

機関番号：13101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20770064

研究課題名 (和文) 褐藻ワカメにおける温度要求性と集団間の遺伝的分化の相関

研究課題名 (英文) Genetic differentiation and Temperature requirement for maturation in *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae)

研究代表者

上井 進也 (UWAI SHINYA)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：00437500

研究成果の概要 (和文)：

北関東地方の野生ワカメ集団の遺伝的構造についてミトコンドリアマーカーおよび核ゲノムコードのマイクロサテライトマーカーを用いて解析を行った。小名浜、十王、大洗、銚子、勝浦の5集団のそれぞれから30-50個体を採集し、解析にかけた。ミトコンドリアにおいても核マイクロサテライトマーカーにおいても、小名浜集団は、マイクロサテライトでFst値が0.46-0.56と、他の4集団との間に顕著な分化をしめた。小名浜集団は、ミトコンドリアハプロタイプにおいては、他の4集団との間に共通するものはみられなかったが、マイクロサテライトの対立遺伝子においては、特に十王や大洗と共通するものが見られた。これらの結果は、ミトコンドリアマーカーの解析から知られていた遺伝的構造が核ゲノムにおいてもみられること、また卵配偶を行う本種における遺伝子流動が、メス配偶子や遊走子よりも、雄配偶子において生じていることを示唆している。

研究成果の概要 (英文)：

Genetic differentiation among the wild populations of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae) was analyzed using mitochondrial and nuclear SSR markers in northern Kanto. 30-50 plants were collected from each of five populations (Onahama, Ju-oh, Oharai, Choshi, Katsu-ura; north to south), among which the Onahama population was highly differentiated with the Fst values of 0.46-0.56 in SSR. Any mitochondrial haplotypes of the Onahama population were not shared with other populations, but some alleles of SSRs were common among Onahama, Ju-Oh and Oharai. These results suggests that the genetic structure reported based on the mitochondrial marker could be observed in nuclear markers, and that the gene-flow of this oogamous species might be occurred by male gametes rather than the female gametes and zoospores.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：種分化、藻類

1. 研究開始当初の背景

褐藻ワカメは、日本沿岸に広く分布する大型藻である。日本沿岸のワカメ集団においては、ミトコンドリアハプロタイプの分布に顕著な地理的構造が知られており、ワカメ集団内に複数の遺伝的集団が存在することが示唆されていた。これらのミトコンドリアハプロタイプ間の遺伝的距離は、ワカメと近縁種ヒロメ間の距離と遜色がなく、集団分化の程度がかなり進んでいることが示唆されている。

2. 研究の目的

研究の目的は、ミトコンドリアハプロタイプの違いとして検出される地理的グループが、「種」と呼べる状態にあるのか、あるいはミトコンドリアハプロタイプに見られる遺伝的分化は過去の分断の名残であり、現在は同種集団として遺伝的交流があるのか、の確認であり、地理的グループの間の遺伝的関係（分化および遺伝子流動の程度）と、生殖隔離機構として働くような生理的分化の有無の解明をめざした。

過去にミトコンドリアハプロタイプで報告されている集団分化は、サンプリングのメッシュが荒く、またミトコンドリアマーカのみであるため、集団構造の実態が把握されているとは言い難い。核ゲノムコードのマーカをもちい、また対象地域を限定することで、野生ワカメにおける集団構造の詳細を明らかにするとともに、集団構造を維持する生理的要因の有無について明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

サンプリングポイントとしては、2つのミトコンドリアハプロタイプの分布境界である北関東から東北地方の5地点（福島県小名浜、茨城県十王、茨城県大洗、千葉県銚子、千葉県勝浦；図1）から30-50個体のワカメ胞子体を採集するとともに、遺伝的構造を比較するため、研究協力者に依頼し、三重県の5地点からワカメおよびヒロメを採集した。

北関東の5地点については、胞子体葉片をDNA抽出用に採集するのみではなく、成熟藻体から遊走子を単離し、培養株を確立することで、生理的比較にも用いた。

遺伝的解析のマーカは、ミトコンドリアハプロタイプについては、cox3 遺伝子および tRNA 遺伝子領域を用いた。tRNA 遺伝子群のスペーサーに存在する20塩基の挿入/欠失を電気泳動で判別することで大部分のサンプルのハプロタイプを決定した。また、一部の個体については、cox3 遺伝子および tRNA 遺伝子領域（合計908塩基対）の塩基配列を決定も行った。核コードのマーカとしては、すでに発表されているマイクロサテライトマーカ4座位（Daguin et al. 2005. Cons.



