定系統群 2 に位置する株の遊走細胞形成時における, 遊走子嚢の細胞質分裂

は、一度に起こった。その後、遊走子嚢内で 2 本の鞭毛を形成した。遊走細胞は遊走子嚢内を動き回らず、遊走子嚢の壁を破り、放出された。遊走子嚢の壁は、崩壊せず残っていた。原基体は、遊走細胞放出前に 1 つ形成され、遊走細胞放出後に残された (図 2)。 *Schizochytrium* sp., *Ulkenia* sp., *T. striatum*, *T. aggregatum*, *Aurantiochytrium* sp., the12 株, 未同定系統群 3a, 未同定系統群 7, *Oblongichytrium* sp. 1 に位置する株の遊走細胞形成時における、遊走子嚢の細胞質分裂は一度に起こり、複数の胞子に分かれた。遊走細胞は、遊走子嚢内で 2 本の鞭毛が形成された。遊走細胞は、遊走子嚢内を動き回らず、遊走子嚢の壁を破り、放出された。遊走子嚢の壁は、形を残さず崩壊した。原基体は、形成されなかった (図 2)。

*Oblongichytrium* sp. 2 に位置する株の遊走細胞形成時における、遊走子嚢の細胞質分裂は一度に起こり、複数の胞子に分かれた。遊走細胞は、遊走子嚢内で 2 本の鞭毛が形成された。遊走細胞は、遊走子嚢内を動き回らず、遊走子嚢の壁を破り、放出された。遊走子嚢の細胞壁は上部のみ崩壊した。原基体は、遊走細胞放出前に 2-5 個形成され、遊走細胞放出後に残された (図 2)。

*Aplanochytrium* sp. に位置する株の遊走細胞形成時における、遊走子嚢の細胞質分裂は一度に起こり、複数の胞子に分かれた。細胞質分裂によって形成された胞子は、胞子嚢の壁を破って放出された。放出された胞子は、遊走細胞になることはなかった。原基体は形成されなかった。形態観察結果は、図 2 に示した。

未同定系統群 3a に位置した株の形態が、*T. globosum* の示す形態に類似したことから、タイプ産地(太海海岸)で分離された未同定系統群 3a の生物株(SEK

671) を代表株として、さまざまな培地での形態観察を行った。

### SEK 671 株の形態観察

このパラグラフに書かれている形態は、すべての培地で観察された。遊走細胞は腎臓型であった (図 3c)。遊走細胞の細胞質には、2-3 の顆粒が鞭毛基部の腹部に存在していた (図 3d)。遊走細胞は基質に付着したあと、栄養細胞になった (図 3a)。栄養細胞は 2 分裂を繰り返して、分裂した細胞が栄養細胞になるという形態を示さなかった。遊走細胞の大きさは、培地条件によって、変化することがわかった。d-GPY 培地は、海水+海藻 培地、海水+松花粉 培地での遊走細胞の大きさは、それぞれ、 $2.5-4.2 \times 2-3.2 \mu\text{m}$ 、 $2.5-3.6 \times 2.2-2.9 \mu\text{m}$ 、 $2.5-3.9 \times 2.1-3.0 \mu\text{m}$  で、栄養細胞の大きさは、それぞれ  $5.1-19.8 \mu\text{m}$ 、 $5.2-13.8 \mu\text{m}$ 、 $5.5-15.5 \mu\text{m}$  となった。2-3 週間培養した細胞は、複数のオレンジまたは黄色の顆粒を含んでいた (図 3e)。遊走子嚢へは、遊走細胞が着生し、約 24 時間後に変化した。遊走子嚢の細胞質は細胞質分裂を起こし、分裂した胞子は遊走細胞として放出される (図 4b-f, 図 5a-h)。初めに、遊走子嚢は、胞子を形成するために細胞質が分裂を行う (図 4c, 図 5b)。これらの胞子は、遊走子嚢内で丸くなる (図 4d, 図 5c-d)。この状態では、鞭毛は現れていなかった (図 4e, 図 5e)。細胞質分裂から約 30 分後、胞子から鞭毛が観察された (図 5g)。約 20 分後、遊走細胞は、遊走子嚢内を泳ぎだした (図 5g)。その 2 分後、遊走子嚢の細胞壁が崩壊し、遊走細胞が遊走子嚢の外に泳いでいった (図 4f, 図 5g)。遊走細胞が放出された後、壁や外質ネットは残された (図 5h)。SEK 671 株が放出した遊走細胞の数は 8-32 であった。本研究において、どのステージの細胞においても、原

基体を形成することはなかった。

海水+海藻 培地, 海水+松花粉 培地では, 遊走細胞は遊走子嚢によって形成された。しかしながら, d-GPY 培地において, 栄養細胞の連続した 2 分裂を介した遊走細胞放出様式を示した (図 5i-m)。最初に, 栄養細胞は, 2 分裂を通して分裂が起こった (図 5j-k)。次に, もう一度 2 分裂を繰り返し, 4 細胞へと変化した (図 5i)。それぞれの細胞は, 遊走細胞へと変換し, そのまま放出された (図 5m)。

海水+海藻 培地において, 外質ネットは 1 本であったが, d-GPY 培地と海水+松花粉 培地では, 分岐した外質ネットを発達させた (図 3a, 図 4a)。d-GPY 寒天培地において, 細胞は六角形や八角形をしていた (図 3b)。外側の細胞は, アメーバ上の細胞をしていた。コロニー全体の大きさは, 50-200  $\mu\text{m}$  で, 蜂の巣状の形をしていた。これらの結果は, 図 6 にまとめた。

### 次世代シーケンサーによる, 新規系統群の探索

Miseq のペアエンドラン解析より, 1,600,756 リード (Read 1, Read 2 の両リードを含む) を得た。これらの配列の中からクオリティ 20 以下 (信頼度が 99% 以下) の配列を除外し, 残った配列を結合した。最終的には, 約 400 bp の 644,619 の 18S rDNA 配列を得た。これらの配列を, 真核生物の DNA 配列 (Silva\_111) と相同性検索 (uclust) を行うと, 6,045 配列が既知のラビリンチュラ綱に位置している配列と 80%以上の相同性を持つことが示された。これらの配列を含め, 系統樹を作成した結果, これらの配列は既知の 11 系統群 (*Thraustochytrium kinnei*, *Parietichytrium* sp., *Thraustochytrium aureum/roseum*, *Ulkenia* sp., environment

thraustochytrid, *Thraustochytrium striatum* 1, *Aurantiochytrium limacinum*, 未同定系統群 3a, *Oblongichytrium* sp. 1, *Oblongichytrium* sp. 3, *Labyrinthula* sp.) と、これまで確認されていない7つ系統群 (New clade 1~7) に位置した (図1)。これまで知られていない7つ系統群は、他の系統群と90%以上の Bootstrap 値で単系統性が支持された。既知種が位置している系統群に位置した配列は、他の系統群と98~99%の Bootstrap 値で単系統性が支持された (図1, 表3)。*Aplanochytrium* 属, *Oblongichytrium* 属近縁に位置した配列は、5~100%の Bootstrap 値で単系統性が支持された (表3)。また、これらの配列は、Blastn 検索で *Oblongichytrium*, *Aplanochytrium*, Uncultured eukaryote clone sequence と90~99%の相同性を示した (表3)。

## 考察

### 基準種 *Thraustochytrium proliferum* について

本研究では、基準種 *T. proliferum* の形態を示す株を分離することはできなかった。基準種は、“孢子嚢内で孢子を形成し、放出後、数時間を経て遊走細胞に変態する”、“孢子を放出後、孢子嚢には原基体が残る”という形態で特徴づけられる (Sparrow 1936)。これら形態は海藻表面だけでなく、他のヤブレッツボカビ科の種の形態を観察する際に用いられる松花粉上でも観察されている (Sparrow 1969)。本研究で形態観察を行った13系統群の株は、原基体を形成する株もいたが、遊走子嚢内で遊走細胞、もしくは放出後に孢子を形成した。放出した孢子は、鞭毛を形成しなかった。また、これらの形態は、培養条件を変化させても遊走子形成様式が変化することはなかった (data not shown)。したが

って、13 の系統群に位置した生物株の中には、*T. proliferum* と同定できるものは存在しなかった。

ウッズホールで採取した紅藻の環境 DNA 解析を行ったところ、ラビリンチュラ綱に位置する環境 DNA 配列が見つかった。このうち、これまで確認されている系統群に位置した環境 DNA は、Blastn での相同性検索の結果、位置した生物株と 99%以上の相同性を示した。さらに、系統樹において各系統群は他の生物群と 99 以上の Bootstrap 値で単系統性を支持した。したがって、これまで確認されている系統群に位置した環境 DNA はこれまで確認されている系統群に位置する種と同じ形態を示す可能性が考えられた。

また、本研究で確認された環境 DNA のみで構成されている系統群が少なくとも 7 つ確認された。ラビリンチュラ綱内には、Bootstrap 値 70%以上で単系統性が示唆されている系統群が、少なくとも 50 系統群確認されている (Collado-Mercado et al. 2010, Orsi et al. 2011, Massana et al. 2013, Pan et al. 2017)。本研究で確認された環境 DNA は、これらの系統群には位置せず、系統樹において各系統群は、他の生物群と 99 以上の Bootstrap 値で単系統性を支持した。したがって、これらの DNA 配列をこれまでに確認されていない DNA 配列と同定した。

基準種の特徴である原基体は、ラビリンチュラ綱の他の種にも見られる形態である。この形態は、さまざまな培養条件下においても、変化しにくい形態であることが分かっている (Booth and Miller 1968)。原基体を示す種は、これまでいくつか記載されており、系統的位置が分かっている種も存在している。しかしながら、原基体を持つ生物は、18S rDNA 配列の系統樹上で単系統群を形成



しないことが分かっている。したがって、本研究で存在が確認された、これまでに確認されていない DNA 配列の生物は、原基体を持つ可能性が考えられた。

また、基準種で観察される“孢子嚢内で孢子を形成し、放出後、数時間を経て遊走細胞に変態する”という遊走子形成様式は、*Thraustochytrium* 属や他のラビリンチュラ綱の種でしか観察されない形態である。独自の形態を持つ属として、ラビリンチュラ綱に位置するアプラノキトリウム科 *Aplanochytrium* 属がいる。この属は、“栄養細胞が外質ネットを使用し、運動性を示す”という形態を示す (Bahnweg and Sparrow 1972, Leander and Porter 2000)。この形態は、他のラビリンチュラ綱の属や種には見られない形態であり、この形態を示す生物は、18S rDNA や複数のタンパク質を使用した系統樹上でも、単系統群を形成している (Honda et al. 1999, Tsui et al. 2009)。*Thraustochytrium* 属の基準種の遊走子形成が、ラビリンチュラ綱でも極めて特徴的な形態であることを考えると、ヤブレッツボカビ科内だけでなく、ラビリンチュラ綱内の独立した系統群内に位置する可能性が考えられた。したがって、本研究で存在が確認された、これまでに確認されていない DNA 配列の生物が、“孢子嚢内で孢子を形成し、放出後、数時間を経て遊走細胞に変態する”という遊走子形成様式を示す可能性が考えられた。

このような背景から、本研究で存在が確認された、これまでに確認されていない DNA 配列の生物が *T. proliferum* である可能性があるため、今後タイプ産地で基準種が分離されるかもしれない。基準種の記載論文では、緑藻ハネモや紅藻イギスに付着していた (Sparrow 1936)。しかしながら、その後発表された論文で、基準種は松花粉にも付着できることが分かっている (Goldstein 1963a,

Sparrow 1969)。そのため、本研究で行った分離法で基準種が分離される可能性があるが、本研究で行った分離法では、ラビリンチュラ綱の遊走細胞が松花粉やクロレラに対して付着することが必要であり、また寒天培地での生育が必須なため、分離される生物に偏りがある。そのため、今後分離を行う際には、寒天培地に塗布する前に、松花粉上に生育している生物の形態を観察し、基準種の形態を示す株が存在しないかを視野に入れる必要がある。

### ***Thraustochytrium globosum* について**

本研究では、*T. globosum* と同定される培養株を、タイプ産地（千葉県・太海）から確立することに成功した。この種は3月に採取された緑藻ヒビミドロの表面で発見された（Kobayashi and Ookubo 1953）。同様の時期にタイプ産地からヒビミドロの採取を試みたが、残念なことに、この藻類はタイプ産地から採取できなかった。しかしながら、採取された *Ulva* sp. を海水に入れた前培養から分離した SEK 671 株に、*T. globosum* の形質が確認された。この種はこれまでに、底層水、表層水、泥などの基質から分離されている（Ulken 1964, Sparrow 1969）。したがって、この生物はヒビミドロに対する宿主特異性をもたないことが考えられた。

*T. globosum* は以下の形質で特徴づけられている、1) “*the zoosporangium of the present species does not proliferate* (= form a proliferous body)” 遊走子嚢は遊走細胞放出後に、原基体を残さない、2) “*zoospores complete their development in sporangium, swimming away immediately after bursting of sporangial wall*” 胞子は遊走子嚢内で鞭毛を形成し、運動した後に放出される、3) “*rhizoid is single and*

*simple, not so long*” 仮根（外質ネット）は、シンプルで長くない（Kobayashi and Ookubo 1953）。これらの形態はヒビミドロ表面に付着した状態で観察されたため、本研究では、紅藻 *Pyropia* sp. と 緑藻 *Monostroma* sp. に付着させて観察をした。その結果、上記の全ての形質が確認され、さらに遊走細胞内に含まれる顆粒の存在や、遊走細胞と栄養細胞の大きさも原記載と一致しており、SEK 671 株を *T. globosum* と同定した。

また、SEK 671 株について、ヤブレッツボカビ科の分類で一般的に用いられることの多い、海水+松花粉培地や栄養液体培地での観察も行った。その結果、d-GPY 培地において、栄養細胞が 2 分裂を繰り返して、それぞれの細胞が遊走細胞となる遊走子形成様式が観察された。これは *Aurantiochytrium mangrovei* と *Oblongichytrium minutum* のみにみられる、珍しい形質である（Gaertner 1981, Raghukumar 1988a）。3 者は系統的に離れているため、この形質がこれらの近縁性を示す形態ではないと考えられる（Yokoyama and Honda 2007, Anderson and Cavalier-Smith 2012）。しかしながら、この特徴は、他の形質と組み合わせることで、*T. globosum* の分類学的形質となると判断されたため、種の定義の修正を行った。

一方、*T. globosum* の外質ネットは、海藻表面で 1 本になる。しかしながら、液体培地では、外質ネットが長く発達し、複数の分岐が観察された。このような外質ネットの形態は、栄養培地におけるヤブレッツボカビ類で一般的にみられる特徴である（例えば、Honda et al. 1998, Bongiorno et al. 2005）。多くのヤブレッツボカビ類の種の記載では、海藻上の形態に着目していない。予備的な観察では *Ulkenia amoeboidea* (NBRC 104106), *Aurantiochytrium* sp. (NBRC 103268),

*Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) は、海藻表面で、外質ネットはあまり発達させなかった。したがって、外質ネットが1本で分岐しないという形態は、*T. globosum* を特徴づける形質ではない可能性が考えられた。

18S rDNA 配列の分子系統樹において、*T. globosum* SEK 671 株は、Ueda et al. (2015) で SEK 699 が位置する UT3a として認識された系統群に位置した。この種の形態形質が確認される株である SEK 699 株、SEK 747 株、SEK 748 株も同じ系統群に位置した (data not shown)。これらの株はそれぞれ比較的高緯度の北海道と低緯度の西表島から分離されており、この種が広い範囲の温度適応性をもつことが示された。さらに、この系統群に属するデータベースに登録のある株が取得された場所は、以下のように世界中に広がっている：台湾 (アクセッション番号：FJ821493–FJ821497) (Yang et al. 2009)、カナダ (アクセッション番号：DQ367052)、アルゼンチン (アクセッション番号：HQ228984–HQ228989)。これらのことから、*T. globosum* はコスモポリタンな種であることが示唆された。

また、*T. globosum* 系統群は、UT3b、UT3c、thel2 株および *Aurantiochytrium* 属系統群と高いブートストラップ値で支持された単系統群を形成した (Ueda et al. 2015)。UT3b は、沿岸域で比較的頻繁に出現し、広い温度適応性をもつことが示唆された系統群であり (Ueda et al. 2015)、これまでもチリ (アクセッション番号：KF718863, KF718864, KF709394, DQ459556) やアルゼンチン (アクセッション番号：HQ228949)、東京湾 (アクセッション番号：AB810966) などで分離されたことがある (Nakazawa et al. 2014)。しかしながら、この系統群の形態などの情報は示されていない。UT3c については、Ueda et al. (2015) で初めて示された系統群であり、UT3b と同様に沿岸域から分離されている。thel2 株は、

Tsui et al. (2009) で初めて示された系統群であり、*T. globosum* と同様に河口域から分離されている。この系統群に位置する株の観察を行うと、栄養細胞が約 5 時間のアメーバ状細胞に変化するという形態を生じるが、*T. globosum* はこの特徴を持っておらず、両者は明確に区別することができる (data not shown)。*Aurantiochytrium* 属は、ヤブレッツボカビ類の中でも、以下のようなことから、最も応用面において注目されているグループである：高い増殖速度、アスタキサンチンなどのカロテノイド色素、ドコサヘキサエン酸 (DHA) やスクワレンの生産 (Nakahara et al. 1996, Aki et al. 2003, Nakazawa et al. 2012)。*Aurantiochytrium* spp. は、栄養細胞が 2 分裂によって増殖するが、*T. globosum* はこの特徴をもっておらず、両者は明確に区別することができる (Raghukumar 1988a, Honda et al. 1998, Yokoyama and Honda 2007)。一方、これらの単系統性を支持する形質は認識されない。

ラビリンチュラ綱の 18S rRNA 遺伝子系統樹では、*Thraustochytrium* 属、狭義の *Schizochytrium* 属および *Ulkenia* 属の多系統性が示された。後者の 2 属については、以下のような過程で分類学的な再編成が行われた。まず、属の基準種の系統的な位置を決定し、次にそれぞれの系統群をまとめる形質の再検討を行い、最後に基準種を含む系統群を狭義のオリジナル属とし、他の系統群に対して新属が設立された (Yokoyama and Honda 2007, Yokoyama et al. 2007)。

*Thraustochytrium* 属は、18S rRNA 遺伝子系統樹では、少なくとも 7 つの系統に分かれることが示されてきた。基本的には、他の遺伝子による系統樹でも同様の結果となることが示されている。*Thraustochytrium* 属についても、分類学的再編成の検討が必要な状況である。しかしながら、基準種である *T. proliferum*

は、1936年に記載されて以来、何度か報告があるが、ex-type 株だけでなく、この種として同定されている株は公的な株保存施設には登録されておらず、分子系統学的な位置も不明である (Johnson 1957, Goldstein 1963a, Booth 1969, Sparrow 1969, Ulken 1970, Johnson 1974)。

上記の“基準種 *Thraustochytrium proliferum* について”で考察のように、本研究では *T. proliferum* の系統的位置を特定することはできなかった。しかしながら、*T. globosum* は、原基体を形成せず、胞子の放出時には鞭毛をもつ遊走細胞の形態をとることから、*T. proliferum* とは明確に区別される (表 4)。また、環境 DNA 解析から検出された系統群と、*T. globosum* とは離れて位置したため、少なくとも *T. proliferum* と *T. globosum* が同じ系統群となることは支持されている状況ではない。以上のことから、*T. globosum* は、*Thraustochytrium* 属から分割し、新属を設立する以下の分類学的な処置を行った。

## 分類学的措置

ストラメノパイル生物群 (Stramenopiles)

ラビリントモルガネラ綱 (Labyrinthulomycetes)

ヤブレッツボカビ目 (Thraustochytriales)

ヤブレッツボカビ科 (Thraustochytriaceae)

### ***Monorhizochytrium* K. Doi et D. Honda gen. nov.**

記載文：栄養細胞は、2 分裂を繰り返し、分裂した胞子が栄養細胞になる形態やアメーバ状細胞にならず、直接遊走子嚢になる。外質ネットは、海藻表面では、1 本で短くなる。液体培地では、外質ネットは分岐し、あまり発達しな

い。遊走子嚢は、一度に分裂を繰り返し、娘細胞を形成する。分裂した娘細胞は、2本の不等毛の鞭毛が生じ、遊走細胞となって、遊走子嚢の外に放出される。原基体は観察されなかった。d-GPY 液体培地において、栄養細胞が、2分裂を繰り返して、分裂した細胞が、それぞれ遊走細胞となる遊走細胞形成を行う。休眠細胞が観察されなかった。

Etymology (語源) : Mono = one, rhizo = rhizoid, chytrion = pot

Type species (基準種) : *Monorhizochytrium globosum* K. Doi et D. Honda comb. nov. (以下に示す)

Basionym (元名) : *Thraustochytrium globosum* Kobayasi et M. Ôkubo, Bulletin of the National Science Museum, Tokyo. 33: 61, 1953

