

霧するスプレー法を実習した。用いた培地は、気生藻のほとんどに適合するBBM培地 (Bischoff & Bold 1963) である。また、野生状態と培養状態で形態が大きく異なる種もあり (図1-F)、単離作業においては、培養プレートを途中段階で観察しつつ、コロニーが目的の藻類から生じたことを確認する重要性についても説明した。参加者それぞれが興味ある内容に取り組むということで、雑然とした中で作業は進んだが、何とか各自培養プレートを作ることができた様子であった。初めての試みではカビだらけになったり、藻類が繁茂しすぎて単離が難しくなったり、藻類のコロニーがほとんど出ない失敗もあるかもしれない。参加者それぞれの培養プレートの、その後の様子が楽しみである。

本実習に当たり実験室の準備や大学バスの調達など尽力い

ただいた高知大学教育研究部の峯一朗准教授、並びに協力していただいたスタッフ一同に感謝申し上げます。

引用文献

- Bischoff, H. W. & Bold, H. C. 1963. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *Phycological studies* IV. Univ. Texas Public. No. 6318: 1-95.
- Ohmura, Y., Mizobuchi, A., Handa, S. & Lücking, R. 2016. *Coenogonium moniliforme* (Coenogoniaceae, lichenized Ascomycota) new to Japan, with taxonomic notes of the photobiont in culture. *J. Jpn. Bot.* 91: 74-78.

(広島県環境保健協会)

クロレラ分類の現在 保科 亮

球状緑色藻「クロレラ」は、健康食品として長年愛されるものとも知られた藻類のひとつである。しかし、分類学的にみると、*Chlorella* 属はきわめて複雑な経緯をへて現在に至っている。本稿ではクロレラ類の分類の変遷と問題点について触れていきたい。なお、本稿では広義のクロレラ = 球状緑色藻 (近似系統群を含む) と、分類学的意味としての *Chlorella* を区別して記述する。

クロレラが記載されたのは *Chlorella* としてではなく、動物内にいる緑の藻類、すなわち、共生藻として記載された *Zoochlorella* (Brandt 1881) が始まりである。Brandt は同論文で同様に共生する黄色の藻類、*Zooxanthella* も記載している。*Chlorella* が記載されるのは9年後の1890年となる。Beijerinck (1890) は、*Zoochlorella* と同様の藻類が、ふつうに淡水中に存在することが分かったため、新属 *Chlorella* (タイプ種: *Ch. vulgaris*) を立ち上げ、*Zoochlorella* は *Chlorella* の一部である、とした。当時、学名の Priority がどうなっていたのか不明だが、学名としての *Zoochlorella* は徐々に使用されなくなっていった。現代的な分類学的処置としては、Silva (1990) が *Chlorella* と *Zoochlorella* はシノニムとみなすことができ、また *Zoochlorella* に Priority があるが、*Chlorella* 属があまりに有名なため *Chlorella* を保存名とし、*Zoochlorella* を廃棄している (ICBN 2000, Appendix IIIA)。なお、現在でも生態学的な意味においては、原生動物等の内部にいる球状緑色藻を *Zoochlorella* (属名扱いとは異なる) と称す。

クロレラの典型的な特徴は、直径 5 μm 前後の球状緑色藻で自生孢子による無性生殖。鞭毛や刺、ゼリーなどの装飾が一切ない、スムーズな細胞壁をもち、群生せず単細胞状態を保つ。葉緑体はペリフェラルな一枚で、多くはカップ状。光学顕微鏡では目立たない場合もあるが、葉緑体の内部にピレノイドを有す。

このピレノイドはデンプンで囲まれ、二重のチラコイドメンブレンが貫入する。現在では、このような形態種を、クロレラ型、あるいは *Chlorella-like* と称す。

