

令和 2 年 9 月 10 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00520

研究課題名(和文)南極昭和基地周辺における土壌藻類群集の長期動態解析

研究課題名(英文)Long-term dynamics of the community of soil algae in the vicinity of Syowa Station

研究代表者

大谷 修司(Ohtani, Shuji)

島根大学・学術研究院教育学系・教授

研究者番号：50185295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：南極昭和基地周辺から9年間の環境モニタリング研究で藍藻、黄緑藻、緑藻の培養株を保存してきた。これらの培養株には形態からの分類が難しく属レベルで同定が留まっているものが多く存在していた。種までの分類が増えることは藻類群集の精度を上げることになるため、この3年間、同定が属レベルの株について、形態による分類学的研究と遺伝子による系統解析によって種までの同定を試みた。特に黄緑藻については類似種が多く分類が難しいことから集中して研究を行った。形態では区別が難しい場合も、遺伝子解析の結果と合わせることで、種が確定できたり、未記載種であることが明確になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

南極での土壌環境監視を目的とした土壌藻類の9年間にわたる計8定点での長期モニタリングは、我々の知る限りでは申請者らの研究以外に実施されていない。保存した藍藻、黄緑藻、緑藻の培養株について形態分類と遺伝子解析の研究で、種を確定できたり、未記載種を明らかにすることができた。

本研究3年間の分類学的研究の成果を9年間の長期データと照合することで、今まで以上に昭和基地周辺の土壌藻類群集構造の変化を明瞭にとらえることができ、土壌環境による種組成の違い、同じ地点に継続して出現する種、年変動が大きい種、生物指標種が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have preserved strains of cyanobacteria, yellow-green algae and green algae in a 9-year environmental monitoring from around the Syowa Station, Antarctica. Many of these strains were difficult to classify based on their morphology and remained identified at the genus level. Since the increase in the classification up to the species will increase the accuracy of the algal community, for the past three years, we have tried to identify the species by morphological taxonomic study and gene phylogenetic analyses for strains at the genus level. Especially for yellow-green algae, since many similar species are difficult to classify, intensive research was conducted. Even when it was difficult to distinguish by morphology, it was clarified that the species could be determined or it was an undescribed species by combining it with the results of gene analysis.

研究分野：微細藻類の分類・生態学

キーワード：南極 土壌藻類 培養株 形態分類 遺伝子解析 長期動態 昭和基地

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

南極観測に伴う人の活動が南極の様々な環境に対して影響を及ぼすことが懸念されている。南極大陸の3%は露岩域であり、土壌藻類は広く分布していることが知られており、南極昭和基地周辺では、土壌藻類による土壌の環境モニタリング研究が実施されてきた。

土壌藻類に関しては、研究代表者らによって、1993年から1998年にかけて種組成の調査や土壌栄養塩濃度等が測定され、特定の土壌藻類を土壌環境の生物指標として利用できることが示唆された(文献1)。その後、昭和基地の改築などで定点を新たに設定する必要があり、研究代表者らは新たに昭和基地周辺に8定点を設定し(文献2)、2000年から2008年の9年間の土壌試料を用いて研究を実施してきた。これまでに土壌環境データや土壌藻類群集の経年変化の結果が蓄積されてきたが、土壌藻類は径や幅が5 μm 以下の大きさの種類が多いこと、形態が類似した種が多いことや種の同定のためには生活環に現れる遊走子等を観察する必要等があったため、属で同定がとどまっている種類も多く残されていた。

2. 研究の目的

研究代表者は9年間にわたって、出現した土壌藻類について形態的特徴から分類学的研究を行と同時に藍藻10、黄緑藻29、緑藻40、計79株を分離保存していた。各定点の藻類群集の特徴や経年変化をより詳しく明らかにすることを目的として、属で同定が留まっている培養株について、栄養細胞の形態に加え、生活環に現れる遊走子等の形態をもとに分類学的研究を実施した。特に、黄緑藻類の*Xanthonema*属、*Botrydiopsis*属については類似種が多く分類が難しいことから特に集中して研究を行った。

研究分担者は、培養株を遺伝学的観点から系統分類し、形態学的観点による分類と比較するために、培養株の部分塩基配列を決定した。対象とする塩基配列はこれまでに多くの情報が蓄積されていることからまずは18S rRNA領域について調査した。さらに詳細な調査が必要な場合には、18S-28S ITS (internal transcribed spacers) 領域や*rbcL* (Rubisco ラージサブユニット) についても調査を行った。決定した配列およびデータベースの配列を用いて系統樹を作成し、遺伝学的観点から系統分類した。

3. 研究の方法

研究代表者の研究室に保存されていた藍藻10、黄緑藻29、緑藻40、計79株の中から、種の同定が属で留まっていたり、種の同定が不確定なものを中心に研究を進めた。黄緑藻*Botrydiopsis*属は培養株保存施設より取り寄せた4種6株を加え、黄緑藻*Xanthonema*属は培養株保存施設より取り寄せた6種7株を加えて形態観察と遺伝子の系統解析により、系統・分類学的検討を行った。

1) 形態分類

培地には、BBM液体培地、BBM1.5%寒天培地平板および斜面培地を用い、人工気象器(日本医化器械、LH-60)FL12-DTおよびLH55RDS)にて温度15 $^{\circ}\text{C}$ 、照度700~1400 lux、12時間、12時間の明暗周期で培養を行った。遊走子の放出は照度1200-2500 luxで行った。

栄養細胞と生活環に現れる遊走子等は微分干渉顕微鏡(オリンパスBX60)を用いて対物レンズ100倍で詳しく観察を行い、観察像の写真撮影は(オリンパスDP25)で行った。観察時のプレパラートからの水の蒸発を防ぐために、しばしば粘性の高い5%メチルセルロース(#400)を薄くスライドグラスに塗布し、その上に観察試料を滴下しカバーグラスをかけた。デンブンはヨウ素液またはルゴール液を用いて染色し、ピレノイドはアゾカーミンGを用いて染色した。

黄緑藻の葉緑体は、落射蛍光顕微鏡（オリンパス BX60, BX-FLA）で紫外線励起すると1分程度で自家蛍光を失い白化する。その際、葉緑体は輪郭が明瞭になることから、この性質を利用して葉緑体数を計測した。遊走子の観察は、マルチウエルプレートを用い、新しい液体BBM培地に栄養細胞を接種した。翌日以降の明期開始直後に培養液に放出された遊走子をマイクロピペットで採集し観察する方法を用い、遊走子の鞭毛を固定する場合はサフラン素を用いた。結果の(X)内は培養株番号を示す。

2) 遺伝子解析

液体培養した土壌藻類株からDNA抽出キットを使ってDNAを抽出し、特異的なプライマーを用いて18S rRNA, 18S-28S ITS (internal transcribed spacers) 領域や *rbcL* (Rubisco ラージサブユニット) のDNA断片をPCR増幅 (TaKaRa, PCR Thermal Cycler Dice Touch) した。PCR増幅したDNA断片を電気泳動によって確認後、ゲルを過によって精製したDNA断片を鋳型としてサイクルシーケンスを行った。その後シーケンサー (ABI, PRISM 3130xl Genetic Analyzer) を用いて塩基配列を決定した。決定された塩基配列をDDBJなどのデータベースでBLAST検索し、近縁種を推定し、形態学的分類と比較した。さらに登録されている代表的な藻類の塩基配列と合わせて系統樹を作成した。主に形態学的な分類が難しい株を遺伝子解析によって区別できるか調査した。使用したプライマーは過去の文献から適したものを選んだが、うまく増幅しないなど場合にはデータベースに登録されている塩基配列から共通配列を探し出して新たにプライマーを作成した。

4. 研究成果

1) 黄緑藻 *Botrydiopsis* 属

南極産培養株は形態分類と *rbcL*, 18SrRNA 遺伝子および ITS2 領域の遺伝子解析の結果から *Botrydiopsis callosa*, *Botrydiopsis* sp. 1 および *Botrydiopsis* sp. 2 の3種に区分することができた。

Botrydiopsis callosa Trenkwalder (R4182, 4941, 4962, 4972, 4973)

細胞の径は最大 38 μm 。成長すると細胞壁が肥厚し、葉緑体の側面観は三角形に近く、内側にピレノイドを有する。若い細胞には、葉緑体の内側にピレノイドが観察されるが成長すると不鮮明になる。成長した細胞は多核。細胞内に緑がかかったオレンジ色の顆粒を1-5個有す。細胞壁は成長とともに肥厚し、3-6 μm になり層状となる。遊走子の鞭毛は長短2本であった。これらの形質は初発表文 (文献3) の記載文や図解と一致した。*rbcL*, 18SrRNA 遺伝子および ITS2 領域は南極産の5株とは100%一致し、イタリア産の株とも高い相同性を示した。

Botrydiopsis sp. 1 (SO11, R4171, 4754)

細胞の径は最大 48 μm , 葉緑体の側面観は紐状で3-6個が重なり、しばしば眼点を有す。遊走子の鞭毛は長短2本であった。形態的特徴は *B. alpina* のタイプ株と類似する点が多いが、タイプ株には南極産には見られない2-3細胞に分裂する性質があった。*rbcL*, 18SrRNA 遺伝子および ITS2 領域は、南極の3株は高い相同性を示したが、スイス産の *B. alpina* のタイプ株とは相同性が低く南極産の3株は別種と考えられた。

Botrydiopsis sp. 2 (4531, 4734, 4833)

細胞は小さく、径は最大 19 μm 。成長しても細胞壁は肥厚しない。葉緑体は細胞壁に沿うこと

が多く、3層程度まで同心円状に並ぶことがある。葉緑体の側面観は長楕円体。遊走子は米粒形から洋梨形で葉緑体を2-3枚有し、眼点があり、鞭毛は長短2本であった。*rbcL*、18SrRNA 遺伝子および ITS2 領域は南極の3株は高い相同性を示した。しかし既知のいずれの種とも形態と遺伝子解析の結果が異なっており未記載種の可能性が示唆された。

2) 黄緑藻 *Xanthonema* 属

南極産培養株は形態観察に加え、*rbcL* 遺伝子、18SrRNA 遺伝子および ITS2 領域を調べたが、18SrRNA 遺伝子は種を区分する解像度が得られなかったため、解像度の良かった *rbcL* 遺伝子と ITS2 領域の結果を用いて系統分類を行った結果、*Xanthonema debile*、*X. exile* および *X. sp. 1*、*X. sp. 2* の4種に区分することができた。

Xanthonema debile (Vischer) Silva (4811, 4541, 4746)

細胞は断片化しやすい。細胞は正方形から長方形または楕円体。しばしば球形細胞が観察される。細胞の幅は 3.5-7.0 μm と変異が大きい。葉緑体は 2-4 (希に 8) 枚であるが、細胞が短くても 4 枚ある場合が多い。Type 株の SAG2289 と昭和基地産 4541 の遊走子は球形～楕円体で、葉緑体を 2 枚有し、眼点があり、鞭毛は 1 本確認できた。昭和基地の 3 株の *rbcL* 遺伝子は高い相同性を示し ITS2 領域は 100% 一致した。それら 3 株の *rbcL* 遺伝子と ITS2 領域は *X. debile* の type 株 SAG2289 とも高い相同性を示したことから本種に同定した。

Xanthonema exile (Klebs) Silva (R4131, 4711, 4852)

細胞は断片化しやすい。細胞は正方形から長方形または楕円体。細胞の幅は 4.0-4.9 μm 。葉緑体は 2-4 枚 (希に 8) であるが、2 枚の場合は互いに平行に並ぶことが多い。ドイツ産 *X. exile* SAG2286 と昭和基地産 R4131 の遊走子は球形～楕円形で、葉緑体を 2 枚有し、眼点があり、鞭毛は 1 本確認できた。昭和基地の 3 株と南極ロス島産株とは *rbcL* 遺伝子が 100% 一致し、ITS2 領域もほぼ一致した。ドイツ産 *X. exile* (SAG2286) とも *rbcL* 遺伝子は高い相同性を示したことから本種に同定した。

これまで遊走子の眼点が *Xanthonema debile* にはあり *X. exile* には無いことが 2 種を区分する分類形質になっていたが、今回の観察では *X. exile* の遊走子にも眼点があり、初発表文に遡って詳細な検討が必要である。

Xanthonema sp. 1 (4713)