この属と同定するための検索表を、表 5 に示した。

***Monorhizochytrium globosum* (Kobayasi et M. Ôkubo) K. Doi et D. Honda comb. nov.**

記載文 : 栄養細胞は、球形は楕円形、単心性、分実性で、大きさは 5.1–19.8  $\mu\text{m}$  である。遊走子嚢は、一度の細胞質分裂を介して、8–32 の娘細胞に分裂する。遊走細胞は、腎臓型で、鞭毛装置の腹部に 2–3 の粒状構造を持つ。寒天培地上での細胞形態は、六角形や八角形をしている。2–3 週間培養した栄養細胞の細胞質には、多くのオレンジ、または黄色がかっているオレンジ色をした顆粒を含んでいる。

Holotype (標準試料) : *T. globosum* の細胞が着生していた、緑藻 (Ulothricales) の乾燥標本 (Kobayashi and Ookubo 1953 で指定)。

タイプ標本は、国立科学博物館には存在していない（細谷，私言）したが  
って、*Monorhizochytrium globosum* (*Thraustochytrium globosum*) の論文図表の  
Lectotype（基準標本が失われた時に，新たに基準とする標本や図）指定を行っ  
た。

Lectotype（改めて決めた基準標本）：Bulletin of the National Science Museum,  
Tokyo 33: 61, Fig. 6, 1953

Epitype: 冷蔵保存した SEK 671 株：千葉，太海で分離された株。



## 第 2 章 *Aurantiochytrium* 属内の種レベルの分類

ヤブレッツボカビ科の 1 属, *Schizochytrium* 属は, 栄養細胞が 2 分裂を繰り返す, 複数の栄養細胞を生じさせる分裂様式を示す種が位置づけられてきた (Goldstein and Belsky 1964)。しかしながら, 18S rDNA 配列の分子系統解析において, この属に位置している種が, 少なくとも 3 つの系統群に分かれることが明らかとなり, 属の分類形質は系統を反映しない形態であることが示唆された (Honda et al. 1999)。そこで, Yokoyama and Honda (2007) によって, それぞれの系統群について詳細な形態比較を行ったところ, 遊走細胞の形状, 外質ネットの発達度合, 遊走細胞の形成における分裂様式など, 新しく取り上げた形態形質を組み合わせることによって特徴づけることができた。また, 脂肪酸組成やカロテノイド色素組成を新たな分類形質とし, それぞれを 3 属 (狭義の *Schizochytrium* 属, *Aurantiochytrium* 属, *Oblongichytrium* 属) に分割する分類学的再編成が行われた。*Aurantiochytrium* 属は, このときに新設された 2 属のうちの 1 属である。

この属には, *A. mangrovei* (S. Raghuk.) R. Yokoyama et D. Honda と *A. limacinum* (D. Honda et Yokochi) R. Yokoyama et D. Honda の 2 種が位置づけられている (Raghukumar 1988a, Honda et al. 1998)。また, 2 種と同定された株は, それぞれ *Aurantiochytrium* 属内に位置している。*A. limacinum* は, 形質が新種記載の論文に示された株 (ex-type 株) が保存されている。しかしながら, *A. mangrovei* と同定された株 (RCC 893) が存在するが, これは ex-type 株ではなく, 香港で新たに分離され, 同定された株である。さらに, この株の形態などの情報は, 公開されていない。また, この系統群内には, 種が未同定の株が多数存

在しており、属内は十分に整理されているとはいえない。したがって、本研究では、最初に、*A. mangrovei* の系統的位置を明らかにすることを目指した。

この種は、インド・ゴアで採取されたマングローブの葉から分離された (Raghukumar 1988b)。そこで、タイプ産地から分離された生物の中から、*A. mangrovei* の形態を示す株を探索した。次に、*Aurantiochytrium* 属内の詳細な系統解析を行い、単系統群を形成した株の詳細な観察を行い、属内の分類体系の整理を行った。

## 材料と方法

### タイプ産地から分離された株の選出

本多によって、インド・ゴアから 176 株の分離株が作製された (本多, 未発表)。これら全ての株の脂肪酸組成解析が行われ、分離株は 30 のグループにまとめられた (松本, 未発表)、グループ内の株の代表株の 18S rDNA の前半部分の配列 (約 600 bp) を決定し、系統樹を作成したところ、4 つの系統に分かれた (松本, 未発表)。本研究では、4 つの系統に分かれた株の形態を観察した。

### DNA 抽出と 18S rDNA 配列の決定

細胞は、15 ml チューブに d-GPY 液体培地を 5 ml 入れ、約 1 週間振とう培養したものを使用した。培養した細胞は 670 ×g, 5 分で遠心した。上澄み液を取り除き、沈殿物を 1.5 ml エッペンチューブに移した。当日 DNA 抽出を行わない場合は、このまま -20°C 冷凍庫で保存した。

DNA 抽出は、CTAB 法を使用した (Murray and Thompson 1980)。抽出後、

DNA の純度や濃度は、Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で測定した。濃度が濃い場合は、約  $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  になるよう、MilliQ 水で希釈した。18S rDNA 配列 (約 1800 bp) の増幅は、PCR 反応を使用した。PCR 反応は、TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (Takara, Ohtsu, Japan) を使用した。プライマーは、SR01 (Nakayama et al. 1996), SR12L1 (Ueda et al. 2015) を使用した。目的配列の増幅確認は、電気泳動を使用した。PCR 反応物の精製は、Illustra ExoProStar (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) を使用した。DNA の配列決定は、BigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で行い、PRISM 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用した。配列決定は、北海道システムサイエンス株式会社に依頼した。

## クローニング

配列決定を行い、18S rDNA 配列が多型 (波形データが重なり、配列が読めなくなる) になったとき、TA クローニング法を使用して配列決定を行った。ベクターへのライゲーション反応は、TaKaRa Mighty TA-cloning Kit 6028 (Takara, Ohtsu, Japan) を使用した。形質転換を行う大腸菌は TaKaRa *E. coli* HST08 Premium Competent Cells 9128 (Takara, Ohtsu, Japan) を使用した。ベクター内に目的とする配列が挿入されたかは、コロニーPCR 法で確認した。PCR 反応は、Quick Taq® HS DyeMix (Toyobo, Osaka, Japan) を使用した。目的の配列が確認できた大腸菌は、15–17 時間培養し、ベクターを抽出した。ベクターの抽出は、Mini prep 法で抽出、精製した。DNA の配列決定は、BigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で行い、PRISM 3730 DNA

analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用した。配列決定は、北海道システムサイエンス株式会社に依頼した。

## 系統解析

*Aurantiochytrium* 属内の系統関係を詳細に把握するため、以下のような手順で作業を行った。1) Genbank に登録されている配列を生物ごとに種類分けしているサイト Silva (<https://www.arb-silva.de/>) から、ラビリンチュラ綱 (Labyrinthulomycetes) と同定された配列をダウンロードした (SSU r126, 1801 配列)。2) 系統群数の把握のため、Mega 6.06 を使用し、1000 bp 以下の配列を除外した。3) 全ての配列を、mafft を使用して、アライメントを行った。配列は 18S rDNA なので、ホモロジーを重視した設定でアライメントを行った (G-INS-I alignment) (Kato et al. 2002)。4) アライメントファイルは、phylogears2 を使用して、PHYLIPex ファイルに変換し、「raxmlGUI」を使用して、系統樹を作成した (ML + rapid bootstrap, GTRGAMMAI, Bootstrap : 500) (Tanabe 2008, Silvestro and Michalak 2012)。上記のように作成した系統樹の OTU を属内のみにし、簡略化した系統樹を図 7 に示した。

## 形態観察

培地は、海水+松花粉 培地 (Raghukumar 1988a), d-GPY 培地 (Ueda et al. 2015) を使用した。観察手順は以下の通りである。1) 細胞は、15 ml フェルコンチューブに d-GPY 液体培地を 5 ml 入れ、3 日間静置培養した。2) 静置培地しておいた細胞を約 0.5 ml 取り、d-GPY 寒天培地に塗布し、3 日間培養した。3)

培養後、滅菌海水を加え、遊走細胞を誘発した。4) 遊走細胞が一定量（顕微鏡を覗いて、約 100 細胞ほど見える程度）放出されたら、1.5 ml ファルコンチューブに、遊走細胞入りの滅菌海水を 1 ml 取り、670 ×g、1 分で遠心した。5) 上澄み液を約 0.5 ml 取り、0.5 ml の滅菌海水を加え、約 1 分静置した。6) 静置後、上澄み液を約 0.5 ml 取り、0.5 ml の滅菌海水を加えた。この液を培養液とした。シャーレでの培養では、培地を 10 ml 入れ、培養液を 0.5 ml 入れて培養した細胞をスライドガラスに移し、観察を行った。チャンバーの培養は、培地を約 1 ml 入れ、培養液を 2-3 滴入れて、培養を行った。

## 結果

### タイプ産地から分離された株の選出

インド、ゴアから分離された代表株は、それぞれ 4 つの系統群 (*Aurantiochytrium* sp. 1, *Aurantiochytrium limacinum*, *Parietichytrium* sp., *Schizochytrium* sp.) に位置している (松本, 未発表)。栄養液体培地において、*Aurantiochytrium* sp. 1 に位置した株 (SEK 414) は、栄養細胞が 2 分裂を繰り返し、分裂した細胞が栄養細胞になるという形態、栄養細胞が 2 分裂を繰り返し、分裂した細胞が遊走細胞になるという形態、多核の遊走子嚢が一度に細胞質分裂を起こし、分裂した細胞が遊走細胞になるという、*A. mangrovei* の特徴を示した (図 8)。*A. limacinum* に位置した株は、栄養細胞が 2 分裂を繰り返し、分裂した細胞が栄養細胞になるという形態、多核の遊走子嚢が一度に細胞質分裂を起こし、分裂した細胞が遊走細胞になるという形態を示した (data not shown)。*Parietichytrium* sp. に位置した株は、*Parietichytrium* 属の特徴を示した。多核の遊

走子嚢が一度に細胞質分裂を起こし、分裂した細胞が遊走細胞になるという *Parietichytrium* 属に見られる形態を示した (data not shown)。 *Schizochytrium* sp. に位置した株は、栄養細胞が 2 分裂を繰り返し、分裂した細胞が栄養細胞になるという形態、多核の遊走子嚢が一度に細胞質分裂を起こし、分裂した細胞が遊走細胞になるという、 *Schizochytrium* 属の形態を示した (data not shown)。

## 系統解析

タイプ産地から採取された株の配列と、新たに DNA 解析を行った配列の系統的位置を把握するために使用した OTU 数は 22、配列数は N や Gap を含めた 1547 配列であった (図 7, 表 6)。

Yokoyama and Honda (2007) において、 *Aurantiochytrium* 属と同定された株が含まれる系統群は、100%の bootstrap 値で単系統性を支持した (図 7)。系統群内で、95%以上の bootstrap 値を示し、単系統群を形成したのは、1) *A. limacinum* のタイプ株 (ATCC MTA-1381) を含む系統群 (以下より、 *A. limacinum* を含む系統群と略する)、2) *A. mangrovei* の形態を示した株を含む系統群 (以下より、 *A. mangrovei* を含む系統群と略する)、3) 種名が同定されていない株を含む系統群 (以下より、「未同定株を含む系統群」と略する) であった。

## 3つの系統群に位置する形態観察

本研究では、以下の株の形態観察を行った。 *A. limacinum* を含む系統群の 4 株 (ATCC MTA-1381, RCC 893, SEK 398, mh0186)、 *A. mangrovei* の形態を示した株を含む系統群の 3 株 (SEK 414, SEK 217, ATCC 20888)、未同定株の

系統群の3株 (SEK 605, ATCC 26185, SEK 243)。全ての結果は、表7にまとめられた。

*A. mangrovei* の形態を示す株を含む系統群の3株は、全ての培地で以下の形態が観察された。遊走細胞の形は卵形であり、遊走細胞は、着生後、丸くなり栄養細胞になった (図 8J-M, 図 9P)。栄養細胞は、分岐する外質ネットを放出した (図 8K)。遊走細胞と栄養細胞の大きさは培地条件によって、大きさに多少の違いがあることが分かった。海水+松花粉 培地, d-GPY 培地における *A. mangrovei* を含む系統群の4株の遊走細胞の大きさはそれぞれ, SEK 414 では  $3.3-5.2 \times 2.2-3.5 \mu\text{m}$ ,  $3.7-5.7 \times 2.2-3.8 \mu\text{m}$ , SEK 217:では  $3.7-5.9 \times 2.1-3.8 \mu\text{m}$ , ATCC 20888:では  $3.9-5.1 \times 2.3-3.7 \mu\text{m}$ ,  $4.1-5.8 \times 2.9-4.1 \mu\text{m}$  であった (図 10)。海水+松花粉 培地, d-GPY 培地における栄養細胞の大きさはそれぞれ, SEK 414 では  $4.1-14.5 \mu\text{m}$ ,  $5.2-18.2 \mu\text{m}$ , SEK 217 では  $4.4-15.5 \mu\text{m}$ ,  $5.5-20.2 \mu\text{m}$ , ATCC 20888 では  $4.6-13.3$ ,  $5.5-22.2 \mu\text{m}$  であった。栄養細胞は、2分裂を繰り返して、分裂した細胞は、栄養細胞になるという形態を示した (図 8A-E)。また栄養細胞は、成長し、多核の遊走子嚢になる (図 8F, 図 9F, Q-R)。最初に、胞子を形成するために、遊走子嚢の細胞質に複数の分裂面が形成され、複数の胞子に分かれる。分裂する際に、胞子は鞭毛を生じていない (図 8G-H, 図 9G-I)。胞子は、分裂後に鞭毛を生やし、遊走子嚢の壁を破って、細胞外に放出される (図 8I, 図 9J)。また d-GPY 培地, 海水+松花粉 培地において、栄養細胞が2分裂を繰り返して、分裂した細胞が、遊走細胞になるという形態が観察された (図 8A-E, 図 9A-E)。最初に、栄養細胞が2分裂を介した分裂を行う (図 8B, 図 9B)。次に分裂した細胞が、2分裂を2回繰り返し、8つの胞子を形成する (図

8C-D, 図 9C-D)。その後各胞子は鞭毛を生やし、遊走細胞となり、泳いでいった (図 8E, 図 9E)。d-GPY 培地において、栄養細胞はアメーバ状細胞に変化した (図 8K-M, 図 11)。最初に栄養細胞が、仮足を伸ばして、培地上を運動した (図 11)。アメーバ状細胞は、約 1 時間~2 時間運動したあと、球状の栄養細胞に戻った (図 9M)。その後、栄養細胞が遊走子嚢になり、細胞質で一度に分裂した後、それぞれが遊走細胞となった (図 9M-O)。

*A. limacinum* を含む系統群の 4 株は、全ての培地で以下の形態が観察された。遊走細胞は卵形で、着生した後丸くなって栄養細胞に変化した (図 12U-X)。また、遊走細胞と栄養細胞の大きさは培地条件によって、若干のズレが生じることが分かった。海水+松花粉 培地, d-GPY 培地における *A. limacinum* を含む系統群の 4 株の遊走細胞の大きさはそれぞれ、ATCC MTA-1381 では  $4.2-6.8 \times 2.2-4.7 \mu\text{m}$ ,  $4.6-7.9 \times 2.6-5.1 \mu\text{m}$ , RCC 893 では  $4.2-6.8 \times 2.2-4.7 \mu\text{m}$ ,  $4.6-8.8 \times 3.1-5.3 \mu\text{m}$ , SEK 398 では  $4.4-8.4 \times 2.9-5.6 \mu\text{m}$ ,  $4.0-8.2 \times 2.9-5.3 \mu\text{m}$ , mh0186 では  $3.6-6.8 \times 2.7-4.6 \mu\text{m}$ ,  $4.1-7.4 \times 2.7-4.6 \mu\text{m}$  であった (図 10)。海水+松花粉 培地, d-GPY 培地における栄養細胞の大きさはそれぞれ、ATCC MTA-1381 では  $5.4-16.5 \mu\text{m}$ ,  $5.2-20.5 \mu\text{m}$ , RCC 893 では  $5.5-17.5 \mu\text{m}$ ,  $5.8-21.5 \mu\text{m}$ , SEK 398 では  $5.2-18.5 \mu\text{m}$ ,  $6.1-22.0 \mu\text{m}$ , mh0186 では  $5.2-17.0$ ,  $5.7-21.1 \mu\text{m}$  であった。栄養細胞は、分岐する外質ネットを細胞外に放出した。栄養細胞は 2 分裂を繰り返し、分裂した細胞は、栄養細胞になるという形態を示した (図 12P-T)。また栄養細胞は成長し、多核の遊走子嚢になる (図 12A)。最初に、胞子を形成するために、遊走子嚢の細胞質に複数の分裂面が形成され、複数の胞子に分かれる (図 12B-C)。分裂する際に、胞子は鞭毛を生やしていない。胞



子は、分裂後に鞭毛を生やし、遊走子嚢の壁を破って、細胞外に放出される (図 12D)。d-GPY 培地において、栄養細胞はアメーバ状細胞に変化した (図 11, 図 12J-O)。最初に栄養細胞が、仮足を伸ばして、培地上を運動した (図 11)。アメーバ状細胞は、約 1 時間~2 時間運動したあと、球状の栄養細胞に戻った (図 12M)。その後、栄養細胞が遊走子嚢になり、細胞質で一度に分裂した後、それぞれが遊走細胞となった (図 12N-O)。

未同定株を含む系統群の 3 株は、全ての培地で以下の形態が観察された。遊走細胞は卵形であり、遊走細胞は、着生後、丸くなり栄養細胞になった (図 13L, 図 14Q)。栄養細胞は、分岐する外質ネットを放出した (図 13M)。遊走細胞と栄養細胞の大きさは培地条件によって、大きさに若干の変化があることが分かった。d-GPY 培地における未同定株を含む系統群の 3 株の遊走細胞の大きさはそれぞれ、SEK 605 では  $3.1-5.8 \times 2.2-3.5 \mu\text{m}$ ,  $3.5-5.9 \times 2.2-3.8 \mu\text{m}$ , SEK 243 では  $3.0-4.8 \times 2.0-3.2 \mu\text{m}$ ,  $3.2-5.2 \times 2.1-3.5 \mu\text{m}$ , ATCC 26185:では  $3.9-5.1 \times 2.3-3.7 \mu\text{m}$ ,  $4.1-5.8 \times 2.9-4.1 \mu\text{m}$  であった (図 10)。海水+松花粉 培地, d-GPY 培地における栄養細胞の大きさはそれぞれ, SEK 605 では  $4.5-13.5 \mu\text{m}$ ,  $5.2-20.5 \mu\text{m}$ , SEK 243 では  $4.0-15.5 \mu\text{m}$ ,  $4.8-21.0 \mu\text{m}$ , ATCC 26185 では  $4.4-15.3$ ,  $5.0-22.9 \mu\text{m}$  であった。栄養細胞は 2 分裂を繰り返し、分裂した細胞は栄養細胞になるという形態を示した (図 13E-H)。また栄養細胞は成長し、多核の遊走子嚢になる (図 13A, 図 14F)。最初に、胞子を形成するために、遊走子嚢の細胞質に複数の分裂面が形成され、複数の胞子に分かれる (図 13B-C, 図 14G-H)。分裂する際に、胞子は鞭毛を生やしていない。胞子は、分裂後に鞭毛を生やし、遊走子嚢の壁を破って、細胞外に放出される (図 13D, 図 14I)。また d-GPY 培

地において、栄養細胞が 2 分裂を繰り返して、分裂した細胞が、遊走細胞になるという形態が観察された (図 14A-E)。最初に、栄養細胞が 2 分裂を介した分裂を行う (図 14A-B)。次に分裂した細胞が、2 分裂を 2 回繰り返して、8 つの胞子を形成する (図 14C-D)。その後各胞子は鞭毛を生やし、遊走細胞となり、泳いでいった (図 14E)。d-GPY 培地において、栄養細胞はアメーバ状細胞に変化した (図 14J-N, 図 11)。最初に栄養細胞が、不定形の細胞に変化した、培地上を運動しなかった (図 14K)。アメーバ状細胞は、約 1 時間~2 時間運動したあと、球状の栄養細胞に戻った (図 14L)。その後、栄養細胞が遊走子嚢になり、細胞質で一度に分裂した後、それぞれが遊走細胞となった (図 14M-N)。全ての系統群の株の形態を表 7 にまとめた。

## 考察

本研究では、*A. mangrovei* の形態を示す株 (SEK 414) を発見することに成功した。*A. mangrovei* は、以下の形態形質で特徴づけられる：1) 松花粉+海水 培地で、栄養細胞が 2 分裂を繰り返して分裂し、それぞれが遊走子になる、2) 栄養液体培地において、栄養細胞が不定形になり、その後 2 分裂を繰り返して、分裂し、それぞれの細胞が遊走細胞になる (Raghukumar 1988a)。松花粉+海水 培地で観察を行ったところ、SEK414 株は、*A. mangrovei* の特徴を示した。また、栄養液体培地 (d-GPY) でも、*A. mangrovei* の特徴を示した。さらに、遊走細胞の大きさも原記載と一致していたことから、この株を *A. mangrovei* と同定した。

