

海産有害・有毒プランクトンの分布と集団遺伝構造

長井 敏

水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所

赤潮環境部有毒プランクトン研究室

〒739-0452 広島県廿日市市丸石2-17-5

Distribution and population genetic structures of marine harmful and toxic microalgae

Keywords: gene flow; Harmful and toxic microalgae; new introduction; population differentiation; population genetic structure.

Satoshi Nagai

Fisheries Research Agency of Japan,

National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea

2-17-5 Maruishi, Hatsukaichi, Hiroshima 739-0452, Japan

1. 有害赤潮藻 *Cochlodinium polykrikoides* の集団遺伝構造

1-1. *C. polykrikoides* の分布拡大

有害赤潮藻 *Cochlodinium polykrikoides* の赤潮発生により、マダイ・ブリ・トラフグ・アワビ・サザエなどの天然や養殖の魚介類が大量に死滅し、韓国と西日本ではこれまで年間数百万〜十数億円の莫大な漁業被害が生じている。本種の栄養細胞の特徴として、1) 無性的二分分裂で増殖、2) 水温21~26°Cの高水温下で活発に増殖、10°C以下では増殖せず、3) 有性生殖の報告はない、4) 高い分裂速度 (1.3 divisions day⁻¹) を示す、等が挙げられる (Kim et al. 2004, 山砥 2006)。一方、hyaline cystと呼ばれる耐久性のあるシストを形成し、越冬に重要な役割を果たしていると考えられている (Kim et al. 2002)。興味深いことに、hyaline cystはこれまで韓国の個体群でのみ確認されている。本種の存在は1975年頃から熊本県八代海において確認されて

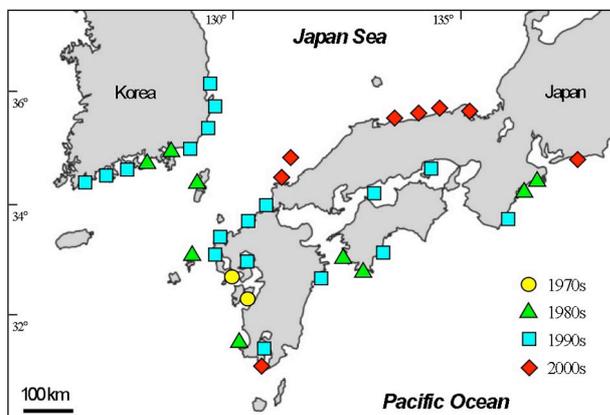


図1 有害赤潮藻 *Cochlodinium polykrikoides* の分布拡大。

いたが、1980年代以降、韓国および西日本において本種の分布域は爆発的に拡大した。また2000年代に入ると、これまで有害赤潮による被害がほとんど報告されていなかった日本海山陰沿岸域においても本種の赤潮が発生し、磯根資源として重要なアワビ・サザエなどを大量に死滅させた (図1)。分布域は現在もなお拡大の一途を辿っているが、その分布拡大経路については未だ未解明のままである。これまで植物プランクト

ンの分野において、種内の遺伝的変異や個体群の遺伝子構造を十分に解析できる分子マーカーの報告は少なく、高い多型性を示す分子マーカーの開発が切望されてきた。最近、我々のグループは、*C. polykrikoides*のマイクロサテライトマーカーの開発を行い、高度多型を有する15個のマーカー作成に成功した(Nishitani et al. 2007)。本研究では、各海域に生息する*C. polykrikoides*個体群の遺伝的構造とその類縁関係をマイクロサテライト多型によって解析し、本種の分布拡大経路を解明することを目的とした。

1-2. マイクロサテライト多型解析

日本および韓国沿岸の計11地点から採集した海水から、クローン培養株（合計421株）を確立した（図2, 表1）。韓国は2005年と2007年、熊本では2006年と2007年にそれぞれサンプリングを実施し、計13サンプルを得た。全株を培養・集藻した後、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)によりDNAを抽出した。開発した15個のマーカーのうち、PCR増幅が良好であった10個のマーカーを用いて全株から抽出したDNAを用いてPCR増幅を行った。ゲルシークエンサーにより各PCR産物のバンドサイズの決定後、各個体の遺伝子型を決定した。集団遺伝学的解析を複数のソフトを用いて行い、各対立遺伝子の出現頻度、個体群間の遺伝距離、集団分化の有意差検定、集団帰属検定、アليل共有度の比較を行った。各サンプルにおいて、10個のマーカーを用いたPCR増幅が得られた株の割合は97-100%であり、いずれのマーカーも集団遺伝学的解析を行うために十分なPCR増幅が見られた。また、シークエンスゲル上の各バンドは1本であり、従って本種の栄養細胞の核相はNであり“Haploid”であることが判明した。これまでリボソームRNA遺伝子（LSU）を用いた配列比較において、種内では多型性がほとんど検出されない（Ki & Han 2008）。一方で、3つの明瞭なリボタイプが存在が報告されているが（Iwataki et al. 2008）、本研究において使用した培養株は全て同一のPCR-RFLPパターンを示し、ほぼ同じLSU配列を持つことを確認済みである。これに対して、マイクロサテライトを用いた場合、各遺伝子座のアليل数は4-26 (9.9 ± 6.1 , 平均土標準偏差)、遺伝子多様度(Nei 1973)は0.00-0.90 (0.54 ± 0.21)の範囲にあり、株間で高度の多型性が認められ、個体識別が可能なこ

