

新規クロレラ様緑藻 TH2-565 株の系統的 position について

小野寺 智香 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 石田 健一郎 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

クロレラ (広義) は球形の単細胞緑藻で、健康食品や養殖業における稚魚の餌となるワムシの餌など、産業分野でよく利用されている⁽¹⁾。

1890年に Beijerinck によって *Chlorella vulgaris* をタイプ種として *Chlorella* 属が設立されて以来、*Chlorella* 属には形態学的な特徴から 100 以上の球形の微細緑藻が記載されたが、それらは形態学的な差異に乏しく、また有性生殖を行わないため、分類は困難を極めた。後に 18S rRNA、ITS 領域による分子系統解析によってそれまでの *Chlorella* 属が多系統であったことが判明し、現在まで属の再編が進められ多くの種が別属に移されてきた。このように別属に移されたものも含め、直径 5 μm 前後で細胞装飾を持たず、カップ状でピレノイドを有する葉緑体を持つ、ピレノイドに 2 重のチラコイド膜が陥入し、自生孢子による無性生殖で繁殖するといった特徴を持つ単細胞球形緑藻は、まとめて便宜的に“クロレラ様緑藻 (クロレラ型緑藻あるいは広義のクロレラ)”と呼ばれている。一方で狭義の *Chlorella* 属に極めて近縁であるが、群体を形成したり細胞表面に多数の棘を持つ緑藻も知られている⁽²⁾。

今回研究対象とした TH2-565 株は、2015 年に鈴木大智氏によって確立されたクロレラ様緑藻の培養株である。滝沢幸史氏によって、本藻の応用利用の可能性を探る研究が進行中である。本藻の系統的 position については、18S rRNA 遺伝子による分子系統解析によって *C. vulgaris* に近縁であることが示唆されている (滝沢私信) が、*C. vulgaris* に近縁な、様々なクロレラ様緑藻が解析に含まれていなかったため、詳しい系統的 position については分かっていなかった。よって、本研究では ITS 領域を用いた分子系統解析を行い、TH2-565 株のより詳しい系統的 position を明らかにすることを目的とした。また、それに並行して本藻の形態観察も行った。

【方法と結果】

① ITS1-5.8S-ITS2 領域の配列取得

TH2-565 株のゲノム DNA は当研究室の滝沢氏から提供いただいた。この DNA を鋳型とし、TaKaRa Ex taq[®] を使用して ITS1-5.8S-ITS2 領域の DNA 断片を PCR によって増幅させた。プライマーは SR10 と LR3 を使用した。PCR 産物を電気泳動した結果、一本のバンドが確認された。QIAquick Gel Extraction Kit を使用して増幅産物を精製した。

BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を使用して精製した DNA 断片の配列を決定した。プライマーは dITS-F、dITS-R、SR10、LR3 と今回のシーケンスのために設計した FIG911 を使用した。最終的に全長 1785 bp の ITS1-5.8S-ITS2 領域の配列を決定した。

② 分子系統解析

TH2-565 株および *Chlorella* 属を含む近縁属の ITS1-5.8S-ITS2 領域 (全 85 OTU) を用いて最尤法により分子系統解析を行い、系統樹を作成した。

その結果 TH2-565 株は、*Chlorella* 属に近縁で主に *Micractinium* 属の種で構成される *Micractinium* クレードの中で独立した枝に位置した。

③ 形態観察

光学顕微鏡の形態観察の結果、TH2-565 株は球形の緑色細胞で、直径 2.1-6.2 μm (平均 3 μm)、群体形成は観察されず常に単細胞であった。細胞はカップ状の葉緑体を持つ、葉緑体内にはピレノイドが存在した。また、一部の細胞で細胞の周りに多数の棘が観察された。

【考察と展望】

ITS1-5.8S-ITS2 領域を用いた詳しい分子系統解析により、TH2-565 株は *Micractinium* クレードに含まれることが高い統計的支持により示された。形態観察から、*Micractinium* 属の多くの種で知られている細胞の周りに多数の棘を形成する特徴を本株も有することが示された。以上の結果から、本株は *Micractinium* 属の一員であると結論できる。

TH2-565 株は、光学顕微鏡レベルの形態観察および ITS 領域を用いた分子系統解析において、既知種との明らかな近縁性は示されず、*Micractinium* クレード内で独立した枝に位置したことから、*Micractinium* 属の未記載種である可能性がある。現在 *Micractinium* 属は、主に遺伝的な特徴 (ITS-2 の二次構造) によって種が区別されている^(3,4)。

現時点で TH2-565 株は微細構造と ITS-2 の二次構造の情報が欠いており、種レベルの分類学的な位置について結論を出すことはできない。今後、TH2-565 株の微細構造及び ITS-2 の二次構造を明らかにし、既知種と比較する必要がある。

【参考文献】

1. クロレラ工業株式会社 <https://www.chlorella.co.jp/>
2. 保科亮 (2017) クロレラ分類の現在 藻類 第 65 巻 第 2 号 p115,116
3. Hoshina *et al.* (2010) *Chlorella variabilis* and *Micractinium reisseri* sp. nov. (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae): Redescription of the endosymbiotic green algae of *Paramecium bursaria* (Peniculia, Oligohymenophorea) in the 120th year *Phycological Research* 58: 188-201.
4. Hyunsik *et al.* (2019) Morphology and phylogenetic relationships of *Micractinium* (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae) taxa, including three new species from Antarctica *Algae* 34: 267-275.