また、本研究で形態観察を行った 2 つの培地で、SEK 414 株は、「栄養細胞が多核の遊走子嚢になり、一度に分裂を行った後、それぞれの細胞が遊走細胞

となる遊走子形成」を示した。これは、これまで記載されたヤブレッツボカビ類の種で一般的に見られる遊走子形成である。この形態が観察されたことによって、同種となる生物（シノニム）が存在するかを検証したが、存在しなかった。

さらに、栄養液体培地で、SEK414 株は、「栄養細胞が、仮足を発達させるアメーバ状細胞になり、培地上を動き回った後に、栄養細胞に戻る」という形態が観察された。この形態は、これまで、「*Aurantiochytrium limacinum*」, 「*Thraustochytrium gaertnerium*」のみで観察された、珍しい形態である (Honda et al. 1998, Bongiorno et al. 2005)。3 者は、18S rDNA 配列による系統関係で明確に区別でき、*A. mangrovei* を特徴づける形態で両者を区別できることから、この形質がこれらの近縁性を示すものではないと考えられる。しかしながら、この特徴は、他の形質と組み合わせることで、*A. mangrovei* の分類学的形質となると判断されたため、種の定義の訂正を行った。

18S rDNA 配列による系統解析において、*Aurantiochytrium* 属は、1) *A. mangrovei* の形態を示す株 (SEK 414) を含む系統群、2) *A. limacinum* のタイプ由来株 (ATCC MTA-1381) を含む系統群、3) 種が未同定とされた株が位置する系統群に分かれた。そのうち、*A. mangrovei* の形態を示した SEK 217 株、ATCC 20888 株は、*A. mangrovei* の形態を示す株 (SEK 414) を含む系統群に位置し、*A. limacinum* の形態を示した SEK399 株、mh0186 株、RCC 893 株は、*A. limacinum* のタイプ由来株を含む系統群に位置した。したがって、それぞれの単系統群が、*A. mangrovei*, *A. limacinum* の種のまとまりであることが考えられた。

「種が未同定とされた株が位置する系統群」に位置した株 (SEK 243, SEK 605, ATCC 26185) の形態は同じであり、既知種 2 種と、1) 遊走子形成様式、

2) アメーバ状細胞の形態や運動性，という形態で，違いが見られた。

まず，遊走子形成様式の違いとは，松花粉+海水 培地では，「栄養細胞が多核の遊走子嚢になり，一度に分裂を行った後，それぞれの細胞が遊走細胞となる遊走子形成」のみであったが，栄養液体培地では，「栄養細胞が 2 分裂を繰り返して分裂し，それぞれが遊走子になる遊走子形成」も観察されるというものである。これらの遊走子形成は，*Aurantiochytrium* 属の既知種で観察される形態である (Raghukumar 1988a, Honda et al. 1998)。また，この現象は，培地によって見られる形態が変化するだけなので，この生物が持っている潜在能力が変化しているものではない。したがって，この生物は 2 種類の遊走子形成を行う能力を持っていると考えられるため，この形態で，既知種と明確に区別することは困難であると判断した。ただ，この特徴は，他の形質と組み合わせることで，「種が未同定とされた株が位置する系統群」の分類形質となると判断したため，種の定義に加えた。

一方，アメーバ状細胞の形態は，「仮足をほとんど伸ばさず，運動性を示さない」というものであった。既知種は，仮足を伸ばし，培地上を運動するという形態を示した。アメーバ類では，仮足を複数伸ばすか 1 本で，属が分けられているなど，仮足の形態が，分類体系に重要であると考えられてきた (Smirnov et al. 2005, 2011)。仮足の数が変化する機構については，まだ未解明だが，既知種と「種が未同定とされた株が位置する系統群」のアメーバ状細胞は，他の生物と比べても，違った形態であることが考えられた。したがって，この形態で，既知種と明確に区別できると判断した。

さらに，遊走細胞の大きさは，*A. mangrovei* と同じような値であったが，

*A. limacinum* より小さかった。この差は、ANOVA（分散分析）解析を行った結果、差があることが示された（data not shown）。したがって、遊走子の大きさは、*A. limacinum* と他の生物を見分けるための形態として使用できることが考えられた。

*Aurantiochytrium* 属は、「外質ネットが発達しにくい」、「脂肪酸組成はアラキドン酸が少なく、ドコサヘキサエン酸（DHA）が多い」、「アスタキサンチンまでの色素をもつ」、「栄養細胞が、連続した2分裂を繰り返す増殖様式を示す」ことで特徴づけられる（Yokoyama and Honda 2007）。これらの特徴は、今回観察した生物株においても、観察された。これらの形態を含んだ上で、「遊走子形成様式」、「遊走子の大きさ」、「アメーバ状細胞の形態と運動性」を組み合わせることで、3者を区別することができた。したがって、「種が未同定とされた株が位置する系統群」は種のまとまりであると考えられ、既知種と明確に区別できる形態を持つことから、この系統群に対し、新種を設立した。

## 分類学的措置

ストラメノパイル生物群（Stramenopiles）

ラビリンチュラ綱（Labyrinthulomycetes）

ヤブレッツボカビ目（Thraustochytriales）

ヤブレッツボカビ科（Thraustochytriaceae）

***Aurantiochytrium immobile* K. Doi et D. Honda sp. nov.**

記載文：栄養細胞は、球状で、単心性、分実性で、大きさは、4.5–20.5  $\mu\text{m}$  である。遊走細胞は、卵形で、大きさは、3.1–5.9  $\times$  2.2–3.8  $\mu\text{m}$  である。d-GPY 培地

において、栄養細胞は、連続した 2 分裂を繰り返し、分裂した細胞が直接遊走細胞になるという遊走細胞形成様式を示す。また、希に栄養細胞は、運動性を示さないアメーバ状細胞になり、着生する。着生した後、多核の遊走子嚢になり、一度に細胞質分裂を行い、分裂した細胞がそれぞれ遊走細胞になって、遊走子嚢から放出される。

**Holotype** (ホロタイプ) : 冷蔵保存した SEK605 株 : 夙川河口で分離された株。

**Etymology** (語源) : im=not, mobile=mobile

## 総合考察

従来のヤブレッツボカビ科の属は、形態的特徴（例えば、栄養細胞が、2 分裂を繰り返して増殖する、アメーバ細胞を形成する）を分類形質として、まとめられていた（Sparrow 1936, Kobayashi and Ookubo 1953, Goldstein and Belsky 1964, Bahnweg and Sparrow 1972, Perkins 1973a, Gaertner 1977）。しかしながら、分子系統樹において、いくつかの属が多系統群を形成したことから、これまで考えられてきた属は、自然分類群ではないことが強く示唆された（Honda et al. 1999）。それ以降、多系統群を形成している属に対して、分類学的な検討が行われ、細胞形態や、新たに注目した高度不飽和脂肪酸の組成とカロテノイド色素、系統関係を総合的に考慮し、各属の基準種が位置する系統群を狭義の属とし、その他を全て新属とする措置がなされた（Yokoyama and Honda 2007, Yokoyama et al. 2007）。これらの措置で採択された分類形質は、それぞれの属のみが単独で持つ、いわゆる共有派生形質を持つものもいたが、多くはこれまでヤブレッツボカビ科で注目されていた細胞形態の有無や発達具合などを組み合わせたものとなっている。

本研究で注目した、*Monorhizochytrium globosum* (former *Thraustochytrium globosum*) は、「原基体を残さない」、「遊走子嚢内で遊走細胞が形成される」という形態が、本種の前に記載された基準種 (*T. proliferum*) と区別できたことから、*Thraustochytrium* 属の新種として記載された（Kobayashi and Ookubo 1953）。しかしながら、本種は *Thraustochytrium* 属内の種と区別されるだけでなく、他属とも下記のような属レベルの相違点が見受けられた。まず、「原基体を残さない」、「遊走子嚢内で、遊走細胞を形成して放出される」という特徴は同じであるが、「栄

養細胞が2分裂を繰り返して増殖しない」、「アメーバ細胞を形成しない」という特徴で *Aurantiochytrium* 属と区別できる。また、「原基体を残さない」、「アメーバ細胞を形成しない」という特徴は同じであるが、「栄養細胞が2分裂を繰り返して増殖しない」、「遊走子放出後に、細胞壁を残さない」という特徴で *Schizochytrium* 属と区別できる。「栄養細胞が2分裂を繰り返して増殖しない」、「遊走子放出後に、細胞壁を残さない」という特徴は同じだが、「アメーバ細胞を形成しない」、「原基体を残さない」という特徴で *Sicyoidochytrium* 属と区別することができる。また、「栄養細胞が2分裂を繰り返して増殖しない」、「遊走子嚢内で、遊走細胞を形成して放出される」という特徴は同じであるが、「アメーバ細胞を形成しない」、「遊走子放出後に、細胞壁を残さない」という特徴で *Parietichytrium* 属と区別することができる。「栄養細胞が2分裂を繰り返して増殖しない」、「原基体を残さない」という特徴は同じであるが、「アメーバ細胞を形成する」という特徴で *Botryochytrium* 属と区別することができる。また、*M. globosum* と同じ特徴を持たないが、「アメーバ細胞を形成しない」という特徴で *Ulkenia* 属と区別することができる。また、「栄養細胞が2分裂を繰り返して増殖しない」、「原基体を有しない」という特徴は同じであるが、「包囊（膨らんだ外質ネット）を形成しない」という特徴で、*Japonochytrium* 属と区別することができる（表4）。

本研究では *M. globosum* と同定できる生物株を発見し、系統的位置を決定した。この生物株は、単系統群を形成しているヤブレッツボカビ科の属内には位置せず、属、種が未同定とされた系統群に位置した。また、この系統群と、ヤブレッツボカビ科の他属との遺伝的距離（substitutions / site）を測定すると、



*Aurantiochytrium* 属とは 0.103, *Schizochytrium* 属とは 0.252, *Sicyoidochytrium* 属とは 0.218, *Parietichytrium* 属とは 0.198, *Ulkenia* 属とは 0.178, *Botryochytrium* 属とは 0.182 となり, 平均値は 0.187 であった (Ueda et al. 2015 の系統樹より算出)。一方, ヤブレッツボカビ科の属同士の遺伝的距離を測定し, それぞれの平均値を算出すると, 0.135–0.193 となる。この結果は, これまで形態のみでヤブレッツボカビ科の属と同レベルであると考えられてきた *M. globosum* の系統関係が明らかになり, 遺伝的距離を比べた場合にもおいても, 現在のヤブレッツボカビ科の属と同レベルであることを明らかにした。

現在, 系統的 position が判明している *Thraustochytrium* 属の種は, 8 種 (*T. pachydermum*, *T. aureum*, *T. roseum*, *T. aggregatum*, *T. kinnei*, *T. striatum*, *T. gaertnerium*, *T. caudivorum*) である。これらの種のうち, *T. aureum* と *T. roseum* は同じ単系統群内に位置し, その他の生物はそれぞれ単系統群を形成している。単系統群を形成している *Thraustochytrium* 属の種の系統群と, ヤブレッツボカビ科の属との遺伝的距離を測定し, それぞれの平均値を算出すると, 0.115–0.197 となった (Ueda et al. 2015 の系統樹より算出)。したがって, *Thraustochytrium* 属の種を含む系統群は, それぞれヤブレッツボカビ科の属と同レベルであることが考えられた。

また, 多系統群を形成している *Thraustochytrium* 属の種は *Thraustochytrium* 属内の種と区別されるだけでなく, 他属とも下記のような属レベルの相違点が見受けられる (表 4)。したがって, *T. aureum* の記載論文に書かれた形態は, 現在のヤブレッツボカビ科の属の細胞形態の特徴である, 複数の形態を組み合わせることによって比較できることから, 属と同レベルであることが考えられた。

一方で、同じ単系統群に位置している *T. aureum* と *T. roseum* の形態は、それぞれ属レベルであるが、遺伝的距離は、0.001 しか離れていない (Ueda et al. 2015 の系統樹より算出)。この結果は、2 種の遺伝的距離は、ヤブレッツボカビ科の属には相当しないことを示している。しかしながら、*T. roseum* のタイプ由来株 (ATCC 28210) は存在しており、この生物株の形態観察を行ったところ、原基体を有することが明らかとなった (data not shown)。また、遊走子形成様式も、*T. aureum* に類似していることが分かっている (data not shown)。したがって、これらの種については、今後、シノニム、もしくは同属の種となることが考えられた。

このように、現在多系統群を形成している *Thraustochytrium* 属の種は、形態、遺伝的距離を考慮しても、現在のヤブレッツボカビ科の属に相当することが考えられた。今後、これらの種に対して分類学的な検討が行われることが考えられるが、ある種として同定された株と、その種と同じ系統に位置する未同定の生物に対して、さまざまな培養条件下での観察結果を総合的に考慮し、必要に応じて、分類学的な措置を行うことが必要となるだろうと思われる。

ヤブレッツボカビ科の種は、これまで、生活史に見られる形態形質 (例えば、遊走細胞の大きさや、栄養細胞の大きさ) から、特徴づけられていた。しかしながら、これらの形態は、本論文および Booth and Miller 1968 によって明らかになったように、培養条件によって変化しやすい。また、多くの属が多系統群を形成していることが明らかになり、属の再編がこれまで進められていたため、種と系統関係を考慮した研究は、これまで行われてこなかった。

そこで、本研究では、単系統群を形成している *Aurantiochytrium* 属内の生

物株に注目した。この系統群内は、少なくとも 3 つの単系統群からなることが明らかになった。また、それぞれの系統群の株は、「遊走細胞の大きさ」、「アメーバ細胞の形態や運動性」から、各系統群を区別できた。さらに、これらの生物株は、全て *Aurantiochytrium* 属の特徴である「外質ネットが発達しにくい」、「栄養細胞の大きさが小さい」という形態、「高度不飽和脂肪酸組成では、アラキドン酸が少なく、DHA が多い」を示すことから、本研究では、それぞれの系統群を種と捉え、1 新種に伴う分類学的な措置を行った。この結果は、現在のヤブレッツボカビ科の属と認識された系統群内に位置し、単系統群を形成する生物株を詳細に観察することで、それぞれを特徴づける形態が見らえることを示した初めての例である。

これまでに、*Aplanochytrium* 属系統群内の系統関係と形態を把握した論文が公開されている (Leander et al. 2004)。この論文では、*Aplanochytrium* 属内に位置する生物株を詳細に観察し、この属内が「コロニーの発達具合」で、大きく分けて 2 つの系統群に分かれることを示した。しかしながら、この論文では、2 つの系統群を属や種とする分類学的な措置は行われず、それぞれがグループであることを示したのみであった。ヤブレッツボカビ科の属は、複数の形態を組み合わせることで、属が特徴づけられている。また、種に関しても、同様であることが本研究で明らかとなった。したがって、形態と系統関係で区別できる *Aplanochytrium* 属のグループに対して、分類学的な措置を行うことが必要であると思われる。

また、ヤブレッツボカビ科の遺伝的距離 (substitutions / site) が長いことは、多くの論文で述べられている (例えば, Anderson and Cavalier-Smith 2012)。今回、

種として認識した系統群間の 18S rDNA 配列による遺伝的距離を測定すると、最小が 0.042，最大で 0.094 であった（図 7 から算出）。さらに、タンパク質などの情報を加えることで、この枝長はさらに長くなることが分かっている（関本 未発表）。

一方で、遊走子形成様式などで属が分かれていた卵菌綱に位置する種の遺伝的距離を計測したところ、*Lagenidium* 属の 5 種の 18S rDNA による遺伝的距離の最小は 0.0065，最大は 0.025（Hakariya et al. 2009 より算出），*Newbya* 属では 0.0025（Spencer et al. 2002 より算出）であり，18S rDNA 配列は，種内の変異が少ない。しかしながら，同様の形態形質で区別されるサブロゲニア科の種の遺伝的距離に比べても，ヤブレッツボカビ科の種の遺伝的距離は大きい。他の分類群の種間の遺伝的な相違となるような分類体系が，形態形質が乏しいことによって，ヤブレッツボカビ科では整理されていない可能性がある。

これまで，多くの生物，特に微細藻類や菌類では，系統関係が明らかになって以降，さまざまな属が多系統群を形成することが明らかとなってきた。例えば，ヤブレッツボカビ科に近縁である卵菌綱 *Pythium* 属や，*Achyla* 属，系統的に離れている *Euglena* 属では，多くの属が多系統群を形成したが，自然分類を目指し，細胞形態や微細構造を改めて観察し，それぞれの属を特徴づける形態と系統関係を考慮して，それぞれを分割する分類学的な措置が行われている（Spencer et al. 2002， Marin et al. 2003， Uzuhashi et al. 2010）。今後も，多系統群を形成している生物群で，このような分類学的な措置が行われていくと思われる。

## 謝辞

本研究を行うきっかけを与えてくださり、また研究者としてのあり方、分類学者としてのスタンスについて、親切丁寧なご指導をいただきました甲南大学 理工学部 生物学科 本多 大輔 教授に心より深く感謝申し上げます。本論文は、著者が甲南大学 理工学部 生物学科 4 回生の卒業研究から、同大学院 自然科学研究科 生物学専攻 修士課程、同大学院 自然科学研究科 生命・機能科学専攻 博士後期課程の在学期間中に行った研究である。そして、本論文をご精読いただき、貴重なご意見を賜りました、甲南大学 理工学部 生物学科 日下部 岳広 教授、渡辺 洋平 准教授、久原 篤 准教授、後藤 彩子 講師、同大学 理工学部 機能分子化学科 岩月 聡史 教授、木本 篤志 准教授に深く感謝申し上げます。

そして、ラビリンチュラ類を分離するためのハネモをご提供いただき、また副論文を *Phycological Research* 誌に投稿した際に、Communicating Editor としての貴重なご意見やご指導を賜りました、福井県立大学 海洋生物資源学部 海洋生物資源学科 神谷 充伸 教授、室蘭にて、ラビリンチュラ類を分離するためのハネモの採取にご助力いただきました、北海道大学 北方生物圏フィールド科学センター 水圏ステーション 室蘭臨海実験所、次世代シーケンサーMiseq の操作法、ならびにデータの解析について、ご指導賜りました、国立研究開発法人 理化学研究所 環境資源科学研究センター バイオマス工学研究部門 バイオマス研究基盤チーム 守屋 繁春 専任研究員、アメリカでのサンプリングの際、ご助力いただきました、Stony Brook 大学 School of Marine and Atmospheric Sciences, Jackie L. Collier 博士に深く感謝申し上げます。

最後になりましたが、共に研究を行い、熱い議論を交わした系統分類学研究室の皆様へ感謝いたします。また、これまで私を温かく見守り、支援して下さいました両親に心より感謝いたします。

## 引用文献

- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E. *et al.* 2012. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* **59**: 429–93.
- Aki, T., Hachida, K., Yoshinaga, M. *et al.* 2003. Thraustochytrid as a potential source of carotenoids. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **80**: 789–94.
- Alderman, D. J., Harrison, J. L., Bremer, G. B. and Jones, E. B. G. 1974. Taxonomic revisions in the marine biflagellate fungi: the ultrastructural evidence. *Mar. Biol.* **25**: 345–57.
- Anderson, O. R. and Cavalier-Smith, T. 2012. Ultrastructure of *Diplophrys parva*, a new small freshwater species, and a revised analysis of Labyrinthulea (Heterokonta). *Acta. Protozool.* **51**: 291–304.
- Artemtchuk, N. J. 1972. The fungi of the White Sea. III. New Phycomycetes, discovered in the great Salma Strait of the Kandalakshial Bay. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.* **13**: 231–7.
- Bajpai, P., Bajpai, P. K. and Ward, O. P. 1991a. Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium aureum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 706–10.
- Bajpai, P. K., Bajpai, P. and Ward, O. P. 1991b. Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *J. Am. Oil Ch.* **68**: 509–14.
- Bahnweg, G. 1979a. Studies on the physiology of thraustochytriales I. Growth requirements and nitrogen nutrition of *Thraustochytrium* spp., *Schizochytrium* sp., *Japoochytrium* sp., *Ulkenia* spp., and *Labyrinthuloides* spp. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.* **17**: 245–68.
- Bahnweg, G. 1979b. Studies on the physiology of thraustochytriales II. Carbon nutrition of *Thraustochytrium* spp., *Schizochytrium* sp., *Japoochytrium* sp., *Ulkenia* spp., and *Labyrinthuloides* spp. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.* **17**: 269–73.



- Bahnweg, G. and Sparrow, F. K. 1972. *Aplanochytrium kerguelensis* gen. nov. spec. nov., a new Phycomycete from subantarctic marine waters. *Arch. Microbiol.* **81**: 45–9.
- Bahnweg, G. and Sparrow, F. K. 1974. Four new species of *Thraustochytrium* from Antarctic regions, with notes on the distribution of zoosporic fungi in the Antarctic marine ecosystems. *Amer. Jour. Bot.* **61**: 754–66.
- Barr, D. J. S. and Allan, P. M. E. 1985. A comparison of the flagellar apparatus in *Phytophthora*, *Saprolegnia*, *Thraustochytrium*, and *Rhizidiomyces*. *Can. J. Botany.* **63**: 138–54.
- Bongiorni, L., Jain, R., Raghukumar, S. and Aggarwal, R. K. 2005. *Thraustochytrium gaertnerium* sp. nov.: A new thraustochytrid stramenopilan protist from mangroves of Goa, India. *Protist* **156**: 303–15.
- Booth, T. 1969. Marine fungi from British Columbia monocentric chytrids and chytridiaceous species from coastal and interior halomorphic soils. *Syesis* **2**: 141–61.
- Booth, T. and Miller, C. E. 1968. Comparative morphologic and taxonomic studies in the genus *Thraustochytrium*. *Mycologia* **60**: 480–95.
- Bower, S. M. 1987. *Labyrinthuloides haliotidis* n. sp. (Protozoa: Labyrinthomorpha), a pathogenic parasite of small juvenile abalone in a British Columbia mariculture facility. *Can J. Zool.* **65**: 1996–2007.
- Chakravarty, D. K. 1979. A new marine Phycomycetes from Adyar estuary of Madras (*Thraustochytrium indicum* sepc. nov.). *Beih. Nova Hedwigia* **63**: 27–32.
- Chamberlain, A. H. L. 1980. Cytochemical and ultrastructural studies on the cell walls of *Thraustochytrium* spp. *Bot. Marina.* **23**: 669–77.

- Coker, W. C. 1923. *The Saprolegniaceae with notes on other water molds*. Chapel Hill, North Carolina, University of North Carolina Press.
- Collado-Mercado, E., Radway, J. C. and Collier, J. L. 2010. Novel uncultivated labyrinthulomycetes revealed by 18S rDNA sequences from seawater and sediment samples. *Aquat. Microb. Ecol.* **58**: 215–28.
- Cox, B. A. and Mackin, J. G. 1974. Studies on a new species of *Labyrinthula* (Labyrinthulales) isolated from the marine gastropod thais *Haemastoma floridana*. *Trans. Amer. Micros. Soc.* **93**: 62–70.
- Dick, M. W. 2001. *Straminipilous Fungi: systematics of the Peronosporomycetes including accounts of the marine straminipilous protists, the Plasmodiophorids and similar organisms*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Fiorito, R., Leander, C. and Leander, B. 2016. Characterization of three novel species of Labyrinthulomycota isolated from ochre sea stars (*Pisaster ochraceus*). *Mar. Biol.* **163**: Articles170.
- Fischer, A. 1892. *Phycomycetes*. Rabenhorst's Kryptogamenflora.
- Gaertner, A. 1967. Ökologische Untersuchungen an einem marinen Pilz aus der Umgebung von Helgoland. *Helgol. wiss. Meeresunters.* **15**: 181–92.
- Gaertner, A. 1968. Eine Methode des quantitativen Nachweises niederer, mit Pollen köderbarer Pilze im Meerwasser und im Sediment. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. Suppl.* **3**: 75–92.
- Gaertner, A. 1970. Beobachtungen über die Sporulation der dick-wandigen Sporangien von *Thraustothyrium kinnei* Gaertner. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.* **12**: 321–7.
- Gaertner, A. 1972. Characters used in the classification of thraustochytriaceous fungi. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.* **13**: 183–94.

- Gaertner, A. 1977. Revision of the Thraustochytriaceae (lower marine fungi) I. *Ulkenia* nov. gen., with description of three new species. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.* **16**: 139–57.
- Gaertner, A. 1981. A new marine Phycomycete, *Schizochytrium minutum*, sp. nov. (Thraustochytriaceae) from saline habitats. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.* **19**: 61–9.
- Goldstein, S. 1963a. Development and nutrition of new species of *Thraustochytrium*. *Amer. Jour. Bot.* **50**: 271–9.
- Goldstein, S. 1963b. Morphological variation and nutrition of a new monocentric marine fungus. *Arch. Microbiol.* **45**: 101–10.
- Goldstein, S. 1963c. Studies of a new species of *Thraustochytrium* that displays light stimulated growth. *Mycologia* **55**: 799–811.
- Goldstein, S., Moriber, L. and Hershenov, B. 1964. Ultrastructure of *Thraustochytrium aureum*, a Biflagellate Marine Phycomycete. *Mycologia* **56**: 897–904.
- Goldstein, S. and Belsky, M. 1964. Axenic culture studies of a new marine Phycomycete possessing an unusual type of asexual reproduction. *Amer. Jour. Bot.* **51**: 72–8.
- Hakariya, M., Hirose, D. and Tokumasu, S. 2009 Molecular phylogeny of terrestrial holocarpic endoparasitic peronosporomycetes, *Haptoglossa* spp., inferred from 18S rDNA. *Mycoscience* **50**: 130–6.
- Harrison, J. L. and Jones, E. B. G. 1974a. Ultrastructural observations on the formation of zoospore in *Thraustochytrium kinnei* Gaertner. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **15**: 273–88.
- Harrison, J. L. and Jones, E. B. G. 1974b. Zoospore discharge in *Thraustochytrium striatum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **62**: 283–8.

- Honda, D., Yokochi, T., Nakahara, T., Erata, M. and Higashihara, T. 1998. *Schizochytrium limacinum* sp. nov., a new thraustochytrid from a mangrove area in the west Pacific Ocean. *Mycol. Res.* **102**: 439–48.
- Honda, D., Yokochi, T., Nakahara, T., Raghukumar, S., Nakagiri, A., Schaumann, K. and Higashihara, T. 1999. Molecular phylogeny of labyrinthulids and thraustochytrids based on the sequencing of 18S ribosomal RNA gene. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**: 637–47.
- Iida, I. Yokochi, T., Kamisaka, Y., Yagi, H., Yamaoka, M. and Suzuki, O. 1996. Improvement of docosahexaenoic acid production in a culture of *Thraustochytrium aureum* by medium optimization. *J. Biosci. Bioeng.* **81**: 76–8.
- Ito, M. 1987. Phylogenetic systematics of Nymphaeales. *Bot. Mag. Tokyo* **100**: 17–36.
- Jenkins, K. M., Jensen, P. R. and Fenical, W. 1999. Thraustochytriosides A-C: new glycosphingolipids from a unique marine protist, *Thraustochytrium globosum*. *Tetrahedron Letter* **40**: 7637–40.
- Johnson, T. W. 1957. On the marine Phycomycete *Thraustochytrium proliferum*. *Trans Brit. Mycol. Soc.* **40**: 292–4.
- Johnson, T. W. 1974. Aquatic fungi of Iceland: Biflagellate species. *Acta Nat. Island.* **23**: 1–40.
- Johnson, T. W. and Sparrow, F. K. 1961. *Fungi in Oceans and Estuaries*. J. Cramer, Weinheim Germany.
- Jones, E. B. G. and Alderman, D. J. 1971. *Althornia crouchii* gen. et sp. nov., a marine biflagellate fungus. *Nova Hedwigia* **21**: 381–99.
- Kang, D. H., Anbu, P., Kim, W. H. and Hur, B. K. 2008. Coexpression of Elo-like enzyme and  $\Delta 5$ ,  $\Delta 4$ -desaturases derived from *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 and the production of DHA and DPA in *Pichia pastoris*. *Biotechnol.*

*Bioprocess Eng.* **13**: 483–90.

- Karnkowska-Ishikawa, A., Milanowski, R., Triemer, R. E. and Zakryœ, B. 2012. Taxonomic revisions of morphologically similar species from two euglenoid genera: *Euglena* (*E. granulata* and *E. velata*) and *Euglenaria* (*Eu. anabaena*, *Eu. caudata*, and *Eu. clavata*). *J. Phycol.* **48**: 729–39.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. and Miyata, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucl. Acids Res.* **30**: 3059–66.
- Kazama, F. Y. 1972a. Ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. zoospores: I. Kinetosome. *Arch. Mikrobiol.* **83**: 179–88.
- Kazama, F. Y. 1972b. Ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. zoospores: II. Striated inclusions. *J. Ultra. Mol. Struct. R.* **41**: 60–6.
- Kazama, F. Y. 1973. Ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. Zoospores III. Cytolysomes and Acid Phosphatase Distribution. *Arch. Mikrobiol.* **89**: 95–104.
- Kazama, F. Y. 1974. The ultrastructure of nuclear division in *Thraustochytrium* sp. *Protoplasma* **82**: 155–75.
- Kobayashi, Y. and Ookubo, M. 1953. Studies on the marine Phycomycetes. *Bull. Natl. Sci. Mus. Tokyo* **33**: 53–65.
- Konno, K. 1972. Studies of Japanese lower aquatic Phycomycetes. *Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku Sect.* **14**: 227–92.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P. *et al.* 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947–8.
- Leander, C. A. and Porter, D. 2000. Redefining the genus *Aplanochytrium* (phylum

Labyrinthulomycota). *Mycotaxon* **76**: 439–44.

- Leander, C. A., Porter, D. and Leander, B. S. 2004. Comparative morphology and molecular phylogeny of aplanochytrids (Labyrinthulomycota). *Eur. J. Protistol.* **40**: 317–28.
- Les, D. H. and Schneider, E. L. 1995. Nymphaeales alismatidae and the theory of an aquatic monocotyledon origin. in *Monocotyledons: systematics and evolution*, eds. Rudall, P. J., Cribb, D., Cutler, D. F. and Humphries, C. J. Kew: Royal Botanic Gardens: 23–42.
- Linton, E. W., Hittner, D., Lewandowski, C., Auld, T. and Triemer, R. E. 1999. A molecular study of euglenoid phylogeny using small subunit rDNA. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**: 217–23.
- Lyons, M. M., Smolowitz, R., Dungan, C. F. and Roberts, S. B. 2006. Development of a real time quantitative PCR assay for the hard clam pathogen Quahog Parasite Unknown (QPX). *Dis. Aquat. org.* **72**: 45–52.
- Madsen, O., Scally M., Douady C. J. *et al.* 2001. Parallel adaptive radiations in two major clades of placental mammals. *Nature* **409**: 610–4.
- Marin, B., Palm, A., Klingberg, M., and Melkonian, M. 2003. Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing Euglenophytes based on SSU rDNA sequence comparisons and synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure. *Protist* **154**: 99–145.
- Massana, R., Del Campo, J., Sieracki, M. E., Audic, S. and Logares, R. 2014. Exploring the uncultured microeukaryote majority in the oceans: reevaluation of ribogroups within stramenopiles. *ISME J.* **8**: 854–866.
- Matsuda, T., Sakaguchi, K., Hamaguchi, R. *et al.* 2012. Analysis of  $\Delta 12$ -fatty acid desaturase function revealed that two distinct pathways are active for the synthesis of PUFAs in *T. aureum* ATCC 34304. *J. Lipid Res.* **53**: 1210–22.

- Moro, I., Negrisolo, E., Callegaro, A. and Andreoli, C. 2003. *Aplanochytrium stocchinoi*: a new Labyrinthulomycota from the southern ocean (Ross Sea, Antarctica). *Protist* **154**: 331–40.
- Moss, S. T. 1985. An ultrastructural study of taxonomically significant characters of the Thraustochytriales and the Labyrinthulales. *Bot. J. Linn. Soc.* **91**: 327–57.
- Murray, M. G. and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* **8**: 4321–5.
- Nakahara, T., Yokochi, T., Higashihara, T., Tanaka, S., Yaguchi, T. and Honda, D. 1996. Production of docosahexaenoic and docosapentaenoic acids by *Schizochytrium* sp. isolated from Yap Islands. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **73**: 1421–6.
- Nakayama, T., Watanabe, S., Mitsui, K., Uchida, H. and Inouye, I. 1996. The phylogenetic relationship between the Chlamydomonadales and Chlorococcales inferred from 18SrDNA sequence data. *Phycol. Res.* **44**: 47–55.
- Nakazawa, A., Matsuura, H., Kose, R. *et al.* 2012. Optimization of culture conditions of the thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strain 18W-13a for squalene production. *Bioresour. Technol.* **109**: 287–91.
- Nakazawa, A., Kokubun, Y., Matsuura, H. *et al.* 2014. TLC screening of thraustochytrid strains for squalene production. *J. Appl. Phycol.* **26**: 29–41.
- Olive, L. S. 1975. *The Mycetozoans*. Academic Press, New York.
- Orsi, W., Edgcomb, V., Jeon, S. *et al.* 2011. Protistan microbial observatory in the Cariaco Basin, Caribbean. II. Habitat specialization. *ISME J.* **5** 1357–73.
- Pan, J., Del Campo, J. and Keeling, P. J. 2017. Reference tree and environmental sequence diversity of Labyrinthulomycetes. *J. Eukaryot. Microbiol.* **64**: 88–96.

- Patterson, D. J. 1989. Stramenopiles: Chromophytes from a protistan perspective. In Green, J. C. , Leadbeater, B. S. C. and Diver, W. L. (eds.) *The Chromophyte Algae. Problems and Perspectives Systematics Association Special*, Vol. 38, Clarendon Press, Oxford, 357–79.
- Perkins, F. O. 1972. The ultrastructure of holdfasts, "rhizoids", and "slime tracks" in thraustochytriaceous fungi and *Labyrinthula* spp. *Arch. Microbiol.* **84**: 95–118.
- Perkins, F. O. 1973a. A new species of marine labyrinthulid *Labyrinthuloides yorkensis* gen. nov. spec. nov.—Cytology and fine structure. *Arch. Microbiol.* **90**: 1–17.
- Perkins, F. O. 1973b. Observations of thraustochytriaceous (phycomycetes) and labyrinthulid (Rhizopodea) ectoplasmic nets on natural and artificial substrates an electron microscope study. *Can. J. Bot.* **51**: 485–91.
- Porter, D. 1969. Ultrastructure of *Labyrinthula*. *Protoplasma* **67**: 1–19.
- Porter, D. 1990. Phylum Labyrinthulomycota. In Margulis, L., Corlis J. O., Melconian, M. and Chapman, D. J. (eds.) *Handbook of Protoctista*. Jones and Bartlett, Boston. 388–98.
- Quick, J. A. 1974a. A new marine *Labyrinthula* with unusual locomotion. *Trans. Amer. Micros. Soc.* **93**: 52–61.
- Quick, J. A. 1974b. *Labyrinthuloides schizochytrops* n. sp., a new marine *Labyrinthula* with spheroid "Spindle" cells. *Trans. Amer. Micros. Soc.* **93**: 344–65.
- Raghukumar, S. 1980. *Thraustochytrium benthicola* sp.nov.: A new marine fungus from the north sea. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **74**: 607–14.
- Raghukumar, S. 1988a. *Schizochytrium mangrovei* sp. nov., a thraustochytrid from mangroves in India. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **90**: 627–31.



- Raghukumar, S. 1988b. *Schizochytrium octosporum* sp.nov. and other thraustochytrids from the North Sea (Rosfjord, Norway). *Trans. Br. Mycol. Soc.* **90**: 273–8.
- Raghukumar, S. 1992. Bacterivory: a novel dual role for thraustochytrids in the sea. *Marine Biology* **113**: 165–9.
- Raghukumar, S. 2002. Ecology of the marine protists, the Labyrinthulomycetes (Thraustochytrids and Labyrinthulids). *Eur. J. Protistol.* **38**: 127–145.
- Rosa, S. M., Galvagno, M. A. and Vélez, C. G. 2006. Primeros aislamientos de Thraustochytriales (Labyrinthulomycetes, heterokonta) de ambientes estuariales y salinos de la Argentina. *Darwiniana* **44**: 81–8.
- Schärer, L., Knoflach, D., Vizoso, D. B., Rieger, G. and Peintner, U. 2007. Thraustochytrids as novel parasitic protists of marine free-living flatworms: *Thraustochytrium caudivorum* sp. nov. parasitizes *Macrostomum lignano*. *Mar. Biol.* **152**: 1095–104.
- Schneider, V. J. 1967. Ein neuer mariner Phycomycet aus der Kieler Bucht (*Thraustochytrium striatum* spec. nov.). *Kieler Meeresforsch.* **23**: 16–20.
- Scholz, E. 1958. Über morphologische Modifikationen bei niederen Erdphycomyceten und Beschreibung zweier neuer Arten von *Rhizophyidium* und *Thraustochytrium*. *Arch. Microbiol.* **29**: 354–62.
- Silvestro, D. and Michalak, I., 2012. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Org. Divers. Evol.* **12**: 335–7.
- Singh, A. and Ward, O. P. 1996. Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum* ATCC 28210. *J. Ind. Microbiol. Bolt.* **16**: 370–3
- Smirnov, A. V., Nassonova, E. S., Berney, C., Fahrni, J., Bolivar, I. and Pawlowski, J. 2005. Molecular phylogeny and classification of the lobose amoebae. *Protist* **156**: 129–42.

- Smirnov, A. V., Chao E., Nasonovac E. S. and Cavalier-Smith T. 2012. A revised classification of naked lobose Amoebae (Amoebozoa: Lobosa). *Protist* **162**: 545–70.
- Sparrow, F. K. 1936. Biological observations on the marine fungi of Woods Hole waters. *Biol. Bull.* **70**: 236–63.
- Sparrow, F. K. 1943. *Aquatic Phycomycetes exclusive of the Saprolegniaceae and Pythium*. Ann Arbor, The University of Michigan press.
- Sparrow, F. K. 1968. Remarks on the Thraustochytriaceae. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.* **3**: 7–18.
- Sparrow, F. K. 1969. Zoosporic marine fungi from the Pacific Northwest (U. S. A.). *Arch. Microbiol.* **66**: 129–46.
- Spencer, M. A., Vick M. C. and Dick M. W. 2002. Revision of *Aplanopsis*, *Pythiopsis*, and ‘subcentric’ *Achlya* species (Saprolegniaceae) using 18S rDNA and morphological data. *Mycol. Res.* **106**: 549–60.
- Springer, M. S., Cleven, G. C., Madsen, O., de Jong, W. W., Waddell, V. G., Amrine, H. M. and Stanhope, M. J. 1997. Endemic African mammals shake the phylogenetic tree. *Nature* **388**: 61–4.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725–9.
- Tanabe, A. S., 2008. "Phylogears version 2.2.0", software distributed by the author at <https://www.fifthdimension.jp/>.
- The Angiosperm Phylogeny Group. 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **85**: 531–53.

- Tice, A. K., Silberman, J. D., Walthall, A. C., Le, K. N. D., Spiegel, F. W. and Brown, M. W. 2016. *Sorodiplophrys stercorea*: Another novel lineage of sorocarpic multicellularity. *J. Eukaryot. Microbiol.* **63**: 623–8.
- Triemer, R. E., Linton, E., Shin, W., Nudelman, A., Monfils, A., Bennett, M., Brosnan, S. 2006. Phylogeny of the Euglenales based upon combined SSU and LSU rDNA sequence comparisons and description of *Discoplastis* gen. nov. (Euglenophyta). *J. Phycol.* **42**: 731–40.
- Tsui, C. K. M., Marshall, W., Yokoyama, R. *et al.* 2009. Labyrinthulomycetes phylogeny and its implications for the evolutionary loss of chloroplasts and gain of ectoplasmic gliding. *Mol. Phylogenet. Evol.* **50**: 129–40.
- Ueda, M., Nomura, Y., Doi, K., Nakajima, M. and Honda, D. 2015. Seasonal dynamics of culturable thraustochytrids (Labyrinthulomycetes, Stramenopiles) in estuarine and coastal waters. *Aquat. Microb. Ecol.* **74**: 187–204.
- Ulken, A. 1964. Über einige Thraustochytrien des polyhyalinen Brackwassers. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.* **9**: 31–41.
- Ulken, A. 1965. Zwei neue Thraustochytrien aus der Außenweser. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.* **9**: 289–95.
- Ulken, A. 1970. Phycomyceten aus der Mangrove bei Cananéia (São Paulo, Brasilien). *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.* **12**: 313–9.
- Ulken, A., Jäckle, I. and Bahnweg, G. 1985. Morphology, nutrition and taxonomy of an *Aplanochytrium* sp. from the Sargasso Sea. *Marine Biology* **85**: 89–95.
- Uzuhashi, S., Tojo, M. and Kakishima, M. 2010. Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience* **51**: 337–65.
- Watson, S. W. and Raper, K. B. 1957. *Labyrinthula minuta* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* **17**: 368–77.

- Yang, H. L., Lu, C. K., Chen, S. F., Chen, Y. M. and Chen, Y. M. 2009. Isolation and characterization of Taiwanese heterotrophic microalgae: screening of strains for docosahexaenoic acid (DHA) production. *Mar. Biotechnol.* **12**: 173–85.
- Yokochi, T., Honda, D., Higashihara, T. and Nakahara T. 1998. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 72–6.
- Yokoyama, R. and Honda, D. 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience* **48**: 199–211.
- Yokoyama, R., Salleh, B. and Honda, D. 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Ulkenia* sensu lato based on morphology, chemotaxonomical characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Ulkenia* and erection of *Botryochytrium*, *Parietichytrium*, and *Sicyoidochytrium* gen. nov. *Mycoscience* **48**: 329–41.

图表

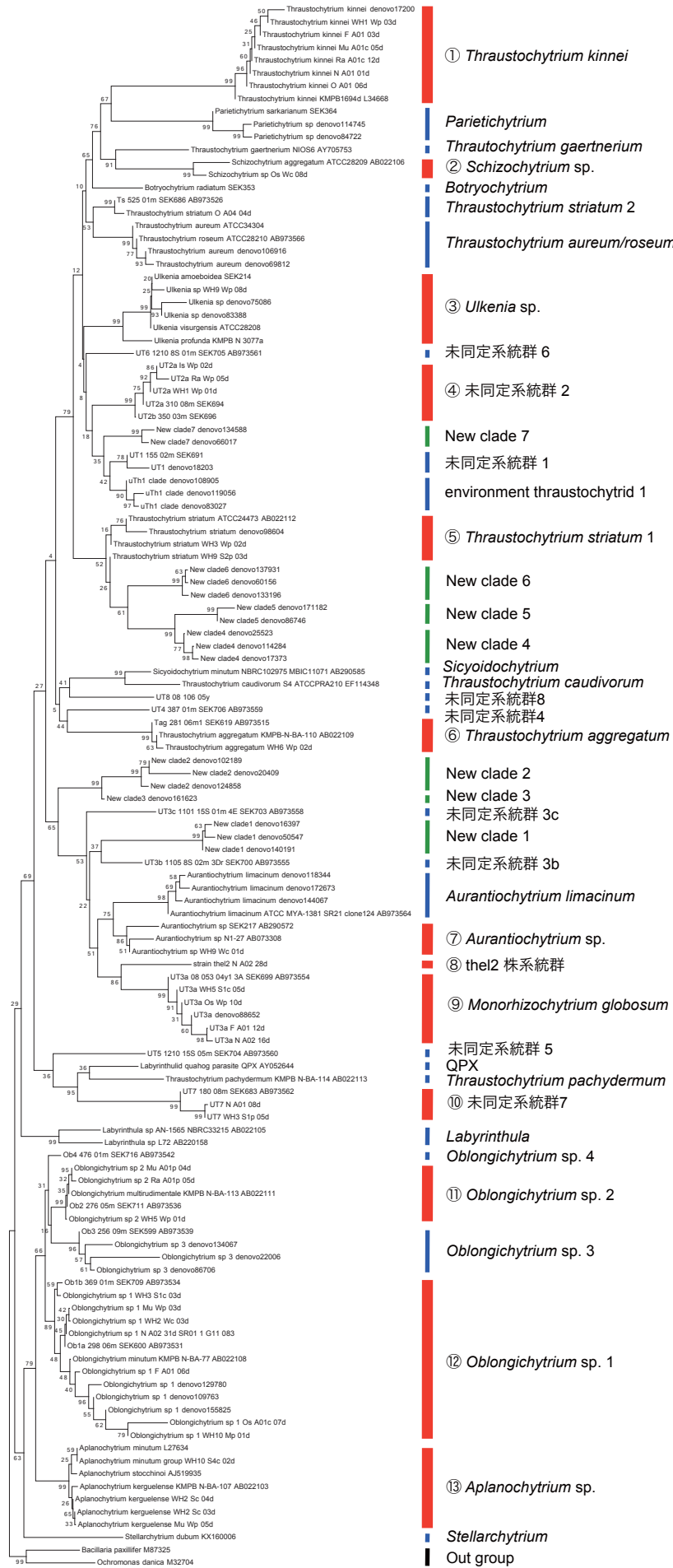


図1 サンプリング株の系統的位  
 18S rDNA配列を使用したラビリンチュラ綱の近隣結合 (NJ) 系統樹。赤色は今回サンプリングで分離された系統群。青は既知の系統群。緑は新たに系統群として認識された系統群。

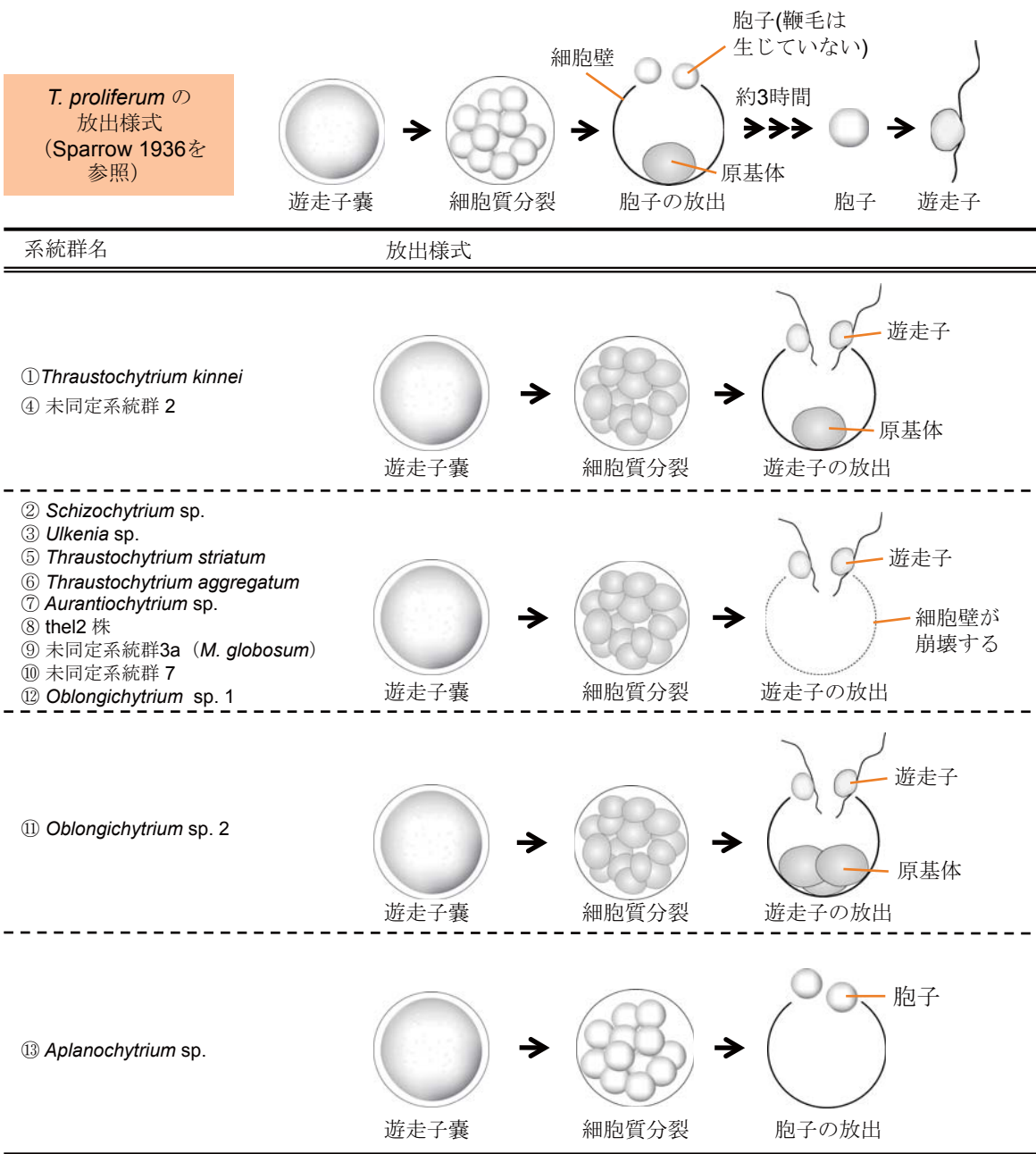


図2 各系統群に位置したサンプリング株の遊走子形成様式のまとめ

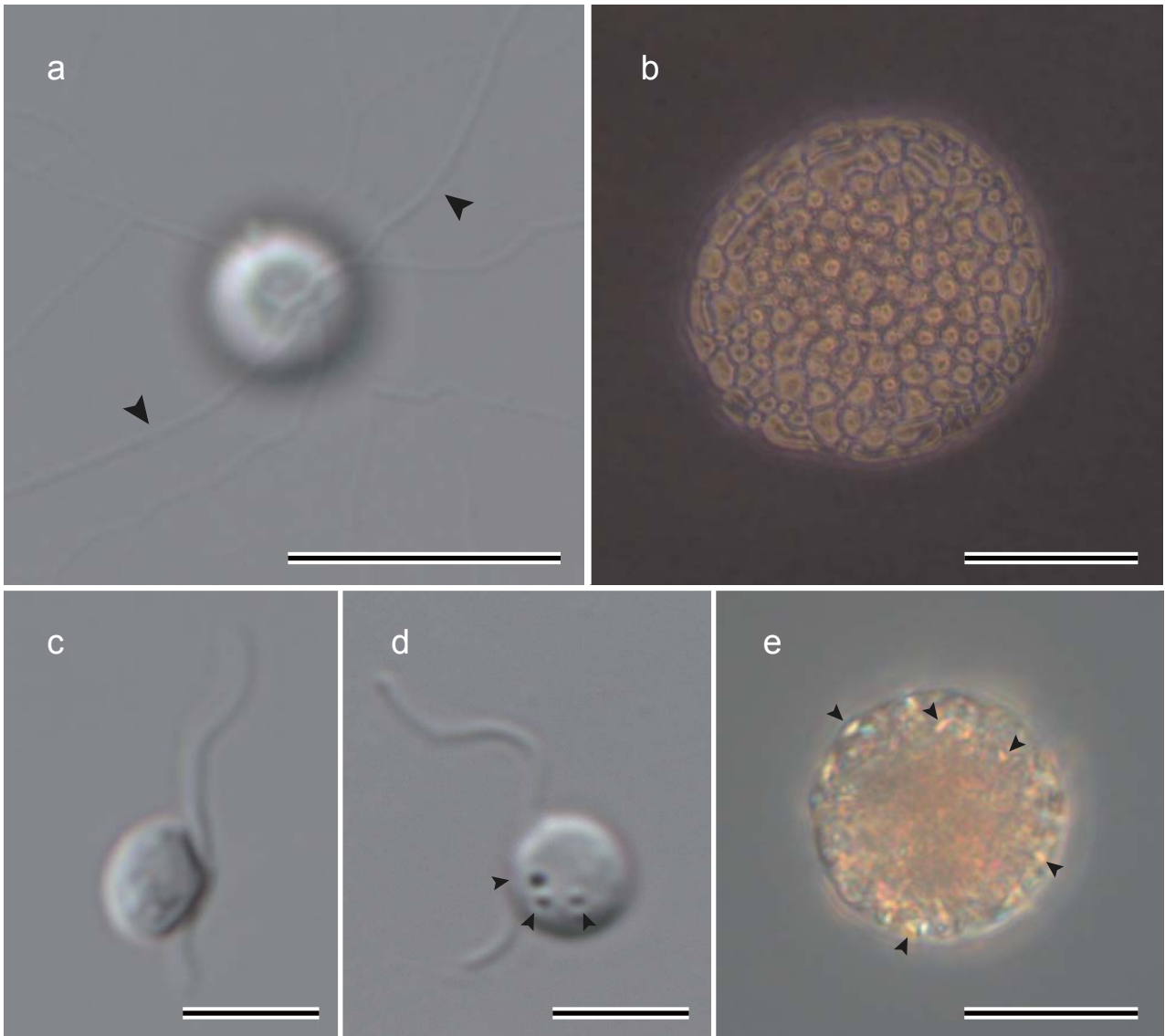


図3 d-GPY 液体培地、d-GPY 寒天培地、海水 + 松花粉 培地における SEK671 *Monorhizochytrium globosum* の形態

(a) 栄養細胞、矢印は、分岐した外質ネットを示している。スケールは 10  $\mu\text{m}$

(b) d-GPY 寒天培地上での蜂の巣状のコロニー。スケールは 50  $\mu\text{m}$  (c) グルタルアル

ルデヒドで固定した腎臓型の遊走細胞。スケールは 5  $\mu\text{m}$  (d) カバーガラスを指で押し

てぶした遊走細胞。矢印は、顆粒を示している (e) 細胞質内に多くのオレンジ色の顆粒を

含んでいる栄養細胞 (d-GPY 液体培地で 20 日培養したもの)。スケールは 10  $\mu\text{m}$ 。



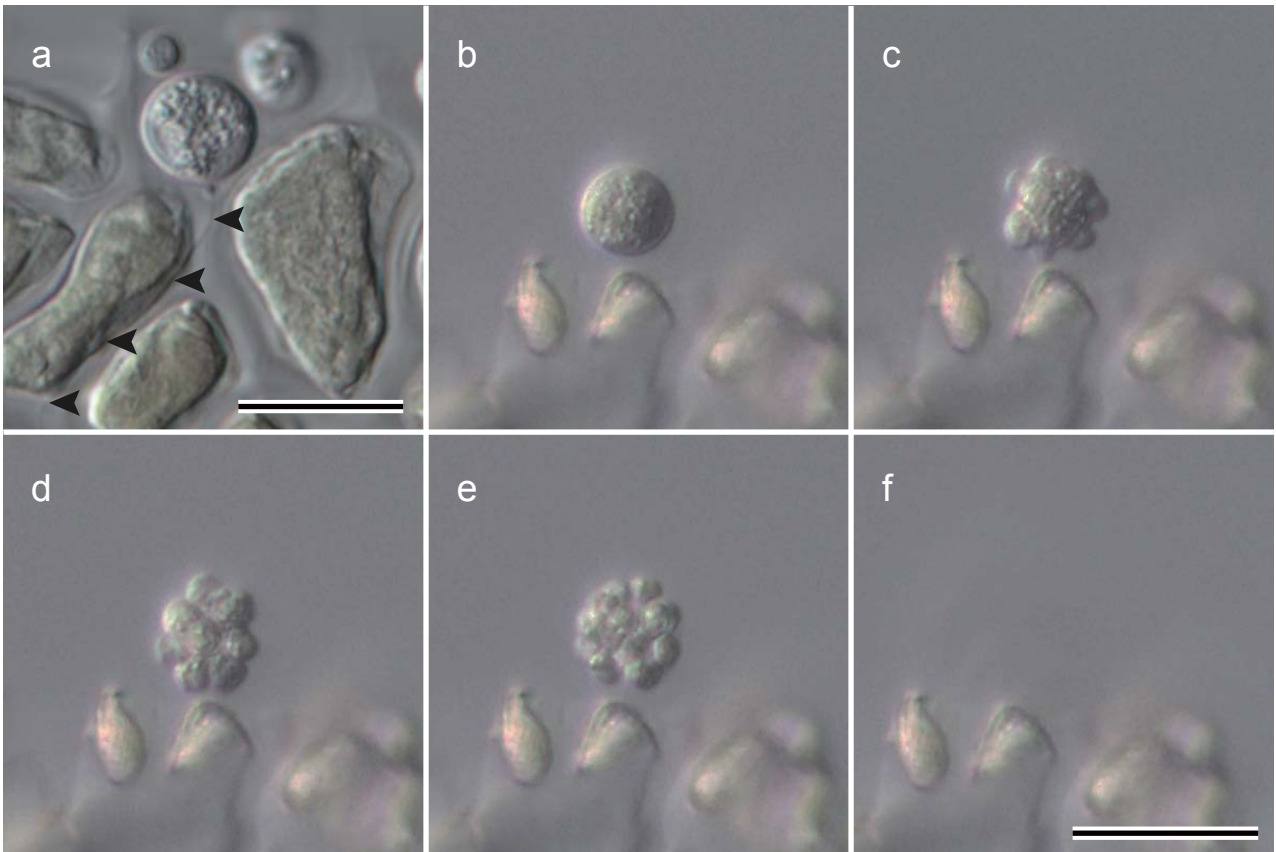


図4 海水 + 海藻 培地における SEK 671 *Monorhizochytrium globosum* の形態形質  
 (a) 栄養細胞が、海藻表面に付着している。矢印は、栄養細胞の1本の外質ネットが  
*Pyropia sp.* 内に外質ネットを侵入させたものである。スケールは5  $\mu\text{m}$ 、(b-f) 遊走  
 子囊の細胞質に一度に分裂面が入り、分裂した各細胞が、遊走細胞となり、放出され  
 るという遊走子形成の連続観察 (b) 遊走子囊、0分 (c) 遊走子囊の細胞質に一度に分  
 裂面が入った、2分 (d) 遊走子囊内に複数の娘細胞が入っている、6分 (e) 娘細胞  
 に、2本の鞭毛が生えている、41分 (f) 遊走子囊内から、遊走細胞が放出される、64  
 分。図4fのスケールは、20  $\mu\text{m}$  で、図4b-e と共通である。

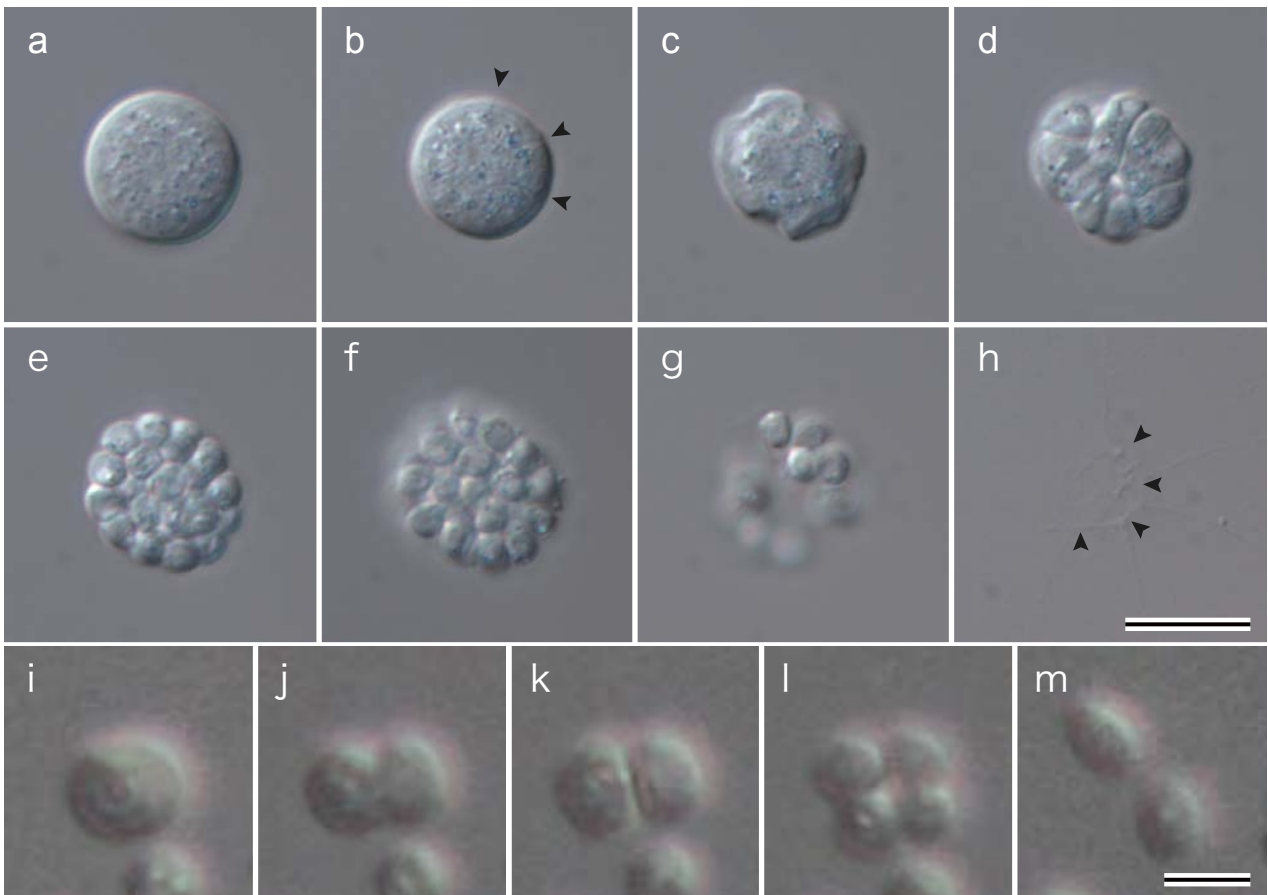


図5 d-GPY 液体培地、海水 + 松花粉 培地における SEK671 株 *Monorhizochytrium globosum* の連続観察による遊走子形成様式。

(a-h) 遊走子囊の細胞質に一度に分裂面が入り、分裂した各細胞が、遊走細胞となり、放出されるという遊走子形成の連続観察 (a) 遊走子囊 (b) 遊走子囊の細胞質に一度に分裂面が入り始める、0分 (c,d) 遊走子囊の細胞質の分裂、7-13分 (e) 遊走子囊内に複数の娘細胞が入っている、17分 (f) 娘細胞に鞭毛が生える、45分 (g) 遊走子囊内から、遊走細胞が放出される、(h) 遊走子が放出された後の細胞壁、73分、矢印は、残った細胞壁を示している。図5hのスケールは10  $\mu\text{m}$  で、図5a-gと共通である。(i-m) 栄養細胞が2分裂を繰り返して、分裂した後の細胞は鞭毛を生やし、遊走子となる遊走子形成様式 (i) 栄養細胞 (k) 2細胞、3分 (l) 4細胞、6分 (m) 泳ぎ出す直前の遊走子、66分。他の2つの遊走子は、すでに泳いで見えなくなっている (not shown)。図5mのスケールは5  $\mu\text{m}$  で、図5i-lと共通である。

