

氏名（本籍） ^{みつはし} ^ち ^さ 三ツ橋 知 沙（東京都）
学位の種類 博士（工学）
学位記番号 甲第 1067 号
学位授与の日付 2020 年 3 月 17 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目 **アオサ類葉緑体ゲノムの解析と分子マーカーの
作出**

論文審査委員 （主査）教授 島田 浩章
教授 清水 公德 教授 田村 浩二
准教授 宮川 信一 教授 武村 政春

論文内容の要旨

1. 序論

アオサは世界各地の内湾の沿岸域で生育が観察されてい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。アオサは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もある。近年、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することや、完全な形態をとるために着床する微生物の影響を受けることなども知られている。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。これらのことから、単細胞生物から多細胞生物への進化の過程を解明するために有用な生物種である。形態学的多様性、発生などの研究においても興味深い材料であるが、このようなアオサ類の特異な形質は形態学的な特徴から種同定をすることを難しくしている。

すでに核ゲノムの転写スペーサー領域（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、これまでは形態学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*（アオアオサ）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。また、*Ulva fasciata* と *Ulva lactuca* は同一種とされた。さらに、*Ulva*

armoricana と *Ulva scandinavica*、*Ulva rigida* は区別がつかず、同一種ではないかという提案がされている。

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間で 10Kbp 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、*U. pertusa* 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. pertusa*)、リボンアオサ (*U. lactuca*)、ミナミアオサ (*U. ohnoi*) などの形態的特徴が似ている *Ulva* 種を特定するための分子マーカーを構築した。

2. アナアオサ (*U. pertusa*) の葉緑体ゲノムの特徴

U. pertusa 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 102,899bp であり、*U. ohnoi* (103,313 bp)、*U. lactuca* (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。*U. pertusa* 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、*U. pertusa* 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、*U. pertusa* 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、*U. pertusa* 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。

3. 他のアオサ類の葉緑体ゲノムとの比較

全葉緑体ゲノム配列を用いてアオサ類の進化系統樹を作成し、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 *U. pertusa* と同様のレタス状の形態を示す *U. ohnoi*、*U. lactuca* が異なるクレードに位置することがわかった。また、*U. pertusa* は遺伝的に *U. mutabilis* と最も近いこと、*U. flexousa* 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。*U. pertusa* 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と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、*U. pertusa* 葉緑体ゲノムでは psbB 遺伝子と rp119 遺伝子の間にある 25 kb 領域が逆転していた。また、psbD と psbC を含む 3 kb の領域は、*U. pertusa* と *U. mutabilis* では反転していることがわかった。これらのことから、ゲノムの再編成が *U. pertusa* および *U. mutabilis* 葉緑体ゲノムで起こったことが示唆された。

4. アオサ類の個別認識が可能な遺伝子マーカーの作成と評価

アオサ類の葉緑体ゲノムでは、遺伝子間領域および遺伝子に含まれるイントロンの塩基配列に多型が多く認められた。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 つの遺伝子マーカーを設定した。これらの遺伝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 *U. ohnoi*、*U. lactuca*、*U. pertusa* の 3 種類のアオサ類の種の同定が可能であった。さらに作成した遺伝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 *U. fenestrata*、チューブ状の形態を示す *U. flexousa*、*U. compressa*、*U. intestinalis* の 4 種類のアオサ類より調製した DNA についてこれらの遺伝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。

5. 考察

本研究では、ゲノム配列が未同定だったアナアオサ (*U. pertusa*) 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。16SrRNA 遺伝子を用いた系統樹解析では、*U. pertusa* 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、*U. pertusa* では 25 Kb に及ぶ領域でのゲノムの反転が起こっており、さらに *U. pertusa* と近縁の *U. mutabilis* の葉緑体ゲノムで 3 Kb の領域の反転が認められた。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遺伝子マーカーを設定した。その結果、これらの遺伝子マーカーを用いた 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。

論文審査の結果の要旨

本論文では、アオサ類の遺伝的多様性に関する研究について審査を行った。

アオサは世界各地の内湾の沿岸域で生育が観察されている緑藻である。アオサは藻場を形成し、沿岸域の生態系を支える重要な生物種である。アオサ類は形態の変化が大きく、着床する微生物の影響を強く受けることが知られており、単純な多細胞藻類であるにも関わらず、形態学的・細胞学的多様性に富む。形態学的多様性、発生などの研究においても興味深い材料であるが、最近、チューブ状の構造であるアオノリ類が、レタス状の形態を示すアオサ類と同じアオサ属に分類されるようになるなど、種の分類が困難な藻類でもある。近年は、核ゲノムの塩基配列を調べて、塩基配列の違いにより種の同定がなされるようになってきた。これにより、これまでは形態学的特徴から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、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。また、*Ulva fasciata* と *Ulva lactuca* は同一種とされた。さらに、*Ulva armoricana* と *Ulva scandinavica*、*Ulva rigida* は区別がつかず、同一種ではないかという提案がされている。

ところで、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間で 10 kb 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、この多様性に基ついた種の同定が可能であると考えられた。

本研究では、アナアオサの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. pertusa*)、リボンアオサ (*U. lactuca*)、ミナミアオサ (*U. ohnoi*) などの形態的特徴が似ている *Ulva* 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。このゲノムの全長は 102,899 bp であり、既に報告されているミナミアオサ (103,313 bp)、リボンアオサ (96,005 bp) など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。一方、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、他のアオサ類に存在する *trnF*(AAA) は見つからなかった。*trnF* (AAA) の当該領域には、これと部分的に類似性を示す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、アナアオサでは変異が生じたのではないかと考えられた。

アオサ類の進化系統樹を作成し、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* と最も近く、同様のレタス状の形態を示す *U. ohnoi*, *U. lactuca* が遺伝的に遠いこと、*U. flexouosa* などのアオノリ類と遺伝的に近いことがわかった。また、アナアオサ葉緑体ゲノムは他のアオサ類の葉緑体ゲノムと構造的な違いが見つかった。

アオサ類の葉緑体ゲノムでは、遺伝子間領域および遺伝子に含まれるイントロンの塩基配列に多型が多く認められた。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 つの遺伝子マーカーを設定した。これらの遺伝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、形態的特徴からだけでは種同定が難しいアオサ類の種の同定が可能となった。

本研究では、ゲノム配列が未同定だったアナアオサ(*U. pertusa*)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。得られたデータを元にした系統樹解析では、*U. pertusa* 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、*U. pertusa* では 25 kb に及ぶ領域でのゲノムの反転が起こっており、さらに *U. pertusa* と近縁の *U. mutabilis* の葉緑体ゲノムで 3 kb の領域の反転が認められた。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遺伝子マーカーを設定した。その結果、これらの遺伝子マーカーを用いた 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。

今回得られた結果は、アオサ類緑藻の遺伝的多様性についての基礎的な研究成果であるが、この結果はこれまで種の同定が困難であった形態的に類似しているアオサの種同定を容易にするものである。これにより海洋環境に悪影響を及ぼす藻類の異常繁茂などに速やかに対応できるようになると期待される応用的価値の高い重要な研究成果であるといえる。したがって本論文は博士（工学）の学位論文として充分価値のあるものと認められる。