微細構造の三次元的な理解による灰色植物の分類体系の実現を目指して

高橋紀之¹, 野崎久義¹

¹ 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

要旨: 灰色植物は一次植物の最も原始的な形態を保持する系統群として全ゲノム解析を含めた研究が実施されているが、分類学的研究は他の2系統である緑色植物や紅色植物に比べ大きく遅れをとってきた。微細藻類の種を形態的に認識するには電子顕微鏡レベルの情報が有用と考えられるが、灰色植物においては、断片的な情報しか得られない従来の電子顕微鏡法だけでは、光学顕微鏡を超えた微細構造上の分類形質の発見は困難であった。そこで我々は特に原形質体表層の外被構造に着目し、次世代の超微細形態観察を含む複数の電子顕微鏡法による観察を実施した。電界放出形走査電子顕微鏡 (FE-SEM) と透過電子顕微鏡 (TEM) を併用した詳細な形態観察によって、灰色植物の一種である *Cyanophora* 属においては、細胞表面全体を覆う嶺により縁どられた模様が認められ、この嶺は細胞膜を裏打ちする小葉状の扁平小胞の境界における反り上がりによって形成されていることがわかった。またこの様な微細構造の差異により、*Cyanophora biloba* と新種 *C. sudae* を識別することができた。一方、厚い細胞壁で覆われた *Glaucocystis* 属の細胞外被は、FE-SEM で直接比較するのは困難であり、超高圧電子顕微鏡による三次元 (3D) 観察を試みた。この結果、*Cyanophora* と同様の *Glaucocystis* の細胞膜と扁平小胞の立体配置が描出され、さらにこの3D微細構造の多様性が明らかになった。これらの結果から、2属に共通する「細胞膜の内側で小葉状の扁平小胞が密に裏打ちする」外被立体微細構造をもつ *Cyanophora* 様の鞭毛虫こそが灰色植物の共通祖先の姿であり、更には最初の一次植物にまで遡るとも推測された。

Toward the establishment of glaucophyte taxonomic system based on the three-dimensional recognition of ultrastructures

Toshiyuki Takahashi¹, Hisayoshi Nozaki¹

¹ Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033 Japan
Author for correspondence: T. Takahashi, tosijuci@bs.s.u-tokyo.ac.jp

Summary: Glaucophytes are one of the three major lineages of primary photosynthetic eukaryotes (Archaeplastida), together with red algae and Chloroplastida (green algae and embryophytes). Within Archaeplastida, glaucophytes are thought to retain ancestral features of the first photosynthetic eukaryote. The biflagellate glaucophyte genus *Cyanophora* has been widely studied as a model organism of primitive phototrophs, with released nuclear genome sequence, but no morphological study has clearly shown ultrastructural diversity to delimit glaucophyte species. Recently, we applied advanced electron microscopic (EM) methodologies for comparative morphology in a purpose of delineating the glaucophyte species. On the basis of ultra-high resolution field emission scanning EM (FE-SEM), we demonstrated that the cell surface of *Cyanophora* was ornamented with angular fenestrations framed by ridges. As supported by observation using several transmission EM methods, these ridges were formed by the edges of overlapping or attaching outermost plate vesicles that distributed throughout the cell periphery just underneath the cell membrane. Based on differences in the pattern of surface ornamentations detected by FE-SEM, *Cyanophora biloba* and *C. sudae* were distinguished from each other. FE-SEM, however, cannot be applied for the native protoplast surfaces that are enclosed by a thick cell wall or extracellular matrix as in the immotile glaucophyte genus *Glaucocystis*. Alternatively, we very recently used the advanced ultra-high voltage EM tomography to unveil the *in situ* peripheral ultrastructure of protoplasts in *Glaucocystis* and revealed the ultrastructural diversity in this genus. Furthermore, *Glaucocystis* cells have numerous, leaflet-like flattened vesicles distributed throughout the protoplast periphery just underneath the cell membrane, as in *Cyanophora* as well as some secondary photosynthetic eukaryotes. Thus, a similar 3D peripheral ultrastructure might have appeared in the common ancestor of glaucophytes and/or the first photosynthetic eukaryote.