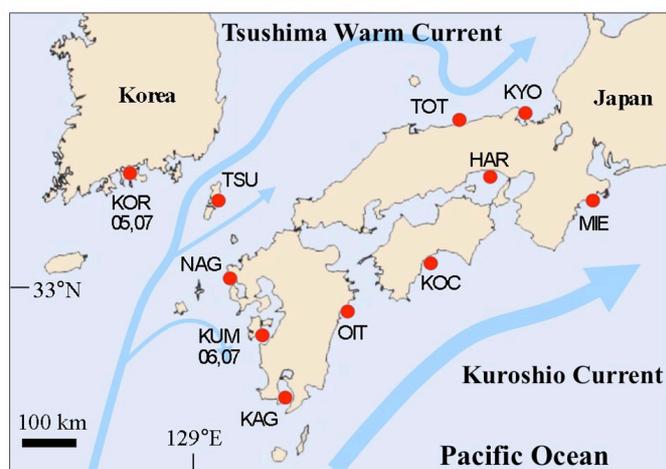


図2 *Cochlodinium polykrikoides*の採集地点図。

表1 *Cochlodinium polykrikoides*の採集地点と分析株数。

採集海域	略称	採集年	分析株数
大分県猪野串湾	OIT	2005	22
長崎県九十九島	NAG	2005	45
兵庫県播磨灘	HAR	2005	33
韓国Yeosu	KOR05	2005	48
長崎県対馬	TSU	2005	47
鳥取県長早生	TOT	2005	25
三重県五ヶ所湾	MIE	2005	36
熊本県八代海	KUM06	2006	48
京都府栗田湾	KYO	2006	44
鹿児島県山川湾	KAG	2005	16
高知県野見湾	KOC	2005	32
熊本県八代海	KUM07	2007	18
韓国Yeosu	KOR07	2007	7

とが判明した。なお、遺伝的多様性の程度については、個体群間で明瞭な差異は見られなかった (Nagai et al. 2009)。

1-3. 各集団間の遺伝的差異 (遺伝的類似性・集団分化・遺伝子流動)

UPGMA法によるデンドログラム (図3) を見ると、11個体群は大きく3つのクラスター、1) 韓国・対馬・鳥取・京都 (日本海の個体群)、2) 熊本 (八代海の個体群)、3) 鹿児島・長崎・大分・高知・播磨・三重 (瀬戸内海および太平洋岸の個体群) に区分された。日本海

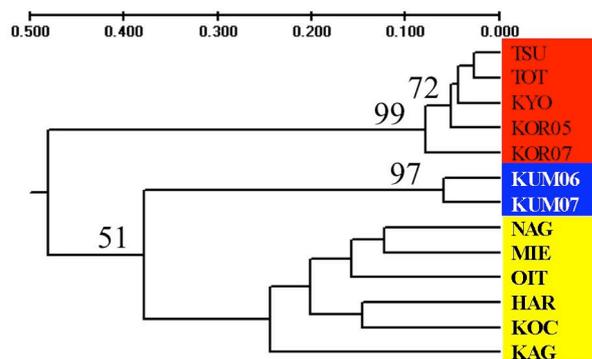


図3 UPGMA デンドログラム。遺伝距離は Nei (1972)による。 *C. polykrikoides* 13 集団 (421 個体) を 10 本のマイクロサテライトを用いて解析したデータを使用。図中の値はブートストラップ値で >50 の値を示した。

および八代海の個体群内では遺伝距離が著しく小さく、これらの個体群が遺伝的に極めて近似していることを示す。また、八代海の個体群はサンプリング年が異なっても遺伝子構造は安定で変化せず、八代海固有の個体群が存在することを示す。残りの個体群でまとまったが、遺伝距離が日本海や八代海の個体群よりやや大きいことがわかった。4つの異なる方法を用いて集団分化の検定を実施した結果、日本海の個体群間では有意差が見られなかった。一方、鹿児島・長崎・大分・高知・播磨・三重・熊本の各個体群間では、ほぼ全てのペア個体群で有意な集団分化が認め

られたことは、これらの個体群では独自の個体群を形成しているため遺伝的差異が生じており、他の個体群とは基本的に混合していないことを示す。地理的な情報を入力せずに、全 421 個体が何個のクラスター (集団) に区分されるかについて、解析ソフト STRUCTURE ver. 2.2 (Pritchard et al. 2000)を用いて調べた結果、2 (日本海およびそれ以外) もしくは3つの集団 (日本海・八代海・それ以外) に区分され、UPGMAデンドログラムや集団分化の検定結果を支持した (図4A, B)。日本海および八代海の個体群では、各個体がほぼ単一のクラスター1 (赤色) およびクラスター2 (青色) で占められていることに対して、瀬戸内海および太平洋の個体群は、長崎県の個体群 (クラスター3, 黄色) 以外はクラスターが混在した。

1-4. 対馬暖流及び人為的要因と思われる海域間輸送

各集団間の全てのペア個体間でアレル共有度 (Chakraborty & Jin 1993)を計算し、10個のマイクロサテライト遺伝子座のうち7個以上の遺伝子座で同じ遺伝子型を有する個体の割合を調べた結果、日本海とそれ以外の各集団間の組み合わせでは0.5%以下であったのに対し、日本海の各集団間では8.1-28.9%の範囲 (14.5±6.5, 平均±標準偏差)、それ以外の各集団間では0.0-7.3%の範囲 (1.1±1.4%) にあり、特に日本海集団では著しく高い値を示した (図4C)。これらの結果は、1) 日本海と瀬戸内海および太平洋沿岸の集団間に遺伝的な交流がほとんど