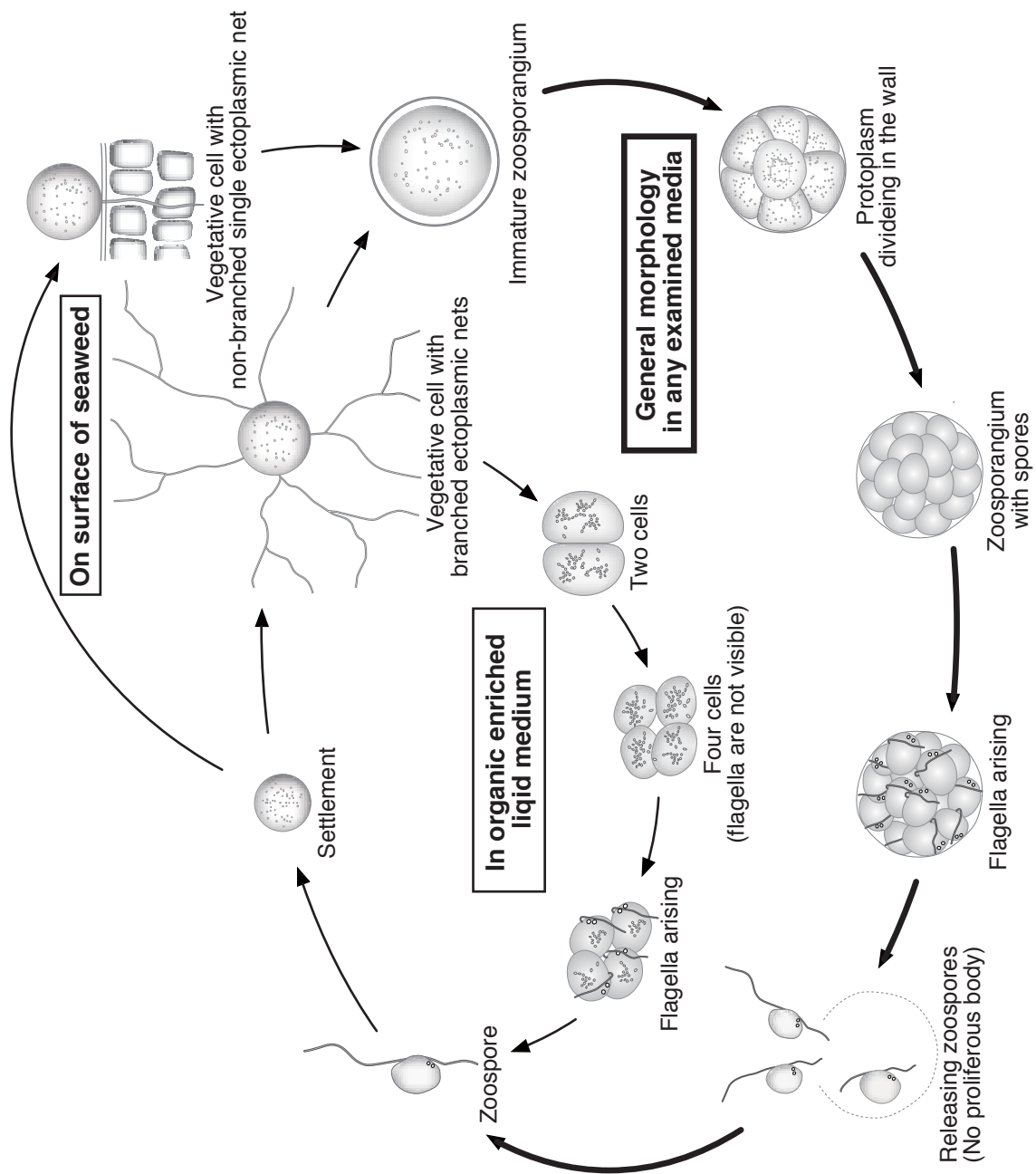


図 6 *Monorhizochytrium globosum* の生活史

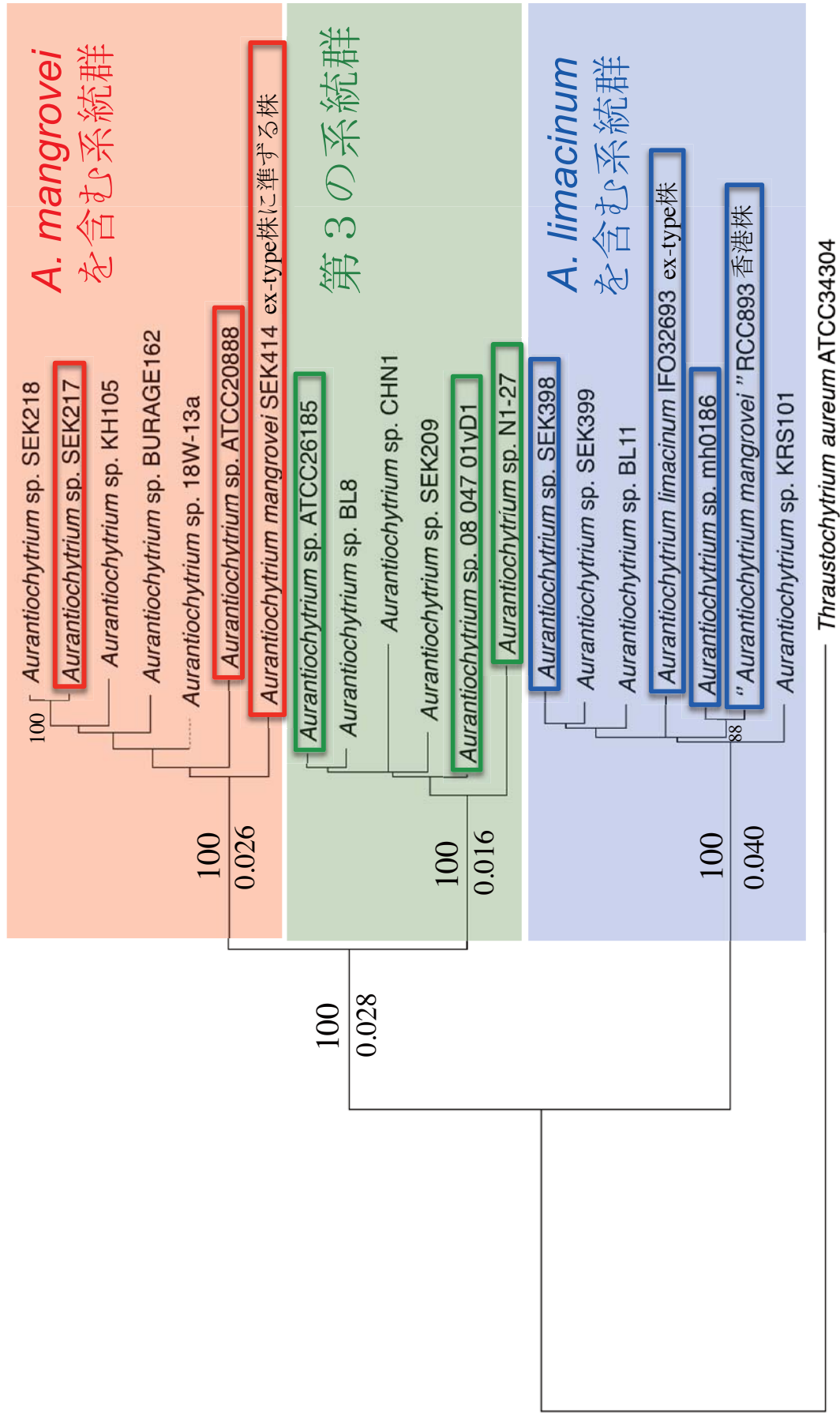


図7 *Aurantiochytrium* 属の18S rDNA配列の最尤系統樹  
 Tamura-Nei+G+I モデル、1547 bpを使用した系統樹。線の上部の数字は、Bootstrapの値を示している (<80%)  
 線の下の数字は、遺伝的距離を示している。外群には、*Thraustochytrium aureum* を使用した。四角で囲まれている  
 生物は、形態観察を行った株を示している。

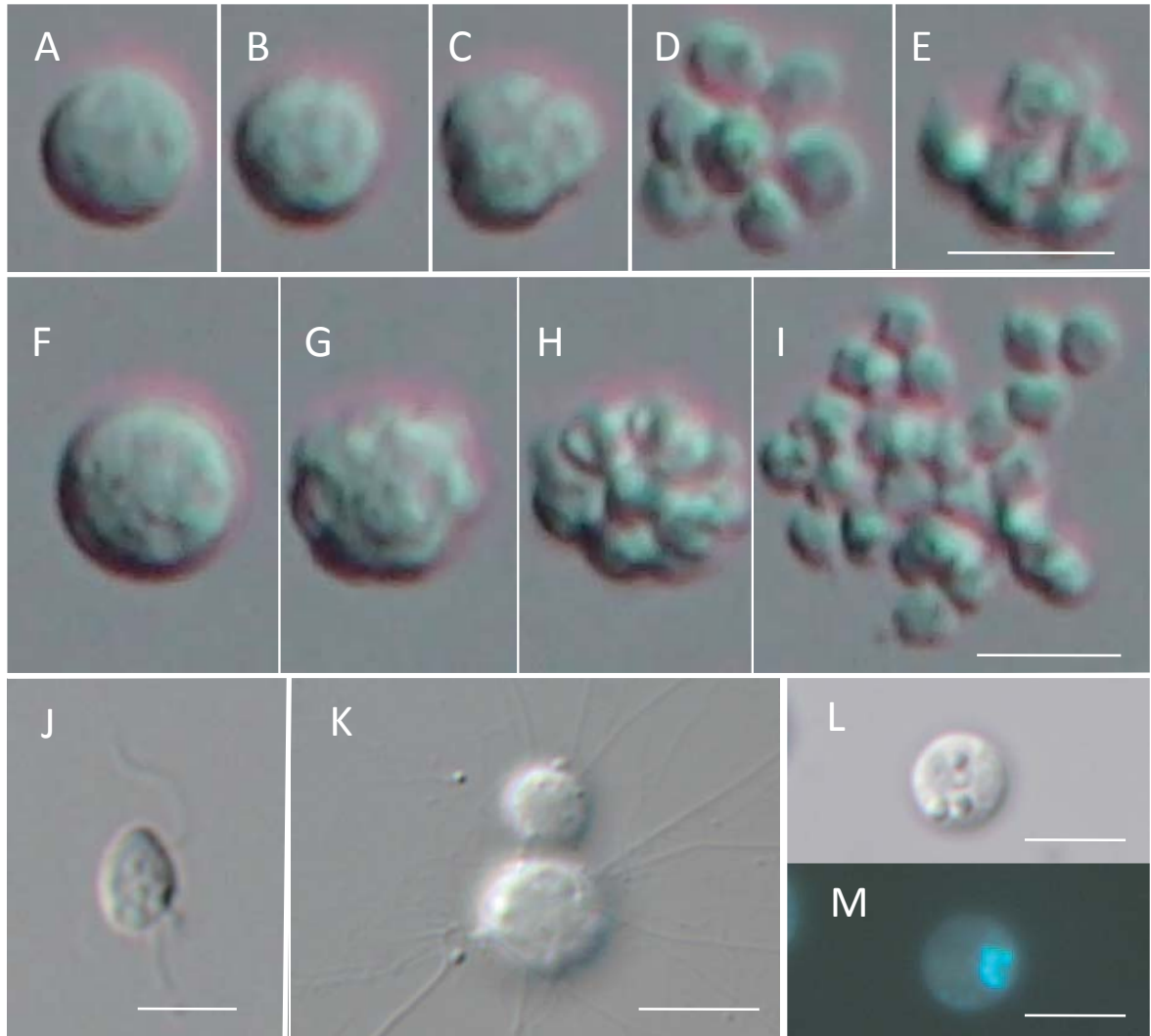


図8 SEK 414 株の形態観察 (滅菌海水+松花粉 培地)

A-E 栄養細胞が成長を伴わない2分裂を繰り返す遊走子形成 スケールは10  $\mu\text{m}$

F-J 遊走子嚢が一度に細胞質分裂する遊走子形成 スケールは10  $\mu\text{m}$  A 栄養細胞

B 2細胞 C 4細胞 D 8細胞 E 遊走子放出 F 遊走子嚢 G-H

細胞質分裂 I 遊走子放出 J 遊走子 K 外質ネット L 栄養細胞 M

栄養細胞 (DAPIによる染色) スケールは10  $\mu\text{m}$

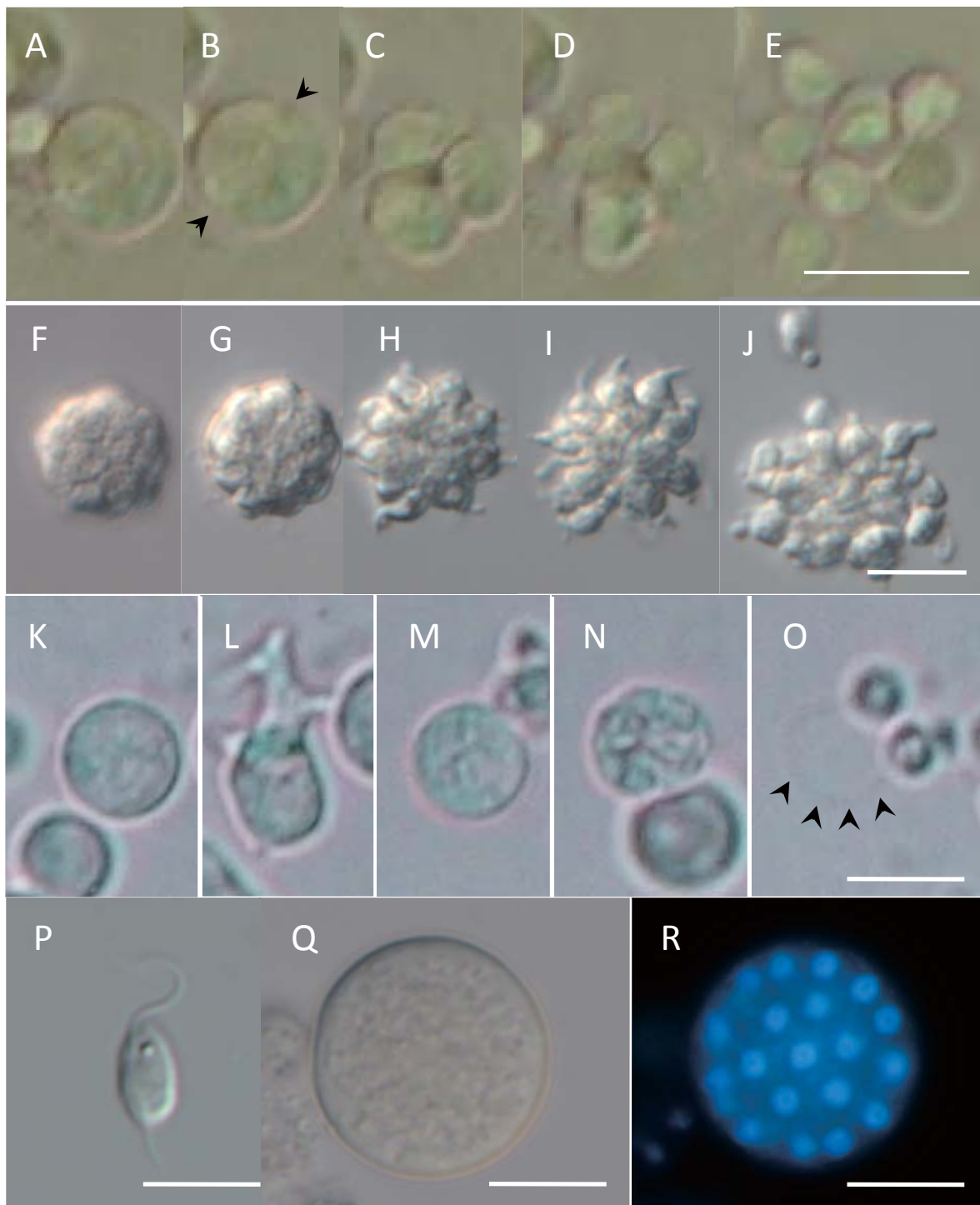


図9 SEK 414 株の形態観察 (d-GPY 培地)

A-E 栄養細胞が成長を伴わない2分裂を繰り返す遊走子形成 スケールは10  $\mu\text{m}$  F-J 遊走子嚢が一度に細胞質分裂する遊走子形成、スケールは 10  $\mu\text{m}$  J-N 運動性がある不定形細胞が遊走子形成をするまでの流れ、スケールは10  $\mu\text{m}$  A 栄養細胞 B 2細胞 C 4細胞 D 8細胞 E 遊走子放出 F 遊走子嚢 G-I 細胞質分裂 J 遊走子放出 K 遊走子嚢 L 不定形細胞 M 不定形細胞が丸くなる N 細胞質分裂 O 遊走子放出後、細胞壁が残る(矢印) P 遊走子 スケールは 5  $\mu\text{m}$  Q 遊走子嚢 スケールは 5  $\mu\text{m}$  R 遊走子嚢 (DAPIによる染色) スケールは 5  $\mu\text{m}$

