

藻類学最前線



見落とされていた氷雪藻の多様性

松崎 令

晩春から初夏の頃に残雪の残る山を歩いていると、緑や黄色、赤などに色付いた残雪を見つけることがある。英語で colored snow と呼ばれるそれらは、日本においては彩雪、色雪、着色雪など、様々な名称で呼ばれている (Fukushima 1963; 本稿では以後、彩雪に統一する)。なかでも赤い彩雪 (赤雪) は非常に目立つものであり、紀元前のアリストテレスの「動物誌」や平安時代の「続日本紀」、更にはダーウィンの「ビーグル号航海記」などにも、赤雪と思われる記述がみられる。そのような彩雪の正体は、氷雪藻 (または雪氷藻) と総称される、寒冷適応して残雪や氷河中で繁殖するようになった微細藻類のブルームである。本稿では、山岳地域の典型的な氷雪藻である緑藻クロロモナス (*Chloromonas*) に対して筆者らが実施してきた分類学的研究のうち、コスモポリタン種とされていた *Chloromonas nivalis* の実体解明に向けた最近の研究 (Matsuzaki *et al.* 2015, 2018) について紹介する。なお、氷雪藻の研究史については竹内 (2010, 2013) の総説が、微細藻類 (特に緑藻) における寒冷適応の進化については Cvetkovska *et al.* (2017) の総説が詳しいので、興味のある方はそちらも参照いただきたい。

彩雪を引き起こす主な氷雪藻

いきなり前言を翻すようで申し訳ないが、極域や高山域の雪原で広域に渡って鮮やかな赤雪を引き起こすのは、クロロモナスの種ではなく、*Chlamydomonas nivalis* (緑藻綱, ボルボックス目) である (Kol 1968)。正確に言えば、本種のシスト (休眠孢子) とされている、光学顕微鏡では細胞内構造が見えないほどアスタキサンチンなどのカロテノイド色素を細胞内に蓄積した、赤くて丸い不動細胞 (図1) がそのような場所に優占する。スキー場などで雪焼けを経験した人ならお分かりいただけると思うが、雪上の太陽光は強烈である。従って、本氷雪藻は細胞内にカロテノイド色素を貯め込むことで、そのような強光から光化学系や DNA を防御していると考えられている。本藻は非常に有名で世界各地から報告されているにもかかわらず、細胞の休眠状態を実験的に解除する方法が確立されていないため、栄養細胞などの実体は現在もわかっていない。ただ、筆者も共同研究者として参加した、次世代シーケンサーを用いた北極と南極の赤雪サンプルの種組成の網羅的解析によると、本藻は (どのように分散しているかは不明だが) 両極に渡って広域分布する、コスモポリタン種のようなものである (Segawa *et al.* 2018)。また、本稿では扱わないが、黄金色藻による黄色い彩雪 (Fukushima 1963, Tanabe *et al.* 2011, Remias *et al.* 2013) や、渦鞭毛藻による茶色い彩雪 (Kol 1968) も知られている。

では、冒頭で触れたクロロモナスはというと、主に山岳地域の林床にみられる緑や赤、オレンジ色の彩雪中に優占している。本属は2本の鞭毛で遊泳する単細胞性緑藻で、およそ130の中温性 (非氷雪性) の種に加え、少なくとも16種の氷雪性の種 (以降、氷雪性クロロモナス) が認められている (e.g. Ettl 1983, Matsuzaki *et al.* 2014, 2015, 2018)。一般的に、緑色の彩雪には氷雪性クロロモナスの遊泳栄養細胞などが、赤やオレンジ色の彩雪には、細胞内にアスタキサンチンなどの色素を蓄積した、本生物群の接合子やシストが優占するとされる (Hoham & Duval 2001)。それらの生活史は図2のようなものと推定されている。なお、氷雪性クロロモナスの生活環を実験的に完結させることは難しく、特に彩雪から得られた接合子やシストについては、現在まで発芽の誘導に成功したという報告はされていない。

