

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25年 5月 1日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22710239

研究課題名（和文） 阿寒湖マリモの保全に向けた遺伝的多様性解析のための技術基盤の確立に関する研究

研究課題名（英文） Construction of the technical bases for conservation genetics in *Aegagropila linnaei* in Lake Akan

研究代表者

西沢 徹（NISHIZAWA TORU）

筑波大学・生命環境系・研究員

研究者番号：80414382

研究成果の概要（和文）：阿寒湖におけるマリモの保全生態遺伝学的研究を可能にするため、マリモを対象にマイクロサテライトマーカーの開発を行った。さらに、集合体から解した1本の糸状体を対象に、フローサイトメトリーによる核相分析の条件検討を行った。最終的に、マイクロサテライト9遺伝子座を増幅するプライマーセットを設計したが、研究期間内では多型的な遺伝子座を捕捉することはできなかった。また、1本の糸状体由来の試料では細胞数が少なく、フローサイトメトリーによる核相分析は困難であった。

研究成果の概要（英文）：I developed microsatellite markers in *Aegagropia linnaei*, a green algae that distributes in Lake Akan. However, polymorphic loci were not captured in this study duration. I also considered optimum conditions which allow the nuclear-phase analysis that covers a single fragment specimen. Due to extremely low DNA content in a single fragment specimen, the nuclear-phase analysis using flow cytometry was impossible.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：植物系統分類学，環境植物学

科研費の分科・細目：資源保全学・資源保全学

キーワード：マリモ，阿寒湖，分子マーカー，マイクロサテライト，遺伝的多様性，個体群保全，

1. 研究開始当初の背景

マリモ (*Aegagropila linnaei*) は、北海道阿寒湖の個体群が球状の集合体を形成することで世界的にも有名な淡水産緑藻の一種である。阿寒湖の個体群は国の特別天然記念物に指定されているほか、絶滅危惧Ⅰ類にも指定されており、早急な保全対策の確立が求められている。阿寒湖のマリモはこの半世紀以上にわたり、生育地の破壊と個体群の消滅、

水力発電のための取水・湖水面低下による大量枯死、湖水富栄養化による球状体の減少と、くり返し生存の危機に見舞われてきた。さらに平成17年以降、阿寒湖の湖底においてマリモを盗採したと考えられる痕跡が数回にわたって確認されており、土産物等の人工マリモへの不正な転用が危惧される事態も起きている。

マリモの調査研究は半世紀以上にわたっ

て継続して行われてきたが、マリモの多様な生態が障害となって生物学的な理解が容易に進展せず、科学的な知見に基づいた保護対策を体系化できるまでには至らなかった。しかし、旧阿寒町（現釧路市）に専門の研究職員が配置された1991年以降、急速に知見の集積が進み、マリモの保護対策を具体的な保護管理プログラムとして整備できる段階になりつつある（若菜ら, 1999）。

これまでに、釧路市教育委員会の調査によって過去の分布域が明らかになった他、水位の高位固定によってマリモの生育環境が失われた経過や、マリモの生育に不可欠と考えられている湖底湧水の存在などが明らかになっている。また、過去に球状のマリモが分布していた阿寒湖西部のシュリコマベツ水域の堆積泥中からは、マリモと考えられる遺存試料が発見されており、絶滅個体群の遺伝的背景をDNA分析によって明らかに出来る可能性がある。加えて、マリモの生育や球化に要される環境条件などについても知見が整いつつあり、シュリコマベツにおける自然との共生を目的としたマリモ個体群の復元再生を実現可能な事業として検討できるようになってきた。

最近報告されたアイソザイムによる遺伝的多様性に関する研究によると、「阿寒湖のマリモは湖内個体群間で遺伝的分化の程度が非常に小さく、栄養繁殖による寄与が大きいと推定されること」、「着生糸状体の遺伝的多様性が比較的大きいことから、球状体に限らず着生糸状体も保全の対象とすべきこと」が明らかにされた（Soejima, et al., 2008）。しかしアイソザイム分析では、湖内個体群間の遺伝的差異を十分に検出できる解像力が得られなかったこと、消失したシュリコマベツ湖底から得られた堆積泥中の遺存試料が分析できないことが課題として残された。したがって、より解像度が高くDNAの分析が可能な分子マーカーの開発が求められている。

