

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570084

研究課題名（和文） 褐藻カヤモノリにおける種生物学的研究

研究課題名（英文） A study of species biology on a brown alga *Scytosiphon lomentaria* in Japan

研究代表者

小亀 一弘 (KOGAME KAZUHIRO)

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：80215219

研究成果の概要（和文）：種は、生物の多様性を認識するときの基本的な単位である。しかし、種の境界が曖昧な状態がしばしば観察される。カヤモノリは世界中の温帯・寒帯海岸に広く分布する褐藻類で、形態から 1 種と考えられてきた。本研究では、日本産カヤモノリについて、遺伝子の DNA 塩基配列の解析と交雑実験を行い、その中には少なくとも 3 種が含まれていること、そのうち 2 種は非常に近縁で実験下では交雑可能であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Species is a fundamental unit for understanding of biodiversity. But, we sometimes encounter species whose species boundary is unclear. *Scytosiphon lomentaria* is a brown alga that is distributed in cold and warm waters worldwide and is recognized as a single species. In this study, molecular analyses of DNA sequences of some genes and cross experiments were carried out in *S. lomentaria* from Japan. The results suggested that Japanese *S. lomentaria* includes three species at least and that two species of them are very closely related and are able to cross between them in laboratory.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：隠蔽種、生殖隔離、ハプロタイプ、交雑実験、褐藻、カヤモノリ

1. 研究開始当初の背景

褐藻類は、海産の多細胞性藻類で、黄金色藻類、珪藻類などとともに不等毛植物に属する。コンブ、ホンダワラ、ヒバマタなど大形の種類は、沿岸生態系の主要な構成要素となっている。褐藻カヤモノリは世界中の温帯および寒帯海域沿岸に分布し、日本でも九州から北海道まで普通に生育する種類である。しかし、

申請者が関わる研究で、世界中から広く集めたサンプルについて *rbcL* の塩基配列を比較したところ、太平洋と大西洋では配列の相違度が大きく、明らかに別種であることがわかっていく。日本のカヤモノリについては申請者がさらに調べ、核リボソーム遺伝子の ITS2 領域とミトコンドリアゲノムの *cox3* 遺伝子の系統解析を行った。その結果、ITS2 には 8 つのハプロタイプ型 (A-H) がみられ、*cox3*

には 11 のハプロタイプ型 (K-V) がこれまで明らかになっている。また、ITS2 領域と *cox3* のハプロタイプ型の各個体内での組み合わせを見ると、ある特定の組み合わせしか見られない。ITS2 領域と *cox3* (母性遺伝) は独立に遺伝するため、ある特定の組み合わせしか見られないことは、遺伝子流動が何らかの原因により妨げられていることを示している。ITS2 領域と *cox3* のハプロタイプ型の特定の組み合わせから、3 つのグループ (I, II, III) が仮定され、それらのハプロタイプ型の組をかつこ内に示すと次のようになる: I (H-U, H-V), II (A-K, A-M, A-N), III (F-L, G-L, G-S)。I は北海道、本州、九州に、II, III は北海道と本州日本海側に分布し、分布の重なりがあるにもかかわらず交雑タイプの組み合わせは見つかっていない。培養株を用いて交雑実験を行ったところ、その結果はこれら 3 つのグループがそれぞれ交配群であることを支持している。また、どのグループにも属さないハプロタイプ型の組み合わせ (B-T, C-Q, D-P, E-R) があり、第 4 のグループの存在も示唆されている。

カヤモノリは、普通種で採集が容易であること、培養株を用いて交雑実験ができること、核相が単相である配偶体を遺伝子解析に使えること、隠蔽種または半種が実際に複数存在することなどから、褐藻類の種生物学的研究を行う対象として大変優れている。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究結果を種生物学的研究として発展させるため、以下の課題に取り組むことを目的とした。

(1) 生殖隔離機構の解明

褐藻類の受精には、いくつかの段階があり、同形配偶であるカヤモノリの場合は、まず、メス配偶子が基物に付着しオス配偶子を誘引する性フェロモンを放出する。オス配偶子は性フェロモンに誘引され、次に前鞭毛でメス配偶子に付着する。多数のオス配偶子が存在するときには、1 つのメス配偶子に多数のオス配偶子が鞭毛で付着した状態となる。オス配偶子はそのまましばらく運動を続け、次に 1 つのオス配偶子が細胞本体をメス配偶子に近づけ接触させ、細胞融合が起こる。

