

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06817

研究課題名(和文) 培養と分子系統解析による微小褐藻の多様性の解明

研究課題名(英文) A study of diversity of minute brown algae using culture and molecular analyses

研究代表者

小亀 一弘 (Kogame, Kazuhiro)

北海道大学・理学研究院・教授

研究者番号：80215219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：褐藻類にはコンブのような大形の種類だけではなく、数mm以下の小さなものもいる。そのような微小褐藻は、明瞭な分類形質が少なく分類が混乱しており、種同定が難しい。そこで、日本各地の沿岸から採集したサンプルから微小褐藻を単離・培養し、それらの培養株のDNA塩基配列を決定し、DNA塩基配列を用いて、微小褐藻の種分類、多様性理解の研究を行った。368の培養株のうち245株についてDNA塩基配列を決定し、62種の存在を確認した。種名を決定できたのは24種で、5種が日本新産種と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

褐藻類にはコンブのような大形の種類だけではなく、数mm以下の小さなものもいる。そのような微小褐藻は、明瞭な分類形質が少なく分類が混乱しており、種同定が難しい。そこで、DNA塩基配列決定し、DNA塩基配列を用いて、微小褐藻の種分類、多様性の理解を目指した。微小褐藻の種をDNAで区別できるようになることで、分類だけでなく、これまで行うことができなかった微小褐藻の生態学的研究や他の生物との関係、環境評価、有用成分の探索など、他分野の研究の発展につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Brown algae include not only large species such as kelps, but also small species less than a few millimeters in size. The taxonomy of such minute brown algae is confusing because of the lack of clear taxonomic characters, making species identification difficult. In this study, isolates of minute brown algae were established from samples collected from the Japanese coasts, and DNA sequences were determined for the isolates in order to use the DNA sequences for understanding of the species classification and diversity of minute brown algae. DNA sequences were determined for 245 of 368 isolates. 24 isolates were identified at species level, and 5 species were considered to be new to Japan.

研究分野：植物分類学

キーワード：褐藻 微小褐藻 DNAバーコーディング cox1 COI 分子系統

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

不等毛植物は、褐藻類、珪藻類、黄金色藻類などを含み、水界において現在最も繁栄している植物群である。褐藻類は、不等毛植物の中で唯一多細胞体制を発達させた植物群で、コンブ目やヒバマタ目の褐藻種は沿岸で群落を形成し、沿岸生態系の重要な構成要素となっている。褐藻類においても、分子系統学的手法は、その多様性・系統の研究を大きく進展させ、多くの隠蔽種の発見、分類体系の改訂がなされてきた。

褐藻類は、多細胞体制をもつが、コンブ目やヒバマタ目のように大形の体をもつものばかりではなく、数 mm から数 cm の種も多数存在する。微視的な藻体をもつグループには、主に次のものがある。シオミドロ目：単列糸状のグループがあり、微視的な種が多く記載されている。また、異形世代交代を行う種には微視的な世代をもつものが多い。アステロクラドン目：糸状の小さな藻体をもつ。クロガシラ目：1cm 以下の種が多く含まれる。スキトタムヌス目、オンスロウィア目：糸状の藻体をもつ種が含まれる。ディスコスポランギウム目：褐藻類の中で最も初期に分岐したと考えられており、単列糸状の藻体をもつ。

現在、褐藻類の種分類における大きな問題の一つに微小褐藻の分類がある。微視的な種の近代的な形態学および分子系統学的研究は少なく一部の種に限られ、特に、数 mm 以下のサイズの褐藻は、研究の進展から取り残されている。その理由として次のことがあげられる：1) 藻体が微視的で、同定には顕微鏡での観察が必要である；2) 形態が単純で同定がむずかしい；3) あまりにも分類が混乱しているため研究に取りかかりにくい；4) 分子系統学的研究を行うには、藻体を単離して培養株を作成し、培養藻体を用いて DNA 塩基配列を決定する必要がある。

微小褐藻には、未発見である種や系統が多く存在している可能性もあり、微小褐藻の多様性および系統について明らかにしていく必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまで見過ごされてきた、微小褐藻の多様性および系統を明らかにしていくことである。微小褐藻に特に注目して、採集、培養株の確立、形態観察、分子系統解析を行い、どのような種がどれだけいるのか明らかにしていく。そこでは、網羅的に、多くの培養株について分子系統解析を行い、微小褐藻の多様性を反映した分子系統樹を作成することが大変有効である。それにより、これまで一般に認識されてこなかった微小褐藻の多様性の実態に迫ることができ、また、多くの研究課題が出てくることが期待される。本研究により、未知の種が多く発見されることが期待され、また、新しい系統や、褐藻の進化を考える上で重要な系統が見つかる可能性もある。異形世代交代を行う種の微小世代は、多くは室内培養下で知られているのみで、野外での形態や生態について未知のものが多い。本研究では、そのような微小世代の野外での知見も多数得られると期待される。

3. 研究の方法

材料の採集・培養株の確立：日本沿岸から材料を得た：北海道（忍路，函館，室蘭，様似，厚岸，羅臼，斜里），青森県（深浦，蕪島），秋田県（鶴ノ崎），岩手県（浄土），山形県（温海），新潟

