P3

日本産海岸生地衣類の種多様性解明と同定ツールの開発および分類

原田　浩（千葉県立中央博物館植物学研究科）

harada@chiba-muse.or.jp

目的

ほとんどの生物にとって過酷な環境となる、岩石海岸の潮間帯から飛沫帯にかけては、地衣類が卓越し時に明瞭な分布帯（黒色帯，橙色帯，灰色帯，桃・褐色帯）を形成することから（原田 2016，右の図１→），生態学をはじめとする様々な分野において研究対象として期待されるが、国内での研究はほとんど進んでいない。そこで本研究では、その基礎となる種多様性解明を進めるとともに、分類学者以外にも利用可能とするための、図鑑・化学成分データベース・DNA データベースの 3 つの同定ツールの構築を目指した。

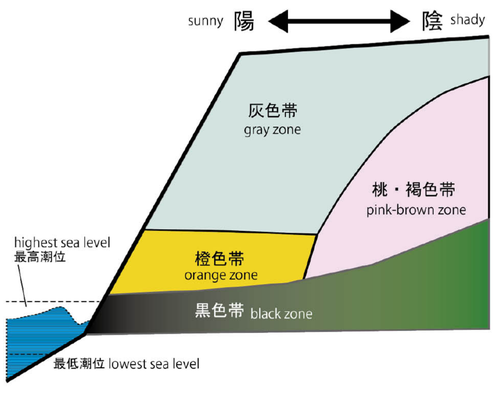


図１．海岸生地衣類の分布帯（模式図）（原田 2016 を一部改変）

研究体制

図鑑・分類チーム
原田 浩（総括）
（千葉県立中央博物館）
坂田 歩美
（千葉県立中央博物館）

DNA チーム
原 光二郎
（秋田県立大学）
（坂田 歩美）

化学成分チーム
木下 薫
（明治薬科大学）
谷川 寛典
（明治薬科大学）
吉川 裕子
（千葉県立中央博物館共同研究員）

図２．研究体制

方法

調査地と材料． 限られた期間内に完結させるため，長崎県周辺・千葉県・秋田県周辺を 3 重点地区として、野外調査を行い採集した新規標本を、「図鑑（分類）」「化学成分」「DNA」の研究に供した。また，補足のため，千葉県立中央博物館に保管されている既存標本を主に「図鑑（分類）」に供した。

化学分析（HPLC/MS）．（LC/MS（HPLC/MS））．新規標本から（葉状地衣の場合は切り取り，痂状地衣の場合はカミソリ等でかきとり）得た試料を実験に供した．試料をアセトンにより抽出し，LC/MS による分析を行い，含有化学成分を同定した．

化学分析（TLC）． キクバゴケ属 Xanthoparmelia（ウメノキゴケ科）の化学分析は，薄層クロマトグラフィー（TLC）を実施した．標本からカミソリ等で切り出した約 1cm 四方の試料を用い，地衣成分分析の TLC の標準的な方法（）に従い，溶媒 A，B′，C を用いた．

DNA 抽出・ITS 配列決定． 新規標本から HPLC/MS 分析のためアセトン等で抽出後の乾燥試料，あるいは採集後まもなく冷凍した（一部は冷蔵，常温保存）試料を用い，市販のキットを用いて DNA を抽出した．その後，地衣菌の核リボソーム DNA の ITS 領域を増幅し，塩基配列を決定し，最終的に公共データベースに登録・公開した．

多様性解明・分類． 新規標本に既存の標本を加え，研究に用いた．外部形態の記載は原則として実体顕微鏡下で乾燥品について行った．内部形態については，実体顕微鏡下でカミソリの刃を用い徒手により切片を作製し，GAW 液（glycerol: ethanol: water= 1: 1: 1）で封入し軽く加熱し気泡を除き GAW 標品とした．更にこの封入液を水に置き換え，次いでエタノール，最後にラクトフェノールコットンブルー（LPCB）液へと置き換え，LPCB 標品を作製した．GAW 標品と LPCB 標品を生物顕微鏡下で観察し，記載を行った．

図鑑作成． 図鑑作成．把握した種について，図と記載からなる印刷物として公表するとともに，ウェブ図鑑を制作した．写真撮影は，現地での生態写真の撮影した．採取した標本の外部形態を千葉県立中央博物館内で実体顕微鏡下で撮影し，Adobe® Photoshop による画像処理（深度合成，色彩補正等）を施して原図とした．内部形態については，実態顕微鏡下でカミソリの刃を用いて切片を作製し，GAW（グリセリン：水：エタノール＝１：１：１），ヨード液(I 液)（ルゴール氏液 1/2 希釈液），LPCB（ラクトフェノールコットンブルー）により封入した切片を用い，生物顕微鏡下で撮影した．子器切片全形図については，Adobe® Photoshop により，複数写真を単一画像に合成し，原図とした．