クロレラは、様々な研究や産業上の重要種であったことから、生理特性や成分分析等によりその多様性が示され、100種以上が記載された。しかし、形態的差異はほとんどなく、また有性生殖しないため、その分類や同定は困難をきわめた。特に、分類形質の一部として採用されてきた量的差異は、わずかな培養条件の差、培養者や施設による影響によることも多く、また、長期培養で性状が変化する種もいる (e.g., Shihira & Krauss 1965)。こうしたクロレラ類を整理・統合してきたのがドイツ人研究者らで、特に Kessler 氏や Huss 氏らの功績は大きい。その彼らが分子系統解析に着手して以降、クロレラの分類観は大きく変貌していく。Huss, Kessler *et al.* (1999) は SSU rDNA で系統樹を構築し、クロレラがトレボウクシア藻綱と緑藻綱の両綱に散在することを示した。すなわち、クロレラと呼ばれる球状緑色藻は他人の空似であり、タイプ種とクラスターを形成する4種 (*Ch. vulgaris*, *Ch. lobophora*, *Ch. sorokiniana*, *Ch. kessleri*) のみを「真のクロレラ」とした。ところが、シークエンスデータが増えるに従い、真のクロレラ系統群の中に様々な形態種が入り混じることが分かってきた。Krienitz, Huss *et al.* (2004) は SSU rDNA に ITS2: Internal transcribed spacer 2 を加えて系統解析をおこない、これらが明瞭に2系統に分かれ、タイプ種 *Ch. vulgaris* を含む方を *Chlorella-clade*、もう一方のクレードに入る *Ch. kessleri* の属名を変えて *Parachlorella-clade* とし、双方併せてクロレラ科と定義している。これ以降、クロレラ分類は Krienitz 氏を中心としたグループによって進められていくことになる。

Chlorella-clade 内には刺を持つ藻類 *Mircactinium pussillum*

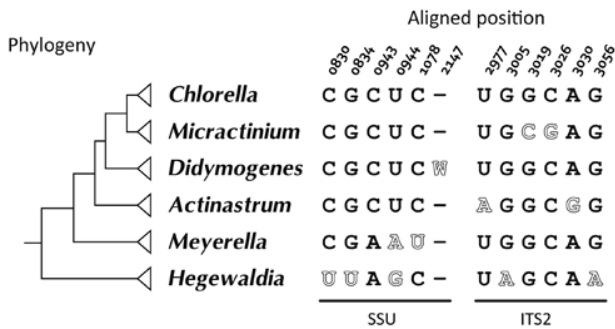


図1. SSU-ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 系統解析によるクレード形成と、クレード固有の共有派生的塩基置換/インデル(白抜き文字)(Luo *et al.* 2010 より一部を抜粋して改編)。なお、*Chlorella* 属には共有派生的変異はみられない。

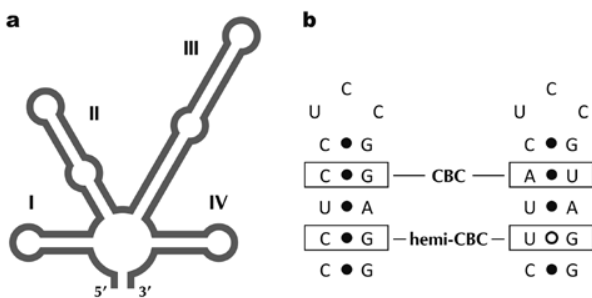


図2. ITS2 と CBC。2a. ITS2 の二次構造。各 Helix には 5' より、I-IV の名前がつく。4-helix 構造は多くの真核生物で共有されるが、Helix が付加されていたり、欠如する分類群も散見される。例えば、繊毛虫の多くは Helix I および IV を欠く。2b. CBC および hemi-CBC の具体例。

がいる。Luo, Krienitz *et al.* (2006) は *M. pusillum* の系統によっては、培養下でクロレラ様の形態をなし、また、培養液に捕食者を入れることで、再度刺の形成が惹起されることを示した。微細藻の分類では、形態、生理、系統や生殖的隔離など、多面的なアプローチが理想とされるが、クロレラ関連群においては、生理的特徴に加えて今度は、形態的特徴も危うさを含むことが判明したわけである。さらに、有性生殖もしないので、多面的アプローチに頼らない、遺伝子の差異のみで分類しようという下地が出来上がった。このような背景があり、クロレラ科では SSU-ITS1-5.8S-ITS2 rDNA を用いた分子系統、および、各クレードにみられる共有派生的な塩基置換やインデルをもって属を定義づけする(図1)という提案がなされた(Luo, Krienitz *et al.* 2010)。

ところで種はどう定義するのか。種の境界はクロレラに限らず、最近では ITS2 という領域の比較が重要視されてきている。スペーサーと銘打っているが、RNA として機能する遺伝因子で、「4本指の手」と呼ばれる特定の構造をとる(図2a)。ITS2 に限らず、高次構造をとる RNA には CBC: Compensatory base change という、特徴的な塩基置換がよくみられる。例えば、C-G ペアの C が A に置換するとペアを形成できない。偶然か必然かはさておき、C-G が両塩基とも置換し A-U ペアに置き換わる現象を

CBC、C が U に置換するなど、ゆらぎ塩基対を形成(逆パターンも)する現象を hemi-CBC と呼ぶ(図2b)。比較する2者間の ITS2 で、CBC がみつかれば別種とみなすことができる。これは陸上植物からクラミドモナスまで、様々な生物群で統計的データが示されている(e.g., Müller *et al.* 2007)。CBC による種コンセプトは、より保存性の高い Helix II と III の CBC に限られていたが、Krienitz 氏らの解析では Helix I と IV も同様に扱うようになった。私見ではあるが、Helix I と IV は、時に激しい Length polymorphism がみられ、どの塩基対同士を比較して CBC の有無を探るのか、バイアスを払拭することができない。一方、同じ ITS2 を使いながら一次配列比較による種分類も模索されている。比較したい2者の ITS2 を Clustal X などを用いてアライメント(セッティングはデフォルトでよい)する。このさい Gap も1塩基として数えると、ほぼすべてのケースで、その差異が2%以内か10%以上となるため、ここに種の境界がみえてくる(Hoshina & Fujiwara 2013, Hoshina 2014)。この比較手法を用いると、ITS2 を BLASTN にかけることで、同種の ITS2 が登録されているかどうか、すぐに判明する。

さて、クロレラ科のその後である。科内にはさらに様々な種が流入し、種分類も進められた。*Chlorella* 属だけでも約15種、*Chlorella* 属といえど、形態形質はクロレラ型だけではなくなった(Bock, Krienitz *et al.* 2013)。遺伝子比較のみで分類を行っているため、それ自体に問題はない。しかし、Krienitz 氏らの系統解析手法には疑念を禁じ得ない。彼らは系統解析に SSU-ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 全域を用いている。ITS2 の差異は種間だと10%以上と上述したが、ITS1 の差異はそうしたレベルをはるかに超える。例えば、伝統的な *Chlorella* 2種、*Ch. vulgaris* と *Ch. sorokiniana* の ITS1 の相違は44%に達する。もちろん、激しい Length polymorphism が随所にみられる。公開されている彼らのアライメント(Bock, Krienitz *et al.* 2010)は、大きなギャップが入り混じるもので、この種のこの塩基が、別の種のこの塩基に相当する根拠は往々にして不明である。ITS1 を用いず、比較的安定的なアライメントが得られる SSU + ITS2 のみで系統樹を構築すると、いくつか属の単系統性が担保されないことが、最近になって指摘されている(Heeg & Wolf 2015)。とりわけ *Chlorella* 属は、*Chlorella*-clade において5つの小クレードに分散する多系統群であることが示された。

生理特性や形態形質に疑問符が付き、かつ有性生殖をおこなわないクロレラ類を、遺伝子比較のみで分類していこうという Krienitz 氏らの目指した新しい方向性は評価されるべきである。しかし、比較領域をわずかに変えるだけでトポロジーが大きく変化する現在の解析、すなわち、rDNA 領域を主体とした系統解析では、クロレラ科内における系統関係の確定には至っていない。現在、rDNA 以外のデータは、それ自体がほとんどなく、今後、新たな分子種を加えた解析による、属の再編が待たれる。

引用文献

- Beijerinck, M. W. 1890. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. Bot. Ztg. 48: 725-72

- 781–8.
- Bock, C., Luo, W., Kusber, W. H., Hegewald, E., Pažoutová, M., Krienitz, L. 2013. Classification of crucigenoid algae: phylogenetic position of the reinstated genus *Lemmermannia*, *Tetrastrum* spp. *Crucigenia tetrapedia*, and *C. lauterbornii* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* 49: 329–39.
- Bock, C., Pröschold, T., Krienitz, L. 2010. Two new *Dictyosphaerium*-morphotype lineages of the Chlorellaceae (Trebouxiophyceae): *Heynigia* gen. nov. and *Hindakia* gen. nov. *Eur. J. Phycol.* 45: 267–77.
- Brandt, K. 1881. Ueber das Zusammenleben von Thieren und Algen. *Arch. Anat. Physiol.* 1881: 570–4.
- Heeg, J. S., Wolf, M. 2015. ITS2 and 18S rDNA sequence-structure phylogeny of *Chlorella* and allies (Chlorophyta, Trebouxiophyceae, Chlorellaceae). *Plant Gene* 4: 20–8.
- Hoshina, R. 2014. DNA analyses of a private collection of microbial green algae contribute to a better understanding of microbial diversity. *BMC Research Notes* 7: 592.
- Hoshina, R., Fujiwara, Y. 2013. Molecular characterization of *Chlorella* cultures of the National Institute for Environmental Studies culture collection with description of *Micractinium inermum* sp. nov., *Didymogenes sphaerica* sp. nov., and *Didymogenes soliella* sp. nov. (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae). *Phycol. Res.* 61: 124–32.
- Huss, V. A. R., Frank, C., Hartmann, E. C. et al. 1999. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta) *J. Phycol.* 35: 587–98.
- Krienitz, L., Hegewald, E. H., Hepperle, D., Huss, V. A. R., Rohrs, T., Wolf, M. 2004. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia* 43: 529–42.
- Luo, W., Pflugmacher, S., Pröschold, T., Walz, N. and Krienitz, L. 2006. Genotype versus phenotype variability in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Protist* 157: 315–33.
- Luo, W., Pröschold, T., Bock, C. and Krienitz, L. 2010. Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Plant Biol.* 12: 545–53.
- Müller, T., Philippi, N., Dandekar, T., Schultz, J. and Wolf, M. 2007. Distinguishing species. *RNA* 13: 1469–72.
- Shihira, I. and Krauss, R. W. 1965. *Chlorella*. Physiology and taxonomy of forty-one isolates. University of Maryland, Maryland.
- Silva, P. C. 1999. Proposal to conserve the name *Chlorella* against *Zoochlorella* (Chlorophyceae). *Taxon* 48: 135–6.