これまでの交配群間の交雑観察では、オス配偶子が前鞭毛でメス配偶子に付着しない場合と、オス配偶子が前鞭毛でメス配偶子に付着するが細胞融合に至らない場合が観察されている。これは、交配群間により生殖隔離機構がどの段階で起こっているのか異なっていることを示している。今回の研究では、交配群間交雑時の配偶子の振る舞いをより詳細に観察・記載し、各交配群間での生殖隔離機構がどこに存在するのかを明らかにす

る。

また、グループ II と III の交雑では、II メス×III オスでは接合子は形成されないが、雌雄を逆にした交雑では接合子が形成される。グループ II と III は分布が重なっているが、ITS2 領域と *cox3* のハプロタイプ型の組み合わせからは遺伝子流動は見つかっていない。従って、グループ II と III の間では、接合後隔離機構の存在も予想される。交雑で得られた接合子を培養し、その後の発達を観察して、接合後隔離機構が存在するかどうか、また、どの段階で接合後隔離機構が働いているのかを明らかにする。

(2) フィールドにおけるグループ II と III のスモールスケールでの分布と雑種個体の有無の調査

グループ II と III が狭い範囲で同所的に生育しているフィールドがあり、その場所で、それぞれのグループの個体の生育位置を調べる。これは、グループ II と III の生態的差異に関する基礎研究である。前述のとおり、ITS2 と *cox3* のハプロタイプ型の組み合わせからはグループ II と III の間の雑種個体はこれまで見つかっていないが、交雑実験による接合子形成が確認されている。従って、グループ II と III が同所的に存在するフィールドで雑種個体の有無についてより詳細な調査を行う。

(3) 無性生殖個体群を特徴づける DNA 塩基配列の探索

これまでの研究の中で、無性生殖個体群の存在が明らかになっており、その ITS2 領域と *cox3* の配列は非常に均一であるようである。しかし、グループ I に属する有性生殖個体群の一部が無性生殖個体群と同じハプロタイプをもつために、無性生殖個体群は DNA 塩基配列により特徴づけられていない。無性生殖個体の同定はこれまでは有性株と交雑して有性生殖の有無により行うしかなく、大変労力がかかってきた。今後、無性生殖個体群の分布、起源などについて研究を進展させるためにも、今回の研究で無性生殖個体群の DNA 塩基配列による特徴づけを行う。

(4) 第 4 のグループの明確化

これまで明らかになっている 3 つのグループに属しないと考えられるサンプルがいくつかあり、これらは第 4 のグループである可能性が高いが、まだ十分なデータが得られていない。本研究においてハプロタイプ解析および交雑実験を進め、第 4 のグループの存在を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 生殖隔離機構の解明

カヤモノリの各交配群間での生殖隔離機構がどこに存在するのかを明らかにするため、以下のように各交配群間での交雑時における配偶子の振る舞いを顕微鏡で観察した。グループ I から III までの各交配群の培養株のうち、これまでの交雑実験で使用した培養株を用いた。放出された雌雄配偶子を混合して顕微鏡で観察し、配偶子が接合に至らないのはどの段階に問題があるのかを確認した。この際、ビデオにより配偶子の振る舞いを記録した。

グループ II と III の雑種接合子の培養を行い、接合後隔離について調べるため、グループ II オスとグループ III メスで雑種接合子を形成し、まず、雌雄配偶子の核の融合の有無を観察した。これは、DNA に結合する蛍光色素である DAPI で接合子を染色することにより行った。核の融合により生ずる複相核は単相核よりも大きいので、その区別は容易である。また、接合子を単離して培養観察を行った。