図1. 北関東沿岸におけるサンプリング地点（赤丸）

Genet. 6: 647-650) を用いた。

生理的分化の比較としては、各地点の配偶体について、成熟（雌性配偶体における造卵器形成）にかかわる温度要求性を検討した。温度条件については、正確を期すために Morita et al. (2003, Phycol. Res. 51; 154-160) に記載されている装置と同様のものを作成し、10℃から22℃まで、3℃間隔で培養し、実験開始から2週間後の成熟率を測定、比較した。培養実験に用いた株は、集団としての特徴をみるために、単一個体由来の株のみを用いるのではなく、各集団から単離した雌配偶体を複数株混合して用いた。

4. 研究成果

遺伝的解析

小名浜（40個体）、十王（45個体）、大洗（43個体）、銚子（46個体）、勝浦（51個体）について、遺伝的解析を行った。

ミトコンドリアハプロタイプについては、上記のうち106個体のハプロタイプをバンド解析により決定した。加えてそのうちの46個体については塩基配列決定も行い、過去に報告されたハプロタイプとの比較を行った。結果としては、福島県小名浜の集団（34個体）のみが、勝浦から十王までの集団とは大きく

異なるハプロタイプを持っていることが明らかになった。十王集団 (33 個体) も大洗 (15 個体)・銚子 (14 個体)・勝浦 (10 個体) とは 1 塩基のみ異なるハプロタイプを持っていたが、小名浜はこれらとは 10 塩基以上異なっており、明確に区別することができた。また合計で 67 個体が調べられているにも関わらず、小名浜-十王間でハプロタイプの共有は確認されなかった。この結果はすでに報告されている顕著な地理的構造が、より詳細な地理的スケールでも見られることをしめすものである。

核ゲノムコードのマイクロサテライト解析については、各遺伝子座において 3-8 対立遺伝子を確認することができ、対立遺伝子頻度の比較から、いずれの遺伝子座においても、小名浜が他の 4 集団とは大きく異なる対立遺伝子頻度をもつという結果を得た。集団分化の程度を比較すると、 F_{st} 値では、小名浜と他の 4 集団の間には 0.46-0.56 という大きな値が見られるのに対し、十王から勝浦までの 4 集団からは 0.06-0.09 という比較的小さい値がみられるのみで、小名浜が核ゲノムにおいても明瞭な分化をとげていることが明らかになった。解析ソフト Structure v. 2.3 を用いたアサインメント解析では、サンプル 225 個体は 2 つのグループに分けられ、小名浜集団からサンプリングした個体が、他の 4 集団からサンプリングされた個体から明確に区別されることが示された (図 2)。最適なグループ数を示す指標となる ΔK は $K=2$ の時最大で、サンプルが 2 グループに分けられることが示唆され、また $K=3$ 以上とした場合においても、勝浦から十王までの 4 集団が、さらに細分されることはなく、小名浜集団が他の 4 集団から区別されること、および勝浦から十王までの 4 集団が細分化できないことが示された。ただし、細かく対立遺伝子頻度をみると、とくに十王や大洗のように小名浜に地理的に近い集団では、小名浜に優占する対立遺伝子が、低頻度で観察され、アサインメント解析においても、十王と大洗集団には小名浜集団が属する遺伝的グループへの帰属が示唆される個体が確認された。これらの結果から、とくに地理的に近接した十王や大洗集団においては、小名浜集団と間に交雑が生じている可能性が示唆された。また、解析ソフト Bayseass v. 1.3 を用いて、最近の数世代における遺伝子流動 (移住率 m) を推定したところ、遺伝的グループ間 (小名浜とそれ以外) では、 $m=0.002-0.008$ 、グループ内 (勝浦-十王の 4 集団間) では $m=0.002-0.146$ という数値を得た。ただし勝浦-十王の 4 集団間にあっても、大洗-十王 ($m=0.100$) や銚子-十王 ($m=0.146$) にみられる大きな値以外は、小名浜との間にみられる値と差はなく、アサインメント解析で認識された遺伝的グ

