

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840125

研究課題名(和文)地球規模の真の種組成の解明を目指して：“汎存種”紅藻のゲノム形態学的解析

研究課題名(英文)Genomic data supports species recognition of the cosmopolitan red algae

研究代表者

鈴木 雅大 (Suzuki, Masahiro)

神戸大学・内海域環境教育研究センター・助教

研究者番号：30637088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：88年前に作製された紅藻ヨグレコナハダのトポタイプ標本からDNAを抽出し、次世代シーケンサを用いて7遺伝子の配列のほぼ全長を決定した。この方法により、作製後数十年を経過した標本や、参照配列の少ない非モデル生物であっても、系統分類学的研究及び種同定に必要な遺伝子配列を決定できることが示された。日本及び世界各地で蒐集した汎存種紅藻ワツナギソウ、ペニスナゴ、ダルスについて、形態観察と分子系統解析に基づいて種を整理し、それぞれの種の正しい種名と、これまで混同されてきた近似種を日本新産種または新種として区別した。

研究成果の概要(英文)：Seven gene sequences were determined from 88-year-old herbarium specimens of *L. japonica* using Next-generation sequencer (NGS) with limited reference sequence data. This study showed that sequencing of historical specimens using NGS is a powerful tool for systematics and identification of not only model, but also non-model, organisms. Morphology and molecular data recognized that correct name, some new records, and some new species of the cosmopolitan red algae *Champia parvula*, *Schizymenia dubyi*, and *Palmaria mollis* from Japan.

研究分野：真正紅藻類の分類学

キーワード：次世代シーケンサ 国際情報交換 分類学

1. 研究開始当初の背景

(1) 紅藻において、汎存種と考えられてきた種が実際は固有種であったり、複数の隠蔽種の存在を示唆する例が、外国において数多く知られている (e.g. Zuccarello et al. 2008, J. Phycol. 44: 384-393.; Conklin & Sherwood 2012, Phycologia 51: 347-357.)。紅藻の分類は世界規模での見直しが始まっているが、分類学的な研究の基本となるタイプ標本あるいはタイプ産地における情報不足、特にゲノム情報が不足していた。ゲノム情報を得るために使用する標本の中には作られてから数十年以上経過したものが多く、このような標本は経年劣化や標本庫の燻蒸などによる DNA の断片化が進んでおり、従来のサンガー法シーケンスによる遺伝子配列の決定は困難な場合が少なくなかった (e.g. Carlile et al. 2010 Phycologia 49: 336-344., Hind et al. 2014 J. Phycol. 50: 760-764.)。DNA の断片化が進んだサンプルから目的の遺伝子配列を確実に決定するため、化石等で用いられている次世代シーケンサを使った配列決定法を海藻においても開発する必要があった。

(2) 日本沿岸で普通種として知られている海産紅藻類のワツナギソウ (*Champia 'parvula'*)、ベニスナゴ (*Schizymenia dubyi*)、ダルス (*Palmaria 'palmata'*) はいずれも汎存種として世界各地で報告されている種に充てられているが、これまで行われた分類学的研究では、日本あるいは北太平洋西岸の固有種である可能性や、複数の隠蔽種を含む可能性が示唆されていた (鈴木ら 2012 学会発表; Suzuki et al. 2013 Phycologia 52: 609-617)。これらの種を正

しく認識し、整理するためには、タイプ標本あるいはタイプ産地で採集したサンプル (トポタイプ) との比較と分類学的検討が必要であった。

2. 研究の目的

(1) サンガー法シーケンスでは遺伝子配列決定が困難な紅藻について、分子系統解析及び系統分類学的研究として用いるに十分な長さの遺伝子配列を決定するため、次世代シーケンサを用いた配列決定法を開発する。

(2) 汎存種紅藻と考えられているワツナギソウ、ベニスナゴ、ダルスについて、それぞれのタイプ産地でサンプルを入手し、日本及び世界各地で蒐集したサンプルと形態及び遺伝子配列データを比較し、それらに基づいて分類学的検討を行う。

3. 研究の方法

(1) サンガー法シーケンスによる遺伝子配列決定が困難かつ、実験に用いるサンプルが十分量得られるサンプルとして、汎存種紅藻ヨゴレコナハダ (*Liagora japonica*) を対象とし、80 年以上前に作られた標本から DNA を抽出し、次世代シーケンサ Illumina MiSeq を用いて遺伝子配列を決定した。また、得られた配列に基づき紅藻近縁種の specific primers を設計した。

(2) ワツナギソウ、ベニスナゴ、ダルスのそれぞれについて、日本及び世界各地で蒐集したサンプルについて、形態観察、DNA 抽出、遺伝子配列決定、分子系統解析を実施した。①ワツナギソウは日本沿岸 11 ヶ所と、台湾、フィリピン、インドネシア、メキシコ、ノースカロライナのサンプルについて観察・解析

した。

②ベニスナゴは日本沿岸 12 ヲ所と、台湾、チリ、アルゼンチンのサンプルについて観察・解析した。

③ダルスは日本沿岸 5 ヲ所と、アメリカオレゴン州、アイルランドのサンプルについて観察・解析した。

4. 研究成果

(1) 88 年前に作られた紅藻ヨゴレコナハダのトポタイプ標本から DNA を抽出し、次世代シーケンサを用いた解析により、種同定や系統解析に用いられる 7 遺伝子のほぼ全長を決定した。本種は、タイプ産地を含む太平洋沿岸では 50 年以上最終報告が無く、絶滅種と考えられていたが、トポタイプの遺伝子配列に基づき、日本海佐渡島と隠岐の島で採集したサンプルとトポタイプとが同種であると断定し、日本海側で再発見するに至った。また、日本海のサンプルの詳細な形態観察と、各種遺伝子を用いた分子系統解析に基づき、新属を提唱し、本種をコナハダ属 (*Liagora*) から移した。

ヨゴレコナハダを含むグループ (真正紅藻綱、ウミゾウメン目) は、次世代シーケンサを用いて配列を決定する際に必要となる近縁種の参照配列が少なく、全ゲノム、オルガネラゲノムの解読が行われた種もないが、本研究では核にコードされる 18S rRNA、28SrRNA 遺伝子、葉緑体にコードされる *rbcL*、*psaA* 遺伝子、ミトコンドリアにコードされる *cox1* 遺伝子など、分類・系統地理学的研究及びバーコーディングに用いられている遺伝子配列のほぼ全長を決定した。このことから、本研究で開発した方法を用いることで、作製後

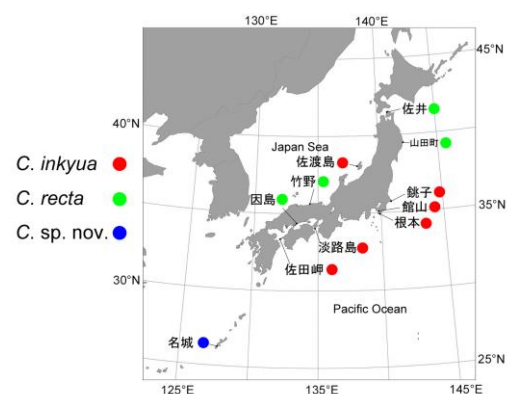
数十年を経過した標本であり、かつ参照配列の少ない種類であっても、系統分類学的研究及び種同定に必要な遺伝子配列を決定できることが示された。以上の結果は、PLOS ONE に投稿し、現在 revise を投稿中である。



(2)

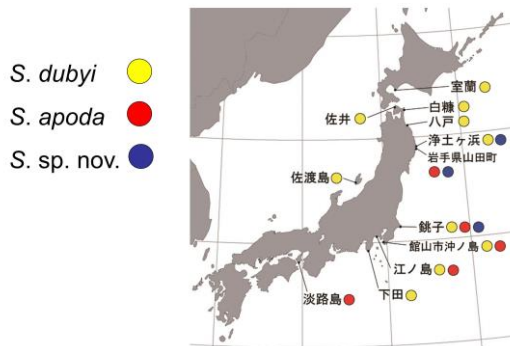
①日本沿岸 11 ヲ所と *Champia parvula* のタイプ産地 (スペインカディス地方) を含む世界 10 ヲ所のサンプルについて、形態観察と分子系統解析の結果に基づいて種を整理したところ、日本産のワツナギソウは、*C. parvula* とは別種であり、ワツナギソウと呼ばれてきた種は、*C. parvula* の異名同種と考えられてきたタチワツナギソウ (*C. recta*)、日本新産種 *C. inkyua*、新種 *Champia* sp. nov. の 3 種に分けられた (鈴木 2015 原生生物合同セミナー 学会発表)。日本産ワツナギソウの種の整理及び新種記載について、投稿論文を準備中である。