一方、マリモの生活史についてもまだ不明な点が多く残されている。近縁なシオグサ属藻類との比較から同型世代交代であると推定されており、特徴的な球状体には配偶体と孢子体の2タイプが存在するものと考えられているが、まだ証明されていない。また、阿寒湖のマリモが球状化する過程として、糸状体が絡まって球状の集合体を形成して成長した後、やがて球状体崩壊によって再び糸状体の断片にもどるといふ仮説が提唱されている。しかし、球状体が単一の糸状体由来した遺伝的クローンであるのか、遺伝的に異なる複数の糸状体が纏まって出来た集合体であるのかも明らかでない。このためマイクロサテライトなどの共優性遺伝をする分子マーカーを用いた遺伝解析において、遺伝

子型の判読を困難な状況にしている。したがって、マリモにおいて遺伝解析を行う系を確立するためには、予めフローサイトメトリー（以後 FSM と略記）で核のDNA量を定量し、対象とする検体の核相を把握しておく必要がある。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、阿寒湖におけるマリモの保全研究を推進する際に必要となる、分子マーカーによる遺伝的多様性解析に必要な技術基盤の整備を目的とする。とりわけ、以下の3点について重点的に取り組む計画である。

① 阿寒湖内に点在する各個体群間で遺伝的な差異を検出できる十分な精度を備えたマーカーを開発する。

多型的な15~20遺伝子座のマイクロサテライト (Simple Sequence Repeat: SSR) もしくは一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms: SNPs) マーカーを開発することを目標とする。

② マリモの生物学的実態を明らかにし、DNAによる遺伝子型分析の系を確立する。

阿寒湖および国内の複数の湖沼からマリモの採集を行う。FSMによる核DNA量の分析によって、核相と生活型（球状体、着生糸状体、浮遊糸状体）との関係を明らかにする。さらに、本研究で開発を目指す分子マーカーを用いた遺伝解析によって、球状体が単一の糸状体由来した遺伝的クローンであるのか、複数の糸状体由来した集合体であるのかを明らかにする。得られた知見を統合し、共優性遺伝マーカーによる遺伝子型判別の系を確立する。

③ 分子遺伝マーカーを用いて阿寒湖内個体群の遺伝的多様度を解析する。

阿寒湖の各個体群から試料を採取し、現存個体群の遺伝的多様度を定量化する。さらに、堆積泥中のマリモ遺存試料からのDNA抽出および遺伝子型決定を行い、絶滅個体群の遺伝的プロファイルの追跡も試みる。

(2) 文化財としてのマリモを特徴づける球状体個体群は、阿寒湖北部のチュウルイとキネタンペの2ヵ所に現存するのみである。これらの保護対策として、「生育地への立ち入り禁止」が継続されてきたが、一方で普及啓発の機会を狭め、結果としてマリモへの関心や理解の広がりを妨げる要因ともなっている。こうした問題のひとつの解決策として、森林伐採による土砂流入が原因で消失した阿寒湖西部のシュリコマベツの個体群を再生する案が浮上してきた。本研究によって、現存する個体群および過去に球状体群落が認められた堆積物中のマリモ遺存試料のDNA分析が可能になれば、釧路市教育委員会が計画する「個体群の復元事業」において、各個体

群間の遺伝的な背景を明らかにし、科学的な根拠に基づく適切な移植元個体群の選定を行うことができる。さらに阿寒湖に現存する個体群の詳細な遺伝的プロファイルが明らかになることで、盗採による不正な流通に対する抑止力としての効果が期待できることや、万一、市場において盗採マリモの転用が疑われる事例が現出した場合には、開発したマーカーを DNA 鑑定による出自鑑別に適用できるなど、社会的要請への貢献も可能となる。