なく、大きな遺伝的分断が生じていること、2) 日本海集団は単に遺伝的に近似しているのではなく、韓国沿岸域から対馬暖流によって輸送されて日本海で赤潮を形成したこと、3) 瀬戸内海や太平洋沿岸の個体群間に人為的要因による遺伝子流動があることを示唆する。10個の

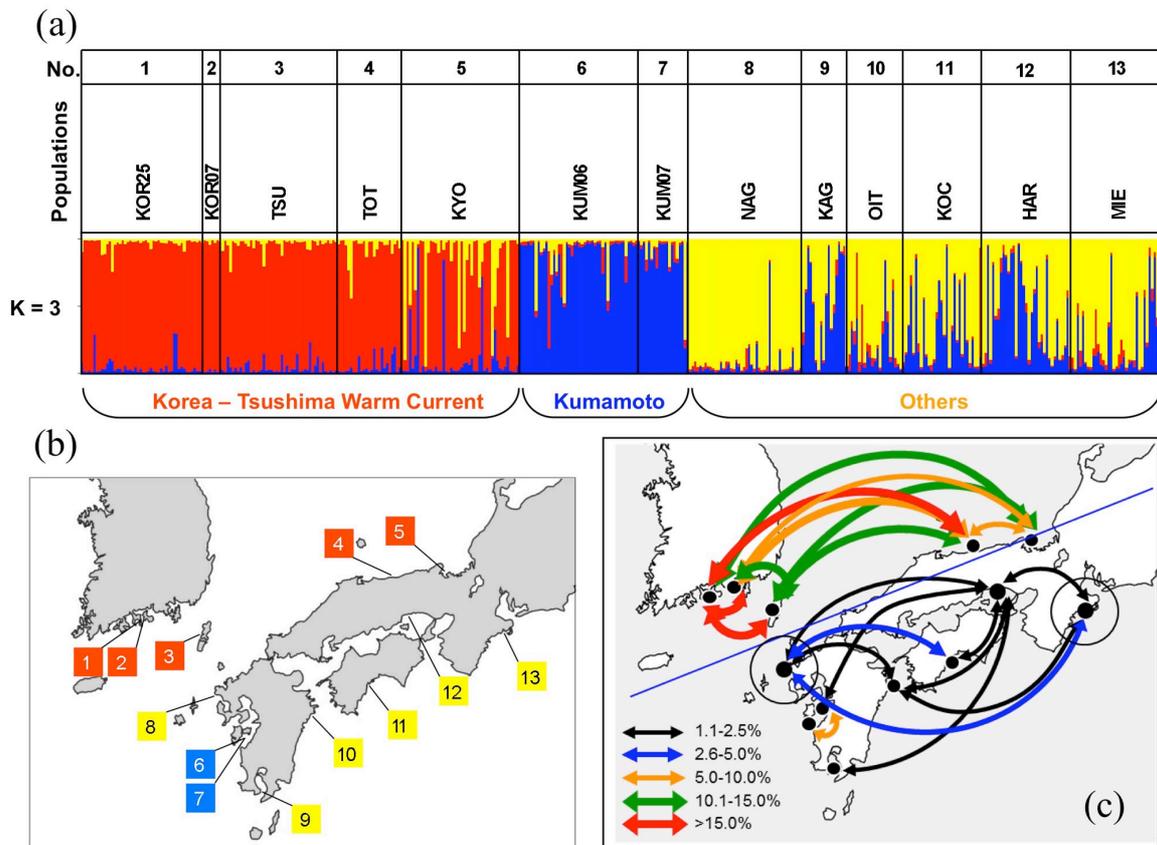


図4 STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) によるバープロット解析。 *C. polykrikoides* 13 集団 421 個体が幾つのクラスターに区分されるかを解析し、各個体が各クラスターにどの程度の割合で帰属するか割合を示した (a)。日本海および八代海の集団 (b) は、赤色あるいは青色で示した単一のクラスターに帰属することを示す (a)。アレル共有度分析による個体追跡 (c)。 *C. polykrikoides* 13 集団各集団間の全てのペア個体間でアレル共有度 (Chakraborty & Jin 1993) を計算し、10 個のマイクロサテライト遺伝子座のうち 7 個以上の遺伝子座で同じ遺伝子型を有する個体の割合を調べ、ペア集団間でその割合を図示した。

各遺伝子座で得られたアレル数 (約26億通り) から計算して、7個以上の遺伝子座で遺伝子型が偶然に同じになる確率は極めて低く、上記で検出されたペア個体は偶然に遺伝子型が一致したのではなく、人間で言えば同じクローンか、親兄弟姉妹ほどの近縁な関係にあると言える。鳥取県の現場調査において、 *C. polykrikoides* が韓国沿岸で大量発生した数日~数十日後に山陰沿岸域でも本種の赤潮が観測されている。また、2003年および2005年に韓国沿岸で本種の大規模な赤潮が発生した時に、人工衛星画像によりクロロフィルaの高濃度帯が、韓国沿岸から東進し山口県萩市周辺沿岸へ漂着し、その後、さらに山陰沿岸に沿って東方へ流れていくのが確認されている (宮原ほか 2005)。さらに、韓国沿岸の蔚山、巨濟、麗水および日本海沿岸の平戸の4地点から初期投入された粒子追跡シミュレーションによる解析結果も、対馬暖流による本種の移送を強く支持した (Onitsuka et al. 2010)。対馬暖流以上の事象から判断し

