

日本植物学会企画シンポジウム 植物科学最前線 「分子でみる光合成生物の多様性・生態・環境」

オーガナイザー

宮下 英明・瀬戸口 浩彰
京都大学大学院人間・環境学研究科
〒606-8501 京都市左京区吉田二本松町

上井 進也
新潟大学理学部自然環境科学科
〒950-2181 新潟市西区五十嵐2の町 8050

本特集は、日本植物学会第74回大会のシンポジウム「分子でみる光合成生物の多様性・生態・環境」の内容を総説にして取りまとめたものです。

このシンポジウムは最近の植物科学研究の手法、現状、今後の展開について発表・討議する総説的・教育的なシンポジウムとして日本植物学会広報委員会によって企画されました。DNA配列を利用する分子生物学的手法は、光合成生物の多様性、分布、生態、進化研究にますます欠かせないツールとなっています。さらに、シアノバクテリア、藻類、陸上植物ゲノム情報の充実は、環境適応に関する遺伝子の解析やその機構解明を容易にし、光合成生物の多様化・進化研究の重要な手がかりとなっています。そこでシンポジウムの企画にあたり「分子・多様性・生態・進化・環境」の5つのキーワードを設定しました。それらのキーワードを基に、植物学会会員に加え、微生物生態学、水産微生物学、生物地理学、進化学など様々な関連学問分野において、シアノバクテリア、藻類、陸上植物の分子生態・進化・多様性研究を勢力的に行っている6名の若手研究者を精選し講演をお願いいたしました。

本特集では、演者の方々の最新研究成果や、その手法、研究現状などがとりまとめられています。この特集を通して、光合成生物分野における「分子・多様性・生態・進化・環境」研究に関する現状の理解ならびに皆様のご研究の更なる発展の一助となれば幸いです。

分子生物学的手法で見えてきたシアノバクテリアの分布と多様性

大久保 智司

京都大学大学院人間・環境学研究科

〒606-8501 京都市左京区吉田二本松町

Distribution and diversity of cyanobacteria revealed by molecular approaches

Keywords: cyanobacteria; microbial ecology; molecular biology.

Satoshi Ohkubo

Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University

Yoshida-nihonmatsucho, Sakyoku, Kyoto 606-8501, Japan

1. はじめに

シアノバクテリアは様々な生態系において一次生産者として重要な微生物である。海水や淡水中に多く存在するが、砂漠などの乾燥した環境、高温、低温、高塩濃度環境といった極限環境に生育するものや動物や植物、菌類と共生するものもあり、地球上の様々な環境に広く分布している (Whitton & Potts 1999)。しかし、その生態については未だ分かっていないことが多い。

微生物の生態を明らかにする上で最も基本的な課題は、「どんな種類の」微生物が「どこに」いて「何を」しているのか、ということである。そもそも微生物は肉眼では見えないため、その多様性や分布を明らかにすることが容易ではない。そのため、伝統的には顕微鏡観察と培養という2つの方法が用いられてきたが、それぞれ、形態による分類・同定には限界がある、環境中の微生物の多くは容易に培養できない (Amann et al. 1995) といった問題があった。近年では、上記の方法に加えて核酸をマーカーとして微生物の多様性や群集構造を明らかにしていく分子生物学的手法が多く用いられている (Dahllöf 2002, Kowalchuk et al. 2004)。本稿では、このような分子生物学的手法によって明らかになってきたシアノバクテリアの分布や多様性に関する知見を紹介する。

2. 微生物の多様性を明らかにする方法

2-1. 形態観察および培養による方法とその限界

シアノバクテリアの分類は歴史的に、形態的特徴に基づいて行われてきた。形態的に大きく分けると单細胞のものと多細胞（糸状体）のものに分かれ、单細胞のものはさらに二分裂あるいは外生胞子で増殖するもの (Chroococcales) と内生胞子形成を行うもの (Pleurocapsales) に、糸状体のものは異質細胞 (heterocyst) をもたないもの (Oscillatoriales), 異質細胞をもち、分枝しないもの (Nostocales) と分枝するもの (Stigonematales) に分けられる。これに加えて栄養細胞の形態、異質細胞や休眠胞子 (akinete) の位置、コロニー形状、糸状体の先端細胞の形態、鞘 (sheath) や液胞の有無などが属や種の分類に用いられる (Boone & Castenholz 2001)。

しかし、実際に環境中のシアノバクテリアをこのような形態的特徴だけで分類・同定するのに限界がある。例えば窒素固定の場である異質細胞や飢餓状態に作られる休眠胞子は常に存在するわけではなく、生息環境中の栄養塩濃度によって形態が変化する。それ以外にも物理的に断片化した糸状体などは正確な分類が困難である。また、ピコシアノバクテリアと呼ばれる単細胞シアノバクテリア (*Synechococcus*属, *Prochlorococcus*属) は、その細胞サイズの小ささ(長径2 μm以下)と細胞形態の単純さ(球形-楕円球形)のため光学顕微鏡下でその系統的な違いを見出すのは困難である。

培養は、このような問題点を克服する一つの方法である。培養細胞の形態的特徴や生理学的、生化学的特徴、あるいは遺伝情報を調べることで、正確に分類・同定することが可能となる。例えば脂質組成(Kenyon 1972, Kenyon et al. 1972) やタンパク質組成(Lyra et al. 1997) はシアノバクテリアの分類に有用であることが知られており、16S rRNA遺伝子などの塩基配列を用いた分子系統解析が系統分類に用いられている(Woese 1987, Wilmotte & Herdman 2001)。しかし、環境中の全てのシアノバクテリアを培養することは現在のところ不可能である。例えば、顕微鏡観察によって計測した環境中の全細菌細胞数に対して、平板法によって検出できる細菌の割合は1%にも満たないことが知られている(Amann et al. 1995)。

このように、形態観察や培養による多様性解析の方法には原理的、技術的限界がある。そこで、近年では環境中から直接核酸を抽出し、その塩基配列を利用して多様性解析を行う分子生物学的手法が用いられている。

2-2. 分子生物学的手法

核酸をマーカーとして環境中の微生物の多様性や群集構造を明らかにする手法として、環境中から得られた核酸を直接用いる手法と、PCRによって増幅したDNAを用いる手法がある。直接核酸を用いる方法として DNA:DNA 再会合反応速度解析(Torsvik et al. 1990), 核酸ハイブリダイゼーション(Buckley et al. 1998), 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(Christensen et al. 1999, Ravenschlag et al. 2000), DNAマイクロアレイ(Rhee et al. 2004, Small et al. 2001), メタゲノム解析(Handelsman 2004)などが使われている。一方、PCRを用いた代表的な方法としては、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE; Muyzer et al. 1993), 末端標識制限酵素断片多型分析(T-RFLP; Liu et al. 1997), 一本鎖高次構造多型(SSCP; Schwieger & Tebbe, 1998), リボゾーム遺伝子間スペーサー解析(RISA; Ranjard et al. 2000), 自動リボゾーム遺伝子間スペーサー解析(ARISA; Cardinale et al. 2004), クローンライブラリー法(Lane 1991, Olsen et al. 1986)などがある。これらの方法には、それぞれ長所と短所があり(de Bruin et al. 2003), 目的に合わせた手法の選択が必要である。シアノバクテリアについては、この中でもDGGEとクローンライブラリー法、あるいはそれらを併用した例がこれまでに最も多く報告されており、様々な環境においてシアノバクテリアの分布や多様性に関する新たな知見が生み出されている。

2-3. PCR-DGGEとクローンライブラリー法

DGGEは直線的に変性剤（尿素とホルムアミド）濃度が変化するポリアクリルアミドゲル中でDNA電気泳動を行うことにより、ほぼ同じ長さのDNA断片を塩基配列の違いによって分離する方法である。微生物生態学においては、環境中から抽出したDNAを錠型としてPCR増幅を行い、得られたDNA断片をDGGEによって分離する（PCR-DGGE）。検出された各バンドをゲルから切り出し、PCRで再増幅した後、塩基配列を決定することにより群集構造や多様性を明らかにすることができます（図1）。原理的にはゲル内で二本鎖DNAの一部が変性し、移動度が変わることによって分離されるため、プライマーの片側にGCクランプと呼ばれる40塩基程度のグアニンとシトシンから成る配列を付加することでDNA断片全体が一本鎖になるのを防いでいる（Sheffield et al. 1989）。

一方、クローンライブラリー法は、抽出したDNAを錠型としてPCR増幅した後、増幅産物をプラスミドベクターに挿入して大腸菌に取り込ませ、培地上に出現したコロニー（クローンライブラリー）について、ベクター内に挿入されたDNA断片の塩基配列を決定する方法である（図1）。

クローンライブラリー法では、配列を決定するクローンの数を増やすほど、環境中の実際の微生物群集構造を反映することができ、相対的に存在量の少ない生物も検出することができる。また、PCR-DGGEで解析できるPCR増幅産物の長さは100-500 bpに限られるが、クローンライブラリー法はより長いPCR産物（例えば16S rRNA遺伝子のほぼ全長：約1500 bp）を用いることができるため、より解像度の高い多様性解析が可能である。しかし、数百から数千クローンの塩基配列を決定するには莫大な時間やコストがかかるため、時間的・空間的に異なる複数のサンプル間で群集構造を比較する場合や優占する生物の動態を明らかにしたい場合には、PCR-DGGEのようなフィンガープリント法が適している。

3. 様々な環境におけるシアノバクテリアの分布と多様性

3-1. 海洋のシアノバクテリア

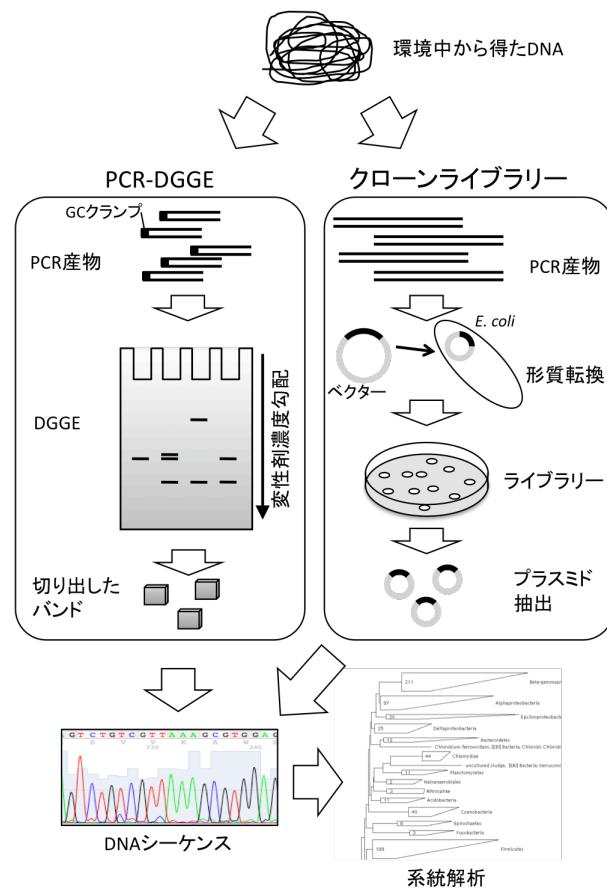


図1 PCR-DGGEとクローンライブラリー法による多様性解析の流れ

外洋、特に貧栄養な海域には、*Synechococcus*属や*Prochlorococcus*属のようなピコシアノバクテリアが優占しており、地球全体の一次生産にも大きく寄与している。特に細胞長0.5-0.7 μmの*Prochlorococcus*は北緯40度から南緯40度の間の海域で深さ100-200 mまで広く分布しており、北太平洋の中心ではバイオマス全体の60%を占めるとも言われている (Campbell et al. 1994, Partensky et al. 1999)。これまでに分離された*Prochlorococcus*には強光に適応した株 (HL型) と弱光に適応した株 (LL型) があることが知られており、それぞれ浅い場所と深い場所という異なるニッチに適応した生態型 (ecotype) であると考えられていた (Moore et al. 1998)。West and Scanlan (1999) は、大西洋においてPCR-DGGEを用いて*Prochlorococcus*の遺伝子型を深度別に調べ、実際にHL型が浅い場所に (10-50 m), LL型が深い場所に (50-110 m) それぞれ分布していることを明らかにした。また、紅海や地中海において行われたPCR-DGGEによる解析でも同様の現象が見られ (Zeidner & Béjà 2004)，生態型が存在することが明らかとなった。

沿岸域に存在するシアノバクテリアに対しても分子生物学的手法を用いた解析は行われている。沿岸の岩に付着する (epilithic) シアノバクテリアはマットやバイオフィルムを形成し、潮間帯において一次生産や窒素固定といった役割を担っている。オーストラリア、ヘロン島の砂浜にある岩の表面には、シアノバクテリアを含むマットとバイオフィルムが形成されており、Diéz et al. (2007) は形態観察とPCR-DGGE、クローンライブラリー法によってシアノバクテリアの多様性解析を行った。16S rRNA遺伝子を用いたPCR-DGGEの結果、形態観察で見出されたよりも多様なシアノバクテリアが検出され、その多くは既知の分離株の塩基配列とは系統的に異なった新しい属や種である可能性が高いと考えられた。また、マットについて窒素固定遺伝子*nifH*を用いたPCR-DGGEを行ったところ、異質細胞をもたない糸状体シアノバクテリアの系統群に属する新規な遺伝子型が主要なバンドとして検出された。マット内では夜間に高い窒素固定活性が確認されており、この糸状体シアノバクテリアがマット内やその周囲の窒素供給に大きく寄与していることが示唆された。また、このマットやバイオフィルムから検出されたいくつかの遺伝子型はメキシコやバハマの塩湖でも近縁な配列が検出されており、これらのシアノバクテリアは塩濃度の高い環境における付着生物として世界中に分布していると考えられた。

3-2. 淡水環境のシアノバクテリア

*Synechococcus*属のピコシアノバクテリアは海洋だけでなく貧栄養な湖沼においても優占している。しかし、湖沼の*Synechococcus*の多様性に関する研究は海洋のそれに比べて少なく、あまり進んでいなかった (Callieri & Stockner 2002)。Becker et al. (2004) は、中央ヨーロッパのLake Constanceにおいて、浮遊性および付着性の*Synechococcus*についてPCR-DGGEを用いた群集構造解析を行った。先行研究で16S-23S rDNAスペーサー領域 (ITS-1) を用いた系統解析の結果、Lake Constanceから分離された浮遊性*Synechococcus*は海洋の*Synechococcus*や*Prochlorococcus*を含むクレード内で単系統群を形成し、その中で4つのクラスターに分かれることがわかつっていた (Ernst et al. 2003)。海洋のピコプランクトンを含むこの単系統群は全て浮遊性のシアノバクテリアであり、沿

岸の岩などに付着するピコシアノバクテリアは、これらとは系統的に異なるものであると予想された。ところがITS-1を用いたPCR-DGGEの結果、湖水中から検出される遺伝子型と付着生物から検出される遺伝子型の間に系統的な違いはほとんど見られず、これらの*Synechococcus*は浮遊生物としても付着生物としても生育することが明らかとなった。また、Ivanikova et al. (2007) はアメリカ合衆国のLake Superiorに生息するピコシアノバクテリアの多様性について、クローンライブラリー法を用いて網羅的に解析した。その結果、Lake Constanceで検出されたものと同じクラスターに属する複数の遺伝子型に加えて、全く新しい複数のクラスターを形成する遺伝子型が検出された。このように、湖沼のピコシアノバクテリアの多様性については未知の部分が多く、今後の研究によって次第に明らかになっていくと期待される。

一方、富栄養な水系において優占するシアノバクテリアは貧栄養な湖沼とは異なる。オランダのLake Loosdrechtは浅い富栄養湖であり、糸状体のシアノバクテリアが優占することが知られていた。形態観察の結果から、最も多いシアノバクテリアは*Oscillatoria limnetica*と同定され（もしくは*Oscillatoria limnetica-like*シアノバクテリア）、2番目に多いのはクロロフィルbをもつシアノバクテリア*Prochlorothrix hollandica*であると考えられていた (Dignum 2003, Pel et al. 2004)。しかし、分離培養やクローンライブラリー法、脂質分析とPCR-DGGEを組み合わせた多様性解析の結果、優占するシアノバクテリアは*Limnothrix redekei*や*Pseudoanabaena* spp.を含む系統群に属する複数の種であることが明らかとなった (Zwart et al. 2005)。また、同実験において*Prochlorothrix hollandica*と姉妹群を形成する複数の遺伝子型も検出された。未培養のためこの遺伝子型をもつ生物の色素組成は不明だが、塩基配列の相同性が約93%であることから、*Prochlorothrix hollandica*と少なくとも種レベルで異なる生物であり (Stackebrandt & Goebel 1994)，シアノバクテリアの色素組成の多様化を考える上で進化的に重要な生物であると考えられる。

3-3. 極限環境のシアノバクテリア

砂漠の土壤表面には土膜 (crust) と呼ばれるシアノバクテリアや藻類などの微生物から成る構造物が存在する。Garcia-Pichel et al. (2001) はコロラド高原の生物性土膜を形成するシアノバクテリア群集について形態観察と培養、PCR-DGGEによる多様性解析をおこなった。土膜中に優占するシアノバクテリアは形態的に*Microcoleus vaginatus*と同定され、PCR-DGGEでもこの生物に由来するバンドが最も濃く検出された。それ以外には、*Nostoc commune*と土膜中から得られた遺伝子型のみからなる4つの未知の系統群が見出された。このうち2つは分離された株の形態からそれぞれ*Microcoleus sociatus*, *Oscillatoria* spp.と同定されたが、残り2つのうち一方はPCR-DGGEで検出された未分離の生物のみからなり、もう一方は分離株の形態的特徴から新属のシアノバクテリア (“*Xeronema*”) であると考えられた。また、スイスの山中にある剥き出しになったドロマイドの内部には*Nostoc*, *Scytonema*, *Microcoleus*, *Chroococcidiopsis* などのシアノバクテリアが存在することがPCR-DGGEによって明らかとなった (Sigler et al. 2003)。この中にはコロラド高原の土膜から見

つかった *Microcoleus sociatus* と近縁なものも含まれており、これらは乾燥や紫外線にさらされるという類似した環境に適応した系統群であろうと考えられた。

