

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 13 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570106

研究課題名(和文) 海水・汽水・淡水産シオグサ種における遺伝的多様性と集団間遺伝子交流の比較研究

研究課題名(英文) Genetic differentiation and gene flow between populations of *Cladophora* species distributed in marine, brackish water or freshwater

研究代表者

神谷 充伸 (KAMIYA, Mitsunobu)

福井県立大学・海洋生物資源学部・教授

研究者番号：00281139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：海産ワタシオグサでは、広域に分布するリボタイプの割合が海産ツヤナシシオグサよりも大きかった。ワタシオグサは通年生育するのに対し、ツヤナシシオグサは夏季に消失することから、生育期間の長いほど集団間の遺伝子流動の頻度が大きくなる可能性が示唆された。カモジシオグサは2つの系統群に分かれ、系統1は淡水・汽水環境のどちらにも見られヘテロ接合体の割合が7%だったのに対し、系統2は淡水環境のみで見られ、すべてヘテロ接合体であった。2つの系統群が同所的に生育している集団はほとんど見られなかったことから、系統群間で生殖的隔離が進んでいるだけでなく、生態生理学的にも分化している可能性が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Marine *Cladophora albida* included a larger number of widely-distributed ribotypes than marine *C. opaca*. *Cladophora albida* grows throughout the year, whereas *C. opaca* disappears during summer, which may affect on the frequency of interpopulational gene flow. *Cladophora glomerata* consisted of two phylogenetic groups; group 1 appeared in only freshwater habitats and the rate of heterozygous specimens was 7%, whereas group 2 was distributed in both freshwater and brackish habitats and all specimens were heterozygous. These results suggest that the two groups are not only reproductively isolated but also ecophysiologicaly differentiated.

研究分野：藻類学

キーワード：汽水 塩濃度勾配 種分化 生理生態 雑種強勢 無性生殖

1. 研究開始当初の背景

(1) 生育環境と遺伝的分化：陸上と比べて水圏では環境の多様性が低く、それに伴って生物の遺伝的多様度も低いと考えられてきた。しかしながら、分子生物学的手法を用いた多様性解析が進むにつれて、水圏生物でも遺伝的な分化が頻繁に起こっていることがわかってきた。海水・汽水・淡水環境は、単に塩濃度だけではなく、水質、水温、流速なども異なる上に、遺伝子交流を妨げる地理的障壁も質的に異なっている。しかしながら、このような異なる水圏環境が遺伝的多様性や集団間の遺伝子交流にどのような影響を及ぼすのかほとんどわかっていない。シオグサ属藻類は、海産・汽水産・淡水産種のいずれもが含まれている数少ない大型藻類であり、水圏環境全体を生物学的に比較・評価する上で大変有用な生物であると考えられるが、形態的に類似した種類が多いため同定が困難で、集団遺伝学的な解析は全く進んでいない。

(2) 分子マーカーの開発：シオグサ類の系統解析には、コピー数が多くてPCR増幅がしやすいリボソーム遺伝子が用いられてきた。しかしながら、リボソーム遺伝子には個体内多型も数多く報告されているため、ヘテロ接合体や集団間・内の遺伝的交流を解析するには不都合な場合がある。

2. 研究の目的

本研究では、系統的に近縁な海産種、汽水産種、淡水産種の緑藻シオグサ類に着目し、全国各地の海岸、湖、河川に生育するシオグサ類の集団遺伝学的解析を行い、生育環境の違いが遺伝的多様性、集団間の遺伝子交流、季節性などに及ぼす影響を探ることを目的とする。平行してシオグサ類で利用可能な分子マーカーの開発も行う。