て、近年、本種が山陰沿岸域で見られるようになった赤潮は、韓国沿岸で大発生した*C. polykrikoides*赤潮の一部が対馬暖流によって流され、山陰沿岸へ漂着したことに起因することは明白である。一方で、地理的に離れた長崎県・兵庫県・三重県の個体群で同じ遺伝子型を持つ複数のペアが検出された結果は、これらの海域がコアとなり人為的な要因による本種の移送・定着を示唆する。長崎県と三重県は日本における真珠養殖の産地として知られ、特に長崎県は真珠貝種苗(母貝・稚貝)の日本有数の供給地である。三重県およびその他の海域では、過去に長崎県から、特に春~秋にかけて大量の真珠貝種苗の購入・移植を行ってきた経緯があり(永井清仁 私信)、これらの種苗とともに*C. polykrikoides*の栄養細胞が運搬された可能性は十分考えられる。兵庫県播磨灘については、地理的に、船舶による運搬の中継基地の役割を果たす神戸港に近く、*C. polykrikoides*が、播磨灘を経由して移送されたのかもしれない。

1-5. 定着と生活史の関係

本種は10°C以下の低水温では生存できないため、冬季の最低水温が10°Cを下回る海域では湾内で越冬しているのか、外洋で越冬しているのか、これまで不明であった。しかし、同一海域から、異なる年に採集した個体群の遺伝子型の組成がほとんど変わらず、海域固有の組成を示したことから(図3,4)、独自の海域で越冬していることが判明した。このことは、沿岸域の富栄養化、地球の温暖化による冬季の水温上昇に伴い、今後さらに新たな海域における赤潮発生と定着・分布拡大が生じる可能性があり、大いに懸念される。以上から、マイクロサテライトマーカーによる集団遺伝学的解析を行うことにより、各海域に分布する個体群および個体を分子レベルで識別し特徴つけることに成功し、また、集団構造に影響を及ぼす要因を検出することが可能となった。現在、人為的な要因、とりわけ水産種苗の移植に伴う、有害・有毒プランクトンの輸送過程について、実際に業者間で売買され移植のため海域間移送中の種苗から、直接、プランクトンを検出する研究も行っており、かなりの量の生きた有害・有毒プランクトンが輸送されていることが明らかになってきた(松山・山口2008)。今後は、日本および韓国沿岸に分布する集団の起源を解明するべく、中国・東南アジア等に分布する*C. polykrikoides*集団の解析も実施し、これらを比較することで地球規模での本種の集団構造と分布拡大要因を明らかにしていきたい。

2. 有毒渦鞭毛藻*Alexandrium catenella*の集団遺伝構造

1-1. *A. catenella*の分布拡大

現在、*Alexandrium*属は、世界中で28種の出現が報告されており、有毒種と無毒種が混在する。日本では、これまで4種の有毒種の出現が知られている。有毒渦鞭毛藻*Alexandrium*属は形態学的な差異が極めて少なく、顕微鏡観察に基づいた形態判別では種判別技術に熟練が要求される。さらに、同一種内で異なる海域に分布する集団間の類縁関係を明らかにし、新たな海域への移入などを解明する手法は、形態学的手法では達成不能である。この目的を達成するためには、高度多型分子マーカーを用いて各個体および集団をタイピングするといった

集団遺伝学的手法の導入が最も有効であると考えられるが、これまで*Alexandrium*属の集団構造について遺伝子解析を行い、それらの情報に基づいた地域集団の集団分化や遺伝子流動(海域間移動)を証明した報告はほとんどなかった(Nagai et al. 2007)。米国のScholin et al. (1995)は、核のリボソームRNA遺伝子を用いて、世界沿岸各地から分離した*Alexandrium*属の分子系統解析を行い、その結果、*A. tamarense* / *catenella* / *fundyense* は非常に近縁であり、分子レベルでは区別できないことから、この3種をspecies complex と名付けた。そして、日本の*A. catenella*はオーストラリアのものと塩基配列が一致することから、本種が日本からの大型タンカーのバラスト水に交じって運ばれ、オーストラリアで貝毒を発生させる原因になったと指摘した(図5)。それ以来、日本が悪者扱いされてきた経緯がある。1995年にフランス沿岸のThau lagoonで、地中海では初めて*A. catenella*のブルームが確認された。カキ養殖の盛んなThau lagoonでは、1998年に初めて食用のカキが毒化し(Masselin et al. 2001)、以来、ほぼ毎年のように本種の出現による麻痺性貝毒の発生が報告されてきた(Genovesi et al. 2009, 2010)。核リボソームRNA遺伝子による系統解析の結果、Thau lagoonに出現する集団は、日本及びアジア起源の個体と類似することから、日本からThau lagoonへのカキ種苗の移植に伴い、運ばれたものと推測された(Lilly et al. 2002, Penna et al. 2005)(図5)。しかし、彼らのデータは、単に1遺伝子の配列情報が類似していることを示したにすぎず、科学的根拠に乏しく説得力に欠ける。筆者は、さらに科学的かつ客観的な方法で真実を明らかにしたいという考えのもと、rRNA遺伝子より高度の多型性を示し、かつ情報量の多い分子マーカーとして知られるマイクロサテライトマーカーの開発(Nagai et al. 2005, Nishitani et al. 2007)を行うとともに解析を行った(Masseret et al. 2009, Genovesi et al. 2009, 2010)。

