

論文の内容の要旨

論文題目 Taxonomic re-examination of snow-inhabiting species of *Chloromonas*
(Volvocales, Chlorophyceae)
(氷雪性クロロモナス属 (緑藻綱, ボルボックス目) の種レベルの分類学的再検討)

氏名 松崎 令

1. 研究背景

残雪が緑や赤などに染まる“彩雪”(図1)は、雪や氷河中の雪解け水に生息する氷雪藻が高密度に繁殖することで引き起こされる。1960年代までは、緑色の雪(緑雪; 図1上)に一般的に優占する遊泳性の緑藻はクロロモナス属(*Chloromonas*; 以降 *Chr.*)などの、赤い雪(赤雪; 図1下)に優占する不動性の緑藻(細胞内に赤色の色素を蓄積する)はスコティエラ属(*Scotiella*)やコダテラ属(*Chodatella*)などの種として分類されていた^[1]。Hohamを中心とした研究グループ(以降 Hoham グループ)は北米産の彩雪試料の継続観察から氷雪性クロロモナス属の生活環(遊泳栄養細胞と不動接合子の対応関係)を明らかにし(図2)、従来スコティエラ属やコダテラ属などの不動性緑藻の種として分類されていた氷雪藻は氷雪性クロロモナス属の不動接合子であるとして、これらの種をクロロモナス属に分類した^[2-6](表1)。また、*Chr. nivalis* または *Chr. brevispina* の不動接合子と形態的に同定できる不動性の細胞が世界各地の彩雪から報告されていたため(図3)、彼らはこの2種をコスモポリタン種と認識した^[3-5]。その後の研究では、野外試料中の不動接合子は Hoham グループの種概念に基づき、不動接合子の形態情報だけで *Chr. nivalis* または *Chr. brevispina* と同定されているが^[7]、それら2種を含め、氷雪性クロロモナス属の不動接合子から遊泳栄養細胞を実験的に誘導したという報告はなく^[8]、遊泳栄養細胞と不動接合子の対応関係は北米産の試料でしか調べられていない。

一方、氷雪性クロロモナス属の遊泳栄養細胞の培養株が1970年代から確立されはじめ、本属の氷雪性の培養株だけで構成される単系統群が報告された^[9]。クロロモナス属の常温性の種は遊泳栄養細胞の形態形質で識別されるが、氷雪性の種は前述の Hoham グループの研究に基づき、不動接合子の形態が重要な種の識別形質とされている^[2,6,10]。しかしながら培養株を用いて不動接合子の形成を実

験的に誘導できた種は1種だけであり^[10]、公的な微細藻類株保存施設に保存されている培養株の多くは正確な種が不明である。また、近年の微細緑藻の分類学的研究では、複数の培養株を用いた微細構造観察や分子系統など、様々な手法を組み合わせた多面的な研究によって種が識別されているが^[11]、氷雪性クロロモナス属ではそのような種レベルの分類学的研究は実施されていない。

近年、単細胞シーケンス法によって日本産の“*Chr. nivalis*”不動接合子から葉緑体 *rbcL* 遺伝子の部分配列が決定され、系統の異なる2つのハプロタイプが得られた^[12]。これは従来 *Chr. nivalis* と同定されてきた不動接合子の中に複数の種が含まれている可能性を示唆したが、各ハプロタイプの系統上の位置についての解像度は低かった。その後、オーストリア産の“*Chr. nivalis*”不動接合子の核 18S rDNA 配列情報を用いた分子系統が実施され、*Chr. nivalis* と表示されている培養株との系統関係が議論された^[8]。しかしそれらの培養株の種同定に関する客観的な情報はなく、また両研究では分子種が異なるため、使用された接合子試料の相互の系統関係は不明である。従って、野外試料中の不動接合子の正確な種同定には、不動接合子試料からの複数 DNA 領域の配列情報の獲得と、培養株だけを用いた種分類法の両方が必要と考えられた。