Key words: *Cyanophora*, flattened vesicles, field emission scanning electron microscopy, Glaucophyta, taxonomy, ultrastructure

はじめに

現生の一次植物 Archaeplastida (Adl et al. 2005, 2012), または植物界 Plantae *sensu* Caval.-Sm. (1981) は、10–20 億年前の中生代頃頃に起きた、光合成を行わない原生生物に光合成細菌シアノバクテリアが取り込まれ色素体となった、一次共生と呼ばれるイベントによって成立したと考えられている (Sagan 1967)。このような一次植物は3つの系統群からなるのだが、この内、紅色植物が広く海洋に分布

し、緑色植物が陸上に迄進出しているのに対し、残る灰色植物 (図1) は単細胞～群体性の淡水産微細藻の稀産種が20種程度知られているに過ぎない (Kies 1992)。しかし、灰色植物は色素体の色素組成や形態がシアノバクテリアに極めて類似しており、一次植物の最も原始的な形態を保持する系統群として葉緑体分裂の研究や全ゲノム解析が実施されている (e.g., 佐藤ら 2009, Sato et al. 2009, Price et al. 2012, Spiegel 2012)。

このように灰色植物は、一次植物の起源を研究する上で重要であると考えられる。しかし、複雑な多細胞体が進化している紅色植物と緑色植物に関しては、Linnaeus (1753) 以前から既に多くの研究者によって様々な手法で種レベルの分類が行われてきた (e.g., 李 1596) のに対して、灰色植物の種レベルの分類は今日まで大きく立ち遅れていた。灰色植物の種分類学的研究では野外試料を直接用いた光学顕微鏡観察・記載が中心で、クローン株レベルの形態学的多様性については殆ど研究されておらず、分子情報も用いられていなかった (Takahashi et al. 2014a)。灰色植物の微細構造の研究はいくつかあったが、微細構造上の差異については殆ど報告されていなかった。そこで我々は灰色植物の客観的かつ全世界レベルの種レベルの分類体系を構築することを目的とし、再現性のある材料として世界の株保存機関の保存培養株を入手し、独自に確立した新規株を加えて、分子系統解析と比較形態観察を実施した (Takahashi et al. 2014a)。形態比較では光学顕微鏡観察と従来の電子顕微鏡による観察に加え、近年生物学に応用され始めた新しい電子顕微鏡法による比較観察を実施した (Takahashi et al. 2014a, 2014b, 2015)。最新の電子顕微鏡機器を用いることで、微細な灰色植物であっても巨視的な植物と同様に形態学的に種が分類できると期待したからである。特に原形質体表層の外被構造に着目した形態比較の結果、種を識別する微細構造上の形態的多様性が灰色植物2属 (図1) で明らかとなった。

Cyanophora 属の分類学的問題点

Kies and Kremer (1986) によれば、灰色植物は灰色植物門 Glaucophyta 灰色藻綱 Glaucophyceae から構成され、鞘被性、厚膜球状、遊泳性という大きく異なる形態形質によって3目に分類されている。*Cyanophora* 属 (図1) は単細胞遊泳性の目 Cyanophorales に所属し、*C. paradoxa*、*C. tetracyanea*、*C. biloba* の3種が記載されていた (Kugrens et al. 1999)。本属のなかで種の名前が記載で用いられた培養株 (正統株) が維持

されていたのは *C. biloba* (UTEX 2766) のみであり、他の2種の原記載は野外試料の顕微鏡観察だけにに基づいていた。これら2種と表示されている保存株は存在するが、培養株を用いた形態情報と分子情報に基づく種分類学的な研究は行われていなかった (Takahashi et al. 2014a)。そこで我々は *C. biloba* 正統株を含む本属と表示されている保存株7株を世界各地から入手し用いた。更に、本州各地から野外試料を採取し、土壌浸出法によって新規株の確立を試みた結果、奈良県生駒市の土壌試料から *Cyanophora* 属の新規培養株を確立することに成功したため、合わせて用いた。

Cyanophora 属の顕微鏡観察

培養株の顕微鏡レベルの形態比較を実施した結果、単細胞性の *Cyanophora* 属にも明瞭な識別点が存在した (図2, Takahashi et al. 2014a)。腹側から見て細胞の中央に深い溝が走り左右の両葉に分かれる双葉性の株 (図2E-H) と、この様な葉の分化の見られない単葉性の株 (図2A-D) とに分類された。分子系統解析の結果 (図3)、この葉の有無は *Cyanophora* 属を系統的に2分する形態的特徴であることが分かった。