結果と考察

日本産海岸生地衣類として 16 科 31 属 51 種を同定し（），この他未同定種として 10 種以上を認めた。同定された 51 種について図（写真）と記載をそろえ、群ごとに図鑑として誌上で公表するとともに、ウェブ図鑑の公開準備を進めた。未同定種についても同様に進めている。DNA バーコーディングを目的として、約半数の 24 種の ITS 領域を取得し、データベース公開の準備を進めた。化学成分（HPLC/MS 等）は、ダイダイゴケ科等について解析を概ね完了し、残る群についてもまもなく完了する予定である。

1．多様性解明・分類

（1）分類群数．本研究により，日本産海岸生地衣類として認識された種は右の Table 1 に示した 12 目 20 科 42 属 73 種であった．このうち，同定できたのは 11 目 17 科 34 属 55 種である（同 Table の列「同定」）．

（2）科ごとの状況．

①Acarosporaceae，Lichinaceae，Peltulaceae，Megasporaceae：海岸以外も含めて国内での分類の研究がほとんど進んでいない群であり，確認された種の同定はほとんどできていない．今後の分類学の課題が明らかになった．

②Roccellaceae：　共同研究者の坂田が，日本産本群の分類を進めており，海岸生種についても徐々に分類が明らかにされつつある．今回は Enterographa leucolyta のみ詳細に明らかにし，1 種を除き DNA 情報を取得できた．

③大型地衣（Caliciaceae の一部，Physciaceae，Parmeliaceae，Ramalinaceae，Collemataceae，Pannariaceae）：海岸生以外も含めて国内での分類がほぼ明らかな群．Ramalinaceae は新知見は無かったが，他の科については実際に海岸に産する種を初めて明らかにすることができた．中には，日本で 2 例目となる，Collema furfuraceum も発見された．

④被果地衣類（Xanthopyreniaceae，Porinaceae，Thelenellaceae，Strigulaceae，Verrucariaceae）：　原田がこれまでに継続的に日本産種を研究し続けた群．Verrucariaceae についてはこれまで半数以上の種を明らかにしていたが，今回，4 種を追加し海岸生種を概ね網羅した．

⑤Lecanoraceae：このうち Lecanora 属については，海岸生以外も含む日本産本群は一通りは分類が明らかにされたとされていたが，認められた 5 種のうち 1 種を除けば，同定できなかった．海岸生種はほとんど研究されていなかったと推察された．

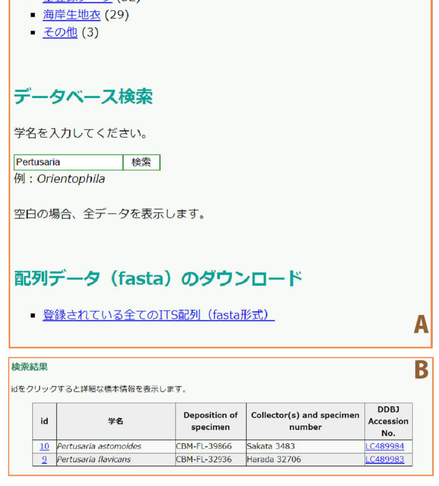
（3）全群を通して．日本産海岸生地衣類の概要はつかめたと思われる．

2．化学成分

2－1．TLC.

Xanthoparmelia：X. saxeti を除くと，形態のみからの種間の区別が困難で，化学成分の検査が必須の群である．同定に際し TLC は威力を発揮した．本群を同定するツールとして TLC のマニュアルを整備の所である．

2－2．LC-MS.（※LC/MS の分析は，本研究費を使用せず実施した．詳細は割愛）



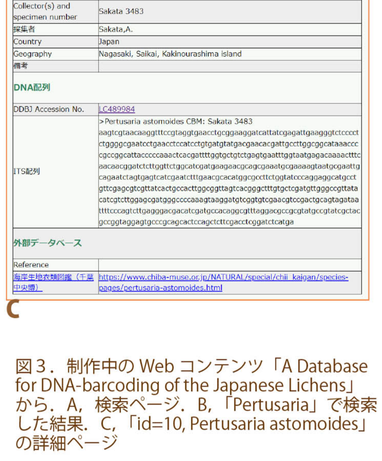


図３．制作中の Web コンテンツ「A Database for DNA-barcoding of the Japanese Lichens」から，A，検索ページ，B，「Pertusaria」で検索した結果，C，「Id=10, Pertusaria astomoides」の詳細ページ

