

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2014

課題番号：22570086

研究課題名(和文) 緑藻アオサ・アオノリ類の種分類と種分化に寄与した環境適応分子進化に関する解析

研究課題名(英文) Taxonomy and molecular evolution for environmental adaptation contributed to speciation of green algal genus *Ulva*

研究代表者

島田 智 (SHIMADA, SATOSHI)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・准教授

研究者番号：40322854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、緑藻アオサ・アオノリ類の種分類と種分化に寄与した環境適応分子進化に関する解析をおこなった。沖縄県石垣島轟川での種多様性調査で*Ulva meridionalis*、外部形態がボタンアオサ似藻体の種多様性調査で*U. adhaerens*、関東近海から*U. tepida*を新種記載した。海産ウスバアオノリと汽水産スジアオノリは系統的に近縁であるが、淡水下で海産ウスバアオノリは生存率20%にまで減少するが、汽水産スジアオノリは100%を維持していた。海産ウスバアオノリと汽水産スジアオノリの、淡水、汽水および海水培養株間でのRNA-seq解析で、低塩濃度適応に関する分子進化について解析中である。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the taxonomy and molecular evolution for environmental adaptation contributed to speciation of green algal genus *Ulva*. *Ulva meridionalis* Horimoto et Shimada sp. nov. was described from the Todoroki River, Okinawa Prefecture. *Ulva adhaerens* Matsumoto et Shimada sp. nov. was described from the samples resembling *U. conglobata*. *Ulva tepida* Masakiyo et Shimada sp. nov. was described from Kanto region. *Ulva linza* (seawater), *U. prolifera* (brackish water) and bloom strain (seawater) were closely related in nrITS2 analysis. After 7 days of freshwater exposure, the viability of *U. linza* decreased to approximately 20%, while *U. prolifera* showed nearly 100% viability. In order to search what genes are related to low-salinity adaptation of *U. prolifera*, the expressed genes of *U. prolifera* and *U. linza* cultured under seawater (SW), brackish water (BW) and freshwater (FW) conditions were compared by RNA-seq.

研究分野：分類学

キーワード：緑藻類 アオサ類 種多様性 環境適応 分子進化 新種記載 nrITS rbcL

## 1. 研究開始当初の背景

緑藻アオサ・アオノリ類は、種の理解が困難と混乱を極めているグループである。このグループはリンネによって記載された *Ulva lactuca* をタイプ種とし、18, 19世紀に記載された種を多く含んでいる。世界中の沿岸域だけでなく、水深50mもの深所や南極などの極地、河口の汽水域や河川の淡水域にまで広く分布している。北京オリンピックのセーリング会場で大発生した「藻」とは、この仲間のことで、世界各地でグリーンタイドという社会問題を引き起こしている。一方で、四万十川のスジアオノリのように、商業的価値のある種も存在する。特にアオノリ類は、現在、IQ貨物に指定されていて、税関に持ち込まれる輸入貨物の簡易で迅速な判別方法の開発が期待されている。

海岸に行けばいつでもどこでも採集でき、社会的な注目を集めるこの緑藻アオサ・アオノリ類は、現在、世界で約150種が報告されているが、体制が単純で分類形質が少なく、しかもその形質状態が生育環境で大きく変化してしまうため、分類学的な混乱が生じている。ただし、世界的に研究者人口が増加し、種分類学的研究を促進するための研究環境が整ってきた。例えば、人工的に配偶子を同調的に大量に調整でき、人工交配実験を容易に行うことができる (Hiraoka and Enomoto 1998 *Phycol. Res.* 46: 199-203)。また、18世紀のリンネのタイプ標本からDNAを抽出し、*rbcL*での系統解析に成功している。 (*Nature news online* 20 Dec. 2007 10.1038. 2007. 396; *Science* v318 5858(21) Dec. 2007. 1839)。さらに、世界規模の研究者コミュニティが形成され世界各地に生育する個体を採集・利用することができる。これらを有効に活用すれば、緑藻アオサ・アオノリ類の「種」を総合的に解析できると考えた。

また、世界でも珍しい淡水産の、しかも海水でも良好に生育する興味深い種 *Ulva limnetica* ウムトウチュラノリが存在する。これは、本申請の研究室で新種として記載したもので (Ichihara et al. 2009 *Phycol. Res.* 57: 94-103)、淡水培養条件下で特異的に発現量が上昇するタンパク質ULLの遺伝子単離にも成功した (Ichihara et al. 2009 *Phycol. Res.* 57: 104-110)。さらに申請者らは、緑藻アオサ・アオノリ類において種分類学的に興味深い事例を発見した。種の認識に有効と考えられているDNAマーカー (ITS領域) で系統解析を行ったところ、海産ウスバアオノリおよび汽水産スジアオノリが非常に近縁であることが明らかになり、海産種から汽水産種がごく最近分化したことが示唆された (Shimada et al. 2008 *J. Appl. Phycol.* 20: 979-989)。

以上のように、世界でも珍しいアオサ属藻類の淡水産種や、ごく最近に海産種から分化した汽水産種を用いることで、低塩濃度適応に関連する分子進化を解析することができ

ば、種分化の引き金、つまり新しい種を生み出す原動力としての環境適応進化を理解できると考えた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、研究環境が整い、かつ種分類や種分化に関する興味深い事例が発見されている緑藻アオサ・アオノリ類に注目し、種分類の再構築と種分化の引き金となった環境適応進化の解析を進めることで、「種」に関する理解を深めたい。また、これまでの知見を生かして、輸入貨物のアオノリ類を簡便にDNA鑑定できるようなシステムを開発する。

## 3. 研究の方法

まず、日本各地、特に河口汽水域や水深50mほどの深所に生育する緑藻アオサ・アオノリ類を採集し、nrITS、*rbcL* および 5S rDNA spacer 領域での分子系統学的解析をおこなう。種クレード内・間での形態的類似性および差違を調査し、必要に応じてタイプ標本を取り寄せて、分類学的解析をおこなう。

また、申請者らが新種記載した世界でも珍しい淡水産種およびごく最近海産ウスバアオノリから分化した汽水産スジアオノリを用い、低塩濃度適応に関わる遺伝子群を subtraction 法もしくは RNA-seq 法で単離し、近縁種間でそれら遺伝子群の発現解析を行うことで、種分化の引き金となった新たな環境への適応を分子レベルで明らかにする。

さらに、商品化されている緑藻アオサ・アオノリ類の多様性を nrITS および 5S rDNA spacer 領域を用いた分子系統学的解析で把握し、輸入貨物のアオサ・アオノリ類断片を1回のPCRと電気泳動で区別する方法を開発した。

## 4. 研究成果

(1) 沖縄県石垣島轟川河口域に生育するアオサ属藻類の nrITS2 領域を用いた種多様性調査では、アオノリ様のアオサ属藻類4種が確認された。1種はスジアオノリ *U. prolifera* で、残りの3種は未記載種であった。そのうちの1種を *Ulva meridionalis* Horimoto et Shimada ミナミアオノリとして新種記載した。

(2) 水深50mほどの深所や汽水域など、これまであまり種多様性調査がおこなわれてこなかった場所に関して全国から緑藻アオサ・アオノリ類を採集し、これまでに報告された種を含め nrITS2 での系統解析をおこなった。その結果、日本産アオサ属藻類として合計29種が検出され、そのうち12種が未記載種であることが確認された。つまり、日本産アオサ属藻類は、約半数は種が認識されていないという分類学的現状があきらかとなった。そのうちの1種を *Ulva tepida* Masakiyo

et Shimada ナツアオノリとして新種記載した。

(3) 潮間帯上部に生育し外部形態が *Ulva conglobata* ボタンアオサに類似する藻体を神奈川県天神島で網羅的に採集し、*rbcL* および *nrITS2* での種多様性調査をおこなった。その結果、アナアオサ、リボンアオサ、ヒメボタンアオサおよび未記載種 2 種の合計 5 種が確認された。つまり、これまでボタンアオサとされていたものには、既報の大型膜状種であるアナアオサやリボンアオサが潮間帯上部に生育することでボタン状になることが示された。