日本産ワツナギソウ類3種の分布



②日本沿岸 12 カ所と *Schizymenia dubyi* のタイプ産地に近いフランスロスコフ地方のサンプルについて、形態観察と分子系統解析の結果に基づいて種を整理したところ、日本産ベニスナゴ属は *S. dubyi*、日本新産種 *S. apoda*、新種 *Schizymenia* sp. nov. の計 3 種に分けられた（鈴木 2015 藻類談話会 学会発表）。日本産ベニスナゴ属の種の整理及び新種記載について、投稿論文を準備中である。

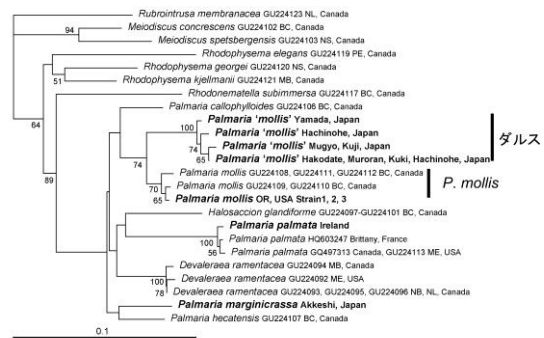
日本産ベニスナゴ属3種の分布



③ *Palmaria palmata* のタイプ産地はヨーロッパとされ、詳細な地名は不明だが、大西洋東岸に位置するアイルランド、イギリス、フランスの *P. palmata* の遺伝子配列に、日本 5 カ所で採集したダルス、太平洋東部に分布する *P. mollis* のタイプ産地であるアメリカ・ワシントン州のサンプルを含め、分子系統解析を実施したところ、日本産のダルスは、*P. palmata* とは別種であること、*P. mollis* に近縁であることが示された。日本産のダルスと *P. mollis* とが同種か別種かの判断には至らなかった。ダルスと *P. mollis* が太平洋西岸から東岸にかけて連続的に分布するものか、別種として分化したものかを判断するためには、北海道東部からサハリン、ベーリング海、アラスカにかけての地域に生育する

サンプルとの比較が必要である。

Cox1遺伝子を用いた紅藻ダルスの系統樹(NJ法)



5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 4 件)

- ①鈴木雅大、汎存種紅藻ベニスナゴの分類学的研究、2015 年度藻類談話会、2015. 11. 7、神戸大学（兵庫県）
- ②鈴木雅大、真正紅藻類の分類学的研究、原生生物合同セミナー2015、2015. 6. 27、神戸大学（兵庫県）
- ③鈴木雅大・瀬川高弘・秋好歩美・大槻 涼・栗原 暁・北山太樹・阿部剛史・小亀一弘・野崎久義、88 年前の紅藻ヨゴレコナハダからの DNA 抽出と次世代シーケンサを用いた分類、日本藻類学会第 39 回大会、2015. 3. 21、九州大学（福岡県）
- ④鈴木雅大、激変する紅藻の分類、東京海洋大学海洋科学技術研究科海洋生命科学専攻合同セミナー、2014. 11. 25、東京海洋大学（東京都）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 雅大 (SUZUKI Masahiro)

神戸大学・内海域環境教育研究センター・特命助教

研究者番号：30637088

(2)研究協力者（五十音順、敬称略）

阿部 剛史 (ABE, Tsuyoshi)

遠藤 光 (Endo Hikaru)

北山 太樹 (KITAYAMA, Taiju)

小亀 一弘 (KOGAME, Kazuhiro)

栗原 暁 (KURIHARA, Akira)

森 宙史 (MORI, Hiroshi)

野崎 久義 (NOZAKI, Hisayoshi)

瀬川 高弘 (SEGAWA, Takahiro)

Gayle Hansen

Maria Eliana Ramírez

Michael D. Guiry