

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440210

研究課題名(和文) 海藻類における成熟時期多型の維持機構の解明

研究課題名(英文) Variation in reproductive seasons and its mechanism in a seaweed species

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：褐藻アカモクは、10m以上にまで成長することもある1年生の海藻である。新潟県沿岸においては1～6月までアカモクの成熟が見られる。本研究は、この長い繁殖期の実態の解明と、集団分化に及ぼす影響を解明することを目的とした。野外調査の結果、新潟県沿岸の地点ごとに成熟期間が異なっていることを確認できた。また培養実験の結果から、春成熟個体と冬成熟個体では光周性が異なることを確認した。遺伝的にはミトコンドリアマーカーを用いた解析でも、核マイクロサテライトマーカーを用いた解析でも、冬(1-3月)と春(4-6月)成熟集団の間に明確な遺伝的分化が確認され、さらに、それぞれの季節の中で地点間の分化も確認された。

研究成果の概要(英文)：Sargasum horneri is an annual brown algae, sometimes grows more than 10m in height. In Niigata prefecture, reproductive period of this species lasts from January to June. This study aimed to understand the mechanism to make this long reproductive period and its power as an isolation mechanism.

In the field observations, variation in reproductive period has been confirmed at three sites of mainland honshu (Ichiburi, Kasashima, Kamomegahana). In culture experiments, winter-fertile plants showed no clear photoperiodicity in sexual maturation, which is clearly different from spring-fertile plants. Molecular analyses, based on mitochondrial cox3 and nuclear microsatellite markers, showed strong genetic differentiation between the populations being fertile in January to March and those in April to June. Furthermore, the microsatellite markers showed genetic differentiation between sites, which make a complex genetic structure in *S. horneri* population in Niigata prefecture.

研究分野：植物分類学

キーワード：アカモク 褐藻 集団分化 成熟時期の多型 季節的隔離 遺伝的分化 光周性

### 1. 研究開始当初の背景

アカモク *Sargassum horneri* (褐藻ヒバマタ目) は、日本沿岸に広く分布し、藻場の主要な構成種となる海藻である。本種は、付着器から一本の長い茎を伸ばし、枝先に形成される気胞の浮力によって水面まで直立する。成熟時には 2~10m と非常に大型になるため、本種の優占する群落は、立体的で非常に複雑な空間構造をもち、沿岸域の動物の重要な生育場所として機能している。また成熟後は、基物から外れ、流れ藻として中国から日本沿岸を長距離移動する間に魚類の産卵場所となるなど、生態的、水産的重要性をもつ海藻として知られている。本種については、古くから雌雄性や成熟時期に関して種内多型が知られている。雌雄同株の集団も知られているが、雌雄異株の集団が一般的である。また、一年藻であり、地域にもよるが、本州日本海沿岸では 5、6 月頃に繁殖期を迎えるものが一般的である。

新潟県沿岸では、冬期に成熟するアカモクを「ナガモ」という名前で食用に利用してきた伝統があり、1 月頃から成熟を迎えるアカモク集団が存在していることが古くから知られていた。春に成熟するアカモクは食用とされないことから、冬期に成熟する集団と春期に成熟する集団の間には、形態的、生理的、生態的また遺伝的に分化が生じていることが想像されるが、分布や成熟期の詳細も含め、これまで両者の関係が調査されたことはなかった。また、冬期(秋期)に成熟する集団については、広島県瀬戸内海沿岸や宮城県松島湾などからも報告があるが、近接して生育している春期成熟集団との関係について明らかにされた事例はない。

### 2. 研究の目的

新潟県沿岸に生育するアカモク集団の成熟時期の多型を明らかにし、また、成熟時期の異なるアカモク集団間の遺伝的分化について解明することが第一の目的である。我々の事前の観察では、新潟県沿岸の冬期成熟集団と春期成熟集団の成熟時期は連続しており、また両集団の生育している地域も重なっている。本研究では、

- (1) 野外における成熟時期の確認
- (2) 培養実験による隔離機構の推定
- (3) 両アカモク集団の間に遺伝的分化の解明

の 3 点について実施し、両集団の間の生態的、生理的、遺伝的違いについて検討を行った。アカモクをはじめとして、海藻類では同種集団間に成熟時期の違いがしばしば報告されている。本研究で得られるであろう新潟県沿岸のアカモク集団の遺伝的分化のデータをもとに、成熟時期の多型が、海藻の集団構造や遺伝的多様性に与える影響を明らかにし、海藻類の種分化過程解明の端緒をつかむことを目的とした。

### 3. 研究の方法

成熟時期については、本土沿岸の 3 力所において月 2 回以上の観察を行い、成熟開始から成熟が終了して流失するまでの期間を調査した。とくに新潟県柏崎市笠島においては漁協および地元住民の方々の協力のもと、成熟し卵を放出しているメス個体に標識をつけ、個体識別を行うことにより、生殖期間の正確な把握を行った。メス個体のみを対象としたのは、リセプタクル上に卵が放出されているか肉眼で確認することが可能であり、観察個体が有性生殖可能な状態か否か、正確に把握できると考えられるためである。