双葉群では、新種 *C. sudae* が成熟細胞の色素体の数が通常4個であり (図2E)、通常2個の *C. biloba* (図2G) と区別されるが、色素体の数は変異があり、また他の点で両種を更に明確に識別するのは光学顕微鏡レベルの情報だけでは困難であった。

単葉群内の分類はさらに難航を極めた。分子情報からは複数の隠蔽種を含む程度の遺伝的多様性が存在すると示唆されたにもかかわらず、すべての株が基本的には *C. paradoxa* としか同定できなかった。双葉群で比較的安定していた色素体の数や分裂様式も単葉群ではクローン株内で非常にばらついていた。また、単葉群では細胞の形状についても光学顕微鏡のみで種レベルの差異を明らかにすることはできなかった。

図1 *Cyanophora* 属 (A, B) と *Glaucocystis* 属 (C, D) の模式図 (A, C) と微分干渉光学顕微鏡写真 (B, D)。

図2 *Cyanophora* 属5種の微分干渉光学顕微鏡写真。Bar = 10 µm。af = 前鞭毛; pf = 後鞭毛; c = 色素体; n = 核; s = 澱粉粒; v = 収縮胞。(A) *C. paradoxa* の側方観。(B, D) 新種 *C. cuspidata* の側方観 (B) と横断面 (D)。(C) 新種 *C. kugrensis* の側方観。(E, F, H) 新種 *C. sudae* の色素体が4個の側方観 (E)、色素体が2個の側方観 (F)、横断面 (H)。(G) *C. biloba* の側方観。Takahashi et al. (2014a) より転用した。John Wiley and Sons の転載許可による (License Number: 3771700412358)。

図3 *psbB* 最尤法系統樹. *Cyanophora* 5種は形態で認識できる単葉群・双葉群に分かれた. Takahashi et al. (2014a) より引用・改変した. John Wiley and Sonsの転載許可による (License Number: 3771700412358).

Cyanophora 属の電界放出形走査電子顕微鏡観察

Cyanophora は細胞壁をもたず、プレートを含む扁平小胞であるプレート小胞が細胞膜を裏打ちする細胞外被をもつことは知られていたが、従来の走査電子顕微鏡 (SEM) では細胞表面の微細構造は明らかではなかった (Kugrens et al. 1999). 我々は SEM 観察の条件検討を行ない、低加速電圧での観察で *C. paradoxa* の細胞外被表面の微細構造を明らかにすることに成功した (図 4A-C, Takahashi et al. 2014b). しかし汎用 SEM では殊に低加速電圧域で分解能が低かったため (図 4B, C), 低加速電圧でも高解像度の観察が可能な超高分解能電界放出形走査電子顕微鏡 (FE-SEM) による表面観察を実施した (図 4D, E). この結果、細胞表面全体を覆う、嶺により縁どられた模様が認められた. 超薄切片透過電子顕微鏡 (TEM) 観察により、嶺はプレート小胞の境界における反り上がりによって形成されていることが分かった. そこでこの低加速電圧 FE-SEM 法と超薄切片 TEM による形態比較を全株で行なった (図 5). その結果、この様な外被微細構造は *Cyanophora* 属に共通する特徴であることが分かった (Takahashi et al. 2014a).

双葉群において細胞背側でこの表面の模様を比較したところ、*C. biloba* で 4~5 角形~扇型であるのに対し、*C. sudae* では 5~6 角形のハニカム構造様であった (図 5D, E). フリーズフラクチャ (凍結切断) TEM によって細胞膜を剥がして観察した結果、SEM で観察される外被の模様が内部のプレート小胞の形態を反映していることが明らかとなった (図 6).

