

藻類学最前線



仲田崇志：トゲと群体とクロレラの分類

広義のクロレラ属 (*Chlorella*: *Ch.*) は細胞が球形の単細胞性緑藻類で、平滑な細胞壁を持つこと、自生孢子形成により増殖することなどが特徴である。かつては100種以上がクロレラ属の下に記載されたが、分類学的な見直しが進み、現在では単系統群を構成する3種 (*Ch. vulgaris*, *Ch. lobophora*, *Ch. sorokiniana*) のみが狭義のクロレラ属として認められている (Huss *et al.* 1999, Krienitz *et al.* 2004)。また他のクロレラ様藻類の多くは、これまでに新属ないし以前に記載されていた独立属に再整理されている (表1)。狭義のクロレラ属はトレボウクシア藻綱に属し、クロレラ系統群 (*Chlorella*-clade) に含まれる (Krienitz *et al.* 2004)。Krienitz *et al.* (2004) の系統樹では、クロレラ系統群にクロレラ属 (図1A) と、群体性で細胞壁に刺状突起 (bristles) を持つミクラクティニウム属 (*Micractinium*: *Mic.*, 図1B), 粘質鞘の中に群体を作るディクティオスファエリウム属 (*Dictyosphaerium*: *Dict.*, 図1H), 紡錘形の細胞が定数群体を形成するアクティナストルム属 (*Actinastrum*, 図1C), 刺状突起を有する単細胞性のディアカントス属 (*Diacanthos*), 定数群体性で一部の種が刺状突起を持つディディモゲネス属 (*Didymogenes*: *Did.*, 図1D) が含まれ、後に単細胞性でピレノイドを欠くマイヤレラ属 (*Meyerella*, 図1E) も加えられた (Fawley *et al.* 2005)。このように

クロレラ系統群には刺状突起や群体、粘質鞘をもつ藻類が混在しており、その進化過程については明らかではなかった。しかし最近になってクロレラ系統群の形態進化と分類学的見直しが進められている。そこでここでは Pröschold *et al.* (2010), Krienitz *et al.* (2010), Luo *et al.* (2010) を中心に研究の進展を紹介したい。

刺状突起の系統分布

Pröschold *et al.* (2010) は刺状突起の進化的起源に着目し、クロレラ系統群の系統解析を行った。彼らはリボソーム小サブユニット RNA 遺伝子 (SSU rDNA) の配列と ITS 領域の配列 (ITS-1 および ITS-2 rDNA) を用いて系統解析を行い、刺状突起を形成する種が多系統的に分布することを明らかにした (図2)。細胞の両端に刺状突起を持つディアカントス属 (*Diacanthos belenophorus* のみ) はミクラクティニウム属 (放射状に刺状突起を持つ) のタイプ種 *Mic. pusillum* と姉妹群になりミクラクティニウム属にまとめられた (*Mic. belenophorum*) が、*Mic. parvulum* は *Mic. pusillum* と系統的に離れており、新属ヘゲワルディア属 (*Hegewaldia*) に移された (*H. parvula*)。またディディモゲネス属も系統的にミクラクティニウム属やヘゲワルディア属とは離れていた。

表1 トレボウクシア藻綱に属する主なクロレラ様藻類と現在の分類 この他幾つかのクロレラ様藻類は緑藻綱に属することが知られている (Huss *et al.* 1999)。

現在の分類	主なシノニム	主な参考文献
<i>Chlorella vulgaris</i>		Huss <i>et al.</i> (1999)
<i>Chlorella lobophora</i>		Huss <i>et al.</i> (1999)
<i>Chlorella sorokiniana</i>		Huss <i>et al.</i> (1999)
<i>Auxenchlorella protothecoides</i>	<i>Chlorella protothecoides</i>	Huss <i>et al.</i> (1999)
<i>Parachlorella beijerinckii</i>		Krienitz <i>et al.</i> (2004)
<i>Parachlorella kessleri</i>	<i>Chlorella kessleri</i>	Krienitz <i>et al.</i> (2004)
<i>Heveochlorella hainangensis</i>		Zhang <i>et al.</i> (2008)
<i>Kalinella bambusicola</i>		Neustupa <i>et al.</i> (2009)
<i>Heterochlorella luteoviridis</i>	<i>Chlorella luteoviridis</i>	Neustupa <i>et al.</i> (2009)
<i>Chloroidium saccharophilum</i>	<i>Chlorella saccharophila</i> <i>Pseudochlorella aquatica</i>	Darienko <i>et al.</i> (2010)
<i>Chloroidium ellipsoideum</i>	<i>Chlorella ellipsoidea</i> <i>Chlorella trebouxioides</i>	Darienko <i>et al.</i> (2010)
<i>Chloroidium engadinensis</i>	<i>Chlorocloster engadinensis</i>	Darienko <i>et al.</i> (2010)
<i>Chloroidium angusto-ellipsoideum</i>	<i>Chlorella angusto-ellipsoideum</i>	Darienko <i>et al.</i> (2010)
<i>Pseudochlorella pyrenoidosa</i>		Darienko <i>et al.</i> (2010)
<i>Pseudochlorella subsphaerica</i>		Darienko <i>et al.</i> (2010)
<i>Pseudochlorella pringsheimii</i>	<i>Chlorella pringsheimii</i> "Chlorella ellipsoidea"	Darienko <i>et al.</i> (2010)
未定	<i>Chlorella mirabilis</i>	Huss <i>et al.</i> (1999)

刺状突起が多系統的に分布することは、ディディモゲネス属とヘゲワルディア属が属内に刺状突起を形成する種としない種を含んでいることから支持された。例えばディディモゲネス属の *Did. anomala* は恒常的に刺状突起を形成するにもかかわらず、タイプ種の *Did. palatina* は刺状突起を形成しない。しかし Luo *et al.* (2006) によれば、ミクラクティニウム属の刺状突起は捕食者によって誘導され、純粋培養下では失われる。これを踏まえると、刺状突起を形成しないとされる種（場合によっては属）の中にも、培養条件を変えたときに刺状突起を形成する種が含まれているかもしれない。

粘質鞘と群体性の系統分布

Krienitz *et al.* (2010) は刺状突起の形成と同様に、粘質鞘に包まれた群体形成について多系統性を検証した。ディクティオスファエリウム属は細胞が多量の粘液質を分泌し、その中で細胞が残存した母細胞壁に繋がれた群体を形成する (図 1H)。既に SSU rDNA の系統解析からディクティオスファエリウム属の一種 *Dict. pusillum* とされた株がクロレラ系統群に属することが示されていたが (Krienitz *et al.* 2004), Krienitz *et al.* (2010) はタイプ種の *Dict. ehrenbergianum* を含めた 16 株について SSU および ITS rDNA の系統解

析を行った。その結果, *Dict. pusillum* とされた株を含む 5 株が狭義のクロレラ属に含まれたのに対して, *Dict. ehrenbergianum* を含んだ 11 株はクロレラ系統群と近縁なパラクロレラ系統群 (*Parachlorella*-clade) に含まれた (図 2)。パラクロレラ系統群にはクロレラ属から独立の新属に分けられたパラクロレラ属 (*Parachlorella*, 図 1G) の他, 針状の細胞を持つ単細胞性のクロステリオプシス属 (*Closteriopsis*, 図 1I) と紡錘形の細胞が定数群体を形成するディクロスター属 (*Diclostera*, 図 1J) が含まれる。ディクティオスファエリウム属はクロレラ属の中でも, パラクロレラ系統群の中でも単系統にはならない。特にパラクロレラ系統群ではディクティオスファエリウム属が祖先的な側系統群を形成し, そこからパラクロレラ属と, クロステリオプシス属とディクロスター属 (互いに姉妹群となる) が派生したように見える。

「遺伝的特徴」に基づく分類

Pröschold *et al.* (2010) および Krienitz *et al.* (2010) の研究は, 刺状突起の形成や群体, 粘質鞘の形成が属の識別形質として有用ではないことを示唆している。例えば狭義のクロレラ属の中には粘質鞘を形成するものとししないものが含まれる。また一般に刺状突起の形成能を持つミクラクティニウム属にも, 刺状突起を形成しない株が見つかってきた。そこで Luo *et al.* (2010) はクロレラ系統群の属分類を再整理するため, 形態形質に代えて機能性 RNA 分子の二次構造に見

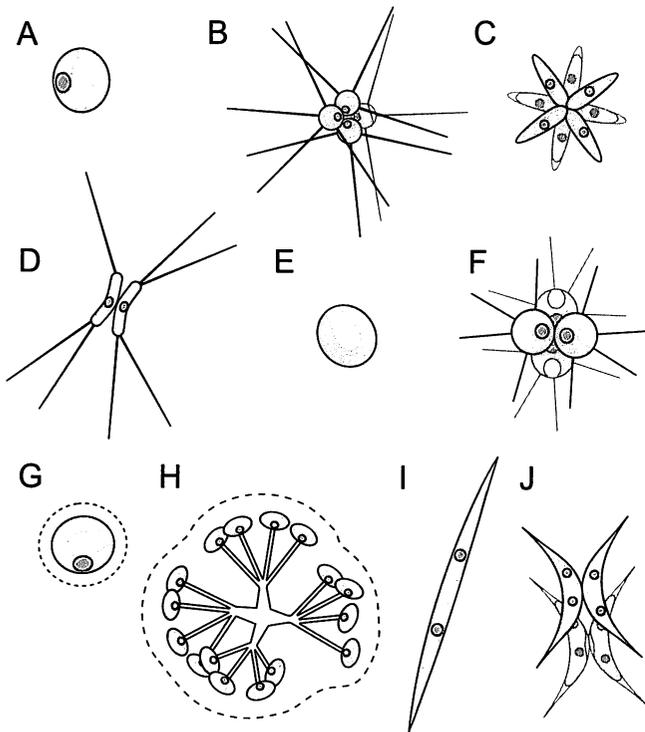


図1 クロレラ系統群およびパラクロレラ系統群の藻類
A. クロレラ属 (*Chlorella*), B. ミクラクティニウム属 (*Micractinium*), C. アクティナストルム属 (*Actinastrum*), D. ディディモゲネス属 (*Didymogenes*), E. マイヤレラ属 (*Meyerella*), F. ヘゲワルディア属 (*Hegewaldia*), G. パラクロレラ属 (*Parachlorella*), H. ディクティオスファエリウム属 (*Dictyosphaerium*), I. クロステリオプシス属 (*Closteriopsis*), J. ディクロスター属 (*Diclostera*).

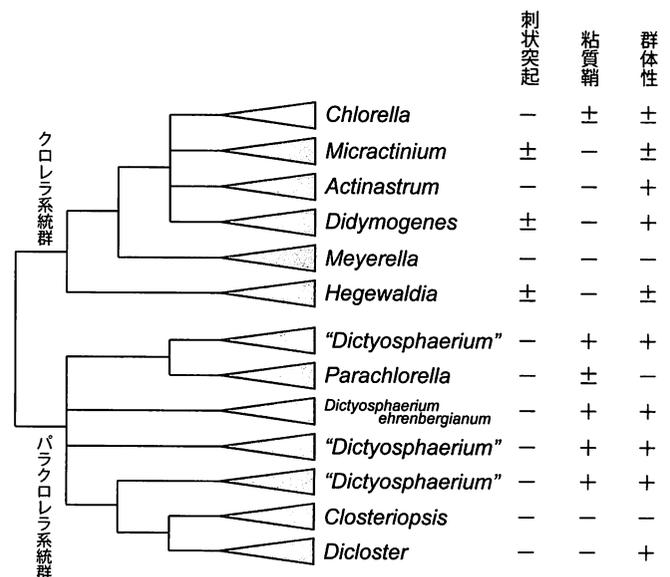


図2 クロレラ系統群およびパラクロレラ系統群の系統樹
Pröschold *et al.* (2010), Luo *et al.* (2010), Krienitz *et al.* (2010) による系統樹と形質情報を基に作成した。事後確率 0.95 未満の枝や論文間で矛盾する枝は多分岐として扱った。刺状突起, 粘質鞘, 群体形成の有無は+, -で示し, 同属内で種ごとに形質が異なる場合は±で示した。

られる「遺伝的特徴」(“genetic signatures”)を探索した。

遺伝的特徴として Luo *et al.* (2010) は非同形的共有派生形質 (NHS: non-homoplasious synapomorphy) と相補的塩基置換 (CBC: compensatory base change) に着目した。NHS とは着目する生物群の中で、特定の単系統群にのみ認められる変異のことで (Marin *et al.* 2003), CBC とは機能性 RNA が二次構造を取ったときに、ステム領域の塩基対に起きる塩基置換のうち、塩基対を崩さないような置換のことである (例えば A-U から G-C への置換, Coleman 2000)。また A-U から G-U (ゆらぎ塩基対) への置換のような、片側だけの CBC は hemi-CBC と呼ばれる。これらの変異は比較的稀に起こるため、種や属の識別に有効であると考えられている (Coleman 2000, Marin *et al.* 2003)。

解析の結果, Luo *et al.* (2010) はクロレラ系統群とパラクロレラ系統群を区別する 6 個の NHS と 3 個の CBC を認め、さらにクロレラ系統群内部の 6 系統群 (図 2, それぞれ独立の属に相当) もそれぞれ一つ以上の遺伝的特徴で識別できることを示した。なおマイヤレラ属についてはピレノイドの欠失で、ヘゲワルディア属は卵生殖によっても特徴付けられるが、他の属は形態的には互いに識別できなかった。そして Luo *et al.* (2010) は従来の形態形質 (刺状突起や群体、粘質鞘の形成) は環境因子への適応応答だったと議論している。

遺伝的特徴はまた、近縁種間で種の識別を行うためにも用いられている。ITS-2 の保存領域における CBC の有無が種の識別に有効であることは Coleman (2000) によって提唱された。また Nakada *et al.* (2010b) や Hayama *et al.* (2010) も ITS-1 と ITS-2 における CBC がある程度の種差を反映していることを示している。Pröschold *et al.* (2010) もディデイモゲネス属の 2 種が独立種であることを ITS-1 に見つかる 8 個の CBC (hemi-CBC も含む) で裏付け、さらにヘゲワルディア属の中で刺状突起を持たない株 (CCAP 283/3) と刺状突起を持つタイプ種の *H. parvula* を 24 個もの CBC で区別し、別種と見なしている。Krienitz *et al.* (2010) は *Dict. ehrenbergianum* と *Parachlorella beijerinckii* の区別を明確にするために SSU および ITS rDNA の二次構造を比較し、やはり多数の遺伝的特徴を確認した。同時に彼らは *Dict. ehrenbergianum* とされた複数株の ITS-2 の保存領域に CBC が認められないことを示し、これらの株が単一種であると結論づけた。

機能性 RNA 分子の遺伝的特徴は、今後も分類学に活用されることだろう。ただし NHS や CBC のみに基づいて属や種の分類を行うことには疑問も感じる。確かに塩基配列の解読さえできれば SSU や ITS rDNA 配列に基づく種同定は容易で客観的であるが、NHS や CBC はそれ自体で生殖的隔離や形態差、あるいは生態的分化の存在を証明するものではない。現時点ではあくまでも遺伝的分化の程度を調べる指標や、同定のための参考情報と見なすべきだろう。

まとめ

一連の研究からは、クロレラ系統群における形態進化がおぼろげに見えてくる。系統樹上での形質分布を見る限り、クロレラ系統群とパラクロレラ系統群は、それぞれ刺状突起を有する群体性藻類 (ミクラクチニウム様の藻類) と粘質鞘に包まれた群体性の藻類 (ディクティオスファエリウム様の藻類) から繰り返し単純化してクロレラ様藻類 (クロレラ属やパラクロレラ属) を生み出したように見える。これは非常に魅力的な仮説であるが、クロレラ様の共通祖先からクロレラ系統群とパラクロレラ系統群が分化し、繰り返し刺状突起や群体性を進化させた可能性も否定できない。今後は、刺状突起や粘質鞘の生化学、発生、さらには遺伝的背景などの研究から相同性の評価が行われることに期待したい。

また Luo *et al.* (2010) は系統樹と遺伝的特徴のみに基づいてクロレラ系統群内部の属を再定義した。しかし近年の微細緑藻類の分類においては、光学顕微鏡・電子顕微鏡を用いた形態比較、分子系統や遺伝的特徴、生殖隔離の有無、生理学的特徴などを総合的に評価する多面的研究 (polyphasic approach) が推進されており (Pröschold & Leriaert 2007, Nakada *et al.* 2008, 2010a, b), Luo *et al.* (2010) の研究はその対極をなしている。ただ多面的な研究においては手間と時間がかかり、しかも新たな手法が開発されればさらに手間が増えるという矛盾を抱えている。分子系統学の進歩により新しい系統群が次々と認識されるようになった昨今, Luo *et al.* (2010) のように有用な形質を絞り込んで早期に新分類群を記載・公表し、より深い多面的な研究は続く研究者に委ねる、という姿勢も必要になってくるかも知れない。

引用文献

- Coleman, A. W. 2000. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. *Protist*. 151: 1-9.
- Darienko, T., Gustavs, L., Mudimu, O., Rad Menendez, C., Schumann, R., Karsten, U., Friedl, T. & Pröschold, T. 2010. *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Eur. J. Phycol.* 45: 79-95.
- Fawley, M. W., Fawley, K. P. & Owen, H. A. 2005. Diversity and ecology of small coccoid green algae from Lake Itaska, Minnesota, USA, including *Meyerella planktonica*, gen. et sp. nov. *Phycologia*. 44: 35-48.
- Hayama, M., Nakada, T., Hamaji, T. & Nozaki, H. 2010. Morphology, molecular phylogeny and taxonomy of *Gonium maiaprillis* sp. nov. (Goniaceae, Chlorophyta) from Japan. *Phycologia*. 49: 221-234.
- Huss, V. A. R., Frank, C., Hartmann, E. C., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B. M., Wenzeler, P. & Kessler, E. 1999. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *J. Phycol.* 35: 587-598.
- Krienitz, L., Bock, C., Luo, W. & Pröschold, T. 2010. Polyphyletic origin of the *Dictyosphaerium* morphotype within Chlorellaceae (Trebouxiophyceae). *J. Phycol.* 46: 559-563.
- Krienitz, L., Hegewald, E. H., Hepperle, D., Huss, V. A. R., Rohr, T. & Wolf, M. 2004. Phylogenetic relationship of *Chlorella*

- and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia*. 43: 529-542.
- Luo, W., Pflugmacher, S., Pröschold, T., Walz, N. & Krienitz, L. 2006. Genotype versus phenotype variability in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Protist*. 157: 315-333.
- Luo, W., Pröschold, T., Bock, C. & Krienitz, L. 2010. Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Plant Biol*. 12: 545-553.
- Marin, B., Palm, A., Klingberg, M. & Melkonian, M. 2003. Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing euglenophytes based on SSU rDNA sequence comparisons and synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure. *Protist*. 154: 99-145.
- Nakada, T., Nozaki, H. & Pröschold, T. 2008. Molecular phylogeny, ultrastructure and taxonomic revision of *Chlorogonium* (Chlorophyta): Emendation of *Chlorogonium* Ehrenberg and description of *Gungnir* gen. nov. and *Rusalka* gen. nov. *J. Phycol.* 44: 751-760.
- Nakada, T., Shinkawa, H., Ito, T. & Tomita, M. 2010b. Re-characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* and its relatives with new isolates from Japan. *J. Plant Res.* 123: 67-78.
- Nakada, T., Soga, T., Tomita, M. & Nozaki, H. 2010a. *Chlorogonium complexum* sp. nov. (Volvocales, Chlorophyceae), and morphological evolution of *Chlorogonium*. *Eur. J. Phycol.* 45: 97-107.
- Neustupa, J., Němcová, Y., Eliáš, M. & Škaloud, P. 2009. *Kalinella bambusicola* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid *Chlorella*-like subaerial alga from Southeast Asia. *Phycol. Res.* 57: 159-169.
- Pröschold, T., Bock, C., Luo, W. & Krienitz, L. 2010. Polyphyletic distribution of bristle formation in Chlorellaceae: *Micractinium*, *Diacanthos*, *Didymogenes* and *Hegewaldia* gen. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phycol. Res.* 58: 1-8.
- Pröschold, T. & Leliaert, F. 2007. Systematics of the green algae: Conflict of classic and modern approaches. In: Brodie, J. & Lewis, J. (eds.) *Unravelling the algae: The Past, Present, and Future of Algae Systematics*. pp. 123-153. CRC Press, Boca Raton.
- Zhang, J., Huss, V. A. R., Sun, X., Chang, K. & Pang, D. 2008. Morphology and phylogenetic position of a trebouxiophycean green alga (Chlorophyta) growing on the rubber tree, *Hevea brasiliensis*, with the description of a new genus and species. *Eur. J. Phycol.* 43: 185-193.

(慶應義塾大学先端生命科学研究所)