



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	日本産寒海性コンブ科植物 <i>Saccharina japonica</i> の遺伝的多様性の保全に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	前田, 高志
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	乙第6925号
Issue Date	2014-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56694
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_Maeda_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士（環境科学）

氏 名

前田 高志

学 位 論 文 題 名

日本産寒海性コンブ科植物*Saccharina japonica*の遺伝的多様性の保全に関する研究
(Conservation research on genetic diversity in *Saccharina japonica*
growing in northern part of Japan)

コンブの一種*Saccharina japonica*は、北海道を中心とする北太平洋沿岸西部の寒海域に広く分布し、各地で大規模な藻場を形成する生態的な重要種である。また、本種は日本において一千年以上も前から食文化を支える材料として利用されてきた産業的な重要種でもある。本種のなかには局所的かつ連続的な分布域を持つ4変種が知られており、それぞれの変種のなかでも産地による形態変異は顕著であり、生育環境や産業的価値もさまざまである。これら多様性を保全し、各地の豊かな海中の森と特色ある水産物を守るためには、客観的分子情報に基づく多様性調査により本種の集団構造を理解し、適切にその保全に努める必要がある。本研究では、北海道沿岸とその周辺域に生育する*S. japonica*について、遺伝的多様性をDNA多型解析によって明らかにするため、まずは、解析に有用なDNAの抽出方法の確立を試みた。次いで、AFLP分析とマイクロサテライトマーカー分析を行い、地域個体群や局所個体群の存在を明らかにするとともに本種在来個体群の遺伝的固有性を考慮した保全の在り方を検討した。さらに、具体的な保全へ向けた策として、環境ストレスマーカーによる藻場健全性の検知と、バイオフィレーバーと高分子ゲルを活用した食植動物からの保護を検討した。

一般に、DNA多型解析においては、結果の再現性が求められる。高い再現性を得るためには材料として質の高いDNAを用いることが不可欠であるが、*S. japonica*をはじめとするコンブについては粘質多糖類やポリフェノールといった夾雑物が抽出DNAの純度を下げる要因と考えられる。今回、DNA抽出Kitを用いた方法、CTABを用いた方法、SDSを用いた方法、CTABとSDSを併用した方法などを含めて、抽出前の多糖類除去処理を伴わない4通りと、処理を伴う7通りの方法によって抽出したDNAについて純度評価と、それらを用いたAFLP分析による結果の再現性を確認した。その結果、何れの方法によって得られたDNAも極端な低純度のものはなかったが、KitやCTAB法など広く一般に用いられている方法では、AFLP分析の結果において蛍光強度が低いバンドの出現の有無に問題が見られた。しかし、今回考案した、抽出前の組織の洗浄、SDS処理、CTAB処理を作業の柱とする方法では、AFLP分析において全てのバンドの出現の有無に高い再現性が得られた。

先に得られた知見をふまえ、北日本沿岸とサハリン南部沿岸の58産地から採集した*S. japonica*葉体を材料にAFLP分析を行ったところ、本種は大きくわけて2つの遺伝子集団が