(2) フィールドにおけるグループ II と III のスモールスケールでの分布と雑種個体の有無の調査

グループ II と III が同所的に存在する北海道小樽市オタモイ海岸で、それぞれのグループのスモールスケールでの生育位置を調査すると同時に、雑種個体の有無を調査した。グループ II と III は、ITS2 領域と *cox3* で特定のハプロタイプ型をもつ (II : A-K, A-M, A-N, III : F-L, G-L, G-S) ので、その間の雑種の組み合わせ (例えば A-L) が見つかった場合は雑種由来の個体と同定できる。カヤモノリは異形世代交代を行い、採集される藻体は配偶体 (単相) であるため、複相の第一代不稔雑種について考慮する必要はない。

フィールドにおいて 50 cm 間隔の格子上で藻体の位置を記録し、また、藻体を採集し証拠標本を作製し、一部を DNA 解析用に保存した。ITS2 領域と *cox3* のハプロタイプを決定して、その藻体がどのグループのものか同定した。

(3) 無性生殖個体群を特徴づける DNA 塩基配列の探索

無性生殖個体群を特徴づける DNA 塩基配列を見つけるためには、これまでの研究で使用してきた ITS2 領域や *cox3* よりもさらに速い進化速度をもつ領域を調べる必要があった。本研究では、交配群を認識するための分子系統解析での利用も考慮し、ミトコンドリアゲノムの *cox1* 遺伝子と核ゲノムのセントリン遺伝子の 2 番目のイントロン領域 (*ctn-int2*) の塩基配列を調べた。セントリン遺伝子はカヤモノリにおいてシングル

コピーであることが知られている。

(4) 第 4 のグループの明確化

これまでグループ I-III のいずれにも属さなかった培養株について、4 つの分子種 (*cox1*, *cox3*, ITS2, *ctn-int2*) を用いた系統解析およびハプロタイプの組み合わせの解析を行い、また、交雑実験を進めた。

4. 研究成果

(1) 生殖隔離機構の解明

交雑実験を、メス 17 株、オス 16 株について行った。グループ I と II の交雑では、オス配偶子が前鞭毛によってメス配偶子に付着することはなく、雌雄配偶子の融合も起こらなかった。グループ I と III の交雑も同様の結果であった。これらの結果から、グループ I と II、および、グループ I と III での生殖隔離機構は、オス配偶子が前鞭毛によりメス配偶子に付着する段階にあると考えられた。グループ II と III の交雑においては、II メス x III オスではオス配偶子が前鞭毛によってメス配偶子に付着することはなく、雌雄配偶子の融合も起こらなかった。しかし、III メス x II オスでは雌雄配偶子の融合が起こった。この雑種接合子を 24 時間後に DAPI で染色し観察したところ、配偶子核より大きな核が 1 個見られ、それは雌雄配偶子核が融合したものであると考えられた。雑種接合子を単離し培養したところ、雑種でない接合子と同様に成長し、次の世代の配偶体から放出された配偶子は接合した。また、これらの配偶体の *cox3* と ITS2 の配列から、接合子は遺伝的にも雑種であることが確認された。しかし、グループ II と III の異なる培養株間の雑種接合子の培養観察では、減数胞子の発芽・発達に異常が見られ、次世代の配偶体が正常に育たなかった。次世代が正常に育つ場合の交雑実験に用いた培養株は、産地が遠い培養株同士の交雑であり、次世代の配偶体が正常に育たない場合は、産地が近いものであった。これはウオレス効果が働いた結果かも知れないが、さらに多くの組み合わせで交雑実験を行う必要がある。

(2) フィールドにおけるグループ II と III のスモールスケールでの分布と雑種個体の有無の調査

グループ II と III の雑種がフィールドで存在する可能性があるため、グループ II と III が同所的に生育する場所において 2009 年と 2010 年に採集した合計 120 個体について、ITS2 と *cox3* の塩基配列を決定し、ハプロタイプの解析により雑種個体の有無を調査した。その結果、グループ II のハプロタイプをもつものが 77 個体、グループ III のハプ

ロタイプをもつものが 43 個体であった。グループ間の交雑に由来すると考えられる個体は見つからなかった。また、グループ II とグループ III の生育位置に顕著な違いは見られなかった。グループ II と III については、実験室では非対称な交雑が起こるが、野外では何らかの隔離障壁によってそれぞれ独立して存在していることが示唆された。