培養実験は、受精卵を単離するか、伸長生長をはじめたばかりの枝の先端を切って単藻化することにより確立した株を使用した。いずれの場合でも、15 8 時間明期条件下で伸長生長をはじめた培養株の一部(枝)を切り取り、日長条件を変化させることで、それぞれの個体のもつ光周性の把握を試みた。培養液は PESI 培地を用い、培養光源は白色蛍光灯、もしくは直管型 LED ランプを用いた。光源の違いによる実験の影響は確認されなかった。

遺伝的解析については、採集時に成熟している(リセプタクルを形成している)個体の枝をサンプリングし解析に用いることで、成熟月の違いと遺伝的分化との対応を確認することを目指した。個体数を確保するため、多くの地点では、卵を放出していなくても十分なサイズのリセプタクルを形成している k 個体を「成熟個体」として採集した。成熟時期の調査を行った際に個体識別したものについては、上述のように、卵放出期間を「成熟期間」とし、遺伝的解析に加えた。

遺伝的マーカーとしては、ミトコンドリアゲノム上の *cox3* 領域、および核ゲノム上の 12 のマイクロサテライト領域を解析に用いた。12 領域のうち、11 領域については、吉川伸哉博士(福井県立大)らより提供された RNAseq データにもとづき、本研究において開発されたものである。DNA の抽出は、DNeasy plant mini kit (キアゲン社)を用い、通常の PCR あるいは、type-it microsatellite PCR kit (キアゲン社)を用いて PCR 増幅を行った。塩基配列決定、およびジェノタイピングについては 3130Genetic Analyzer (ABI) を用いた。

本研究では、「集団」を採集地点と採集日の組み合わせで定義した。ミトコンドリア *cox3* については、塩基配列の出現頻度を集団ごとにまとめ、月ごとの変化を確認した。マイクロサテライトについては、遺伝子型データにもとづき、集団間の分化の程度をあらわす *F* 統計量を算出するとともに、集団間の遺伝的関係を系統推定や主座標分析により解析した。さらに STRUCTURE によるクラスタリング解析により、新潟沿岸にいくつの遺伝的グループが存在するか、および遺伝的グループと成熟時期との対応を検討した。

#### 4. 研究成果

野外調査においては、前述のように標識を行うか、地上の構造物との相対的な位置関係から個体識別を行って、個体ごとの成熟状況を観察した。2016年から2018年2月にかけて本土側3地点（糸魚川市市振、柏崎市笠島、鷗が鼻）を中心に調査を行い、市振では1-3月に成熟個体が確認され、一方で鷗が鼻においては、5月に成熟が始まることが確認された。笠島においては、1月末から5月まで連続的に成熟藻体が見られ、4月にやや成熟個体がへるものの、成熟時期をわけるような明確なギャップは確認できなかった。このように、本研究では、場所ごとに集団の成熟時期、期間とも異なることを確認した。従来、冬成熟（ナガモ）春成熟と区別していた集団には、市振集団と鷗が鼻集団がそれぞれ対応するものと考えられる。笠島については、後述するように遺伝的にも他とは分化しており、やや特殊な性質をもつ集団である可能性が考えられる。いずれの地点においても、一個体の成熟（卵放出）期間は2週間から1ヶ月程度で、それ以降は藻体の老化とともに浮力を失って海底に沈むか、流失してしまうことを観察した。

培養実験は、古くから知られているアカモクの光周性にもとづき、一日8時間明期条件下(15)において維持培養を行い、10時間、12時間、および16時間明期の各条件下(15)に株を移動させる長日処理を行うことで成熟誘導をかけ、生殖器官（リセプタクル）の形成における臨界日長を探るといった戦略をとった。しかしながら、冬成熟集団由来の株（佐渡二見、佐渡羽吉、市振）においては、8時間明期条件下でも偶発的にリセプタクルの形成が生じ、計画通りに臨界日長を明確にすることが不可能であった。春成熟集団由来の株（寺泊）が8時間明期条件下では成熟しないという点を考慮すると、春成熟集団と冬成熟集団の間には、成熟誘導に関する光周性に違いがある可能性が考えられる。両集団の成熟時期（1-3月と4-6月）における日長時間の違いを考慮すると、本研究で示唆された、両集団の光周性の違いは極めて説明的である。しかし、冬成熟集団由来の株を未成熟状態で維持する条件が確認できておらず、また、成熟状態になってしまった株を未成熟状態に戻すことに成功していないため、冬成熟集団由来の株において、同じ株をつかった反復実験が実施できていない。このため、光周性の違いについては、今後、株数や集団を増やした上で、冬成熟集団に一般的な性質かの確認を行う必要があると考えられる。

遺伝的解析においては、ミトコンドリア *cox3* 領域の解析に32集団343個体、マイクロサテライトマーカーの解析に32集団470個体を用いた。ミトコンドリア *cox3* の解析においては、大きく3系統に区別される16ハプロタイプが確認された。1月から3月成

熟個体においてみられるハプロタイプと、4月以降の成熟個体において見られるハプロタイプの属する系統が異なっており、冬成熟集団と春成熟集団の間の遺伝的分化が強く示唆された（図）。