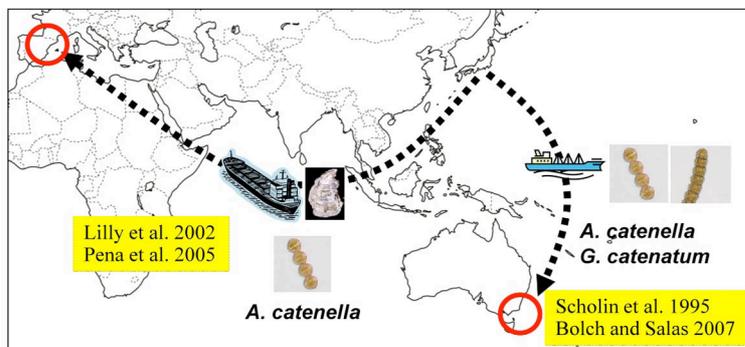


図5 有毒プランクトンの分布拡大仮説。日本からのタンカーのバラスト水の排水やカキの移植により移送されたとして複数の研究者により、日本が悪者扱いされてきた。

2-2. マイクロサテライト多型解析

日本(8地点)、中国(3地点)およびフランスの地中海Thau lagoon(1地点)の計12地点から採集した海水および海底泥から、クローン培養株(合計644株)を確立した(図6, 表2)。全株を培養・集藻した後、CTAB法(Lian et al. 2001)によりDNAを抽出した。開発した21個のマーカーのうち、PCR増幅が良好であった8個のマーカーを用いて全株から抽出したDNAを用いてPCR増幅を行った。ゲルシークエンサーにより各PCR産物のバンドサイズの決定後、各個体の遺伝子型を決定した。集団遺伝学的解析を複数のソフトを用いて行い、各対立遺伝子の出現頻度、集団間の遺伝距離、集団分化の有意差検定等の比較を行った。各サンプルに

において、8個のマーカを用いたPCR増幅が得られた株の割合は97-99%であり、いずれのマーカも集団遺伝学的解析を行うために十分なPCR増幅が見られた。また、シーケンスゲル上の各バンドは1本で、従って本種の栄養細胞の核相はNであり“Haploid”であることが判明した。マイクロサテライトを用いた場合、各遺伝子座のアリル数は2-13 (9.9±6.1, 平均±標準偏差)、遺伝子多様度 (Nei 1973) は0.16-0.89 (0.61±0.15) の範囲にあり、株間で高度の多型性が認められ、個体識別が可能なことが判明した。なお、遺伝的多様性の程度については、集団間で明瞭な差異は見られなかった (Genovesi et al. 2010)。

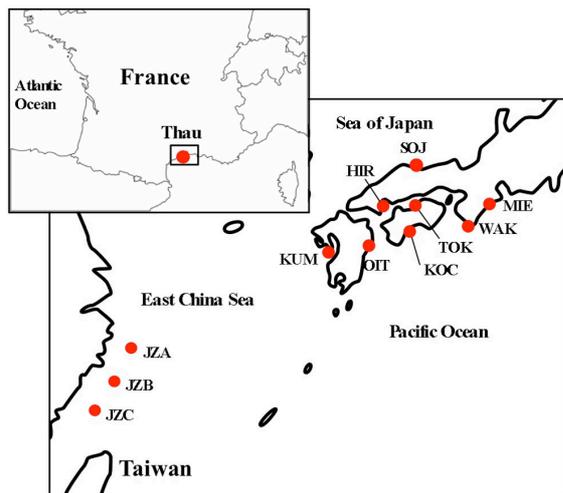


図 6 *Alexandrium catenella* の採集地点図

表2 *A. catenella*の採集地点と分析株数

採集海域	略称	採集年	分析株数
フランス Thau lagoon	THAU	2004	74
中国 Zhejiang Coast	ZCA	2007	60
中国 Zhejiang Coast	ZCB	2007	58
中国 Zhejiang Coast	ZCC	2007	50
三重県英虞湾	MIE	2008	57
和歌山県田辺湾	WAK	2007	83
高知県野見湾	KOC	2009	44
大分県猪串湾	OIT	2006	43
熊本県宮ノ河内湾	KUM	2009	59
徳島県北灘	TOK	2003	35
広島県広島湾	HIR	2006	35
鳥取県赤崎港	SOJ	2006	46

2-3. 各集団間の遺伝的差異 (遺伝的類似性・集団分化・遺伝子流動)

ゲルシーケンサーで各バンドサイズを決定し、集団遺伝学解析のための統計パラメータを求めるため複数のソフトを用いて解析した。日本、中国、日本海およびフランスの集団のバンドパターンが明らかに異なったため、Arlequin ver. 3.1.1 (Excoffier et al. 2005) による AMOVA 解析において、あらかじめ日本、日本海、中国、フランスの4集団に分けて解析を行ったところ、対立遺伝子の出現頻度 (F_{ST}) および対立遺伝子のサイズ (R_{ST}) のいずれの場合についても、4集団は遺伝的に異なる集団であることが判明した (Genovesiほか 未発表データ)。ペアワイズ F_{ST} ・ R_{ST} ともに、ほとんど全てのペア集団間で有意な遺伝的分化 (F_{ST} で27/28ペア集団, R_{ST} で25/28ペア集団) が認められた。4集団のペアワイズ F_{ST} ・ R_{ST} に基づく集団分化の検定結果において、日本海とそれ以外 (日本・中国・フランス) の集団間の遺伝的分化の程度が著しく大きく、とりわけペアワイズ R_{ST} では、日本-日本海間で0.764, 日本海-フランス間で0.737という極めて大きな値を示した (表3)。

	Japan (8)	China (3)	SOJ (1)	France (1)
Japan (8)	---	0.129***	0.764***	0.068***
China (3)	0.117***	---	0.458***	0.065*
SOJ (1)	0.138***	0.165***	---	0.737***
France (1)	0.164***	0.241***	0.307***	---

表 3. *Alexandrium catenella* 集団の集団分化の検定結果. ペアワイズ F_{ST} (左下) & R_{ST} (右上). 8 個のマイクロサテライトマーカを用いて得られたデータを Arlequin ver. 3.1 (Excoffier et al. 2005) により解析した。有意差検定は 10,100 回のパーミュテーションを実施し、さらにボンフェローニ検定で修正した。***, $P < 0.001$; * $P < 0.05$

この結果は、これらの集団が対立遺伝子の出現頻度の差だけでなく、特に対立遺伝子のサイズ差（繰り返し配列を含むPCR産物長の差）が大きいことを示すものであり、近年に分岐した集団というより、歴史的にずいぶん前に分岐した集団であることを強く示唆した。一方、中国のペア集団間では有意とならない場合も認められた (R_{ST} で2/3ペア集団)。おそらく、南シナ海から東シナ海にかけて北上する沿岸海流 (Hu et al. 2000, Li et al. 2000) による集団の移送があり、ある程度の遺伝子流動が生じてきたと思われる。日本国内の集団については、統計学的に有意な集団分化が見られてはいるが、ペアワイズ $F_{ST} \cdot R_{ST}$ の値は国外の集団間の値に比べて大きな値ではなく、むしろ弱い集団構造の形成を示唆した。また、*Cochlodinium polykrikoides* で検出されたような人為的な要因によると思われる遺伝子流動 (図4C)、つまり人間活動による集団の海域間移送は、本種については検出されなかった。PCAgen (Goudet 2005) を用いて主成分分析とSTRUCTUREを用いた集団帰属検定を実施したところ、AMOVA解析の結果およびペアワイズ $F_{ST} \cdot R_{ST}$ による集団分化の検定結果で示された通り、12集団は4個のクラスターに分けるのが最適であり、可視的にも集団分化の現状を示すことに成功した (図7, 8)。STRUCTUREによる集団帰属検定の結果は、日本および中国の集団はどちらかと言うと2, 3のクラスターで構成される混成集団であることに対して、日本海およびフランスの集団は、単一のクラスターで構成されるピュアな集団であることを示した (図8)。

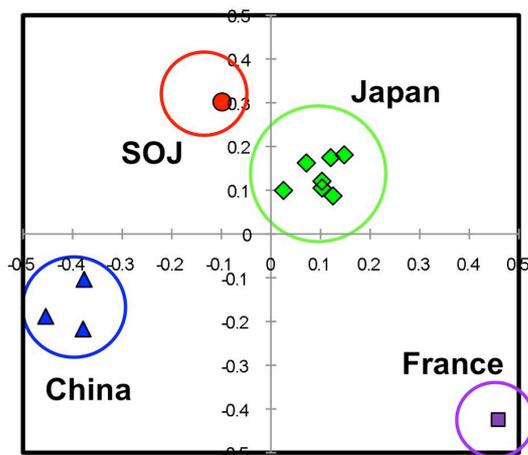


図7 主成分分析の結果。*A. catenella* 12 集団 (644 個体) を 8 本のマイクロサテライトを用いて解析したデータを使用。Japan, 日本 7 集団; china, 中国 3 集団; SOJ, 日本の日本海 1 集団; France, フランス Thau lagoon の 1 集団を示す。第 1~3 主成分の累積寄与率は 77.1% であった。

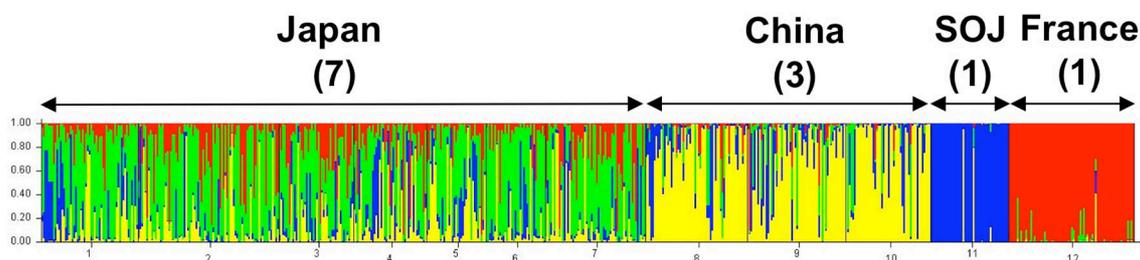


図8 STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) によるバープロット解析。*A. catenella* 12 集団 644 個体が幾つのクラスターに区分されるかを解析し、各個体が各クラスターにどの程度の割合で帰属するか割合を示した。Japan, 日本 7 集団; China, 中国 3 集団; SOJ, 日本の本海 1 集団; France, フランス Thau lagoon の 1 集団。日本および中国の集団は、2, 3 のクラスターの混成であることに対して、SOJ と France の集団は、単一のクラスターに帰属することを示す。

とりわけ日本海の集団は、著しく高いペアワイズ R_{ST} 値が示す通り、他の集団とは遺伝的に大きく異なり、歴史的に異なる背景を持つ集団であることが強く示唆された。日本海集団の遺伝的異質性は、*C. polykrikoides*、魚類や無脊椎動物においても報告されており、更新世期の海水面の低下や異なる海洋構造により、大きな遺伝的分断が生じた可能性が指摘されている (Liu et al. 2007, Tsang et al. 2008)。