一方、マリモは国内 15 カ所の湖沼および西ヨーロッパに広く分布しているが、大きな球状体を形成するのは阿寒湖とアイスランドの個体群だけである。近年、18S リボソーム RNA 遺伝子を用いた分子系統解析により、シオグサ目における系統的な位置関係は明らかになりつつあるが (Hanyuda, et al., 2002), 世界的なレベルでの詳細な集団遺伝学的研究はこれからの課題となっている。本研究の成果は、世界に分布するマリモの遺伝的類縁関係や種分化過程の解明、および糸状体から大きな球状体に成長する生活史の解明にも利用でき、マリモの種分化研究や系統地理学的研究に発展が期待できる。

3. 研究の方法

本研究は、釧路市教育委員会阿寒生涯学習課学芸担当専門員の若菜勇博士と密接な連携を保ちながら行う計画で、若菜博士を通じて研究用試料の分譲を受ける。

(1) 分子マーカーの開発

① SSR マーカーの開発

湖内個体群間の遺伝的差異を検出するための分子マーカーとして、マイクロサテライト (SSR) マーカーを開発する。磁性ビーズによる濃縮法を用いて SSR 領域を濃縮した上でゲノミックライブラリーを構築し、プラスミド配列特異的プライマーとリピートモチーフプライマーによる PCR で SSR 領域を含むクローンを効率的にスクリーニングする。クローン化された SSR 領域を含むゲノム断片の塩基配列決定の際には、TempliPhi Amplification Kit (GE Healthcare) を用いたプラスミド DNA の塩基配列決定法などを採用し、効率よく SSR 領域を単離する。多型的な集団解析用マーカーの候補として、良好な PCR 増幅が認められる領域について、100 カ所程度を目標に選抜する。

② 一塩基多型 (SNPs) マーカーの開発への予備的研究

これまでの先行研究や、本研究に先立って行われた予備的研究の結果、阿寒湖内のマリモ個体群は保有する遺伝的変異が非常に小さく、十分な数の多型的な SSR 遺伝子座を捕捉できない事態も予想される。したがって、

SSR マーカー開発の過程において、阿寒湖から採取した一部のマリモ DNA で予備的な多型解析を行い、SSR の情報不足を補うための SNPs マーカーの開発が必要かどうかについても考察する。一方で、SSR マーカー開発の経緯で決定したマリモ DNA の塩基配列情報を基に個体群間で変異がある領域を探索し、SNPs マーカーとして汎用可能かどうかについても検討を行う。

(2) 阿寒湖および国内各地のマリモ試料の収集

① 阿寒湖の各個体群からの試料採集

5月下旬～6月上旬におけるマリモの繁殖期には、若菜博士と共同で試料の採集を行う。研究開始年度は、球状体個体群が現存するチュウルイとキネタンペの 2 カ所の個体群と、過去に球状体の群落が認められた阿寒湖西部のシュリコマベツ水域の堆積泥を重点対象とする。次年度以降は、基本的に前年度と同様の方法で採集を実施し、阿寒湖内全域を対象に、複数の個体群から着生糸状体および浮遊糸状体の採取を行う。

② 全国各地の個体群由来の藻体試料の収集

アイソザイム分析の結果から、阿寒湖内における遺伝的分化の程度が小さいことも予想されることから (Soejima, et al., 2008), 変異のある遺伝子座選抜に用いる DNA 検体用に、日本各地の湖沼 (チミケツ湖, 小川原湖, 西湖, 河口湖, 琵琶湖など) 由来の藻体も収集する。阿寒湖エコミュージアムセンターマリモ研究室には、全国各地のマリモ藻体がコレクションされているため、若菜博士よりこれらのコレクションから藻体の分譲を受ける。