3. 研究の方法

全国の汽水湖とその周辺の海岸および河川域において、シオグサ類の生育状況をチェックし、各集団から2~10個体採集するとともに、水質データの収集を行う。採集した全個体について、形態をチェックするとともにリボソームの遺伝子型(リボタイプ)を決定する。生育地点の水質データと照らし合わせ、各遺伝子型の分布パターンや季節的消長に関係する因子を特定する。また、遺伝的多様度や各遺伝子型の分散距離などを生育環境ごとに比較し、遺伝的分化や遺伝子交流と生育環境の関連性について考察する。これまでに緑藻類で解読された核および葉緑体遺伝子の配列を元に縮重プライマーを設計し、分子マーカーとして利用可能かを検証する。

4. 研究成果

(1) 集団遺伝学的解析

ワタシオグサ: 23 地点で 77 個体を解析したところ、16 種類のリボタイプが検出され、

大きく2つの系統に分かれた(図1)。どちらの系統に属するリボタイプも日本海側と太平洋側の双方に出現し、多くの地点では同所的に分布していたことから、2つの系統群は生殖的に隔離している可能性が高いと考えられる。また、多くのリボタイプが広域に分布していたことから、ワタシオグサは比較的分散能力が高いことが示唆された。

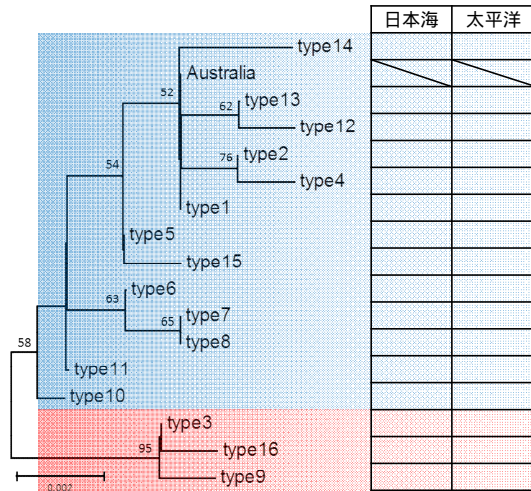


図1 ワタシオグサの16リボタイプのNJ系統樹と各リボタイプが検出された沿岸

ツヤナシシオグサ: 21 地点で 79 個体を解析したところ、17 のリボタイプが検出され、ワタシオグサと同様に2つの系統群に分かれた(図2)。1つの系統群は北海道と日本海に広く分布していたのに対し、もう1つの系統群は静岡のみで採集された。全17リボタイプのうち13のリボタイプが1地点のみで検出され、広い範囲に分布していたリボタイプは2つしかなかった。以上の結果より、ツヤナシシオグサは同じ海産のワタシオグサよりも集団間の分散能力が低いと考えられる。

