

## 藻類学最前線



## Haematococcus 属とその近縁属に関する系統分類学的研究

大田 修平

*Haematococcus* 属藻類 (*Haematococcus* Flot.: アカヒゲムシ属) は緑藻綱オオヒゲマワリ目 (Volvocales) に属する単細胞性の緑藻類で、淡水域に広く分布する。本記事では *Haematococcus* 属藻類の中で、アスタキサンチンを生産し商業利用されている種を *Haematococcus lacustris* (Gir.-Chant.) Rostaf. (= *H. pluvialis* Flot.) と呼ぶことにする。

*Haematococcus lacustris* (= *H. pluvialis*) の生活環は、二本鞭毛をもつ遊泳細胞、球状細胞 (緑色~緑色を帯びたオレンジ色)、ストレス条件下で多量のアスタキサンチンを蓄積したレッドシストからなる (図1, Wayama *et al.* 2013)。アスタキサンチンを蓄積したレッドシストが血のように赤い (haemat-: ギリシア語で「血赤色の」) 球状細胞であることが本属名の由来となっている。球状細胞を新しい培地に植え替え、培地中の栄養状態が良くなると、最大32細胞の鞭毛をもつ娘細胞に分裂し、親細胞壁を破り、ハッチングする。遊泳細胞はやがて着生し、細胞壁をもった球状細胞になる。球状細胞はストレスがない条件では、緑色細胞のまま、あるいは少しアスタキサンチンを蓄積した状態で細胞分裂をストップさせているが、強光などのストレス条件にさらされると、多量のアスタキサンチンを蓄積して、細胞が赤くなる (図1B)。Buchheim *et al.* (2013) はこのステージをアキネートと呼んでいる。Wayama *et al.* (2013) は、*Haematococcus lacustris* (= *H. pluvialis*, SCCAP K-0084 株) がアスタキサンチンを蓄積する前後の細胞における微細構造的動態を3次元立体構築技術を用いて明らかにした。体積計算の結果、シスト化した細胞ではオイルドロップにカロテノイドの蓄積が見られ、細胞の約半分 (約52%) を占めることが明らかになった。

*Haematococcus lacustris* が作り出すアスタキサンチンはカロテノイドの一種で、抗酸化活性が高いことで知られる (松浦2012)。産業利用もされており、例えばタイ・サケの養殖の際の色揚げ添加飼料として利用されるほか、機能性食品や化粧品として使われている。アスタキサンチンは菌類の *Xanthophyllomyces dendrorhous* (樹液酵母) も作り出すが、色揚げ飼料用には菌類のものが利用され、機能性食品には藻類から抽出されたアスタキサンチンが利用されている (奥田2008)。

*Haematococcus lacustris* は19世紀に記載され、古くから知られている微細藻類である。最近では高付加価値物質を産生する微細藻類としても注目されるようになったが、分類学的にはまだ問題の多い藻類でもある。最近、Buchheim *et al.* (2013) によって分子系統解析や internal transcribed spacer 2 (ITS2) の二次構造比較、トポロジー検定などの知見に基づ

き、*Haematococcus* 属の再検討がなされた。そこで本稿では *Haematococcus* 属およびその近縁属における最新の系統分類学的研究である Buchheim *et al.* (2013) の記事を紹介したい。*H. lacustris* (= *H. pluvialis*) の詳しいシノニム・正名の議論は、他の記事 (大田・仲田2014) を参照いただきたい。

## Haematococcus 属の多系統性

Buchheim *et al.* (2013) は18S rDNA と18S+26S rDNA に基づく分子系統解析および Approximately unbiased (AU) 検定を行い、広義の *Haematococcus* 属が多系統になることを示した。つまり、タイプ種を含まない *Haematococcus* 属各種は *Stephanosphaera* 属とともに単系統群を形成し (グループA; 図2), *Stephanosphaeria* クレード (Nakada *et al.* 2008) に含まれた。また *Haematococcus* 属のタイプ種のみで単系統群を形成し (グループB), *Chlorogonia* クレード (Nakada *et al.* 2008) に含まれた (図2)。Stephanosphaeria クレードと *Chlorogonia* クレードは比較的高い統計的支持 (ブートストラップ値 [BS]・ベイズ事後確率 [PP]) で姉妹関係となった (18S rDNA データの場合: BS = 73, PP = 0.99)。