糸状体は長く、細胞は長方形からややくさび形で、しばしば細い針状の付着根を有す。細胞の幅は 4.2-5.7 μm 。葉緑体は 2 枚で互いに平行して並ぶことが多く分裂前に 4 枚となる。本種の形態は既存の種とは一致せず、系統樹も最もはなれた場所にあり新種の可能性が考えられた。

Xanthonema sp. 2 (4831)

糸状体は短く、細胞は方形から長方形で幅は 5.6-6.5 μm 、葉緑体は 4-8 枚で、そのうちの数枚が細胞の内側に入り混む特徴がある。この形質は他の種にはないことに加えて、系統樹も最もはなれた場所にあり新種の可能性が考えられた。

3) 緑藻 *Chlorella vulgaris* (R4111)

細胞は楕円体から球形で、径は 3.5-8.5 μm と変位の幅が大きい。葉緑体は側壁性カップ状で一

枚あり，ピレノイドを1個有す。デンプン鞘は2枚からなる。無性生殖は自生孢子により通常4個形成され楕円形。しばしば母細胞壁が細胞に付着する。南極昭和基地産も他の地域の株と18SrRNA 遺伝子が100%一致し世界広範種の可能性が指摘できた。

4) 緑藻 *Bracteracoccus bullatus* Fucikova et al. (4152, 4851)

若いカルチャーでは細胞は通常球形で6-20 μmだが，古いカルチャーでは，楕円体からひょうたん型になり，しばしば乳頭状突起を形成し，細胞壁が肥厚する。葉緑体は側壁性，多角形で多数有す。ピレノイドはないが，デンプン粒が多数認められる。成長した細胞は多核。無性生殖は不動孢子形成により不動孢子は5個の場合を確認した。類似種が多く同定が難しい属であるが，*B. bullatus* の重要な分類形質である乳頭状突起を形成することに加えて，既存の培養株と100%18SrRNA 遺伝子が一致したことから本種に同定した。

5) 形態分類に遺伝子解析の結果が反映されない場合

緑藻 *Chlorella luteoviridis*, *Klebsormidium flaccidum* のなどのように形態分類でその特徴から種を同定できた場合でも，遺伝子データベースの既存種と遺伝的な距離が離れた場合が複数認められた。それらの種は形態が単純で分類形質が少なく，近縁種が多く存在する分類群で有り，分類学的検討が継続して必要と考えられる。

まとめ

特に分類が混乱していた黄緑藻の *Botrydiopsis* 属，*Xanthonema* 属などの本研究3年間の分類学的研究成果を9年の長期データと照合することで，今まで以上に昭和基地周辺の土壤藻類群集構造の変化を明瞭にとらえることができた。その結果，土壤環境による種組成の違い，同じ地点に継続して出現する種，年変動が大きい種，生物指標種が明らかとなった。

<引用文献>

- 1) Ohtani, S. Suyama, K., Yamamoto, H., Aridomi, Y., Itoh, R. and Fukuoka, Y. Distribution of soil algae at the monitoring sites in the vicinity of Syowa Station between austral summers of 1992/1993 and 1997/1998. Polar Bioscience 13: 113-132. (2000)
- 2) 大谷修司，巢山弘介，神田啓史．昭和基地周辺における土壤藻類および土壤微生物による環境モニタリング．南極資料 44(3):.265-276 (2000)
- 3.) Trenkwalder, H. Neue Bodenalgen aus Föhrenwäldern im Raum von Bixen (Südtirol, Italien) Ber. Nat.-med. Ver. Innsbruck 62: 7-19 (1975)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大谷修司, 林昌平
2. 発表標題 南極昭和基地周辺土壌から分離された <i>Botrydiopsis callosa</i> Trenkwalderの形態と分布
3. 学会等名 第8回極域科学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大谷修司, 林昌平
2. 発表標題 南極産黄緑藻 <i>Botrydiopsis callosa</i> Trenkwalder の形態と生活環
3. 学会等名 日本藻類学会第42回仙台大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大谷修司, 林昌平
2. 発表標題 南極昭和基地から分離された黄緑藻 <i>Botrydiopsis</i> 属の分類学的研究
3. 学会等名 日本藻類学会第42回仙台大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	林 昌平 (Hayashi Shohei) (20725593)	島根大学・学術研究院環境システム科学系・助教 (15201)	