“コスモポリタン種” *Chloromonas nivalis*

氷雪性クロロモナスのいくつかの種と同様、本稿で紹介する *Chloromonas nivalis* の生活環もまた、米国の彩雪サンプルの継続的な観察に基づいて報告された (Hoham & Mullet 1977, 1978) (図2; ただし接合子の発芽は未確認)。本種はクロロモナス全体で見ても珍しい逆水滴形の栄養細胞と、翼 (flange) と呼ばれる長軸方向の隆起を5-8本伴うラグビーボール状の接合子という、非常にユニークな形態の特徴をもつ。形態的に本種の接合子と同定できる不動細胞 (“*C. nivalis* 接合子”) (図3) が世界各地の彩雪から頻りに報告されていたことから、本種はコスモポリタン種とされた (Hoham & Mullet 1977, 1978)。ただし、栄養細胞と接合子の対応関係は、米国の野外サンプル以外では確認されていない。

その後、本種は専ら接合子形態のみに基づいて識別されるようになったが (e.g. Müller *et al.* 1998), Muramoto *et al.*

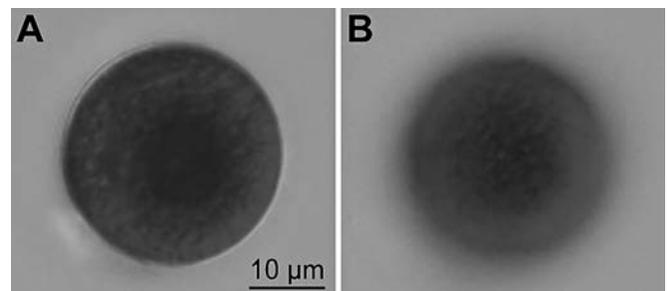


図1. 日本産 “*Chlamydomonas nivalis* シスト” の光学顕微鏡写真。富山県の立山で採取した個体。A, 光学切片。高密度に蓄積されたカロテノイド色素により、細胞内構造の詳細を識別することは困難。B, 表面観。