2-4. 地中海フランス集団の日本およびアジア集団起源説の是非

各集団間の全てのペア個体間でアレル共有度 (Chakraborty & Jin 1993) を計算したところ、日本集団内で $38.7 \pm 12.4\%$ ($n = 45,158$)、中国集団内で 27.4 ± 12.5 ($n=8,641$)、日本海集団内で 33.5 ± 15.2 ($n=528$)、フランス集団内で 52.8 ± 13.2 ($n=2,451$) となり、明らかにフランス集団内で高い値を示した。また、8個のマイクロサテライト遺伝子座のうち4個以上の遺伝子座で同じ遺伝子型を有するペア個体の割合を調べた結果、日本集団内で 35.6% 、中国集団内で 14.9% 、日本海集団内で 28.6% 、フランス集団内で 70.5% となり、やはりフランス集団では他より著しく高い値を示した。これは、フランス集団が、他の海域よりも親兄弟・姉妹・親戚等の濃い血縁集団で構成されており、比較的最近、他の海域から持ち込まれた小さな遺伝的プールを持つ集団が分布している可能性が高い (図8)。他海域から持ち込まれた可能性は高いが、以上の解析結果は、地中海フランスThau lagoon沿岸の*A. catenella*集団が、日本およびアジア起源にあるとする仮説 (Lilly et al. 2002, Penna et al. 2005) に対して否定的である。現在、個体ごとに多型性を示すハプロタイプマーカーを用いた解析も行っており、その結果でも、地中海フランス集団の日本・アジア集団起源説は否定的である。また、アメリカ西岸やニュージーランドの集団の解析も実施しており、今後、さらに中近東、アフリカや南米の集団も含めた全地球規模の解析を実施したいと考えており、これらの解析の進行とともに、フランス集団の起源や本種のさらに詳細な集団遺伝構造が明らかになると期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、海水採集にご尽力いただいた韓国釜慶大学校 Chang-Hoon Kim氏、韓国国立水産振興院 Chang Kyu Lee氏、鳥取県栽培漁業センター氏良介氏、大分県農林水産研究センター斉藤義昭氏、熊本県水産研究センター棲田清成氏、対馬水産業普及指導センター杉原志貴氏、三重県科学技術振興センター中西克之氏、兵庫県立農林水産技術総合センター西川哲也氏、京都府立海洋センター藤原正夢氏、鹿児島県水産技術開発センター村田圭助氏、高知県水産試験場林芳弘氏、長崎県総合水産試験場山砥稔文氏、独立行政法人水産総合研究センター宮津栽培漁業センター長副聡氏に厚くお礼申し上げます。また、本稿をまとめるにあたり、非常に有益なご助言をいただいた(独)水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所坂本節子、山口峰生、神山孝史、西谷豪、板倉茂氏および Universite de la Mediterranee (Aix-Marseille II) Benjamin Genovesi氏に深謝する。本研究は、(独)水産総合研究センター運営費交付金プロジェクト研究「有害赤潮渦鞭毛藻コクロディニウム赤潮の発生機構解明と予

察・防除対策に関する研究の一部および日本学術振興会科学研究補助金（基盤研究B，課題番号 19380116）「有害・有毒鞭毛藻の個体群における遺伝的分化と遺伝子流動に影響を及ぼす要因の解明」の一部として実施した。

引用文献

- Bolch, C.J.S. & de Salas, M.F. 2007. A review of the molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates *Gymnodinium catenatum* and the *Alexandrium tamarensis* complex to Australasia. *Harmful Algae* 6: 465-485.
- Chakraborty, R. & Jin, L. 1993. Determination of relatedness between individuals by DNA fingerprinting. *Hum. Biol.* 65: 875-895.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. 2005. Arlequin, version 3.11: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Goudet, J. 2005. PCAGEN 1.2.
- Genovesi, B., Nishitani, G., Wang, J., Masseret, E., Grezbyk, D., Berrebi, P. & Nagai, S. 2010. Genetic structure of Asian populations in *Alexandrium catenella* (Dinophyceae): a study using microsatellite markers. Proceedings of the 13th International Conference on Harmful Algae: in press.
- Genovesi, B., Reynaud, N., Nishitani, G., Wang, J., Masseret, E., Berrebi, P. & Nagai, S. 2009. *Alexandrium catenella* in Thau lagoon (France) is not a recent introduction from Asia? *Harmful Algal News* 40: 1-3.
- Hu, J.Y., Kawamura, H., Hong, H.S. & Qi, Y.Q. 2000. A review on the currents in the South China Sea: seasonal circulation, South China Sea Warm Current and Kuroshio intrusion. *J. Oceanog.* 56: 607-624.
- Iwataki, M., Kawami, H., Mizushima, K., Mikulski, C.M., Doucette, G.J., Relox Jr., J.R., Anton, A., Fukuyo, Y. & Matsuoka, K. 2008. Phylogenetic relationships in the harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniales, Dinophyceae) inferred from LSU rDNA sequences. *Harmful Algae* 7: 271-277.
- Ki, J.S. & Han, M.S. 2008. Implications of complete nuclear large subunit ribosomal RNA molecules from the harmful unarmored dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae) and relatives. *Biochem. Syst. Ecol.* 36: 573-583.
- Kim, C.H., Cho, H.J., Shin, J.B., Moon C.H. & Matsuoka, K. 2002. Regeneration from hyaline cysts of *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniales, Dinophyceae), a red tide organism along the Korean coast. *Phycologia* 41: 667-669.
- Kim, D.I., Matsuyama, Y., Nagasoe, S., Yamaguchi, M., Yoon, Y.H., Oshima, Y., Imada, N. & Honjo, T. 2004. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Dinophyceae). *J. Plankton Res.* 26: 61-66.
- Li, N.S., Zhao, S.L. & Wasiliev, B. 2000. Geology of Marginal Sea in the Northwest Pacific [in