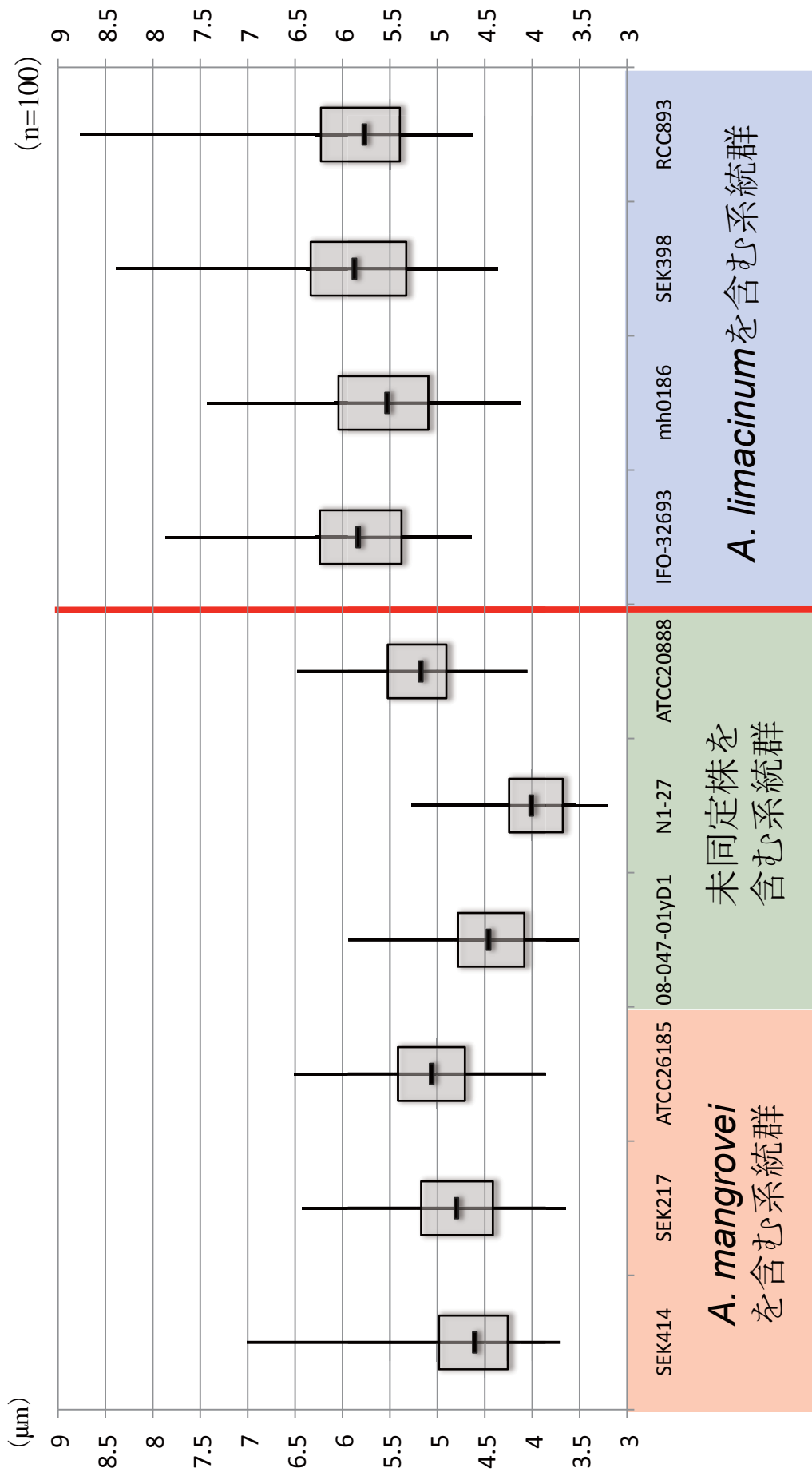


図10 遊走細胞の縦の長さの箱ひげ図

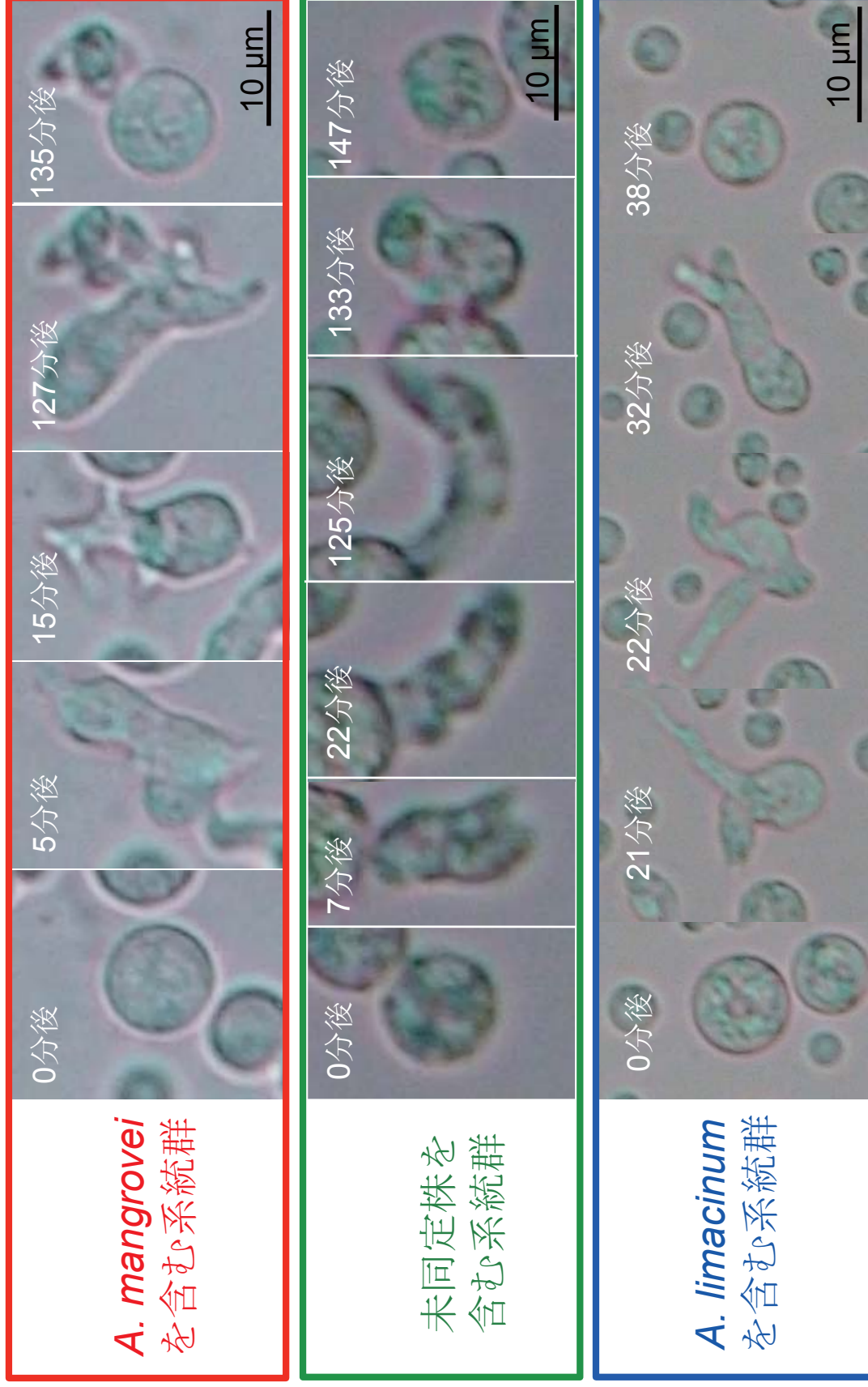


図11 各系統群に見られるアメーバ状細胞の連続観察写真

*A. mangrovei*を含む系統群：SEK414株、未同定株を含む系統群：SEK 243株、*A. limacinum*を含む系統群：ATCC MTA-1381



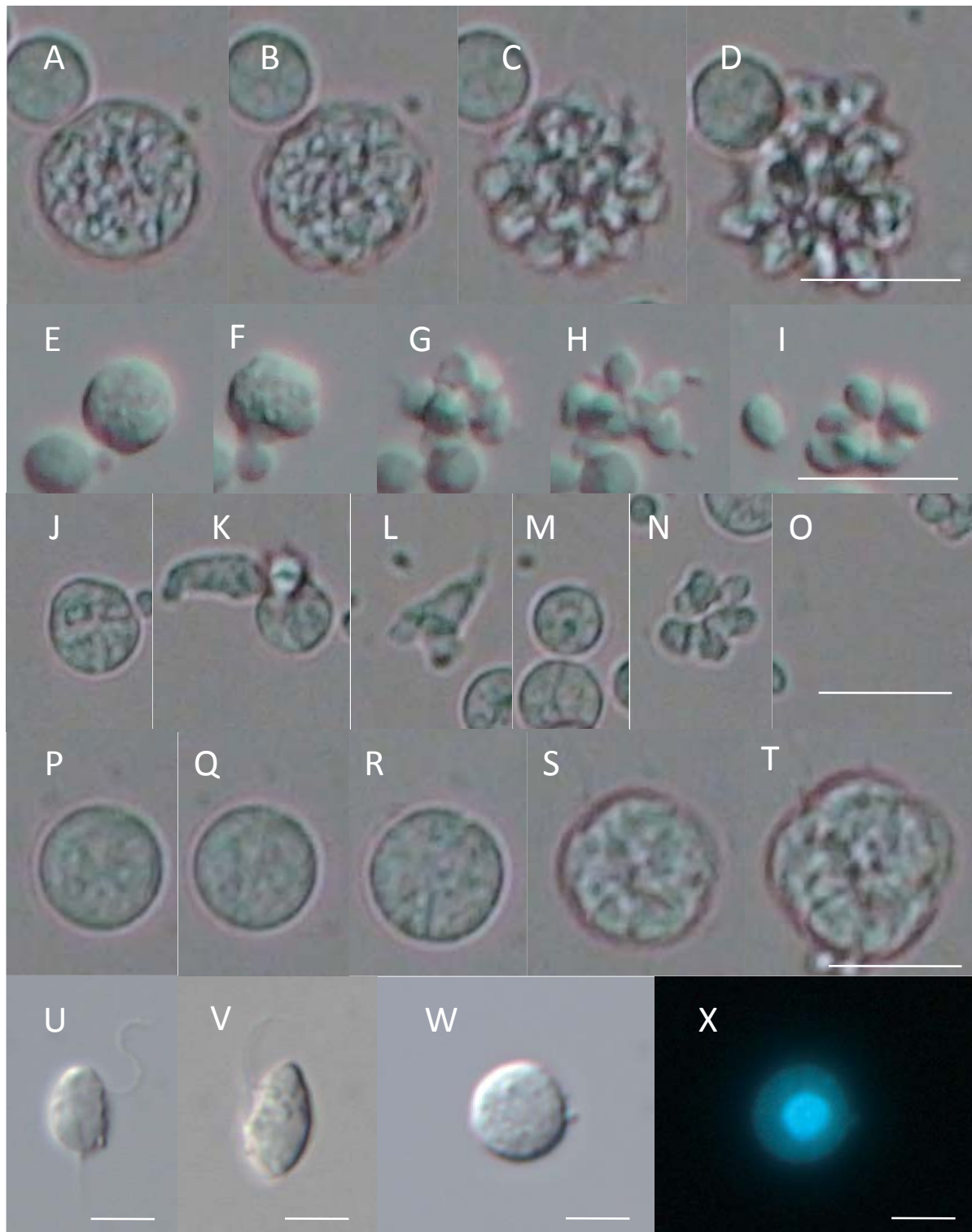


図12 ATCC MTA-1381株の形態観察（滅菌海水+松花粉、d-GPY培地）

A-D 遊走子嚢が一度に細胞質分裂する遊走子形成（d-GPY 培地） スケールは10 $\mu$ m  
 E-I 遊走子嚢が一度に細胞質分裂する遊走子形成（滅菌海水+松花粉）スケールは  
 10  $\mu$ m J-O 運動性がある不定形細胞が遊走子形成をするまでの流れ スケールは  
 10  $\mu$ m P-T 2分裂を繰り返してクラスター細胞になるまで A 遊走子嚢 B-C  
 細胞質分裂 D 遊走子放出 E 遊走子嚢 F-H 細胞質分裂 I 遊走子放出 J  
 栄養細胞 K-L 運動性を示す不定形細胞 M 着生した栄養細胞 N 遊走子形成  
 放出後 P 遊走子嚢 Q 2細胞 R 4細胞 S 8細胞 T クラスター細胞  
 U 遊走子（滅菌海水）スケールは5  $\mu$ m V 遊走子（d-GPY 培地）スケールは5  $\mu$ m  
 W 栄養細胞（DAPI） X 栄養細胞（DAPI） スケールは 5  $\mu$ m

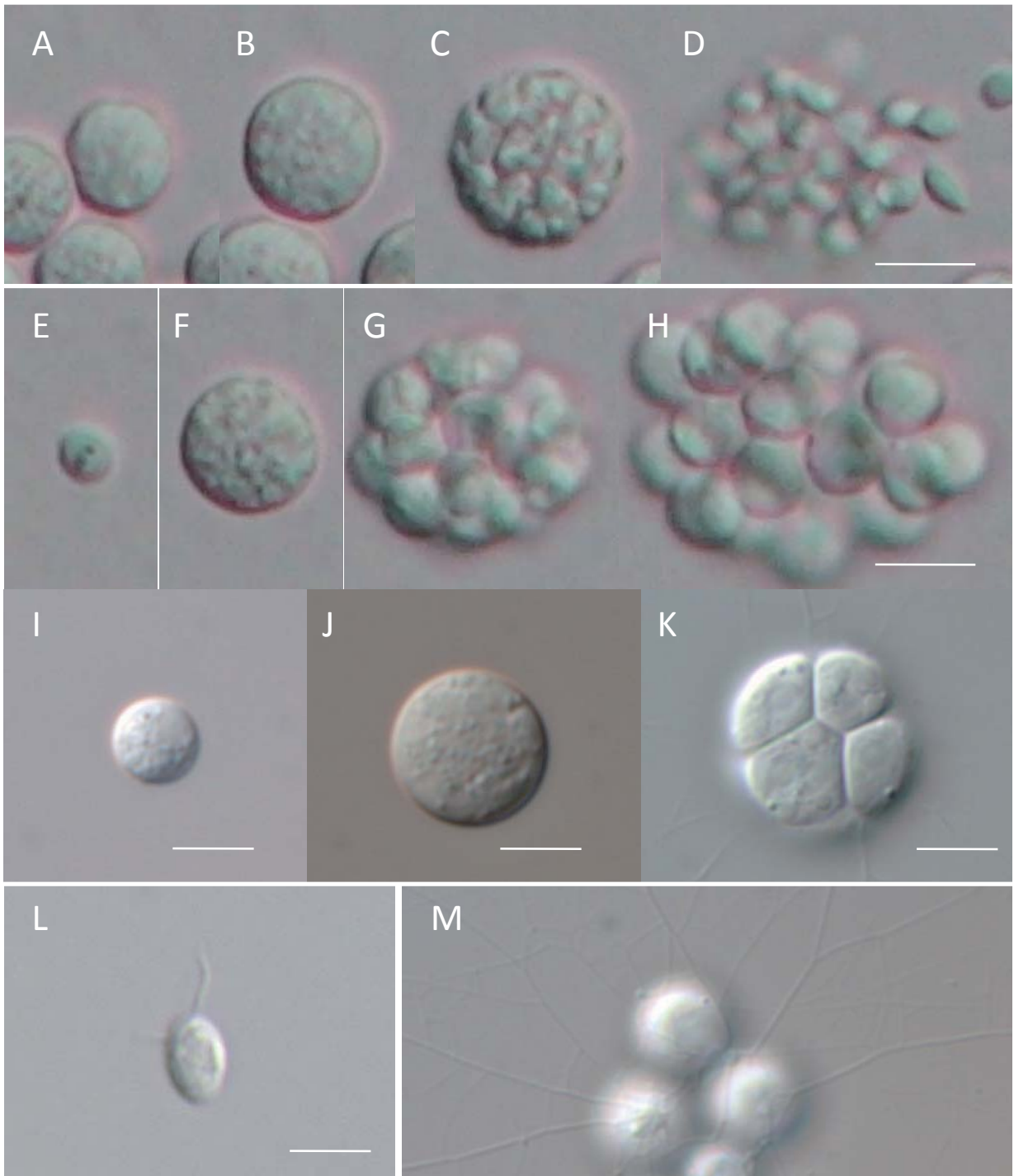


図13 SEK 605株の形態観察  
(滅菌海水+松花粉 培地)

A-D 遊走子嚢が一度に細胞質分裂する遊走子形成、スケールは

10  $\mu\text{m}$  E-H 遊走子嚢が

クラスター細胞になるまで A 遊走子嚢 B-C 細胞質分裂 D 遊走子放出 E 遊走子嚢

F 細胞質分裂 G 細胞成長 H クラスター細胞 I 栄養細胞

スケールは5  $\mu\text{m}$  J 遊走子嚢 スケールは5  $\mu\text{m}$  K クラスター細胞 スケールは5  $\mu\text{m}$  L 遊走子 スケールは5  $\mu\text{m}$  M 外質ネット スケールは10  $\mu\text{m}$

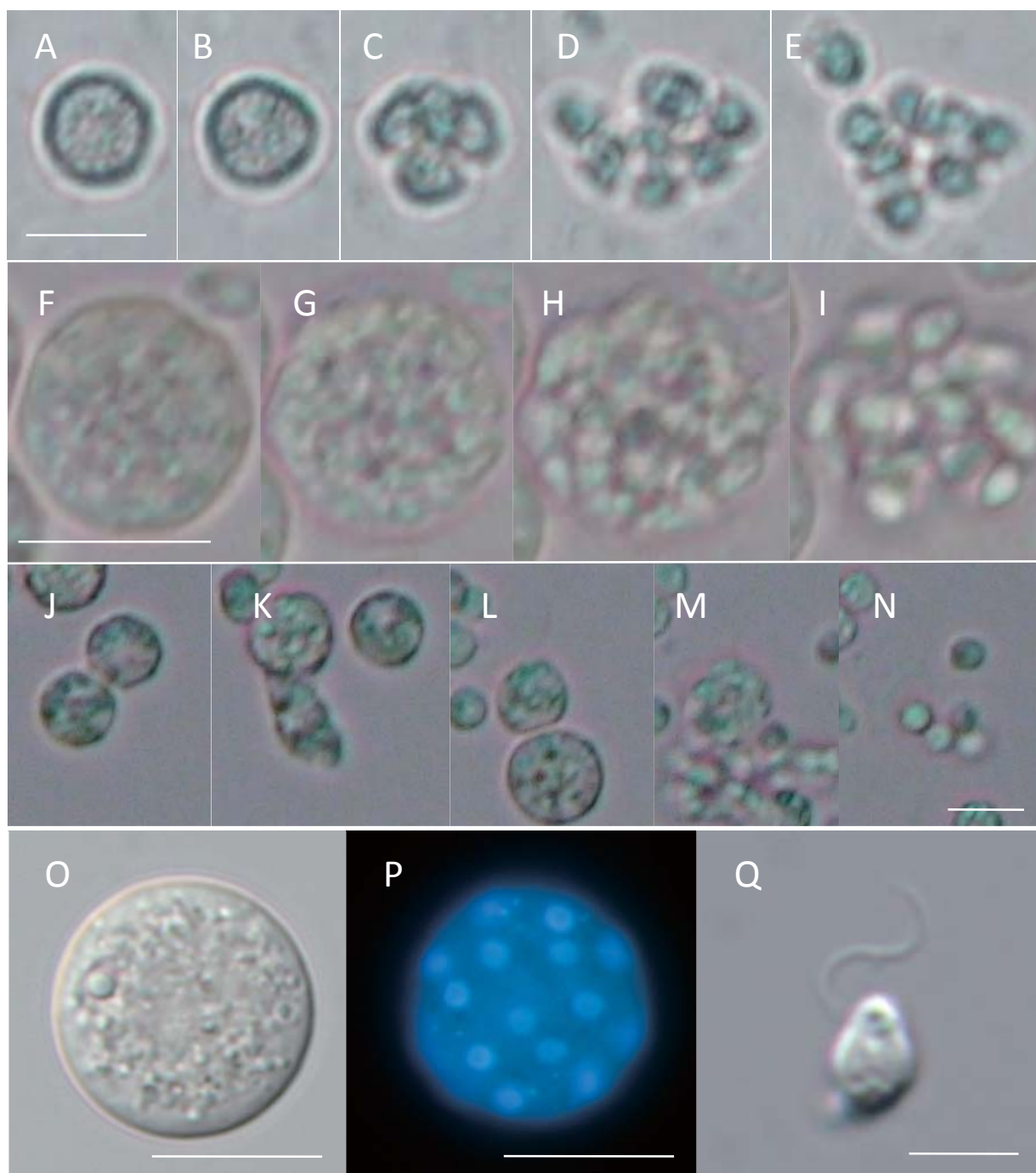


図14 SEK 605株の形態観察 (d-GPY 培地)

A-E 栄養細胞が成長を伴わない2分裂を繰り返す遊走子形成 スケールは10  $\mu$ m F-J 遊走子嚢が一度に細胞質分裂する遊走子形成 スケールは10  $\mu$ m J-N 運動性がある不定形細胞が遊走子形成をするまでの流れ スケールは10  $\mu$ m A 栄養細胞 B 2細胞 C 4細胞 D 8細胞 E 遊走子放出 F 遊走子嚢 G-I 細胞質分裂 J 遊走子放出 K 遊走子嚢 L 不定形細胞 M 不定形細胞が丸くなる N 細胞質分裂 O 遊走子放出後、細胞壁が残る P 遊走子 スケールは5  $\mu$ m Q 遊走子嚢 スケールは10  $\mu$ m R 遊走子嚢 (DAPI) スケールは 5  $\mu$ m

表1 各サンプリング地点で採取した基質と株の分離数

サンプリング地点	緑藻	紅藻	その他	分離数 (株)
ウッズホール (アメリカ、2014年)	アオサ, ミル, シオグサ	イギス	表層水, アマモ, 砂	1105
ウッズホール (アメリカ、2015年)	アオサ, ミル, シオグサ	イギス	表層水, アマモ, 砂	48
マーザスビニヤード島 (アメリカ)	アオサ, ミル	イギス	表層水, アマモ, 砂	8
スワンスコット (アメリカ)	シオグサ, ミル	-	表層水, 砂	8
太海海岸 (千葉県)	シオグサ, アオサ	マクサ, ムカデノリ	表層水	15
沖の島 (千葉県)	ミル	ハネイギス, マクサ, スギノリ	表層水, アマモ	37
金沢八景 (神奈川県)	ハネモ	オゴノリ	-	69
室蘭 (北海道)	ハネモ	-	表層水	168
蘭島海水浴場 (北海道)	-	-	表層水, ツルモ, アマモ	24
忍路臨海実験所前	シオグサ		表層水	32
石狩海水浴場 (北海道)	-	-	表層水, 砂	7
若狭町 (福井県)	ハネモ	-	-	10
下田 (静岡県)	シオグサ	-	表層水	0
大洗 (茨城県)	オオハネモ, アオサ	-	表層水	0
			合計	1531