単葉群 6 株のなかで、新種 *C. cuspidata* ではしばしば細胞後端が非常に鋭く尖った尾を有する点で区別できた (図 5B, G). この尾は光顕レベルでは多様な細胞形状の中で認知する事が困難であった形質であったが、低加速電圧 FE-SEM 法では非常に鋭利であり、本種に固有である事が明瞭に示された. 更に光顕と異なり細胞の輪郭が明瞭な SEM 写真上で詳細な細胞形状として多数の個体の細胞長

図4 *Cyanophora paradoxa* の走査電子顕微鏡 (SEM) 法の比較. Bar = 5 μm. (A) 四酸化オスミウム単固定、汎用 SEM 像、加速電圧 15 kV. (B) 四酸化オスミウム単固定、汎用 SEM 像、加速電圧 5 kV. 低加速電圧で表面構造が現れた. (C) 四酸化オスミウム・グルタルアルデヒド二重固定、汎用 SEM 像、加速電圧 5 kV. 固定法をよりマイルドなものとする事でアーティファクトの少ない構造が観察できた. (D, E) 四酸化オスミウム・グルタルアルデヒド二重固定、電界放出形 (FE-) SEM 像、加速電圧 1 kV. 低加速電圧 FE-SEM 法によって、嶺で囲まれた模様が鮮明に観察できた. Takahashi et al. (2014b) より転用した. 日本メンデル協会の転載許可による.

や幅を測定したところ、統計的な形態差が認められた。*C. cuspidata*で細胞形状が広長球～広倒卵球形であったのに対し、*C. paradoxa*で広卵球形、新種*C. kugrensii*で狭卵球形である点で相互に区別でき、単葉群は3種に分類されることが明らかになった(図3, 5)。

以上のように様々な電子顕微鏡法を併用することで、*Cyanophora*属に共通する外被の立体微細構造が推測され

図5 *Cyanophora*属5種の電界放出形走査電子顕微鏡写真。Bar = 5 μm. (A, F) *C. paradoxa*. (B, G) 新種*C. cuspidata*. (C, H) 新種*C. kugrensii*. (D, I) 新種*C. sudae*. 模様は5～6角形でハニカム構造様。 (E, J) *C. biloba*. 模様は4～5角形～扇形。 Takahashi et al. (2014a)より引用・改変した。 John Wiley and Sonsの転載許可による (License Number: 3771700412358)。

図6 フリーズフラクチャ透過電子顕微鏡 (TEM) (A, B), 電界放出形走査電子顕微鏡写真 (C, D) と超薄切片 TEM (E-H). 細胞表面全体を覆う模様は嶺により縁どられるが、嶺はプレート小胞の境界における反り上がりによって形成され、模様は内部のプレートの形態を反映していた。 Bar = 1 μm. (A, C, E, F) 新種*C. sudae*. (B, D, G, H) *C. biloba*. Takahashi et al. (2014a)より引用・改変した。 John Wiley and Sonsの転載許可による (License Number: 3771700412358)。

た (Takahashi et al. 2014a, 2014b). *Cyanophora*属5種は細胞膜全体を小葉状のプレート小胞が裏打ちしており、低加速電圧FE-SEMで直接、細胞全体を覆う小葉状の扁平小胞の模様を捉えることができた。*Cyanophora*属が細胞膜表面に嶺で囲まれた模様というダイナミックな構造を有しているとは思ってもよらなかったのも、観察している我々にとっては驚きであった。そしてこの事が更なる灰色植物の外被観察を行なう契機ともなった。

一方、我々の分類学的研究によって*Cyanophora*属には従来の2倍にも相当する種が存在する事が明らかになった。この事はこれ迄非常に小さな系統群とされてきた灰色植物にも光顕レベルで判別が難しい未記載種がかなり存在する事を示唆した。この中で低加速電圧FE-SEM法による比較形態学的な観察は、種を識別する分類形質を発見するのに有効であり、この手法により細胞全体を観察できる利点を活かし新種*C. cuspidata*や新種*C. sudae*に特徴的な微細構造レベルの識別点が明らかとなった。低加速電圧FE-SEMではより高倍率の観察も可能であり、実際、模様内側の平坦な細胞膜表面のナノスケールのざらつきに種間差が認められたのだが、現状では分類形質として採用していない。今後*Cyanophora*属の培養株の確立に伴って更に詳細な外被観察を行なう事で、このスケールの形質による分類へと進展するかも知れない。