3．DNA

（1）ITS 領域のデータを得た種数．本研究により，日本産海岸生地衣類として認識された種のうち 27 種について，ITS 領域を解読し，公共データベースに登録，あるいは登録準備中である（右の Table 1 に示した「DNA」列の○印の種）．また，このほかに，11 種からデータを得たが，登録の前に分類を検討中である（Table 1「DNA」列の◇印）．さらに 2 種（△印）については，先行研究によって，あるいは非海岸生標本からデータを得ている．

（2）　データベース公開：以下のサイトで準備中．
「A Database for DNA-barcoding of the Japanese Lichens」（図 3）
http://www.lichenology-jp.org/dna/index.php

（3）群ごとの問題点

①Teloschistaceae：　近年，分子系統情報の成果として多数の属に分けられ，その把握が困難となっていた．今回，ITS の解読に成功したことで，分類・同定に大きく貢献できた．Orientophila 属では，新種とみられる複数種が DNA から認識され，その分類を研究中．

②Parmeliaceae のうち，Xanthoparmelia：　形態と化学成分から認識された種が，ITS によって支持されなかった．どう解釈すべきか，結論を得ていない．

③Verrucariaceae：ヨーロッパ産と共通とみられた種が，別種であることが判明した例を明らかにした．これらの分類は再検討中である．

④Xanthopyreniaceae，Verrucariaceae の一部，他：　地衣体が極めて薄いため，他群に比べ十分な試料を得ることができないことが，良好な結果を得ることができない原因になったと考えられる．

（4）全群を通して．分類群が多数の目にわたったこと，また先行データ（特に日本産種）がない，あるいは少ない群も多く，群ごとに実験条件を検討する必要があった．

4．日本産海岸生地衣類図鑑

群ごとに「海岸生地衣類図鑑」（Illustrated flora of marine and maritime lichens of Japan）の表題の下，図と記載を伴う論文を日本地衣学会の会誌 Lichenology（ライケノロジー）に投稿（成果論文１～４）または準備中（５～８）である．

これと並行し，分類群として認識された種に基づくウェブ図鑑の整備を進め，千葉県立中央博物館のデジタルミュージアムのコンテンツ「海岸生地衣類」として公開を予定している．図鑑としては，確認された全種の掲載を目指している（一例を図４↓に示す）．更に海岸における地衣類の分布帯を紹介したり，景観写真を掲載し，海岸生地衣類への理解を深める手助けをする．また，DNA データベースへのリンクを張って，情報を相互活用し，同定ツールとしての高度化を図る．

このコンテンツは，公開準備中であり，ＵＲＬを掲載できない．代わりに，関連する以下の 2 つのコンテンツを紹介する．

1）「房総の地衣類誌」
https://www.chiba-muse.or.jp/NATURAL/special/chii_boso/boso-index.html

2）「日光の地衣類」
https://www.chiba-muse.or.jp/NATURAL/special/chii_nikko/nikko-index.html

図４．制作中の Web コンテンツ「海岸生地衣類」から種のページとして Oxneriopsis yeosuensis ニチリンダイダイゴケを例示

Table 1．日本産海岸生地衣類の種，同定状況，図鑑，DNA

目/科　種名	和名	同定	図鑑	DNA	ノート
Acarosporales/ Acarosporaceae					
Acarospora sp. 1	ホウネンゴケ		◇		
Acarospora sp. 2	ホウネンゴケ属		◇		新種か日本新産
Arthoniales/ Roccellaceae					
Enterographa leucolyta (Nyl.) Redinger	イソクチナワゴケ	○	○	○	
Enterographa sp.				○	日本新産
Graphidastra japonica A.Sakata & H.Harada	タツゴケ	○	○		
Lecanographa sp.				◇	分類検討中
Opegrapha sp.				◇	分類検討中
Roccellina niponica (Nyl.) Tehler	ヘリプトゴケ	○	○	○	
Caliciales/ Caliciaceae					
Buellia yoshimurae A.Higashi et al.	ハマスミイボゴケ	○	○	△	△：先行研究により取得
Dirinaria applanata (Fée) D.D.Awasthi	コフキザリナリア	○	○		論文1
Pyxine endochrysina Nyl.	ウチキクロボシゴケ	○	○		論文1
Caliciales/ Physciaceae					
Phaeophyscia exomatula (Zahlbr.) Kashiw.	チチレクロウラムカデゴケ	○	○		論文1
Phaeophyscia limbata (Poelt) Kashiw.	クロウラムカデゴケ	○	○	○	論文1
Phaeophyscia spinelllosa Kashiw.	ナメラクロウラムカデゴケ	○	○	○	論文1
Physcia albicans (Pers.) J.W.Thomson	シマムカデゴケ	○	○		論文1
Physciella melanchra (Hue) Essl.	ムカデコゴケ	○	○		論文1
Rinodina sp.	ビスケットゴケ属				
Collemopsidales/ Xanthopyreniaceae					
Collemopsidium halodytes (Nyl.) Grube & B.D.Ryan	イソシズミゴケ	○	○		論文3
Collemopsidium sublitorale (Leight.) Grube & B.D. Ryan	モグリイソシズミゴケ	○	○		国内初めての詳細な記録．論文3
Lecanorales/ Lecanoraceae					
Lecanora kurokawae Shiba et al.	コナハマチャンブゴケ	○	○	○	
Lecanora sp. 1 (*L.* cf. *subimmergens*)			◇	◇	
Lecanora sp. 2			◇	◇	新種か日本新産
Lecanora sp. 3			◇	◇	新種か日本新産
Lecanora sp. 4			◇	◇	新種か日本新産
Lecidella enteroleucella (Nyl.) Hertel		○	○	○	
Protoparmeliopsis muralis (Schreb.) M.Choisy	キクバチャシブゴケ	○	○	○	
Lecanorales/ Parmeliaceae					
Myelochroa leucotylíza (Nyl.) Elix & Hale	ヒカゲウチキウメノキゴケ	○	○		論文1
Parmotrema tinctorum (Nyl.) Hale	ウメノキゴケ	○	○	○	論文1
Xanthoparmelia botryoides Kurok.	フサナリキクバゴケ	○	○	◇	論文1．◇：要検討
Xanthoparmelia claviculata Kurok.	ノルロバリドンキクバゴケ	○	○	◇	論文1．◇：要検討
Xanthoparmelia coreana (Gyeln.) Hale	ウスイロキクバゴケ	○	○	◇	論文1．◇：要検討
Xanthoparmelia saxetii (Stizenb.) G.Amo et al.	ハマキクバゴケ	○	○	○	論文1
Lecanorales/ Ramalinaceae					
Ramalina litoralis Asah.	イソカラタチゴケ	○	○		論文1
Ramalina siliquosa (Huds.) A.L.Sm.	ハマカラタチゴケ	○	○	○	論文1
Toninia sp.	フジカワゴケ属		◇	◇	新種か日本新産．◇：分類要検討
Lichinales/ Lichinaceae					
Lichinaceae sp.			◇		新種か日本新産
Pyrenopsis conturbatula Nyl.	モツレノリ	○	○		1890年に記載されて以来，不確かな記録しかない．論文4
Lichinales/ Peltulaceae					
Peltula sp.	タテゴケ属		◇		新種か日本新産
Ostropales/ Graphidaceae					
Diploschistes candidissimus (Kremp.) Zahlbr.	キッコウゴケ属	○	○	○	日本新産
Ostropales/ Porinaceae					
Porina guentheri (Flotow) Zahlbr.	クロマルゴケ	○	○		論文3
Porina leptalea (Durieu & Mont.) A.L.Sm.	コマルゴケ	○	○		論文3
Ostropales/ Thelenellaceae					
Thelenella luridella (Nyl.) H.Mayrhofer	オオアミゴケ	○	○		論文3
Peltigerales/ Collemataceae					
Collema furfuraceum (Schaer.) Du Rietz	フクレトゲカワホリゴケ	○	○		国内2例目．初めての詳細な記録．論
Collema subflaccidum Degel.	トゲカワホリゴケ	○	○		論文1
Peltigerales/ Pannariaceae					
Pannaria lurida (Mont.) Nyl. subsp. *lurida*	テツイロハナビラゴケ	○	○		論文1
Pertusariales/ Megasporaceae					
Circinaria sp.			◇	◇	新種か日本新産．◇：分類要検討
Pertusariales/ Pertusariaceae					
Ochrolechia parellula (Müll.Arg.) Zahlbr.	イワニクイボゴケ	○	○	○	
Pertusaria astomoides Nyl.		○	◇	○	
Pertusaria flavicans Lamy	モエギトリハダゴケ	○	○	○	
Pertusaria subobductans Nyl.	ヒメコブトリハダゴケ	○	◇		
Strigulales/ Strigulaceae					
Strigula maritima H.Harada	シオマンジュウゴケ	○	○		論文3
Teloschistales/ Teloschistaceae					
Loekoesia austrocoreana S.Y.Kondr. et al.	コフキコゲチャダイダイゴケ	○	○	○	日本新産．論文5
Mikhtomia multicolor (Hue) S.Y.Kondr. et al.	クロズミダイダイゴケ	○	○	○	日本新産．論文5
Orientophila sp. 1			◇	○	新種？．論文準備中
Orientophila sp. 2				○	新種？
Orientophila sp. 3			◇	○	新種？．論文準備中
Orientophila sp. 4			◇	○	新種？．論文準備中
Orientophila subsoopularis Arub & Frisch	イソダイダイゴケ	○	○	○	論文5
Oxneriopsis yeosuensis S.Y.Kondr. et al.	ニチリンダイダイゴケ	○	○	○	日本新産．論文5
Yoshimuria spodoplaca (Nyl.) S.Y.Kondr. et al.	シロイソダイダイゴケ	○	○	○	論文5
Zeroviella mandschurica (Zahlbr.) S.Y.Kondr. & Hur	オオロウソウゴケ	○		△	△：非海岸生標本より取得
Verrucariales/ Verrucariaceae					
Hydropunctaria amphibia (Clemente ex Ach.) Cl. Roux	オオゴマダラゴケ	○	○	○	新種（別名で記載中）．論文2
Hydropunctaria maura (Wahlenb.) C.Keller et al.	キッコウゴマダラゴケ	○	○		論文2
Verrucaria ditmarsica Erichsen	ゴマダラウラボイボゴケ	○	○	○	日本新産．論文2
Verrucaria fuscella (Turner) Winch	キッコウアナイボゴケ	○	○	○	論文2
Verrucaria halizoa Leight.	ウシオイボゴケ	○	○		学名の変更．論文2
Verrucaria iwatsukii H.Harada	イワツキハマイボゴケ	○	○		論文2
Verrucaria marinomuralis H.Harada	ハマイボゴケ	○	○		論文2
Verrucaria miyagiensis H.Harada	ミヤギウシオイボゴケ	○	○		論文2
Verrucaria praeviella H.Harada	サイゴウハマイボゴケ	○	○	○	論文2
Verrucaria sandstedei B. de Lesd.	ヒメウシオイボゴケ	○	○		学名の変更．論文2
Verrucaria sanrikuensis H.Harada	サンリクハマイボゴケ	○	○	○	論文2
Verrucaria submicrospora Nyl.	モグリウシオイボゴケ	○	○		論文2