(長浜バイオ大学バイオサイエンス学部)

文献データベースから見た微細藻類バイオマス研究の動向 大田修平

2017年3月25日午後、日本藻類学会高知大会の一般講演が無事に終了し、引き続きワークショップIIが開催された。このワークショップは1日目の講義編と2日目の実習編から成る。講義編では、トレボウクシア藻類を研究材料とした生態、分類、カルチャーコレクション、バイオマス利用に関する研究動向が紹介された。講義編で解説した藻類バイオマス研究に関する内容は既に和文としてまとめているので、ご興味ある方は参照されたい(大田・河野 2015, 大田・河野 2017)。今回の講義の導入部では、藻類バイオマスの国内外の研究動向について紹介した。

トムソン・ロイター社により提供されている Web of Science は、オンラインの学術データベースの総合プラットフォームである。PubMed, ScienceDirect や Google Scholar などと併用して論文検索に使用されている方も多かもしれない。Web of Science は自然科学, 社会科学, 人文科学の全分野における主要論文誌の情報がカバーされており、文献調査に関する分析ツールが充実している。また、Web of Science のデータベースのひとつである InCites Journal Citation Reports は、インパクトファクターの計算に使われているおなじみのリソースである。

国内外の学術の動向を知りたい場合、当該分野の出版論文数がひとつの指標となる。特許案件の研究では論文公表が控えられるが、特許申請と論文執筆は並行的に進められていることも多い。特許案件の研究でも公知後、論文は出版されることが多く、当該分野の論文の報告数は研究動向の重要な指標である。今回、藻類バイオマスの研究動向を分析するため

に、Web of Science のリソースを利用し、検索クエリを組み合わせて動向分析した。Web of Science を使ったクエリ検索では Web of Science™ Core Collection より、例えば、「algae fuel」等のトピック検索を行った。クエリワードが複数ある場合は OR 検索を行った。以降の本文中で「・」は OR を示す。今回の分析では最小レコード件数(しきい値)は2報/年としてカウントした。国・地域別の分析では、上位10レコードを抽出した。分析結果はテキストデータに保存して、エクセルに再度読み込み、データの編集を行いグラフ化した。本稿の図1Aと図2は2017年3月、それ以外は2017年5月に調査したものを示している。

藻類バイオマスの研究では「燃料」「原料」「食料」がキーワードとして真っ先に思い浮かぶ。そこでこれらについての論文出版動向を年代別に調べたのが図1Aである。藻類燃料、藻類原料・食料ともに徐々に論文が増えているのではなく、ある年を境にして、急に論文が増えていた。特に藻類原料・食料は出版数の増加傾向が顕著であり、1990年で41報であったものが、翌年には198報まで増加し、一気に5倍近くまで跳ね上がっている。藻類原料・食料に関しては1985年～1989年、藻類燃料に関しては1985年～2006年以前に出版された論文についてさらに詳しく調査した結果、当該期間の論文は38報あり、被引用数の2017年までの合計は1050件、平均被引用件数は27.63件/報であった。一方、藻類燃料に関しては1985年～2006年以前を調査したところ、当該期間の論文は15報あり、被引用数の合計は2017年までの合計は117件、平均被引用件数は7.8件/報であった。