*Haematococcus* 属藻類が多系統になることは、Buchheim & Chapman (1991), Nakada *et al.* (2008), Nakada & Nozaki (2009), Demchenko *et al.* (2012) 等でも示されていたが、Buchheim *et al.* (2013) では、系統解析やAU検定の結果をもとに *Balticola* 属の復活を提案している。*Balticola* 属とは、Droop (1956) が *Haematococcus* 属の2種 (*H. buetschlii* と *H. droebakensis*) を組み替えるときに提案した属である。Droop (1956) が提案した組合せは、*B. buetschlii* (≡ *H. buetschlii* Blochm.) と *B. droebakensis* (≡ *H. droebakensis* Wollenw.) の2種である。一方で、Buchheim *et al.* (2013) のなかでは、Droop (1956) 以降、*Haematococcus* 属として記載された *H. capensis* Pocock, *H. zimbabwiensis* Pocock も *Balticola* 属に移すことが提案されている。なお、先に Almgren (1966) が “Key to genera and species of Haematococcaceae” の中で *H. capensis*, *H. zimbabwiensis* を *Balticola* 属の下で新組合せを提案しているが、Almgren (1966), Buchheim *et al.* (2013) のいずれも基礎異名の十分な引用を伴わないため、*Balticola* 属の下での組合せは正式に発表されていないと考えられる。

分子系統解析では、図2に示すように広義の *Haematococcus* 属がグループAとBに分かれるが、形態的にもグループAの *Haematococcus* 属 (*Balticola*

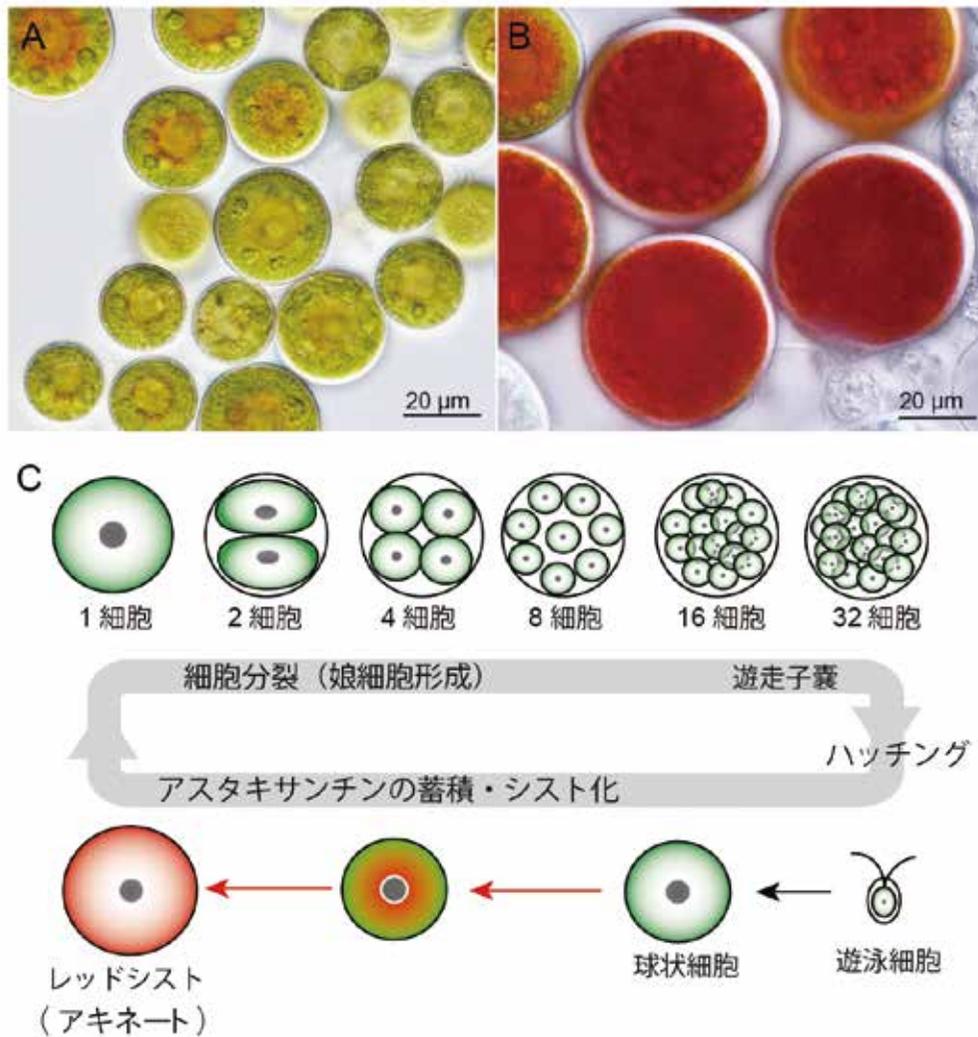


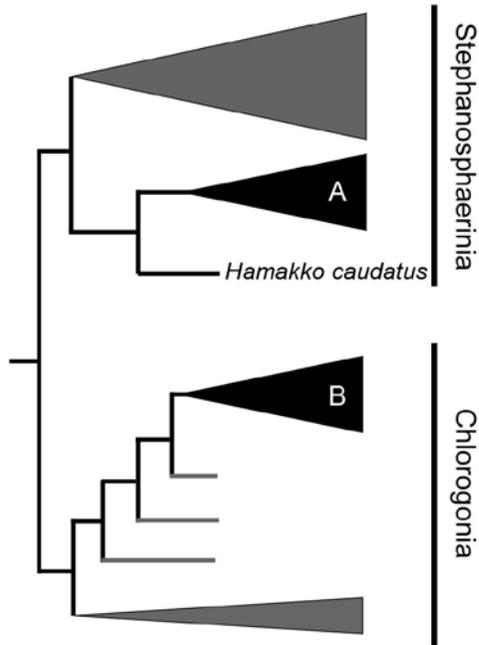
図1. *Haematococcus lacustris* (= *H. pluvialis*) の光学顕微鏡写真と生活環の模式図 A. 緑色球状細胞 (SCCAP K-0084 株)。B. アスタキサンチンを蓄積したレッドシスト (アキネート, SCCAP K-0084 株)。C. 生活環の模式図。強光ストレス条件にさらされるとアスタキサンチンの蓄積が加速される (赤矢印)。Wayama *et al.* (2013) を基に作図。

属) とグループ B の *Haematococcus* 属 (狭義) は異なることが知られ, またグループ A の *Haematococcus* 属は *Stephanosphaera* 属との近縁性が指摘されている (後述)。グループ A の *Haematococcus* 属とグループ B の *Haematococcus* 属の違いについては, ピレノイドの数や原形質系の太さなどがあるが (Droop 1956, Almgren 1966), 生活環も大きく異なる。例えば, タイプ種である *H. lacustris* ではシスト (不動細胞) 内で遊走子形成が行われるが, グループ A の *H. droebakensis* では遊泳細胞内で遊走子形成が行われることも両者の際立った違いであろう。

さらに今回の 18S rDNA に基づく分子系統解析では, グループ A と *Hamakko caudatus* Nakada が高い統計的支持をもって姉妹関係になることが示された (BS = 100, PP =

1.0) (図2)。*Hamakko caudatus* は紡錘形をした鞭毛性緑藻で, 核を挟んで1対のピレノイドをもつ (Nakada & Nozaki 2009)。*Stephanosphaera* 属と *Balticola* 属の各種 (グループ A に属する種) のピレノイドがたいてい2個であるのに対して, *H. lacustris* は3つ以上のピレノイドをもつ (Droop 1956, Pocock 1960, Almgren 1966)。ピレノイドのような細胞構造的特徴もまたグループ A (+*Hamakko caudatus*) とグループ B の違いを反映していると言える。

このように分子系統的にも形態的にもグループ A に位置する *Haematococcus* 属各種はタイプ種を含む *Haematococcus* 属と明瞭に区別できるため, 別属に組み替えたほうが自然である。それでは, 別属候補として Droop (1956) の *Balticola* 属が妥当なのだろうか?



#### A: *Haematococcus* 属 - *Stephanosphaera* 属系統群

*Haematococcus capensis* (*Balticola* 属)  
*Haematococcus buetschlii* (*Balticola* 属)  
*Haematococcus droebakensis* (*Balticola* 属)  
*Haematococcus zimbabwiensis* (*Balticola* 属)  
*Stephanosphaera pluvialis*  
*Stephanosphaera* sp.

#### B: *Haematococcus* 属のタイプ種からなる系統群

*Haematococcus lacustris* (= *H. pluvialis*)

図2. *Haematococcus* 属, *Balticola* 属および *Stephanosphaera* 属の系統関係の模式図。黒色で示したクレードは広義の *Haematococcus* 属各種を含むことを示し、灰色は *Stephanosphaerina*, *Chlorogonia* 各クレードにおいて本稿では議論しなかった OTU (operational taxonomic unit) を示す。三角形で示したクレードは複数の OTU からなることを示す。A, *Haematococcus* 属-*Stephanosphaera* 属系統群。B, *Haematococcus* 属のタイプ種からなる系統群。Buchheim et al. (2013) の 18S rDNA 分子系統樹を基に作図。

### *Stephanosphaera* 属と *Balticola* 属の近縁性と *Balticola* 属の独立性

*Stephanosphaera* 属と *Balticola* 属の主要な違いは、前者が群体性であるのに対して、後者が単細胞性であることである。単細胞性という観点からは *Haematococcus* 属と *Balticola* 属が類似しているが、Buchheim et al. (2013) の分子系統解析は *Stephanosphaera* 属と *Balticola* 属の近縁性を示している。実際、Droop (1956) は、“*H. droebakensis* resembles *Stephanosphaera* more closely than *H. pluvialis*.” と記しており、形態的な側面から *Stephanosphaera* 属と *Balticola* 属の近縁性が指摘されていた。例えば、遊泳ステージの細胞には、プロトプラストと細胞壁をつなぐ原形質系があるが、*H. droebakensis* とその近縁種 (*Balticola*

属とされた種) には基部で原形質系が太く分枝しているのに対して、タイプ種である *H. pluvialis* は均一で細い。*Stephanosphaera* 属では、太く分枝しているタイプの原形質系をもつ (Droop 1956, Almgren 1966)。

*Stephanosphaera* 属とグループ A に位置する *Haematococcus* 属の近縁性については上述の通りであるが、それでは、*Stephanosphaera* 属と *Balticola* 属の違い (独立性) についてはどのような議論がなされているのか? 18S rDNA に基づく系統解析では *Stephanosphaera* 属と *Balticola* 属は明瞭なクレードを形成せず、両属がかなり近縁であることは確かであるが、分子系統だけでは属の独立性については疑問が残る。著者らは *Balticola* 属の単系統性に対する AU 検定も実施しており、その *p* 値は単系統の場合 0.739、非単系統の場合 0.261 であった。これは、*Balticola* 属の非単系統性が完全に棄却されないため、単系統性が弱く支持されると解釈できる。また、18S+26S rDNA に基づく分子系統解析では、両属は独立したクレードを形成している。さらに、上述のとおり *Stephanosphaera* 属は群体性、*Balticola* 属は単細胞性の藻類であるため、形態的・生活環的な点から両属は明瞭に区別できることを合わせて考えると、*Balticola* 属は独立した属であると結論し、グループ A に位置する (つまりタイプ種が含まれない) *Haematococcus* 属各種を *Balticola* 属に組み替えるという今回の提案は妥当であろう。

### タイプ種内の系統関係

本論文ではさらに、*Haematococcus lacustris* (= *H. pluvialis*) とされる地理的に様々な場所から分離された株を用いて ITS2 の二次構造比較と ITS に基づいた分子系統解析によって、タイプ種の種内構造について詳しく調べている。解析の結果、*H. lacustris* (= *H. pluvialis*) とされる各株は 5 種類の系統 (A ~ E) からなる単系統群にまとまることが明らかになった。ITS2 二次構造比較の結果、例外的に SAG34-1m 株での一つの補償的塩基置換 (compensatory base change : CBC) が検出されているものの、基本的に *H. lacustris* (= *H. pluvialis*) の各株間で CBC は検出されなかった。CBC は ITS2 の二次構造を比較することで示される塩基置換で、分類群を線引きするときに使われる客観的指標として提案されている (Coleman 2000)。実際 Nakada et al. (2010) では、*Chlamydomonas* 属の種レベルの線引きの一つの指標として用いられている。*H. lacustris* (= *H. pluvialis*) とされる分離株には CBC が 1 株を除いて検出されなかったが、*Balticola* 属とされた種 (*H. droebakensis*, *H. zimbabwiensis*) および *Stephanosphaera* 属の各種と *H. lacustris* (= *H. pluvialis*) の間で比較した場合は、5 ~ 8 個の CBC が確認された。以上より、基本的にタイプ種 *H. lacustris* (= *H. pluvialis*) とされる分離株は、すべて分類学的に同一 (同種) であることを示唆しているが、*Balticola* 属と *Stephanosphaera* 属の各種とは少なくとも種レベル以上の違いがあるといえる。

## まとめ

今回紹介した論文 Buchheim *et al.* (2013) の主な結果をまとめると、(1) 広義の *Haematococcus* 属は明らかに多系統になること、(2) *Balticola* 属 (グループ A に含まれる *Haematococcus* 属各種) は *Stephanosphaera* 属に近縁関係にあること、(3) *Balticola* 属は分子系統解析では弱い単系統性を示し、かつ近縁の *Stephanosphaera* 属とは形態的に明瞭に区別できること、(4) タイプ種内では CBC は見つからないが、*Balticola* 属/*Stephanosphaera* 属と *Haematococcus* 属タイプ種の間では 5~8 個の CBC が確認されたことが挙げられる。これらの結果より、*Balticola* 属を独立した属とみなし、タイプ種以外の *Haematococcus* 属各種が *Balticola* 属へ移されることになった。厳密に言えば、*H. carocellus* R. H. Thomps. & Wujek は今回の分子系統解析には含まれていないのでどちらのクレードに属するかかわからないが、本種は原形質糸が太いという *Balticola* 属の特徴をもつため (Thompson & Wujek 1989)、*Balticola* 属に移すべきというのが Buchheim *et al.* (2013) の見解である。すなわち *Haematococcus* 属には *H. lacustris* ただ一種のみが残されることになる。

## 引用文献

- Almgren, K. 1966. Ecology and distribution in Sweden of algae belonging to Haematococcaceae. I. Notes on nomenclature and history. *Svensk Bot. Tidskr.* 60: 49–73.
- Buchheim, M. A. & Chapman, R. L. 1991. Phylogeny of the colonial green flagellates: a study of 18S and 26S rRNA sequence data. *Biosystems* 25: 85–100.
- Buchheim, M. A., Sutherland, D. M., Buchheim, J. A. & Wolf, M. 2013. The blood alga: phylogeny of *Haematococcus* (Chlorophyceae) inferred from ribosomal RNA gene sequence data. *Eur. J. Phycol.* 48: 318–329.
- Coleman, A. W. 2000. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. *Protist* 151: 1–9.
- Demchenko, E., Mikhailyuk, T., Coleman, A. W. & Pröschold, T. 2012. Generic and species concepts in *Microglena* (previously the *Chlamydomonas monadina* group) revised using an integrative approach. *Eur. J. Phycol.* 47: 264–290.
- Droop, M. R. 1956. *Haematococcus pluvialis* and its allies. I. The Sphaerellaceae. *Rev. Algol. n.s.* 2: 53–71.
- 松浦裕志 2012. アスタキサンチンの生理活性作用. 渡邊信 (監修) 藻類ハンドブック. pp. 695–698. NTS. 東京.
- Nakada, T., Misawa, K. & Nozaki, H. 2008. Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses. *Mol. Phylogenet. Evol.* 48: 281–291.
- Nakada, T. & Nozaki, H. 2009. Taxonomic study of two new genera of fusiform green flagellates, *Tabris* gen. nov. and *Hamakko* gen. nov. (Volvocales, Chlorophyceae). *J. Phycol.* 45: 482–492.
- Nakada, T., Shinkawa, H., Ito, T. & Tomita, M., 2010. Recharacterization of *Chlamydomonas reinhardtii* and its relatives with new isolates from Japan. *J. Plant Res.* 123: 67–78.
- 奥田徹 2008. 菌類を使ったバイオテクノロジー産業. 国立科学博物館(編) 菌類のふしぎ—形とはたらきの驚異の多様性. pp. 194–201. 東海大学出版会. 神奈川.
- 大田修平・仲田崇志 2014. アスタキサンチン産生ヘマトコッカス (アカヒゲムシ属: *Haematococcus*; 緑藻綱) の学名: *Haematococcus lacustris* か? *Haematococcus pluvialis* か? 藻類 62: 7-10.
- Pocock, M.A. (1960). *Haematococcus* in southern Africa. *Trans. Roy. Soc. S. Africa*, 36: 5–55.
- Thompson, R. H. & Wujek, D. E. 1989. *Haematococcus carocellus* sp. nov. (Haematococcaceae, Chlorophyta) from the United States. *Phycologia* 28: 268–270.
- Wayama, M., Ota, S., Matsuura, H., Nango, N., Hirata, A. & Kawano, S. 2013. Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS ONE* 8: e53618.

(東京大学)