

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440208

研究課題名(和文) 日本近海に広域分布する海藻類の多種系アプローチによる比較系統地理学的解析

研究課題名(英文) Comparative geographical analysis of the seaweeds that widely distributed all around Japanese shore by several approaches

研究代表者

嶋田 智 (Shimada, Satoshi)

お茶の水女子大学・基幹研究院・准教授

研究者番号：40322854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： 褐藻ヒジキのSSR、褐藻ウミトラノオおよび紅藻マクサのRADseqの結果、大きく九州・日本海・北海道グループと太平洋グループが存在し、太平洋東北地域でそれらの境界が存在し、分布は大きな海流(対馬海流、親潮、黒潮)に沿って拡大したことが推定できた。九州・日本海で遺伝的多様性が高く、分布の末端で遺伝的多様性が低くなっていた。

褐藻ヒジキの地域個体群(沖縄産、館山産、函館産)の水温に関する生育特性を解析した。その結果、函館産ヒジキには高温耐性がなく、一方、低温耐性は3カ所に違いは見られなかった。沖縄産ヒジキの系統保存株の作出に成功し、同様の解析を行った結果、類似の特性が検出された。

研究成果の概要(英文)：As a result of SSR analysis of brown alga *Sargassum husiforme* and RADseq analysis of brown alga *Sargassum thunbergii* and red alga *Gelidium elegans*, two big geographical group were detected: Kyushu, the Sea of Japan, Hokkaido group and Pacific group. These lineages were faced at Tohoku region of the Pacific coast. They were supposed to expand the distribution along a big ocean current (Tsushima Current, the Kurile Current, the Kuroshio Current). Genetic diversity was high in Kyushu, the Sea of Japan, and genetic diversity became low at the end of the distribution.

The growth properties about the water temperature were analyzed between three local population (Okinawa, Tateyama, Hakodate) of the brown alga *Sargassum husiforme*. As a result, the alga from Hakodate did not have high temperature tolerance, and, on the other hand, the low temperature tolerance was not different between the three localities. Culture strain of the brown alga from Okinawa performed similar growth properties.

研究分野：系統地理学、環境適応分子進化学

キーワード：系統地理 RAD-seq STRUCTURE 海藻類

1. 研究開始当初の背景

生物は種によって様々な分布域をもつ。ある島にしか生育していない固有種がある一方で、日本/世界中に広く分布する種が存在する。広域分布種がいつの時代にどのようなルートで分布域を拡大し、温暖化と寒冷化が繰り返し起こった第四紀をどのように生き延びてきたのか、という疑問に答えるべく、各種動物や陸上植物においては精力的に系統地理学的解析が進められている(Tian et al. 2008 PLoS ONE, Kikuchi et al. 2012 Biol. J. Linn. Soc. など)。特に多種系アプローチによる比較系統地理学的解析は、“地域生物相の一般的な分布変遷史”について深い考察が可能であり、近年、様々な地域を対象として盛んに研究が行われてきている(Eidesen et al. 2013 New Phytol. など)。また、そのような一般的な分布変遷史を明らかにすることにより、各種の“種特有性”とそれに影響をおよぼした特殊事項についても考察が可能となる(Rossetto et al. 2009 Mol. Eco. など)。

しかし海藻類では、ワカメなど移入種の移動経路に関する研究は行われてきたが(川井ら 2007 海洋と生物)、純粋に“海洋”の様々な水深に生育する“固着性酸素発生型光合成生物”が各種環境要因に影響を受けながら、どのように分布域を拡大させてきたのかについての系統地理学的解析はほとんど行われてこなかった。

海に囲まれた日本には、海藻類が約 1500 種生育している。緑藻カサノリは沖縄・奄美に、褐藻リシリコンブは北海道に、というように多くの種は分布域が狭い。しかし、申請者の行った北海道大学標本庫(SAP)での分布調査の結果、褐藻ウミトラノオのように沖縄・鹿児島から北海道にまで広く分布する種が複数存在することがわかった。そこで申請者は、広域分布する海藻類のうち、(i) 2N 個体を容易に識別できる、(ii) 種分類が確定していて種同定が容易、(iii) 人為的な移動の

可能性が少ない(養殖種でない)という観点で種を絞り込み、比較系統地理学的解析を進める本研究計画を着想した。

また、これら広域分布する海藻類は沖縄から北海道にまで生育しており、例えば南方個体群と北方個体群の間には、最適生育水温や日長による生活環制御など生育特性に違いがあると想像できる。そこで次に、上述の系統地理学的解析で明らかになったメジャーな遺伝的クラスター間に生じている「生育特性の違い」と、その生育特性分化に關与する「環境適応分子進化」を解明したいと考えた。

広域分布を可能にした地域個体群での適応(ex. 低温耐性)が特定できれば、RNA-seq 解析で地域適応に關与した遺伝子群を効率的に探索できるが、海藻類では一部地域個体群の生育特性を ImagingPAM 等により解析した例はあるものの(土屋ら 2012 水産学会誌)、広域分布種の地域個体群間で生育特性を比較し、さらにその生育特性分化に關与した適応分子進化を解析した例はない。

2. 研究の目的

本研究では、日本近海に広域分布する海藻類に注目した多種系アプローチによる比較系統地理学的解析を行い、一般的な分布変遷史や遺伝的多様性の地理的パターンを解明し、海流、水温、日長、地形などの環境要因がそれらに与える影響について明らかにする。

さらに、沖縄から北海道にまで分布する種の沖縄産、北海道産などの地域個体群の生育特性を比較することで、環境適応能の分化程度を解明する。

3. 研究の方法

本研究では、日本近海に広域分布する海藻類のうち生育深度の異なる 5 種(浅場: 褐藻ウミトラノオ、褐藻ヒジキ、紅藻フクロノリ、深場: 緑藻ミル、紅藻マクサ)に注目した。

まず、RNA-seq データを用いて効率的にマイクロサテライトマーカー (SSR) を作出し、もしくは RAD-seq 解析により取得したゲノムワイドな SNP 情報を用いて、空間的遺伝構造・遺伝的多様性の地理的パターン等に関する系統地理学的特徴を比較し、生育深度が異なるグループにおける共通性/特異性と、海流、水温、日長、地形などの環境要因による影響について解析した。

次に、ImagingPAM および DO メーターによる地域個体群の生育特性に関する実験により、例えば「高水温域から低水温域へ」など異なる環境への分布拡大に関与した環境適応について解析した。

4. 研究成果

(1) RNA-seq データを用いた効率的マイクロサテライトマーカー (SSR) の作出と、系統地理学的解析 (褐藻ヒジキ):

1000 種の植物種のトランスクリプトーム解析をしようというプロジェクト: 1KP Project (www.onekp.com/index.html) が所持している褐藻ヒジキの RNA-seq データを用いて、7 つの新規 SSR マーカーを作出した。

日本各地 20 地点 192 個体を用いて、STRUCTURE および NeighborNet などの地理的な遺伝構造を解析した結果、沖縄、九州・日本海・北海道、太平洋、の 3 つの大きな遺伝的集団が検出された。ABC 解析の結果、沖縄が最初に分化し、その後九州・日本海が大きな集団を維持し、太平洋が分岐したと推定された。海流の方向からも、日本海を北上した系統が函館にたどり着き、太平洋東北沿岸を北上した系統が八戸に分布を広げたことが推察された。

また、シャノン係数や u_{He} など遺伝的多様性を示す各種指標を算出した結果、他の大型藻類でも見られるように、九州で遺伝的多様性が高くなった。一方、沖縄、函館、八戸な

ど、分布の末端で遺伝的多様性が低くなり、他の生物との類似性が見られた。

(2) RAD-seq 解析により取得したゲノムワイドな SNP 情報を用いた系統地理学的解析 (褐藻ウミトラノオ、紅藻マクサ、紅藻クロフノリ、緑藻ミル):

日本各地から採集した藻体から DNA を抽出し、RAD-seq 解析をおこなった。得られた RAD-seq データから depth = 5、1-5 SNPs、2-6 alleles で SNPs データのスクリーニングをおこない、STRUCTURE および NeighborNet などの地理的な遺伝構造、シャノン係数や u_{He} など遺伝的多様性を示す各種指標を解析・算出、および DIYABC 解析で分布変遷史を推定した。

褐藻ウミトラノオおよび紅藻マクサでは、明確な地理的遺伝構造が確認できた。両種の結果は前述の褐藻ヒジキと類似していた。大きく九州・日本海・北海道グループと太平洋グループが存在し、太平洋東北地域でそれらの境界が存在し、分布は大きな海流 (対馬海流、親潮、黒潮) に沿って拡大したことが推定できた。遺伝的多様性も褐藻ヒジキと類似していて、九州・日本海で遺伝的多様性が高く、分布の末端で遺伝的多様性が低くなっていた。

SSR マーカーの作出からアレルの決定という煩雑な行程を踏まない RAD-seq 解析は、非常に有効なツールであり、今後も系統地理学的理解を推進すると思われる。

ただし本研究では、紅藻クロフノリおよび緑藻ミルにおいて、各地域の個体間では遺伝的類似性が見られたが、明確な地理的遺伝構造は検出されなかった。紅藻クロフノリにおいては、*rbcL* で全個体の DNA 鑑定をやり直した結果、5 種の隠蔽種の存在が確認できた。種分類が終わっていると勝手に思い込まずに、全個体の DNA 鑑定が RAD-seq 解析をおこなう前に必要である。

(3) ImagingPAM および DO メーターによる地域個体群の生育特性に関する解析 (褐藻ヒジキ):

明確な遺伝構造が見られた褐藻ヒジキを用いて、地域個体群 (沖縄産、館山産、函館産) の水温に関する光合成特性 (ImagingPAM)・呼吸特性 (DO メーター) を解析した。その結果、函館産ヒジキには高温耐性がなく、一方、低温耐性は3カ所に違いは見られなかった。呼吸特性にも3カ所に違いは見られなかった。

沖縄産ヒジキの系統保存株の作出に成功し、同様の解析を行った結果、類似の特性が検出された。つまり、水温に関する光合成特性・呼吸特性は、遺伝的に固定されていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2件)

1. Honoka Kobayashi, Yuka Haino, Takaya Iwasaki, Ayumi Tezuka, Atsushi J. Nagano, Satoshi Shimada. 2018. DdRAD-seq based phylogeographic study of *Sargassum thunbergii* (Phaeophyceae, Heterokonta) around Japanese coast. *Marine Environmental Research* accepted May 25 2018
2. 堀内はるな, 小林穂ノ佳, 岩崎貴也, 巖田智. 2017. 日本沿岸における褐藻ヒジキの系統地理学的解析. *藻類* 65: 139-148.

[学会発表] (計 4件)

1. 巖田智・榎本葵・堀内はるな・河口莉子・拝野優佳・岩崎貴也「大型藻類の系統地理学的解析」第40回日本藻類学会 (東京 Mar. 2016)

2. 孫田佳奈・岩崎貴也・巖田智「褐藻ヒジキの系統地理学的解析と生理生態学的解析」第19回植物分類学会 (京都 Mar. 2017)
3. 孫田佳奈・岩崎貴也・巖田智「褐藻ヒジキの系統地理学的解析と地域個体群の環境適応」第42回日本藻類学会 (仙台 Mar. 2018)
4. 小林穂ノ佳・岩崎貴也・巖田智「海藻類の系統地理学的解析」第19回植物分類学会 (京都 Mar. 2017)

[その他]

ホームページ等

<http://www-p.sci.ocha.ac.jp/bio-shimada-lab/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

巖田智 (SHIMADA SATOSHI)
お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・准教授
研究者番号: 40322854

(3)連携研究者

岩崎貴也 (IWASAKI TAKATA)
神奈川大学・理学部生物科学科・特別助教
研究者番号: 10636179