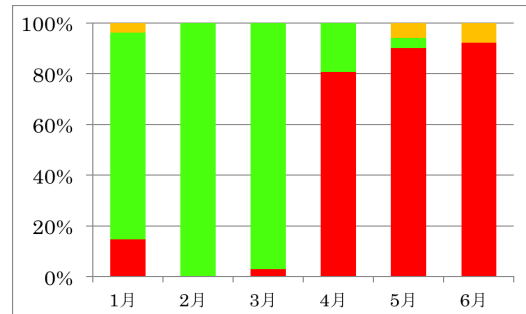


図. 月別のハプロタイプ頻度。赤は1群、緑は2群、黄色は3群のハプロタイプを表す。

マイクロサテライトマーカーにおいては、STRUCTURE解析の結果は非常に複雑なものとなり、Kにもとづくグループ数の推定においては、新潟県沿岸には8つの遺伝的グループが存在することが示唆された。これは、季節間の遺伝的分化に加えて、それぞれの季節集団の中に地域間の遺伝的分化が確認されたことが一つの原因である。グループ間の系統関係をみると大きく冬成熟と春成熟に分けられること、集団間の遺伝的距離にもとづいて主座標分析を行った結果、第一軸にそって冬成熟と春成熟が分かれていたことなど、マイクロサテライトマーカーでも成熟時期で集団が大きく2分されるものの、それぞれの中にさらに細分化されたグループが検出された。

ミトコンドリアとくらべると、核マーカーにおいて季節との対応が明確でなくなった原因の2つ目は、笠島の集団、とくに笠島の春集団が、他の地点の春集団と遺伝的に強く分化していた点である。野外調査の結果と照らし合わせると、笠島においては他地点の春成熟集団と遺伝的に近いグループが、2月から成熟していた。つまり、遺伝的には春成熟集団と認識できるものの、成熟時期という点では冬成熟集団の時期（2、3月）にずれ込んでおり、他の地点の春集団より1ヶ月以上早く成熟していた。遺伝的にも冬成熟集団と認識できる集団は、笠島では2月にのみ確認できた。笠島の春集団については、遺伝的な面とあわせて他の春集団とは分化している可能性が高く、その実態や起源の解明は今後の課題といえる。また、笠島においては港内の斜路（幅300m程度）に沿って、冬集団と春集団がほぼ同所的に生育し（冬集団の方がやや深い場所に生える）同時期に成熟するが、冬集団と春集団の間の交雑を、十分な根拠をもって検出することはできなかった。

本研究において確認された遺伝的分化は、成熟時期の違いによって維持されているのか。少なくともSTRUCTUREにおける遺伝的グ

ループ間の系統関係においては、最初に冬と春に大きく分かれており、主座標分析の結果からもマイクロサテライトの結果も成熟時期に対応した遺伝的分化の存在を示唆していると考えられる。一方で、冬成熟集団と春成熟集団が同時期に成熟する笠島においても両集団の雑種個体は確認できていない。この笠島の結果は、成熟時期の違いという交配前隔離が、主要な隔離機構というよりは二次的なものであることを示唆している。多くの場合、冬集団と春集団では冬集団のほうが深所を好むことを考えると、春集団と冬集団の隔離機構としては、生育場所の違いがなんらかの方法で交配後隔離として働いている可能性が考えられる。

本研究により、新潟県沿岸のアカモク集団においては、季節的な分化と季節集団内での地理的な分化が重なることで、非常に複雑な遺伝的構造が存在することが示唆された。この結果は、従来のアカモクでイメージされていた流れ藻として長距離分散を行うイメージとは真逆のものである。また、アカモクの葉や気胞の形態や生殖形質(雌雄性、季節性)には非常に大きな多様性が知られているが、本研究で確認されたような複雑な遺伝的構造がこれらの多様性を生み出している可能性が考えられる。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 本間由莉・奥田修次郎・笠原賢洋・高橋文雄・吉川伸哉・上井進也、「新潟県沿岸におけるアカモク集団の遺伝的分化の解析」、日本藻類学会第 42 回仙台大会(2018 年 3 月 24 日)
2. 本間由莉・奥田修次郎・笠原賢洋・高橋文雄・吉川伸哉・上井進也、「成熟時期の異なるアカモク集団の遺伝的分化の解析」、北陸植物学会平成 29 年度大会(2017 年 6 月 11 日)
3. 本間由莉・奥田修次郎・笠原賢洋・高橋文雄・吉川伸哉・上井進也、「佐渡におけるアカモク集団の成熟時期の多型と遺伝的構造の関係について」、日本藻類学会第 41 回高知大会(2017 年 3 月 24 日)
4. 渡辺幸平・吉田友和・上井進也、「佐渡島内におけるアカモクの遺伝的構造について」、日本藻類学会第 29 回福岡大会(2015 年 3 月 21 日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 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

なし ( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

吉川 伸哉 (YOSHIKAWA Shinya)  
福井県立大学  
本間 由莉 (HONMA Yuri)  
新潟大学大学院自然科学研究科  
渡辺 幸平 (WATANABE Kohei)  
新潟大学大学院自然科学研究科