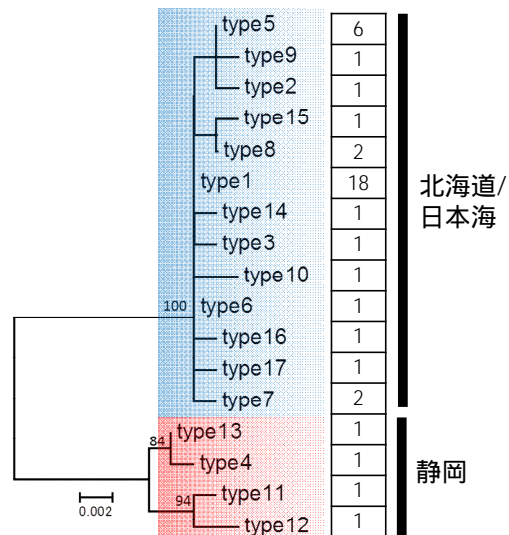


図2 ツヤナシシオグサの17リボタイプのNJ系統樹と各リボタイプの個体数

カモジシオグサ：62 地点で 304 個体を解析したところ、21 のリボタイプが検出され、他種と同様に 2 つの系統群に分かれた。系統 1 は淡水および汽水の河川・湖沼に幅広くみられたのに対し、系統 2 は淡水の河川からしか検出されなかった（図 3）。2 つの系統群が同所的に生育している集団がなかったことから、系統群間で生態生理学的特性が異なっている可能性が高い。また、系統 1 のヘテロ接合度は 7% だったのに対し、系統 2 に属する 79 個体全てがヘテロ接合型であった。一般的にシオグサ類は単相の配偶体と複相の胞子体で世代交代を行っているが、系統 2 に関してホモ接合体が見られなかったことから、複相の胞子体のみで繁殖している可能性がある。紅藻アヤギヌ類では、系統的に離れた個体間で交雑すると F<sub>1</sub> 胞子体が減数分裂せずに胞子体だけで無性生殖するようになる（Kamiya *et al.* 2011）。カモジシオグサの系統 2 の場合、異なる河川で生じた固有のリボタイプ間で交雑が起こり、生じたヘテロ接合型が無性生殖化し、やがて祖先型の有性生殖個体よりも優占するようになったというストーリーが考えられる。近年、三方五湖に出現する緑藻スジアオノリにおいても、ヘテロ接合型の無性生殖集団が優占しているという報告があり（Ogawa *et al.* 2014）、無性生殖化のメカニズムや無性生殖集団が優占する理由などを早急に解明する必要がある。

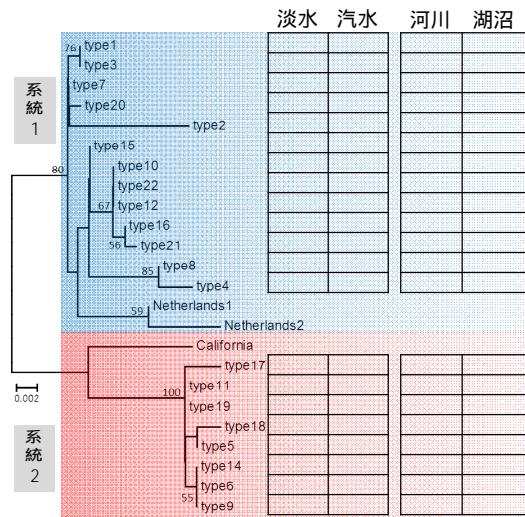


図 3 カモジシオグサの 21 リボタイプの NJ 系統樹と各リボタイプの生育環境

3 種間の比較：海産ツヤナシシオグサは 1 地点のみに出現するリボタイプの割合が最も高く、広域に分布するリボタイプも少数だったことから、海洋環境に生育しているながら淡水・汽水産種より分散能力が低いことが示唆された。ワタシオグサやカモジシオグサは通年生育しているのに対し、ツヤナシシオグサは夏季に消失することから、出現期間の違いが分散能力の差に影響している可能性がある。

(2) 分子マーカーの開発：マイクロサテライトマーカーの開発も検討したが、解析に用いる 3 種すべてを同じプライマーで増幅するのは困難であると考え、いくつかの大型緑藻類で配列が解読されているハウスキーピング遺伝子を元に、縮重プライマーを設計した。最終的に 6 つの核コード遺伝子 [カルモジュリン結合タンパク (*cbp*)、熱ショックタンパク質 (*hsp70*, *hsp90*)、リボソームタンパク (*rb13*)、アルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (*gapA*)、アクチンタンパク (*act1*)、タンパク質伸長因子 (*EF1a*)] と 3 つの葉緑体コード遺伝子 [タンパク質伸長因子 (*tufA*)、ATP 合成酵素 (*atpB*)、ルビスコ遺伝子 (*rbcL*)] の縮重プライマーを設計し、様々な増幅条件で PCR を試みたが、いずれのプライマーも目的の DNA 断片を増幅することはできなかった。シオグサ類では大規模なゲノム突然変異が起こっている可能性があり、RNAseq や EST 解析など、より包括的な解析でプライマーを設計する必要があると考えられる。