*Glaucocystis*属の分類学的問題点

*Glaucocystis*属は*Glaucocystales*に分類される不動厚膜球状性の灰色植物(図1)であり、これまでにも野外試料の光学顕微鏡観察をもとに約6種が認められていた (Komárek and Fott 1983). 本属においては複数の培養株のTEMによる比較が行われていたが、微細構造上の違いはないと報告されていた (Schnepp et al. 1966). 近年、我々の研究と並行してChongら (2014) は培養株のマーカー遺伝子を用いて本属に隠蔽種とも考えられる遺伝的多様性を報告しているが、種を識別するような形態形質については報告していない。ごく最近我々は*Glaucocystis*属の複数の培養株を用いた微細構造レベルの形態比較を実施しており、その一部を以下に紹介したい。

*Glaucocystis*属細胞外被の超高压電子顕微鏡観察

*Glaucocystis*属の外被構造については、*G. geitleri*を用いた超薄切片TEM観察が実施されており、*Cyanophora*に類似した細胞膜を裏打ちするプレート小胞の存在が示唆されていた (Schnepp et al. 1966). 一方、*G. geitleri*のフリーズフラクチャTEMでは、アピコンプレックス(寄生性アルベオラータ)と類似した3重の細胞膜からなる外被モデルが提出されており (Robinson and Preston 1971), 細胞周期のステージによって変わるという説も提唱されていた (Willison and Brown 1978).

*Glaucocystis*属においても*Cyanophora*属と同様に細胞外被に種を識別する多様性があると我々は期待したが、*Glaucocystis*属は厚い細胞壁で囲まれその中で自殖するので、FE-SEMによる直接比較はできない。このため本属では代替的なアプローチが求められた。そこで我々はこの外被構造を丸ごと立体的に微細構造レベルで観察するために、超高压電子顕微鏡を用いることとした (Takahashi et al.

2015). 超高压電子顕微鏡は超高加速電圧を用いることで厚い試料の透過観察が可能なTEMの一種であり、X線CTスキャンのように、回転撮影した試料の透過像シリーズから再構築することで断層像シリーズであるトモグラフィーを得ることが可能である。超高压電子顕微鏡トモグラフィーは近年、生物試料にも応用されているが、これまでに分類学的研究に応用されたことはなかった。そこで我々は*Glaucozystis*属の2種、*G. nostochinearum*と*G. geitleri*の培養株を用いて、微細構造の保存性の良好な固定法である加圧凍結・凍結置換法によって作成した樹脂試料を超高压電子顕微鏡で観察し、トモグラフィーによる3次元微細構造レベルの形態比較を試みた(Takahashi et al. 2015)。

この結果、細胞壁内側の細胞外被を立体微細構造レベルで直接観察することができ、必要な情報のみを輪郭抽出によって3Dイメージとして示した(図7)。*Glaucozystis*属2種においても、細胞膜の内側全体を小葉状の扁平小胞が裏打ちする細胞外被構造を有することが解明され、この細胞外被構造には種多様性が存在することが明らかになり、今後の本属の種分類に大きく貢献することが期待された(図8)。

図7 *G. geitleri*の超高压電子顕微鏡トモグラフィーと3Dイメージング。Takahashi et al. (2015)より引用・改変した。

図8 *Glaucozystis* 外被微細構造の多様性。超高压電子顕微鏡3D(右)で解明された*Glaucozystis*培養株の細胞外被3D微細構造には多様性が認められ、超薄切片透過電子顕微鏡(左)でも区別された。Takahashi et al. (2015)より引用・改変した。

遙かなる一次植物の旅路

我々はこれまでに、灰色植物全体の2大系統を代表する(Chong et al. 2014)遊泳性*Cyanophora*と不動厚膜球状性*Glaucozystis*の両属で、基本的には同じ「細胞膜の内側で小葉状の扁平小胞が密に裏打ちする」細胞外被立体微細構造をもつことを明らかにしてきた(Takahashi et al. 2014a,