大気

積雪

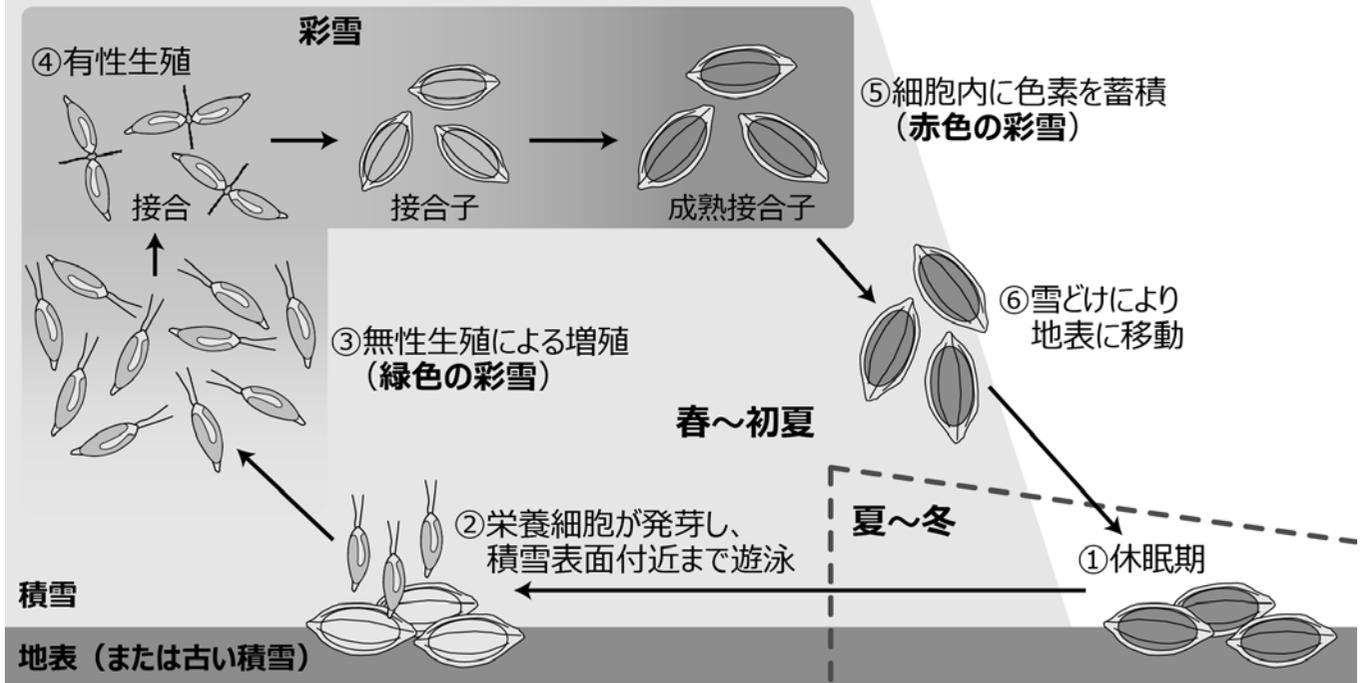


図2. 氷雪性緑藻 *Chloromonas nivalis* の推定生活史。Hoham & Mullet (1977) および Hoham & Duval (2001) を基に作図。

(2008) は1細胞シーケンス法を用いて日本産“*C. nivalis* 接合子”から葉緑体 *rbcL* の部分塩基配列を決定し、“*C. nivalis* 接合子”に複数の種が含まれている可能性を報告した。続いて、Remias *et al.* (2010) はオーストリア産“*C. nivalis* 接合子”の分子系統解析を行い、*C. nivalis* とされている米国およびノルウェー産の培養株 (UTEX SNO66 および CCCryo 005-99) とは系統が異なること、また、*C. nivalis* とされている培養株自体も単系統性を示さないことを報告した。従って、彩雪中の“*C. nivalis* 接合子”と *C. nivalis* とされている培養株、双方の分類学的再検討が必要と考えられた。

複数 DNA 領域の配列データを用いた“*C. nivalis* 接合子”の解析

残念ながら、筆者も彩雪中の“*C. nivalis* 接合子”を実験的に発芽させて栄養細胞を得ることができなかつたため、“*C. nivalis* 接合子”の実体解明には別の方法をとる必要があつた。筆者らは、詳細な形態解析と分子系統によって氷雪性クロロモナスの培養株の種を正確に識別できることを既に報告していたので (Matsuzaki *et al.* 2014)、彩雪中の“*C. nivalis* 接合子”から十分な長さの塩基配列データを得ることができれば、正確な種同定を実施した培養株と分子データで結びつけることで、その実体を明らかにできると考えた。理想的には“*C. nivalis* 接合子”1細胞から塩基配列を得たかつたが、分厚い細胞壁や高密度に蓄積された二次代謝産物のせい、1細胞ゲノム増幅法などを用いても十分な長さの塩基配列を得ることはできな

かつた(松崎 未発表データ)。そこで、ガラスキャピラリーピペットを用いて単一彩雪サンプルから“*C. nivalis* 接合子”を50細胞集めてDNAを抽出し、そのDNAサンプルから複数領域の配列を増幅・決定する方法に切り替えた。その結果、筆者らが分子解析に使用している核 SSU/LSU ribosomal RNA 遺伝子および ITS-2 領域、ならびに葉緑体 *atpB/psaB/rbcL* 遺伝子、合計約7,500塩基対の配列データを各DNAサンプルから決定することに成功した。

上記の手法を用いて得られた日本産“*C. nivalis* 接合子”(図3)の配列データを用いて分子系統解析を実施した結果、それらは2系統に別れ(図4の①と③)、そのうちの1系統(①)は *C. miwae* の日本産培養株2株とともに、小さな単系統群 (Miwa clade, 図4) を形成した。培養株の形態データや高進化速度領域における遺伝的距離の比較から、Miwa clade は単一種 *C. miwae* に相当すると考えられたため、彩雪を引き起こす“*C. nivalis* 接合子”の実体が分子データに基づいて初めて明らかとなった (Matsuzaki *et al.* 2015)。また、今回解析した日本産“*C. nivalis* 接合子”2系統、先行研究で報告された日本産の2系統(図4の②と⑤)、ならびにヨーロッパの1系統(図4の④)はそれぞれ別種に相当するレベルの遺伝的差異をもつことから、“*C. nivalis* 接合子”には少なくとも5種が含まれると考えられた (Matsuzaki *et al.* 2015)。残念ながら日本産の1系統(図4の①, = *C. miwae*) 以外は同一種とみなせる培養株がみつからなかつたため、それらの実体解明は今後の課題である。