(3) 無性生殖個体群を特徴づける DNA 塩基配列の探索

無性生殖株 (12 株) を含む 110 サンプルについて *cetn-int2* および *cox1* の DNA 塩基配列を調べ、系統解析を行った。無性生殖株については、有性生殖株と同じ塩基配列を示すものがあり、今回用いた分子種では無性生殖株を有性生殖株から区別することはできなかった。また、無性生殖株のハプロタイプの多様性は小さかった。これらのことは、無性生殖個体群の分化が起こったのは最近であることを示している。

(4) 第 4 のグループの明確化

交雑実験および 4 つの分子種 (*cox1*, *cox3*, ITS2, *cetn-int2*) を用いた系統解析およびハプロタイプの組み合わせの解析を行った。これらの結果は、各グループの関係をこれまでより明確に示した。しかし、所属不明であった 4 つの培養株については、それらがグループ I-III に属することを支持しなかった。一方、他の独立したグループに属することは、明確には示さなかった。第 4 のグループの存在を示すには培養株の数が少なく、さらに調査を進める必要が残った。

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 4 件)

- ① Hagino, K., Bendif, E. M., Young, J. R., Kogame, K., Takano, Y., Horiguchi, T., de Vargas, C. and Okada, H. New evidence for morphological and genetic variation in the cosmopolitan coccolithophore *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) from the *cox1b-atp4* genes. *Journal of Phycology* 47: 1164-1176 (2011). (査読有り)
- ② Kogame, K., Kurihara, A., Cho, G. Y., Lee, K. M., Sherwood, A. R. and Boo, S. M. *Petalonia tatewakii* sp. nov. (Scytosiphonaceae, Phaeophyceae) from the Hawaiian Islands. *Phycologia* 50: 563-573 (2011). (査読有り)
- ③ Kimura, K., Nagasato, C., Kogame, K. and Motomura, T. Disappearance of male mitochondria DNA after four-cell stage in

sporophytes of the isogamous brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonaceae, Phaeophyceae). *Journal of Phycology* 46: 143-152 (2010). (査読有り)

- ④ Uwai S., Kogame K., Yoshida G., Kawai H. and Ajisaka T. Geographical genetic structure and phylogeography of the *Sargassum horneri/filicinum* complex in Japan, based on the mitochondrial *cox3* haplotype. *Marine Biology* 156: 901-911 (2009). (査読有り)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 八重樫康祐, 山岸幸正, 上井進也, 小亀一弘, 日本産褐藻アキネトスポラ属の分類学的研究, 日本藻類学会第 35 回大会, 2011 年 3 月 27, 28 日, 富山大学 (富山市)
- ② 木下大旗, 小亀一弘, 渡邊摩美, 沖野龍文, 阿部剛史, 北海道沿岸における紅藻ウラソソのケミカルレースと遺伝的多様性, 日本藻類学会第 35 回大会, 2011 年 3 月 27, 28 日, 富山大学 (富山市)
- ③ 小亀一弘, 褐藻カヤモノリ種複合体の構造, 第 55 回日本植物学会北海道支部大会, 2010 年 8 月 3 日, 北海道大学 (札幌市)
- ④ 石川彰造, 阿部剛史, 川井浩史, 小亀一弘, 褐藻マツモ属 (*Analipus*) の分子系統学的解析, 日本藻類学会第 34 回大会, 2010 年 3 月 20, 21 日, 筑波大学 (つくば市)
- ⑤ Kogame, K. and Ishikawa, S. Crossing experiments in the *Scytosiphon lomentaria* complex (Phaeophyceae) in Japan, 9th International Phycological Congress, 2-8 August 2009, Tokyo, Japan
- ⑥ Kimura, K., Nagasato, C., Kogame, K. and Motomura, T. Difference of elimination timing in male mitochondria and mitochondrial DNA after fertilization between isogamous and oogamous brown algae, 9th International Phycological Congress, 2-8 August 2009, Tokyo, Japan
- ⑦ Sato, D., Shimada, S., Kogame, K. and Baba, M. A phylogenetic study of Japanese articulated coralline algae (Rhodophyta), 9th International Phycological Congress, 2-8 August 2009, Tokyo, Japan

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小亀 一弘 (KOGAME KAZUHIRO)
北海道大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号：80215219

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし