

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770086

研究課題名（和文） 単細胞緑藻類の近縁種間での生理的分化の解明

研究課題名（英文） Research on physiological differentiation among closely related unicellular green algae

## 研究代表者

仲田 崇志（NAKADA TAKASHI）

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任助教

研究者番号：10548994

研究成果の概要（和文）：淡水に生息する微細藻類の一群であるオオヒゲマワリ目の藻類について、様々な種の培養株を確立し、その形態的特徴と類縁関係を解明した。この中から選別した藻類を含む 3 つの系統群において、温度条件や栄養条件が増殖に及ぼす影響を調べたところ、近縁な種間でも増殖特性が大きく異なることが明らかとなり、微細藻類が増殖特性の違いによって棲み分けている可能性が示唆された。また一部の系統群ではゲノムの倍数化が種分化をもたらした可能性も示唆された。

研究成果の概要（英文）：Several new strains of volvocalean algae, a major freshwater microalgal group, were established, and their morphological and phylogenetical properties were clarified. Three lineages including the new strains were selected and examined for the growth examination under different temperature and nutrient conditions. As a results, growth properties were quite different between even closely related species, and it is indicated that microalgal species are differentiated based on the differences of growth properties. It is also indicated that genome duplications possibly resulted in species differentiations in certain lineages.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：進化，生理学，藻類学，微生物，分類学，緑藻類，倍数体

## 1. 研究開始当初の背景

微生物の分布においては、地理的な障壁があまり存在しない可能性が示唆されている。このことは微生物の種分化において地理的隔離は大きな役割を果たしていないことを意味している。また浮遊性の微細藻類の場合は空間的な棲み分けも困難であろう。にもかかわらず微細藻類の種多様性は決し

て低くはなく、主に単細胞性緑色鞭毛藻類からなるオオヒゲマワリ目（Volvocales）には 1000 種以上が記載されている。従って、水圏の微細藻類多様性を生み出し、維持する何らかの機構が存在すると考えられる。その候補としては、生理的特性の違いが考えられる。

## 2. 研究の目的

水圏の単細胞藻類の種分化において、生理的特性の分化が役割を果たしている可能性を検証することを目的とした。そのためには種の実態がよく調べられている近縁種間で生理的な特性を比較する必要があるため、研究代表者らによっていくつかの種で種分類の研究が進められてきたオオヒゲマワリ目を対象として、種の実態の解明や生理学的な特性の比較し、種間で明確な生理学的差異が存在する可能性を特に検証する。

## 3. 研究の方法

(1) 微細藻類において、正確な種分類が確立している種群は極めて限られている。そこで生理学的な特性を比較することに先立ち、オオヒゲマワリ目の様々な種において、培養株の分子系統解析と光学顕微鏡観察、有性生殖能力に基づいて種の実態を解明した。また以後の研究で用いる種について、系統学的な位置の解明など分類学的な所屬を解明した。

(2) オオヒゲマワリ目において種の実態が最もよく調べられている *Chlamydomonas reinhardtii* において太平洋をまたいだ日米間の培養株が接合子を形成することが知られていたが、接合子が正常に発芽して交雑体が得られるかどうかは調べられていなかった。そこで米国産の栄養要求性の株と日本産の野生型株を用いて、両者の接合子を作成し、発芽実験を試みた。親株の栄養要求性と交雑型の組合せに着目し、交雑体の裏付けも行った。

(3) 生理学的な特性を比較するために、培養温度および培地中の有機物の有無を変えた条件でそれぞれの対象藻類を培養し、培地中の細胞密度の変化に基づいて増殖特性を明らかにした。培地中に添加する有機物としては、様々なオオヒゲマワリ目の藻類が利用することが知られている酢酸イオンを選択した。

(4) 新たに単離、培養した *Chlamydomonas parallelistriata* の培養株と、これに近縁な既存の培養株などを含んだ種群 (*Parallelistriata* 種群) において、ゲノムの倍数化が起こっている可能性が浮上したため、市販の測定キットを用いて細胞中の DNA を定量した。