2014b, 2015)。このような細胞外被構造は一次植物の他の2系統である緑色植物や紅色植物では知られていない。しかし、系統的に一次植物の外側に位置するとされるアルベオラータやハプト藻といった二次共生を経験した鞭毛藻類では知られている(Winter and Siesser 1994, Adl et al. 2012)。特にアルベオラータの1種である厚膜球状性光合成生物*Chromera velia*では、細胞表面が模様で覆われている遊泳細胞のFE-SEM像が報告されており(Weatherby et al. 2011)、我々が明らかにした*Cyanophora*のFE-SEM像と非常に類似している。さらに*Chromera velia*の不動栄養細胞が細胞壁中で自殖して殖える様式(Moore et al. 2008)は*Glaucozystis*に類似しており、アルベオラータと灰色植物の単細胞遊泳性の祖先型からの平行進化であると考えられる。これらのことから灰色植物の共通祖先が*Cyanophora*様の鞭毛虫であって、すでに「細胞膜の内側で小葉状の扁平小胞が密に裏打ちする」立体微細構造を獲得していた可能性があり、更には最初の一次植物にまで遡るとも推測された(図9)。このことは真核生物のBikontaの大部分である外被類(corticates)と呼ばれるグループが外被構造でまとめられるという仮説(Cavalier-Smith 2010)を支持した。

図9 現生の真核生物への外被の進化。灰色植物の共通祖先は*Cyanophora*様の鞭毛虫であって、既に「細胞膜の内側で小葉状の扁平小胞が密に裏打ちする」立体微細構造を獲得していた可能性があり、更には最初の一次植物にまで遡るとも推測された。Takahashi et al. (2015)より引用・改変した。

灰色植物の種分類のこれから

低加速電圧FE-SEM法による比較形態学的な観察は、細胞表面全体の超高分解能観察が可能で、微細藻類の種を識別する微細構造レベルの分類形質を発見するのに有効であった。超高压電子顕微鏡トモグラフィーは我々の研究で初めて分類学に応用されたが、細胞の内部であっても3D微細構造レベルの形態比較が可能であり、微生物への3D形態情報の有用性を示した。これらの次世代の超微形態観察は、断片的な情報しか得られなかった従来の電子顕微鏡観察に取って代わって今後の微生物分類の主流となると期待される。このレベルの微細形態比較によって、灰色植物門全体の種レベルの多様性が明らかとなり、本門全体の種分類に

基づく新しい高次分類体系の構築が実現できるものと考えられる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、共同研究として低加速電圧SEM観察法・固定法を丹念に御教授下さった佐藤繭子、豊岡公徳両博士(理化学研究所)には非常に御尽力頂いた。また、フリーズフラクチャ(凍結切断)TEM観察は高知大学において川村真依氏、奥田一雄教授の親切的な御指導の下、共同研究させて頂いた。FE-SEMは日立ハイテクのデモルームのSU8020を利用させて頂き、観察に際して檀紫氏、渡邊俊哉氏に御助力頂いた。藻類サンプリングでは川船かおる博士(東京工業大学)にお世話になり、松崎令博士(東京大学)には微細藻類の取扱いから分子実験まで様々な面で大変面倒をお掛けした。加圧凍結・凍結置換法は齊藤知恵子博士(現JST)に御指導頂き、東大農学部加圧凍結装置HPM010利用に際して石綱史子氏に御助力頂いた。超高压電子顕微鏡観察では大阪大学超高压電子顕微鏡センターで西田倫希博士(現QTEC)、保田英洋教授と共同研究させて頂いた。本稿で紹介した研究成果はこれら各方面の専門家の御援助があって初めて実現できたものであり、この場を借り深謝の意を表明したい。