本研究は、氷雪性クロロモナス属の種多様性を解明することを目的とし、以下の実験を実施した。まず、野外試料中の不動接合子から DNA の複数領域の配列情報を決定する手法を確立し、Hoham グループの種概念によると *Chr. nivalis* または *Chr. brevispina* と同定される日本産の不動接合子の種の実体を、複数遺伝子分子系統と高進化速度領域の比較により明らかにした。次に氷雪性クロロモナス属の複数の培養株を用いて、光学・蛍光・透過型電子顕微鏡による比較形態解析と複数遺伝子分子系統を実施し、培養株だけで種を分類することに成功した。

2. コスモポリタン種と同定される野外試料中の氷雪性クロロモナス属の不動接合子の分子系統

山形県月山（月山）および青森県八甲田山（八甲田）で彩雪試料を採集し、Hoham グループの種概念によると *Chr. nivalis* または *Chr. brevispina* の不動接合子と同定される同一形態の不動性の細胞（図4）を光学顕微鏡下でそれぞれ50個体ずつ単離し、DNAを抽出した。抽出したDNAのPCR産物をダイレクトシーケンスし、核18S rDNAおよび葉緑体 *atpB*・*psaB* 遺伝子の配列情報を決定して分子系統解析を実施した（図5）。その結果、日本産の“*Chr. nivalis*”不動接合子（月山産試料 Gassan-B、Gassan-C および八甲田産試料 Hakkoda-3）は Gassan-B/Hakkoda-3 と Gassan-C の2系統に分かれ、Gassan-C は球形の遊泳栄養細胞をもつ *Chr. miwae* に近縁な日本産の NIES-2379 株および NIES-2380 株^[13]と強固な単系統群を形成した（図5内グループA）。一方、日本産“*Chr. brevispina*”不動接合子（Gassan-A、Hakkoda-1 および Hakkoda-2）は日本産の *Chr. krienitzii*（細長い腎臓形の遊泳栄養細胞をもつ；第3章で新種として記載）の培養株とともに強固な単系統群を形成した（図5内グループB）。Gassan-C と NIES-2379 株、または Gassan-A/Hakkoda-2 と *Chr. krienitzii* の培養株間の核 rDNA internal transcribed spacer 2（ITS2）の遺伝的差異（0.0–0.7%）は、常温性の微細緑藻の種内の ITS2 にみられる遺伝的差異（3.3–4.1%）^[11, 14]と比べて明らかに低いため、それぞれ同一種と考えられた。従って、水滴形の遊泳栄養細胞をもつ北米産の *Chr. nivalis*^[3]（図6左）と Gassan-C（日本産“*Chr. nivalis*”不動接合子）、および卵形または洋梨形の遊泳栄養細胞をもつ北米産の *Chr. brevispina*^[5]（図6右）と Gassan-A/Hakkoda-2（日本産“*Chr. brevispina*”不動接合子）はそれぞれ異なる種であり、不動接合子の形態だけで識別される両種は、ともに複数の隠蔽種を含むことが強く示唆された。

3. 比較光学・電子顕微鏡観察と分子情報を組み合わせた氷雪性クロロモナス属の培養株の解析

第2章で不動接合子の形態だけでは氷雪性クロロモナス属の実際の種を識別できないことが強く示唆された。従って本章では、近年の常温性緑藻の種レベルの分類学的研究で成果を挙げている、培養株の多面的な解析を用いて氷雪性クロロモナス属の培養株の種分類を試みた。氷雪性クロロモナス属の既知種の多くは楕円形または細長い遊泳栄養細胞をもつため^[13]、そのような遊泳栄養細胞をもつ北米産の8株と日本産新規培養株4株に対し、光学・蛍光・透過型電子顕微鏡による遊泳栄養細胞と無性生殖ステージの詳細な比較解析を行った。その結果、遊泳栄養細胞の形状、蛍光および透過型電子顕微鏡観察で明瞭になった葉緑体形状とその表面観（図7）、無性生殖ステージで母細胞内に形成される娘細胞の最大数などから、3新種を含む7種として識別できた（表2）。また、本種分類は分子系統（図5）、ITS2 二次構造の比較^[15]、および常温性クロロモナス属の姉妹種間の遺伝的差異との比較からも支持された。