これら 5 種のタイプ標本を含めた詳細な形態学的解析をおこない、外部形態的にはボタンアオサに類似するが細胞形態学にそれぞれの種は区別が可能であることが明らかとなった。そのうちの 1 種を *Ulva adhaerens* Matsumoto et Shimada カサネアオサとして新種記載した。この新種は、上下に積み重なった葉状部が二次的の仮根によって結合している、というこれまでのアオサ属藻類では発見されていない新規形態形質で他の種と区別できる。

もう 1 つの未記載種が、Kjellman による *Ulva conglobata* の原記載時に掲載された藻体群ともっとも形態的に類似していた。ただし、生育場所に関する記載で違いがあり、また、DNA 抽出に関して標本所有者の許可が得られず、分子系統解析は実施できなかったため、この未記載種が *Ulva conglobata* と結論づける事ができなかった。

(4) これまでの *nrITS2* での系統解析の結果から、海産ウスバアオノリ、汽水産スジアオノリおよび中国チンタオ海産ブルーム株の近縁性が示されていた。*nrITS* よりも変異速度の速い 5S rDNA spacer 領域での系統地理学的解析の結果、日本産スジアオノリから中国チンタオ海産ブルーム株が派生したと示唆された。実験室内での交雑実験の結果、海産ウスバアオノリと汽水産スジアオノリは片側交雑、汽水産スジアオノリおよび海産ブルーム株では通常の交雑が示された。チンタオ海産ブルーム株と海産ウスバアオノリは交雑しなかった。実験室内のことではあるが、チンタオ海産ブルーム株と海産ウスバアオノリだけならば遺伝子流動は引き起こされないが、中間的な汽水産スジアオノリが存在するため、これら 3 者は遺伝子流動の可能性が示された。

(5) 淡水産アオサ属藻類ウムトゥチュラノリの海水培養藻体および淡水培養藻体で発現している遺伝子を比較し、subtraction 法を用いて淡水培養藻体で特異的に発現が上昇

している 39 遺伝子を単離した。それらの遺伝子の海水から淡水移行後 1、4、24 時間後、3、7 日後の発現量の挙動を調査した結果、一時的に発現量が上昇するがその後落ちるタイプ、その後も落ちないタイプなどが示された。

(6) 様々なアオサ属藻類(深所性アオサ種、沿岸性アナアオサ、海産ウスバアオノリ、来水産スジアオノリ、淡水産ウムトゥチュラノリ)を 7 日間海水中、汽水中および淡水中で培養し、細胞生存率の推移を調査した。深所性アオサ種は、汽水でも 1 日で生存率 0% となった。深所は環境が安定しており、わずかな環境変動でも生存に影響したと示唆された。沿岸性アナアオサは淡水中 3 日目で生存率 0% となった。系統的に近縁な海産ウスバアオノリと汽水産スジアオノリは、淡水中でのみ大きな違いが生じ、海産ウスバアオノリは 7 日目の生存率が 20% にまで減少するが、汽水産スジアオノリでは 100% を維持していた。全ての種で、低塩濃度適応に関し、生育場所の環境との整合性が見られ、環境適応に関する遺伝的な進化が生じている事が示唆された。

(7) 日本各地の海産ウスバアオノリおよび汽水産スジアオノリを採集し、2 種で利用可能なマイクロサテライトマーカーを開発した。STRUCTURE や POPULATION などのフラグメント解析の結果、北海道信砂川に生育するスジアオノリに北海道忍路産ウスバアオノリの遺伝子流動が引き起こされていることが示唆された。現在、高知県四万十川のサンプルを追加し、SSR および RAD-seq を用いた解析を行っている。

(8) 海産ウスバアオノリおよび汽水産スジアオノリの、淡水、汽水および海水培養株間での RNA-seq 解析をおこなった。低塩濃度適応に関する遺伝子の単離、その機能解析、発現挙動、2 種間での分子進化について解析中である。

(9) 商品化されている緑藻アオサ・アオノリ類を日本・アジア諸国から取り寄せ、アオサ類およびアオノリ類の多様性の幅を *nrITS* 領域および 5S rDNA 領域で把握した。この解析では、前述の海産ウスバアオノリおよび汽水産スジアオノリの交雑体と思われる藻体も複数地域の数製品から検出された。また、解析で得られたアオサ類およびアオノリ類の *nrITS* の多様性の幅から、アオノリ類だけを増幅させるプラマーを開発し、1 回の PCR で自由に輸入できるアオサ類と、輸入割当があるアオノリ類を区別する方法を開発した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件 全て査読あり)

1. Kaoru Matsumoto and Satoshi Shimada. 2015. Systematics of green algae resembling *Ulva conglobata*, with a description of *Ulva adhaerens* sp. nov. (Ulvales, Ulvophyceae). *European Journal of Phycology* 50: 100-111. DOI:10.1080/09670262.2014.994189
2. Yuumi Kawashima, Tetsuya Akasaki, Yoshitsugu Matsumoto and Satoshi Shimada. 2014. Development of a rapid and accurate PCR-based detection method for commercially valuable green algal species. *Fisheries Science* 80: 859-867. DOI:10.1007/s12562-014-0760-8
3. Yuka Masakiyo & Satoshi Shimada. 2014. Species diversity of the genus *Ulva* (Ulvophyceae, Chlorophyta) in Japanese waters, with special reference to *Ulva tepida* Masakiyo et S.Shimada sp. nov. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B* 40: 1-13.
4. Kensuke Ichihara, Kazuyuki Miyaji & Satoshi Shimada. 2013. Comparing the low-salinity tolerance of *Ulva* species distributed in different environments. *Phycological Research* 61: 52-56. DOI: 10.1111/j.1440-1835.2012.00668.x
5. Yuumi Kawashima, Tetsuya Akasaki, Yoshitsugu Matsumoto, Yukihiko Yamazaki & Satoshi Shimada. 2013. Species identification of imported and Japanese commercial green algal products, based on phylogenetic analyses using the nrITS2 and 5S rDNA spacer regions. *Fisheries Science* 79: 521-529. DOI: 10.1007/s12562-013-0610-0
6. Rika Horimoto, Yuka Masakiyo, Kensuke Ichihara & Satoshi Shimada. 2011. *Enteromorpha*-like *Ulva* (Ulvophyceae, Chlorophyta) growing in the Todoroki River, Ishigaki island, Japan, with special reference to *Ulva meridionalis* Horimoto et Shimada sp. nov. *Bulletin of the National Science Museum* 37: 155-167.
7. Kensuke Ichihara, Frederic Mineur & Satoshi Shimada. 2011. Isolation and temporal expression analysis of freshwater-induced genes in *Ulva limnetica* (Ulvales, Chlorophyta). *Journal of Phycology* 47: 584-590. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2011.01001.x
8. Masanori Hiraoka, Kensuke Ichihara, Wenrong Zhu, Jiahai Ma & Satoshi Shimada. 2011. Culture and hybridization

experiments on an *Ulva* clade including the Qingdao strain blooming in the Yellow Sea. *PLoS ONE* 6(5): 1-6. DOI: 10.1371/journal.pone.0019371

9. Satoshi Shimada, Moe Nagano, Masanori Hiraoka, Kensuke Ichihara, Frederic Mineur & Wenrong Zhu. 2010. Phylogeographic analysis of the genus *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta), including bloom sample in Qingdao, China. *Coastal Marine Science* 34: 117-122.

[学会発表] (計14件)

1. 正清友香・市原健介・小倉淳・嶋田智「緑藻アオサ類における異なる塩環境下での生育特性比較解析」第78回日本植物学会(2014年9月13日)明治大学(神奈川県川崎市)
2. 正清友香・市原健介・小倉淳・嶋田智「緑藻アオサ属藻類近縁2種間の異なる塩濃度条件における比較RNA-seq解析」第13回日本植物分類学会(2014年3月20日)熊本大学(熊本県熊本市)
3. 正清友香・市原健介・小倉淳・嶋田智「緑藻アオサ属藻類近縁2種間の異なる塩濃度条件における比較RNA-seq解析」第38回日本藻類学会(2014年3月15日)東邦大学(千葉県船橋市)
4. 正清友香・市原健介・小倉淳・嶋田智「緑藻アオサ属藻類近縁2種間の異なる塩濃度条件における比較RNA-seq解析」第61回日本生態学会(2014年3月15日)広島国際会議場(広島県広島市)
5. 永野萌・岩崎貴也・松下範久・宝月岱造・平岡雅規・嶋田智: "近縁なアオサ2種にみられる遺伝子流動" 第12回日本植物分類学会.(2013年03月15日).千葉大学(千葉県千葉市)
6. 永野萌・松下範久・宝月岱造・平岡雅規・嶋田智: "別種とされてきたアオサ2種にみられる遺伝的交流" 第76回日本植物学会.(2012年09月16日). 兵庫県立大学(兵庫県姫路市)
7. 正清友香・市原健介・小倉淳・嶋田智: "比較RNAseqによる緑藻アオサ類の淡水適応メカニズムの解析" 第76回日本植物学会.(2012年09月16日). 兵庫県立大学(兵庫県姫路市)
8. 永野萌・松下範久・宝月岱造・平岡雅規・嶋田智: "種とは? 緑藻アオサの場合" 第36回日本藻類学会.(2012年07月14日). 北海道大学(北海道札幌市)
9. 松本薫・嶋田智: "緑藻「ボタンアオサ」は存在するか?" 第36回日本藻類学会.(2012年07月14日). 北海道大学(北海道札幌市)

10. 鳶田智・正清友香・市原健介・小倉淳. "比較RNAseq による緑藻アオサ類の淡水適応メカニズムの解析" 第36回日本藻類学会. (2012年07月14日). 北海道大学 (北海道札幌市)
11. 河嶋優美・赤崎哲也・松本啓嗣・山崎幸彦・鳶田智. "DNA分析によるアオノリ製品の原料種推定と属レベルでの簡易スクリーニング法の開発" 第36回日本藻類学会. (2012年07月14日). 北海道大学 (北海道札幌市)
12. 正清友香・堀本理華・内村真之・寺田竜太・鳶田智. "日本産アオサ属藻類の種多様性" 第36回日本藻類学会. (2012年07月14日). 北海道大学 (北海道札幌市)
13. 永野萌, ほか. "種とは?-緑藻アオノリの場合-" 第75回日本植物学会. (2011年09月18日). 東京大学 (東京都駒場)
14. 市原健介・鳶田智. "淡水産アオノリ *Ulva limnetica* を用いた淡水誘導性遺伝子の単離と発現解析" 第74回日本植物学会. (2010年09月10日). 中部大学 (愛知県名古屋市)

〔その他〕

ホームページ

<http://bios.cc.ocha.ac.jp/Shimada/member/figs/framepage8.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鳶田智 (SHIMADA SATOSHI)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学

研究科・准教授

研究者番号：40322854

### (3)連携研究者

宮村新一 (MIYAMOTO SHINICHI)

筑波大学・大学院生命環境科学領域・准教授

研究者番号：00192766