引用文献

- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W., and Taylor, M. F. J. R. (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* 52: 399-451.
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., le Gall, L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Standridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A., and Spiegel, F. W. (2012) The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 59: 429-514.
- Cavalier-Smith, T. (1981) Eukaryote kingdoms: Seven or nine? *BioSys* 14: 461-481.
- Cavalier-Smith, T. (2010) Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biol Lett* 6: 342-345.
- Chong, J., Jackson, C., Kim, J. I., Yoon, H. S., and Reyes-Prieto, A. (2014) Molecular markers from different genomic compartments reveal cryptic diversity within glaucophyte species. *Mol Phylogenet Evol* 76: 181-188.
- Kies, L. (1992) Glaucocystophyceae and other protists harbouring procaryotic endocytobionts. In: Reisser W (ed) *Algae and symbioses: plants, animals, fungi, viruses, interactions explored*, Biopress, Bristol, pp. 353-377.
- Kies, L. and Kremer, B. P. (1986) Typification of the Glaucocystophyta. *Taxon* 35: 128-133.
- Komárek, J. and Fott, B. (1983) Chlorophyceae (Grünalgen); Ordnung: Chlorococcales. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Kugrens, P., Clay, B. L., Meyer, C. J., and Lee, R. E. (1999) Ultrastructure and description of *Cyanophora biloba*, sp. nov., with additional observations on *C. paradoxa* (Glaucophyta). *J Phycol* 35: 844-854.
- Linnaeus, C. (1753) *Species plantarum, exhibentes plantas rite cognitae*, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas. Impensae Laurentii Salvii, Holmia.
- 李時珍 (1596) 本草綱目. 後学胡承龍梓行, 金陵.
- Moore, R. B., Obornik, M., Janoušková, J., Chrudimský, T., Vancová, M., Green, D. H., Wright, S. W., Davies, N. W., Bolch, C. J. S., Heimann, K., Šlapeta, J., Hoegh-Guldberg, O., Logsdon, J. M., and Carter, D. A. (2008) A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature* 451: 959-963.
- Price, D. C., Chan, C. X., Yoon, H. S., Yang, E. C., Qiu, H., Weber, A. P. M., Schwacke, R., Gross, J., Blouin, N. A., Lane, C., Reyes-Prieto, A., Durnford, D. G., Neilson, J. A. D., Lang, B. F., Burger, G., Steiner, J. M., Löffelhardt, W., Meuser, J. E., Posewitz, M. C., Ball, S., Arias, M. C., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Rensing, S. A., Symeonidi, A., Doddapaneni, H., Green, B. R., Rajah, V. D., Boore, J., and Bhattacharya, D. (2012) *Cyanophora paradoxa* genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants. *Science* 335: 843-847.
- Robinson, D. G. and Preston, R. D. (1971) Studies on the fine structure of *Glaucocystis nostochinearum* Itzigs. II. Membrane morphology and taxonomy. *Br Phycol J* 6: 113-128.
- Sagan, L. (1967) On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 14: 225-274.
- Sato, M., Mogi, Y., Nishikawa, T., Miyamura, S., Nagumo, T., and Kawano, S. (2009) The dynamic surface of dividing cyanelles and ultrastructure of the region directly below the surface in *Cyanophora paradoxa*. *Planta* 229: 781-791.
- 佐藤繭子, 豊岡公徳, 平田愛子, 南雲保, 河野重行 (2009) 最近の研究と技術 ペプチドグリカン層をもつ葉緑体であるシアネレの分裂とFtsZリング形成. *顕微鏡* 44: 57-60.
- Schnepf, E., Koch, W., and Deichgräber, G. (1966) Zur Cytologie und taxonomischen Einordnung von *Glaucocystis*. *Arch Microbiol* 55: 149-174.
- Spiegel, F. W. (2012) Contemplating the first Plantae. *Science* 335: 809-810.
- Takahashi, T., Sato, M., Toyooka, K., Matsuzaki, R., Kawafune, K., Kawamura, M., Okuda, K., and Nozaki, H. (2014a) Five *Cyanophora* (Cyanophorales, Glaucophyta) species delineated based on morphological and molecular data. *J Phycol* 50: 1058-1069.
- Takahashi, T., Sato, M., Toyooka, K., and Nozaki, H. (2014b) Surface ornamentation of *Cyanophora paradoxa* (Cyanophorales, Glaucophyta) cells as revealed by ultra-high resolution field emission scanning electron Microscopy. *Cytologia* 79: 119-123.
- Takahashi, T., Nishida, T., Saito, C., Yasuda, H., and Nozaki, H. (2015) Ultra-high voltage electron microscopy of primitive algae illuminates 3D ultrastructures of the first photosynthetic eukaryote. *Sci Rep* 5: 14735.
- Weatherby, K., Murray, S., Carter, D., and Šlapeta, J. (2011) Surface and flagella morphology of the motile form of *Chromera velia* revealed by field-emission scanning electron microscopy. *Protist* 162: 142-153.
- Willison, J. H. M. and Brown Jr., R. M. (1978) Cell wall structure and deposition in *Glaucocystis*. *J Cell Biol* 77: 103-119.
- Winter, A. and Siesser, W. G. (1994) *Coccolithophores*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

Received: 18 December 2015 / Accepted: 30 December 2015