存在することが示された。さらに、本種内の4変種のなかにも、それぞれ2つの遺伝子集団が存在することも明らかとなった。一方、特定湾内（小樽市忍路湾内）の7地点間における分析の結果、湾口部と湾奥部で遺伝的な差異が検出され、海水の流動などの物理的環境要因によって小規模群落間に遺伝的分化が生じることが示唆された。従って、本種藻場を保全するうえで、産地レベルの遺伝子集団のみならず、これらの小規模集団を存続させることも必要であると考えられる。また、今回、産地間の遺伝的類似度の関係を精査することによって周辺の産地と遺伝的に大きく異なる集団が存在することが明らかになった。これらの局所個体群は遠方の産地と高い遺伝的類似性を示したが、本種の胞子の拡散能力を考慮すると、これらは人為的に導入されたもの、あるいは種分化の過程で孤立したものであることが推察された。ところで、マイクロサテライトマーカーの開発は、一般に操作が複雑で多大な時間と費用を要することが問題となる。そこで今回、その問題を解決するべくDual-Suppression PCR法によるマイクロサテライトマーカーの開発効率を検証するとともにマーカーの開発を試みた。その結果、陸上植物で報告されているほどの効率は得られなかったものの、従来の方法と同等かそれ以上の効率が得られた。一方で、開発に用いるSSR Primerと鋳型DNAの非特異的な結合と、短鎖アダプターの3'末端からの伸長反応のブロックの程度が、開発効率の低下に繋がることが明らかとなった。開発された10種類のうち、4つをマーカーとして利用して、マイクロサテライトマーカー分析により*S. japonica*産地間の遺伝的多様性を調査したところ、既存の4変種とはそれぞれ分布域の異なる4つの遺伝子集団の存在が支持され、今後はこれまでの変種の枠とは異なったこれら4集団をそれぞれ変種として扱うことが妥当と見なされた。さらに、マイクロサテライトマーカーを用いたSTRUCTURE分析では、AFLP分析で認められた局所個体群が優先的に持つクラスターがその周辺域の別産地個体にも混在することが明らかとなった。局所個体群の取り扱いには本種の遺伝的多様性を保全するうえでの大きなポイントとなるが、今後如何なる藻場造成を行うにしても、現場海域へ遺伝資源を投入する際には局所個体群周辺域の個体が持つ遺伝組成を十分に考慮すべきである。

現存するコンブ遺伝資源の保全を目的として藻場造成を実施するにあたり、事前に対象域内の個体について生育環境における健全性を理解することは、その先、効率的に事を進めるうえで大いに役立つ。今回、*S. japonica*藻場の衰退や消失に大きく関与する本種のストレス要因である水温と栄養塩（窒素・リン）濃度に依存して葉体内で発現量が増減するタンパク質をプロテオーム解析によって探索し、藻場の健全性を計るために有用な環境ストレスマーカーの開発を試みた。その結果、高水温下や貧栄養下で育った個体は適正条件で育った個体に比べて特異的に発現量が増加するタンパクスポットが検出された（水温25℃以上で71のスポットが検出；窒素濃度リン濃度ゼロで51のスポットが検出）。北海道沿岸では一年を通して海水温が25℃を超えることはほとんどなく、窒素やリンの濃度がゼロになることはない。従って、これらの条件で特異的に発現増加の認められたスポットは本種の環境ストレス応答タンパク質であり、今回同定されたvBPOや14-3-3 proteinなどのスポットは藻場の健全性を知るためのマーカーとして有用と考えられる。

本研究のなかで行った*S. japonica*の遺伝的多様性の調査を通して、遺伝資源の保全を進め

るうえで、地域個体群や局所個体群、そして産地内の小規模群落を維持していくことが重要であることが示された。現状、既存の本種藻場を維持するためにもっとも課題となるのが、水温変化や栄養塩濃度変化への対策は別として、キタムラサキウニによる食害への対策である。今回、比較的小規模な藻場を守ることを目的とした、コンブ葉体由来のバイオフィレーバーを添加したアルギン酸ゲルを用いたウニの駆集方法について提案、検討した。その結果、室内水槽を使ったウニの行動観察を通して、コンブ葉体由来のバイオフィレーバーがキタムラサキウニの誘因に働くことが確かめられ、その効果はフレーバー中の既知の成分である11種類の揮発性化合物についても認められた。一方、化合物の担持体として働かせるゲルの濃度は1%から1.25%とし、化合物の添加量はゲル40gあたり、コンブ葉体40g中に含まれる量の10倍が効果的であることが分かった。本取り組みを実海域で行う場合、化合物の入手法が課題である。コンブ葉体が有するバイオフィレーバーの主成分の幾つかは陸上植物の香り成分でもあることから、これらを活用することで安全かつ安価に化合物を得ることができる。