成果論文

1）原田浩・坂田歩美・吉川裕子．2020. 日本産海岸生地衣類図鑑（1）．大型地衣類．Lichenology 18(2): 59-78.
2）原田浩．2020. 日本産海岸生地衣類図鑑（2）．アナイボゴケ科．Lichenology 18(2): 79-97.
3）原田浩：日本産海岸生地衣類図鑑（3）：被果地衣類．Lichenology（投稿中）
4）Harada H.：Illustrated flora of marine and maritime lichens of Japan (0). Pyrenopsis conturvatula (Lichinaceae). Lichenology（投稿中）
5）Harada H. & Hara K.: Marine and maritime lichens of Japan (0), Hydropunctaria ●●● sp. nov. Lichenology（投稿準備中）
6）Sakata A., Hara K., Harada H., Tanikawa H. & Kinoshita K.: Taxonomic study on the lichen family Roccellaceae s. lat. (lichenized Ascomycota, Arthoniales) of Japan (7). Enterographa leucolyta. Lichenology（投稿準備中）
7）坂田歩美・原光二郎・原田浩・谷口貫・谷川寛典・木下薫．日本産海岸生地衣類図鑑（0）．ダイダイゴケ科．Lichenology（投稿準備中）
8）坂田歩美・原光二郎・原田浩・谷口貫・谷川寛典・木下薫・吉川裕子．日本産海岸生地衣類図鑑（0）．トリハダゴケ属 Pertusaria．Lichenology（投稿準備中）

引用文献

Culberson C.F. 1972. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. J. Chromatography 72: 113-125.
Culberson C.F. & Johnson A. 1976. A standardized two dimensional thin-layer chromatographic method for lichen products. J. Chromatography 128: 253-259.
Culberson C.F. & Johnson A. 1982. Substitution of methyl tert. butyl ether for diethyl ether in the standardized thin-layer chromatographic method for lichen products. J. Chromatography 238: 483-487.
Culberson C.F. & Kristinsson H.D. 1970. A standardized method for the identification of lichen products. J. Chromatography 46: 85-93.
原田浩．2016. 日本産海岸生地衣類，垂直分布帯と種多様性（予報）．Lichenology 14(2): 163-166.