表2 系統解析を行ったサンプリング株

系統群名	株名	サンプリング場所
<i>Aplanochytrium kergulense</i> group	Mu-Wp-05d	北海道, 室蘭
<i>Aplanochytrium kergulense</i> group	WH2-Sc-03d	アメリカ, ウッズホール (2014年)
<i>Aplanochytrium kergulense</i> group	WH2-Sc-04d	アメリカ, ウッズホール (2014年)
<i>Aplanochytrium minutum</i> group	WH10-S4c-02d	アメリカ, ウッズホール (2015年)
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	WH9-Wc-01d	アメリカ, ウッズホール (2015年)
<i>Oblongichytrium</i> sp. 1	F-A01-06d, SEK751	千葉県, 太海海岸
<i>Oblongichytrium</i> sp. 1	N-A02-31d	神奈川県, 金沢八景
<i>Oblongichytrium</i> sp. 1	Mu-Wp-03d	北海道, 室蘭
<i>Oblongichytrium</i> sp. 1	Os-A01c-07d	北海道, 忍路臨海実験所前
<i>Oblongichytrium</i> sp. 1	WH2-Wc-03d	アメリカ, ウッズホール (2014年)
<i>Oblongichytrium</i> sp. 1	WH3-S1c-03d	アメリカ, ウッズホール (2014年)
<i>Oblongichytrium</i> sp. 1	WH10-Mp-01d	アメリカ, ウッズホール (2015年)
<i>Oblongichytrium</i> sp. 2	Ra-A01p-05d	北海道, 蘭島海水浴場
<i>Oblongichytrium</i> sp. 2	Mu-A01p-04d	北海道, 室蘭
<i>Oblongichytrium</i> sp. 2	WH5-Wp-01d	アメリカ, ウッズホール (2014年)
<i>Schizochytrium</i> sp.	Os-Wc-08d	北海道, 忍路臨海実験所前
thel2 株系統群	N-A02-28d	神奈川県, 金沢八景
<i>Thraustochytrium aggregatum</i>	WH6-Wp-02d	アメリカ, ウッズホール (2014年)
<i>Thraustochytrium kinnei</i>	F-A01-03d, SEK749	千葉県, 太海海岸
<i>Thraustochytrium kinnei</i>	O-A01-06d	千葉県, 沖の島
<i>Thraustochytrium kinnei</i>	N-A01-01d	神奈川県, 金沢八景
<i>Thraustochytrium kinnei</i>	Mu-A01c-05d	北海道, 室蘭
<i>Thraustochytrium kinnei</i>	Ra-A01c-12d	北海道, 蘭島海水浴場
<i>Thraustochytrium kinnei</i>	WH1-Wp-03d	アメリカ, ウッズホール (2014年)
<i>Thraustochytrium striatum</i> 1	WH3-Wp-02d	アメリカ, ウッズホール (2014年)
<i>Thraustochytrium striatum</i> 1	WH9-S2p-03d	アメリカ, ウッズホール (2015年)
<i>Thraustochytrium striatum</i> 2	O-A04-04d	千葉県, 沖の島
<i>Ulkenia</i> sp.	WH9-Wp-08d	アメリカ, ウッズホール (2015年)
未同定系統群2	Ra-Wp-05d	北海道, 蘭島海水浴場
未同定系統群2	Is-Wp-02d	北海道, 石狩浜海水浴場
未同定系統群2	WH1-Wp-01d	アメリカ, ウッズホール (2014年)
<i>Monorhizochytrium globosum</i> (未同定系統群3a)	F-A01-12d, SEK671	千葉県, 太海海岸
未同定系統群3a	N-A02-16d	神奈川県, 金沢八景
未同定系統群3a	Os-Wp10d	北海道, 忍路臨海実験所前
未同定系統群3a	WH5-S1c-05d	アメリカ, ウッズホール (2014年)
未同定系統群7	N-A01-08d	神奈川県, 金沢八景
未同定系統群7	WH3-S1p-05d	アメリカ, ウッズホール (2014年)

表3 次世代シーケンサー解析で検出されたDNA配列の情報まとめ

Phylogenetic name	Number of OTUs	Bootstrap(Pairwise)	Top hit of Blast	Sequence similarity (%)	selected OTU for Blast		
<i>Aplanochytrium</i> spp.	2757	97	Uncultured microeukaryote clone E-31 (KC851756)	92	denovo163153		
		58	Uncultured eukaryote clone D4P08D11(EF100352)	97	denovo25583		
		26	Uncultured stramenopile clone G0Esp_50_9(KC911766)	98	denovo80630		
		85	Uncultured eukaryote clone SGUH1164(KJ762899)	95	denovo40279		
		37	Labyrinthuloides minuta 16S-like(L27634)	94	denovo33411		
		67	Labyrinthuloides minuta 16S-like(L27634)	91	denovo128760		
		84	Uncultured stramenopile clone G0Esp_50_9	94	denovo33623		
		81	Labyrinthuloides minuta 16S-like(L27634)	95	denovo26763		
		46	Uncultured eukaryote clone D4P08A04(EF100337)	96	denovo57364		
		99	Uncultured eukaryote clone 66F(FJ486008)	99	denovo41482		
		5	Uncultured eukaryote clone SGUH1164(KJ762899)	94	denovo90659		
		30	Uncultured eukaryote clone SGUH1164(KJ762899)	93	denovo99798		
		17	Uncultured eukaryote clone SGUH1164(KJ762899)	97	denovo87788		
		61	Uncultured eukaryote clone 66F(FJ486008)	96	denovo173354		
		68	Uncultured eukaryote clone SGUH1164(KJ762899)	94	denovo98576		
		25	Uncultured eukaryote clone SGUH1164(KJ762899)	89	denovo3975		
		30	Uncultured eukaryote clone SGUH1164(KJ762899)	93	denovo116290		
		86	Uncultured eukaryote clone SGUH1164(KJ762899)	88	denovo135741		
		94	Uncultured microeukaryote clone E-31 (KC851756)	93	denovo101039		
		<i>Oblongichytrium</i> spp.	991	12	Uncultured labyrinthulid clone PJS101305 (FJ800651)	99	denovo100957
				96	Schizochytrium minutum (AB022108)	98	denovo129780
				48	Oblongichytrium sp. SEK 599 (AB973539)	97	denovo134067
				65	Thraustochytrium multirudimentale (AB022111)	95	denovo163939
				84	Oblongichytrium sp. CAP-2014 (KJ513674)	97	denovo27776
				100	Uncultured labyrinthulid clone PBW102907_31 (FJ800623)	95	denovo129631
				100	Uncultured eukaryote clone MS605-62 (HM369677)	99	denovo22115
100	Thraustochytrium multirudimentale (AB022111)			90	denovo81714		
100	Thraustochytrium multirudimentale (AB022111)			91	denovo141122		
96	Uncultured labyrinthulid partial 18S rRNA gene, clone BIO2 (FN598249)			96	denovo77875		
97	Uncultured labyrinthulid partial 18S rRNA gene, clone BIO2 (FN598249)			96	denovo57287		
100	Uncultured labyrinthulid partial 18S rRNA gene, clone BIO2 (FN598249)			96	denovo92899		
100	Uncultured labyrinthulid partial 18S rRNA gene, clone BIO2 (FN598249)			95	denovo12229		
31	Uncultured eukaryote 18S rRNA, partial sequence, clone: RM2-SGM55 (AB505563)			98	denovo24879		
99	Thraustochytrium multirudimentale (AB022111)			94	denovo19017		
92	Thraustochytrium multirudimentale (AB022111)			93	denovo153300		
79	Thraustochytrium multirudimentale (AB022111)			94	denovo77487		
<i>Labyrinthula</i> spp.	832			100	Labyrinthula sp. (AF265332)	90	denovo82836
				100	Labyrinthula sp. (AB022105)	91	denovo62120
		80	Uncultured eukaryote clone QZ (KT201567)	93	denovo145672		
		100	Uncultured marine eukaryote clone ME (GU385675)	99	denovo83180		
		53	<i>Schizochytrium limacinum</i> (HM042906)	99	denovo144067		
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	10	53	<i>Schizochytrium limacinum</i> (HM042906)	99	denovo144067		
<i>Thraustochytrium globosum</i>	1	100	Thraustochytridae sp. SEK 699(AB973554)	99	denovo88652		
<i>Thraustochytrium striatum</i> 1	1	95	Thraustochytrium striatum (AB022112)	98	denovo98604		
environment thraustochytrid 1	38	82	Uncultured labyrinthulid clone BBW042908 (FJ800589)	99	denovo108905		
未同定系統群1	2	50	Thraustochytridae sp. SEK 692 (AB973547)	99	denovo18203		
<i>Thraustochytrium aureum</i>	2	98	Thraustochytrium aureum (AB022110)	99	denovo106916		
<i>Ulkenia</i> spp.	3	95	Ulkenia visurgensis (AB022116)	99	denovo83388		
<i>Thraustochytrium kinnei</i>	1	94	Thraustochytrium kinnei (KT716334)	99	denovo17200		
<i>Parietichytrium</i> sp.	2	100	Parietichytrium sp. TF77 (KM023707)	98	denovo114745		
New clade 1	6	100	Thraustochytridae sp. SEK 701 (AB973556)	85	denovo140191		
New clade 2	14	100	Thraustochytridae sp. SEK 701 (AB973556)	85	denovo124858		
New clade 3	1	100	Thraustochytridae sp. strain H41 (DQ459556)	87	denovo161623		
New clade 4	16	93	Thraustochytrium striatum (AB022112)	85	denovo25523		
New clade 5	4	100	Labyrinthuloides haliotidis (U21338)	80	denovo171182		
New clade 6	5	100	Thraustochytrium striatum (AB022112)	84	denovo137931		
New clade 7	3	100	Thraustochytrium striatum (AB022112)	89	denovo134588		

表4 ヤブレッツボカビ類の分類形態のまとめ

Taxon	Vegetative cell				Sporogenesis							Reference
	(T): type species	Binary division	Ectoplasmic nets	Apothysis	Type of spore	Amoeboid cell	Number of proliferous body	Persistence of cell wall	Spore formation			
<b>Family Thraustochytriaceae</b>												
<b><i>Monorhizochytrium</i> gen. nov. (= unidentified thraustochytrid 3a = UT3a)</b>												
<i>M. globosum</i> (T)	-	+	-	-	Zoospore	-	-	+/-	Zoosporangium Direct forming	-	-	This study
<b>Genus <i>Thraustochytrium</i> Sparrow (1936)</b>												
<i>T. proliferum</i> (T)	-	+	+/-	-	Non-ciliate spore (developing flagella after releasing several hours)	-	1	+/-	Zoosporangium	-	-	Sparrow 1936; Johnson 1957
<i>T. pachydermum</i>	-	+	-	-	Non-ciliate spore (developing flagella after releasing then)	-	-	+	Zoosporangium	-	-	Scholz 1958
<i>T. motivum</i>	-	+	-	-	Zoospore	-	1	-	Zoosporangium	-	-	Goldstein 1963a
<i>T. aureum</i>	-	+	-	-	Zoospore	-	1	-	Zoosporangium	-	-	Goldstein 1963b
<i>T. roseum</i>	-	+	-	-	Zoospore	-	-	+	Zoosporangium	-	-	Goldstein 1963c
<i>T. aggregatum</i>	+	+	-	-	Zoospore	-	-	-	Zoosporangium	-	-	Ulken 1965; Gaertner 1968; Konno 1972
<i>T. kinnei</i>	-	+	-	-	Zoospore	-	1	+/-	Zoosporangium	-	-	Gaertner 1967, 1970
<i>T. striatum</i>	-	+	-	-	Zoospore	-	-	+/-	Zoosporangium	-	-	Schneider 1967; Sparrow 1969; Harrison & Jones 1974
<i>T. arudimentale</i>	-	-	-	-	Zoospore	-	-	+	Zoosporangium	-	-	Artemchuk 1972
<i>T. antarcticum</i>	-	+	-	-	Zoospore	-	1	-	Zoosporangium	-	-	Bahnweg & Sparrow 1974
<i>T. rossii</i>	-	+	-	-	Zoospore	-	5-50	+	Zoosporangium	-	-	Bahnweg & Sparrow 1974
<i>T. kerguelense</i>	-	+	-	-	Zoospore	-	3-10	-	Zoosporangium	-	-	Bahnweg & Sparrow 1974
<i>T. indicum</i>	-	+	-	-	Zoospore	-	-	+	Zoosporangium	-	-	Chakravarty 1979
<i>T. benthicola</i>	-	+	-	-	Zoospore	-	1	+	Zoosporangium	-	-	Raghukumar 1980
<i>T. gaertnerium</i>	-	+	-	-	Zoospore	+	1	-	Zoosporangium	-	-	Bongiommi et al. 2005

<i>T. caudivorum</i>	-	+	-	-	+	Zoospore	+	-	-	-	Zoosporangium	Schärer et al. 2007
<b>Genus <i>Japonochytrium</i> Kobayasi et Ookubo (1953)</b>												
<i>J. marinum</i> (T)	-	+	+	+	-	Zoospore	-	-	-	+	Zoosporangium	Kobayashi & Ookubo 1953
<b>Genus <i>Schizochytrium</i> Goldstein et Belsky (1964)</b>												
<i>S. aggregatum</i> (T)	+	+	-	-	-	Zoospore	-	-	-	-	Zoosporangium	Goldstein & Belsky 1964
<b>Genus <i>Ulkenia</i> Gaertner (1977)</b>												
<i>U. visurgensis</i> (T)	-	+	-	-	+	Zoospore	+	-	-	-	Zoosporangium	Ulken 1965
<i>U. amoeboides</i>	+	+	-	-	+	Zoospore	+	-	-	+	Zoosporangium	Gaertner 1977
<i>U. profunda</i>	-	+	-	-	+	Zoospore	+	1-5	-	-	Zoosporangium	Gaertner 1977
<b>Genus <i>Aurantiochytrium</i> Yokoyama et Honda (2007)</b>												
<i>A. limacinum</i> (T)	+	+	-	-	+	Zoospore	+	-	-	-	Zoosporangium	Honda et al. 1998
<i>A. mangrovei</i>	+	+	-	-	+	Zoospore	+	-	-	-	Zoosporangium Direct foming	Raghukumar 1988a
<b>Genus <i>Botryochytrium</i> Yokoyama, Salleh et Honda (2007)</b>												
<i>B. radiatum</i> (T)	-	+	-	-	-	Zoospore	+	-	-	-	Zoosporangium	Yokoyama et al. 2007
<b>Genus <i>Parietichytrium</i> Yokoyama, Salleh et Honda (2007)</b>												
<i>P. sarkarianum</i> (T)	-	+	-	-	-	Zoospore	+	-	-	+	Zoosporangium	Yokoyama et al. 2007
<b>Genus <i>Sicyodochytrium</i> Yokoyama, Salleh et Honda (2007)</b>												
<i>S. minutum</i> (T)	+	+	-	-	-	Zoospore	+	1	-	-	Zoosporangium	Gaertner 1977; Yokoyama et al. 2007
<b>Family Althorniaceae</b>												
<b>Genus <i>Althornia</i> Jones et Alderman (1971)</b>												
<i>A. crouchii</i> (T)	-	-	-	-	-	Zoospore	-	-	-	+	Zoosporangium	Jones & Alderman 1971



**Family Aplanochytriaceae**

**Genus *Aplanochytrium* Bahnweg et Sparrow (1972)**

<i>A. kerguelense</i> (T)	-	+	-	-	-	-	-	-	Sporangium	Bahnweg & Sparrow 1972; Leander <i>et al.</i> 2004 Watson & Raper 1957
<i>A. minutum</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	Sporangium	
<i>A. yorkense</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	Sporangium Zoosporangium (?)	Perkins 1973; Leander <i>et al.</i> 2004 Quick 1974a
<i>A. saliens</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	Sporangium	Quick 1974a
<i>A. thaisaii</i>	+	+	-	-	-	+	-	+/-	Sporangium	Cox & Mackin 1974
<i>A. schizochytrrops</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	Sporangium	Quick 1974b
<i>A. halloidis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	Sporangium	Bower 1987
<i>A. stocchinoi</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	Sporangium	Moro <i>et al.</i> 2003
<i>A. blankum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	Sporangium	FioRito <i>et al.</i> 2016

**Family Oblongichytriaceae**

**Genus *Oblongichytrium* Yokoyama et Honda (2007)**

<i>O. minutum</i> (T)	+	+	-	-	-	-	-	-	Zoosporangium	Gaerther 1981
<i>O. multirudimentale</i>	+	+	-	-	-	-	2-4	+	Direct forming Zoosporangium	Goldstein 1963a
<i>O. octosporum</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	Zoosporangium	Raghukumar 1988b
<i>O. porteri</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	Sporangium	FioRito <i>et al.</i> 2016

**Family *incertae sedis***

**Genus *Stellarchytrium* FioRito et Leander (2016)**

<i>S. dubium</i> (T)	-	+	-	-	-	-	-	-	Zoosporangium	FioRito <i>et al.</i> 2016
----------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---------------	----------------------------

1. Absence ectoplasmic nets of vegetative cells	Family Althorniidae <i>Althornia</i>
1. Presence movement of vegetative cells utilizing ectoplasmic nets	Family Aplanochytriidae <i>Aplanochytrium</i>
1. Presence of amber pigmented or colorless and with a single apical nucleus in protoplasm of vegetative cell	Family incertae sedis <i>Stellarchytrium</i>
1. Oblong zoospores observed	Family Oblongichytriidae <i>Oblongichytrium</i>
1. Developing ectoplasmic nets of vegetative cell and ovoid or reniform zoospores observed	Family Thraustochytriaceae <i>Japonochytrium</i>
2. Presence apophysis of vegetative cell	3
2. Absence apophysis of vegetative cell	
3. Presence successive binary division of protoplasm of vegetative cell developing new vegetative cell	<i>Aurantiochytrium, Schizochytrium</i> <i>Thraustochytrium aggregatum</i>
3. Absence successive binary division of protoplasm of vegetative cell developing new vegetative cell	4
4. Amoeboid-like cell observed	<i>Botryochytrium, Parietichytrium</i> <i>Sicyoidochytrium Thraustochytrium</i> ( <i>T. gaertnerium, T. caudivorum</i> ) <i>Ulkenia</i>
4. Amoeboid-like cell not observed	5
5. Remaining proliferous body in zoosporangium after releasing zoospores	<i>Thraustochytrium (T. antarcticum, T. aureum, T. benthicola, T. kergulensis, T. kinnei, T. motivum, T. proliferum, T. kergulensis, T. rossii )</i>
5. Not remain proliferous body in zoosporangium after releasing zoospores	6
6. Releasing mass of external zoospores in zoosporangium	<i>Thraustochytrium arudimentale</i>
6. Not release mass of external zoospores in zoosporangium	7
7. Protruding external wall of 1-4 sites in vegetative cell	<i>Thraustochytrium indicum</i>
7. Not protrude external wall in vegetative cell	8
8. Thin cell wall, not swelling spots on the membrane of ectoplasmic nets, and not radial cleavage of protoplasm in zoosporangium. In addition, not locate phylogenetic positions following three species.	<b><i>Monorhizochytrium globosum</i></b> <b>gen. et sp. nov. (formerly</b> <b><i>Thraustochytrium globosum</i>)</b>
8. Thick cell wall, swelling spots on the membrane of ectoplasmic nets, or radial cleavage of protoplasm in zoosporangium. In addition, not locate phylogenetic position the genus <i>Monorhizochytrium</i> .	<i>Thraustochytrium (T. pachydermum, T. roseum, T. striatum)</i>

表5 ヤブレッツボカビ類の検索表

表6 図7で系統解析に使用した株のリスト

Taxon	Strain name	アクセッション番号
<b>Genus <i>Aurantiochytrium</i></b>		
<b><i>Aurantiochytrium mangrovei</i> を含む系統群</b>		
<i>Aurantiochytrium mangrovei</i>	SEK 414	-
<i>Aurantiochytrium mangrovei</i>	SEK 217	AB290572
<i>Aurantiochytrium mangrovei</i>	ATCC 20888	DQ367050
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	SEK 218	AB290573
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	18W 13a	AB636147
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	BURABG162	DQ100295
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	KH105	AB052555
未同定株を含む系統群		
<i>Aurantiochytrium immobile</i>	SEK 605	-
<i>Aurantiochytrium immobile</i>	SEK 243	AB073308
<i>Aurantiochytrium immobile</i>	ATCC 26185	FJ821482
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	08-085-13y	-
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	SEK 634	-
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	SEK209	AB290574
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	CHN-1	AB126669
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	BL8	FJ821482
<b><i>Aurantiochytrium limacinum</i> を含む系統群</b>		
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	ATCC MTA-1381	-
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	SEK 398	-
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	mh0186	AB362211
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	RCC 893	DQ367049
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	BL11	FJ821478
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	KRS101	HM126528
<b>Out group</b>		
<i>Thraustochytrium aureum</i>	ATCC 34304	AB022110

表7 観察を行った株の形態形質のまとめ

Taxon	<i>A. mangrovei</i>	<i>A. mangrovei</i>	<i>A. mangrovei</i>	<i>A. mangrovei</i>	<i>A. immobile</i>	<i>A. immobile</i>	<i>A. immobile</i>
Strain name	SEK 414	SEK 217	ATCC 20888	SEK 605	SEK 243	ATCC 26185	
size of zoospore (μm)	3.7 - 5.7 × 2.2 - 3.8	3.7 - 5.9 × 2.1 - 3.8	4.1 - 5.8 × 2.9 - 4.1	3.2 - 5.3 × 2.2 - 3.5	3.3 - 5.9 × 2.3 - 3.9	3.9 - 6.0 × 3.1 - 4.2	
2分裂を繰り返す遊走子形成(貧)	+	+	+	-	-	-	
2分裂を繰り返す遊走子形成(富)	+	+	+	+	+	+	
一度に細胞質分裂を行う遊走子形成(貧)	+	+	+	+	+	+	
一度に細胞質分裂を行う遊走子形成(富)	+	+	+	+	+	+	
不定形細胞の運動性	+	+	+	-	-	-	

Taxon	<i>A. limacinum</i>	<i>A. limacinum</i>	<i>A. limacinum</i>	<i>A. limacinum</i>
strain name	ATCC MTA-1381	SEK 398	mh0186	RCC 893
size of zoospore (μm)	4.6 - 7.9 × 2.9 - 4.8	4.6 - 8.4 × 3.0 - 5.1	4.2 - 7.4 × 2.7 - 4.6	4.6 - 8.8 × 3.1 - 5.3
2分裂を繰り返す遊走子形成(貧)	-	-	-	-
2分裂を繰り返す遊走子形成(富)	-	-	-	-
一度に細胞質分裂を行う遊走子形成(貧)	+	+	+	+
一度に細胞質分裂を行う遊走子形成(富)	+	+	+	+
不定形細胞の運動性	+	+	+	-