県（笠島），神奈川県（江ノ島，三崎），静岡県（下田），広島県（忠海）高知県（井ノ尻，四万十），鹿児島県（馬毛島沖），沖縄県（水釜，瀬底，本部，屋我地，天仁屋，金武）。微小褐藻が付着していると思われる岩や海藻類から，顕微鏡を用いて微小褐藻を探し，単藻培養株を確立した。また，岩の表面の一部や海藻類の断片を培養液を入れたシャーレに入れ，粗培養を行い，繁殖した微小褐藻から培養株を確立した。培養株の元の基質（石，砂，海藻種）について記録した。

培養株の形態：顕微鏡により形態を観察し，藻体の形状，分枝の仕方，葉緑体の形態，ピレノイドの有無，生殖器官の形態等を記録した。

分子系統解析・種境界判別・種同定：培養株について，ミトコンドリア COI（チトクローム c オキシダーゼ I サブユニット）遺伝子の部分領域を PCR 法により増幅し塩基配列を決定した。DNA データバンクからのシーケンス情報を加えて，Neighbour-Joining 法により分子系統樹を作成し，種同定，種数の把握を行った。種境界判別は，ASAP（Assemble Species by Automatic Partitioning）法により行った。

種多様性の把握：培養株数と累積種数の関係を解析し，発見される種数の上限の予測を試みた。

4．研究成果

26 地点のサンプルから，368 株の培養株を確立した。そのうち，245 株について COI 遺伝子の部分配列情報を得た。それらの配列と DNA データバンクからダウンロードした 149 のレファレンス配列をアラインメントし，Neighbour-Joining 法を用いて系統樹を作成した。得られた配列は，4 株を除いて，全て，シオミドロ目（Ectocarpales）に位置した。また，ASAP による種境界解析で得られた 1.8% の塩基配列の違いで種境界を設定すると，これらの 245 株は 62 種に分かれた。そのうち，レファレンス配列から種を同定できたものは 24 種，属まで同定できた種は 5 種，レファレンス配列との比較において，属・種名いずれも不明な種は 36 種であった。異形世代交代を行う種の微小世代であったものは 12 種であった：*Punctaria latifolia*，*Punctaria plantaginea*，*Leathesia marina*，*Vimineoleathesia japonica*，*Nemacystus decipiens*，*Eudesme borealis*，*Asperococcus bullosus*，*Hydroclathrus tilesii*，*Petalonia fascia*，*Planosiphon gracilis*，*Planosiphon nakamurae*，*Desmarestia viridis*。レファレンス配列から種を同定できたもののうち，5 種が日本新産と考えられた。それらは *Microspongium stilophorae*，*Ectocarpus fascicularis*，*Ectocarpus subulatus*，*Ectocarpus crouaniorum*，*Hincksia onslowensis* であった。

培養株数と累積種数の関係の解析では，曲線の傾きには大きな変化は見られず，今後も，株数が増えるに従い種数もまだ増えると考えられた。

Hecatonema terminale は，沖縄から北海道までの 12 地点から見つかリ，日本に広く分布することが示された。しかし，今回認められた 62 種のうち，31 種は 1 株だけしか見つかっておらず，微小褐藻の分布を明らかにするためには，さらに多くの培養株の確立・解析が必要と考えられる。

ヨーロッパ産の配列との比較では，それらと同種と考えられたものは 16 種あり，分布が広い種が多く存在することが示された。

本研究で得られた COI 部分塩基配列を DDBJ（DNA Data Bank of Japan）を通じて DNA データバンクに登録した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masakazu Hoshino, Shimpei F. Hiruta, Maria Emilia Croce, Mitsunobu Kamiya, Takahiro Jomori, Toshiyuki Wakimoto, Kazuhiro Kogame	4. 巻 30
2. 論文標題 Geographical parthenogenesis in the brown alga <i>Scytosiphon lomentaria</i> (Scytosiphonaceae): Sexuals in warm waters and parthenogens in cold waters	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Ecology	6. 最初と最後の頁 5814, 5830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mec.16152	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Masakazu Hoshino, Atsuko Tanaka, Mitsunobu Kamiya, Shinya Uwai, Masanori Hiraoka, Kazuhiro Kogame	4. 巻 57
2. 論文標題 Systematics, distribution, and sexual compatibility of six <i>Scytosiphon</i> species (Scytosiphonaceae, Phaeophyceae) from Japan and the description of four new species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Phycology	6. 最初と最後の頁 416-434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jpy.13089-20-119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Eriko Sasagawa, Wilfred John E. Santianez, Kazuhiro Kogame	4. 巻 70
2. 論文標題 <i>Asterocladon ednae</i> sp. nov. (Asterocladales, Phaeophyceae) from the Philippines	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Phycological Research	6. 最初と最後の頁 185-191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pre.12490	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榊山海里, 関本瑠菜, 小亀一弘
2. 発表標題 褐藻類の微小藻体のCOIバーコーディング
3. 学会等名 日本藻類学会第46回大会（オンライン福井大会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関本瑠菜, 小亀一弘
2. 発表標題 COIバーコーディングによる微小褐藻の多様性
3. 学会等名 日本藻類学会第44回大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------