C. nivalis と同定できる培養株の探索と “C. nivalis 接合子” との比較

続いて筆者らは、単系統性を示さなかった “C. nivalis の培養株” の分類学的再検討を実施した。海外の藻類系統保存施設が保有する、C. nivalis と標記されていた培養株を購入し、それらの詳細な形態観察を実施した結果、これまで研究に用いられていなかった米国産の1株 (UTEX SNO71) のみが特徴的な逆水滴形の栄養細胞をもち、C. nivalis と同定できることを確認した (ただし有性生殖を誘導できず、本株の接合子の形態は不明)。また、先行研究において C. nivalis として解析された残りの培養株は、実際にはクロロモナスの2未記載種に相当することが栄養細胞と無性生殖の形態形質から明らかとなったため、新種 C. hoshawii および新種 C. remiasii として記載した (Matsuzaki *et al.* 2018) (図4)。一方、分子系統解析の結果、2新種のみならず、C. nivalis と同定可能な米国産培養株でさえも、日本およびヨーロッパ産 “C. nivalis 接合子” とは別種であることが強く示唆された (図4)。

筆者らの研究により、“C. nivalis 接合子” には少なくとも5種が含まれていることが明らかとなった。そのうちの4種が日本という限られた地域からみつかったことを踏まえると、世界各地の彩雪から報告されてきた “C. nivalis 接合子” には更に多くの種が含まれている可能性が高く、接合子の情報に基づいて本種をコスモポリタン種とみなすことには疑問の余地がある。また、今回解析したどの “C. nivalis 接合子” も C. nivalis と同定できる米国産培養株とは系統が異なったため、栄養細胞に基づくそれらの分類学的再検討も必要である。ひょっとしたら、C. nivalis の生活環自体の見直しも必要になるかもしれない。

氷雪藻の多様性解明に向けて

氷雪藻は接合子やシストの状態で見つかることも多く、先行研究で提示された生活環に基づき、どちらかといえば接合子/シストの形態情報が種を識別する上で重要視されてきた。しかしながら、本稿で解説した “C. nivalis 接合子” だけでなく、氷雪藻の他の種の接合子やシストとして同定されてきた彩雪中の不動細胞も、実際には複数の種を内包している可能性が最近報告されている (Matsuzaki *et al.* 2015, Remias *et al.* 2018, Segawa *et al.* 2018)。従って筆者は、氷雪藻も他の微細藻類と同様、栄養細胞に基づいて種を識別すべきであるというスタンスで研究を続けている (e.g. Matsuzaki *et al.* 2014, 2018)。氷雪藻は寒冷適応や有用物質生産などに関する研究材料としても関心を集めており、しかも栄養細胞の培養が比較的容易なことから、氷雪性クロロモナスだけでも100を超える培養株が世界各地の彩雪から確立され、米国の Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin (UTEX)、ドイツの Culture Collection of Cryophilic Algae at the Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology (CCCr) および日本の国立環境研究所微生物系統保存施設 (NIES) などの藻類系統保存施設に保存されている。従って、それらを用いた種レベルの詳細な分類学的研究を実施することで、氷雪藻の

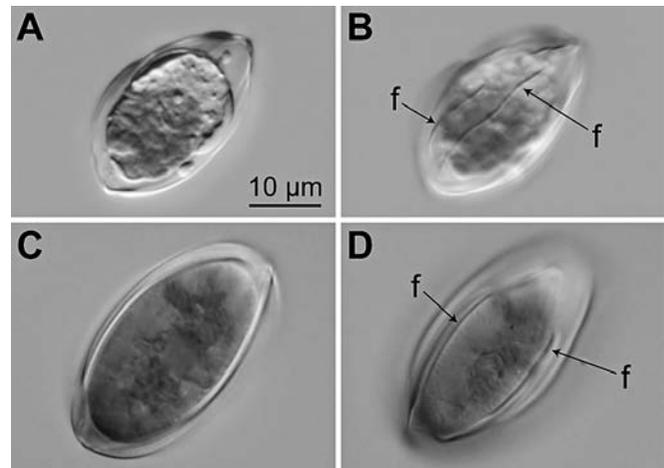


図3. 日本産 “*Chloromonas nivalis* 接合子” の光学顕微鏡写真。写真は全て等倍率。A, B. 山形県の月山で採取した個体 (図2の「接合子」および図4の①に相当)。C, D. 青森県の八甲田山で採取した個体 (図2の「成熟接合子」および図4の③に相当)。AとCは光学切片、BとDは表面観。f, 翼 (flange)。

種を全世界的に明らかにできると思われる。また、氷雪藻の多様性を解明するためには、栄養細胞と接合子の対応関係を調べることも必要である。現状では氷雪藻の生活環を実験的に完結させることができないため、筆者らが実施したような彩雪中の接合子/シストの分子同定法は、実践的かつ有効な解決策と思われる。もちろん、培養株を用いた接合子やシストの形成誘導や、彩雪中の接合子/シストの発芽誘導を実験条件下で完遂できるようにになれば、氷雪藻の種の実体解明は飛躍的に進むため、そのような手法の確立も今後の課題である。

以上のような研究が進み、正確な分類学的情報が整備された培養株/野外サンプルの分子データが蓄積されていけば、近年実施されるようになった、次世代シーケンサーを用いた野外サンプル中の氷雪藻の種組成の網羅的解析 (e.g. Lutz *et al.* 2016, Segawa *et al.* 2018) の精度もより一層向上すると考えられる。氷雪藻の生息域は極域や山岳地域に限られており、地理的な隔離が予想されるため、本生物群は生物地理学的にも非常に興味深い。リファレンスデータを増強し、解析の遅れている中緯度の山岳地域の彩雪サンプルのデータを追加することで、氷雪藻の種分布や地域ごとの種組成についても、全球規模で明らかにできるだろう。筆者も引き続き、世界各地で採集された氷雪藻の培養株と野外サンプルの分類学的研究を進め、それらの形態および分子データを増大させていくことで、今後も氷雪藻の真の多様性解明に貢献していきたい。

謝辞

氷雪藻の分類学的研究を進める上でご指導いただいた原慶明山形大学名誉教授、野崎久義准教授 (東京大学)、および河地正伸室長 (国立環境研究所) に心より感謝申し上げます。また、本稿をまとめる上で多くの有益なご助言をいただいた、仲田崇志特任講師 (慶應義塾大学) にも御礼申し上げます。なお、本稿の内容の一部は JSPS 科研費 (15H06148, 16J09828) の助成を受けたものです。



図4. (左) 緑藻クロロモナスの氷雪性の種の簡易系統樹 [Matsuzaki *et al.* (2018) に基づく]。 *Chloromonas nivalis* とされていた培養株を灰色の背景で、本種の接合子と同定可能な野外サンプルを黒の背景でそれぞれ強調している。(右) *Chloromonas nivalis* とされていた培養株の栄養細胞の光学顕微鏡写真 [Matsuzaki *et al.* (2018, PLoS One 13: e0193603) から引用]。写真は全て等倍率。e, 眼点。n, 核。

引用文献

- Cvetkovska, M., Hüner, N. P. A. & Smith, D. R. 2017. Chilling out: the evolution and diversification of psychrophilic algae with a focus on Chlamydomonadales. *Polar Biol.* 40: 1169–1184.
- Ettl, H. 1983. Chlorophyta. I. Phytomonadina. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H. & Mollenhauer, D. (eds.) Süßwasserflora von Mitteleuropa 9. pp. 1–807. G. Fischer Verlag, Stuttgart.
- Fukushima, H. 1963. Studies on cryophytes in Japan. *Journal of the Yokohama Municipal University. Series C. Natural Science* 43: 1–146.
- Hoham, R. W. & Duval, B. 2001. Microbial ecology of snow and freshwater ice with emphasis on snow algae. In: Jones, H. G., Pomeroy, J. W., Walker, D. A. & Hoham, R. W. (eds.) *Snow ecology: An interdisciplinary examination of snow-covered ecosystems*. pp. 168–228. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hoham, R. W. & Mullet, J. E. 1977. The life history and ecology of the snow alga *Chloromonas cryophila* sp. nov. (Chlorophyta, Volvocales). *Phycologia* 16: 53–68.
- Hoham, R. W. & Mullet, J. E. 1978. *Chloromonas nivalis* (Chod.) Hoh. & Mullet. comb. nov., and additional comments on the snow alga, *Scotiella*. *Phycologia* 17: 106–107.
- Kol, E. 1968. Kryobiologie. Biologie und Limnologie des Schnee und Eises. I. Kryovegetation. In: Elster, H.-J. & Ohle, W. (eds.) *Die Binnengewässer* 24. pp. 1–216 with 16 pls. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obemiller), Stuttgart.
- Lutz, S., Anesio, A. M., Raiswell, R., Edwards, A., Newton, R. J., Gill, F. & Benning, L. G. 2016. The biogeography of red snow microbiomes and their role in melting arctic glaciers. *Nat. Commun.* 7: 11968.
- Matsuzaki, R., Hara, Y. & Nozaki, H. 2014. A taxonomic study of snow *Chloromonas* species (Volvocales, Chlorophyceae) based on light and electron microscopy and molecular analysis of cultured material. *Phycologia* 53: 293–304.
- Matsuzaki, R., Kawai-Toyooka, H., Hara, Y. & Nozaki, H. 2015. Revisiting the taxonomic significance of aplanozygote morphologies of two cosmopolitan snow species of the genus *Chloromonas* (Volvocales, Chlorophyceae). *Phycologia* 54: 491–502.
- Matsuzaki, R., Nozaki, H. & Kawachi, M. 2018. Taxonomic revision of *Chloromonas nivalis* (Volvocales, Chlorophyceae) strains, with the new description of two snow-inhabiting *Chloromonas* species. *PLoS One* 13: e0193603.
- Müller, T., Bleiß, W., Martin, C.-D., Rogaschewski, S. & Fuhr, G. 1998. Snow algae from northwest Svalbard: their identification, distribution, pigment and nutrient content. *Polar Biol.* 20: 14–32.
- Muramoto, K., Kato, S., Shitara, T., Hara, Y. & Nozaki, H. 2008. Morphological and genetic variation in the cosmopolitan snow alga *Chloromonas nivalis* (Volvocales, Chlorophyta) from Japanese mountainous area. *Cytologia* 73: 91–96.
- Remias, D., Jost, S., Boenigk, J., Wastian, J. & Lütz, C. 2013. *Hydrurus*-related golden algae (Chrysophyceae) cause yellow snow in polar summer snowfields. *Phycol. Res.* 61: 277–285.
- Remias, D., Karsten, U., Lütz, C. & Leya, T. 2010. Physiological and morphological processes in the alpine snow alga *Chloromonas nivalis* (Chlorophyceae) during cyst formation. *Protoplasma* 243: 73–86.
- Remias, D., Procházková, L., Holzinger, A. & Nedbalová, L. 2018. Ecology, cytology and phylogeny of the snow alga *Scotiella cryophila* K-1 (Chlamydomonadales, Chlorophyta) from the Austrian Alps. *Phycologia* 57: 581–592.
- Segawa, T., Matsuzaki, R., Takeuchi, N. *et al.* 2018. Bipolar dispersal of red-snow algae. *Nat. Commun.* 9: 3094.
- 竹内望 2010. 雪氷藻類: 色づく雪と氷の不思議. 雪国環境研究 16: 21–35.
- 竹内望 2013. 雪に宿る生命: 雪氷藻類. 極地 96: 3–9.
- Tanabe, Y., Shitara, T., Kashino, Y., Hara, Y. & Kudoh, S. 2011. Utilizing the effective xanthophyll cycle for blooming of *Ochromonas smithii* and *O. itoi* (Chrysophyceae) on the snow surface. *PLoS One* 6: e14690.

(国立環境研究所)