シアノバクテリアは超高塩濃度の環境にも分布しており、メキシコの人工蒸発池にある超高塩濃度の微生物マット中からは複数のシアノバクテリアが分離されている。これらの分離された生物は確かに培養液中で高い塩濃度耐性を示すが、実際に超高塩濃度の微生物マット中でこれらの生物が優占しているかどうかはわかつていなかった。また、耐性塩濃度範囲や至適塩濃度が種によって異なっていたが、この生理学的特徴が実際の環境中における分布と一致しているのかも不明であった。そこで、異なる塩濃度の複数の微生物マットについて、PCR-DGGEによる群集構造解析がおこなわれた (Nübel et al. 2000)。その結果、塩濃度5-11%では *Microcoleus chthonoplastes* に近縁な生物が優占し、塩濃度14%のマットでは *Euhalothece* 属や *Halospirulina* 属の分離株と同じクラスターに属するシアノバクテリアが優占していた。*Euhalothece* や *Halospirulina* は至適塩濃度が広範囲であるにも関わらず (それぞれ1.5-25%, 3.5-20%)、その分布域は塩濃度の最も高いマットに限られており、実際の環境中での分布には他の制限要因が影響していると考えられた。

南極にある Lake Fryxell の微生物マットの中からは複数の系統群に属するシアノバクテリアが検出された (Taton et al. 2003)。PCR-DGGE とクローンライブラー法で得られた遺伝子型は22の異なる系統群に分かれ、そのうち9つは南極に特有の遺伝子型からのみ成っており、さらにその中の2つは既知の配列を含まない新しい系統群であった。この結果は、世界中に広く分布するコスモポリタン種が存在すると同時に、南極という特殊な環境に固有な系統群も存在することを示唆するものであった。

3-4. 動植物と共生するシアノバクテリア

海綿動物には多くの微生物が共生しており、そのほとんどは従属栄養細菌とシアノバクテリアである。海綿に共生するシアノバクテリアは単細胞から糸状体まで多岐にわたり、*Synechocystis*, *Aphanocapsa*, *Oscillatoria* (*Phormidium*), *Anabaena*, *Synechococcus* などであることが知られている。その中でも形態的に *Aphanocapsa feldmannii* と同定された単細胞シアノバクテリアが最も一般的な海綿共生シアノバクテリアと考えられていた (Diaz 1996)。しかし、この *Aphanocapsa feldmannii* 様シアノバクテリアが共生する9種の海綿について、PCR-DGGEによる群集構造解析をおこなったところ、各海綿個体から検出されたシアノバクテリア由来のバンドは1本であり、それらの塩基配列のほとんどは *Synechococcus/Prochlorococcus* を含む系統群に属していた (Usher et al. 2003)。

熱帯の沿岸域に生息する群体ボヤの一部には単細胞のシアノバクテリア *Prochloron* spp. が共生することが知られている (Lewin & Cheng 1989)。形態観察によってこのシアノバクテリアは宿主のボヤ群体の中に单一クローナーで存在していると考えられていた (Lewin 1981)。PCR-DGGE についていくつかの群体ボヤ内のシアノバクテリアを検出したところ、1つの群体ボヤ内からは *Prochloron* に由来する遺伝子型が1つずつ検出され、やはり单一クローナーであることが明らかとなつた (Schmidt et al. 2004)。

*Acaryochloris*属はクロロフィルdを主要色素とするシアノバクテリアであるが、この生物もまた熱帯に生息する群体ボヤの共生シアノバクテリアとして分離された (Miyashita et al. 1996)。その後、日本沿岸に生息する紅藻の表面にもこのシアノバクテリアが付着していることが明らかとなり (Murakami et al. 2004)，クロロフィルdが紅藻の微量色素として検出されてきたという経緯から (Manning & Strain 1943)，一部の紅藻に特異的に付着すると考えられた。そこで、*Acaryochloris* sp. が発見された紅藻とその周囲に生息する他の紅藻、緑藻、褐藻についてPCR-DGGEによって付着シアノバクテリアの群集構造が解析された。その結果、全ての海藻から*Acaryochloris*に由来する遺伝子型が2つ検出され (図2)，このシアノバクテリアは紅藻だけでなく様々な海藻に付着していることが示された (Ohkubo et al. 2006)。

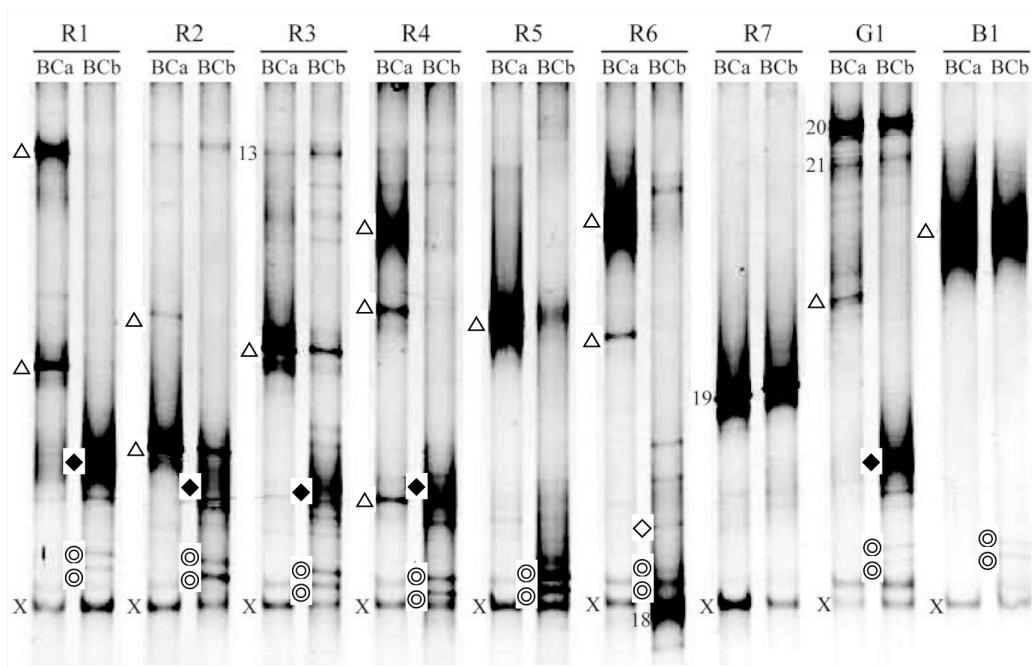


図2 海藻に付着するシアノバクテリア群集のPCR-DGGE解析。PCR増幅には2つのプライマーセット BAC341F-CYA781R(a) (BCa) およびBAC341F-CYA781R(b) (BCb) を用いた。解析に用いた海藻は紅藻の *Ahnfeltiopsis flabelliformis* (R1), *Carpopeltis prolifera* (R2), *Chondrus ocellatus* (R3), *Caulacanthus ustulatus* (R4), *Grateloupe lanceolata* (R5), *Gloiopeletis furcata* (R6), *Chondria crassicaulis* (R7), 緑藻の *Ulva pertusa* (G1), 褐藻の *Undaria pinnatifida* (B1)。◎: *Acaryochloris* sp., ◆: 単細胞シアノバクテリア, ◇: *Oscillatoria* sp., △: 藻類の葉緑体。Ohkubo et al. (2006) の図を一部改変。

*Azolla*属（シダ植物）の葉の内部には窒素固定能をもつ*Anabaena*属のシアノバクテリアが共生していることが知られている (Van Hove & Lejeune 2002)。*Azolla*に共生するシアノバクテリアの多様性と宿主特異性を明らかにするためにPCR-DGGEを用いた解析が行われた (Papaefthimiou et al. 2008)。検出されたシアノバクテリアの遺伝子型は*Azolla*の種間で異なっており、同一種内でも多様性が見られた。また、*Azolla*各種から検出された遺伝子型は宿主特異性を示し、*Azolla*属内の2つの節、*Azolla*節と*Rhizosperma*節の間で大きく2つの系統群に分かれた。これらの結果は、*Azolla*とシアノバクテリアの共生というイベントが過去に1度だけ起こり、共進化してきたということを示唆している。

4. 様々なPCRプライマーの利用

PCRを用いた群集構造解析手法の場合、プライマーの選び方は重要である。多くの場合、16S rRNA遺伝子を対象とするが、他の機能遺伝子が用いられることもある。また、特定の系統群に特異的なプライマーを用いることによって、目的の生物を選択的に検出することができる。

4-1. マーカー遺伝子

DNAマーカーとして最も多く用いられる遺伝子は16S rRNA遺伝子である。その理由は、全ての生物が持っていること、構造や機能が保存されていること、多くの生物間にわたって保存された部位が存在するためプライマーが作りやすいこと、種間や属間の分類に用いるのに十分な解像度があることなどである。また、データの蓄積量が他の遺伝子に比べて圧倒的に多いことも理由の一つである。しかし、16S rRNA遺伝子を用いた系統解析にも問題があり、例えば種内や株間の多様性を見たいときには解像度が不十分である。そのため、種内の多様性を明らかにするという目的のためにはより解像度の高いITS領域が用いられている (Janse et al. 2003, Ernst et al. 2003, Becker et al. 2004, Erwin & Thacker 2008)。また、16S rRNA遺伝子がゲノム中に複数コピー存在し、個々の配列が異なる場合もあるため、ゲノム中に1コピーしか存在しない $rpoB$ という遺伝子を用いる例もある(Dahllöf et al. 2000)。この遺伝子を使えば、微生物の存在比を正確に見積もることができるが、データの蓄積量が少ないため現状では多様性解析に用いるには限界がある。他の機能遺伝子については、シアノバクテリアでは $nifH$ や $psbA$, $ntcA$ などが用いられている (Diéz et al. 2007, Bauer et al. 2008, Junier et al. 2007)。 $nifH$ は特に窒素固定能をもったシアノバクテリアの多様性や分布について明らかにしたい時に有効なマーカーとなる。

4-2. 特異的プライマー

16S rRNA遺伝子を対象とする場合、全ての真正細菌を検出することのできるユニバーサルプライマーがいくつか報告されている (Muyzer et al. 2004)。しかし、このプライマーではシアノバクテリアだけでなく従属栄養細菌も含めて検出されるため、シアノバクテリアに特異的なプライマーセットがNübel et al. (1997) によって開発された。このプライマーセットはCYA359Fというフォワードプライマー（5'末端にGCクランプを付加する）とCYA781R (CYA781R(a)とCYA781R(b)の混合プライマー) というリバースプライマーから成り、ほとんど全てのシアノバクテリアと葉緑体の16S rRNA遺伝子を增幅することができるため、シアノバクテリアや微細藻類を対象とした研究に広く用いられている。

Boutte et al. (2006) は、リバースプライマーCYA781R(a)とCYA781R(b)の個々の特異性について調べ、CYA781R(a)は主に糸状体のシアノバクテリアに対して特異性が高く、ほとんどの単細胞シアノバクテリアはCYA781R(b)に対応する配列をもっていることを報告した (表1)。実際の環境サンプルに対してもこれらのプライマーが個々に用いられている (Boutte et al. 2008)。また、葉緑体の16S rRNA遺伝子はほとんどがCYA781R(a)と対応する配列をもつため、Ohkubo et al. (2006)は海藻に付着するシアノバクテリア群集に対してこの2つのプライマーを別々に用いることによって

海藻の葉緑体の影響を減らし, *Acaryochloris* spp.を高感度で検出することに成功した(図2)。また、これ以外にも特定の属や種レベルの特異的プライマーが用いられている(West & Scanlan 1999, Becker et al. 2004)。

表1 既知シアノバクテリア由来16S rRNA遺伝子配列のCYA781R(a)およびCYA781R(b)に対する適合数

系状体 異質細胞有り	CYA 781R(a)	CYA 781R(b)	No match	系状体 異質細胞無し	CYA 781R(a)	CYA 781R(b)	No match	単細胞	CYA 781R(a)	CYA 781R(b)	No match
<i>Anabaena</i>	82	0	0	<i>Arthrosira</i>	4	1	0	<i>Acaryochloris</i>	0	3	0
<i>Anabaenopsis</i>	4	0	0	<i>Geitlerinema</i>	6	1	0	<i>Aphanocapsa</i>	0	1	1
<i>Aphanizomenon</i>	31	0	2	<i>Halospirulina</i>	4	0	0	<i>Aphanothece</i>	0	2	0
<i>Calothrix</i>	8	0	2	<i>Leptolyngbya</i>	0	20	3	<i>Chamaesiphon</i>	0	1	1
<i>Capsosira</i>	1	0	0	<i>Limnothrix</i>	2	3	0	<i>Chroococcidiopsis</i>	16	0	3
<i>Chlorogloeopsis</i>	3	0	0	<i>Lyngbya</i>	9	0	3	<i>Cyanobium</i>	0	4	0
<i>Coleodesmium</i>	1	0	2	<i>Microcoleus</i>	45	0	7	<i>Cyanothece</i>	0	8	0
<i>Cyanospira</i>	0	0	1	<i>Oscillatoria</i>	24	36	6	<i>Dactylococcopsis</i>	0	1	0
<i>Cylindrospermopsis</i>	51	0	0	<i>Phormidium</i>	19	19	2	<i>Dermocarpa</i>	0	13	0
<i>Cylindrospermum</i>	4	0	0	<i>Planktothricoides</i>	6	0	0	<i>Dermocarpella</i>	0	2	0
<i>Fischerella</i>	9	0	0	<i>Planktothrix</i>	85	1	0	<i>Euhalothece</i>	0	4	0
<i>Hapalosiphon</i>	4	0	0	<i>Plectonema</i>	0	2	0	<i>Gloeobacter</i>	3	0	0
<i>Mastigocladopsis</i>	1	0	0	<i>Pseudoanabaena</i>	10	1	0	<i>Gloeocapsa</i>	0	2	0
<i>Mastigocladus</i>	2	0	0	<i>Spirulina</i>	6	1	0	<i>Gloeothece</i>	0	4	0
<i>Nodularia</i>	41	0	0	<i>Symploca</i>	5	0	0	<i>Halothece</i>	0	1	0
<i>Nostoc</i>	94	0	4	<i>Trichodesmium</i>	8	0	0	<i>Merismopedia</i>	0	1	0
<i>Nostochopis</i>	2	0	0	<i>Tychonema</i>	7	0	0	<i>Microcystis</i>	0	70	3
<i>Scytonema</i>	4	0	2					<i>Myxosarcina</i>	0	2	0
<i>Spirirestis</i>	3	0	0	Total	240	85	21	<i>Pleurocapsa</i>	0	6	0
<i>Stigonema</i>	2	0	0	Percentage	69.4	24.6	6.1	<i>Prochlorococcus</i>	0	26	0
<i>Sympyonema</i>	2	0	0					<i>Prochloron</i>	0	2	0
<i>Sympyonemopsis</i>	1	0	0					<i>Prochlorothrix</i>	0	5	0
<i>Tolyphothrix</i>	3	0	0					<i>Staniera</i>	0	3	0
<i>Westiellopsis</i>	6	0	0					<i>Synechococcus</i>	18	184	3
Total	359	0	13					<i>Synechocystis</i>	1	6	1
Percentage	96.5	0.0	3.5					<i>Xenococcus</i>	0	2	0
							Total		38	353	12
							Percentage		9.4	87.6	3.0

Boutte et al. (2006) を参考に改変した.

5. 課題と展望

分子生物学的手法を用いた微生物の多様性解析にはまだ課題も残されている。技術的な課題としては、抽出した核酸の質とプライマーの質である。環境中に存在する細胞の形や大きさ、堅さは生物種によって異なり、全ての細胞から核酸を抽出するのは困難である。また、土壤や植物体にはPCR反応を阻害する物質が含まれており、DNA抽出時にこれらを除去する必要がある。これらの課題をクリアした核酸抽出技術の開発が望まれる。また、現在用いられているプライマーは既知の塩基配列を基に作られている。したがって、未知の塩基配列をもった生物を見過ごす、あるいは過小評価してしまう危険性がある。塩基配列データの蓄積に伴って、プライマーの特異性を見直す必要がある(Mühling et al. 2008)。もう一つの課題は、検出された生物の実体が見えないということである。環境中からは「未分離の」微生物に由来する塩基配列が多く得られているが、その生物がどんな形をして、どんな代謝をおこなっているのか、系統的に近縁な株が存在する場合を除いては知り得ない。環境中から得られる塩基配列を生物学的特徴と対応付けるためには、形態観察や分離・培養による知識の蓄積もまた必要である。

しかしながら、PCR-DGGEやクローンライブラー法といった手法は非常に強力なツールであり、今後も続々とシアノバクテリアの分布や多様性に関する様々な新しい知見が生み出されていくと期待される。

引用文献

- Amann, R.I., Ludwig, W. & Schleifer, K-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbial Reviews* 59: 143-169.
- Bauer, K., Díez, B., Lugomela, C., Seppälä, S., Borg, A.J. and Bergman, B. 2008. Variability in benthic diazotrophy and cyanobacterial diversity in a tropical intertidal lagoon. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63: 205-221.
- Becker, S., Singh, A.K., Postius, C., Boger, P. & Ernst, A. 2004. Genetic diversity and distribution of periphytic *Synechococcus* spp. in biofilms and picoplankton of Lake Constance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49: 181-190.
- Boone, D.R. & Castenholz, R.W. 2001. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. Springer. New York.
- Boutte, C., Grubisic, S., Balthasar, P. & Wilmotte, A. 2006. Testing of primers for the study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE. *J. Microbiol. Methods* 65: 542-550.
- Boutte, C., Mankiewicz-Boczek, J., Komarkova, J., Grubisic, S., Izidorczyk, K., Wautelet, F., Jurczak, T., Zalewski, M. and Wilmotte, A. 2008. Diversity of planktonic cyanobacteria and microcystin occurrence in Polish water bodies investigated using a polyphasic approach. *Aquat. Microb. Ecol.* 51: 223-236.
- Buckley, D.H., Gruber J.R. & Schmidt, T.M. 1998. Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom Crenarchaeota and their diversity and abundance in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4333-4339.
- Callieri, C., & Stockner, J.S. 2002. Freshwater autotrophic picoplankton: a review. *J. Limnol.* 61: 1-14.
- Campbell, L., H.A. Nolla, and D. Vaulot. 1994. The importance of *Prochlorococcus* to community structure in the central North Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 39: 954-961.
- Cardinale, M., Brusetti, L., Quatrini, P., Borin, S., Puglia, A.M., Rizzi, A., Zanardini, E., Sorlini, C., Corselli, C. & Daffonchio, D. 2004. Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6147-6156.
- Christensen, H., Hansen, M. & Sorensen, J. 1999. Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence *in situ* hybridization with an rRNA oligonucleotide probe. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1753-1761.
- Dahllöf, I., Baillie, H. & Kjelleberg, S. 2000. *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3376-3380.
- Dahllöf, I. 2002. Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 213-217.
- Diaz, M.C. 1996. Molecular and ecological studies of sponge-microbial associations. PhD Thesis, University of California, Santa Cruz.