4. 考察

第2章で実施した野外試料中の不動接合子の複数遺伝子分子系統と高進化速度領域の比較により、不動接合子と同一種と考えられる培養株が2系統で明らかになった。一方、第3章で実施したような、多くの培養株を用いた比較形態解析と分子情報を結合した種レベルの分類学的解析は、氷雪性クロロモナス属の種の識別に非常に有効と考えられた。培養株を用いて実験的に不動接合子を誘導することは困難なため^[10]、DNAの複数領域の配列情報を用いて、培養株の多面的な解析から識別した種と野外試料中の不動接合子を結びつけることは、氷雪性クロロモナス属のそれぞれの種の生活環を認識する上で有効かつ実用的な手法と考えられる。今後、世界各地で採集された培養株と不動接合子試料を同様の手法を用いて解析することで、氷雪性クロロモナス属の種多様性が世界レベルで明らかになると期待される。

引用文献

1. Kol E. 1968. In: *Die Binnengewässer* vol. 24. 216 pp.
2. Hoham R.W. 1975. *Phycologia* **14**: 213–226.
3. Hoham R.W. & Mullet J.E. 1977. *Phycologia* **16**: 53–68.
4. Hoham R.W. & Mullet J.E. 1978. *Phycologia* **17**: 106–107.
5. Hoham R.W. et al. 1979. *Phycologia* **18**: 55–70.
6. Hoham R.W. et al. 1983. *Can. J. Bot.* **61**: 2416–2429.
7. Lukavský J. & Cepák V. 2010. *Acta Bot. Croat.* **69**: 163–171.
8. Remias D. et al. 2010. *Protoplasma* **243**: 73–86.
9. Hoham R.W. et al. 2002. *J. Phycol.* **38**: 1051–1064.
10. Hoham R.W. et al. 2006. *Phycologia* **45**: 319–330.
11. Matsuzaki R. et al. 2012. *Phycologia* **51**: 74–85.
12. Muramoto K. et al. 2008. *Cytologia* **73**: 91–96.
13. Muramoto K. et al. 2010. *Eur. J. Phycol.* **45**: 27–37.
14. Nakada T. et al. 2010. *J. Plant Res.* **123**: 67–78.
15. Coleman A.W. 2009. *Mol. Phylogenet. Evol.* **50**: 197–203.

表1. *Chr. nivalis* と *Chr. brevispina* の主なシノニムリスト。文献4と5による。

***Chloromonas nivalis* (Chodat) Hoham & Mullet 1978.**
 BASIONYM:
Pteromonas nivalis Chodat 1902. (フランス)
 SYNONYMS:
Scotiella antarctica F.E. Fritsch 1912. (南極)
Scotiella nivalis (Chodat) F.E. Fritsch 1912.

***Chloromonas brevispina* (F.E. Fritsch) Hoham et al. 1979.**
 BASIONYM:
Chodatella brevispina F.E. Fritsch 1912. (南極)
 SYNONYMS:
Trochiscia nivalis Lagerheim 1892. (エクアドル)
Cryodactylon glaciale Chodat 1921. (スイス)