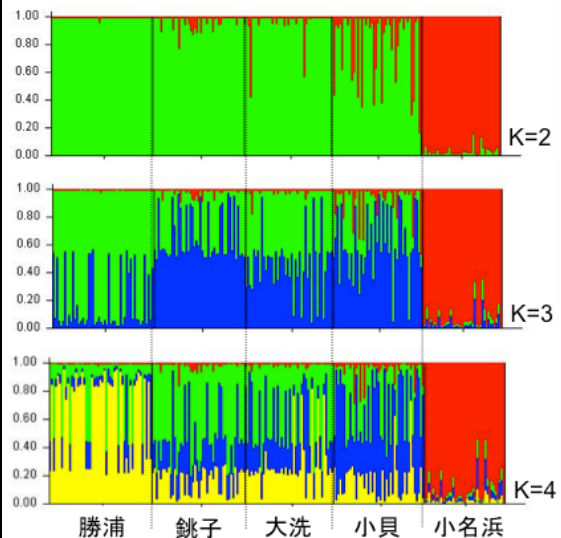


図 2. グループ数 2-4 におけるアサインメント解析の結果 (Structure v. 2.3 による)。K は、グループ数を表す。縦の細いバーが 1 個体を示しており、バーの色が、個体の所属する遺伝的グループを表す。

ループ間で、とくに遺伝子流動が制限されているという結果は得られなかった。また今回得られた移住率 (m) は、同じコンブ目の *Macrocystis pyrifera* で報告されている値 ($m=0.02-0.08$; Alberto et al. 2011. Mol. Eco. 20: 977-984) と同程度で、コンブ目における一般的な数値と考えることができる。

培養実験

培養実験においては、予備実験により実験開始後 2 週間程度で成熟率が安定することを確認したため、本実験では実験開始後 16 日目の成熟率を測定して、比較を行った。いずれの集団由来の株も、13、16、19°C においては高い成熟率 (70-90%) をしめし、集団間で明確な差は観察されなかった。ただし、22°C においては、小名浜の成熟率の低下 (約 40%) がみられ、70-90% の成熟率がみられた他の集団との間に違いがみられた。東北から北海道という北日本に分布する地理的グループに属する小名浜集団にくらべ、他の北関東の集団が高温条件下において高い成熟率を見せたことは、環境への適応、生理的分化という意味で興味深い結果である。一方で、より低温域では、小名浜と他の北関東集団の間には成熟率の違いは見られず、生殖隔離機構として働くことが期待できるような温度要求性の分化は確認できなかった。

まとめ

本研究により、ミトコンドリアハプロタイプの分化から認識されている地理的グループはより詳細な地理スケールにおいても明確

な分化を示すことが明らかになった一方で、地理的グループ内で生じているものと同程度の、遺伝子流動が起こっていることが確認された。今回の培養実験の結果のみから、地理的グループ間に生殖隔離機構が存在しないと結論づけることはできないが、少なくとも遺伝的解析からは、グループ間での遺伝子流動が存在することが示唆された。ミトコンドリアマーカールに見られる塩基置換数を考慮すると、地理的グループにみられる遺伝的分化は、現在進行中のものと言うよりは、かつてなんらか（例えば最終氷期のような）の要因によって隔離されていた名残であると考えられ、地理的グループは遺伝的交流をもつ同種の異所的集団と見なすべきであると考えられる。小名浜を含む北日本グループにくらべ、北関東のグループがより高温に適応していることも示唆されたが、これと同様の結果は、三重県におけるワカメと近縁の別種とされるヒロメの間でも報告されており（Morita et al. 2003, Phycol. Res. 51: 154-160）、ワカメとヒロメの間の遺伝子流動の有無や両種の独立性について興味もたれる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計1件）

1. 上井進也：日本沿岸における海藻の地理的構造 BSJreview 1 (2010) : 57-65 査読無し

〔学会発表〕（計3件）

1. 上井進也：遺伝子マーカーでみる海藻の集団構造と動態 日本植物学会第74回大会 2010年9月 中部大学

2. 江村望・森田晃央・倉島彰・上井進也：北関東沿岸における褐藻ワカメ集団の遺伝的分化の解析 日本藻類学会第34回大会 2010年3月 筑波大学

3. UWAI S., EMURA N., MORITA T., KURASHIMA A., KAWAI H.: The genetic structure of *Undaria* species around Japan. International Phycological Congress 2009, 2009年8月 国立オリンピック記念青少年総合センター, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上井 進也 (UWAI SHINYA)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：00437500

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：