## 4. 研究成果

(1) 潜在的に本研究の対象として適しているオオヒゲマワリ目の様々な種について、系統分類学的な研究を行った。

有機栄養要求性で、一部の種が微好気性

とされている群体性オオヒゲマワリ目の *Pyrobotrys* 属について、その分子系統学的な位置が知られていなかったため、新規培養株と既存の培養株の 18S rRNA、*rbcL*、*psaB* の 3 遺伝子の配列を決定し、系統解析を実施した。その結果、これらの群体性藻類が既知の群体性藻類とは系統的に全く異なる独自の系統群であることが明らかとなり、*Journal of Eukaryotic Microbiology* 誌に論文発表した (雑誌論文)。しかし複数の培養株を安定に培養することも、本属の姉妹群を特定することも出来なかったため、生理学的特性の比較には適さないと考えられた。

日本国内からこれまで報告例のなかったヨリソイマユダマモ (*Volvulina compacta*) と形態的に同定された培養株について、詳細な形態観察と 5 遺伝子の系統解析を行った。その結果、日本産のヨリソイマユダマモは、系統的にはむしろ *Volvulina pringsheimii* に近縁であることが示されたため、*Journal of Japanese Botany* 誌に論文発表した (雑誌論文)。しかし本種の培養株は乏しく、進化的起源も複雑であるため、生理学的特性の比較には適さないと考えられた。

未発表データに基づき、無色鞭毛藻類の新規株との近縁性が示唆されていた新規培養株について、その種分類と正確な系統的位置が不明だったことから、詳細な光学顕微鏡観察と 3 遺伝子の結合系統解析を行った結果、本種がマメコナミドリ (*Chlamydomonas neoplanoconvexa* [旧名 *Chlamydomonas planoconvexa*]) であり、オオヒゲマワリ目の *Caudivolvuxa* 系統群の中で独自の系統群を代表することが示された。本研究については *Phycological Research* 誌に論文発表した (雑誌論文, 学会発表)。本種については生理学的特性の研究に用いた。

日本産の複数の新規培養株が、これまで分子系統学的研究が行われていない種であることが示唆されたため、詳細な光学顕微鏡観察と 18S rRNA の分子系統解析を行った。その結果、いずれも日本では未記録の *Chlamydomonas pseudomacrostroma* と *Chlamydomonas media* であると同定された。前者についてはイギリス産の培養株と同種であると考えられ、微細藻類が広域分布する可能性を裏付ける新たな証拠となった。この成果については *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 誌に論文発表した (雑誌論文)。しかし直後により多数の種を用いた分類研究が別のグループにより発表され (Pröschold et al. *Eur. J. Phycol.* 2012), これらの種の分類に異論が提示されたため、さらに種分類を検証する必要がある。

単細胞性の *Gungnir* 属の新規株が *Gungnir neglectum* と近縁な新種である可能性が示唆されたため、詳細な顕微鏡観察と 3 遺伝子系統解析、および RNA 分子の二次構造比較に基づき、種分類の見直しを行った。その結果、2 新種が見いだされたため、学会発表を行った（学会発表）。その後、新たな培養株が取得されたため、これらも含めた分類学的裏付けが必要となっている。

18S rRNA の系統樹に基づき、新規の培養株が、*Chlamydomonas parallelistriata* および *Chlamydomonas nasuta* などとされた既存の培養株と近縁であることが示唆されたため、形態観察と、RNA 分子の二次構造に基づく種分類学的研究を行った。その結果、これらの培養株を含む *Parallelistriata* 種群が 4 種に分類されることが強く示唆されたため、学会発表を行った（学会発表）。

(2) 日本産と米国産の *Chlamydomonas reinhardtii* の培養株を用いて、交雑体を作成し、発芽条件を検討した。数日間の乾燥の後に酢酸栄養を含んだ培地を添加することで接合子の発芽が認められ、ここから単離されたクローン株において栄養要求性と交配型を調べることで、交雑体であることの確認を行った。その結果、日米間の培養株の交雑体にしか認められない組合せが確認されたため、太平洋を挟んだ日本とアメリカに分布する *Chlamydomonas reinhardtii* の間で、遺伝的な交流が起こりうることを示された。本成果については今後、遺伝型を確認した上で論文として発表することを予定している。

(3) 3 つの系統群に含まれる種において、それぞれ生理学的な特性の比較を行った。

先行研究にて互いの類縁性が示されていた *Chlamydomonas reinhardtii* と *Chlamydomonas globosa* について、異なる温度条件における増殖の比較を行った。その結果、25 °C での培養において差異が認められた。しかしいずれの種も良好な増殖を示す中において、必ずしも大きな差ではなかった。

ヤリミドリ属の 2 種、*Chlorogonium euchlorum*、*Chlorogonium elongatum*、そしてこれらと近縁な無色鞭毛藻類の *Hyalogonium fusiforme* において酢酸栄養の有無、光の有無に対する増殖特性の変化を調べた。その結果、2 種のヤリミドリ属は光合成のみによって増殖を維持することができるが、*H. fusiforme* は増殖に酢酸イオンを要することが分かった。また、3 種とも酢酸イオンを増殖に用いることが出来るが、

*Chlorogonium elongatum* においては酢酸イオンのみによる増殖は光合成に比べて顕著に遅い一方、*Chlorogonium euchlorum* では酢酸イオンの存在下でむしろ増殖が速く、光合成が二次的な役割しか果たしていないことが示唆された。これらの 3 種は互いに極めて近縁であることから、近縁種間で生理学的特性が異なり、棲み分けを行っている可能性が示唆された。本研究成果については学会発表の一部として報告した（学会発表）。

(1) で報告した *Chlamydomonas neoplanoconvexa* と、その姉妹群である無色鞭毛藻類 *Hyalogonium* sp. について、酢酸栄養の有無、光の有無に対する増殖特性の変化を調べた。その結果、前者は酢酸イオンを増殖に利用することが出来ない一方、後者は酢酸イオンによって増殖が大きく促進されることが示された。また、無色の藻類は光合成を行わないものと考えられるが、*Hyalogonium* sp. は有機炭素源の不在下でも明条件で若干の増殖を示した。このことは、一見すると無色の本種がわずかながら光合成を行っている可能性を示唆しており、本種が光合成を喪失する途上にある中間的な生物であることを示している。本研究成果については学会発表の一部として報告した（学会発表）。

(4) (1) で種分類を検討した *Chlamydomonas parallelistriata* 種群においては、含まれる 4 種が互いに近縁であるにもかかわらず、明らかに細胞サイズが異なっていた。そこでこれらの種がゲノムの倍数化によって分化した可能性を検討した。半同調的な培養系を確立し、DNA 定量キットと細胞計数器を組み合わせることによって、間期の栄養細胞のゲノムサイズを測定する方法を開発し、実際に測定した結果、大きな細胞を持つ種では、小さな細胞を持つ種に比べて細胞が 2~4 倍の DNA を含むことが示された。このことは *Parallelistriata* 系統群においてゲノムの倍数化が種分化に大きな役割を果たした可能性を強く示唆しており、この成果について学会にて発表を行った（学会発表）。

## 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 13 件)

仲田崇志 国際細菌命名規約 (1990 年版) からの規約改訂と、国際原核生物命名規約への規約名称変更. *日本微生物資源学会誌* 28, 135-147 (2012). 査読無  
[http://www.jssc-home.jp/journal/No28\\_2](http://www.jssc-home.jp/journal/No28_2).

html

Nakada, T., Nozaki, H. & Tomita, M. Light microscopy and phylogenetic analyses of *Chlamydomonas* species (Volvocales, Chlorophyceae). I. *Chlamydomonas pseudomacrostigma* and *Chlamydomonas media*. *Acta Phytotax. Geobot.* **62**, 69-78 (2012). 査読有

<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009470706/>

Nakada, T. & Tomita, M. *Chlamydomonas neoplanconvexa* nom. nov. and its unique phylogenetic position within Volvocales (Chlorophyceae). *Phycol. Res.* **59**, 194-199 (2011). 査読有

DOI: 10.1111/j.1440-1835.2011.00617.x

Nakada, T. (138) A proposal on the designation of cultures of fungi and algae as types. *Taxon* **59**, 983 (2010). 査読無

<http://www.ingentaconnect.com/content/iapt/tax/2010/00000059/00000003/art00034>

仲田崇志 微細藻類の培養研究と国際植物命名規約(ウィーン規約)におけるタイプ指定. *日本微生物資源学会誌* **26**, 109-116 (2010). 査読無

[http://www.jbcc-home.jp/journal/No26\\_2/No26\\_2\\_109.pdf](http://www.jbcc-home.jp/journal/No26_2/No26_2_109.pdf)

仲田崇志 古今東西の植物の定義: これは植物ですか?と聞かれたら. *植物科学最前線* **1**, 36-41 (2010). 査読無

<http://bsj.or.jp/frontier/BSJreview2010A8.pdf>

Nakada, T., Tomita, M. & Nozaki, H. *Volvulina compacta* (Volvocaceae, Chlorophyceae), new to Japan, and its phylogenetic position. *J. Jpn. Bot.* **85**, 364-369 (2010). 査読有

[http://www.tsumura.co.jp/english/kampo/plant/085/085\\_06.html#p364](http://www.tsumura.co.jp/english/kampo/plant/085/085_06.html#p364)

Nakada, T., Nozaki, H. & Tomita, M. Another origin of coloniality in volvocales: The phylogenetic position of *Pyrobotrys Arnoldi* (Spondylomoraceae, Volvocales). *J. Eukaryot. Microbiol.* **57**, 379-382 (2010). 査読有

DOI: 10.1111/j.1550-7408.2010.00488.x

[学会発表](計 10 件)

仲田崇志, 無色鞭毛性緑藻類(緑藻綱, オオヒゲマワリ目)および近縁種の酢酸利用, 日本藻類学会第 37 回大会, 2013 年 3 月 28 日, 山梨大学(山梨)

仲田崇志, 粘菌は植物?いいえ, アメーバです: 真核生物の系統分類と粘菌の起源, 日本変形菌研究会 2013 年大会(招待講演), 2013 年 2 月 23 日, 国立科学博物館 東京

仲田崇志, *Chlamydomonas parallelistriata* 種群(緑藻綱, オオヒゲ

マワリ目)における DNA 含量の変化, 日本藻類学会第 36 回大会, 2013 年 7 月 14 日, 北海道大学(北海道)

仲田崇志, *Chlamydomonas parallelistriata* 種群(緑藻綱, オオヒゲマワリ目)の分類と進化, 日本植物分類学会第 11 回大会, 2012 年 3 月 24 日, 大阪学院大学(大阪)

仲田崇志, 単細胞藻類の分類学 ハナのない植物の魅力とは, 第 43 回種生物学シンポジウム(招待講演), 2011 年 12 月 10 日, 富士 Calm(山梨)

仲田崇志, *Gungnir* 属(緑藻綱; オオヒゲマワリ目)3 種の多面的な種分類, 日本藻類学会第 35 回大会, 2011 年 3 月 27 日, 富山大学(富山)

Nakada, T., *Chlamydomonas neoplanconvexa* nom. nov. and its unique phylogenetic position within Volvocales (Chlorophyceae), 日本植物分類学会第 10 回大会, 2011 年 3 月 19 日, 筑波大学(茨城; 東日本大震災により要旨集の発行のみとなった)

仲田崇志, *Chlamydomonas reinhardtii* と近縁株の分類学的再検討, 第 8 回クラミドモナスワークショップ, 2010 年 12 月 11 日, 東京大学(東京)

仲田崇志, オオヒゲマワリ目(緑藻植物門緑藻綱)の進化と分類学的再編, 日本植物学会第 74 回大会(招待講演), 2010 年 9 月 9 日, 中部大学(愛知)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

仲田崇志 (NAKADA TAKASHI)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任助教

研究者番号: 10548994

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし