

学位申請論文

アオサ類葉緑体ゲノムの解析と分子マーカーの作出

2020年3月

三ツ橋知沙

目次	1
要旨	2
1. 序論	5
図 1~3	9
2. <i>U. pertusa</i> (アナアオサ) の葉緑体ゲノムの解読	12
表 1	14
図 4,5	15
3. アナアオサの葉緑体ゲノムと他のアオサ類の葉緑体ゲノムの比較	17
表 2~4	21
図 6~14	24
4. アオサ類の個別認識が可能な分子マーカーの作成と評価	36
表 5	40
図 15~17	41
5. 総合考察	44
6. 材料および方法	47
7. 参考文献	50
8. 主論文を構成する論文	56
9. 謝辞	57

要旨

アオサは世界各地の内湾の沿岸域で生育する緑藻の一つである。アオサは沿岸域で藻場を形成する重要な種である一方、富栄養化した内湾で異常増殖し、堆積することによりグリーンタイドを形成し、環境問題を引き起こす原因にもなっている。遺伝子解析が進むことにより、一層の細胞層からなるチューブ状の構造をとるアオノリ属だった緑藻類が、平たいレタス状の形態を示し二層の細胞層からなるアオサ類と同じアオサ属に分類されるようになった。また、アオサ類は形態が可塑性を有し、比較的単純な多細胞構造にも関わらず、形態学的・細胞学的多様性を持っている。このようなアオサ属の形態的特徴は種同定をすることを難しくしている。

すでに核ゲノムの **internal transcribed spacer (ITS)** 領域や *rbcL* 遺伝子配列、*cox1* 遺伝子配列の比較解析により種の分類が見直されており、これまでは形態的特徴から異なる種とされてきたものの一部が同一種に分類されている。例えば、日本沿岸で生息しており、固有種と考えられていた *Ulva pertusa* (アナアオサ) はオーストラリアで生息している *Ulva australis* と同一種であることがわかった。

緑藻植物では葉緑体のゲノムに大きな多様性があることが知られている。すでに全配列の葉緑体ゲノムの解読が終わっているアオサ類の葉緑体ゲノムのサイズを比較したところ、これらのゲノムサイズは最も小さなものと大きなものとの間で **10 kbp** 以上の差があった。このことから、アオサ類の葉緑体ゲノム構造の違いが大きく、この多様性に基づいた種の同定が可能であると考えられた。

本研究では、アナアオサ葉緑体ゲノムの全塩基配列を決定し、この情報をもとに他のアオサ類の葉緑体ゲノムとの構造的相違を調べた。さらに、東京湾に生息するアナアオサ、*U. ohnoi* (ミナミアオサ)、*U. lactuca* (リボンアオサ) などの形態的特徴が似ているアオサ種を特定するための分子マーカーを構築した。

アナアオサの葉緑体ゲノムの全塩基配列を解読した。その結果、このゲノムの全長は **102,899 bp** であり、ミナミアオサ (**103,313 bp**)、リボンアオサ (**96,005 bp**) など既に報告されているアオサの葉緑体ゲノムとほぼ同じ大きさであった。アナアオサの葉緑体ゲノムには、**74** 個のタンパク質遺伝子、**3** 個の **rRNA** 遺伝子、**27** 個の **tRNA** 遺伝子の **104** 個の遺伝子が含まれていた。これらは他のアオサ類の葉緑体ゲノムの遺伝子と類似していた。また、高等植物で普遍的に存在する **IR** 配列 (反復配列) は、他のアオサ類の葉緑体ゲノムと同じく存在しなかった。ところで、アナアオサ葉緑体ゲノムでは、*tRNA-Phe* に対応する **tRNA** は *trnF(GAA)* のみが存在した。しかし、アナアオサと近縁種である *U. mutabilis* 以外の他のアオサ類で保存されている *trnF(AAA)* は見つからなかった。他のアオサ類の葉緑体ゲノムでは *trnF(AAA)* が存在している *U. pertusa* の当該領域には、こ

れと部分的に類似性を示すヌクレオチド配列が存在したことから、この領域に存在していた *trnF(AAA)* は、アナアオサ葉緑体ゲノムでは変異が生じて遺伝子の機能を失ったのではないかと考えられた。

全葉緑体ゲノム配列を用いて、アオサ類の系統樹を作成し、葉緑体ゲノムの遺伝的解析を行った。その結果、系統樹ではアナアオサと同様のレタス状の形態を示すミナミアオサ、リボンアオサが異なるクレードに分類されることがわかった。また、アナアオサは遺伝的に *U. mutabilis* と最も近いこと、キヌイトアオノリなどのチューブ状の形態を示す種と遺伝的に近いことがわかった。これらの結果は、他の遺伝子で解析された先行研究で報告されている系統樹と類似の結果であった。アナアオサ葉緑体ゲノムとすでに報告されているアオサ類の葉緑体ゲノムを比較したところ、構造的な違いが見つかった。ゲノムに載っている遺伝子の順序は、アナアオサ葉緑体ゲノムでは *psbB* 遺伝子と *rpl19* 遺伝子の間にある 25 kbp 領域が逆位を起こしていた。また、*psbD* と *psbC* を含む 3 kbp の領域は、アナアオサと *U. mutabilis* では逆位を起こしていることがわかった。これらのことから、ゲノムの再構成がアナアオサおよび *U. mutabilis* 葉緑体ゲノムで起こったことが示唆された。

アオサ類の葉緑体ゲノムでは、遺伝子間領域およびイントロンを含む遺伝子に多型が認められた。この結果をもとに、イントロンを含む遺伝子である *psbD*、*atpA*、*atpB* 遺伝子のエキソン部分、遺伝子間領域の長さに差が認められた *rbcl* と *chl1* 遺伝子の間の領域の配列に対応する 4 つの分子マーカーを設定した。これらの分子マーカーを利用して PCR を行ったところ、それぞれの種より採取した DNA では増幅された断片長に違いが認められ、この違いをもとにアオサ類の種を同定することが可能であった。これにより、いずれもレタス状の形態を示すことから、形態的特徴からだけでは種同定が難しいアナアオサ、ミナミアオサ、リボンアオサの 3 種類のアオサ類の種の同定が可能であった。さらに作成した分子マーカーの有用性を評価するため、レタス状の形態を示すチシミアオサ、チューブ状の形態を示すキヌイトアオノリ、ボウアオノリ、ヒラアオノリの 4 種類のアオサ類より調製した DNA についてこれらの分子マーカーを用いて増幅を行ったところ、種ごとに増幅される断片長が異なり、これにより種の同定が可能であった。

本研究では、ゲノム配列が未同定だったアナアオサ葉緑体ゲノムの全塩基配列を決定し、他のアオサ類の葉緑体ゲノムと比較した。葉緑体全塩基配列を用いた分子系統解析では、アナアオサは、形態がよく似ている他のアオサ種とは異なるクレードに分類された。また、ゲノム全体の構造に大きな違いが認められ、アナアオサでは 25 kbp に及ぶ領域での逆位が起こっており、さらにアナアオサと近縁の *U. mutabilis* の葉緑体ゲノムで 3 kbp の領域の逆位が認められた。これらの

葉緑体ゲノムの構造的違いに基づいて、それぞれのアオサ類の同定に供することが可能な複数の分子マーカを設定した。その結果、これらの分子マーカを用いた PCR により種ごとに特異的な増幅断片が得られ、これらの断片長の違いを利用することで個々のアオサ種の同定が可能であった。このことから、形態的に類似していて同定が困難であったアオサ類の分類の簡便化に成功したと考えられた。

1. 序論

アオサは世界各地の内湾の沿岸域で生育する緑藻植物門アオサ藻綱アオサ目アオサ科アオサ属に分類される緑藻である。アオサ属の一部は沿岸および河口域で藻場を形成するため、沿岸域の生態系を支える重要な生物種である (Zertuche-González *et al.* 2009)。

一方で、富栄養化した内湾において異常発生したアオサがグリーンタイドを引き起こすことがある。通常、大型藻類は岩などの基盤に付着して成長するが、グリーンタイドは岩などの基盤に付着せず、浮遊している大型緑藻が異常増殖し、堆積する現象である (平岡ら 2002, Ye *et al.* 2011)。アオサ類が異常増殖し、沿岸域でグリーンタイドが発生すると、海底面付近はグリーンタイドに覆われる。グリーンタイドで覆われた下の海底は嫌氣的な環境となる。さらに、堆積したグリーンタイドが分解されることに伴い、海底を構成する堆積物や岩からなる底質は還元状態になる。その結果、底質で生息するアサリなどの底生生物が死滅することもある (藤井ら 2009)。グリーンタイドの発生が、アオサと同じような水域で藻場を形成するアマモの減少と関連があるのではないかという報告もある (Zertuche-González *et al.* 2009)。さらに、堆積した海藻が腐敗する際に発生する硫化物による悪臭が発生し、私たちの生活環境に大きな影響を与える。これらのことから、グリーンタイドは新たな環境問題の一つとして認識されている (Ye *et al.* 2011, 石井 2011)。

グリーンタイドの発生は、東京湾、瀬戸内海、伊勢三河湾、大阪湾など日本各地の沿岸域で報告されている (平岡ら 2002, 石井 2011)。日本だけでなく、アメリカ、中国、オーストラリア、インドなど世界各地でも発生が報告されている (Ye *et al.* 2011, Wichard *et al.* 2015) (図 1)。フランスでは、2019 年にブルターニュの沿岸で 2 名が亡くなり、その原因がグリーンタイドを引きをしたリボンアオサの分解時に発生する硫化水素が原因ではないかという報道があった (The Daily Telegraph. 2019 July 14, Daily mail online. 2019 July 15)。2019 年以前にも、フランスでは 2009 年に 48 歳のトラック運転手が緑藻類を大型トラックで輸送した後、死亡し、裁判所は彼の死は硫化水素ガスの吸入による労働災害であると裁定した (THE WEEK. 2019 July 15)。2009 年に馬、2011 年に 30 頭以上のイノシシが死亡した件も、ブルターニュのビーチの緑藻類の腐敗によるものと公式に考えられているとの報道もある (THE WEEK. 2019 July 15, France 24. 2019 July 22)。このようにグリーンタイドは看過できない重要な課題の一つである。

アオサは、比較的単純な構造をもった多細胞生物である。生育環境が形態に影響を及ぼすことが知られており、これによってさまざまな形態に変化する可塑性

を示す (Guidone *et al.* 2013, Wichard *et al.* 2015)。アオサ属の海藻の中には、レタス状の形態で断面は2つの細胞層が密着しているものと、中空のチューブ状の形態で断面は1層の細胞が輪になった形になるものがある (Kraft *et al.* 2010) (図2)。同じアオサの遊走子集団からレタス状とチューブ状の両方の形態を形成をする場合があることが以前から報告されていた (Tan *et al.* 1999)。たとえば、自然環境下において *U. mutabilis* は、レタス状の形態とチューブ状の構造の両方を示すことが報告されている (Clerck *et al.* 2018) (図3)。このように比較的単純な構造をもち、形態的に大きな多様性と可塑性を示すことから、アオサは形態形成の研究においてもモデル生物として注目されている (Coates *et al.* 2015, Wichard *et al.* 2015)。

近年、遺伝子解析技術が進歩したことで、さまざまな緑藻類の遺伝子の構造解析が行われ、遺伝子情報を元にした緑藻類の系統解析が可能になった。以前は、アオサ属に含まれる海藻のうち、1層の細胞層が中空のチューブ状の構造をとるものはアオノリ属に分類されていた。アオサ属に分類されていた海藻は、レタス状の形態で2層の細胞層が密着している断面を示すものであった。しかし、遺伝情報を元にした系統解析が行われた結果、アオサ属に分類されていたものとアオノリ属に分類されていたものは遺伝的に近く、同じクレードに含まれることがわかった (Tan *et al.* 1999, Shimada *et al.* 2003, Kraft *et al.* 2010)。同じアオサの遊走子から、旧アオサ属と旧アオノリ属の両方の特徴を示す形態を形成する場合があったこともあり、最近、アオサ属とアオノリ属は同じアオサ属に分類されるようになった (Tan *et al.* 1999, Shimada *et al.* 2003, Hayden *et al.* 2003)。

ところで、アオサ類の緑藻は外的要因により形態が変化する。このことから、生育環境により形態の変化が起こることが知られている。また、配偶子をつくる成熟個体となるためには、特定の細菌の手助けが必要であることが知られている (Marshall *et al.* 2006)。そこで、このような変化を示す外的要因や正常な形態形成のために必須となる細菌の研究も行われている。その結果、*U. mutabilis* に付随する微生物叢を調べた結果、正常な成長と発生の過程において、*Roseobacter sp.* と *Cytophaga sp.* が必須であることがわかってきた (Spoerner *et al.* 2012)。

緑藻類のアオサ藻綱には単細胞藻類と多細胞藻類が含まれている。その中でアオサ属の海藻は比較的単純な形態を示すにも関わらず、成体の多様性が大きい。これらのことは、アオサは単細胞から多細胞への進化の過程、平面状に細胞が拡張していく過程、細胞の極性変化などの研究においても、非常に興味深い生物種であることを示している (Wichard *et al.* 2015)。しかし、このようなアオサ類の形質は、その形態的な特徴をもとにしたアオサ類の種同定を難しくしている (Kraft *et al.* 2010, Guidone *et al.* 2013)。

これまで、アオサ類の緑藻は、形態的特徴をもとに様々な種に分類されてきた。

近年、これらの種の分類は、核ゲノムに含まれる転写スペーサー領域 (ITS 領域) 等の塩基配列の多型解析等の結果により見直しが行われている。この解析の結果、多くの種の分類がこれまでの種の分類とは異なることが示された。これまでは異なる種とされてきたものが同一種に分類される例が報告されている。例えば、*U. armoricana* と *U. scandinavica*、*U. rigida* (アオサリカ) は DNA レベルの解析では区別がつかず、これらは同一種にすべきではないかという提案がされている (Malta *et al.* 1999, Kawai *et al.* 2007)。また、*U. fasciata* (リボンアオサ) と *U. lactuca* は同一種であるとされた (Hughey *et al.* 2019)。日本沿岸に生息し日本の固有種と考えられてきた *U. pertusa* (アナアオサ) は、オーストラリアで生息している *U. australis* と同一種であることがわかった (Couceiro *et al.* 2011, Hanyuda and Kawai 2018)。このように、近年はアオサ類の分類が混乱をしており、種名の見直しが続いている。そのため、現在の種名が今後も使用され続けるとは限らず、詳細な解剖学的な形態分析と遺伝子配列による分析により種同定がなされるべきとの指摘がなされている (Kraft *et al.* 2010)。

ところで、海藻の葉緑体数は種により異なる (光合成事典 アオサ藻 2015)。一部のアオサ類は細胞内に1つだけ葉緑体をもつ。葉緑体は母性遺伝し、このゲノムは種ごとにサイズが異なり、大きな多様性があることが知られている (Leliaert *et al.* 2012, Turmel *et al.* 2017)。葉緑体ゲノムは 100 kbp 程度の大きさを有する環状 DNA である。これまでに多くの植物種で葉緑体ゲノムの塩基配列が明らかになっている。アオサ類でも、すでにいくつかの種において全葉緑体ゲノムの塩基配列が解読されている。これらのアオサ類の葉緑体ゲノムのサイズは、最も小さなものと最も大きなもの間で 10 kbp 以上の違いがある。(*U. mutabilis*: 119,866 bp、ミナミアオサ: 103,313 bp、リボンアオサ: 96,005 bp、スジアオノリ: 93,066 bp、キヌイトアオノリ: 89,414 bp、ウスバアオノリ: 86,726 bp)。

一般的な高等植物では、葉緑体ゲノムは一对の逆位反復配列 (Inverted Repeat 配列/IR 配列) を含むことが知られている (梅園 1987, Turmel *et al.* 2017)。この IR 配列により、大きな単一配列 (Large single copy: LSC) と小さな単一配列 (Small single copy: SSC) に分けられている。一方、藻類の葉緑体ゲノムは IR 配列を含むものと含まないものと同じ目の中に存在している。例えば、アオサ目に含まれる海藻のうち、*Pseudoneochloris* には IR 配列があるが、現在報告されているアオサ類には IR 配列がない。このように IR 配列はその進化の過程で何度も失われており構造的に多様性をもっている (Turmel *et al.* 2017)。

アオサ類の葉緑体ゲノムのサイズに大きな違いがあること、緑藻の葉緑体ゲノムでは IR 配列の獲得と喪失が何度も起こっていたことなどから、アオサ類の種ごとに大きな違いが認められるものと予想された。そこでこのような葉緑体ゲノムの多様性に基づいた種同定が可能であると考えた。本研究では、アナアオサ (*U.*

pertusa) の葉緑体ゲノムを解読し、その構造的多様性を明らかにした。さらにその結果を用いて、葉緑体ゲノムの多様性に基づいた種の同定可能な分子マーカーの構築を行った。



図 1 グリーンタイド の発生が報告された地域 (Ye *et al.* 2011 より一部改変)
丸印は直近 30 年間でグリーンタイドの発生した地域の一部を示す。

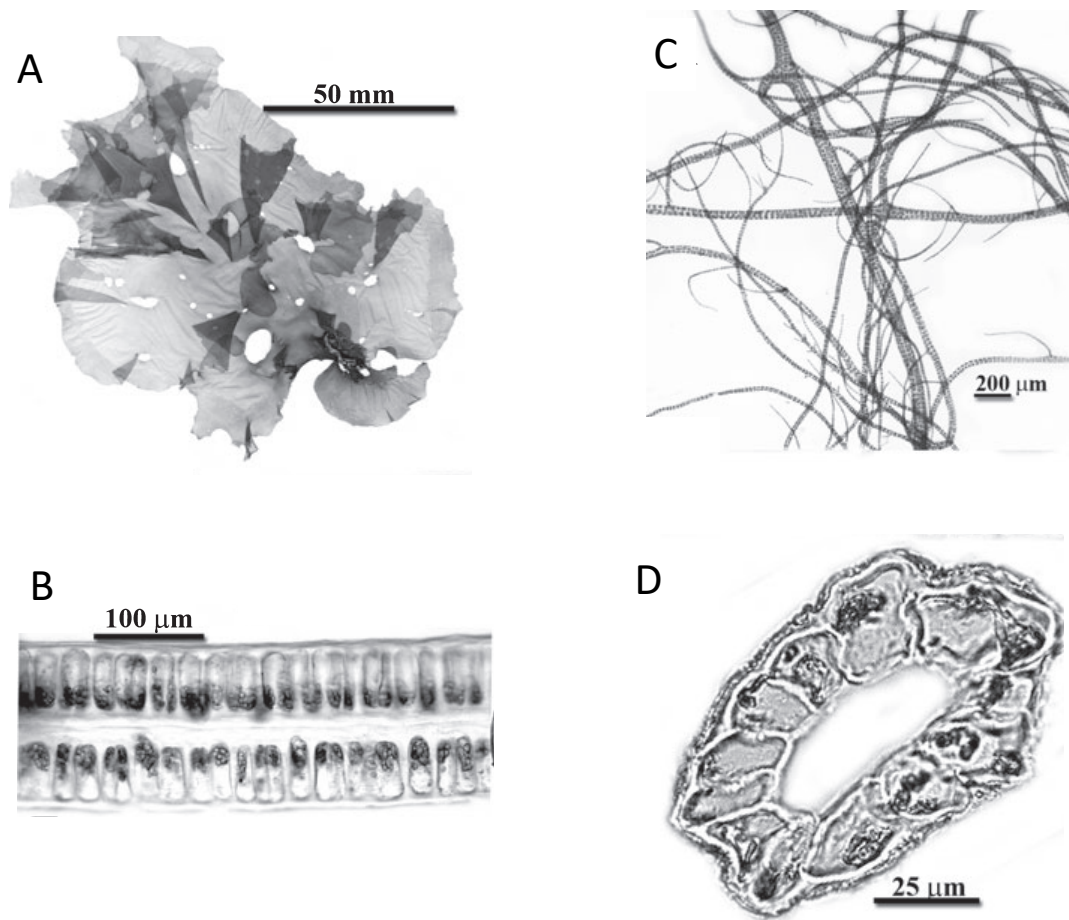


図2 アオサ属の海藻の形態 (Kraft *et al.* 2010 Fig. 3, Fig. 6 より一部引用)

Aはアナアオサの成体。葉状体のいたるところに穿孔が見られる。Bは葉状体の断面。2層の細胞層が合わさってできている。Cはワタゲアオノリの成体(葉状体)。Dは葉状体の断面。1層の細胞が輪になり、中空のチューブ状の構造をとる。

A,B: *U. pertusa* (アナアオサ)

C,D: *U. flexuosa subsp. Paradoxa* (ワタゲアオノリ、*U. flexuosa* (キヌイトアオノリ)の亜種)

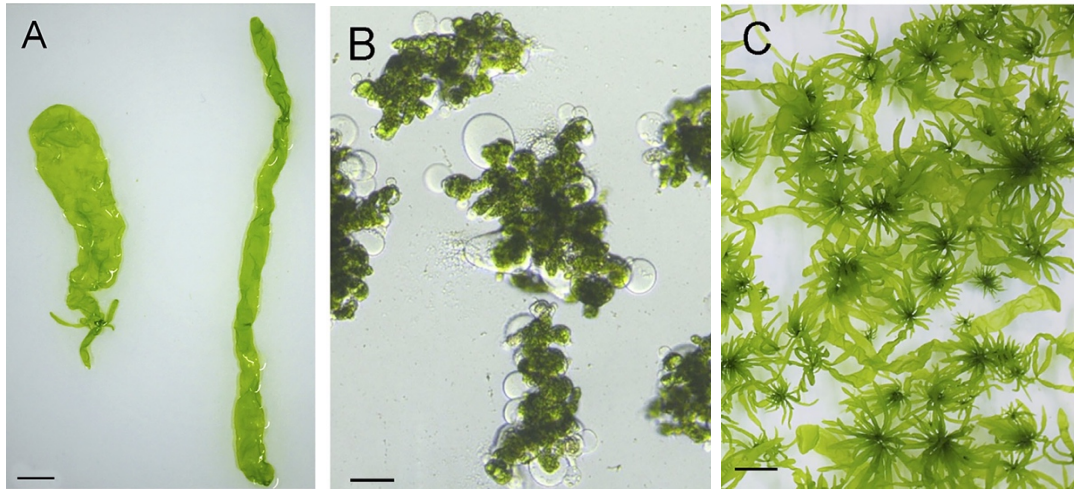


図3 *U. mutabilis* の形態 (Clerck *et al.* 2018 より引用)

A: 異なる形態を示す *U. mutabilis* (bar: 1 cm)

左右両方の成長形態は自然に発生する。左側は旧アオサ属の特徴であるレタス状の形態、右側は旧アオノリ属の特徴であるチューブ状の形態をしている。

B: 無菌状態で培養した *U. mutabilis* (bar: 100 mm)

細胞のゆるい集合体として成長し、カルス様形態を示す。正常な成長形態を示さない。

C: *Roseovarius sp.* MS2 and *Maribacter sp.* MS6 を添加した馴化培地で培養した *U. mutabilis* (bar: 1 cm)

正常な葉状体の形態形成がみられる。

2. *U. pertusa* (アナアオサ) の葉緑体ゲノムの解読

東京湾でグリーンタイドを形成するのは、主にアナアオサ、*U. ohnoi* (ミナミアオサ)、*U. lactuca* (リボンアオサ) の3種類である(石井 2011)。これらのうち、研究を始めた2017年4月時点で葉緑体ゲノムが解読されていたのはリボンアオサのみであったため、アナアオサとミナミアオサの葉緑体ゲノムの解読を行うこととした。葉緑体ゲノムの解読に使用するサンプルは、お台場海浜公園(東京)や海の公園(横浜)などで採取したサンプルを使用することも検討したが、アオサ類は種同定が難しいことから、国内で唯一、大型藻類の培養株を維持・分譲している神戸大学海藻類系統株コレクション(KU-MACC)より分譲いただくことにした。KU-MACCでは、フィルターろ過した外洋海水をオートクレーブにより滅菌し、PESIまたはPES mediumを添加した強化海水培地を用いていた。そのため、海水はお台場海浜公園や海の公園で採取するのではなく、千葉県水産総合研究センター東京湾漁業研究所から、ろ過・UV滅菌したものを分譲いただき、オートクレーブにて滅菌を行った後、栄養塩を添加し用いた。培養は16時間の明、8時間の暗サイクルを繰り返し18°Cでの培養を行った。培養した藻体(図4-D、G)から一部を切り取り、葉緑体を抽出し精製した。精製した葉緑体から葉緑体ゲノムを抽出、精製した。

アナアオサとミナミアオサの葉緑体ゲノムは、既に全葉緑体ゲノムの配列が解読されていたリボンアオサと構造的類似性があると想定し、この塩基配列情報を元にPCRによるゲノムDNAの増幅を試みた。葉緑体ゲノムDNAの増幅に用いたプライマーは、光合成に関与する遺伝子のコード領域を中心に設計した(表1)。当初はPCRにより増幅された断片は、TAクローニングを行い、得られたプラスミドDNAを用いてシーケンス解析を行うことにした。

DNA断片の増幅を試みている途中で、ミナミアオサの全葉緑体ゲノムの配列が明らかとなった。そこで、この解析を中止し、アナアオサの葉緑体ゲノムの解読に注力した。アオサには多糖類と思われる物質が多く含まれていたため、通常のPCRでは断片を増幅することができなかった。PCRの条件検討を行ったところ、DNA polymeraseに、KOD Fx Neo (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いた時のみにDNA断片の増幅に成功した。そこで、それぞれ増幅した断片を用いて、直接シーケンス解析を行うことで塩基配列の決定を行った。解読によって得られた塩基配列情報を元に新たなプライマーを設計し、当該の断片の全塩基配列の

解読を行った。同様の操作を繰り返すことにより、**1027** の断片をつなぎアナアオサの葉緑体ゲノムの塩基配列を決定することができた。全塩基配列は **102,899 bp** であった (図 5)。

考察

アナアオサの葉緑体ゲノムの解読を行うにあたり、次世代シーケンサーを用いて解読を行うことも検討した。通常、高等植物では **1** つの細胞に多コピーの葉緑体が存在するが、アナアオサは **1** 細胞に **1** つの葉緑体しか含まない。そのため、**1** 細胞に含まれる葉緑体ゲノムの量が少ない。また、次世代シーケンサーを用いた解析に用いることができる断片化されていない葉緑体ゲノムを精製することが難しかった。これらのことから、本研究では **PCR** によって増幅した葉緑体ゲノム **DNA** 断片の直接シーケンス解析を行い、塩基配列を決定することにした。

本研究で解読したアナアオサの葉緑体ゲノムも一般的な葉緑体ゲノムと同様に環状構造をとっていた。アオサ類の葉緑体ゲノムサイズが最大の種は *U. mutabilis* (**119,866 bp**)、最小の種はウスバアオノリ (**86,726 bp**) であり、その差は **10 kbp** 以上ある。アナアオサの葉緑体ゲノムは **102,899 bp** であり、すでに報告されているアオサゲノムサイズの範囲内にあった。また、タバコやイネなどの高等植物の葉緑体ゲノムや他のアオサ目の海藻に含まれている **IR** 配列は、アナアオサの葉緑体ゲノムには見つからなかった。つまり、アオサ属の海藻には **10 kbp** 以上の差があるにも関わらず、**IR** 配列の挿入や喪失は起こっていない。このことから、アオサ属の葉緑体ゲノムの構造解析を行うことで、葉緑体ゲノムのサイズの差を生み出している違いが明らかになるのではないかと考えた。

表 1 葉緑体ゲノム解析に使用したプライマー

No.(location)	Forward sequences(5' to 3')	No.(location)	Reverse sequences(5' to 3')
1(214)	AGCCGAACACTCTACCATTG	1(rev: 432)	TAATGAGCCGAGCTGGATTC
2(3197)	GAGGAAGGTGAATTAACAAATC	2(rev: 3318)	GACGGCTCTCTTTAATTGGTAAG
3(9292)	CAGGCGTGAATAAGTTAAACG	3(rev: 11001)	TACCTTCTGTAAAGCTTTTTCCATATC
4(11796)	GCACCCG TTATTGCTTT CGCTTGG	4(rev: 15305)	CGTCTATCACGATATGAAAACAT
5(18405)	TGGTTACTGATGAATTTACCGTTAATG	5(rev: 18621)	TTTTTGGAGTTTTTTTCATTTTTGCCCA
6(22671)	TTAGGGGTTCCCTTCACGTATG	6(rev: 23070)	TCCTTCTAAAGCCCAAACCTCCAT
7(26816)	AGTTTAACAAAATCGTCTAATAAAGTT	7(rev: 28304)	CCTCCAAGCTTCAGAACAAGC
8(28370)	CCTATTA TTGTTCCCTAG TCAAGATATG	8(rev: 29749)	GCGTTGTTATTTCTTGGTTTC
9(38997)	AGTTTATGATGGATACCTAGGC	9(rev: 39042)	GAAGCATTTGTTGGTATC
10(40261)	TGCCCCGAAAACCTAAGG	10(rev: 40328)	CATCGACTACACCTTTTCGATC
11(41679)	TAAGTTTCGACCCGCACG	11(rev: 41700)	GTGCCCAGATCGTTACGTC
12(44970)	CAGCTCAAGTTATTCAATCATA	12(rev: 45134)	AGGTTGAATAGCTGGAGCTAC
13(47515)	GCTAGGAGGGATTTGAAC	13(rev: 47550)	GACTAGAGCACACGGCTAC
14(49936)	TAATTGGTATTGGGCAAATC	14(rev: 50211)	GAACAGGGGGAATCGAAC
15(51266)	GTTGATTCTCAAGGTCGTGT	15(rev: 56583)	ATCGGCACGAACAACCTCCA
16(56469)	TGCAGTAGGCTGGTTAGGC	16(rev: 61768)	TTAATGCGAGGAATGGAAGC
17(60016)	CCGGTTGTATAAACCGTGG	17(rev: 61946)	CAATTATTGGGCCTGTAGTTG
18(61725)	CGTTGGTCTACAGGTAAGT	18(rev: 73163)	GTAGCTACAGGCTACGGAATG
19(68029)	TGCTCATAATGGTTGTCGAC	19(rev: 74127)	TGCTTCATGAGCAGACATAC
20(73484)	GTTTCGATTCTGGTTCCCTG	20(rev: 79681)	ATGTTCTTTTGTGTTGTCGAT
21(78478)	GTTCTCCTGTAGTCCCTGCC	21(rev: 80057)	ACACCACGTTCAACACGTC
22(79648)	GCTATTCTAGTTGTATCTGGTGCTG	22(rev: 81010)	GCCTTCTAGCGGAGTCGAAC
23(81468)	CGACGTAATGGATGACTGGT	23(rev: 82216)	CATAAAGAAGTGAAGCCAACG
24(82166)	CAGCAAACCGTTTCTGGTC	24(rev: 83708)	CCTAATACGAAATGTGAACAAGC
25(84403)	CGCGGAATGTCACTAGTTC	25(rev: 84529)	AACCCGCAACTTCTACCGTG
26(88156)	GCTCTTTCAATTGTTCAAGC	26(rev: 88323)	TAAGACCTAAAACGTTTACTTCCA
27(93732)	GAAACCATTAGAAGTTGTCCA	27(rev: 94974)	TGGAATGCATTTAGGGCATC
28(96245)	AAACCGTCCGGTAATATTAACCA	28(rev: 96414)	CGTATTGTATGTGCTAACTGTC
29(102719)	CGAAAGAATTTAAAACCTCCTAAAGC	29(rev: 102799)	GCATCACCAAACGGTTGGA

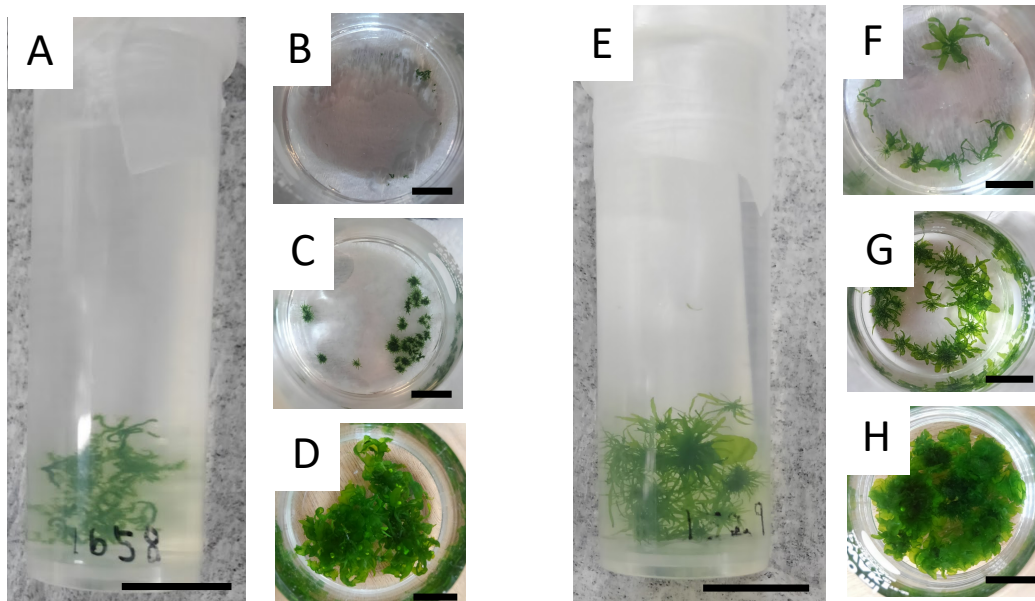


図 4 分譲された海藻と培養後の海藻

A-D: *U. pertusa* (アナアオサ) (bar: 1 cm)

E-H: *U. ohnoi* (ミナミアオサ) (bar: 1 cm)

A,E: 神戸大学海藻類系統株コレクション (KU-MACC) から分譲された直後の様子 (2017年7月)。

B,F: 分譲後 10 日撮影

C,G: 分譲後 25 日撮影

D,H: 分譲後 6 ヶ月撮影

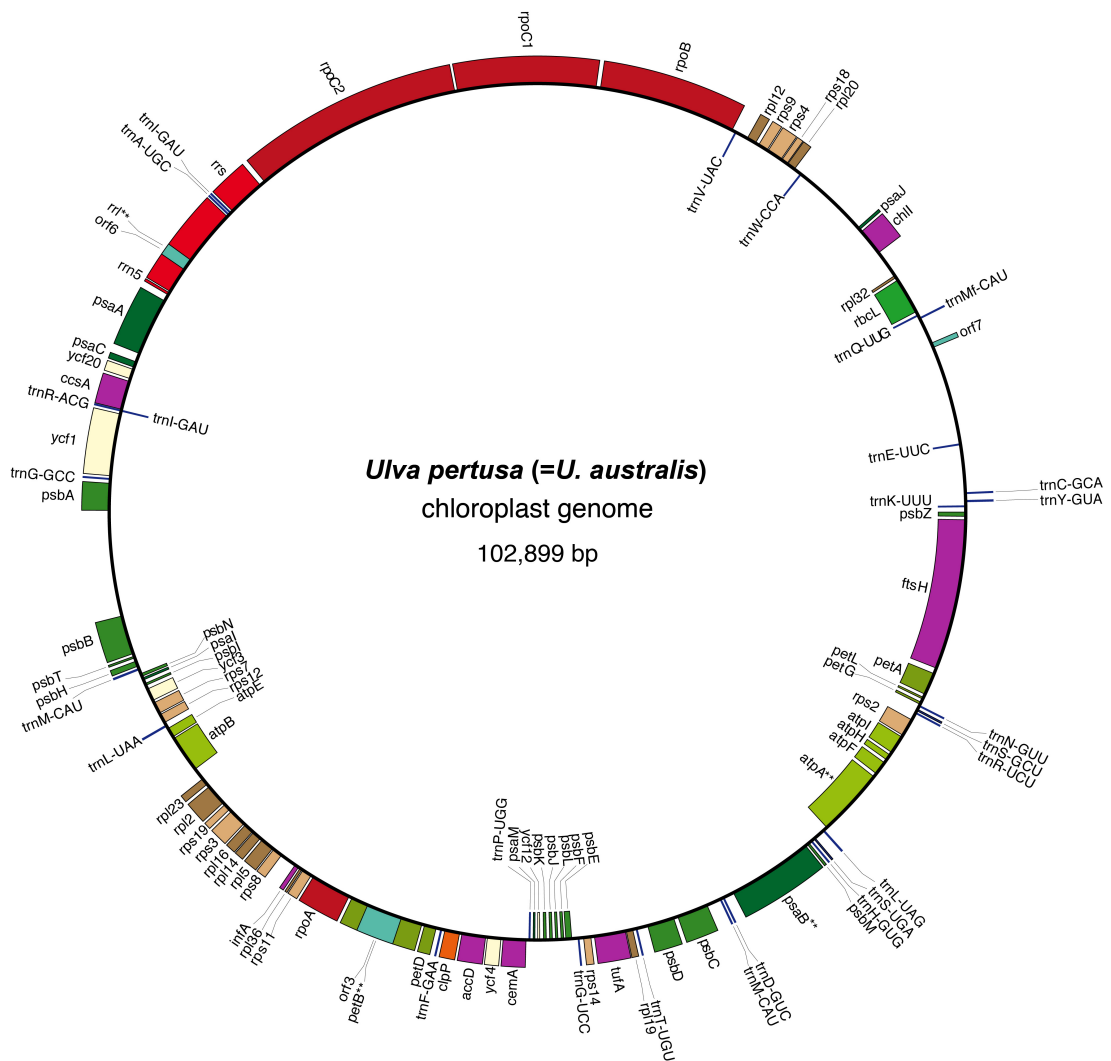


図 5 *U. pertusa* (アナアオサ) の葉緑体ゲノム

時計回りに転写される遺伝子は円の内側に描かれる。反時計回りに転写される遺伝子は円の外側に描かれる。

3. アナアオサの葉緑体ゲノムと他のアオサ類の葉緑体ゲノムの比較

U. pertusa (アナアオサ) の葉緑体ゲノムには、74 個のタンパク質遺伝子、3 個の rRNA 遺伝子、27 個の tRNA 遺伝子を含む 104 個の遺伝子が含まれていた。葉緑体ゲノムに含まれる遺伝子数について、他のアオサ種と比較を行った(表 2)。その結果、葉緑体ゲノムの中で、rRNA、光合成に関係する遺伝子、転写翻訳に関係する遺伝子数は、他のアオサ類と同じであった。このことから、アオサ類では葉緑体ゲノムに含まれる遺伝子は種の違いに関わらず保存されているのではないかと考えられた。

しかし、アオサ属の葉緑体ゲノムに含まれる tRNA 遺伝子数は種により異なっていた。アナアオサと *U. mutabilis* の葉緑体ゲノムには 27 個の tRNA 遺伝子が含まれていたが、*U. ohnoi* (ミナミアオサ)、*U. lactuca* (リボンアオサ) など他のアオサの葉緑体ゲノムには 28 個の tRNA 遺伝子が含まれていた。高等植物では、葉緑体ゲノムに 30~31 の tRNA 遺伝子が含まれている (Shinozaki *et al.* 1986, Hiratsuka *et al.* 1989)。アオサ属の葉緑体ゲノムに含まれる tRNA 遺伝子数には、高等植物の葉緑体ゲノムに含まれる tRNA 数のアミノ酸残基に対応する tRNA 配列が含まれていた (図 6)。

tRNA 遺伝子数の違いは *tRNA-Phe* に対応する tRNA のうち *trnF(AAA)* によるものであった。アナアオサと *U. mutabilis* では *tRNA-Phe* に対応する tRNA は *trnF(GAA)* のみであり、*trnF(AAA)* は見つからなかった (表 3)。リボンアオサの *trnF(AAA)* がコードされている領域とアナアオサの当該領域部分の配列を比較したところ、アナアオサの *trnF(AAA)* 周辺の領域の塩基配列に多型が認められた。この領域にコードされている *psbM*、*trnM(CAU)* 遺伝子の配列は、リボンアオサの *psbM*、*trnM(CAU)* 遺伝子の配列と非常に類似していた。アナアオサの葉緑体ゲノムのうち、他のアオサで *trnF(AAA)* に対応する領域には、*trnF(AAA)* と類似した配列が存在し、部分的に高い相同性があった (図 7)。*trnF(AAA)* に対応する領域の配列には AT が多く存在する。この領域にアンチコドン配列になりうる AAA 配列が存在したので、アナアオサの *trnF(AAA)* に対応する領域の塩基配列について二次構造予測を行った。tRNA の二次構造予測が可能な tRNAscan-SE 2.0 (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) を用いて構造予測を行った結果、何も形成されなかった。*trnF(AAA)* と同じくフェニルアラニンに対応する *trnF(GAA)* は tRNA に特徴的なクローバーリーフに類似する構造予測結果だった (図 8-A)。

tRNA に限らず RNA の二次構造予測が可能な CentroidHomfold (<http://rtools.cbrc.jp/centroidhomfold/>) と Centroidfold (<http://rtools.cbrc.jp/centroidfold/>) を用いてアナアオサの *trnF(AAA)* に対応する領域と *trnF(GAA)* の二次構造の予測を行った。その結果、データベース (Rfam) に登録されている RNA 配列を参照して二次構造を予測する CentroidHomfold では、*trnF(AAA)* に対応する領域は tRNA に特徴的なクローバーリーフ様の構造予測はされなかったが、*trnF(GAA)* はクローバーリーフに類似した二次構造が予測された (図 8-B、D)。入力された配列情報から二次構造を予測する Centroidfold で構造予測を行った場合、*trnF(GAA)* も *trnF(AAA)* に対応する領域でも、クローバーリーフ様ではない二次構造が予測された (図 8-C、E)。

アオサ類の葉緑体ゲノムに含まれる遺伝子数はほぼ同じであるにも関わらず、アオサ類の葉緑体ゲノムのサイズは異なる。葉緑体のゲノムサイズが最も大きい種は *U. mutabilis* (119,866 bp)、最も小さい種は *U. linza* (ウスバアオノリ: 86,726 bp) である。*U. mutabilis* とウスバアオノリの葉緑体ゲノムサイズの差は 30 kbp 以上ある。葉緑体ゲノムのサイズの多様性を生み出している要因の一つに、遺伝子に含まれるイントロンの多型があるのではないかと考えられた。そこで、イントロンを含む遺伝子の比較を行った。その結果、イントロンを含む遺伝子は種ごとに異なっていた (表 4)。より詳細な比較解析を行うため、*petB* 遺伝子の塩基配列と *psbD* 遺伝子の塩基配列を比較した (図 9、10)。その結果、イントロンの数が異なる遺伝子でも、エキソン部分の塩基配列の保存性は非常に高かった。また、種が異なっても同じ場所にイントロンが挿入されていた。これらの結果からこれらの遺伝子の保存性は非常に高いことがわかった。

最も葉緑体ゲノムサイズが小さいウスバアオノリ (86,726 bp) には、イントロンを含む遺伝子は無かった (表 4)。しかし、それ以外の種において、葉緑体ゲノムサイズが大きい種で共通のイントロンを含む遺伝子があり、ゲノムサイズが小さい種では共通のイントロンを含む遺伝子があるなど、葉緑体のゲノムサイズとイントロンを含む遺伝子の関係に規則性は見られなかった。また、旧アオサ属と旧アオノリ属、それぞれで共通の遺伝子がイントロンを含むことはなかった。

そこで、葉緑体ゲノムの全塩基配列を用いてアオサ類の分子系統樹を作成し葉緑体ゲノムの遺伝的解析を行った。その結果、アナアオサは遺伝的に *U. mutabilis* と最も近いことがわかった。また、*U. flexuosa* (キヌイトアオノリ) などの旧分

類でアオノリ属に分類されていた種が、もとは同じ旧アオサ属に分類されていたミナミアオサ、リボンアオサよりも遺伝的に近いことが示唆された (図 11)。

葉緑体ゲノムの全塩基配列を用いた系統解析の結果、同じクレードに含まれているアナアオサと *U. mutabilis* の葉緑体ゲノム全体の構造を詳細に比較した。その結果、ゲノム上にコードされている遺伝子の順序が大きく異なり、構造的に異なっていた。アナアオサ葉緑体ゲノムの *psbB* 遺伝子と *rpl19* 遺伝子の間にある 25 kbp 領域が逆位を起こしていた (図 12-1、図 13)。この結果から、アオサ属の葉緑体ゲノムの構造に差があることが分かったため、他のアオサ類との比較も行った。その結果、系統解析で同じクレードに含まれていたアナアオサと *U. mutabilis* では、*psbD* と *psbC* を含む 3 kbp の領域で逆位を起こしていた (図 12-2~4、図 13)。

アナアオサの葉緑体ゲノムでは、*rbcL* 遺伝子と *psbZ* 遺伝子、*rbcL* 遺伝子と *chl1* 遺伝子の遺伝子間領域は、それぞれ他の種よりも約 5 kbp 以上、約 0.5 kbp 長くなっていた。この領域の構造を比較をしたところ、アナアオサでのみ *rbcL* 遺伝子と *psbZ* 遺伝子の間にある *trnE(UUC)* が逆位になっていた。また、アナアオサでは、*rbcL* 遺伝子と *psbZ* 遺伝子の間にある *trnMf(CAU)* と *trnE(UUC)* の間に Open Reading Frame(ORF)が存在していた。この ORF には *XerC* super family の一員である *Site-specific recombinase XerD* ドメインが含まれていた (図 14)。

考察

本研究により、アオサの葉緑体ゲノムの多様性が明らかになった。イントロンを含む遺伝子が種ごとに異なる理由は明らかではないが、最も葉緑体ゲノムサイズの小さいウスバアオノリにはイントロンを含む遺伝子はなかった。形態的特徴に基づいて分類された旧アオサ属でイントロンを含む遺伝子が、必ず旧アオノリ属ではイントロンを含まないという傾向は無かった。このことから、形態的特徴や葉緑体ゲノムサイズとイントロンを含む遺伝子の間になんらかの傾向や関連性は見られなかった。

近年、分子系統解析を行うとアオノリ属だったものとアオサ属だったものが同じクレード内に含まれていることも、旧アオサ属と旧アオノリ属がアオサ属として統一されたことの一つの根拠となっていた。また、核ゲノムの ITS 領域や葉緑体に含まれる *rbcL* 遺伝子の配列を用いて分子系統解析を行った先行研究では、

アナアオサとボウアオノリ、ヒラアオノリの遺伝的距離は比較近く、ミナミアオサ、リボンアオサとは遺伝的距離が比較的離れているという結果が示されている (Kraft *et al.* 2010, Matsumoto and Shimada 2014, Ichihara *et al.* 2015)。葉緑体ゲノムの全配列を用いた分子系統解析の結果は、旧アオサ属の種同士よりも旧アオサ属の種と旧アオノリ属の種が近く、形態的特徴に基づくアオサ種の特徴とは異なる結果を示していた。この結果は、先行研究と同様の結果であり、旧アオサ属と旧アオノリ属が同属となった背景を支持するものであった。

アナアオサの *trnF(AAA)* に対応する領域の二次構造予測を行った結果、*trnF(GAA)* が示すような tRNA に特徴的な二次構造予測はされなかった。これらの結果から、アナアオサでは、*trnF(AAA)* 配列に変異が起こり、機能を失ったのではないのではないかと考えられた。

アナアオサと *U. mitabilis* には *trnF(AAA)* がなく、他のアオサにあったという結果は、全葉緑体ゲノムを用いて行った分子系統解析の結果を支持するものであった。つまり、分子系統解析の結果、アナアオサと *U. mitabilis* は同じクレオードに含まれており、他のアオサと比較し遺伝的に比較的距離が近い。この 2 種のアオサのみ、*psbC* および *psbD* 遺伝子周辺の約 3 kbp の領域でゲノムの再構成が起こっており、*trnF(AAA)* がコードされていなかった。また、アナアオサの葉緑体ゲノムの特徴として、約 25 kbp におよぶ大きなゲノム再構成と *trnE(UUC)* の逆位もあった。

これらの結果から、アオサ類の葉緑体ゲノムサイズの違いを生み出している要因に、イントロンを含む遺伝子の違い、葉緑体ゲノムの再構成が含まれると推察された。アオサ類の葉緑体ゲノムのサイズの違いやゲノム構造の多様性を生み出す一因となっているこの 2 つ特徴は、種同定を可能とする分子マーカーの設計に利用できるのではないかと考えた。

表 2 葉緑体に含まれる遺伝子の数

	Genome size(bp)	rRNA	tRNA	Transcrip- tion and translation	Photo- synthe sis	Others	<i>Ycf</i>	<i>Orf</i>
<i>U. pertusa</i>	102,899	3	27	25	27	14	5	3
<i>U. mutabilis</i>	119,866	3	27	25	27	14	5	1
<i>U. ohnoi</i>	103,313	3	28	25	27	14	5	7
<i>U. lactuca</i>	96,005	3	28	25	27	14	5	6
<i>U. linza</i>	86,726	3	28	25	27	14	5	0
<i>U. flexuosa</i>	89,414	3	28	25	27	14	5	0
<i>U. prolifera</i>	93,066	3	28	25	27	14	5	1

表 3 アオサ類の葉緑体ゲノムに含まれる tRNA 遺伝子とその数

	<i>U. pertusa</i>	<i>U. ohnoi</i>
	<i>U. mutabilis</i>	<i>U. lactuca</i>
		<i>U. linza</i>
		<i>U. flexuosa</i>
		<i>U. prolifera</i>
<i>trnA</i> (UGC)	1	1
<i>trnC</i> (GCA)	1	1
<i>trnD</i> (GUC)	1	1
<i>trnE</i> (UUC)	1	1
<i>trnF</i> (AAA)	0	1
<i>trnF</i> (GAA)	1	1
<i>trnG</i> (GCC)	1	1
<i>trnG</i> (UCC)	1	1
<i>trnH</i> (GUG)	1	1
<i>trnI</i> (GAU)	2	2
<i>trnK</i> (UUU)	1	1
<i>trnL</i> (UAA)	1	1
<i>trnL</i> (UAG)	1	1
<i>trnM</i> (CAU)	2	2
<i>trnM</i> (CAU)	1	1
<i>trnN</i> (GUU)	1	1
<i>trnP</i> (UGG)	1	1
<i>trnQ</i> (UUG)	1	1
<i>trnR</i> (ACG)	1	1
<i>trnR</i> (UCU)	1	1
<i>trnS</i> (GCU)	1	1
<i>trnS</i> (UGA)	1	1
<i>trnT</i> (UGU)	1	1
<i>trnV</i> (UAC)	1	1
<i>trnW</i> (CCA)	1	1
<i>trnY</i> (GUA)	1	1

表 4 イントロンを含む遺伝子数の比較

	<i>rrl</i>	<i>atpA</i>	<i>atpB</i>	<i>psaB</i>	<i>petB</i>	<i>psbB</i>	<i>psbD</i>
<i>U. pertusa</i>	1	1	-	1	1	-	-
<i>U. mutabilis</i>	3	1	2	-	2	-	1
<i>U. ohnoi</i>	2	-	2	1	1	-	-
<i>U. lactuca</i>	1	-	-	1	2	-	1
<i>U. linza</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>U. flexuosa</i>	-	-	2	-	-	-	-
<i>U. prolifera</i>	-	-	-	1	1	1	-

	codon	anti codon		codon	anti codon		codon	anti codon		codon	anti codon
Phe	UUU	GAA	Ser	UCU	GGA	Tyr	UAU	GUA	Cys	UGU	GCA
Phe	UUC		Ser	UCC	UGA	Tyr	UAC		Cys	UGC	
Leu	UUA	UAA	Ser	UCA		ter	UAA	-	ter	UGA	-
Leu	UUG	CAA	Ser	UCG		ter	UAG	-	Trp	UGG	CCA
Leu	CUU		Pro	CCU		His	CAU		Arg	CGU	ACG
Leu	CUC		Pro	CCC		His	CAC	GUG	Arg	CGC	
Leu	CUA	UAG	Pro	CCA	UGG	Gln	CAA	UUG	Arg	CGA	
Leu	CUG		Pro	CCG		Gln	CAG		Arg	CGG	
Ile	AUU		Thr	ACU	GGA	Asn	AAU		Ser	AGU	
Ile	AUC	GAU	Thr	ACC	UGU	Asn	AAC	GUU	Ser	AGC	GCU
Ile	AUA	CAU	Thr	ACA		Lys	AAA	UUU	Arg	AGA	UCU
Met	AUG	CAU	Thr	ACG		Lys	AAG		Arg	AGG	
fMet		CAU				Asp	GAU		Gly	GGU	
Val	GUU		Ala	GCU		Asp	GAC	GUC	Gly	GGC	GCC
Val	GUC	GAC	Ala	GCC		Glu	GAA	UUC	Gly	GGA	UCC
Val	GUA	UAC	Ala	GCA	UGC	Glu	GAG		Gly	GGG	
Val	GUG		Ala	GCG							

図6 葉緑体ゲノムに含まれる tRNA 一覧 (梅園 1987 改定)

高等植物に含まれる tRNA はアンチコドン位の DNA 塩基配列 (5'-3') に示す。アオサの葉緑体に含まれる tRNA は赤字で示す。アナアオサと *U. mutabilis* に含まれていなかった *trnF(AAA)* は青字で示す。

```

*****
U. pertusa 1 ATGGAAAGTCCCGCTTTTTCTTTTCAATTTTATTGGATGCTTCTATTAAGTATTACT 60
U. lactuca 1 ATGGAAAGTCCCGCTTTTTCTTTTCAATCTTTATTGGATGCTTCTATTAAGTATTACT 60
psbN

*****
U. pertusa 61 GGTATTCCCTTTATGTGGGATTTGGTCCCCCTTCAAAAACCTTACGAGATCCTTTTGAA 120
U. lactuca 61 GGTATTCCGCTTTATGTTGGATTTGGTCCCTTCAAAAACCTTACGAGATCCTTTTGAA 120

*****
U. pertusa 121 GAACATGAAGATTAA TAAAAAATATTTATTTAAGTTTTAT-A-TAAAACTTAAAAATA 178
U. lactuca 121 GAACATGAAGATTAA TAAAAAATATTTATTTAAGTTTTAA-TTTT-TAATTAAAAATTAATA 171
trnF(AAA)

*****
U. pertusa 179 AAATATTTTGTATATAAAAAATATTTAGATTATTAGGTTGAATTCCTATAAAATCTTGAAT 238
U. lactuca 172 AAATA-TTT-T-T-T-A-A-A-T-A--T-A---GGTTAAATTCCTATAAAATCTT-A-- 219

* * * * *
U. pertusa 239 AACATTTTAATTTAAGTTTAATTTAAATTGCATCCAGTGGGGTTTGAACCCACGAGTGC 298
U. lactuca 220 A--A-TTTAAT---AA-A-TA-TTTT-TTGCATCCAGTGGGGTTTGAACCCACGATGTC 269
trnM(CAU)

*****
U. pertusa 299 CTTTTGGGAAGCGGATTATGAGCCCGCTGCTTTCGACCACTCAGCCACAGATGC 352
U. lactuca 270 CTTTTGGGAAGCGGATTATGAGCCCGCTGCTTTCGACCACTCAGCCACAGATGC 323

```

図 7 *trnF(AAA)* 遺伝子周辺の領域の比較

U. pertusa (アナアオサ) および *U. lactuca* (リボンアオサ) 葉緑体ゲノムの塩基配列を示す。配列の比較は MAFFT を用いて行った。両種の *psbN* および *trnM(CAU)* 領域と *U. lactuca* の *trnF(AAA)* 領域は四角で囲まれている。種間の同一塩基はアスタリスクで表示している。*trnF(AAA)* のアンチコドン部分は赤字で示す。

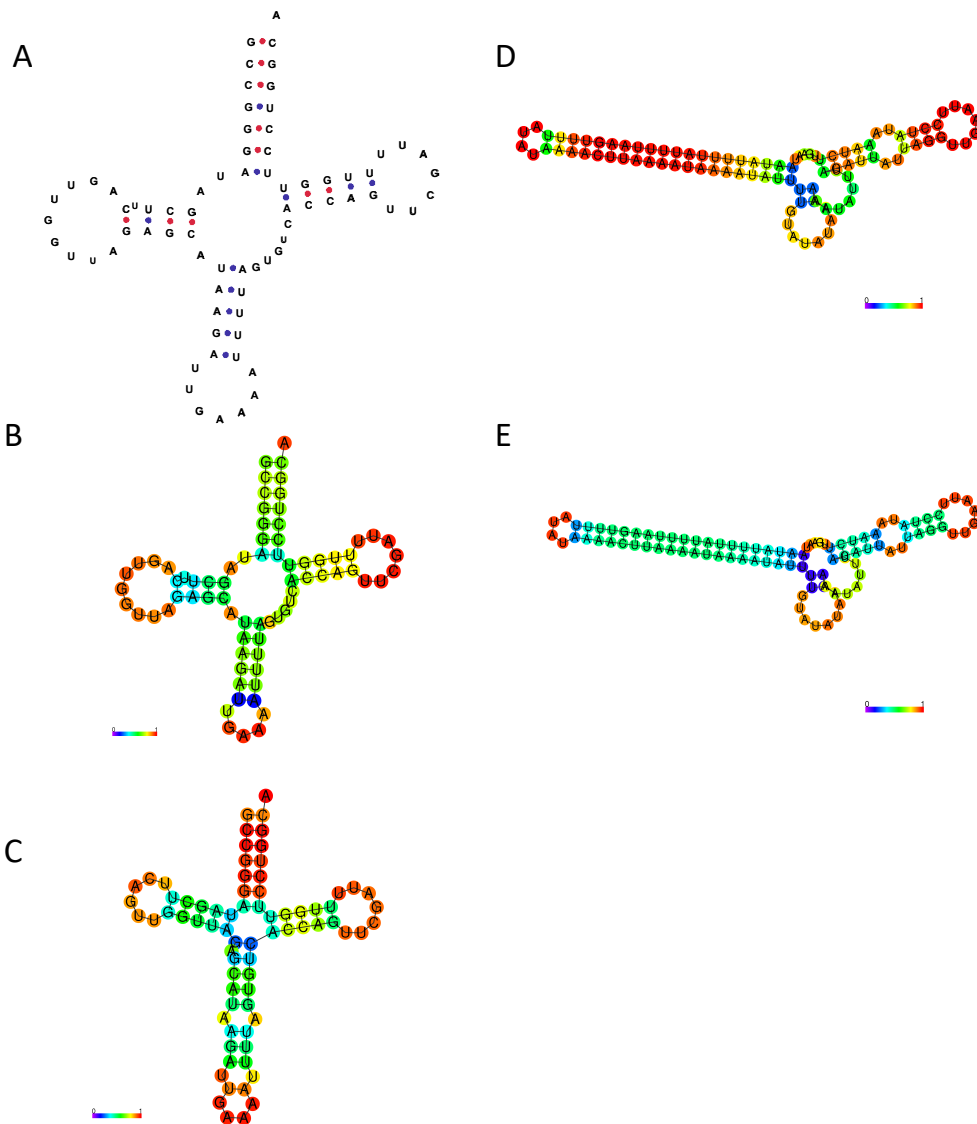


図 8 アナアオサの *trnF(AAA)* 領域と *trnF(GAA)* の二次構造予測

アナアオサの *trnF(AAA)* 領域と *trnF(GAA)* の二次構造予測結果を示す。CentroidHomfold と Centroidfold で予測した結果は、塩基対の確率が高いものから低くなるに従い、紫、青、黄緑、黄色、赤と色が変わる。

A: tRNAscan-SE によるアナアオサ *trnF(GAA)* の二次構造予測結果

B: CentroidHomfold によるアナアオサ *trnF(GAA)* の二次構造予測結果

C: Centroidfold によるアナアオサ *trnF(GAA)* の二次構造予測結果

D: CentroidHomfold によるアナアオサ *trnF(AAA)* 領域の二次構造予測結果

E: Centroidfold によるアナアオサ *trnF(AAA)* 領域の二次構造予測結果

アナアオサ	1	ATGAGTAAAATTTACGATTTGTTGAAGAAGCTTTAGAAAATCAAGCAATTCAGAGATATTTACAAGTGTGGCGATTGGTCTGCACGCAAGTTT	138
ミナミアオサ	1	ATGAGTAAAATTTACGATTTGTTGAAGAAGCTTTAGAAAATCAAGCAATTCAGAGATATTTACAAGTGTGGCGATTGGTCTGCACGCAAGTTT	146
リボンアオサ	1	ATGAGTAAAATTTACGATTTGTTGAAGAAGCTTTAGAAAATCAAGCAATTCAGAGATATTTACAAGTGTGGCGATTGGTCTGCACGCAAGTTT	144
<i>U. mutabilis</i>	1	ATGAGTAAAATTTACGATTTGTTGAAGAAGCTTTAGAAAATCAAGCAATTCAGAGATATTTACAAGTGTGGCGATTGGTCTGCACGCAAGTTT	149
ウスバアオノリ	1	ATGAGTAAAATTTACGATTTGTTGAAGAAGCTTTAGAAAATCAAGCAATTCAGAGATATTTACAAGTGTGGCGATTGGTCTGCACGCAAGTTT	68
スジアオノリ	1	ATGAGTAAAATTTACGATTTGTTGAAGAAGCTTTAGAAAATCAAGCAATTCAGAGATATTTACAAGTGTGGCGATTGGTCTGCACGCAAGTTT	68
キヌイトアオノリ	1	ATGAGTAAAATTTACGATTTGTTGAAGAAGCTTTAGAAAATCAAGCAATTCAGAGATATTTACAAGTGTGGCGATTGGTCTGCACGCAAGTTT	68
<hr/>			
アナアオサ	2177	CAAACTAAATTAATACTCAAGCTTAACTTAATATACAGGAGCCGTATGAGGTGAAACTCACGTCACGGTTTGAATFAGAGGTTCATATAA	2322
ミナミアオサ	2168	AGAACTAAAGATTCTCAAGCTTAACTTAATATACAGGAGCCGTATGAGGTGAAACTCACGTCACGGTTTGAATFAGAGGTTCATATAA	2309
リボンアオサ	2163	AGAACTAAAGATTCTCAAGCTTAACTTAATATACAGGAGCCGTATGAGGTGAAACTCACGTCACGGTTTGAATFAGAGGTTCATATAA	2304
<i>U. mutabilis</i>	2210	AAAACTAAAGATTCTCAAGCTTAACTTAATATACAGGAGCCGTATGAGGTGAAACTCACGTCACGGTTTGAATFAGAGGTTCATATAA	2355
ウスバアオノリ	69		87
スジアオノリ	69		87
キヌイトアオノリ	69		87
<hr/>			
アナアオサ	2623	CTTTTGGTGTACAGGTTATTCATTACCCTGGGACCAAGTAGGATATGGGCTGTAAAATGTAACAGGTCACCTGATGCAATCTGTTGAGGAACAACATTAGTGAATTATACGTGGTGTAGGTTAGG	2763
ミナミアオサ	2610	CTTTTGGTGTACAGGTTATTCATTACCCTGGGACCAAGTAGGATATGGGCTGTAAAATGTAACAGGTCACCTGATGCAATCTGTTGAGGAACAACATTAGTGAATTATACGTGGTGTAGGTTAGG	2750
リボンアオサ	2605	CTTTTGGTGTACAGGTTATTCATTACCCTGGGACCAAGTAGGATATGGGCTGTAAAATGTAACAGGTCACCTGATGCAATCTGTTGAGGAACAACATTAGTGAATTATACGTGGTGTAGGTTAGG	2749
<i>U. mutabilis</i>	2656	CTTTTGGTGTACAGGTTATTCATTACCCTGGGACCAAGTAGGATATGGGCTGTAAAATGTAACAGGTCACCTGATGCAATCTGTTGAGGAACAACATTAGTGAATTATACGTGGTGTAGGTTAGG	2805
ウスバアオノリ	388		528
スジアオノリ	388		537
キヌイトアオノリ	388		528
<hr/>			
アナアオサ	2764	-----CAAGCAACTAACACGTTTTATAGTTACATAC	2798
ミナミアオサ	2751	-----CAAGCAACTAACACGTTTTATAGTTACATAC	2785
リボンアオサ	3928	TTGTTATCTTTGGTATGATGATATAGAAATCAAAATCAAAACACAAAAAATAATTAATAAAGTAGTAAAAAATTTAATGATGTCACAAAAGAAACAATTTCTTTTAGCAAGCAACTAACACGTTTTATAGTTACATAC	4070
<i>U. mutabilis</i>	3947	TTGTTATCTTTGGTATGATGATATAGAAATCAAAATCAAAACACAAAAAATAATTAATAAAGTAGTAAAAAATTTAATGATGTCACAAAAGAAACAATTTCTTTTAGCAAGCAACTAACACGTTTTATAGTTACATAC	4096
ウスバアオノリ	529	-----CAAGCAACTAACACGTTTTATAGTTACATAC	563
スジアオノリ	1663	TTGTTATCTTTGGTATGATGATAGAAATCAAAATCAAAATCAAAACACAAAAAATAATTAATAAAGTAGTAAAAAATTTAATGATGTCACAAAAGAAACAATTTCTTTTAGCAAGCAACTAACACGTTTTATAGTTACATAC	1812
キヌイトアオノリ	529	-----CAAGCAACTAACACGTTTTATAGTTACATAC	563
<hr/>			
アナアオサ	2799	CTTTGTTTTACCATTAACTGCAGTATTTATGTTAAATGATGTTGTAAGTAACTGTAAGCAAGGTATTTCTGGTCCACTATAA	2883
ミナミアオサ	2786	CTTTGTTTTACCATTAACTGCAGTATTTATGTTAAATGATGTTGTAAGTAACTGTAAGCAAGGTATTTCTGGTCCACTATAA	2870
リボンアオサ	4071	CTTTGTTTTACCATTAACTGCAGTATTTATGTTAAATGATGTTGTAAGTAACTGTAAGCAAGGTATTTCTGGTCCACTATAA	4155
<i>U. mutabilis</i>	4097	CTTTGTTTTACCATTAACTGCAGTATTTATGTTAAATGATGTTGTAAGTAACTGTAAGCAAGGTATTTCTGGTCCACTATAA	4181
ウスバアオノリ	564		648
スジアオノリ	1813		1897
キヌイトアオノリ	564		648

図 9 *petB* 遺伝子の配列比較

アナアオサ、ミナミアオサ、リボンアオサ、*U. mutabilis*、スジアオノリ、ウスバアオノリ、キヌイトアオノリの *petB* 遺伝子の配列比較を行った。配列の比較は MAFFT を用いて行った。7 種のアオサ種のうち、4 種以上で同一塩基配列の部分は赤く囲まれている。エキソンは青い下線で示す。イントロンは黄緑色の下線で示す。

アナアオサ	1	ATGACTATCGCAATCGGTAAGTCAGAAGAAAAACGTGGATTATTCGACGTAATGGATGACTGGTACCCCGTGA	CCTCTGTTTATGTTGGTGGTCAGGTTATTACTATTACCTTGTCATATTTGCATTAGG	CGTTGGTTAA	150
ミナミアオサ	1	ATGACTATCGCAATCGGTAAGTCAGAAGAAAAACGTGGATTATTCGACGTAATGGATGACTGGTACCCCGTGA	CCTCTGTTTATGTTGGTGGTCAGGTTATTATTACTTTGTCATATTTGCATTAGGAGGTTGGTTAA	CGTTGGTTAA	150
リボンアオサ	1	ATGACTATCGCAATCGGTAAGTCAGAAGAAAAACGTGGATTATTCGACGTAATGGATGACTGGTACCCCGTGA	CCTCTGTTTATGTTGGTGGTCAGGTTATTATTACTTTGTCATATTTGCATTAGGAGGTTGGTTAA	CGTTGGTTAA	150
<i>U. mutabilis</i>	1	ATGACTATCGCAATCGGTAAGTCAGAAGAAAAACGTGGATTATTCGACGTAATGGATGACTGGTACCCCGTGA	CCTCTGTTTATGTTGGTGGTCAGGTTATTACTATTACCTTGTCATATTTGCATTAGGAGGTTGGTTAA	CGTTGGTTAA	150
ウスバアオノリ	1	ATGACTATCGCAATCGGTAAGTCAGAAGAAAAACGTGGATTATTCGACGTAATGGATGACTGGTACCCCGTGA	CCTCTGTTTATGTTGGTGGTCAGGTTATTACTATTACCTTGTCATATTTGCATTAGGAGGTTGGTTAA	CGTTGGTTAA	150
スジアオノリ	1	ATGACTATCGCAATCGGTAAGTCAGAAGAAAAACGTGGATTATTCGACGTAATGGATGACTGGTACCCCGTGA	CCTCTGTTTATGTTGGTGGTCAGGTTATTACTATTACCTTGTCATATTTGCATTAGGAGGTTGGTTAA	CGTTGGTTAA	150
キヌイトアオノリ	1	ATGACTATCGCAATCGGTAAGTCAGAAGAAAAACGTGGATTATTCGACGTAATGGATGACTGGTACCCCGTGA	CCTCTGTTTATGTTGGTGGTCAGGTTATTACTATTACCTTGTCATATTTGCATTAGGAGGTTGGTTAA	CGTTGGTTAA	150
<hr/>					
アナアオサ	601	GTTCAGGTGATTAGGAGCCATTATTATGTCGAATTCAGTGTACTGTAGAAAAACAATCTTTGAAGATGGT	GACGGTGCAAAACACATCCCGTCATTAA	CCACGCAAGCTCAAGAAACGTA	742
ミナミアオサ	601	GTTCAGGTGATTAGGAGCCATTATTATGTCGAATTCAGTGTACTGTAGAAAAACAATCTTTGAAGATGGT	GACGGTGCAAAACACATCCCGTCATTAA	CCACGCAAGCTCAAGAAACGTA	742
リボンアオサ	601	GTTCAGGTGATTAGGAGCCATTATTATGTCGAATTCAGTGTACTGTAGAAAAACAATCTTTGAAGATGGT	GACGGTGCAAAACACATCCCGTCATTAA	CCACGCAAGCTCAAGAAACGTA	750
<i>U. mutabilis</i>	601	GTTCAGGTGATTAGGAGCCATTATTATGTCGAATTCAGTGTACTGTAGAAAAACAATCTTTGAAGATGGT	GACGGTGCAAAACACATCCCGTCATTAA	CCACGCAAGCTCAAGAAACGTA	750
ウスバアオノリ	601	GTTCAGGTGATTAGGAGCCATTATTATGTCGAATTCAGTGTACTGTAGAAAAACAATCTTTGAAGATGGT	GACGGTGCAAAACACATCCCGTCATTAA	CCACGCAAGCTCAAGAAACGTA	742
スジアオノリ	601	GTTCAGGTGATTAGGAGCCATTATTATGTCGAATTCAGTGTACTGTAGAAAAACAATCTTTGAAGATGGT	GACGGTGCAAAACACATCCCGTCATTAA	CCACGCAAGCTCAAGAAACGTA	742
キヌイトアオノリ	601	GTTCAGGTGATTAGGAGCCATTATTATGTCGAATTCAGTGTACTGTAGAAAAACAATCTTTGAAGATGGT	GACGGTGCAAAACACATCCCGTCATTAA	CCACGCAAGCTCAAGAAACGTA	742
<hr/>					
アナアオサ	743	-----	-----	-----	747
ミナミアオサ	743	-----	-----	-----	747
リボンアオサ	1612	TTCCGAAACAGTAAGTATCTCTATTA-----AAAGAGATAAAGATATAGTCTGATCTTATAGGAACTATAAGCTGTGGCC	ACTTTATATAAAAGTAGTCCCGAAAGAGTTCCGCAATCTTTTGAACATTTTGTAGCA	AGCA	1752
<i>U. mutabilis</i>	1638	TTCCGAAACAGTAAGTATCTCTATTA-----AAAGAGATAAAGATATAGTCTGATCTTATAGGAACTATAAGCTGTGGCC	ACTTTATATAAAAGTAGTCCCGAAAGAGTTCCGCAATCTTTTGAACATTTTGTAGCA	AGCA	1783
ウスバアオノリ	743	-----	-----	-----	747
スジアオノリ	743	-----	-----	-----	747
キヌイトアオノリ	743	-----	-----	-----	747
<hr/>					
アナアオサ	898	CTCAAGAAATTCGTCGCTGAAGATCCAGAATTTAACTTTCTATACAAAAACAATTTAAATGAAGGTATT	CGTCATGGATGGCTGCTCAAGATCAACCACATGAACATTTAGTATCCAGAGGAGGT	TTACCACTGGGA	104
ミナミアオサ	898	CTCAAGAAATTCGTCGCTGAAGATCCAGAATTTAACTTTCTATACAAAAACAATTTAAATGAAGGTATT	CGTCATGGATGGCTGCTCAAGATCAACCACATGAACATTTAGTATCCAGAGGAGGT	TTACCACTGGGA	104
リボンアオサ	1983	CTCAAGAAATTCGTCGCTGAAGATCCAGAATTTAACTTTCTATACAAAAACAATTTAAATGAAGGTATT	CGTCATGGATGGCTGCTCAAGATCAACCACATGAACATTTAGTATCCAGAGGAGGT	TTACCACTGGGA	285
<i>U. mutabilis</i>	1934	CTCAAGAAATTCGTCGCTGAAGATCCAGAATTTAACTTTCTATACAAAAACAATTTAAATGAAGGTATT	CGTCATGGATGGCTGCTCAAGATCAACCACATGAACATTTAGTATCCAGAGGAGGT	TTACCACTGGGA	288
ウスバアオノリ	898	CTCAAGAAATTCGTCGCTGAAGATCCAGAATTTAACTTTCTATACAAAAACAATTTAAATGAAGGTATT	CGTCATGGATGGCTGCTCAAGATCAACCACATGAACATTTAGTATCCAGAGGAGGT	TTACCACTGGGA	104
スジアオノリ	898	CTCAAGAAATTCGTCGCTGAAGATCCAGAATTTAACTTTCTATACAAAAACAATTTAAATGAAGGTATT	CGTCATGGATGGCTGCTCAAGATCAACCACATGAACATTTAGTATCCAGAGGAGGT	TTACCACTGGGA	104
キヌイトアオノリ	898	CTCAAGAAATTCGTCGCTGAAGATCCAGAATTTAACTTTCTATACAAAAACAATTTAAATGAAGGTATT	CGTCATGGATGGCTGCTCAAGATCAACCACATGAACATTTAGTATCCAGAGGAGGT	TTACCACTGGGA	104
<hr/>					
アナアオサ	1048	AACGCTCTTTAA			1059
ミナミアオサ	1048	AACGCTCTTTAA			1059
リボンアオサ	2053	AACGCTCTTTAA			2064
<i>U. mutabilis</i>	2084	AACGCTCTTTAA			2095
ウスバアオノリ	1048	AACGCTCTTTAA			1059
スジアオノリ	1048	AACGCTCTTTAA			1059
キヌイトアオノリ	1048	AACGCTCTTTAA			1059

図 10 *psbD* 遺伝子の配列比較

アナアオサ、ミナミアオサ、リボンアオサ、*U. mutabilis*、スジアオノリ、ウスバアオノリ、キヌイトアオノリの *psbD* 遺伝子の配列比較を行った。配列の比較は MAFFT を用いて行った。7 種のアオサ種のうち、4 種以上で同一塩基配列の部分は赤く囲まれている。エキソンは青い下線で示す。イントロンは黄緑色の下線で示す。

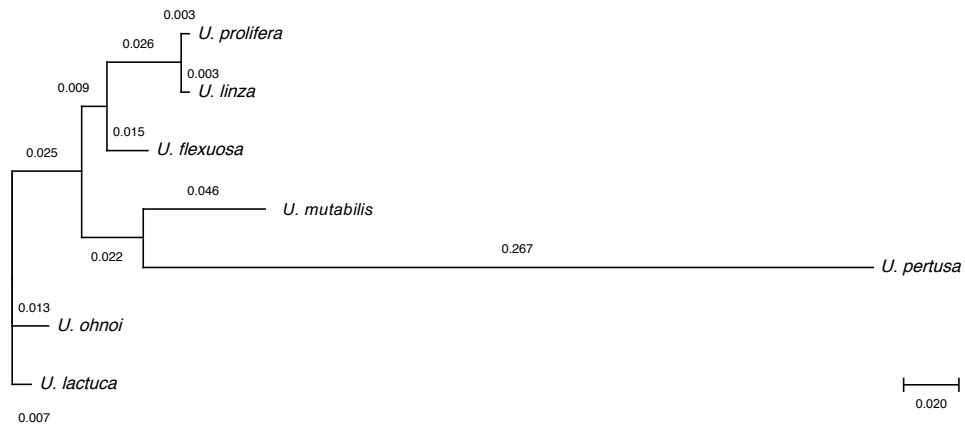


図 11 アオサ類の葉緑体全ゲノム配列を用いた分子系統解析

アナアオサと *U. mutabilis*、ウスバアオノリ、スジアオノリ、キヌイトアオノリ、ミナミアオサ、リボンアオサの葉緑体ゲノムの配列を元に分子系統解析を行った。系統解析には **maximum likelihood** 法を用いた。枝長はサイト当たりの塩基置換数を示す。

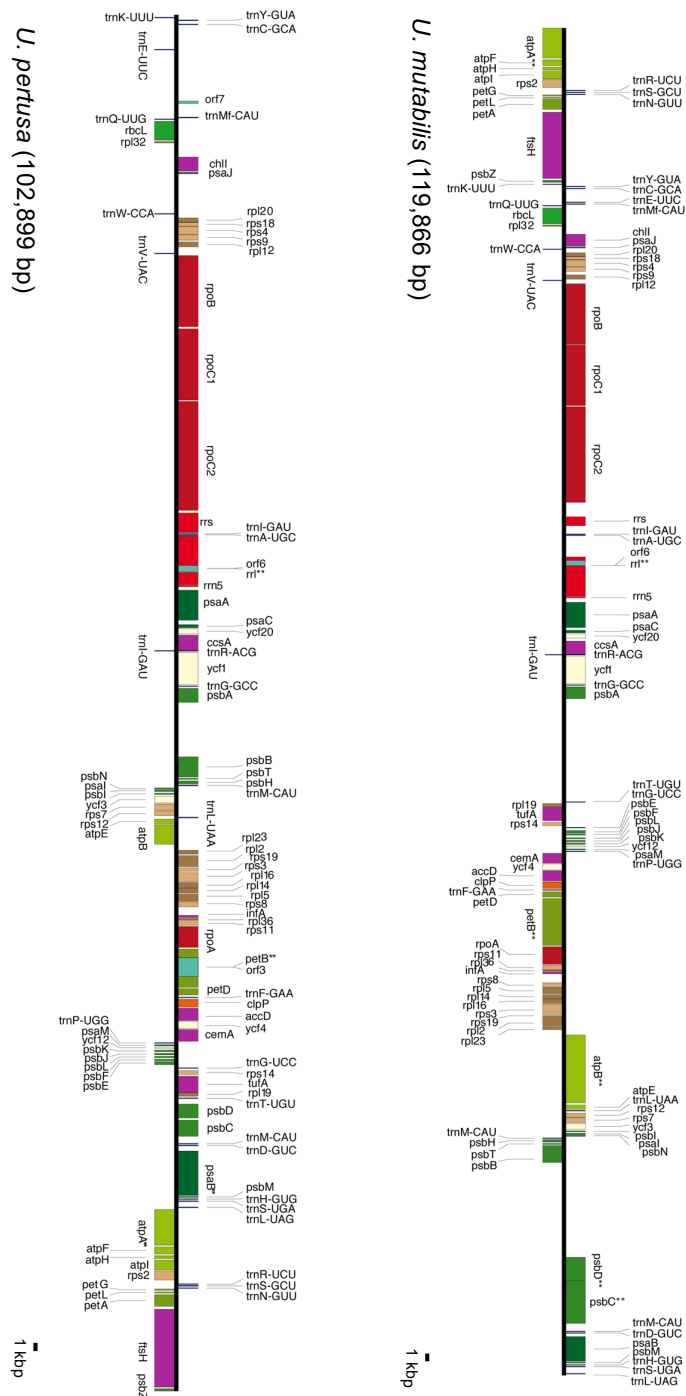


図 12-1 全葉緑体ゲノム上の遺伝子の比較

アナアオサと *U. mutabilis* の葉緑体ゲノム上にコードされている遺伝子を示す。左から右へ転写される遺伝子は黒線の上側に示し、右から左へ転写される遺伝子は黒線の下側に示す。
左: *U. pertusa* (アナアオサ)、右: *U. mutabilis*

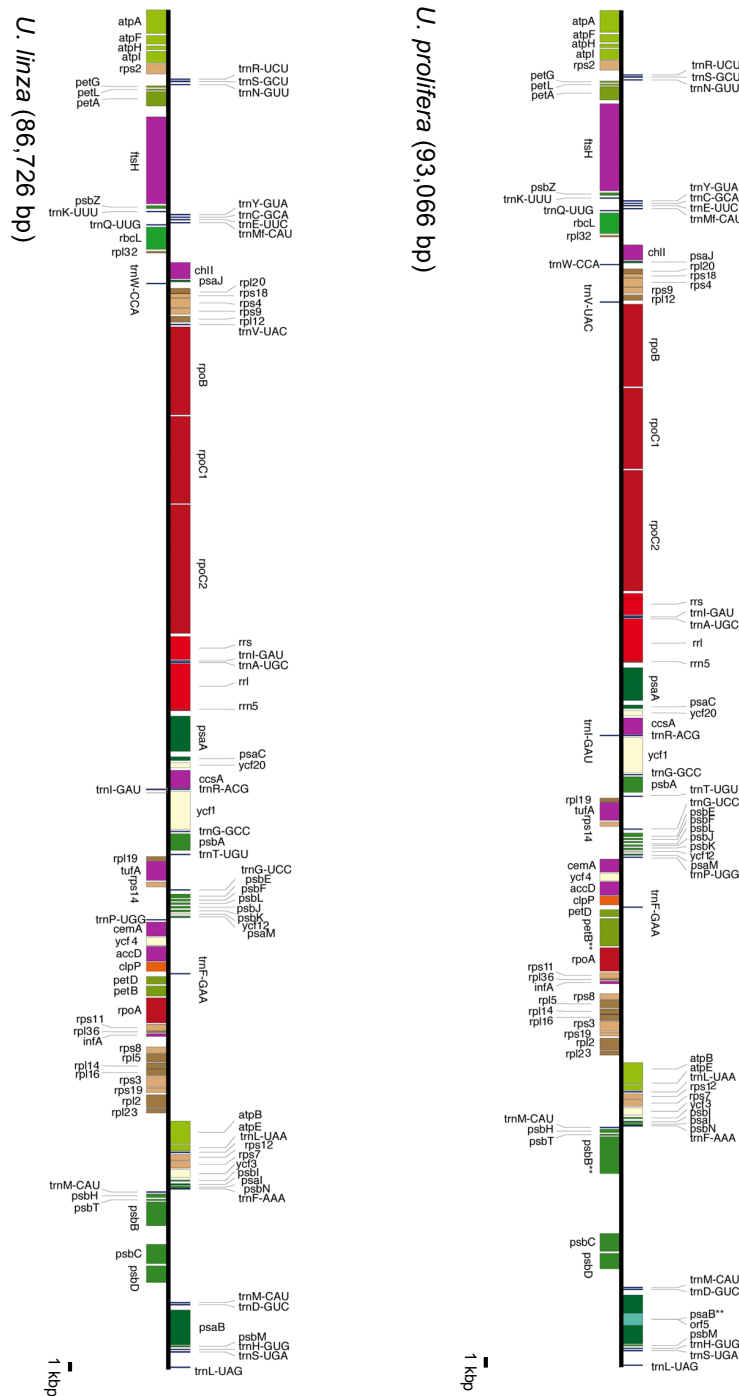


図 12-2 全葉緑体ゲノム上の遺伝子の比較

ウスバアオノリ、スジアオノリの葉緑体ゲノム上にコードされている遺伝子を示す。左から右へ転写される遺伝子は黒線の上側に示し、右から左へ転写される遺伝子は黒線の下側に示す。

左: *U. linza* (ウスバアオノリ)、右: *U. proliferata* (スジアオノリ)

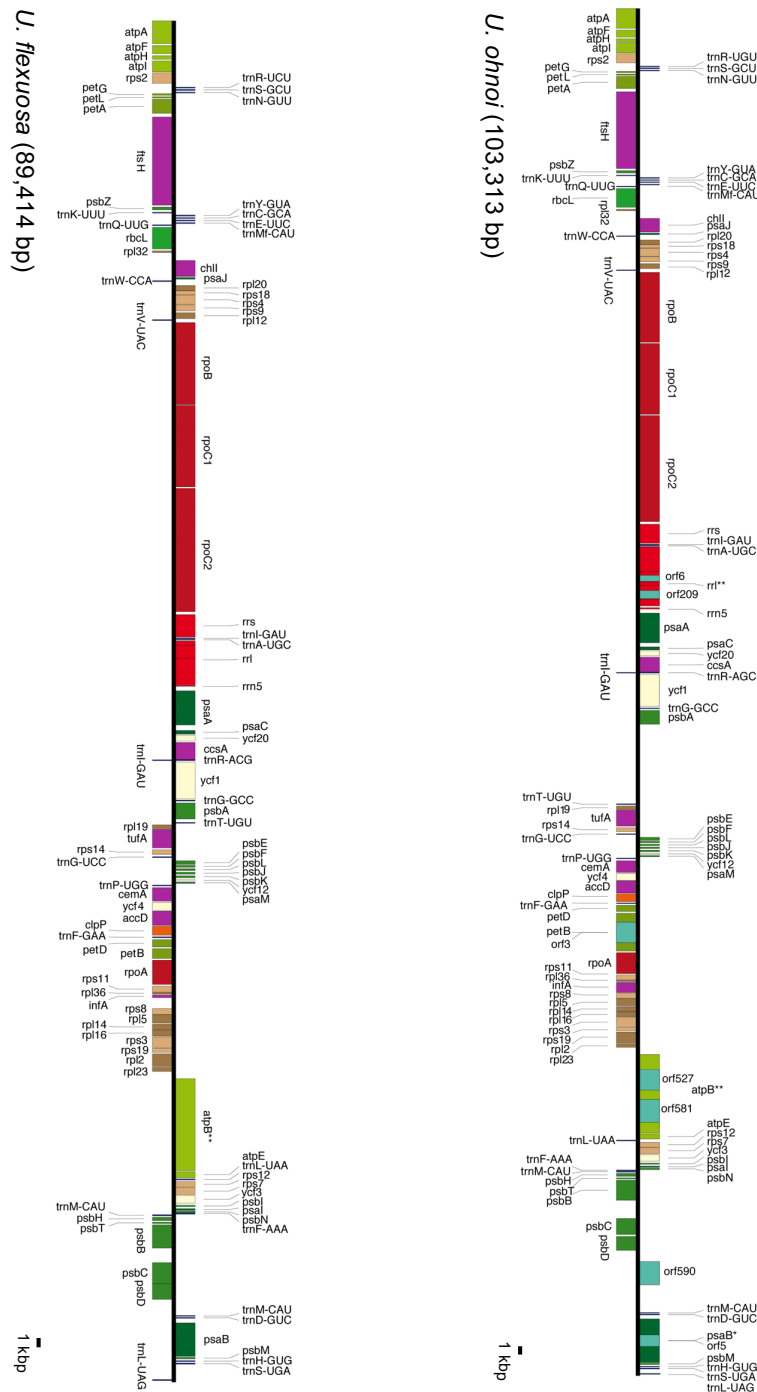


図 12-3 全葉緑体ゲノム上の遺伝子の比較

キヌイトアオノリ、ミナミアオサの葉緑体ゲノム上にコードされている遺伝子を示す。左から右へ転写される遺伝子は黒線の上側に示し、右から左へ転写される遺伝子は黒線の下側に示す。

左: *U. flexuosa* (キヌイトアオノリ)、右: *U. ohnoi* (ミナミアオサ)

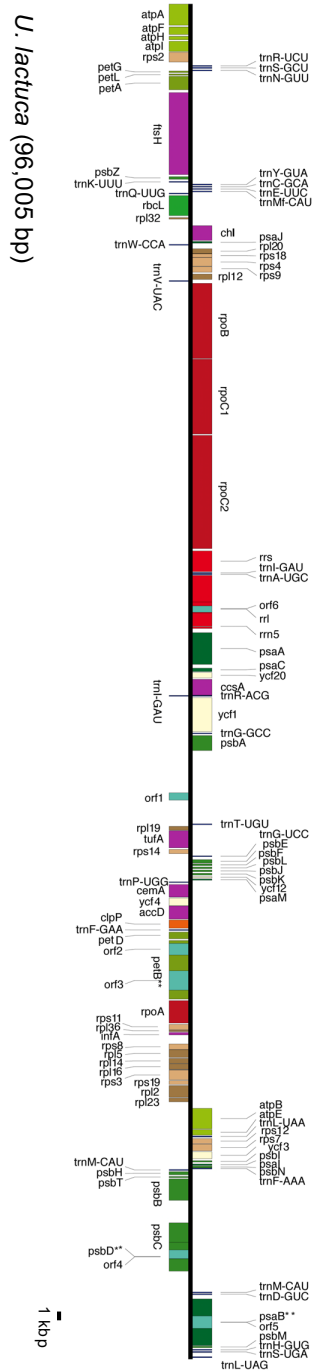


図 12-4 全葉緑体ゲノム上の遺伝子の比較

リボンアオサの葉緑体ゲノム上にコードされている遺伝子を示す。左から右へ転写される遺伝子は黒線の上側に示し、右から左へ転写される遺伝子は黒線の下側に示す。

U. lactuca (リボンアオサ)

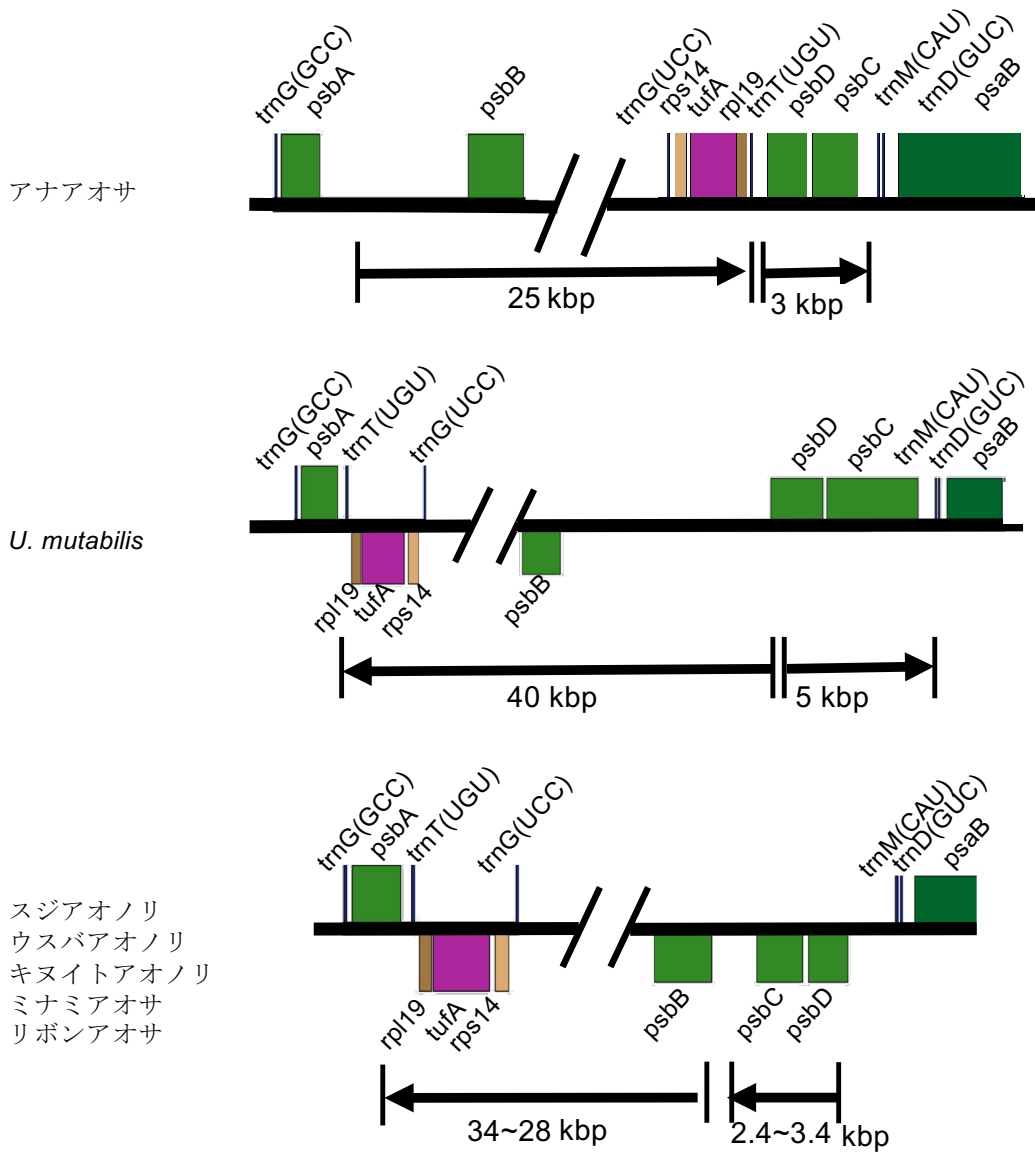


図 13 アオサ種の葉緑体ゲノムにおける遺伝子の概略

予測されたゲノム反転を含む領域を示す。矢印は葉緑体ゲノム内の遺伝子順序の方向を示している。左から右へと転写される遺伝子は線の上側に示す。右から左へと転写される遺伝子は線の下側に示す。

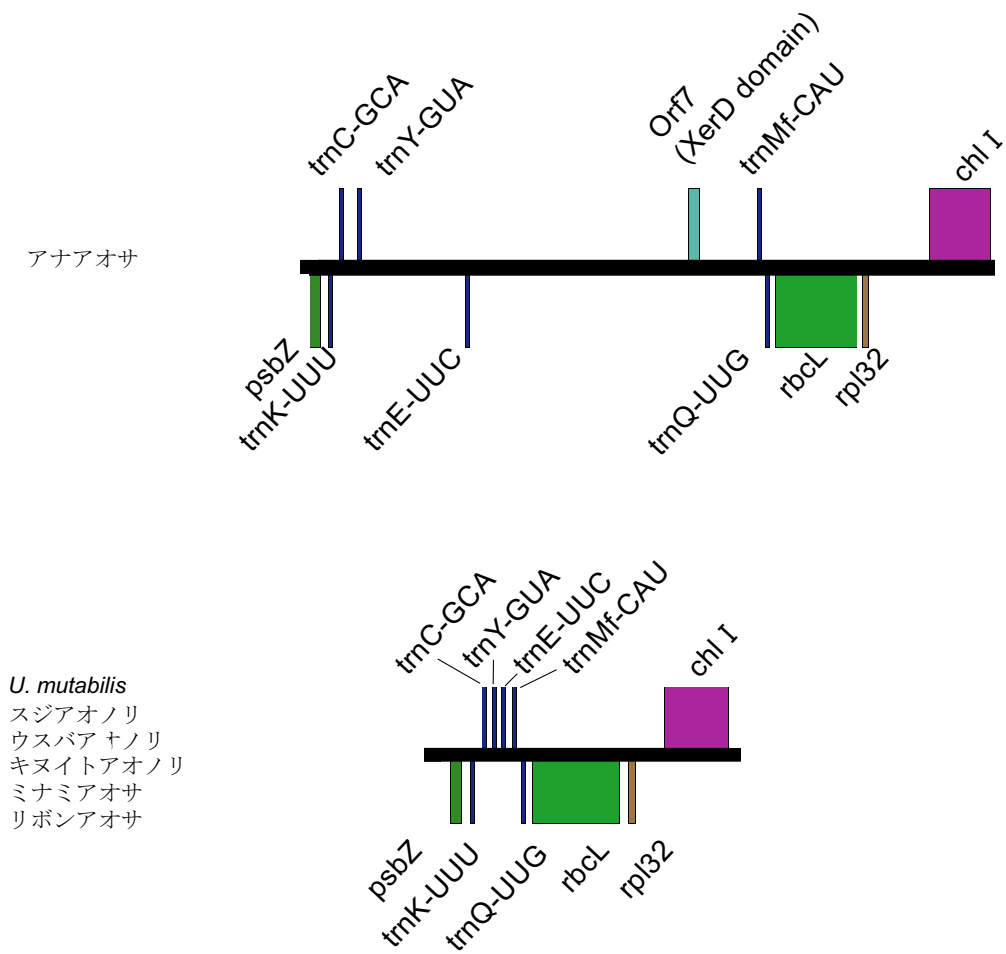


図 14 アオサ種の葉緑体ゲノムにおける *rbcL* 遺伝子周辺領域の概略

アノアオサ (*U. pertusa*) のみ *trnE(UUC)* が逆位になっている。左から右へと転写される遺伝子は線の上側に示す。右から左へと転写される遺伝子は線の下側に示す。Orf7 は XerC super family の一員である *Site-specific recombinase XerD domain* が含まれている。

4. アオサ類の個別認識が可能な分子マーカーの作成と評価

東京湾でグリーンタイドを形成する種として報告されている *U. pertusa* (アナアオサ)、*U. ohnoi* (ミナミアオサ)、*U. lactuca* (リボンアオサ) は形態が似ているため、形態的特徴を用いた種同定が難しいことが知られている。アオサ類の葉緑体ゲノムの構造比較により、イントロンを含む遺伝子に規則性はみられなかった。しかし、エキソン部分が保存されており、イントロンの挿入部分は種を超えて同じであった。また、遺伝子間領域にも差があることがわかった。そこで、これらの特徴を利用し、アナアオサ、ミナミアオサ、リボンアオサの種同定が可能な分子マーカーの作出が可能ではないかと考えた。

アオサ類の葉緑体ゲノムの中にイントロンを含む遺伝子、遺伝子間領域の長さには差がある領域が複数あった。このうち、*atpA* 遺伝子はアナアオサのみにイントロンがあったことから、*atpA* 遺伝子領域の多型を利用した分子マーカーAを設計した。*rbcL* 遺伝子の周辺領域は、アナアオサのみ *trnE* が逆位になり、遺伝子間領域が長くなっていたことから、*rbcL* 遺伝子と *chl1* 遺伝子の間の領域の多型を利用した分子マーカーBを設計した。*psbD* 遺伝子領域はゲノムの逆位が起こっていたが、イントロンの塩基配列が保存されていた。また、*psbD* 遺伝子はリボンアオサのみにイントロンがあったことから、*psbD* 遺伝子領域の多型を利用した分子マーカーCを設計した。*atpB* 遺伝子はミナミアオサのみイントロンがあったことから *atpB* 遺伝子領域の多型を利用した分子マーカーDを設計した(表5)。

アナアオサ、ミナミアオサ、リボンアオサ、それぞれから抽出したDNAを用い、4種類の分子マーカーを用いてPCRを行った。その結果、各分子マーカーで増幅されるDNA断片の大きさが異なった。アナアオサは、分子マーカーA、Bで最も長い断片(A: 1.5 kbp、B: 2 kbp)が増幅した。リボンアオサは分子マーカーCで最も長い断片(1.6 kbp)が増幅した。ミナミアオサは分子マーカーDで最も長い断片(6 kbp)が増幅した(図15)。この結果から、本研究において作出した4種類の分子マーカーにより、東京湾でグリーンタイドを形成し形態が似ている3種類のアオサを、各分子マーカーで増幅されるDNA断片長の違いにより見分けることが可能であった。

しかし、本研究で作出した分子マーカーが、種によって安定した結果を示すか

は不明である。採取地が異なるため別系統として維持されている藻体を用いて種同定を行った。その結果、ミナミアオサ、リボンアオサにおいて、同種別系統の藻体で同じサイズの DNA 断片が増幅された。この結果から、今回作出した 4 種類の分子マーカーは別系統で維持されている種でも同種として種の識別が可能であり、種同定に有用であった (図 16)。

アオサ属の海藻には大きく分けて 2 つの形態がある。旧アオサ属はレタス状の形態、旧アオノリ属はチューブ状の形態を示す。東京湾でグリーンタイドを形成するアナアオサ、ミナミアオサ、リボンアオサは旧アオサ属に分類されていた種のため、分子マーカーの有用性は旧アオサ属の種のみを用いて検討を行っていた。しかし、海外では旧アオノリ属に分類されていた種によるグリーンタイドも報告されていることから、旧アオノリ属に分類されていた *U. flexuosa* (キヌイトアオノリ) について分子マーカーを用いた種同定を試みた。その結果、各分子マーカーで増幅される DNA 断片長が他の種と異なり、種同定が可能であった (図 16)。日本でみられる一般的なアオサ属の海藻である *U. fenestrata* (チシマアナアオサ)、*U. intestinalis* (ボウアオノリ)、*U. compressa* (ヒラアオノリ) は葉緑体全ゲノムが解読されていない。現時点で、これらの種は東京湾のグリーンタイドを形成する種として報告されていない。今後、グリーンタイド形成種に含まれる可能性もある。そのため、これらの種でも分子マーカーを用いた種同定を試みた。その結果、各分子マーカーで増幅される DNA 断片長が他の種と異なり、種同定が可能であった (図 16)。また、日本での生息は報告されていない *U. mutabilis* は全葉緑体ゲノムが解読されている。データベースに登録されている情報を元に、増幅される DNA 断片長を予測した。その結果、各分子マーカーで増幅される DNA 断片長が他の種と異なり、種同定が可能であった (図 16)。

アナアオサとボウアオノリはマーカー A、C、D で増幅した DNA 断片長が同一であったが、マーカー B で増幅した DNA 断片長は異なった。この結果からアナアオサとボウアオノリを見分けることが可能であった。ミナミアオサとキヌイトアオノリとヒラアオノリはマーカー A、B、C で増幅した DNA 断片長が同一であったが、マーカー D で増幅した DNA 断片長は異なった。この結果からミナミアオサとキヌイトアオノリとヒラアオノリを見分けることが可能であった。キヌイトアオノリとボウアオノリはマーカー B、C、D で増幅した DNA 断片長が同一であったが、マーカー A で増幅した DNA 断片長は異なった。この結果からキヌイ

トアオノリとボウアオノリを見分けることが可能であった (図 16-E)。これらの結果から、本研究で作出した分子マーカーセットを用いて、アナアオサ、ミナミアオサ、リボンアオサ、チシマアナアオサ、キヌイトアオノリ、ボウアオノリ、ヒラアオノリの種同定が可能であった。

アオサ属の海藻は形態的特徴を用いた種同定が難しい場合が多い。実際に種名がわからないサンプルを用い、分子マーカーセットを用いた種同定を試みた。検討には、お台場海浜公園にて採取した 5 種類のアオサ属の海藻を用いた。採取したサンプル 1 は旧アオノリ属にみられるチューブ状の形態、サンプル 2~5 は旧アオサ属に見られるレタス状の形態だった (図 17-A)。全てのサンプルから DNA を抽出し、分子マーカーセットの検定を行った (図 17-B~ F)。その結果、旧分類アオノリ属に分類されていた種に似たサンプル 1 はキヌイトアオノリと同じ大きさの DNA 断片長が増幅された。このことから、サンプル 1 はキヌイトアオノリではないかと推測された。旧分類でアオサ属だったものに似た形態のサンプル 2~5 は、全てリボンアオサと同じ DNA 断片の増幅パターンを示した。このことからサンプル 2 から 5 はすべてリボンアオサではないかと推測された。