(3) 解析用糸状体試料の前処理法の確立と DNA 精製

① 集合体マリモの場合、別個体 (ジェネット) 由来である複数の糸状体が絡み合って構成されている可能性が高い。この場合に、DNA 精製の試料や FSM による核相分析用試料として複数の糸状体を纏めて破碎すると、複数個体由来の組織が混入した検体となり、遺伝的解析用の試料としては不相当である。したがって、顕微鏡下で糸状体を解し、糸状体 1 本毎に分別した上で DNA 精製や FSM 用のバッファーに破碎懸濁する必要がある。この糸状体 1 本由来の検体を便宜的に「糸状検体」と呼ぶ。1つの集合体当たり、10 個程度の複数ロットの糸状検体を準備し、糸状検体 1 本からの DNA 抽出法の検討、および FSM による核相分析用試料としての最適条件について検討を行う。

② 糸状検体および精製したマリモ遺存試料から DNA の抽出を行う。抽出には微量なサンプルからも PCR の鋳型として十分な量を回収

できる DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使用する。

(4) フローサイトメトリー (FSM) による核相分析

複数の集合体 (球状体および糸状体が纏まった藻塊) を対象として、FSM で核 DNA 量の解析を行う。各集合体当たり複数の糸状検体を解析し、集合体が単一の核相の糸状体からなるのか、あるいは異なる核相を持った糸状体の集合からなるのかを明らかにする。

(5) 分子マーカーによる遺伝子型決定系の確立

阿寒湖内外のマリモ試料を対象に、SSR もしくは SNPs 遺伝子座で PCR を行い、PCR 増幅産物を ABI3730 ジェネティックアナライザ (所属機関現有設備) で解析して各検体の遺伝子型を決定する。SSR および SNPs はいずれも共優性遺伝マーカーであることから、例えばヘテロ遺伝子型と判定された試料の場合に、複相世代を裏付ける核相分析の結果と対応しているかどうかなどを慎重に検討する。

4. 研究成果

(1) マリモ分子マーカーの開発

構築したマリモゲノミックライブラリーから SSR 領域を含むクローンを単離し、SSR 領域を増幅するプライマーセットの設計を行った。この過程で、単離したクローンの塩基配列を決定した結果、SSR 領域の隣接領域に特徴的な傾向が認められた。それは、隣接領域の一方の配列は完全に異なり、SSR モチーフの繰り返し数も異なるにもかかわらず、もう一方の隣接領域の配列が複数のクローン間で完全に同一もしくは非常に似通っていた。SSR を含む近傍の配列を 1 つの単位として、ゲノム中にタンデムに繰り返し出現する例は他の分類群でも観察されている。しかし、研究代表者はこれまでに様々な分類群において SSR マーカーの開発を行ってきたが、片側は完全に同一で、もう一方が異なるという傾向が観察されたのは初めての経験であった。緑藻におけるゲノム進化の問題としては非常に興味深い結果であるが、「SSR マーカーの開発」という本来の目的からすると、マーカー化は非常に困難を極めた。

設計したプライマーセットを用いてマリモ DNA を鋳型として PCR を行った結果、設計時に予想された分子量以外に、様々な分子量の DNA 断片が増幅されてきた。SSR の隣接配列が類似した構造をしていたことから、プライマー配列と類似した配列をもったゲノム中の複数の領域が PCR 増幅された結果と考えられる。したがって、研究期間内に捕捉できたシングルバンドで安定的に PCR 増幅が認められたプライマーセットは 9 対であった。

(2) 各地からのマリモ試料の収集

阿寒湖での試料採集は、2010 年度と 2011 年度に若菜博士と共同で行った。2010 年度には、シュリコマベツの湖底堆積層からポーリングコア試料の採取も行った。

さらに 2011 年度には、若菜博士より阿寒湖エコミュージアムセンターマリモ研究室にコレクションされている各地のマリモから試料の提供を受けた。提供を受けたには、シラルトロ湖 (釧路湿原)、達古武沼 (釧路湿原)、市柳沼 (青森県、小川原湖湖沼群)、田面木沼 (青森県、小川原湖湖沼群)、姉沼 (青森県、小川原湖湖沼群)、内沼 (青森県、小川原湖湖沼群) の国内産と、ミーヴァトン湖 (アイスランド) 産のマリモである。さらに、アオミソウ (愛知県一宮市)、タテヤママリモ (富山県立山市) についても提供を受けた。

