

学位論文題名

Taxonomy, phylogeny, and adaptation in *Ulva limnetica* sp. nov.
(Ulvales, Ulvophyceae), a rare freshwater representative of
a common green seaweed genus

(緑色海藻類アオサ属の稀有な淡水産種 *Ulva limnetica* sp. nov.

(アオサ藻綱アオサ目) の分類、系統および適応)

学位論文内容の要旨

緑藻植物門アオサ藻綱アオサ目に含まれるアオサ属藻類 (*Ulva*) は、世界中の沿岸域に生育する最も一般的な緑色海藻類で、一部の種は汽水域にも生育している。藻体は2層膜状 (*Ulva* 型) または一層中空 (*Enteromorpha* 型) で、「グリーンタイド」と呼ばれる大量繁殖を引き起こす種や、「青のり」として食用利用される種が含まれる。現在、世界で96種が分類学的に認められており、日本では19種が確認されている。

生物の多様性を生み出す原動力として、新しい環境への適応は非常に興味深い現象である。その例の一つに海産生物の淡水適応が挙げられる。本研究では、沖縄県石垣島の淡水湧水池および与那国島の河川中流域から発見した本属では珍しい淡水産のアオサ属藻類を研究対象とした。この淡水産アオサ属藻類には近縁な海産種や汽水産種が存在することから、近縁種との生理的・遺伝的な比較により海産植物の淡水適応のメカニズムや進化過程を明らかにできると期待される。

そこで本研究では、1) 形態観察および分子系統解析から沖縄県で発見した淡水産アオサ属藻類の独立性およびアオサ目内での系統的位置を明らかにすること、2) この淡水産アオサ属藻類と海産および汽水産アオサ属藻類の低塩濃度耐性を比較し、アオサ属藻類における生育地と低塩濃度耐性の相関を明らかにすること、さらに、3) 淡水条件で発現が上昇する遺伝子群の単離と発現解析から、海産植物の淡水適応に関わる分子進化を明らかにすることを目的とした。

第1章では、沖縄で発見した淡水産アオサ属藻類の野外藻体および培養藻体を用いた形態観察と分子系統解析により、種としての独立性を調査し、アオサ目内での系統的位置を推定した。外部形態は全長が最大80cm、直径は2cmにまで達し、藻体は一層中空 (*Enteromorpha* 型) で、もろく、表面にシワが目立ち、所々に分枝を生じていた。また顕微鏡観察から葉緑体は細胞表面を覆うように位置し、ピレノイドを1~3個含むことが明らかになった。以上の形態形質の組み合わせにより本種は既知の類似種から区別された。さらに、藻体基部に存在する根様細胞は、多くのアオサ属藻類で細胞層の内側に伸長するが、本種では細胞層の外側に伸長していた。この形態的特徴はアオサ属では *Ulva* 型の *Ulva sublittoralis* でのみ確認されており、*Enteromorpha* 型としては本種が初めての例となる。さらに、核コード18S rRNA 遺伝子 (18S ribosomal RNA gene)、ITS2 領域 (internal transcribed spacer region 2) および葉緑体コード *rbcL* 遺伝子 (large subunit of the ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase gene) を用いた分子系統解析からも、本種は既知のアオサ属藻類とは異なる独立種であることが支持された。以

上の形態観察および分子系統解析の結果から、本種をアオサ属藻類の新種 *Ulva limnetica* sp. nov. として記載した。また、分子系統解析の結果からは本種が 1) アオサ属内で最も初期に派生した種であること、2) アオサ目内の海産種に挟まれるように位置し、海産種から派生した種であることも示唆された。

第 2 章では、異なる水環境に生育するアオサ属藻類を用いて、それぞれの種の低塩濃度耐性を FDA (Fluorescein diacetate) 生体染色法によって比較した。実験には、海産種 (潮下帯: *Ulva* sp. 2、潮間帯: *Ulva pertusa*、*Ulva linza*)、汽水産種 (*Ulva prolifera*) および淡水産種 (*U. limnetica*) の培養株を用いた。その結果、潮下帯に生育する *Ulva* sp. 2 は、5 PSU (practical salinity unit) で一日培養すると全ての細胞が死滅し、低塩濃度に対する耐性が最も低いことが明らかになった。また、潮間帯に生育する *U. linza* では淡水で 7 日間培養すると細胞の生存率が 20 % まで減少するのに対し、汽水産種 *U. prolifera* では生存率が 100 % に保たれていた。このことから、以前の研究で非常に近縁であることが示されている *U. linza* と *U. prolifera* では低塩濃度への耐性が大きく異なることが明らかになった。さらに、淡水産種 *U. limnetica* は現在までの野外調査では海域では見つかっていないが、30 PSU の環境でも高い生存率を維持できることが明らかになった。

第 3 章では、*U. limnetica* を淡水条件で培養した際に発現が上昇するタンパク質を検出するために、それぞれ淡水条件および海水条件で培養した藻体からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) による比較を行った。その結果、淡水培養藻体で蓄積量が増加している約 19 kDa のタンパク質の存在が明らかになった。このタンパク質の N 末端配列をアミノ酸シーケンサーによって解析したところ、Ala-Asp-Cys-Asn-Thr-Asp-Ser-Ala-Phe-Gln-Leu-Leu という配列を得た。この配列を基に縮重プライマーを作成し、このタンパク質をコードしている cDNA を RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法によって単離した。単離された cDNA は全長 1272 bp、5'-UTR (untranslated region) が 198 bp、ORF (open reading frame) が 840 bp、3'-UTR が 234 bp であった。アミノ酸シーケンサーで得られた N 末のアミノ酸配列は開始コドンから 90 番目~101 番目に存在していた。得られたアミノ酸配列で BLAST 検索をおこなったところ *U. pertusa* 由来のレクチンと最も高い相同性を示したことから、この遺伝子を *ULL* (*Ulva limnetica* lectin) と名付けた。また、海水培養藻体および淡水培養藻体を用いた Northern hybridization から *ULL* は淡水培養藻体でより高い発現を示していることも明らかになり、転写レベルで調節を受けていることが示唆された。

第 4 章では、より網羅的な淡水条件で発現が上昇する遺伝子の単離を目的とし、cDNA subtraction 法を利用した EST (Expressed sequence tag) 解析をおこない、さらに得られた遺伝子群の発現解析をおこなった。配列解析した 263 個のクローン配列には、27 個のコンティグ配列と 192 個シングルトン配列が含まれ、合計 219 個の淡水条件で発現上昇が期待される遺伝子の部分配列を得た。この内、120 個の遺伝子を RT-PCR により、淡水での発現上昇を検証したところ、39 個 (32.5%) の遺伝子が実際に発現上昇していることが確認できた。次に、この 39 個の遺伝子について、海水培養藻体を淡水に移してから 1 h 後、4 h 後、24 h 後、3 日後、7 日後の発現量の変化を調べた。その結果、遺伝子発現のピークの多くは淡水移行直後の短い期間 (1~4 h 後) にみられること、またこれらの遺伝子群には発現パターンが異なる 3 グループが存在することが明らかになった。グループ 1 では淡水移行後に見られた発現の上昇が 7 日後まで維持された。グループ 2 では淡水移行直後の短い期間 (1~4 h 後) にのみ発現が上昇し、24 h 後には海水条件と同程度の発現量まで減少した。グループ 3 ではグループ 1 の遺伝子群と似た発現パターンを示したが発現量のピークは 3 日後、7 日後の実験期間の後半に見られた。グループ 1 にはリボソーム遺伝子、活性酸素除去酵素 (アスコルビン酸ペルオキシダーゼ)、適合溶質関連酵素、分子シャペロン等が、グループ 2、グループ 3 には主に機能未知遺伝子が含まれていた。

以上、本研究では淡水産アオサ属藻類である *Ulva limnetica* の新種記載を行い、その淡水環境への適

応機構について分子生物学的な手法を用いることによって、多くの適応候補遺伝子群の同定、またその発現様式を明らかにした。アオサ藻綱においては、このような淡水適応との関連が期待される遺伝子の同定はこれまでにおこなわれておらず、同生物群における淡水及び汽水域への適応進化学的研究に新しい知見をもたらすことができた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 堀 口 健 雄

副 査 教 授 片 倉 晴 雄

副 査 教 授 Matthew H. DICK

副 査 教 授 山 本 興太朗 (生命科学院)

副 査 准教授 藤 田 知 道 (生命科学院)

副 査 准教授 瀧 田 智 (お茶の水女子大学大学院

人間文化創成科学研究科)

学 位 論 文 題 名

Taxonomy, phylogeny, and adaptation in *Ulva limnetica* sp. nov.
(Ulvales, Ulvophyceae), a rare freshwater representative of
a common green seaweed genus

(緑色海藻類アオサ属の稀有な淡水産種 *Ulva limnetica* sp. nov.

(アオサ藻綱アオサ目) の分類、系統および適応)

生物の多様性を生み出す原動力として、新しい環境への適応は非常に興味深い現象である。その一つに海産生物の淡水適応が挙げられる。本研究では、沖縄県石垣島の淡水湧水池および与那国島の河川中流域から発見した緑藻植物門アオサ藻綱アオサ目アオサ属 (*Ulva*) に含まれる珍しい淡水産アオサ属藻類を研究対象とした。アオサ属藻類は、世界中の沿岸域に生育する最も一般的な緑色の海藻類で、一部の種は汽水域にも生育している。今回発見した稀有な淡水産アオサ属藻類には近縁な海産種や汽水産種が存在することから、近縁種との生理的・遺伝的な比較により海産植物の淡水適応のメカニズムや進化過程を明らかにできると期待される。以上の背景から本研究は、1) 沖縄県で発見した淡水産アオサ属藻類の種としての独立性およびアオサ目内での系統的位置を明らかにすること、2) 本種と海産および汽水産アオサ属藻類の低塩濃度耐性を比較し、生育地と低塩濃度耐性との相関を明らかにすること、さらに3) 淡水条件で発現が上昇する遺伝子群の単離と発現解析から、海産植物の淡水適応に関わる分子進化を明らかにすることを目的としたものである。

第1章では、まず、本種の詳細な形態観察を行なった。全長が最大80cm、直径は2cmにまで達し、藻体は一層中空で、もろく、表面にシワが目立ち、所々に分枝を生じていた。葉緑体は細胞表面を覆うように位置し、ピレノイドを1~3個含んでいた。以上の形態形質の組み合わせにより本種は既知の類似種から区別された。さらに、藻体基部に存在する根様細胞は、多くのアオサ属藻類で細胞層の内側に伸長するが、本種では細胞層の外側に伸長していた。この形態的特徴はアオサ属では *Ulva* 型の *U. sublittoralis* でのみ確認されており、*Enteromorpha* 型としては本種が初めての例となる。さらに、核コード18S rRNA遺伝子、ITS2領域および葉緑体コード *rbcL* 遺伝子を用いた分子系統解析からも、本種は既知のアオサ属藻類とは異なる独立種であることが支持された。以上の形態観察および分子系統解析の結果から、本種をアオサ属藻類の新種 *Ulva limnetica* sp. nov. として記載した。また、分子系統解析の結果、本種はアオサ目内の海産種に挟まれるように位置し、本種が海産種から派生した種であることが示唆された。

第2章では、海産種 (潮下帯: *Ulva* sp. 2、潮間帯: *U. pertusa*、*U. linza*)、汽水産種 (*U. prolifera*)

および淡水産種（本種 *U. limnetica*）の低塩濃度耐性を FDA 生体染色法によって比較した。その結果、淡水産種、汽水産種、潮間帯種、潮下帯種の順に低塩濃度耐性が高く、低塩濃度に対する耐性の差は生育環境の違いを反映していることを明らかにした。また、本種 *U. limnetica* は今までのところ海域で発見されていないが、30 PSU の環境でも高い生存率を維持できることが判明した。

第 3 章では、本種 *U. limnetica* を淡水条件で培養した際に発現が上昇するタンパク質を明らかにするため、それぞれ淡水条件および海水条件で培養した藻体からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE による比較を行った。その結果、淡水培養藻体で蓄積量が増加している約 19 kDa のタンパク質の存在が明らかになった。単離された cDNA は全長が 1272 bp、5'-UTR が 198 bp、ORF が 840 bp、3'-UTR が 234 bp であった。得られたアミノ酸配列は *U. pertusa* 由来のレクチンと最も高い相同性を示したことから、この遺伝子を ULL (*Ulva limnetica* lectin) と名付けた。

第 4 章では、本種 *U. limnetica* の淡水条件で発現が上昇する遺伝子のより網羅的な単離を目的とし、cDNA subtraction 法を利用した EST 解析をおこない、さらに得られた遺伝子群の発現解析をおこなった。部分配列を得た淡水条件で発現上昇が期待される遺伝子を、RT-PCR により淡水条件下での発現上昇を検証したところ、39 個の遺伝子が実際に発現上昇していた。次に、海水培養藻体を淡水に移してから 1 h 後、4 h 後、24 h 後、3 日後、7 日後の発現量の変化を調べた。その結果、遺伝子発現のピークの多くは淡水移行直後の短い期間（1~4 h 後）にみられること、またこれらの遺伝子群には発現パターンが異なる 3 グループが存在することが明らかになった。

これを要するに、著者は、海産アオサ属の稀有な淡水産種を新種記載し、その淡水環境への適応に関与した候補遺伝子群の同定またその発現様式を明らかにすることで、同生物群における海水から淡水への適応進化的研究に関して多くの新知見を得たもので、生物学に貢献するところ大なるものがある。本研究は、系統分類学、生理学、生態学を統合しようとする意欲的なもので、このような研究は将来の植物科学の中心の一つになることが期待される。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。