#### 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 7 件)

- Hayakawa, Y., Ogawa, T., Yoshikawa, S., Ohki, K. & Kamiya, M. (2012) Genetic and ecophysiological diversity of *Cladophora* (Cladophorales, Ulvophyceae) in various salinity regimes. *Phycological Research* 60: 86–97.
- 丹羽一夫・早川雄一郎・神谷充伸 (2013) 異なる塩濃度環境に生育するシオグサ類の遺伝的多様度と分布パターンの比較. *藻類* 61: 74–80.
- Ogawa, T., Ohki, K. & Kamiya, M. (2013) Difference of spatial distribution and seasonal succession among *Ulva* species (Ulvophyceae) across salinity gradients. *Phycologia* 52: 637–651.
- Kamiya, M. & West, J. A. (2014) Cryptic diversity in the euryhaline red alga *Caloglossa ogasawaraensis* (Delesseriaceae, Ceramiales). *Phycologia* 53: 374–382.
- Ogawa, T., Ohki, K. & Kamiya, M. (2014) High heterozygosity and phenotypic variation of zoids in apomictic *Ulva prolifera* (Ulvophyceae) from brackish environments. *Aquatic Botany* 120: 185–192.
- 芹澤 (松山) 和世・金原昂平・米谷雅俊・渡邊広樹・白澤直敏・田口由美・神谷充伸・芹澤如比古 (2015) 「富士北麓・精進湖と本栖湖におけるフジマリモの発見(予報)」*富士山研究* 9: 1–6.
- Okuda, K., Sekida, S., Hasebe, A., Iwabuchi, M., Kamiya, M. & Hishinuma, T. (2016) Segregative cell division and the cytoskeleton

in two species of the genus *Struvea*  
(Cladophorales, Ulvophyceae, Chlorophyta).  
*Phycological Research* (accepted on 25 May  
2016)

〔学会発表〕(計6件)

多様な塩濃度環境に生育するシオグサ属藻類における集団遺伝学的解析. 丹羽一夫・早川 雄一郎・吉川伸哉・神谷充伸. 北陸植物学会 2013 年度大会、2013 年 6 月、金沢.

山梨県内のタニシの殻上に着生するシオグサ目藻類. 芹澤如比古・渋谷里夏・早川雄一郎・神谷充伸・芹澤(松山)和世. 日本藻類学会 2014 年度大会、2014 年 3 月、千葉.

Extremely high heterozygosities of asexual *Ulva prolifera*. Ogawa, T., Ohki, K. & Kamiya, M. 2014 Wando International Marine Algal Symposium, April 2014, Wando, Korea.

近縁な海産・淡水産シオグサの遺伝的多様性と分布パターンの比較. 丹羽一夫・吉川伸哉・神谷充伸. 日本藻類学会 2015 年度大会、2015 年 3 月、福岡.

汽水域に生育するスジアオノリの遺伝的・生殖的多様性と分布特性. 小川拓・吉川伸哉・神谷充伸. 北陸植物学会 2015 年度大会、2015 年 6 月、金沢.

淡水エビに寄生するエビヤドリモ属 *Cladogonium* 藻類には複数種いるのか? 芹澤如比古・今井 正・大貫貴清・中曾雅之・小川拓・丹羽一夫・神谷充伸・芹澤(松山)和世. 日本陸水学会甲信越支部会. 2015 年 11 月、新潟.

〔図書〕(計2件)

「海藻(ネイチャーウォッチングガイドブック)」 誠文堂新光社、東京. 271 pp., 2012. (監修)

「藻類ハンドブック」(渡辺 信監修) NTS、東京. 768 pp., 2012. (編集・分筆)

6. 研究組織

(1)研究代表者

神谷 充伸 (KAMIYA Mitsunobu)  
福井県立大学・海洋生物資源学部・教授  
研究者番号：00281139

(2)研究分担者

( )  
研究者番号：

(3)連携研究者

( )  
研究者番号：