考察

アオサ類の葉緑体ゲノムの構造解析から、アオサ種はイントロンを持つ遺伝子が種によって異なること、遺伝子間領域の長さが異なる領域があることが明らかとなった。これらの特徴を利用し、種同定が可能な遺伝診断マーカーセットを作出することができるのではないかと考え、4 種類の分子マーカーを作出した。当初、作出した分子マーカー 4 種類のうち 3 種類を用いて分子マーカーセットをつくる予定だった。しかし、研究を進めていく中で、3 種類の分子マーカーで同じサイズの DNA 断片が増幅することがあり、3 種類の分子マーカーでは同定ができない種があることがわかった。そのため、4 種類全ての分子マーカーを使用することとした。

本研究で作出した 4 種類の分子マーカーにより、増幅される DNA 断片の多型から東京湾でグリーンタイドを形成するアナアオサ、ミナミアオサ、リボンアオサの 3 種類を同定することが可能であった。東京湾のグリーンタイド形成種に他の種が含まれることも想定される。そのため、東京湾でグリーンタイドを形成する 3 種に加え、チシマアナアオサ、キヌイトアオノリ、ヒラアオノリ、ボウア

オノリ、*U. mutabilis* を含めた 8 種類のアオサ属の海藻で種同定が可能か検討を行ったところ、増幅される DNA 断片長が異なり多型を示した。この多型により、8 種類のアオサ属の海藻の種同定が可能であった。これらの結果から、4 種類の分子マーカーを用いることで、他のアオサ種が含まれた場合でも種同定が可能であるのではないかと考えた。

表 5 分子マーカーのプライマーリスト

分子 マーカー	Primer set	Primer sequences
A	Forward	5'-GGTGCTGTAATAATGGGTGAAG-3'
	Reverse	5'-GACCAATTGCAACATAAACAC-3'
B	Forward	5'-TACCTTCTGTTAAAGCTTTTTCCATATC-3'
	Reverse	5'-CAGGCGTGTAATAAGTTAAACG-3'
C	Forward	5'-CGACGTAATGGATGACTGGT-3'
	Reverse	5'-CATAAAGAAGTGAAGCCAACG-3'
D	Forward	5'-TTAATGCGAGGAATGGAAGC-3'
	Reverse	5'-CCGGTTGTATAAACCGTGG-3'

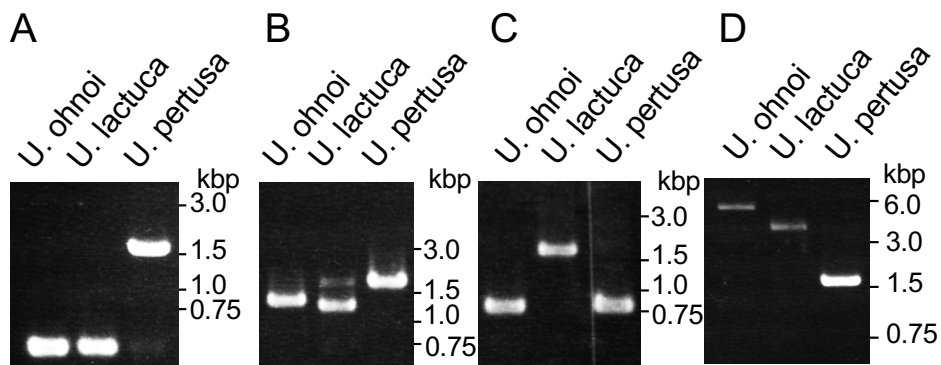


図 15 分子マーカーの評価

パネル A~D は、それぞれ表 5 に示したプライマー A~D を使用し、*U. ohnoi* (ミナミアオサ)、*U. lactuca* (リボンアオサ)、および *U. pertusa* (アナアオサ) のゲノム DNA を用いて PCR を行って得られた結果を示す。右側の数字は DNA 分子量マーカーのサイズを示す。

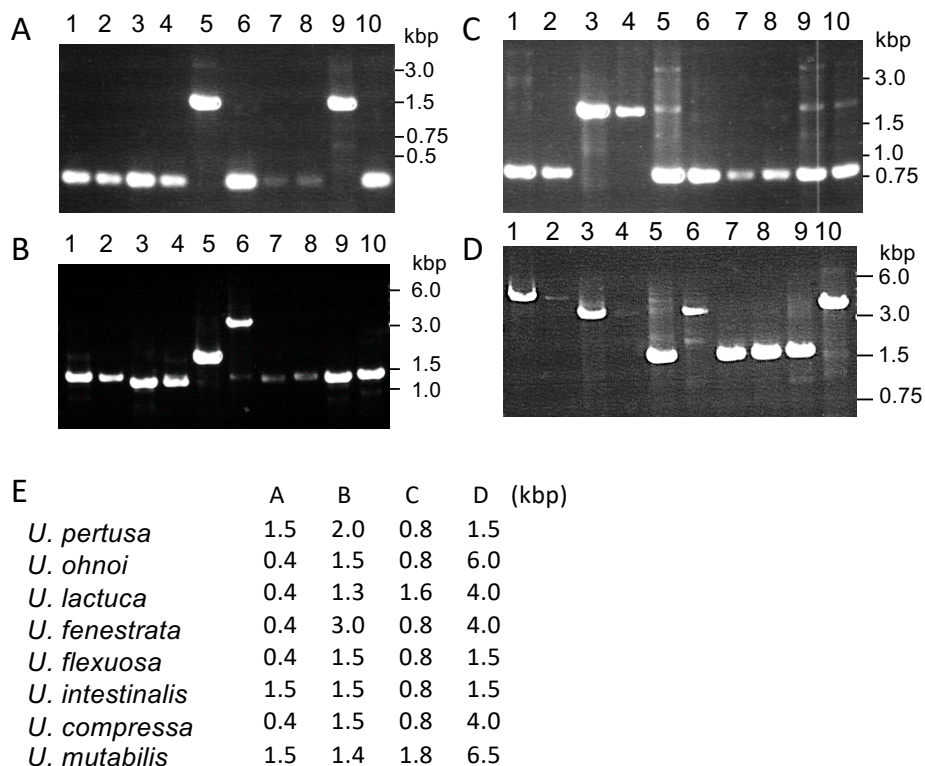


図 16 分子マーカーA~D を使用して得られた多型 DNA フラグメントの検出

パネル A~D は、それぞれ表 5 に示しているプライマーA~D を使用し、得られた PCR 増幅断片を示す。それぞれの電気泳動写真の上に記載されている数字は、アオサ類から調製された DNA サンプル、右側の数字は DNA 分子量マーカーのサイズを示している。E は、各分子マーカーを使用した結果をまとめたものである。各アオサ種の遺伝子診断を行ったときに得られた増幅断片のサイズ (kbp) を示す。

1: *U. ohnoi* (ミナミアオサ KU-1525)、2: *U. ohnoi* (ミナミアオサ KU-1529)、3: *U. lactuca* (リボンアオサ KU-1539)、4: *U. lactuca* (リボンアオサ KU-1540)、5: *U. pertusa* (アオサ KU-1658)、6: *U. fenestrata* (チシマアオサ KU-1603)、7: *U. flexuosa* (キヌイトアオノリ KU-1526)、8: *U. flexuosa* (キヌイトアオノリ KU-1532)、9: *U. intestinalis* (ボウアオノリ KU-1534)、10: *U. compressa* (ヒラアオノリ KU-1634) これらは神戸大学内海研究センターで独立して維持されている培養系統である。

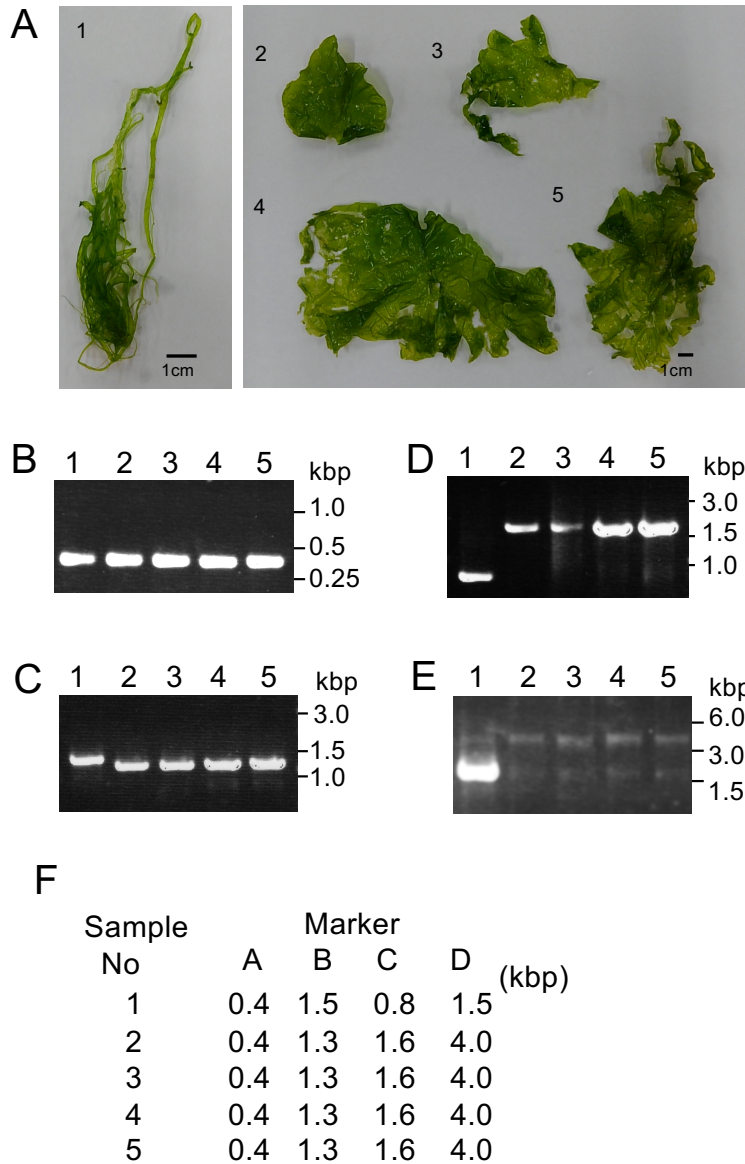


図 17 お台場海浜公園で採取したサンプルの分子マーカーによる検定

パネル B~D は、それぞれ表 5 に示した分子マーカー A~D を使用し、得られた DNA 増幅断片を示す。それぞれの電気泳動写真の上に記載されている数字は、パネル A に示しているアオサ類から調製された DNA サンプルを示す。右側の数字は DNA 分子量マーカーのサイズを示す。F はそれぞれのサンプルにおいて増幅された断片のサイズ (kbp) を示す。

5. 総合考察

本研究では、アオサ類の葉緑体ゲノムの多様性に基づき、アオサ類の種同定が可能な分子マーカーの構築を目指した。

そのために、まず *U. pertusa* (アナアオサ) の葉緑体ゲノムの全塩基配列を決定した (図 5、Acc no. LC507117)。アナアオサの葉緑体ゲノムには光合成に関わる遺伝子、転写翻訳に関わる遺伝子、rRNA、tRNA などの遺伝子がコードされていた (表 2)。これらの遺伝子は他のアオサ類の葉緑体ゲノムにもコードされており、構造的にもよく保存されていた (図 9、10)。しかし、*trnF(AAA)* はアナアオサと *U. mutabilis* で欠如しているという違いが見つかった (表 3、図 7、8)。アオサ類の葉緑体ゲノムの構造を比較した結果、アナアオサと *U. mutabilis* で *psbC* 遺伝子、*psbD* 遺伝子領域を含む 3 kbp 領域でのゲノムの再構成が起こっていた。また、アナアオサでは *psbB* 遺伝子から *rpl19* 遺伝子の間の約 25 kbp の領域、*trnE(UUC)* 周辺領域のそれぞれでゲノムの再構成が起こったと推測された (図 13)。

アオサ類葉緑体ゲノムの全塩基配列を用いた分子系統解析の結果、アナアオサと *U. mutabilis* は同じクレードに含まれていた (図 11)。アナアオサと *U. mutabilis* の 2 種で、*trnF(AAA)* の欠如や同様のゲノムの再構成が起こっていたことは、この系統解析の結果と合致している。つまり、他のアオサ種と分岐したのち、このアナアオサと *U. mutabilis* で *trnF(AAA)* の欠如、*psbD* 遺伝子領域を含む 3 kbp 領域のゲノム再構成が起こった。その後、アナアオサで、*psbB* 遺伝子から *rpl19* 遺伝子の間の約 25 kbp の領域と *trnE(UUC)* の周辺領域でゲノムの再構成が起こったのではないかと考えられる。本研究により、アオサ類の葉緑体ゲノムでゲノムの再構成が複数回起こっていたことが明らかとなり、その構造の多様性を明らかにすることができた。

東京湾のグリーンタイドは、主にアナアオサ、*U. ohnoi* (ミナミアオサ)、*U. lactuca* (リボンアオサ) の 3 種の混成である (石井 2011)。この 3 種は形態も似ており、形態的特徴から種同定は難しく、DNA を抽出し核ゲノムの ITS 領域や *rbcL* 遺伝子の塩基配列などを解析することで種同定が行われている。そのため、本研究によって明らかになったアオサ類の葉緑体ゲノム構造の多様性を活かし、東京湾でグリーンタイドを形成し、形態的特徴が似ているアナアオサ、リボンアオサ、ミナミアオサの種同定が可能な分子マーカーの作出を試みた。

イントロンを含む遺伝子の違い、遺伝子間領域の違いの両方の特徴を利用し、4種類の分子マーカーを作出し、それらを用いた遺伝子診断法を構築した。本研究で構築した分子マーカーセットは、塩基配列の保存性が高い場所に設計した。その結果、本研究で検討を行った8種類のアオサにおいて4種類の分子マーカーで増幅されるDNA断片長のパターンが種ごとに異なり、多型を示した。また、葉緑体ゲノムの配列情報が未知の種でも有用であることが示された(図16)。これらのことから、本研究において構築した分子マーカーセットを用いることで、塩基配列を解読することなく種同定が可能となることが示唆された。現在、グリーンタイドが発生した後でとることができる対策は物理的な除去が最も有効である。そのため、早期発見により早めの対策を講じられることは重要である。また、種同定が比較的簡便にできるようになることで、種ごとのアオサのモニタリングが容易になる。

日本では主に旧アオサ属だったアオサ種の異常増殖によるグリーンタイドの報告が多いが(平岡 2002, 石井 2011)、海外では旧アオノリ属だったアオサ類によるグリーンタイドも報告されている(Wichard *et al.* 2015)。東京湾でもいつ、新たな外来種の流入があるかわからない。しかし、形態的特徴が類似しているため、外来種の流入に気がつかない可能性がある。今回構築した分子マーカーセットを用い、今まで検出してきたものとは異なるDNA断片長の増幅が見られた場合、外来種や未知の種の早期検出が可能となる。早期発見が可能となれば、予防的措置を取ることの検討も可能となる。グリーンタイド発生後には有効な対策をとることが難しい中で、早期発見と外来種や未知の種に対して対策の検討ができることは重要である。

近年、アオサ属の海藻は遺伝子解析の結果の積み重ねにより、形態的特徴を用いた分類の見直しがされた。その結果、旧アオノリ属と旧アオサ属はアオサ属として統一された。遺伝子解析の結果、種のレベルでも同一種とされるものが多数出て、種名の見直しが続いている。*U. lactuca*(リボンアオサ)は日本で*U. fasciata*(リボンアオサ)と呼ばれていたものと同一種となった。ところが、日本で*U. lactuca*(オオバアオサ)と呼ばれていたものは*U. lactuca*(*U. fasciata*、リボンアオサ)と異なる形態的特徴を持っていた。遺伝子解析が行われることにより、*U. lactuca*(オオバアオサ)は*U. fenestrata*(チシマアオサ)と同一種であることがわかった(Hughey *et al.* 2019)。分子マーカーセットを用いた診断の結

果、*U. fasciata* (*U. lactuca*、リボンアオサ) と *U. lactuca* (*U. fenestrata*、チシマアオサ) の増幅される断片長には多型が見られた。増幅される DNA 断片長の違いから、この 2 種を見分けることができた (図 17)。*U. lactuca* という同じ種名でも国によって異なる種がその名前で呼ばれている場合、種名の見直しが行われた結果、同一種としてよいかという混乱が今後も起こる可能性がある。本研究で構築した分子マーカーは別の地域から採取された同一種で同じ結果を示す。今後、種の見直しに伴い混乱が生じた場合、同一種とされた種の検定にこの分子マーカーセットを用いることで、全葉緑体ゲノムを解読することなく同一種かどうかの判断を行う際にも貢献できる可能性が示唆された。

6. 材料および方法

・藻類と培養条件

U. pertusa (= *U. australis*, アナアオサ) および他のアオサ属の海藻は、神戸大学海藻類系統株コレクション (KU-MACC) から分譲いただいた。*U. pertusa* (= *U. australis*, アナアオサ) (KU-1658)、*U. ohnoi* (ミナミアオサ) (KU-1525、KU-1529)、*U. lactuca* (= *U. fasciata* リボンアオサ) (KU-1539、KU-1540)、*U. fenestrata* (チシマアナアオサ) (KU-1603)、*U. intestinalis* (ボウアオノリ) (KU-1534)、*U. compressa* (ヒラアオノリ) (KU-1634)、および *U. flexuosa* (キヌイトアオノリ) (KU-1526、KU-1532) は、0.5%KW21 (Daiichi Seimo Co., Ltd, Kumamoto, Japan) を含む海水 (ろ過、UV 滅菌、オートクレーブ) で 16/8 時間の明暗サイクル、18°C で培養した。

お台場海浜公園 (東京都港区) においては、海藻は、潜水調査により採取した。オートクレーブにて滅菌をした海水で表面を3回洗浄したのち、0.5%KW21 (Daiichi Seimo Co., Ltd, Kumamoto, Japan) を含む海水 (ろ過、UV滅菌、オートクレーブ) で16/8時間の明暗サイクル、18°Cで培養した。

・藻類サンプルからのDNAの調製

湿重量約100~150mgの藻体サンプルを細かく刻んで入れた2mlのエッペンドルフチューブにステンレスクラッシャーを入れ、電動破砕装置 (オートミル) (Tokken Inc., Kasiwa, Japan) で90秒間振盪 (1,200rpm) を2~3回することで藻体を破砕した。破砕後、葉緑体分離キット (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) を使用して葉緑体のみを抽出した。抽出した葉緑体から抽出バッファー溶液 (150 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.5 M NaCl, 40 mM EDTA, 2% SDS)、または RED Extract-N-Amp™ Plant PRC Kit (Merck, Darmstadt, Germany) を使用し葉緑体ゲノムを抽出、精製した。分子マーカーの検定に用いたDNAはQuick Extract™ DNA Extraction Solution (Lucigen, Middleton, WI, U.S.A)、またはRED Extract-N-Amp™ Plant PRC Kitを使用し調製した。

・PCR、およびDNA配列分析

調製した葉緑体ゲノムをPCRで増幅するプライマーは、*U. lactuca*の配列情報を参考に作製した (表1)。DNA断片はBlend Taq DNA polymerase (TOYOBO, Osaka, Japan) とKOD Fx Neo DNA polymerase (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いたPCRで増幅した。PCRは94°Cで2分間の初期変性、サイクリングは98°C、10秒間の熱変性、50°C~60°Cで30秒間のアニーリング、68°Cの伸長を35サイクル、68°Cで7分間の最終伸長を行った。増幅したDNA断片は0.8%アガロース

電気泳動で分離し、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて精製した。

TAクローニングは、TARget Clone™ (TOYOBO, Tokyo, Japan) を用い、pTA2 Vectorと増幅し精製したDNA断片のライゲーションをT4 DNA Ligaseを用いて行いクローニングした。大腸菌株DH5αからのプラスミドDNAの抽出は、Fast Gene™ Plasmid Mini Kit (NIPPON Genetics Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。

塩基配列の解読はABI 3730 XL自動シーケンサー (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用し、サンガー配列決定に基づく直接配列決定法により決定した。全葉緑体ゲノム配列の解読は、プライマーウォーキング法を用いた。プライマーウォーキング法により設計するプライマーは、前の解析で得られた配列データと 100 塩基の重複を目安に設計した。重複する部分が少ない場所にプライマーを設計した部分は、相補鎖解読用のプライマーを当該部分と重ならないような場所に設計し解読した。全配列を 3 回解読し、配列情報が異なった部分は再度解読を行い、頻度の高い塩基を採用した。合計 1027 の断片をつなぎ全塩基配列を決定した。

・葉緑体遺伝子の推定とマッピング

候補遺伝子は BLAST による相同性検索を行い決定した。tRNA 遺伝子は、tRNAscan-SE 2.0 (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) (Lowe and Chan 2016) を用いて決定した。*trnF(AAA)* 領域と *trnF(GAA)* は、CentroidFold (<http://rtools.cbrc.jp/centroidfold/>) (Hamada *et al.* 2009) と CentroidHomfold (<http://rtools.cbrc.jp/centroidhomfold/>) (Hamada *et al.* 2011) を用いて二次構造予測を行った。葉緑体ゲノム地図の作成及び推定遺伝子の確認は GeSeq (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/geseq.html>) (Tillich *et al.* 2017) を用いた。環状葉緑体ゲノムマップの描画は OGDRAW v1.3.1 (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/OGDraw.html>) (Greiner *et al.* 2019) を用いた。アノテーションされた塩基配列情報は、アクセッション番号 LC507117 で DDBJ に登録された。

・系統分析

アオサ種の塩基配列データセットは、GenBankデータベースから取得した。それらはMAFFT (Kato *et al.* 2005) を使用してアライメントを行ったのち、trimAl (Capella-Gutiérrez *et al.* 2009) にて 10%以上の配列でアライメントにギャップがある領域を除いた 79,426 塩基を系統分析に用いた。Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) X10.1 (Kumar *et al.* 2018) を使用してMaximum Likelihood法にて系統樹を構築した。Maximum Likelihood法による系統樹の作成はGeneral Time Reversible model (Felsenstein 1985, Nei and Kumar 2000) に

基づいて得られた 1,000 回のブートストラップで行った。

7. 参考文献

- Capella-Gutiérrez S., Silla-Martínez J. M., and Gabaldón T. (2009) trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*. **25**, 1972–1973 (DOI: 10.1093/bioinformatics/btp348)
- Clerck D.O., Kao S. M., Bogaert K. A., Blomme J., Foflonker F., Kwantes M., Vancaester E., Vanderstraeten L., Aydogdu E., Boesger J., Califano G., Charrier B., Clewes R., Del Cortona A., D'Hondt S., Fernandez-Pozo N., Gachon C. M., Hanikenne M., Lattermann L., Leliaert F., Liu X., Maggs C. A., Popper Z. A., Raven J. A., Bel M. V., Wilhelmsson P. K. I., Bhattacharya D., Coates J.C., Rensing S. A., Van Der Straeten D., Vardi A., Sterck L., Vandepoele K., Van de Peer Y., Wichard T., and Bothwell J. H. (2018) Insights into the Evolution of Multicellularity from the Sea Lettuce Genome *Current Biology*. **28**, 2921–2933 (DOI: 10.1016/j.cub.2018.08.015)
- Coates J. C., Umm-E-Aiman, and Charrier B. (2015) Understanding “green” multicellularity: do seaweeds hold the key. *Front. Plant Sci.* **5**, 737 (DOI: 10.3389/fpls.2014.00737)
- Couceiro L., Cremades J., and Barreiro R. (2011) Evidence for multiple introductions of the Pacific green alga *Ulva australis* Areschoug (Ulvales, Chlorophyta) to the Iberian Peninsula. *Bot. Marina*. **54**, 391–402 (DOI: 10.1515/bot.2011.044)
- Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. **39**, 783–791. (DOI: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x.)
- 藤井暁彦, 道山晶子, 横山佳裕, 関根雅彦. (2009) アサリ資源の保全のための効率的なアオサ回収方法の検証 *水環境学会誌*, **32**, 5, p273-280 (DOI: 10.2965/jswe.32.273)
- Greiner S., Lehwark P., and Bock R. (2019) OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. *Nucl. Acids Res.* **47**, W59–W64 (DOI:

10.1093/nar/gkz238)

- Guidone M., Thornber C., Wysor B., and O'Kelly C. J. (2013) Molecular and morphological diversity of Narragansett Bay (RI, USA) *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) populations. *J. Phycol.* **49**, 979–995 (DOI: 10.1111/jpy.12108)
- Hanyuda T., and Kawai H. (2018) Genetic examination of the type specimen of *Ulva australis* suggests that it was introduced to Australia. *Phycological Res.* **66**, 238–241 (DOI: 10.1111/pre.1222)
- Hamada M., Kiryu H., Sato K., Mitsuyama T., Asai K. (2009) Prediction of RNA secondary structure using generalized centroid estimators. *Bioinformatics.* **25**, 4, 465-473 (DOI: 10.1093/bioinformatics/btn601)
- Hamada M., Yamasa K., Sato K., Martin C. F., Asai K. (2011) CentroidHomfold-LAST: accurate prediction of RNA secondary structure using automatically collected homologous sequences. *Nucleic Acids Res.* **39**, W100-106 (DOI: 10.1093/nar/gkr290)
- Hayden H.S., Blomster J., Maggs C.A., Silva P.C., Stanhope M.J., and Waaland J.R. (2003) Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. *Eur. J. Phycol.* **38**, 277–294 (DOI: 10.1080/1364253031000136321)
- 平岡雅規, 嵩田智, 吉田吾郎. (2002) グリーンタイド. 堀輝三, 大野正夫, 堀口健雄編「21世紀初頭の藻学の現況」, 日本藻類学会. 山形, p98-101
- Hiratsuka J., Shimada H., Whittier R., Ishibashi T., Sakamoto M., Mori M., Kondo C., Honji Y., Sun C. R., Meng B. Y., Li Y.-Q., Kanno A., Nishizawa Y., Hirai A., Shinozaki K., and Sugiura M. (1989) The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: Intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.* **217**, 185–194 (DOI: 10.1007/bf02464880)
- Hughey J. R., Maggs C. A., Mineur F., Jarvis C., Miller K. A., Shabaka S. H., and Gabrielson P. W. (2019) Genetic analysis of the Linnaean *Ulva lactuca* (Ulvales,

Chlorophyta) holotype and related type specimens reveals name misapplications, unexpected origins, and new synonymies. *J. Phycol.* **55**, 503–508 (DOI: 10.1111/jpy.12860)

Ichihara K., Suzuki R., Yamazaki T, Ota S., Mogi Y., Kagami Y., Kuwano K., and Kawano S. (2015) *Ulva partita* sp. nov., a novel enteromorpha-like *Ulva* species from Japanese coastal areas. *Cytologia.* **80**, 261–270 (DOI: 10.1508/cytologia.80.261)

石井裕一 (2011) 海藻がもたらす環境問題—グリーンタイドの発生と構成種の特徴 国立極地研究所ニュース. 2010年度, 29, 6, p7-9

Katoh K., Kuma K., Toh H., and Miyata T. (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucl. Acids Res.* **33**, 511–518 (DOI: 10.1093/nar/gki198)

Kawai H., Shimada S., Hanyuda T., Suzuki T., and Gamagori City Office (2007) Species diversity and seasonal changes of dominant *Ulva* species (Ulvales, Ulvophyceae) in Mikawa Bay, Japan, deduced from ITS2 rDNA region sequences. *Algae.* **22**, 221–228 (DOI: 10.4490/algae.2007.22.3.221)

光合成事典 アオサ藻. 日本光合成学会編. 光合成事典. (2015)
<http://photosyn.jp/pwiki/index.php?アオサ藻>

Kraft L. G. K, Kraft G. T., and Waller R. F. (2010) Investigations into southern Australian *Ulva* (Ulvophyceae, Chlorophyta) taxonomy and molecular phylogeny indicate both cosmopolitanism and endemic cryptic species. *J. Phycol.* **46**, 1257–1277 (DOI: 10.1111/j.1529-8817.2010.00909.x)

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evolution.* **35**, 1547–1549 (DOI: 10.1093/molbev/msy096)

Leliaert F., Smith D. R., Moreau H., Herron M, D., Verbruggen H., Delwiche C. F., and Clerck O. D. (2012) Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Crit. Rev. Plant Sci.* **31**, 1–46 (DOI: 10.1080/07352689.2011.615705)

- Lowe T. M., and Chan P. P. (2016) tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. *Nucl. Acids Res.* **44**, W54–57 (DOI: 10.1093/nar/gkw413)
- Malta E. J., Draisma S. G. A., and Kamermans P. (1999) Free-floating *Ulva* in the southwest Netherlands: species or morphotypes? A morphological, molecular and ecological comparison. *Eur. J. Phycol.* **34**, 443–454 (DOI: 10.1080/09541449910001718801)
- Marshall K., Joint I., Callow M. E., Callow J. A. (2006) Effect of Marine Bacterial Isolates on the Growth and Morphology of Axenic Plantlets of the Green Alga *Ulva linza*. *Microb Ecol.* **52**, 2, 302-310 (DOI: 10.1007/s00248-006-9060-x)
- Matsumoto K., and Shimada S. (2014) Systematics of green algae resembling *Ulva conglobata*, with a description of *Ulva adhaerens* sp. nov. (Ulvales, Ulvophyceae) *Eur. J. Phycol.* **50**, 1, 100-111 (DOI: 10.1080/09670262.2014.994189)
- Nei M., and Kumar S. (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Shimada S., Hiraoka M., Nabata S., Ima M., and Masuda M. (2003) Molecular phylogenetic analyses of the Japanese *Ulva* and *Enteromorpha* (Ulvales, Ulvophyceae), with special reference to the free-floating *Ulva*. *Phycol. Res.* **51**, 99–108 (DOI: 10.1046/j.1440-1835.2003.00296.x)
- Shinozaki K., Ohme, M., Tanaka M., Wakasugi T., Hayashida N., Matsubayashi T., Zaita N., Chunwongse J., Obokata J., Yamaguchi-Shinozaki K., Ohto C., Torazawa K., Meng B. Y., Sugita M., Deno H., Kamogashira T., Yamada K., Kusuda J., Takaiwa F., Kato A., Tohdoh N., Shimada H., and Sugiura M. (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* **5**, 2043–2049 (DOI: 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04464.x)
- Spoerner M., Wichard T., Bachhuber T., Stratmann J., and Oertel W. (2012)

- Growth and thallus morphogenesis of *Ulva mutabilis* (Chlorophyta) depends on a combination of two bacterial species excreting regulatory factors. *J Phycol.* **48**, 1433–1447 (DOI: 10.1111/j.1529-8817.2012.01231.x)
- Tan I. H., Blomster J., Hansen G., Leskinen E., Maggs C. A., Mann D. G., Sluiman H. J., and Stanhope M. J. (1999) Molecular phylogenetic evidence for a reversible morphogenetic switch controlling the gross morphology of two common genera of green seaweeds, *Ulva* and *Enteromorpha*. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 1011–1018 (DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026190)
- Tillich M., Lehwark P., Pellizzer T., Ulbricht-Jones E. S., Fischer A, Bock R., and Greiner S. (2017) GeSeq—versatile and accurate annotation of organelle genomes. *Nucl. Acids Res.* **45**, W6-W11 (DOI: 10.1093/nar/gkx391)
- Turmel M., Otis M., and Lemieux M. (2017) Divergent copies of the large inverted repeat in the chloroplast genomes of ulvophycean green algae. *Sci Rep.* **7**, 994 (DOI: 10.1038/s41598-017-01144-1)
- 梅園和彦 (1987) 植物葉緑体ゲノムの遺伝子構成 生物物理 27 卷 3 号 p101-105 (DOI: 10.2142/biophys.27.101)
- Wichard T., Charrier B., Mineur F., Bothwell J. H., Clerck O. D., and Coates J. C. (2015) The green seaweed *Ulva*, a model system to study morphogenesis. *Front. Plant Sci.* **6**, 72 (DOI: 10.3389/fpls.2015.00072)
- Ye N., Zhang X., Mao-Y., Liang C., Xu D., Zou J., Zhuang Z., Wang Q. (2011) ‘Green tides’ are overwhelming the coastline of our blue planet: taking the world’s largest example. *Ecol. Res.*, **26**, 477-485 (DOI: 10.1007/s11284-011-0821-8)
- Zertuche-González J. A., Camacho-Ibar V. F., Pacheco-Ruiz I., Cabello-Pasini A., Galindo-Bect L. A., Guzmán-Calderón J. M., Macias-Carranza V., and Espinoza-Avalos J. (2009) The role of *Ulva* spp. as a temporary nutrient sink in a coastal lagoon with oyster cultivation and upwelling influence. *J. Appl. Phycol.* **21**, 729–736 (DOI: 10.1007/s10811-009-9408-y)

記事

Holidaymakers warned about toxic algae on French beaches after two deaths in a week (The Daily Telegraph, 2019 July 14)

<https://www.telegraph.co.uk/news/2019/07/14/holidaymakers-warned-toxic-sea-lettuce-french-beaches-two-deaths/>

Tourists heading to France are warned to avoid toxic sea lettuce which is feared to have KILLED two men in last few days (Daily mail online, 2019 July 15)

<https://www.dailymail.co.uk/news/article-7248143/Tourists-heading-France-warned-avoid-toxic-sea-lettuce.html>

SEA OF SLUDGE the toxic algae swamping Brittany's beaches (France 24, 2019 July 22)

<https://webdoc.france24.com/algae-beaches-france-saint-brieuc-farming/>

Toxic algae: two deaths at French beaches (THE WEEK, 2019 July 15)

<https://www.theweek.co.uk/102263/holidaymakers-warned-about-toxic-algae-on-french-beaches>

8. 主論文を構成する論文

Mitsuhashi C., Teramura H., Shimada H. Construction of genomic marker sets based on the chloroplast genome of a green alga, *Ulva pertusa* (syn.*Ulva australis*), leads to simple detection of *Ulva* species. Genes Genet Syst. (In press)

9. 謝辞

本研究を行うにあたり多大なるご指導・ご鞭撻を賜りました東京理科大学 基礎工学部生物工学科 島田浩章教授に深く感謝いたします。

研究を行う中で多くの助言をいただいた寺村浩助教に深く感謝いたします。解析に使用する海藻を分譲くださった神戸大学 (KU-MACC) 川井浩史教授、秋田晋吾研究員に深く感謝いたします。

海藻の培養に使用する海水を分譲千葉県水産総合研究センター東京湾漁業研究所 深山義文様、吉満友野様に深く感謝いたします。

研究室の皆様をはじめ、本研究を遂行するにあたって大変お世話になりました皆様方に、この場を借りて深く御礼申し上げます。