- Díez, B., Bauer, K. & Bergman, B. 2007. Epilithic cyanobacterial communities of a marine tropical beach rock (Heron Island, Great Barrier Reef): Diversity and diazotrophy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3656-3668.
- de Bruin, A., Ibelings, B.W. & Van Donk, E. 2003. Molecular techniques in phytoplankton research: from allozyme electrophoresis to genomics. *Hydrobiologia* 491: 47-63.
- Ernst, A., Becker, S., Wollenzien, U.I.A. & Postius, C. 2003. Ecosystem-dependent adaptive radiations of picocyanobacteria inferred from 16S rRNA and ITS-1 sequence analysis. *Microbiology* 149: 217-228.
- Erwin, P.M. & Thacker, R.W. 2008. Cryptic diversity of the symbiotic cyanobacterium *Synechococcus* spongiarum among sponge hosts. *Mol. Ecol.* 17: 2937-2947.
- Garcia-Pichel, F., López-Cortés, A. & Nübel, U. 2001. Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado plateau. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1902-1910.
- Geitler, L. 1932. Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz 14 Cyanophyceae. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 669-685.
- Ivanikova, N.V., Popels, L.C., Michael, R., McKay, L. & Bullerjahn, G.S. 2007. Lake Superior supports novel clusters of cyanobacterial picoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4055-4065.
- Janse, I., Meima, M., Kardinaal, W.E. & Zwart, G. 2003. High-resolution differentiation of Cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6634-6643.
- Junier, P., Witzel, K.P. & Hadas, O. 2007. Genetic diversity of cyanobacterial communities in Lake Kinneret (Israel) using 16S rRNA gene, *psbA* and *ntcA* sequence analyses. *Aquat. Microb. Ecol.* 49: 233-241.
- Kenyon, C.N. 1972. Fatty acid composition of unicellular strains of blue-green algae. *J. Bacteriol.* 109: 827-834.
- Kenyon, C.N., Rippka, R. & Stanier, R.Y. 1972. Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae. *Arch. Microbiol.* 83: 216-236.
- Kowalchuk, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D.L. & van Elsas, J.D. 2004. Molecular Microbial Ecology Manual (2nd ed.) Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. (eds.) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. pp. 115-175. John Wiley & Sons, New York.
- Lewin, R.A. & Cheng, L. 1989. *Prochloron*, a Microbial Enigma. Chapman & Hall. New York.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. & Forney, L.J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4516-4522.
- Lyra, C., Hantula, J., Vanio, E., Rapal, J., Roushainen, L. & Sivonen, K. 1997. Characterization of cyanobacteria by SDS-PAGE of whole cell proteins and PCR/RFLP of 16S rRNA gene. *Arch. Microbiol.* 168: 176-184.
- Manning, W.M. & Strain, H.H. 1943. Chlorophyll d, a green pigment of red algae. *J. Biol. Chem.* 151: 1-19.

- Miyashita, H., Ikemoto, H., Kurano, N., Adachi, K., Chihara, M. & Miyachi, S. 1996. Chlorophyll *d* as a major pigment. *Nature* 383: 402-402.
- Moore, L.R., Rocap, G. & Chisholm, S.W. 1998. Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature* 393: 464-467.
- Mühling, M., Woolven-Allen, J., Murrell, J.C. & Joint, I. 2008. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME J.* 2: 379-392.
- Murakami, A., Miyashita, H., Iseki, M., Adachi, K. & Mimuro, M. 2004. Chlorophyll *d* in an epiphytic cyanobacterium of red algae. *Science* 303: 1633-1633.
- Muyzer, G., de Waal, E.C. & Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H. & Wawer, C. 2004. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: Kowalchuk, G.A., de Brujin, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D.L. & van Elsas, J.D. (eds) *Molecular Microbial Ecology Manual*, 2nd edition. pp. 743-770. Kluwer Academic. Boston.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F. & Muyzer, G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3327-3332.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Clavero, E. & Muyzer, G. 2000. Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient. *Environ. Microbiol.* 2: 217-226.
- Ohkubo, S., Miyashita, H., Murakami, A., Takeyama, H., Tsuchiya, T. & Mimuro, M. 2006. Molecular detection of epiphytic *Acaryochloris* spp. on marine macroalgae. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7912-7915.
- Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Pace, N.R. & Stahl, D.A. 1986. Microbial ecology and evolution: A ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 337-365.
- Papaefthimiou, D., Van Hove, C., Lejeune, A., Rasmussen, U. & Wilmotte, A. 2008. Diversity and host specificity of genus *Azolla* cyanobionts. *J. Phycol.* 44: 60-70.
- Partensky, F., W. R. Hess, and D. Vaulot. 1999. *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 106-127.
- Pel, R., Floris, V. & Hoogveld, H.L. 2004. Analysis of planktonic community structure and trophic interactions using refined isotopic signatures determined by combining fluorescence-activated cell sorting and isotope-ratio mass spectrometry. *Freshwater Biol.* 49: 546-562.
- Ranjard, L., Poly, F., Combrisson, J., Richaume, A., Gourbiere, F., Thioulouse, J. & Nazaret, S. 2000. Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microbiol. Ecol.* 39: 263-272.

- Ravenschlag, K., Sahm, K., Knoblauch, C., Jorgensen, B.B. & Amann, R. 2000. Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine Arctic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3592-3602.
- Rhee, S.-K., Liu, X., Wu, L., Chong, S.C., Wan, X. & Zhou, J. 2004. Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4303-4317.
- Schmidt, E.W., Sudek, S. & Haygood, M.G. 2004 Genetic evidence supports secondary metabolic diversity in *Prochloron* spp., the cyanobacterial symbiont of a tropical ascidian. *J. Nat. Prod.* 67: 1341-1345.
- Schwieger, F. & Tebbe, C.C. 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4870-4876.
- Sheffield, V.C., Cox, D.R. & Myers, R.M. 1989. Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 232-236.
- Sigler, W.V., Bachofen, R. & Zeyer, J. 2003. Molecular characterization of endolithic cyanobacteria inhabiting exposed dolomite in central Switzerland. *Environ. Microbiol.* 5: 618-627.
- Small, J., Call, D.R., Brockman, F.J., Straub, T.M. & Chandler, D.P. 2001. Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by using oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4708-4716.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B.M. 1994. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., De Wit, R. & Wilmette, A. 2003. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo dry valleys, Antarctica): A morphological and molecular approach. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5157-5169.
- Torsvik, V., Goksoyr, J. & Daee F.L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 782-787.
- Usher, K.M., Fromont, J., Sutton, D.C. & Toze, S. 2004. The biogeography and phylogeny of unicellular cyanobacterial symbionts in selected sponges from Australia and the Mediterranean. *Microbial Ecol.* 48: 167-177.
- van Hove, C. & Lejeune, A. 2002. Applied aspects of *Azolla-Anabaena* symbiosis. In: Rai, A.N., Bergman, B. & Rasmussen, U. (eds.) *Cyanobacteria in Symbiosis*. pp. 179-193. Kluwer Academic, Dordrecht.
- West, N.J. & Scanlan, D.J. 1999. Niche-partitioning of *Prochlorococcus* populations in a stratified water column in the eastern North Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2585-2591.
- Whitton, B.A. & Potts, M. 1999. Introduction to the Cyanobacteria. In: Whitton B.A. & Potts, M. (eds.) *The Ecology of Cyanobacteria*. pp. 1-11. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Whitton B.A. & Potts, M. 2000. *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Wilmette, A. & Herdman, M. 2001. Phylogenetic relationships among the Cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. In: Boone, D.R. and Castenholz R.W. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic*

- Bacteriology. Volume 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototropic Bacteria. Second Edition. pp. 487-493. Springer. New York.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
- Zeidner, G. & Béjà, O. 2004. The use of DGGE analyses to explore eastern Mediterranean and Red Sea marine picophytoplankton assemblages. *Environ. Microbiol.* 6: 528-534.
- Zwart, G., Agterveld, M.P.K., van der Werff-Staverman, I., Hagen, F., Hoogveld, H.L. & Gons, H.J. 2005. Molecular characterization of cyanobacterial diversity in a shallow eutrophic lake. *Environ. Microbiol.* 7: 365-377.

日本沿岸における海藻集団の地理的構造

上井 進也

新潟大学 理学部 自然環境科学科

〒950-2181 新潟市西区五十嵐2の町 8050

Geographic structure of seaweed populations on the Japanese coast.

Key words: Geographic structure; Japan; Mitochondria; Seaweed.

Shinya Uwai

Department of Environmental Science, Faculty of Science, Niigata University

Ikarashi 2, Nishiku, Niigata 950-2181, Japan

1. はじめに

海藻とは、海に生育する多細胞性の真核藻類の総称である。アマモ、スガモなどの海に適応した種子植物（海草）以外の、海産・多細胞性の真核光合成生物を全てまとめた呼び方であるとも言える。系統的には、その体色からアオサ藻（緑藻）、紅藻、褐藻に分けられ、これらは進化的には全く別々のグループである。海藻は、固着性で光合成を行うため、当然光がとどく場所にしか生育できない。このため、海藻の主な生育場所は海全体ではなく、波しぶきがかかる程度の飛沫帶から、深いところでもおよそ水深20mくらいまでの場所である。

一つの種の中で、集団間にどの程度の遺伝的分化がみられるか、あるいは、どのようにして遺伝的分化が蓄積していくかを明らかにすることは、進化や種分化を考えて行く上で重要な仕事の一つである。集団間の遺伝的分化についての解析は海草（加藤&楳田 2004, Olsen et al. 2004）についてはある程度の研究がなされてきたが、残念ながら海藻についての研究、とくに広い地理的範囲を対象とした研究は非常に数が限られている（Coyer et al. 2003, Provane et al. 2005, Hoarau et al. 2007）。褐藻に限らず、海藻では多糖類が多いためかアイソザイムによる集団解析はほとんど行われておらず、また葉緑体マーカーも、種内レベルでは変異が少ないためあまり用いられていない。褐藻や紅藻では近年になり、ミトコンドリアマーカーを用いた解析の結果が報告されるようになり（Zucarello et al. 2002, Kogame et al. 2005, Voisin et al. 2005, Hoarau et al. 2007），とくに褐藻ではミトコンドリアゲノムの全配列が複数の系統群で決定されたため（Oudot-Le Secq et al. 2001, 2002, 2006），多くのミトコンドリアマーカーが利用できるようになっている（Engel et al. 2008）。

日本は、世界6位といわれる長い海岸線をもち、周辺海域では暖流と寒流がぶつかり合う、複雑な海洋環境をもつ。また最終氷期などを通じ、沿岸環境の大きな変化を経験している（Oba et al. 1991, 尾田&嶽本 1992, Oba & Murayama 2004）ため、生物集団間の遺伝的分化がある程度期待できる地域でもある（小島 2009）。日本沿岸に分布する海藻において、どのような集団構造がみられるのか、また集団構造がみられるとして、その集団間の遺伝的分化を維持している要因はなにか、という素朴な疑問を出発点として、筆者らは、海藻の集団構造の解析を進めている。本稿では、日本沿岸に広く分布する褐藻ワカメ *Undaria pinnatifida*（コンブ目チガイソ科）、とアカ

モク *Sargassum horneri* (ヒバマタ目ホンダワラ科) の 2 種の日本沿岸の集団にみられる地理的構造について、これまで明らかになっている結果を概説する。なお、日本沿岸の底生動物における集団構造の解析については小島 (2009) による総説があるので、そちらを参考にしていただきたい。

2. ミトコンドリアマークからみたワカメとアカモクにみられる集団構造

ワカメとアカモクはいずれも日本沿岸に広く分布する 1 年生の海藻で、中国や朝鮮半島にも生育する。これらの 2 種について、日本、および中国と韓国の数ヶ所の野生集団について、ミトコンドリアハプロタイプの地理的分布を調べた結果が図 1, 2 である。ミトコンドリアハプロタイプとは、ミトコンドリアの遺伝子型であると思ってもらえばいいが、本稿ではミトコンドリアゲノム上にコードされている *cox3* 遺伝子の部分配列約 500 塩基対の塩基配列によって定義されている。また、図 1b, 2b は、ネットワーク系統樹で、*cox3* ハプロタイプ間の系統関係をしめしたものである。ネットワークを比べると一目瞭然だが、ワカメとアカモクではみつかったハプロタイプの間の塩基置換数に大きな違いがみられる。塩基置換数が大きいばかりではなく、多数のハプロタイプが見つかったアカモクでは、作図の都合上、近縁なハプロタイプを同じ色で示してある。表 1 には、ワカメとアカモクの遺伝的多様性についてまとめてある。

表 1 アカモクとワカメで観察された遺伝的多様性。Uwai et al. (2006a,b, 2007, 2009) のデータにもとづき再計算したもの。

	個体数	集団数	ハプロタイプ数 ¹	ハプロタイプ多様度 (<i>h</i>) ²	塩基多様度 (π) ²
アカモク	329	37	33	0.848 ± 0.015	0.143 ± 0.007
ワカメ	292	31	18	0.770 ± 0.015	0.005 ± 0.003

¹ 図 1, 2 のネットワークは外国産や近縁種のものも含んでいるため、必ずしも一致しない。²Arlequin ver. 3.5 (Excoffier & Lischer 2010) により計算した値。

図 1, 2 のハプロタイプの地理的分布をみると、アカモク、ワカメの両種について、地域間でハプロタイプの明瞭な分化を確認することができる。アカモクにおいては、ハプロタイプの地理的分布と遺伝的距離（塩基置換数）から、日本沿岸の集団を大きく 3 つのグループに分けることができる。東北太平洋岸、関東・東海地方沿岸、そして日本海沿岸をふくむ西日本の 3 グループであるが、これら 3 グループのハプロタイプの間には 10 塩基程度の塩基置換がみられ、東北太平洋沿岸の一部の集団を除くと、海流の流路において上流・下流の関係にあるにも関わらず、地理的分布の重なりも確認されていない。細かく見ると、西日本においては、見つかるハプロタイプの数も多く、分布域も広いためか、構造が複雑で、地理的に非常に近接した集団であるにも関わらず、見つかるハプロタイプが大きく異なるケースが見つかっている。

これに対し、ワカメにおいては、ハプロタイプ間の塩基置換数が少ないためか、ハプロタイプに明確な系統的グループを見いだすことができないが、地理的分布としては、東北太平洋岸と北海道の集団が同じハプロタイプをもっており、本州日本海沿岸からも一つのハプロタイプのみが見つかっている。瀬戸内海は多少複雑だが、全体的に日本海沿岸と同じハプロタイプが多い。こ

これらの地域では広い範囲にわたって一つのハプロタイプが優占しているが、これに対し、関東・東海地方では場所ごとに見つかるハプロタイプが異なっている。

多少強引に両種にみられる集団構造を比較してみると、西日本（瀬戸内海+日本海沿岸）／東北太平洋岸／関東・東海地方沿岸、という3つの地理的・系統的なグループが認識できるという共通点をあげることができる。ワカメの`cox3`は変異が少ないため、関東・東海グループについてあまりまとまりとして認識できないかも知れないが、`cox3`遺伝子のみではなく、ミトコンドリアゲノム上のtRNA遺伝子群（スペーサー領域を含む）の塩基配列も加えて描いたネットワーク系統樹（図2c）では、ゆるやかながら、関東・東海地方のまとまりを認識することができる。関東・東海グループと東北太平洋岸グループの分布の境界地域あたる北関東のワカメ集団を調べた江村ら（2010）によると、千葉県勝浦から茨城県十王までは関東・東海グループのハプロタイプがみられるのに対し、45kmほど離れた福島県小名浜の集団では、関東・東海グループのハプロタイプはみられず、完全に東北太平洋岸（+北海道）グループのハプロ

タイプに置き換わっていることが報告されており、少なくともワカメでは地理的グループ間の遺伝的交流はかなり限られたものであると考えられる（後述）。日本海沿岸の集団にみられる遺伝的多様性が太平洋側にくらべて小さい点など、ワカメとアカモクでみられる共通点は他にもいくつあるが、一方で、ワカメとアカモクの間では、`cox3`の塩基置換数に大きな差がみられる。しかし、いずれの種においてもグループ内の塩基置換数は1-3塩基程度であり、現在みられる集団構造が、同じような時期に形成されはじめたことを示唆している。アカモクにおいては、関東グループや東北グループについて、8-9万年前と、最終氷期（1-7万年）以前から多様化がはじまった

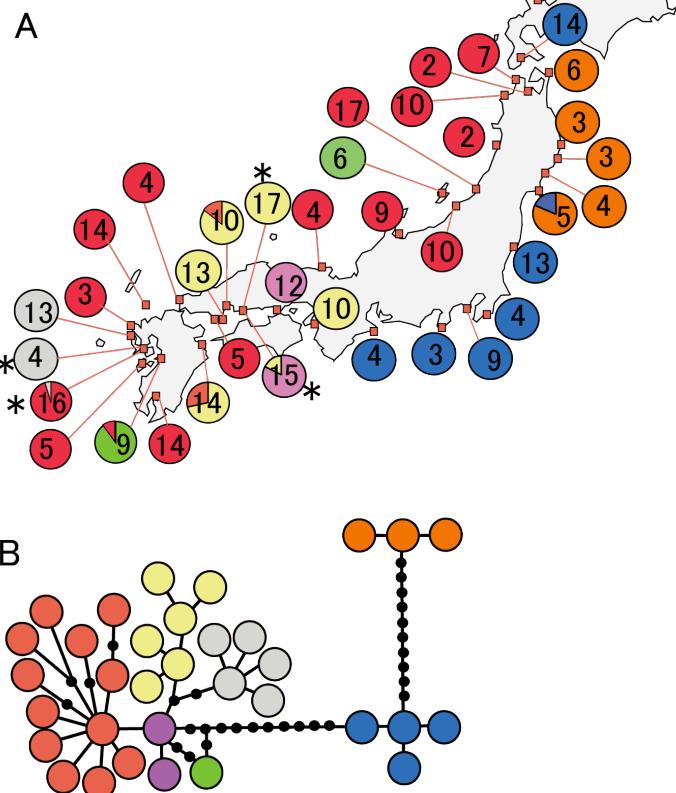


図1 日本沿岸のアカモク集団にみられるミトコンドリアハプロタイプの地理的構造（A）とミトコンドリア`cox3`配列のネットワーク系統樹（B）。Uwai et al. (2009) にデータを加えて作製。地図上の数字はサンプル数を表す。星印のついた集団はアカモク型の個体とシダモク型の個体（本文参照）が同所的にみられる集団で、両タイプを別々に示してある。ネットワーク系統樹はTCS ver. 1.21 (Clement et al. 2000) により作製した。ネットワーク系統樹の黒丸は実際には見つかっていないハプロタイプをしめす。関東・東海地方（青）と東北地方（オレンジ）のハプロタイプが、西日本のものと大きく異なることがわかる。西日本集団についてはさらにハプロタイプグループを細分して示してある。

という推定値がでている (Uwai et al. 2009)。しかし、*cox3* の進化速度の推定が、別の遺伝子（葉緑体 *psbA*）との比較から出されており、誤差が大きい可能性が高く、年代の推定については、より精度の高い解析が待たれる。

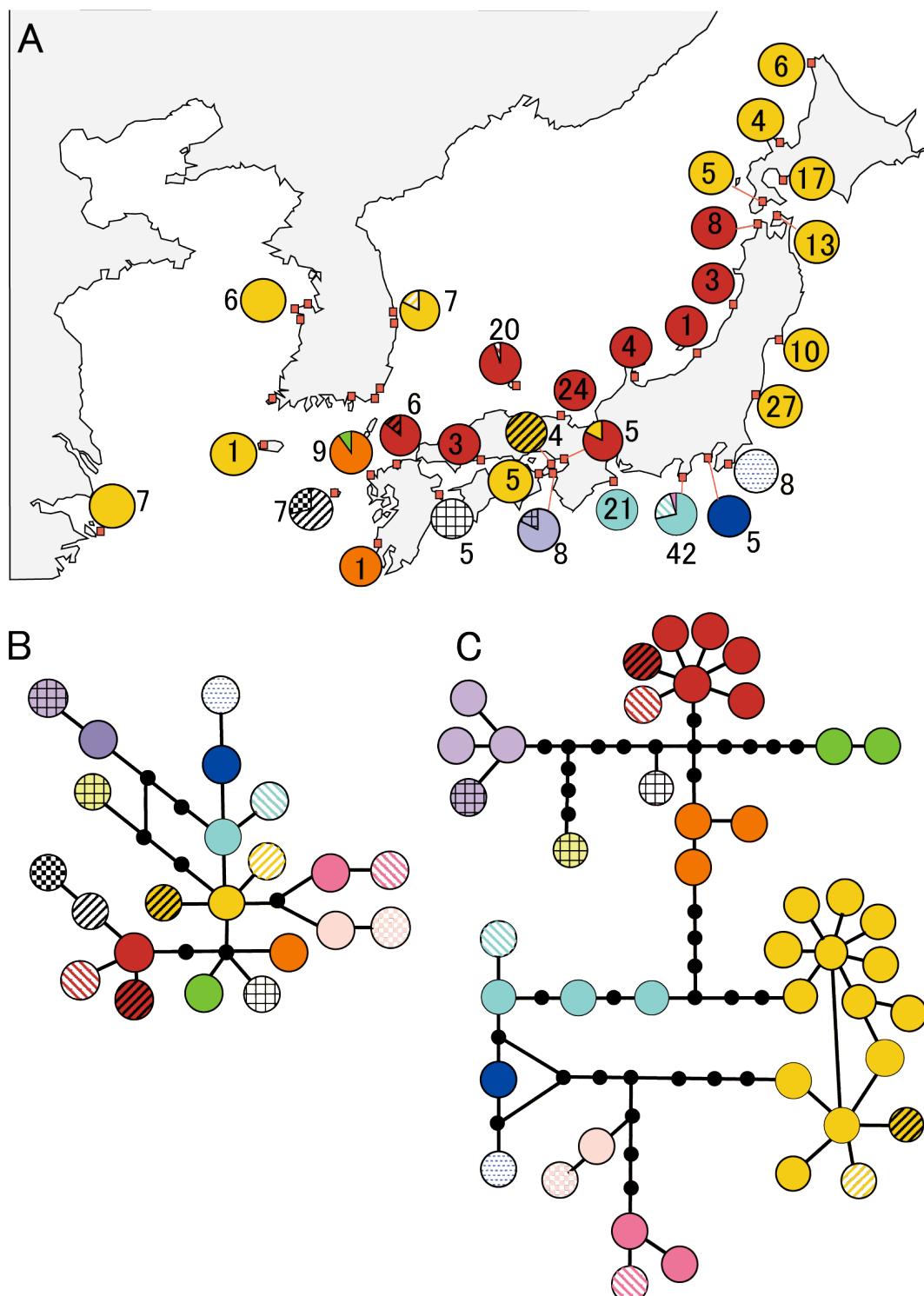


図2 ワカメ集団にみられるミトコンドリアハプロタイプの地理的構造 (A) とミトコンドリア *cox3* 配列のネットワーク系統樹 (B)，および，*cox3* 配列にミトコンドリア tRNA 領域の塩基配列を加えて描いたネットワーク系統樹 (C)。色とパターンはハプロタイプの対応関係を表す。*cox3* と tRNA のデータをつなげることにより，ミトコンドリアハプロタイプのグルーピングが確認できるようになる。Uwai et al. (2006a, b, 2007) より加筆して作成。

3. 集団の遺伝的分化の維持要因は何か

日本沿岸のアカモクやワカメに、明瞭な集団構造がみられるなどを説明してきたが、なぜこのような構造がみられるかについては、現時点では答えがない。アカモク、ワカメの双方にみられた3つの地理的グループのうち、太平洋側の集団と日本海側の集団との間で大きな遺伝的分化がみられるることは、海産の底生動物においても同様の報告があるが(小島 2009)、太平洋沿岸と日本海沿岸との遺伝的交流が困難であることを考えると、受け入れやすい結果である。一方、太平洋岸にみられる遺伝的構造、とくに東北太平洋沿岸の集団が遺伝的に日本海側の集団とも関東地方の集団とも異なるという結果については、これといった集団分化の維持機構がみあたらず、今後の研究が待たれるところである。

アカモクでみられた、同所的な集団間のハプロタイプの分化については、集団間で成熟時期のズレが観察されており、遺伝的分化の維持機構として働いていると推測されている(Uwai et al. 2009)。アカモクは一年生の雌雄異株の海藻であり、卵配偶を行う種である。アカモクは日本沿岸に普通に見られる種であるが、いくつかの地域(瀬戸内海、九州西岸、佐渡、仙台)において、地理的に十数km程度(山口県柳井市では約18km)しか離れておらず、海水温などの物理環境も大きな違いが存在しないにもかかわらず、12~2月(秋型)に成熟する集団と4~6月(春型)に成熟する集団が存在することが知られている(奥田 1987, Yoshida et al. 1998, 2001)。成熟した個体は流失してしまうため、春型の集団が成熟するころには、秋型の集団はすでに消失してしまっており、成熟期のズレは集団分化を維持する要因としてイメージしやすい。ただし、実際には、2つの成熟ピークの間の時期に成熟する集団も存在するらしく、成熟時期と集団の遺伝的分化の相関については、今後さらに詳細な解析を行う必要がある。また、アカモクの解析結果の中には、シダモク *S. filicinum* として、別種扱いされることも多い集団も含まれている。シダモクとアカモクは、気胞という部分の形態が異なることから区別されてきたが、本稿では、遺伝的にアカモクに含まれてしまうことと、形態的にもアカモクと連続的であること(鰯坂&上井 2005)からアカモクの一型として扱ってある。しかし、形態的、系統的には区別できなくても、ハプロタイプ頻度からは、同所的なアカモク(型)集団とシダモク(型)集団は明確に区別することができる。アカモクとシダモクの間でも、成熟時期に1ヶ月程度のズレが存在することに加え、シダモクが雌雄同株であることが、両型の間のハプロタイプ分化を維持しているのではないかと思われる。

4. 長距離移動と遺伝的グループ間の遺伝子流動

ワカメとアカモクにおいて、ミトコンドリアハプロタイプの分析から得られた遺伝的構造は、いずれの種も、あまり高い分散能力をもっていないことを示唆している。貝類などでは、プランクトン幼生として生きる期間の長さが集団分化の強弱に影響することが報告されている(Sherman et al. 2008, 小島 2009)。遊走子や精子は遊泳可能であるものの、ワカメもアカモクも、プランクトン幼生として自由遊泳して生きる期間をもつわけではなく、この点は今回の結果と矛盾しない。ただし、アカモクをはじめとするホンダワラ科の海藻は、葉の一部(気胞とよばれる)にガスを貯め込むため、付着力が弱ると、気泡の浮力で基質からはがれ、「流れ藻」となり波間に漂うという性質をもっている。実際、アカモクは日本周辺海域の主要な流れ藻構成種の一つであ

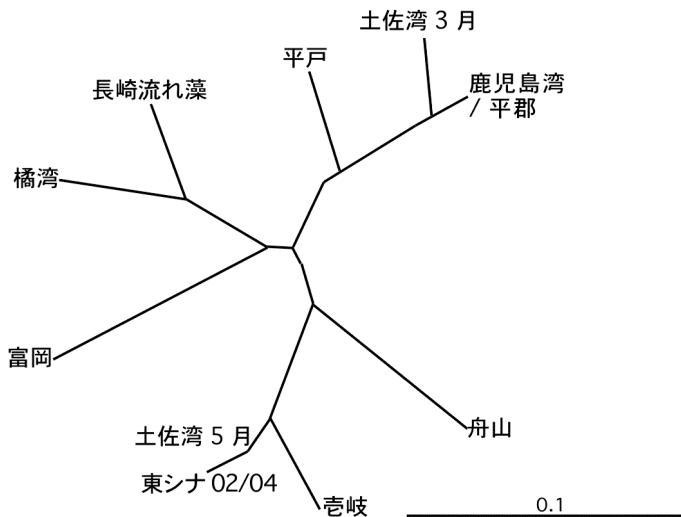


図3 流れ藻集団と海流の流路沿岸の固着性集団との NJ 系統樹 (上井ら 2006)。ミトコンドリアハプロタイプ頻度から算出した Cavalli-Sforza & Edward の距離にもとづく。「東シナ 02/04」、「土佐湾 5月」、「土佐湾 3月」、「長崎流れ藻」が流れ藻サンプルで、ほかは固着性集団。土佐湾 5月の流れ藻サンプルは東シナ海の流れ藻に遺伝的に非常に近い。

り、海流にのって、ときには 1000km 以上の長距離移動を行うと言われている (吉田 1963)。しかし、海流のコースの上では、関東・東海地方や東北太平洋岸の上流域にあたる西日本グループのハプロタイプは、これまで解析された範囲では、関東・東海地方や東北太平洋岸から検出されておらず、流れ藻が、散布体として、西日本から関東・東海地方へ、あるいは日本海沿岸から東北太平洋岸への長距離の遺伝子流動に貢献した痕跡は検出されていない。このように地域ごとに検出されるハプロタイプがある程度異なるのであれば、長距離移動をしてきたと考えられる個体について、ハプロタイプからある程度原産地を推定することができる。アカモクの流れ藻は、ブリ養殖の種苗となる天然稚魚の生育場所としても重要であるため、沿岸に生育する固着性のアカモク集団と流れ藻となったアカモク集団のハプロタイプを比較し、流れ藻の起源地と動態を調べる研究が行われている。

実際に、東シナ海や高知沖など黒潮の流路上に漂う流れ藻サンプルについて、ミトコンドリアハプロタイプ組成を解析した研究 (上井ら 2006) では、東シナ海の流れ藻 (3-4 月) に特徴的なハプロタイプが、5 月になると 500km 以上離れた高知沖の流れ藻から検出され、流れ藻が移動していることを示唆する結果が得られている。土佐湾の流れ藻でも 3 月に採集されたもの (8 個体) には、この東シナ海に特徴的なハプロタイプはみつからないが、5 月に採集された流れ藻では大半を占めるようになり (13 個体中 11 個体)、遺伝的に東シナ海の流れ藻と非常に近くなる ($\phi_{st} = 0.03$, 図 3)。黒潮の流路沿岸の固着性集団 (鹿児島や大分など) には、このハプロタイプがみられないことをあわせて考えると、流れ藻が東シナ海から土佐湾へ移動したことは間違いない。流れ藻が長距離移動をすることと、顕著な遺伝的構造がみされることという、両方の結果をすりあわせるといいくつかの仮説が浮かぶが、最も考えられるのは、流れ藻になり、沖合で主要な海流にのった個体が、再度沿岸域に漂着して、そこで胞子 (胚) を落とすことは非常にまれで、流れ藻は散布体としては機能していないということである。また、目的は異なるが、ワカメにおいても、世界各地に分布している移入集団について、その産地推定がハプロタイプからなされている (Uwai et al. 2006a)。こちらについては、川井らによる総説 (2008) があるので、そちらを参考にしていただきたい。

ここまでミトコンドリアマーカーにもとづく結果を述べてきたが、ワカメについてはマイクロサテライトが開発されており、先述の江村ら (2010) により、北関東 (千葉から福島) までの 5

集団について、マイクロサテライト4座位を使った予備的な集団構造解析が報告されている。江村らの結果によると、ミトコンドリアハプロタイプが異なる福島県小名浜集団は、マイクロサテライトにおいても、他の4集団とは大きく異なる対立遺伝子頻度をもち、明確に区別できるが、一方で、特に十王集団との間には、対立遺伝子の共有がみられ、遺伝子流動が生じていることが示唆されたことを報告している。また、ミトコンドリアハプロタイプでは区別できない集団間ににおいては、 $F_{st}=0.06-0.1$ の弱い遺伝的分化しか検出されなかつたことも報告している。野生ワカメ集団が、ある程度広範囲（千葉勝浦～茨城十王=200km）にわたって明瞭な集団分化を起こしていないという結果は、小名浜集団との間の遺伝的分化と比較すると不思議な気もするが、核ゲノムにおいては、異なるハプロタイプグループ間でも遺伝子流動が生じていることも明らかである。ワカメにおいてミトコンドリアが母性遺伝であること (Kimura 2010), ワカメが卵配偶であることを考えると、この結果は、ワカメの遺伝子流動において、雄性配偶子である精子が大きな役割を果たすのに対し、雌性配偶子である卵細胞はもちろん、無性の遊走子も遺伝子流動への貢献が少ないことを示していると考えられる。海藻を研究材料とする面白さの一つに、生活史や接合様式の多様性・複雑性があげられるが、これらの要因が遺伝的構造に与える影響についても、今後データが蓄積するにつれ明らかになっていくと考えられる。

ここまで述べたように、海藻における集団分化は、ようやく集団の地理的構造がおおまかにつかめ始めたところで、最初に述べた「沿岸に生育する海洋生物にとって、種分化、集団分化を引き起こし、維持する要因は何であるのか」については、まだまだ今後の研究をまたなくてはいけない。特に遺伝的分化の維持要因については、遺伝的解析ばかりではなく、培養実験などを用いた研究が行われる必要がある。一方で、ワカメやアカモクで検出されたような地理的構造がどれだけ一般化しうるものなのか、集団構造の解析対象を増やし、データを蓄積していくことが、今後沿岸生態系の保全などを考える上で非常に重要になってくると思われる。

本稿に記載した研究結果は、多くの方々との共同研究の結果である。色々な研究結果を寄せ集めた関係上、単著としたが、共同で研究を進めてくださった皆様に厚く御礼申し上げる。また貴重な流れ藻サンプルを快く提供してくださった、高知県水産試験場の田井野清也氏には心から感謝している。紹介した研究結果のうち、アカモク流れ藻は科学研究費補助金 基盤 A (22255010, 代表 東京大学 小松輝久), ワカメの集団分化は科学研究費補助金若手 (B) (20770064) による研究成果の一部である。

引用文献

- 鰯坂哲郎・上井進也 2005. アカモクシダモク種群の気胞と生殖器托の形態学的変異について. 月刊海洋 37: 460-465.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9: 1657-1659.
- Coyer, J.A., Peters, A.F., Stam, W.T. & Olsen, J.L. 2003. Post-ice age recolonization and differentiation of *Fucus serratus* L. (Phaeophyceae; Fucaceae) populations in Northern Europe. *Mol. Ecol.* 12: 1817-1829.
- 江村望・森田晃央・倉島彰・上井進也 2010. 北関東沿岸における褐藻ワカメ集団の遺伝的分化の解析. 藻類 58: 50.

- Engel, C.A., Billard, E., Voisin, M. & Viard, F. 2008. Conservation and polymorphism of mitochondrial intergenic sequence in brown algae. *Eur. J. Phycol.* 43: 195-205.
- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Res.* In press.
- Hoarau, G., Coyer, J.A., Veldsink, J.H., Stam, W.T. & Olsen, J.L. 2007. Glacial refugia and recolonization pathways in the brown seaweed *Fucus serratus*. *Mol. Ecol.* 16: 3606-3616.
- 加藤由実子・颶田葉子 2004. *phyA* 遺伝子の塩基配列にもとづくアマモの集団遺伝的解析. 海洋と生物 153: 322-329.
- 川井浩史・上井進也・北山太樹・Nelson, W.・Neil K.・夫性民 2008. 日本のワカメは外国の海に侵入したか—分子系統地理学的知見-. 海藻資源 19: 3-8
- Kimura, K. 2010. Studies on the cytoplasmic inheritance of mitochondria in isogamous and oogamous brown algae. 北海道大学大学院環境科学院博士論文.
- Kogame, K., Uwai, S., Shimada, S. & Masuda, M. 2005. A study of sexual and asexual populations of *Scytoniphon lomentaria* (Scytoniphonaceae, Phaeophyceae) in Hokkaido, Northern Japan, using molecular markers. *Eur. J. Phycol.* 40: 313-322.
- 小島茂明 2009. 日本沿岸における底生動物の分散と遺伝的分化. 塚本勝巳 (編) 海洋生命系のダイナミクス第5巻 海と生命「海の生命観」を求めて. pp. 141-154. 東海大学出版会. 秦野.
- Oba, T. & Murayama, M. 2004. Sea-surface temperature and salinity changes in the northwest Pacific since the Last Glacial Maximum. *J. Quat Sci.* 19: 335-346.
- Oba, T., Kato, M., Kitazato, H., Koizumi, I., Omura, A., Sakai, T. & Takayama, T. 1991. Paleoenvironmental changes in the Japan Sea during the last 85,000 years. *Paleoceanography* 6: 499-518.
- 尾田太良・嶽本あゆみ 1992. 浮遊性有孔虫からみた黒潮流域における過去2万年間の海洋変動. 第四紀研究 31: 341-357.
- 奥田武雄 1987. アカモクにおける雌雄同株個体と秋期の成熟. 藻類 35: 221-235.
- Olsen, J.L., Stam, W.T., Coyer, J.A. et al. 2004. North Atlantic phylogeography and large scale populations differentiation of the seagrass *Zostera marina* L. *Mol. Ecol.* 13: 1923-1941.
- Oudot-Le Secq, M.-P., Fontaine, J.-M., Rousvoal, S., Kloareg, B. & Loiseaux-de Goer, S. 2001. The complete sequence of a brown algal mitochondrial genome, *Ectocarpale Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. *J. Mol. Evol.* 53: 80-88.
- Oudot-Le Secq, M.-P., Kloareg, B. & Loiseaux-de Goer, S. 2002. The mitochondrial genome of the brown alga *Laminaria digitata*: a comparative analysis. *Eur. J. Phycol.* 37: 163-172
- Oudot-Le Secq, M.-P., Loiseaux-de Goer, S., Stam, W.T. & Olsen, J.L. 2006. Complete mitochondrial genomes of the three brown algae (Heterokonta: Phaeophyceae) *Dictyota dichotoma*, *Fucus vesiculosus* and *Desmarestia viridis*. *Curr. Genet.* 49: 47-58.
- Provan, J., Wattier, R.A. & Maggs, C.A. 2005. Phylogeographic analysis of the red seaweed *Palmaria palmata* reveals a Pleistocene marine glacial refugium in the English Channel. *Mol. Ecol.* 14: 793-803.
- Sherman, C.G., Hunt, A. & Syre, D.J. 2008. Is life history a barrier to dispersal? Contrasting patterns of

- genetic differentiation along an oceanographically complex coast. *Biol. J. Linnean Soc.* 95: 106-116.
- Uwai, S., Arai, S., Morita, T. & Kawai, H. 2007. Genetic distinctness and phylogenetic relationships among *Undaria* species (Laminariales, Phaeophyceae) based on mitochondrial *cox3* gene sequences. *Phycol. Res.* 55: 263-271.
- Uwai, S., Kogame, K., Yoshida, G., Kawai, H. & Ajisaka, T. 2009. Geographical genetic structure and phylogeography of the *Sargassum horneri/filicinum* complex in Japan, based on the mitochondrial *cox3* haplotype. *Mar. Biol.* 156: 901-911.
- 上井進也・小松輝久・立川賢一・川井浩史・鰯坂哲朗 2006. DNA でみた流れ藻に出現するアカモクと固着生活期アカモクの地理的分布の差異. 月刊海洋 38: 563-569.
- Uwai, S., Nelson, W., Neill, K., Wang, W.D., Aguilar-Rosas, L.E., Boo, S.-M., Kitayama, T. & Kawai, H. 2006a. Genetic diversity in *Undaria pinnatifida* deduced from mitochondria genes - Origins and succession of introduced populations. *Phycologia* 45: 687-695.
- Uwai, S., Yotsukura, N., Serisawa, Y., Muraoka, D., Hiraoka, M. & Kogame, K. 2006b. Intraspecific genetic diversity of *Undaria pinnatifida* in Japan, based on the mitochondrial *cox3* gene and the ITS1 of nrDNA. *Hydrobiologia* 553: 345-356.
- Voisin, M., Engel, C.R. & Viard, F. 2005. Differential shuffling of native genetic diversity across introduced regions in a brown alga: Aquaculture vs. maritime traffic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 5432-5437.
- Yoshida, G., Arima, S. & Terawaki, T. 1998. Growth and maturation of the 'autumn-fruiting type' of *Sargassum horneri* (Fucales, Phaeophyta) and comparisons with the 'spring-fruiting type'. *Phycol. Res.* 46: 183-189.
- Yoshida, G., Yoshikawa, K. & Terawaki, T. 2001. Growth and maturation of two populations of *Sargassum horneri* (Fucales, Phaeophyta) in Hiroshima Bay, the Seto Inland Sea. *Fish. Sci.* 67: 1023-1029.
- 吉田忠生 1963. 流れ藻の分布と移動に関する研究. 東北海区水産研究所研究報告 23: 141-186.
- Zuccarello, G.C., Sandercock, B. & West, J.A. 2002. Diversity within red algal species: variation in world wide samples of *Spyridia filamentosa* (Ceramiaceae) and *Murrayella periclados* (Rhodomelaceae) using DNA markers and breeding studies. *Eur. J. Phycol.* 37: 403-417.

アオコ形成ラン藻ミクロシスティスの生物地理

田辺 雄彦

筑波大学大学院 生命環境科学研究科

〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

Biogeography of a water-bloom forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*

Key words: biogeography; F_{ST} *Microcystis*; MLST; waterbloom.

Yuuhiko Tanabe

Graduate School of Life & Environmental Sciences, University of Tsukuba

1-1-1 Tennodai, Ibaraki 305-8572, Japan

1. バクテリアの生物地理学？

生物地理学は地球上における生物種の空間分布を説明するための学問である (Avise 2000)。ところで、一般に高等動物や大型植物を対象としている研究者の生物地理学の研究方法は、様々な地域においてある種あるいはその近縁種の分布を調べ、多数の個体を採集して形態観察等を行い、適当な遺伝子マークを使って系統・集団解析を行った結果と地理分布との関係を議論する、というものではないだろうか。バクテリアについてもほぼ同様のアプローチを踏襲することによって生物地理学研究が行われてきてはいたが、残念ながらその結果は高等動植物の研究成果に見られるようなクリアなものではなく、かなりの曖昧さを伴うものであった。その原因はバクテリア特有の二つの属性に拠るところが大きい。その二つの属性とは、細胞サイズが小さいこと、及び個体群サイズ（ある集団内の個体数）が途方もなく大きいことである。前者の属性は対象とするバクテリアが特定の場所に生息しているか否かを直ちに確認することは難しいこと、それはつまり、バクテリアの分布域を把握することが困難であることを意味する。また、双方の属性からバクテリアにおいては長距離移動が頻繁に起こることが想像される。もしこの想像が正しいならば、バクテリアには地理的隔離あるいは分断といった、生物種の分布に地理的なパターン・違いをもたらす決定的な要因が欠落していることになる。このことはさらに、生育環境さえフィットしていれば地球上のあらゆる所に同一のバクテリア種が分布する、という仮説に帰結する（図1）。この点に気づいたオランダの微生物学者 Baas Becking は1934年にこの仮説を定式化し、「Everything is everywhere: where environment selects（意訳：微生物の空間分布は環境要因によってのみ決定される）」という名句で表現した (Baas Becking 1934)。この仮説は結局のところ、バクテリアの生物地理学という研究分野はそもそも成立し得ない（研究したところで地理的パターンは出てこないから意味がない）、ということを言っているのである。直感的なわかりやすさゆえに、この”Everything is everywhere” 仮説は提唱後数十年もの間、微生物学の中において定説として君臨することになった。タンパク質・遺伝子変異の解析技術が種多様性研究に導入されるようになって以降も、しばらくはこの状況は変わらなかった。これは、初期にそのような研究の対象となつたバクテリアが主に感染症を引き起こす病原菌であり、それらの大陸間伝播が異常に早いことが

本説の正しさの傍証と考えられたためである。少なくとも 20 年前までは、バクテリアの生物地理学の研究を扱った論文の数は散発的なレベルに留まり、一分野を形成するには至らなかったのである。



図 1 “Everything is everywhere”仮説の概念図。高等動物においては、地理的分断によって個体群が隔離された結果、種分化が起こる（図中の動物、異種を異なる色で示す）。一方、バクテリアにおいては長距離移動が容易に起こるため、地理的隔離が存在しないと考えられ、従って地理的隔離による種分化はおこらない。このことは、環境にフィットさえしていれば、地球上のどこにでも同種のバクテリアが存在することを意味する（図中、異種バクテリアを異なる色で示す）。

ところが近年になって状況が一変した。1990 年代半ば以降、PCR 法の普及に伴い、遺伝子マイラーを用いて種内の遺伝的多様性を調べる研究が病原菌以外の環境微生物（土壤や水圈に生息する微生物）についても行われるようになったが、その結果、一部のバクテリア種については、生息地の環境要因ではなく地理を反映した分布を示すことが明らかとなったのである (Papke et al. 2003)。長く信じられていた ”Everything is everywhere” 仮説は検証すべき問題として再認識されるようになり、以降、様々な種について生物地理パターンの有無が大小様々なスケールで調べられてきている。現在はバクテリアの生物地理学が一分野として成立しつつあると言つていい状況であるが、実のところ、厳密に生物地理的な分布パターンが証明された種は未だ非常に少ない。数少ない明瞭な例の一つは、*Sulfolobus islandicus* というアーキアである（バクテリアではないが、属性的にバクテリアの一例として便宜上扱っても問題はないであろう）。本種を世界各地から採集して遺伝子解析を行った結果、カムチャツカ・北米・アイスランドで分離された個体は系統樹上でそれぞれ明瞭な地域固有のグループを形成した、すなわち系統地理的なパターンを示すことがわかったが、種内で生態的特性の相違は全く見られなかった (Whitaker et al. 2003)。この結果は、同種に地理的隔離が存在することを強く示唆する。このアーキアにおいては何が地理的隔離をもたらしているのであろうか？という疑問が次に生じるが、このケースで考えられたのは地理的距離であった。生息地間の距離が大きくなればなるほど、ある個体が別の個体群へと移動する確率は小さくなり、その結果、時間経過とともに地理的に離れた個体群は遺伝的にも離れていく、と

いう考えはごく自然な推論であると考えられる。この推測の下では、距離が離れた生息地（個体群）間の地理的距離と個体群間の平均遺伝距離の間に正の相関が観察されることが期待されるが、この関係のことを「距離による隔離【Isolation-by-distance】」と呼ぶ (Slatkin 1993)。*Sulfolobus islandicus* についても、「距離による隔離」が観察され、個体群間の距離の大きさに比例して移動が制限されていることが強く示唆された。それではなぜ *Sulfolobus islandicus* においては、他のバクテリアを含む微生物には見られない地理的隔離が観察されたのであろうか？本種は高温低 ph の温水といふいわば極限環境に生息し、また耐久性胞子も作らないことから、長距離移動は他の微生物種に比べれば困難であると考えられる。こうした他のバクテリアにはない特殊な性質が、本種に生物地理パターンをもたらした可能性が高いと考えられている。現在、種によってはバクテリアの個体群間にも地理的隔離が存在しうること自体は多くの微生物研究者が認めるところであるが、今後のバクテリアの生物地理学が明らかにすべき問題は、「どのような属性のバクテリアに地理的隔離が起こるか？」、あるいは「バクテリアに地理的隔離をもたらす要因は何か？」ということであろう (Whitaker et al. 2009)。この問題に対して回答を与えるための一つのアプローチとして、多くの種の異なる属性を持ったバクテリアについて生物地理パターンの有無を調べて比較するという研究が考えられる。しかしながら、今までに生物地理学的研究が展開されている種は主として病原菌、土壤性バクテリア、海洋性バクテリアに限定されており、淡水性のバクテリアについてはなぜかほとんど調べられていない。筆者らはこの問題に「淡水性バクテリア」を用いて取り組むため、数年前よりアオコ形成ラン藻ミクロシスティスを対象とした生物地理学的研究を行っている。

2. アオコ形成ラン藻ミクロシスティス

富栄養化した湖沼・貯水池・ダム等において、青緑色の粉状、あるいはペンキをこぼしたような浮遊物が確認できることがある。これはアオコ（青粉）と呼ばれるラン藻類（シアノバクテリア）の大量発生現象である（図 2 A）。様々な種類のラン藻類がアオコをつくることが知られているが、最も一般的に見られるアオコ形成ラン藻は *Microcystis aeruginosa*（ミクロシスティス・エルギノーザ）という種である（図 2 B）。

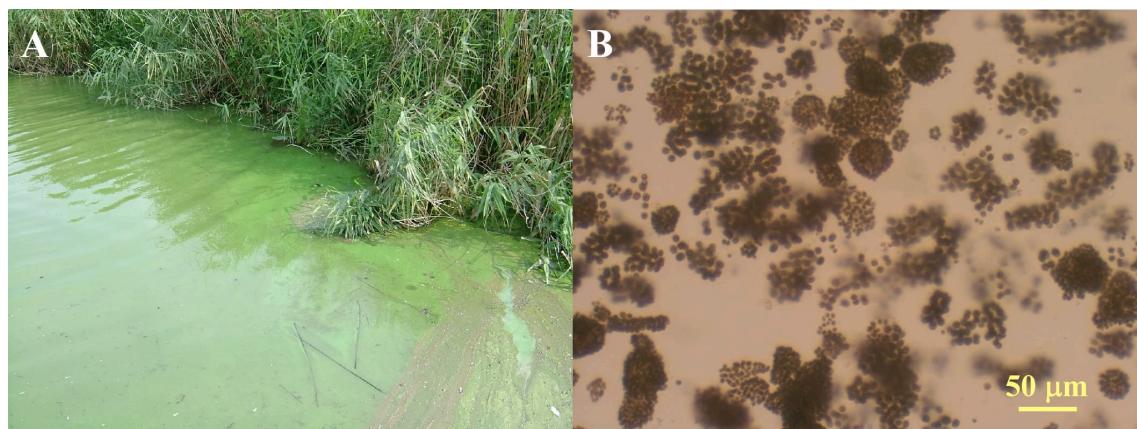


図 2 A 霞ヶ浦で発生したアオコ、B アオコ形成ラン藻ミクロシスティスの顕微鏡写真、細胞密度や形状が異なる様々なコロニーが観察できる。かつてはこれらは別種として分類されていたが、現在はすべて *Microcystis aeruginosa*（ミクロシスティス・エルギノーザ）一種として分類されている。

本種は $3\text{--}8 \mu\text{m}$ 程度のサイズの単細胞性の球菌であるが、通常は個々の細胞が集合し、寒天質を含んだ形態的に多様なコロニーを形成することで知られる。古くはその多様なコロニー形態によって 5つ以上の種に分類されていたが、遺伝子レベルでほとんど違いがないこと、コロニー形態の可塑性（培養条件によってコロニー形態が変わる）ことが発見されたことなどから、現在では全て *Microcystis aeruginosa* 一種として分類されている (Otsuka et al. 2001)。本種が水面近くに浮遊しているのは、細胞内にガス胞と呼ばれる浮き袋の役割を果たす器官を有しているためである。本種は世界中で分布が確認されており、熱帯域では年間を通じて発生が見られるが、日本を含む温帯域では主に夏季を中心に発生が見られる。本種によるアオコの発生は、特に発生後期における腐敗による悪臭の発生・アオコ死骸の蓄積に起因する底層の酸欠等の水環境問題を引き起こす。さらに深刻な問題として、本種の一部の個体はミクロシスチンという急性肝炎を引き起こすアオコ毒素を放出するということが挙げられる。実際、本種アオコ含有水の誤飲による中毒事故が世界各地で散発的に報告されていることから、1995 年には WHO (世界保健機関) はミクロシスチンの飲料水における含有率のガイドラインの ($1\mu\text{g/l}$ 以下) を設けた。現在も世界中の飲料水源において、同種アオコ及び同種のつくるミクロシスチンの監視が続けられている。

同じミクロシスティスに分類される個体であっても、有毒と無毒の個体が存在するため、有毒アオコの監視という実践上の必要性から、両者を識別する試みが数多く行われている。16S rDNA (Otsuka et al. 2001) や ITS (Janse et al. 2004) のようなお馴染みの系統マーカーにはじまり、*cpcBA* (フィコシアニンサブユニット遺伝子座) のような光合成生物特異的マーカー (Tillett et al. 2002) やアオコ毒素ミクロシスチンの生合成遺伝子 *mcy* (Tanabe et al. 2004) など、様々な遺伝子を用いた解析が行われてきた。しかしながら、いずれの研究も毒性の識別に関する議論に終始し、アオコの地理的な分布や移動パターンに言及する研究はほぼ皆無であった。しかし、例えば新しく建築されたダム等の人造湖において、ある時に突然アオコが発生するケースがあることはよく知られている。その場合、アオコはどこから来たのであろうか？また、アオコは世界中で見られるが、どのようにして広まったのであろうか？アフリカ大陸のアオコとユーラシアのアオコは遺伝的に異なるのであろうか？そのような疑問に答えるためには、各地で採集したミクロシスティスについて、高い分解能を持つ（詳細な個体識別ができる）遺伝子マーカーを用いて解析し、地理分布と合わせて議論する「生物地理学的な研究」が必須である。アオコは現場で直ちに存在を確認できる数少ない微生物の一つであり、時に航空・衛星画像からも存在を確認することができるが、このことはバクテリアの生物地理学的研究のモデル生物としても大きな利点となる。あるいは、アオコの研究を通して、前章最後で述べたバクテリアの生物地理学における問題に、部分的にでも回答を与えることができるかもしれない。

3. MLST を用いたミクロシスティスの系統・集団解析

生物地理学的研究を始めるに際してまず重要なことは、適当な分解能を持った遺伝マーカーを選択することである。バクテリアにおいて、現在最も広く用いられている種内の個体識別のための遺伝マーカーは、複数（7つの遺伝子座を用いるのが一般的）のハウスキーピング遺伝子座（それぞれ約 450 塩基程度）の遺伝子配列であり、これらを用いて基づいて個体識別を行う手法を

MLST (Multilocus sequence typing) という (Maiden et al. 1998)。本手法が汎用されている理由として、バクテリアは一般に高等動植物等と比較して種内の遺伝的多様性が大きく、タンパク質をコードする短い遺伝子断片を調べることにより十分な分解能が得られる（詳細な個体識別ができる、かつ個体間の類縁関係も明瞭に理解できる）ということが挙げられる。また、バクテリアはプラスミドやファージ等の染色体外遺伝因子の媒介によって、種内の個体間で頻繁に遺伝子を交換（組み替え、”recombination”）することが知られている (Smith et al. 1993)。実際、ミクロシスティスの自然集団においても、個体間で遺伝子の組み替えが、比較的高い頻度で起こっていることが示唆されている (Tanabe et al. 2009a)。複数の遺伝子を用いて解析する理由は、組み替えによって生じるバイアス、例えば最近組み換えを起こした遺伝子をマーカーとすることによって遺伝的に離れた個体を近縁であると結論づけてしまう、というような誤判断を軽減させるためである (Hanage et al. 2005)。

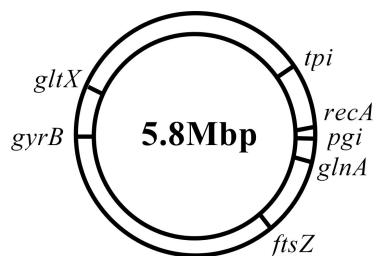


図3 ミクロシスティスの7つのMLST遺伝子座の位置。*M. aeruginosa* NIES-843株のゲノムデータを元に作成。

筆者らはミクロシスティスの生物地理学的研究のため、ゲノムに散在する7箇所のハウスキーピング遺伝子座（図3）をマーカーとするMLSTスキームを構築した (Tanabe et al. 2007)。次に予備研究として、日本産のミクロシスティス約160株入手し、これらについてMLSTにより遺伝子タイプを行った。その結果、解析株数の半数弱に匹敵する76の異なる遺伝子型が得られたこと、それらの遺伝子型間に相当の遺伝距離が得られたことなどから、MLSTが本種の生物地理解析に必要な分解能を期待通りに有していることがわかった。ところが、この約160株について系統解析を行ってみたところ、同一の湖沼から分離された個体が遺伝的にまとまつたグループをつくる傾向は全く見られなかった（図4）。日本国内のミクロシスティスにおいては、系統樹で識別可能な生物地理パターンは形成されていないようである。

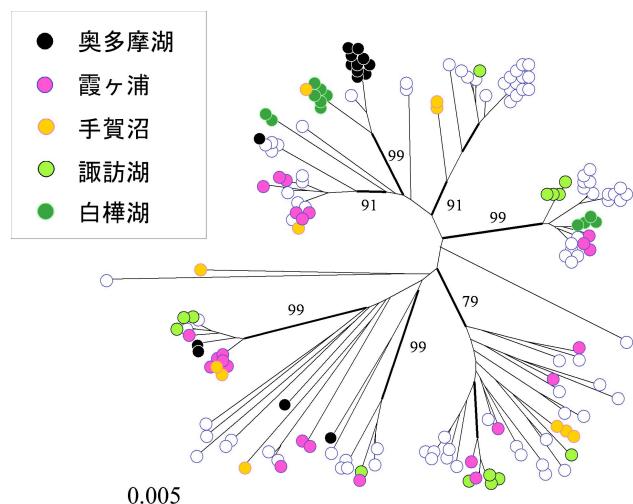


図4 ミクロシスティス164株を用いた近隣結合法によるMLST系統樹（7つの遺伝子座を併せた計2,992塩基に基づく）。系統樹内の数値はグループの統計的信頼度を示すブートストラップ確率（主要な系統群のみ示す）、スケールバーはサイト当たりの塩基置換数、白抜き円は上記5箇所以外の湖沼から分離された個体を示す。各湖沼から採取された個体が系統群としてまとまらず、系統樹内に散在している点に注意。

さて、MLSTによる系統樹を見る限り、ミクロシスティスに生物地理的なパターンは存在しないようであるが、それでは本種は頻繁に日本中の湖沼間を移動しているのであろうか？この問題を考えるに際しては、個体群の遺伝的組成が経時変化していく過程を理論的に抑えておく必要がある（図5）。アオコが生息する二つの湖沼があり、仮にその湖沼間での移動を妨げるような地理的障壁が生じたとしよう。以降、双方のアオコは独自の進化の道を辿り、それらの遺伝子組成は「遺伝的浮動」と呼ばれる確率論的変化によって互いに異なっていき、そして時に「自然選択」によって進化のスピードが速められ、最終的には系統樹上で別のグループとして認識できるに至る。ここで重要なことは、こうした進化のスピードは早いものではないということである。実際、地理的隔離が生じたとしても、系統樹上で別のグループとして表現されるまでには相当な時間を要するということが理論的研究によりわかっている。しかしその一方で、系統樹上で異なるグループとして認識できる以前の段階であっても、地理的隔離などによって湖沼間の移動が制限されると、ほどなくして湖沼間で遺伝子組成に違いが現れる（しばしば「遺伝的分化」と表現される）。実はこの集団間に生じた初期的な遺伝子組成の違いは、 F_{ST} という指標を用いて検出することができる。従って、系統樹で地理的パターンが得られない場合であっても、地理的隔離の存在をこの指標を利用することによって推測することができる。

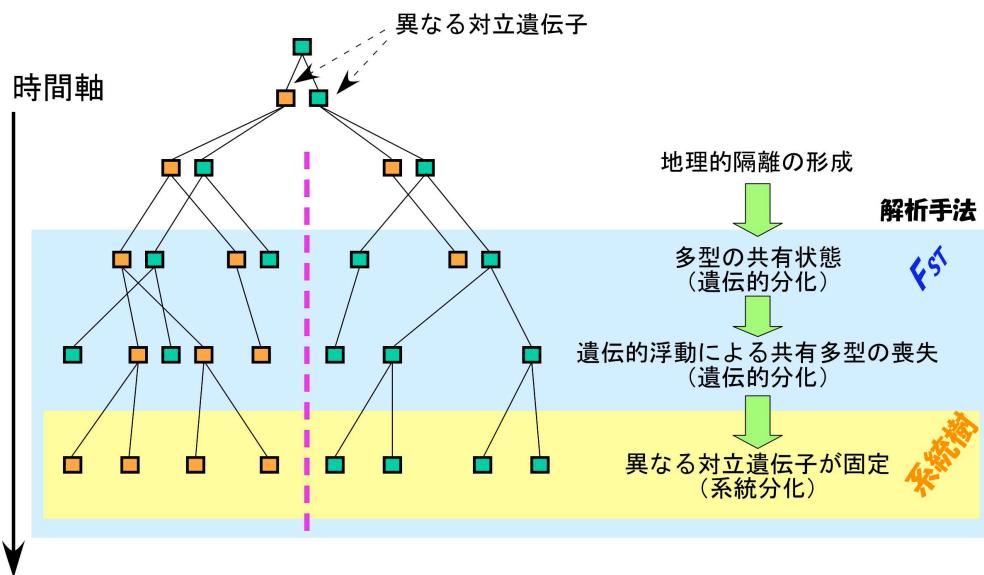


図5 地理的隔離と集団内の遺伝子型組成の時間発展。地理的隔離が形成されて二つの集団に分かれて以後、しばらくの間は遺伝子型は共有される。時間経過とともに、「遺伝的浮動」と呼ばれる集団内遺伝子組成の確率論的変動（偶然に子孫を沢山残したり、残せなかつたりという状況を生む効果）によって、二つの集団間で遺伝子型頻度（特定の遺伝子型の集団中に占める頻度）は変わっていく。この段階（図中青）では F_{ST} という遺伝子型頻度を変数とする指標を用いることによって、集団間の遺伝的組成の違いの有無の検出（0より有意に大きければ組成は異なると判断）、及び遺伝的組成の大きさの違いを推測（0から1までの数値の大きさで表現）を行うことができる。最終的には二つの集団で異なる遺伝子型が固定するが、この段階（図中黄）になって初めて系統樹で二つの集団の間の地理的隔離を検出できる。（注： F_{ST} という指標は実際には地理的隔離以外の様々なファクターの影響を受けて変動するため、その解釈には注意が必要。）

ところで、この指標は個体群内の遺伝子頻度（個体群の中で特定の対立遺伝子の占める割合）の推定値の関数であるため、統計的に有意な結果を得るために、一つの採集地から大量にアオ

コを単離して解析する必要がある。そこで筆者らはこの問題に取り組むため、利根川水系の下流域に発達している複数の湖沼をモデル地域に設定し、そこから2005年夏季にアオコの大量採集・分離培養を行い、これら分離株についてMLST解析を行った結果を元に F_{ST} を用いた解析を行った。その結果、全体的に見ると F_{ST} は有意に正の値を示すこと ($F_{ST} = 0.351, P < 0.001$)、つまり各地点の個体群間の遺伝子組成に違いが見られることがわかったが、その違いのパターンは単純ではなかった(図6)。最も驚くべき結果は、わずか3キロしか離れていない同一湖沼内の地点間でアオコの遺伝子組成が全く異なっていたことである。さらに驚くべきことに、同一の地点のアオコの遺伝子組成が2ヶ月後に全く異なるものに変化していた(Tanabe et al. 2009b)。

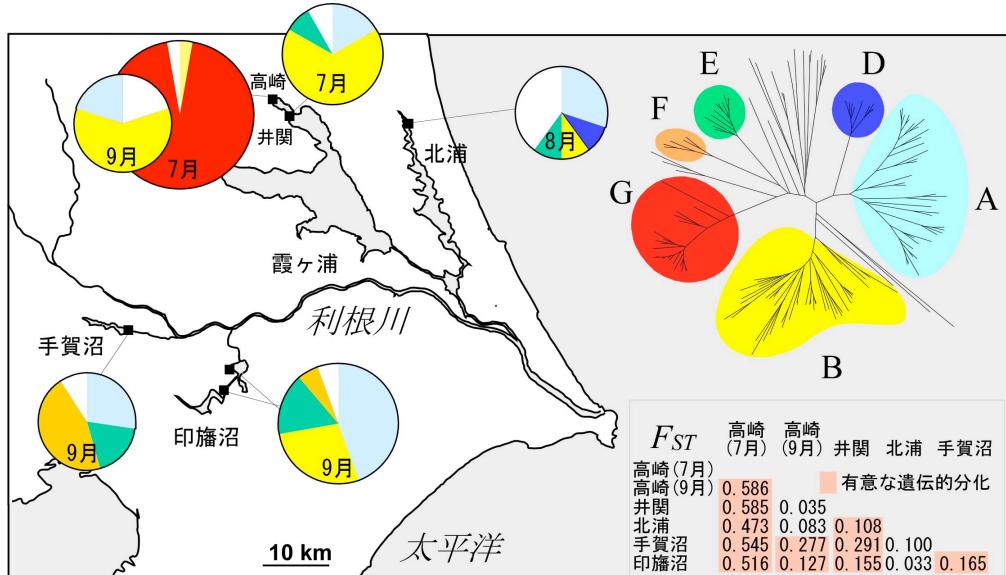


図6 利根川水系のアオコ個体群における遺伝的分化。各地個体群における遺伝子型頻度分布をMLST系統樹(右)における6つのグループ分け(グループA, B, D-G)に基づいて円グラフで示す。円グラフの面積は分離株の個数に比例するように描く。グループCは小群のため省略。表(右下)の F_{ST} 値の有意水準は0.1%。最も大きな F_{ST} 値を示す(最も異なった遺伝的組成を示す)個体群のペアは、同一地点(高崎、霞ヶ浦)の7月と9月、及び最近接する二集団(高崎と井関、同じ日に採集)であることに注意。

さて、今回観察された複雑なミクロシティスの個体群の遺伝的相違パターンをどのように解釈すればよいだろうか? MLSTの系統樹を精査してみると、この二つの意外な観察結果には、グループGと仮称する種内系統群が関与していることがわかる。1章で説明した「距離による隔離」は、利根川水系の湖沼のミクロシティスにおいては観察されなかつたが、グループGを除くと弱いながらも「距離による隔離」を示唆するパターンも見られた(Tanabe et al. 2009b)。筆者らはこのグループGが他の種内系統群(A~F)とは異なる生態的特性を持つ適応的なグループである可能性を考えており、現在その特性の解析を進めている。いずれにしても、少なくとも今回の地理スケール(60キロ程度)においては、地理的距離や水域の分断といった地理的要素以外のファクターが、アオコの分布パターンに相当に大きなインパクトを与えていることが示唆される。グループGが実際に適応的なグループであるならば、そのファクターは自然選択ということになるであろう。

4. 今後の展望

今回紹介した研究は日本国内のアオコを対象としたものであるが、前述の通り、ミクロシティス

イスは世界各地で見られる。より大きい地理スケールで解析した場合に、どのような結果が得られるかは興味深いところである。アオコは ”Everything is everywhere” 仮説が述べるように、世界各地で似たような遺伝子組成を持っているのであろうか？それとも地域固有の系統群が見出されるのであろうか？そのような系統群があるならば、それに生態系適応・自然選択はどのように関わっているのであろうか？これらの諸問題に取り組むため、現在、筆者らはアジア・オセアニア地域より集中的にミクロシティスの採集・単離・遺伝子タイピングを行っている。将来的には欧洲、新大陸、アフリカ等においても採集を行い、同種を材料とした地球規模の生物地理学的研究を展開したいと考えている。

引用文献

- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Cambridge (Massachusetts): Harvard University Press.
- Baas Becking, L.G.M. 1934. *Geobiologie of inleiding tot de milieukunde*. The Hague, the Netherlands: W.P. Van Stockum & Zoon (in Dutch).
- Hanage, W.P., Fraser, C. & Spratt, B.G. 2005. Fuzzy species among recombinogenic bacteria. *BMC Biol.* 3: 6.
- Janse, I., Kardinaal, W.E., Meima, M., Fastner, J., Visser, P.M. & Zwart, G. 2004. Toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3979-3987.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M. & Spratt B.G.. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3140-3145.
- Otsuka, S., Suda, S., Shibata, S., Oyaizu, H., Matsumoto, S. & Watanabe M.M. 2001. A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kutzing ex Lemmermann 1907 under the rules of the Bacteriological Code. *Int. J Syst. Evol. Microbiol.* 51: 873-879.
- Papke, R.T., Ramsing, N.B., Bateson, M.M. & Ward D.M. 2003. Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* 5: 650-659.
- Papke, R.T. & Ward, D.M. 2004. The importance of physical isolation to microbial diversification. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48: 293-303.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47: 264-279.
- Smith, J.M., Smith, N.H., O'Rourke, M. & Spratt, B.G. 1993. How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4384-4388.
- Tanabe, Y., Kaya, K. & Watanabe, M.M. 2004. Evidence for recombination in the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacteria *Microcystis* spp. *J. Mol. Evol.* 58: 633-641.
- Tanabe, Y., Kasai F. & Watanabe, M.M. 2007. Multilocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*.

- Microbiology* 153: 3695-3703.
- Tanabe, Y., Sano, T., Kasai, F. & Watanabe, M.M. 2009a. Recombination, cryptic clades and neutral molecular divergence of the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *BMC Evol. Biol.* 9: 115.
- Tanabe, Y., Kasai, F. & Watanabe, M.M. 2009b. Fine-scale spatial and temporal genetic differentiation of water bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*: revealed by multilocus sequence typing. *Environ. Microbiol. Reports* 1: 575-582.
- Tillett, D., Parker, D.L. & Neilan, B.A. 2001. Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2810-2818.
- Whitaker, R.J., Grogan, D.W. & Taylor, J.W. 2003. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* 301: 976-978.
- Whitaker, R.J. 2006. Allopatric origins of microbial species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361: 1975-1984.

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 ($1.3 \text{ divisions day}^{-1}$) 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

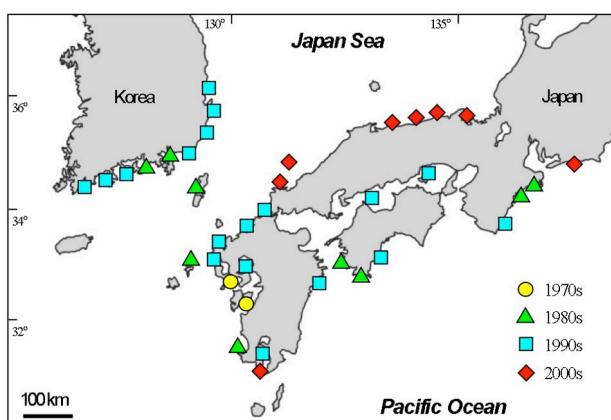


図1 有害赤潮藻 *Cochlodinium polykrikoides* の分布拡大。

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クターの報告は少なく、高い多型性を示す分子マークタ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クターの開発を行い、高度多型を有する15個のマークター作成に成功した(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個のマークターのうち、PCR増幅が良好であった10個のマークタ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。ゲルシーケンサーにより各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、アリル共有度の比較を行った。各サンプルにおいて、10個のマークターを用いたPCR増幅が得られた株の割合は97-100%であり、いずれのマークタ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、シーケ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。これまでリボソーマル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の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、各遺伝子座のアリル数は4-26 (9.9 ± 6.1 、平均士標準偏差)、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

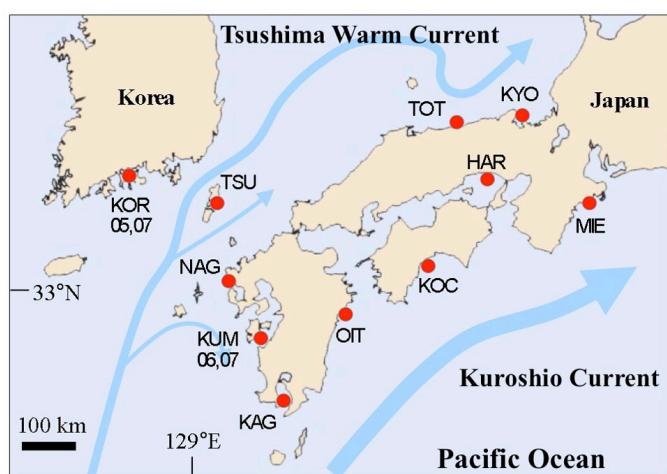


図2 *Cochlodinium polykrikoides*の採集地点図。

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

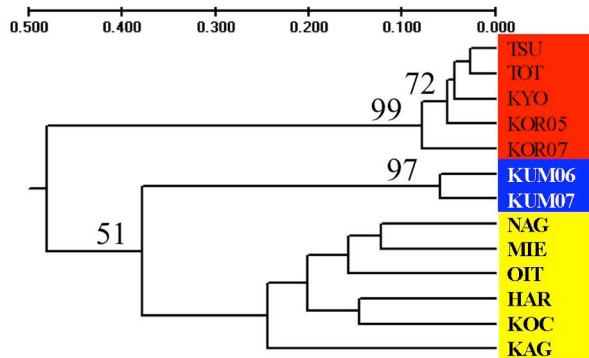


図3 UPGMA デンドログラム。遺伝距離は Nei (1972)による。*C. polykrikoides* 13 集団 (421 個体) を 10 本のマイクロサテライトを用いて解析したデータを使用。図中の値はブートストラップ値で>50 の値を示した。

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リル共有度 (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 ($1.1 \pm 1.4\%$) 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

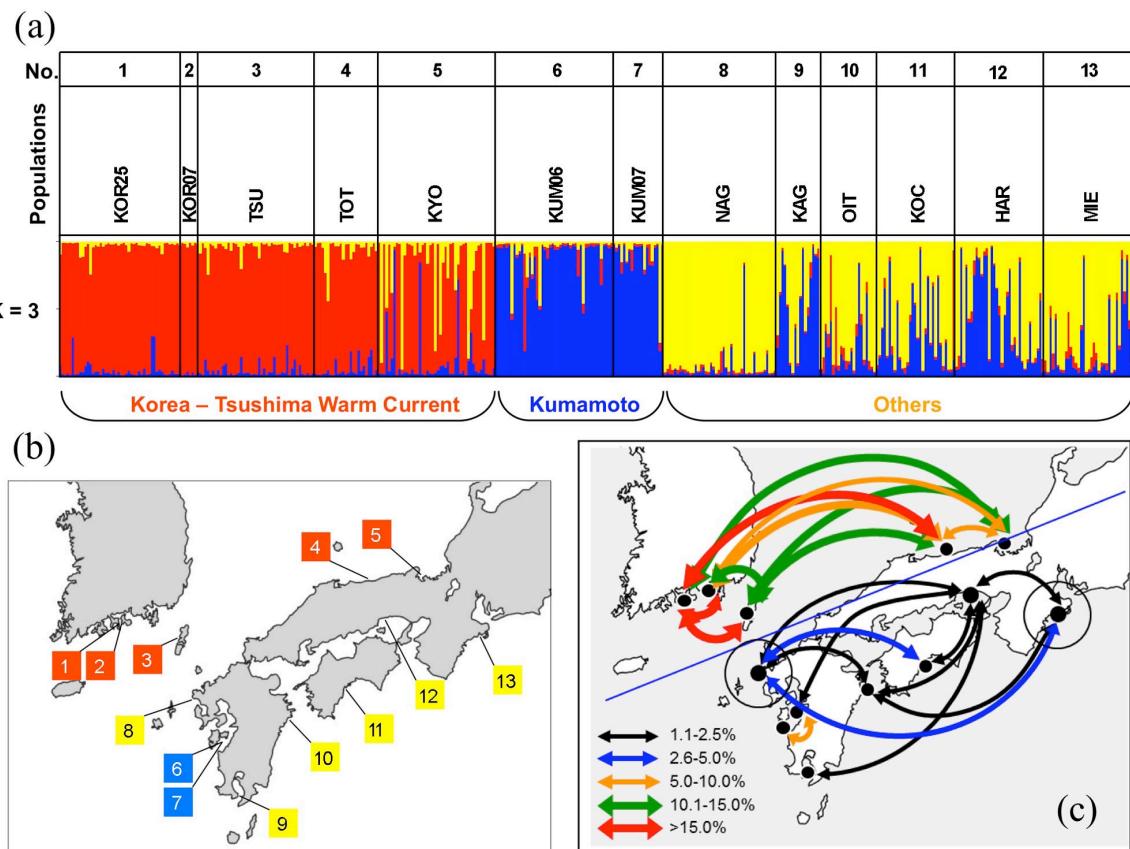


図 4 STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) によるバープロット解析。*C. polykrikoides* 13 集団 421 個体が幾つのクラスターに区分されるかを解析し、各個体が各クラスターにどの程度の割合で帰属するか割合を示した(a)。日本海および八代海の集団(b)は、赤色あるいは青色で示した単一のクラスターに帰属することを示す(a)。アリル共有度分析による個体追跡(c)。*C. polykrikoides* 13 集団各集団間の全てのペア個体間でアリル共有度 (Chakraborty & Jin 1993) を計算し、10 個のマイクロサテライト遺伝子座のうち 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リル数（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し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的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、核のリボソーマル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. tamarensis / 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）。核リボソーマル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方のもと、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）。

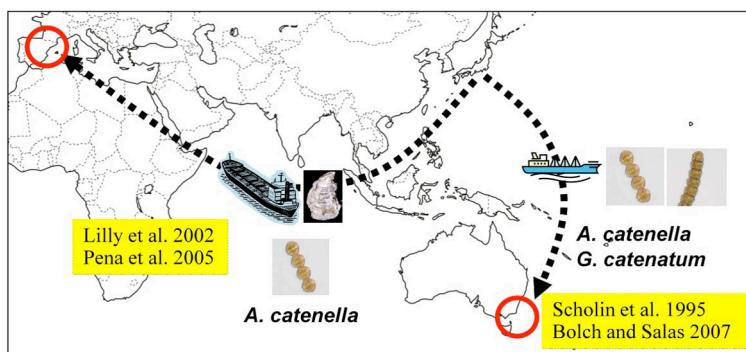


図5 有毒プランクトンの分布拡大仮説。日本からのタンカーのバラスト水の排水やカキの移植により移送されたとして複数の研究者により、日本が悪者扱いされてきた。

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增幅が良好であった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增幅を行った。ゲルシーカンサーにより各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個のマーカーを用いたPCR增幅が得られた株の割合は97-99%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增幅が見られた。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)。

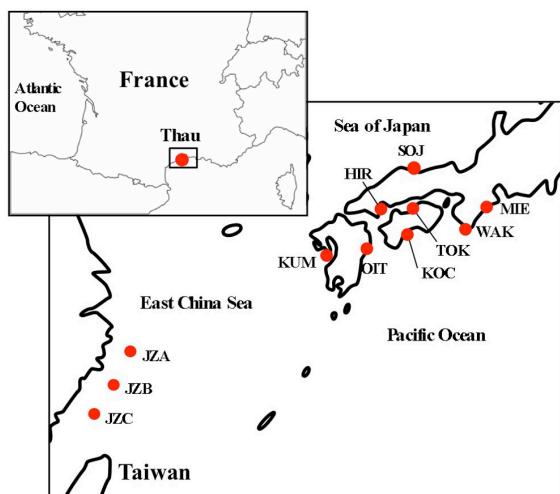


図 6 *Alexandrium catenella* の採集地点図

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 laggon	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)。ペアワイス 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集団のペアワイス 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、とりわけペアワイス 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。ペアワイス F_{ST} (左下) & R_{ST} (右上)。8個のマイクロサテライトマーカー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 回のペ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)。

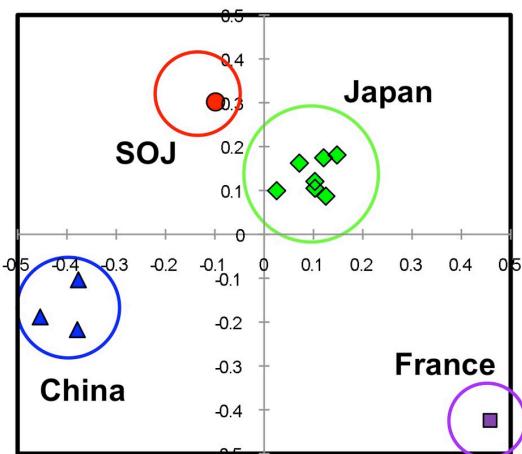


図 7 主成分分析の結果。*A. catenella* 12 集団 (644 個体)を 8 本のマイクロサテライトを用いて解析したデータを使用。Japan, 日本 7 集団; China, 中国 3 集団; SOJ, 日本の日本海 1 集団; France, フランス Thau lagoon の 1 集団を示す。第1~3 主成分の累積寄与率は 77.1% であった。

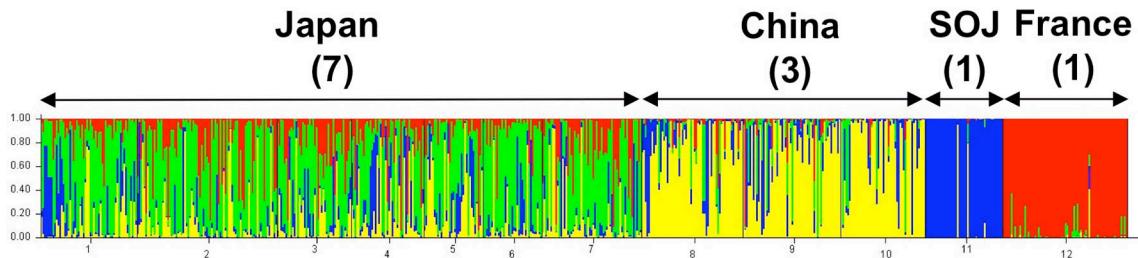


図 8 STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) によるバーパロット解析。*A. catenella* 12 集団 644 個体が幾つのクラスターに区分されるかを解析し、各個体が各クラスターにどの程度の割合で帰属するか割合を示した。Japan, 日本 7 集団; China, 中国 3 集団; SOJ, 日本の本海 1 集団; France, フランス Thau lagoon の 1 集団。日本および中国の集団は、2, 3 のクラスターの混成であることに対して、SOJ と France の集団は、単一のクラスターに帰属することを示す。

とりわけ日本海の集団は、著しく高いペアワイス 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リル共有度 (Chakraborty & Jin 1993) を計算したところ、日本集団内で $38.7\pm12.4\%$ ($n = 45,158$)、中国集団内で $27.4\pm12.5\%$ ($n=8,641$)、日本海集団内で $33.5\pm15.2\%$ ($n=528$)、フランス集団内で $52.8\pm13.2\%$ ($n=2,451$) 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斎藤義昭氏、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聰氏に厚くお礼申し上げる。また、本稿をまとめにあたり、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プによる有毒微細藻類の人為的グローバル化の実態解説手法の開発, (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 "tamarensis" 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 tamarensis* (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.

適応進化を担うフィトクロム －日本産高山植物の *PHYE* 遺伝子における自然選択－

池田 啓

東京大学大学院理学研究科

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

Phytochromes are involved in adaptive evolution:

Natural selection on *PHYE* of alpine plants in Japan

Keywords: adaptive evolution; alpine plants; phylogeography; phytochrome.

Hajime Ikeda

Graduate School of Science, Tokyo University

7-3-1 Hongo, Tokyo 113-0033, Japan

植物は能動的に動くことが出来ないため、周囲の環境へと適応し、温度や光周期といった生育環境の変化をモニターすることが、生きる伸びるためだけでなく、次世代を残すことにおいても重要である。そのため、周囲の環境をモニターし、環境へと適応するための精巧なシステムが、植物の進化の過程において、自然選択によって作り上げられてきたものと考えられる。特に、発芽や被陰応答、開花のタイミングといった、植物における様々な発生プロセスが、光シグナルによって制御されている (Whitelam & Devlin 1997, Whitelam et al. 1998, Smith 2000, Mathews 2006)。こうした光シグナルによる発生プロセスの制御には、光受容体が中枢としての役割を担っている。とりわけ、赤色—遠赤色光の受容体であるフィトクロムが、環境へと応答した発生段階の制御に大きな役割を果たしている。そのため、植物における地域環境への適応にも、フィトクロムが大きな役割を果たしていることが期待される。

フィトクロムが地域適応を担うことに関しては、モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を始めとして、近年幾つかの報告がなされている。シロイヌナズナでは、フィトクロムの一つである *PHYC* における多型が、緯度や経度に応じた開花時期の変化と相関を持つことが知られている (Balasubramanian et al. 2006, Samis et al. 2009)。また、ポプラ (*Populus tremula*) では、緯度に沿って変化する冬芽形成の時期に対し、*PHYB2* におけるアミノ酸置換が相関を持つことが知られている (Ingvarsson et al. 2006, 2008)。さらに、イネ科パールミレット (*Pennisetum americanum*) においても、*PHYC* における変異が、野生集団に見られる開花時期の違いに相関を持つことが知られている (Saïdou et al. 2009)。

こうした生態的に重要な形質における表現型に基づいた研究に加え、系統地理学を応用した逆遺伝学的なアプローチからも、フィトクロムが適応進化に関わっていることが、日本列島の高山植物において示されている。アブラナ科ミヤマタネツケバナ (*Cardamine nipponica*) では、フィトクロム遺伝子を含む14個の遺伝子の多型に基づく解析が行われている。その結果、中部地方と東北・北海道（北日本）の集団の間では、フィトクロムの一つである *PHYE* が

他の遺伝子とは異なる進化様式を示すことから、南北間で異なる自然選択を受けて進化してきたことが示唆されている (Ikeda et al. 2009, 2010)。また、ツツジ科コメバツガザクラ (*Arcterica nana*) では、AFLPによるゲノム全体から網羅的に得た遺伝的多型の地理構造に加え、フィトクロム遺伝子を含む4つの核遺伝子の多型に基づく解析が行われている (Ikeda & Setoguchi 2009, 2010)。その結果、フィトクロムの一つである *PHYE*における多型は、ゲノム全体の多型や他の核遺伝子の多型とは食い違う地理構造を持ち、中部地方から北日本にかけて、特異的に遺伝的な分化を持つことが示されている。こうした結果から、コメバツガザクラにおいても、*PHYE*が日本列島の南北集団の間で適応に関わって進化してきたことが示唆されてきた (Ikeda & Setoguchi 2010)。これらの例から、日本列島の高山植物においては、フィトクロムの一つである *PHYE*が緯度に沿った地域適応に関わって進化していることが示唆されている。シロイヌナズナにおけるフィトクロムの生理学的な実験から、*PHYE*は低温条件下における発芽に大きく関与することが知られている (Heschel et al. 2007)。高山植物は、その生育期間の大部分が低温であるため、*PHYE*が低温下において重要な役割を果たしていることは、非常に興味深いことである。しかしながら、*PHYE*が果たす具体的な役割に関しては、モデル植物においてすら、はっきりとは知られていない (Mathews 2010)。そのため、日本列島の高山植物において、*PHYE*が具体的にどのような役割を果たすことで適応を担っているのか、という点を実証的に示す研究が望まれる。

植物において、適応進化を担う仕組みはフィトクロムに限らず、様々な因子が関わっているものと考えられる。しかし、フィトクロムは、全ての植物が持つ光受容体であるため (Mathews & Sharrock 1997)，植物の適応進化・多様性形成を担う上で鍵となる役割を果たしていることが想像される。フィトクロムが適応進化を担う、という観点からの研究は、その事例が限られているように十分に行われていない。そのため、今後様々な植物において、フィトクロムが適応進化に関わることを示すとともに、その具体的な役割を実証的に示す研究が望まれている。

引用文献

- Balasubramanian, S., Sureshkumar, S., Agrawal, M., Michael, T.P., Wessinger, C. et al. 2006. The PHYTOCHROME C photoreceptor gene mediates natural variation in flowering and growth responses of *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 38: 711-715.
- Heschel, M.S., Selby, J., Butler, C., Whitelam, G.C., Sharrock, R.A. & Donohue, K. 2007. A new role for phytochromes in temperature-dependent germination. *New Phytol.* 174: 735-741.
- Ikeda, H. & Setoguchi, H. 2009. The homogenous genetic structure and inferred unique history of range shifts during the Pleistocene climatic oscillations of *Arcterica nana* (Maxim.) Makino (Ericaceae). *J. Plant Res.* 122: 141-151.
- Ikeda, H. & Setoguchi, H. 2010. Natural selection on *PHYE* by latitude in the Japanese archipelago: insight from locus specific phylogeographic structure in *Arcterica nana* (Ericaceae). *Mol. Ecol.* 19: 2779-2791.
- Ikeda, H., Fujii, N. & Setoguchi, H. 2009. Molecular evolution of phytochromes in *Cardamine*

- nipponica* (Brassicaceae) suggests the involvement of *PHYE* in local adaptation. *Genetics* 182: 603-614.
- Ikeda, H., Fujii, N. & Setoguchi, H. 2010. Molecular evolution of cryptochrome genes and the evolutionary manner of photoreceptor genes in *Cardamine nipponica* (Brassicaceae). *J. Plant Res.* in press.
- Ingvarsson, P.K., Garcia, M.V., Hall, D., Luquez, V. & Jansson, S. 2006. Clinal variation in *phyB2*, a candidate gene for day-length-induced growth cessation and bud set, across a latitudinal gradient in European aspen (*Populus tremula*). *Genetics* 172: 1845-1853.
- Ingvarsson, P. K., Garcia, M. V., Luquez, V., Hall, D. & Jansson, S. 2008. Nucleotide polymorphisms and phenotypic associations within and around the *phytochrome B2* locus in European aspen (*Populus tremula*, Salicaceae). *Genetics* 178: 2217-2226.
- Mathews, S. & Sharrock, R. A. 1997. Phytochrome gene diversity. *Pl. Cell Environ.* 20: 666–671.
- Mathews, S. 2006. Phytochrome-mediated development in land plants: red light sensing evolves to meet the challenges of changing light environments. *Mol. Ecol.* 15: 3483-3503.
- Mathews, S. 2010. Evolutionary studies illuminate the structural-functional model of plant phytochromes. *Pl. Cell* 22: 4-16.
- Saïdou, A. A., Mariac, C., Luong, V., Pham, J. L., Bezançon, G. & Vigouroux, Y. 2009. Association studies identify natural variation at *PHYC* linked to flowering time and morphological variation in pearl millet. *Genetics* 182: 899-910.
- Smith, H. 2000. Phytochromes and light signal perception by plants-an emerging synthesis. *Nature* 407: 585-591.
- Whitelam, G.C. & Devlin, P.F. 1997. Roles of different phytochromes in *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Pl. Cell and Environ.* 20: 752-758.
- Whitelam, G.C., Patel, S. & Devlin, P.F. 1998. Phytochromes and photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 353: 1445-1453.

シロイヌナズナ属における自家和合性進化の遺伝的背景を探る

土松 隆志・清水 健太郎

チューリヒ大学植物生物学研究所

The genetic basis for the evolution of self-compatibility in *Arabidopsis*

Key words: *Arabidopsis*; genetic basis of adaptation; reproductive systems;
self-compatibility; selfing.

Takashi Tsuchimatsu & Kentaro K. Shimizu

Institute of Plant Biology, University of Zurich

Zollikerstrasse 107, CH-8008 Zurich, Switzerland

1. はじめに

全被子植物のうち約7割に及ぶ種が、ひとつの花の中に雄（花粉）・雌（胚珠）の2つの性を持つ「両性花」をつけることが知られている (Yampolsky & Yampolsky 1922)。両性花をつける植物の中には自己の花粉と胚珠の交配によって種子をつくることが可能な種が多くあり、このような繁殖様式を自殖（自家受精）と言う。これに対し、他個体同士の花粉と胚珠の交配は他殖（他家受精）と呼ばれる。植物が自殖を行う適応的な意義、自殖を促進あるいは回避するメカニズム、自殖が植物集団にもたらす進化的な影響などは、ダーウィン以来、生態学・進化学における中心的な課題である。

私たちは、分子遺伝学のモデル生物であるアブラナ科シロイヌナズナを用いて、分子レベルの知見からこのような生態学的・進化学的な問い合わせに迫ろうとしている。本総説では、自殖研究の歴史をごく簡単に振り返り、私たちの研究とその今後の展望を紹介したい。

2. 自殖の適応的意義

自殖の有利な点・不利な点を最初に科学的に研究したのは、『種の起源』を著した進化生物学の祖ダーウィン (C. Darwin) である。ダーウィンは膨大な数の植物種について交配実験を行い、自殖を積極的に行う種が存在する一方で、多くの植物種は他個体由来の花粉で種子を結実させることを明らかにした。これに加えてダーウィンは、自殖由来の個体は他殖由来の個体に比べて一般に成長・繁殖能力が低いことを発見した (Darwin 1876)。植物やヒトを含む様々な生物において、自殖のような近親交配由来の子孫の成長率が低かったり遺伝病の発症リスクが高まったりする現象が知られており、これを近交弱勢と呼ぶ。近交弱勢は、集団中にごく低い頻度で存在する劣性有害突然変異がホモ接合で揃うことにより引き起こされる (総説として Charlesworth & Willis 2009)。

しかしながら、一方で自殖を行う植物も多く存在する。自殖には近交弱勢を補って余りある利点があるはずだと考え、ダーウィンが最終的に行き着いた仮説が「繁殖保証仮説」であった。ダーウィンは、隔離された集団などの交配相手が少ない状況や、送粉者の訪花頻度が不安定な環境

下では、一個体だけで種子を残せる自殖性は確実な繁殖を保証するという点で有利になるのではないかと考えた。その後、交配相手が減少してしまう可能性の高い長距離分散を経た種は自殖性のものが多いという一般的な傾向が、ベイカー (H.G. Baker) によって報告された (Baker 1955)。ベイカーの法則と呼ばれるこの傾向は、繁殖保証仮説を支持する証拠のひとつである。

自殖の適応的意義に関するもうひとつの重要な考察は、フィッシャー (R.A. Fisher) による「遺伝子の伝達効率」である (Fisher 1941)。ダーウィンは近交弱勢という自殖の不利さに着目していたが、フィッシャーはむしろ基本的には自殖の方が有利なはずだと考えた。他殖によって作られた種子では、父親（花粉親）と母親（胚珠親）は違う個体である一方、自殖によって作られた種子では父親も母親も同じ個体、自分自身である。つまり、自殖由来の種子は親の遺伝子からのみ構成されていることになる。しかし、他殖由来の種子では、半分は自分由来であるもののもう半分はまったくの他個体由来である。このことは、他殖より自殖のほうが次世代への遺伝子の伝達効率が2倍良い、つまり進化的に有利であることを意味する。

のことからフィッシャーは、近交弱勢と遺伝子の伝達効率のバランスでそれぞれの種の自殖率が決まると考えた。具体的には、近交弱勢の強さ（他殖由来の個体の適応度に対する自殖由来の個体の適応度の割合）が $1/2$ 以下のときは他殖を促進する性質が進化し、 $1/2$ 以上のときは自殖を積極的に行う性質が進化するのではないかとの予測である。「 $1/2$ 」という値は自殖における「2倍」の遺伝子の伝達効率に由来する。つまり、伝達効率の有利さが近交弱勢の不利さに打ち勝つとき自殖が有利になるというわけである。

自殖の適応的意義に関する論文はその後も続々と出版された。中でも Lande & Schemske (1985) は、フィッシャーのモデルをさらに洗練し、実際の植物を用いて理論を検証する枠組みを提案した点で特に重要である。ここではその詳細には触れないが、Lande & Schemske (1985)とその後の研究史をまとめた総説として Goodwillie et al. (2005)を薦めたい。

3. 自殖性・自家和合性進化の遺伝的背景：シロイヌナズナを例に

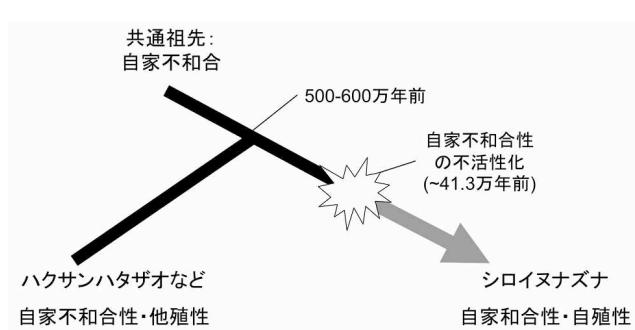


図 1 シロイヌナズナにおける自家不和合性の不活性化と自殖の進化。

自殖の適応的意義に関する研究は、このように今まで盛んに行われてきた。その一方で、他殖的な種と自殖的な種の進化的な移行のプロセスに関する知見は依然として数少ない。自殖・他殖という性質は近縁種間でも顕著に異なる場合があることが一般に知られており、それらの種では過去に繁殖様式の進化的な変化があったはずである。具体的にどの遺伝子のどの変異によって、

いつ、どのような環境下で繁殖システムの移行が起きたのか。こういった問題に取り組むためには、生態学的な調査だけではなく、自殖性・他殖性に関する遺伝子レベルの知見が欠かせない。そこで私たちは、アブラナ科シロイヌナズナ属に属し分子遺伝学研究のモデル生物として知られるシロイヌナズナに着目した。

シロイヌナズナは自殖性の種であり、野外でつける種子の約99%は自殖由来であると推定されている。その一方、ハクサンハタザオなどの近縁種は他殖性である(図1)。シロイヌナズナの近縁種が他殖性なのは、これらの種が「自家不和合性」と呼ばれるメカニズムを持っているためである。自家不和合性とは、自己の花粉と胚珠の交配を避ける遺伝的なしくみである。例えば、他殖性のハクサンハタザオでは、自己の花粉が柱頭についても花粉管を伸長させることができず、種子が形成されない。よって、シロイヌナズナでは、過去にこのシステムが不活性化することによって自家不和合性から自家和合性になり、自殖を行うようになったと考えられる(図1)。

シロイヌナズナ属では、この自家不和合性の鍵となる遺伝子、*SCR*(*SPII*とも呼ばれる)と*SRK*がすでに単離されている(Kusaba et al. 2001)。*SCR*は花粉側で発現し、*SRK*は柱頭側で発現する。自家不和合性を持つ他殖種においては、同個体由来の花粉が柱頭についたときに*SCR*・*SRK*間の特異的な相互作用が起こり、花粉管伸長が阻害される。

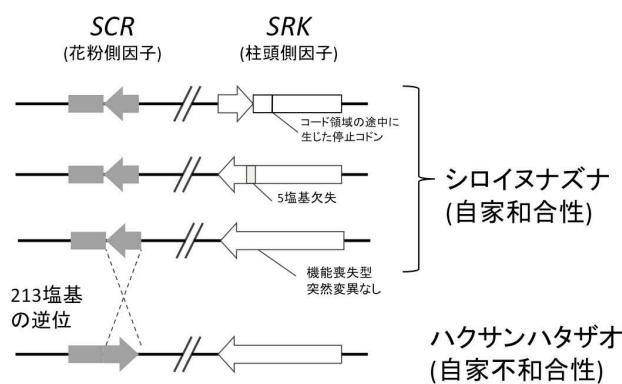


図2 シロイヌナズナの花粉側因子 *SCR* および柱頭側因子 *SRK* 上に生じた突然変異。ヨーロッパの様々な地点から採集されたシロイヌナズナの *SCR* および *SRK* のうち代表的な配列を、近縁種で自家不和合性をもつハクサンハタザオの配列と比較した。*SCR* 上の 213 塩基の逆位が種内で広く共有されている一方、*SRK* 上に機能喪失型突然変異の見られない系統もいくつか発見された。

その一方で、少なくとも 12 系統のシロイヌナズナにおいて、配列上はどこも壊れていない正常な *SRK* が見つかった(Tsuchimatsu et al. 2010)。この 12 系統は、シロイヌナズナの種全体の 4%ほどの系統に相当する。これに対し機能型の花粉側遺伝子 *SCR* はどの系統からも見つからず、コード領域の最後に 213 塩基の逆位が見られることがわかった(Tsuchimatsu et al. 2010)。この逆位変異はシロイヌナズナにおいて 95%以上と高い割合で共有されていたのに対し、それ以外のいくつかの突然変異はいずれも頻度が低かった。さらに、逆位を元に戻した花粉側遺伝子 *SCR* の DNA 配列を PCR によって人工的に作成し、正常な柱頭側遺伝子 *SRK* をもつシロイヌナズナの系統のひとつに遺伝子導入したところ、遺伝子導入個体において自家不和合反応が観察されたことがわかった(Tsuchimatsu et al. 2010, 共同研究者である東北大学の諏訪部圭太博士[現・三重大学]・五十川祥代氏・渡辺正夫博士による実験)。

これらの結果は、花粉側遺伝子 *SCR* 上に生じた逆位変異がシロイヌナズナにおける過去の自

シロイヌナズナでは、これら *SCR* と *SRK* のいずれかに機能喪失型の突然変異を起こすことによって自家不和合性が不活性化し、高い自殖率が進化した可能性がある。これを確かめるために、私たちはヨーロッパに分布するシロイヌナズナの様々な種内系統について *SCR* と *SRK* の塩基配列を決定し、またそれらを近縁種のハクサンハタザ

オの配列と比較した。その結果、図2のようにいくつもの機能喪失型突然変異が *SCR*・*SRK* 上に見つかった(Shimizu et al. 2008)。まず、柱頭側遺伝子 *SRK* 上には、フレームシフトなどの機能喪失型突然変異が多く見つかった。

家和合性の進化に関わった突然変異のひとつであることを示す。*SCR*・*SRK* 上に見つかったその他の様々な変異は、この逆位変異が生じた後、二次的に蓄積した変異であり、自家和合性の進化の直接の原因となった変異ではないと考えられる。私たちの研究は、野外集団において自家和合性の進化に関わった突然変異を分子レベルで同定し、その突然変異がほぼ種全体に広がったことを確かめた世界初の報告である。

この結果は何を示唆するだろうか。自家不和合性は *SCR* と *SRK* を含む多くの遺伝子によって成り立つ複雑なシステムである。ひとたび自家和合性が進化したら、システム全体が中立化し、それぞれの遺伝子に突然変異が蓄積していくと考えられる。しかし実際には、花粉側遺伝子 *SCR* の突然変異を人工的に修復するだけで自家不和合性が復活した。すなわち、少なくとも種内の数% の系統については、*SCR* の逆位以外は正常なままであったということである。これは、シロイヌナズナにおける自家不和合性の不活性化が比較的最近に起きたことを示唆する。もし長い時間が経っていたら、*SCR* の逆位以外にも多くの突然変異が蓄積していたはずである。他の研究グループによる同義置換率・非同義置換率の比に基づいた解析によると、シロイヌナズナにおける自家和合性の進化は、もっとも古くて 413,000 年前程度と推定されている (図 1, Bechsgaard et al. 2006)。この値は、近縁種との分岐年代 (約 500-600 万年前) よりも一桁少ないオーダーである。

シロイヌナズナが自家不和合性を失ったと考えられる数万年～数十万年前、シロイヌナズナが分布するヨーロッパでは、ちょうど氷期・間氷期のサイクルの中で動植物の分布が大きく拡大・縮小していたと考えられている。分布が大きく変化する状況下では、交配相手が不足し、十分な他家花粉が得られなかつたかもしれない。そのような環境の下では、一個体だけで子孫を残すことができる自殖性は、繁殖保証の観点から有利になりうる。また、分布の急激な拡大に伴って生じる強い遺伝的ボトルネックは、分布拡大の最前線の集団において近交弱勢の値を低下させる効果があることが近年指摘されている (Pujol et al. 2009)。近交弱勢が分布拡大をきっかけに低下するがあれば、遺伝子の伝達効率の高さで自殖は他殖よりも有利になり、他殖を促す自家不和合性は不活性化する方向へ淘汰圧が働いただろう。このように、私たちの発見は、ダーウィン、フィッシャーらの仮説を分子レベルから支持するものである。自家和合性・自殖性の進化が最近の分布拡大とともに起きたことは同じくアブラナ科のルベラナズナでも報告されており (Guo et al. 2009)，シロイヌナズナに限らない一般的な傾向かもしれない。さらなる研究の蓄積が待たれる。

4. 展望

シロイヌナズナにおいて見られた他殖から自殖へという進化の方向性は、他の分類群においても一般的である。すなわち、主に自家和合性の進化をきっかけにして他殖種から自殖種が何度も繰り返し起源するものの、その逆の進化はあまり起こらないと考えられている (Stebbins 1974)。このような進化の不可逆性はなぜ生じるのかを、今後の展望として最後に考えてみたい。

現在のところ大きく 2 つの要素が重要であると考えられている (Stebbins 1974, Takebayashi & Morrell 2001)。一つ目は、自家不和合性が不活性化するのは簡単だが、ひとたび不活性化するとその復帰は困難であるという点である。いったん不活性化した自家不和合性が復帰するためには、同じ遺伝子の同じ箇所にもう一度元通りにする突然変異が生じる必要がある。この確率は、自家

不和合性に関わる遺伝子群のどこかひとつに変異が起きる確率に比べるとずっと低いはずである。複雑なシステムの獲得と喪失に見られるこのような非対称性は、一般にドローの法則と呼ばれる。

もう一点は、自殖集団における遺伝的多様性の減少にともなう絶滅率の上昇である。自家和合突然変異が集団に広まりどの個体も自殖を行うようになると、組み換えの減少や遺伝的浮動の効果により、集団の遺伝的多様性が減少すると考えられる。適応進化の原動力である遺伝的多様性が失われると、常に変化する生物的・無生物的環境に対応できず、自殖集団は他殖集団より絶滅しやすいことが予想される。

自殖性は、遺伝子伝達効率・繁殖保証などの短期的な有利さから集団中に広まるものの、集団レベルの進化のポテンシャルを低下させ絶滅率を高める点で、長期的には不利な性質かもしれない。一度進化したら戻れない、あとは絶滅を待つばかりという意味で、自家和合性とそれとともに自殖の進化は「進化のデッドエンド」とも言われる。ただし、この予測は十分に検証されたとはいがたい。特に、自殖が実際に集団の遺伝的多様性を低下させることで適応進化のポテンシャルを減少させているかを実証的に明らかにした例はほとんどない (Takebayashi & Morrell 2001)。分子レベルの知見を取り入れながら、今後様々な分類群で野外での進化学的・生態学的研究を積み重ねていくことが重要であろう。

謝辞

諏訪部圭太博士（三重大）、渡辺正夫博士、五十川祥代氏（東北大）、鈴木剛博士（大阪教育大）、高山誠司博士（奈良先端大）には、共同研究を通じて数々の助言を賜った。篤くお礼申し上げる。

引用文献

- Baker, H.G. 1955. Self-compatibility and establishment after 'long-distance' dispersal. *Evolution* 9: 347-349.
- Bechsgaard, J.S., Castric, V., Charlesworth, D., Vekemans, X. & Schierup, M.H. 2006. The transition to self-compatibility in *Arabidopsis thaliana* and evolution within S-haplotypes over 10 Myr. *Mol. Biol. Evol.* 23: 1741-1750.
- Charlesworth, D. & Willis, J.H. 2009. The genetics of inbreeding depression. *Nat. Rev. Genet.* 10: 783-796.
- Darwin, C. 1876. The Effects of Cross and Self Fertilisation in the Vegetable Kingdom. J. Murray, London.
- Fisher, R. A. 1941. Average excess and average effect of a gene substitution. *Ann. Eugen.* 11: 53-63.
- Goodwillie, C., Kalisz, S. & Eckert, C.G. 2005. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36: 47-79.
- Guo, Y.L., Bechsgaard, J.S., Slotte, T., Neuffer, B., Lascoux, M., Weigel, D. & Schierup, M.H. 2009. Recent speciation of *Capsella rubella* from *Capsella grandiflora*, associated with loss of self-incompatibility and an extreme bottleneck. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106: 5246-5251.
- Kusaba, M., Dwyer, K., Hendershot, J., Vrebalov, J., Nasrallah, J.B. & Nasrallah, M.E. 2001. Self-incompatibility in the genus *Arabidopsis*: characterization of the S locus in the outcrossing *A. lyrata* and its autogamous relative *A. thaliana*. *Pl. Cell* 13: 627-643.

- Lande, R. & Schemske, D.W. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution* 39: 24-40.
- Pujol, B., Zhou, S.R., Sanchez Vilas, J. & Pannell, J.R. 2009. Reduced inbreeding depression after species range expansion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106: 15379-15383.
- Shimizu, K.K., Shimizu-Inatsugi, R., Tsuchimatsu, T. & Purugganan, M.D. 2008. Independent origins of self-compatibility in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Ecol.* 17: 704-714.
- Stebbins, G.L. 1974. Flowering Plants: Evolution Above the Species Level. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Takebayashi, N. & Morrell, P.L. 2001. Is self-fertilization an evolutionary dead end? Revisiting an old hypothesis with genetic theories and a macroevolutionary approach. *Amer. J. Bot.* 88: 1143-1150.
- Tsuchimatsu, T., Suwabe, K., Shimizu-Inatsugi, R., Isokawa, S., Pavlidis, P., Städler, T., Suzuki, G., Takayama, S., Watanabe, M. & Shimizu, K.K. 2010. Evolution of self-compatibility in *Arabidopsis* by a mutation in the male specificity gene. *Nature* 464: 1342-1346.
- Yampolsky, C. & Yampolsky, H. 1922. Distribution of sex forms in the phanerogamic flora. *Bibliotheca Genetica* 3: 1-62.