(3) 糸状体試料の前処理法の確立と DNA 精製

① 球状体マリモから約 1cm の藻塊を分離し、ピンセットで一部を摘んで水を張ったバット中で濯ぎ、絡み合った藻塊を 1 本 1 本の糸状体の状態になるまで解した。最終的に、解した糸状体を双眼実体顕微鏡下で検鏡し、1 本の糸状体であることを確認した。解した 1 本の糸状体の大きさは、おおよそ 1~2cm であった。解した糸状体は 1 本ずつ 1.5mL チューブに脱イオン水とともに入れ、冷蔵庫で保管した。1 個の球状体当たり、20 本程度の糸状検体を分離した。

② 1 本の糸状検体からの DNA 抽出には、QIAGEN 社製 DNeasy Plant Kit もしくは同等品である VIOGENE 社製 Plant Genomic DNA Extraction System を使用し、添付のマニュアルにしたがって DNA 精製を行った。DNA 精製には、全長が 1cm 程度で、分枝が多くできるだけ藻体量が多くなる糸状検体を使用した。この方法で 1 本の糸状検体当たりから得られた DNA 収量は、100ng 以下であった。

③ シュリコマベツ湖底のポーリングコア試料では、白色の粘土状の堆積層が過去に消失したマリモ遺存層と考えられた。この堆積層を水に懸濁して沈殿させた試料を対象に、QIAGEN 社製 Kit で DNA の精製を試みたが、精製グレードの高い DNA 収量は得られなかった。遺存層試料を鋳型に、直接 PCR を行うなど、微量で分解の進んだ試料からのマリモ DNA の検出法については今後の課題である。

(4) FSM による核相分析

阿寒湖マリモの糸状体を材料に、フローサイトメトリー (FSM) による核 DNA 量の定量を行った。球状体マリモは複数の糸状体が纏まりあった、別個体由来の糸状体集合と考えられることから、実体顕微鏡下で集合体マリモを分解し、長さ約 5cm の糸状体 1 本を選別

して1検体とした。10検体の定量を行ったが、長さ約5cmの糸状体1本では細胞数が少なく、核相の判別を可能とする精度でDNA量の定量を行うことができなかった。FSMによる定量を行うためには、微量の糸状体1本を純粋培養によって成長させ、十分な量の細胞数を確保するステップが必要である。

(5) マリモの遺伝的多様性解析に向けての今後の課題

設計した分子量サイズに増幅が認められたプライマーセットを対象に、阿寒湖産マリモおよび近傍のシラルトロ湖産マリモのDNAを鋳型に遺伝子型の解析を試みたが、両湖沼間で多型は認められなかった。研究期間内では、阿寒湖以外から収集したマリモ試料の遺伝子型解析までを完了することができなかったことから、今後は引き続いてこれらの9遺伝子座のプライマーセットを用いた多型解析を継続する予定である。

一方、今回の結果からも、SSRレベルでの阿寒湖内個体群の遺伝的分化は非常に小さいことが示唆された。したがって、最終的に湖内個体群間の差異を検出するためには、SNPs マーカーも組み合わせた、複数の遺伝マーカーによる解析系の構築が必要と考えられる。本研究で構築したSSR濃縮ゲノミックライブラリーの塩基配列決定の過程で、SSRの隣接領域にSNPsも複数観察された。しかしながら、このSSR隣接領域の配列は、ゲノム中に類似箇所が複数存在していることがSSRプライマーのスクリーニング過程で示唆されたことから、この隣接配列の塩基配列情報を基にSNPsマーカーを開発することは、今回のSSRマーカーと同様に困難と考えられる。したがって、今後は、次世代シーケンサー等の利用も視野に入れた、新たなマーカー開発のアプローチが必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西沢 徹 (NISHIZAWA TORU)

筑波大学・生命環境系・研究員

研究者番号：80414382