

論文要旨

Comparative molecular and physiological analyses of low salinity adaptation between closely related *Ulva* species in marine and brackish waters.

緑藻アオサ属近縁 2 種間における低塩適応についての分子生物学的・生理学的比較解析
アオサ属の近縁な海産種および汽水産種における低塩適応についての分子生物学的・生理学的比較解析

正清 友香

生物は、温度、光、塩濃度など周囲の環境に影響を受けながら生育する。新しい環境への適応をきっかけに、それまでの個体群と地理的に分断されることで種分化が引き起こされ、生物多様性が増大してきたと考えられる。水域に生育する生物種にとっては、各種環境要因の中でも塩濃度は大きな障壁であり、海水域から汽水・淡水域への低塩適応とその後の種分化は、生物多様性の増大に貢献する興味深い適応進化の事例の一つとされる。また、海水と淡水では含まれるイオンの量に差があり、生物がそれぞれの塩濃度環境に適応するためには、浸透圧調節機構や栄養塩吸収機構など、様々な機構の獲得が必要であると考えられる。このように低塩適応は、その分子機構や分子進化に関して興味深い環境適応の一つであるが、最適な生物材料が少なく、これまでほとんど研究はされてこなかった。

本研究では、緑藻アオサ属の汽水産スジアオノリ (*Ulva prolifera*) と海産ウスバアオノリ (*Ulva linza*) に着目した。両種は、nrITS2 の分子系統解析において同一クレードに収まるほど非常に近縁であることが示され、海産ウスバアオノリから汽水産スジアオノリが種分化したと推察されている。また、実験室内の交雑実験において、汽水産スジアオノリの雌配偶子と海産ウスバアオノリの雄配偶子の組み合わせであれば交雑可能であることが確認されている。しかし、両種は淡水適応能に差があり、両種を淡水条件下で7日間培養すると、汽水産スジアオノリの細胞生存率は7日間でほぼ100%維持されるが、海産ウスバアオノリの細胞生存率は20%ほどに落ちることが知られている。このように汽水産スジアオノリと海産ウスバアオノリは非常に近縁でありながら低塩適応に差があり、低塩適応進化について研究するには最適な生物材料である。

そこで本研究では、汽水産スジアオノリの低塩適応について分子生物学的、生理学的に解明することを目的とし、RNA-seq 解析による低塩適応候補遺伝子の探索、低塩環境下での2

種の成長率と細胞内元素含有量の比較をおこなった。

まず、海水、汽水および淡水条件下で培養した両種藻体の発現遺伝子を RNA-seq により網羅的に解析し、低塩時に発現が増減する遺伝子を選出し、機能解析をおこなった。その結果、選出された遺伝子の大半が機能未知であった中、両種で低塩時に発現が増加する遺伝子には、硫黄を取り込む為の DASS トランスポーターが含まれていた。その他、汽水産スジアオノリでは膨圧調整に関与するような細胞壁の加水分解酵素が含まれており、一方、海産ウスバアオノリではストレス応答タンパク質が多く選出された。また発現が減少する遺伝子には、汽水産スジアオノリでは細胞膜や脂質代謝関係の遺伝子が含まれていた。以上の結果から、汽水産スジアオノリの低塩適応は、不足イオンの効率的な吸収や、細胞壁の修飾による膨圧調整、脂質代謝の調節などによっておこなわれている可能性が示唆された。

低塩適応を分子レベルで解明するためには、汽水産スジアオノリと海産ウスバアオノリの塩濃度変化に伴う生理学的な知見が不可欠であると考えた。そこで次に、0 ~ 30‰ (淡水 ~ 海水) まで 5‰ 刻みの 7 条件の塩濃度環境下において両種藻体を 7 日間培養し、両種の各塩濃度条件での 7 日後の成長率を多重比較検定によって比較した。その結果、汽水産スジアオノリでは各種塩濃度で成長率に有意な差は見られなかった。一方、海産ウスバアオノリでは、0‰ の成長率は他の塩濃度に対して有意に低く、15‰ での成長率は有為に高いという結果が得られた。このことから低塩適応種の汽水産スジアオノリの成長は外界の塩濃度の影響を受けないのに対し、海産ウスバアオノリの成長は外界の塩濃度の影響を受け、15‰ が成長のピークであることが示唆された。

次に、各種培養株の元素含有量の違いを明らかにするため、0, 5, 15, 30‰ の 4 条件の塩濃度環境下において両種藻体を 7 日間培養し、ICP 質量分析装置を用いて、ホウ素、ナトリウム、マグネシウム、リン、硫黄、カリウム、カルシウム、マンガン、鉄、銅、亜鉛の含有量を測定した。測定した元素をすべて足し合わせた合計元素含有量では、海産ウスバアオノリでは 5, 15, 30‰ の塩条件では含有量はほぼ一定に保たれていたが、0‰ では有意に他の条件よりも含有量が低くなり、外界の塩濃度によらず、常に一定の元素量を維持していきたい性質が強いことが推測された。一方、汽水産スジアオノリは 0‰ と 30‰ の条件では含有量に有意差があったが、それ以外の条件間では有意差は見られず、外界の塩濃度に合わせて、体内の元素量変動していることがわかった。また、合計元素含有量を種間で比較すると、0‰ を除いたすべての条件で、海産ウスバアオノリの方が汽水産スジアオノリよりも元素含有量が高く、海産ウスバアオノリでは生育に必要な元素量が汽水産スジアオノリよりも多いことが示唆された。海産ウスバアオノリは、低塩環境下において各種元素の必要量を摂取することができず、低塩環境に適応できない可能性がうかがえた。

上記の結果から、本研究では、汽水産スジアオノリの低塩適応能は、DASS トランスポーター

により不足する硫黄を獲得し、細胞壁関連の加水分解酵素で細胞壁の強度を調節し、脂質代謝関係の遺伝子発現を減少させることによって獲得されたという仮説を構築することができた。また、これらの遺伝子発現によって、外界の塩濃度によらず淡水から海水まで幅広い塩環境で同じように成長でき、体内の塩濃度が変動したとしても生育できるという性質を持ったスジアオノリが海産ウスバアオノリから種分化したと考えられた。今後、マイクロアレイや RT-PCR、遺伝子組換え体の作成を通じ、本研究で選出された淡水適応候補遺伝子の汽水産スジアオノリにおける実際の挙動や機能を確認することが大切である。また、今回測定した元素について、その含有量を調節する機構について探ることで、汽水産スジアオノリの低塩適応の全貌を解明し、植物系統での低塩適応進化の一例として、様々な研究へ貢献したい。