- Chinese]. Heilongjiang Education Press, Harbin, China.
- Lian, C.L., Miwa, M. & Hogetsu, T. 2001. Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. *Heredity* 87: 88-98.
- Lilly, E.L., Kulis, D.M., Gentien, P. & Anderson, D.M. 2002. Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from western Pacific: evidence from DNA and toxin analysis. *J. Plankton Res.* 24: 443-452.
- Liu, J.X., Gao, T.X., Wu, S.F. & Zhang, Y.P. 2007. Pleistocene isolation in the Northwestern Pacific marginal seas and limited dispersal in a marine fish, *Chelon haematocheilus* (Temminck & Schlegelm, 1985). *Mol. Ecol.* 16: 275-288.
- 松山幸彦・山口早苗 2008. 地球環境研究総合推進費, 平成 18年度研究成果 中間成果報告集 自然資源の劣化個体群分子タイピングによる有毒微細藻類の人為的グローバル化の実態解明手法の開発, (2)人間活動による有毒微細藻類の海域間移動の直接的な検証. pp.301-307.
- 宮原一隆・氏良介・山田東也・松井芳房・西川哲也・鬼塚剛 2005. 2003年 9月に日本海山陰沿岸海域で発生した *Cochlodinium polykrikoides* Margalef赤潮.日本プランクトン学会報 52: 11-18.
- Masseret, E., Grzebyk, D., Nagai, S., Genovesi, B., Lasserre, B., Laabir, M., Collos, Y., Vaquer, A. & Berrebi, P. 2009. Unexpected genetic diversity among and within populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* as revealed by nuclear microsatellite markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 2037-2045.
- Masselin, P., Amzil, Z., Abadie, E., Carreras, A., Chiantella, C., Le-Bec, C., Nézan, E. & Truquet, P. 2001. Paralytic shellfish poisoning on the French Mediterranean coast in autumn 1998: *Alexandrium "tamarense complex"* (Dinophyceae) as causative agent. In: Hallegraeff GM Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J. (eds.). *Harmful Algae Blooms 2000*. pp.26-29. IOC-UNESCO, Paris, 2001.
- Nagai, S., Lian, C.L., Yamaguchi, S., et al. 2007. Microsatellite markers reveal population genetic structure of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) in Japanese coastal waters. *J. Phycol.* 43: 43-54.
- Nagai, S., Nishitani, G., Sakamoto, S., Sugaya, T., Lee, C.K., Kim, C.H., Itakura, S. & Yamaguchi, M. 2009. Genetic structuring and transfer of marine dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* in Japanese and Korean coastal waters revealed by microsatellites. *Mol. Ecol.* 18: 2337-2352.
- Nagai, S., Sekino, M., Matsuyama, Y. & Itakura, S. 2005. Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Dinophyceae). *Mol. Ecol. Notes* 6: 120-122.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Natur.* 16: 283-292.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3321- 3323.
- Nishitani, G., Nagai, S., Masseret, E., Lian, C.L., Yamaguchi, S., Yasuda, N., Itakura, S., Grzebyk, D., Berrebi, P. & Sekino, M. 2007. Development of compound microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Dinophyceae). *Plankton & Benthos Res.* 2: 128-133.

- Nishitani, G., Nagai, S., Sakamoto, S., Lian, C.L., Nishikawa, T., Lee, C.K., Uji, R., Itakura, D. & Yamaguchi, M. 2008. Development of microsatellite markers in the noxious red tide-causing algae *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae). *Mol. Ecol. Notes* 7: 827-829.
- Onitsuka, G., Miyahara, K., Hirose, N., Watanabe, S., Semura, H., Hori, R., Nishikawa, T. & Yamaguchi, M. 2010. Large-scale transport of *Cochlodinium polykrikoides* blooms by the Tsushima Warm Current in the southwest Sea of Japan, *Harmful Algae* 9: 390-397.
- Pritchard, J.K., Matthew, S.M. & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Penna, A., Garces, E., Vila, M., Giacobbe, M., Fraga, S., Luglie, A., Bravo, I., Bertozzini, E. & Vernesi, C. 2005. *Alexandrium catenella* (Dinophyceae), a toxic ribotype expanding in the NW Mediterranean Sea. *Mar. Biol.* 148: 13-23.
- Pritchard, J.K., Matthew, S.M. & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Scholin, C.A., Hallegraeff, G.M. & Anderson, D.M. 1995. Molecular evolution of the *Alexandrium tamarense* "species complex" (Dinophyceae): dispersal in the North American and West Pacific regions. *Phycologia* 34: 472-485.
- Tsang, L.M., Chan, B.K.K, Ma, K.Y. & Chu, K.H. 2008. Genetic differentiation, hybridization and adaptive divergence in two subspecies of the acorn barnacle *Tetraclita japonica* in the northwestern Pacific. *Mol. Ecol.* 17: 4154-4163.
- 山砥稔文 2006.九州沿岸に分布する有害渦鞭毛藻 *Cochlodinium polykrikoides*の生理生態学的研究.長崎県水産試験場研究報告32: 23-90.