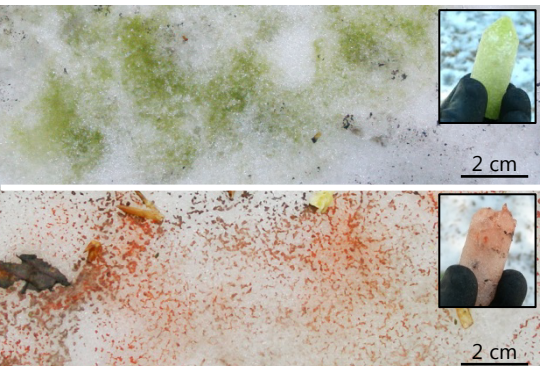


図1. 緑雪(上)と赤雪(下)。枠内は採集した彩雪試料。青森県八甲田山および山形県月山にて著者が撮影。

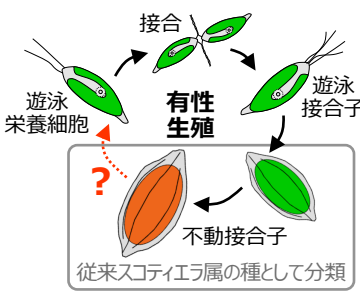


図2. Hohamグループが解明した北米産 *Chr. nivalis* の生活環。文献3を基に作成。

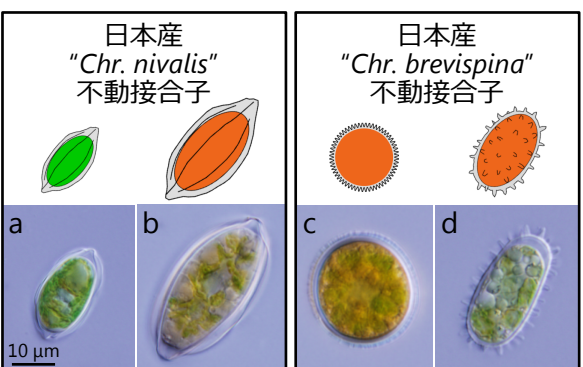


図4. 日本の野外試料中の *Chr. nivalis* (aとb) と *Chr. brevispina* (cとd) と同定される不動接合子。写真は全て等倍率。Hohamグループによればaとbは成熟度、cとdは遊泳接合子の大きさに由来する変異とされる^[3-5]。

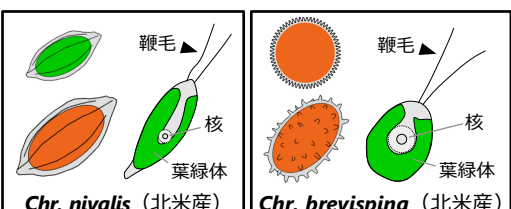


図6. 北米産の *Chr. nivalis* と *Chr. brevispina* の不動接合子(左)と遊泳栄養細胞(右)の対応図(ノンスケール)。文献3-5を基に作成。両試料ともに配列情報がないため、系統上の位置は不明である。

表2. 本研究で識別された氷雪性クロモナス属7種とその識別形質。* = 正統株。

| 図5の番号 | ① | ② | ③ | ④ | ⑤ | ⑥ | ⑦ |
|----------|------------------------------|---|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 学名 | 新種 <i>Chr. fukushimae</i> | <i>Chr. tughillensis</i> | <i>Chr. hohamii</i> | 新種 <i>Chr. tenuis</i> | <i>Chr. pichincae</i> | <i>Chr. chenangoensis</i> | 新種 <i>Chr. krienitzii</i> |
| 培養株 | GsCl-11* HkCl-65 (新規株) | UTEX SNO91* UTEX SNO88 UTEX SNO92 | UTEX SNO67 | UTEX SNO132* | UTEX SNO33 | UTEX SNO150* UTEX SNO143 | GsCl-54* GsCl-49 (新規株) |
| 模式図(等倍率) | | | | | | | |
| 栄養細胞形状 | 細長い腎臓形 | 細長い楕円形 | 細長い楕円形 | 細長い円筒形 | 楕円形 | 楕円形 | 細長い腎臓形 |
| 葉緑体形状 | 側壁型(薄板様) | カップ型 | カップ型 | カップ型 | カップ型 | カップ型 | 側壁型 |
| 葉緑体表面観 | ゆるく裂ける | 細長い板で構成 | 細長い板で構成 | 細長い板で構成 | 円板で構成 | 円板で構成 | ゆるく裂ける |
| 娘細胞の最大数 | 8 | 16 | 8 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 細胞集合体 | × | ○ | × | × | ○ | × | × |

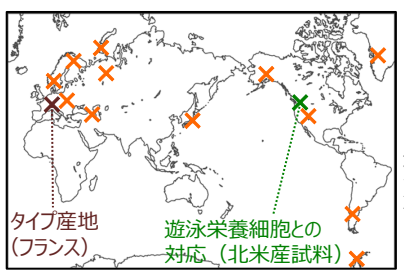


図3. Hohamグループの種概念による *Chr. nivalis* の不動接合子の産地(×印)。文献1と3による。遊泳栄養細胞と不動接合子の対応関係は北米産の試料でのみ調査されている^[3]。

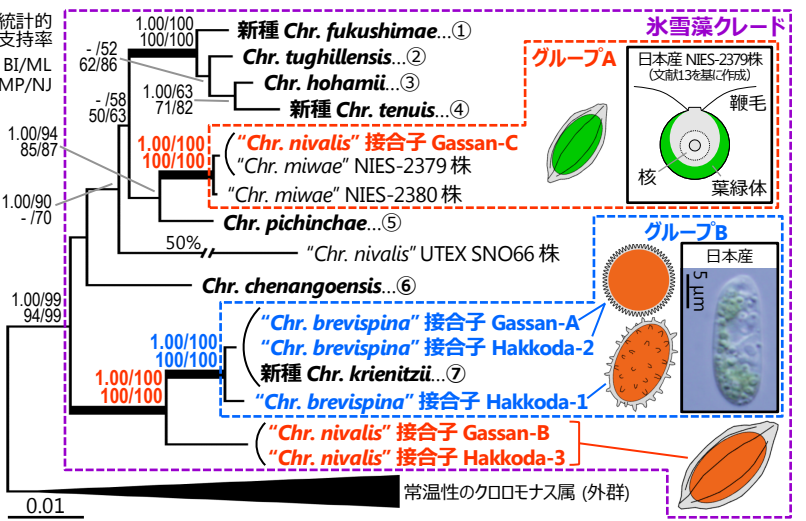


図5. クロモナス属の培養株および野外試料中の不動接合子の核18S rDNAと、葉緑体 *atpB*・*psaB* 遺伝子の第1・第2コドン(3,428塩基)を用いたベイズ法(BI)に基づく系統樹。学名の右にある番号は表2と対応している。ML=最尤法。MP=最節約法。NJ=近隣結合法。

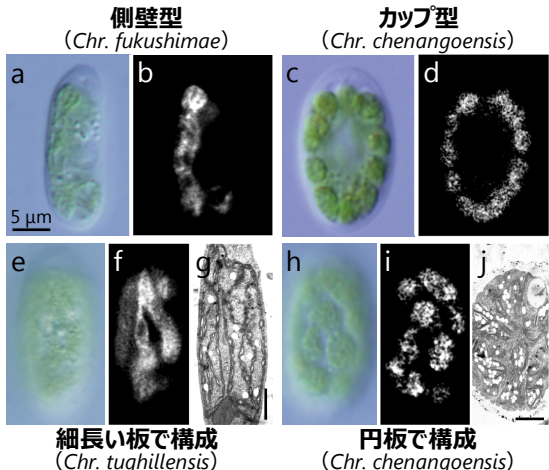


図7. 培養株の比較観察から明らかになった氷雪性クロモナス属の種を識別する葉緑体の形態形質。光学顕微鏡(a, c, e, h)と蛍光顕微鏡(b, d, f, i)の写真は全て等倍率。(a-d)葉緑体の光学切片。aとbは薄板側壁型、cとdはカップ型の葉緑体。(e-j)カップ型葉緑体の表面観。透過型電子顕微鏡写真(g, j)は細胞表面の切片で、葉緑体の表面観がわかる(scale bars = 1 μm)。