

上井進也：ミトコンドリアマーカーによる日本産褐藻アカモク集団における遺伝的・系統地理的構造の解析

「種」の内部に存在する遺伝的多様性といってもいろいろな種類のものがある。例えば形態的分類が十分に吟味されておらず形態的には同種とみなされていても実は多系統的である場合もある。本稿はそういった多系統性に由来する遺伝的多型ではなく、分子系統学的にも単系統とみなされる種の内部に存在している遺伝的多型についての話である。褐藻アカモクにおける遺伝的多様性の大きさと地理的分布にもとづく系統地理的解析について解説したい。

アカモク (図1) は褐藻ホンダワラ科の仲間で、九州から北海道まで黒潮や親潮の影響の強い地域を除き広く分布している。一年生の褐藻で、ホンダワラの仲間の中では長い茎と長楕円形の気胞、羽状の冠葉などの特徴で比較的簡単に同定できる。類似種としてシダモクがあり、両種は気胞の形態 (長楕円形と球形, 図2, 3) と雌性で区別されてきた (沢田 1955, 奥田 1977, Yoshida 1983)。Stieger *et al.* (2003) の ITS 領域に基づく分子系統学的解析によるとアカモクとシダモクは他のホンダワラ科の仲間からは明瞭に区別することができる単系統群となるものの、ITS 領域では両種の区別は明瞭ではない。このような理由から我々の研究では便宜的にアカモクとシダモクを種群としてまとめて扱い、系統地理的解析ばかりではなく両種の遺伝的關係も調べた。

マーカーとしてはミトコンドリアの *cox3* 遺伝子の部分配列 (470 塩基) を用いた。両親由来の核ゲノムコードのマーカー

と母親由来のミトコンドリアマーカーとではデータ収集 (シーケンスやジェノタイピングなど) の際の方法も違えば、その後の解析も異なる。ミトコンドリアマーカーは片親由来であるため基本的に組み換えがなく、このため全ミトコンドリアゲノムは一つの遺伝子座として扱う。この特徴には一長一短 (例えば短所としてはいくつもの遺伝子について多型を調べても結局一つのマーカーにおける多型として扱うことになる点が挙げられる) があるが、種内でハプロタイプ間の系統関係を推定するような場合には大きな利点となる。なおミトコンドリアゲノムは核ゲノムにくらべて遺伝的浮動の影響を受けやすく、地域差がでやすいことも留意しておいていただきたい。

この解析ではアカモク 31 集団、シダモク 6 集団から計 305 個体を日本沿岸から採集した (図4)。これら 305 個体からは 33 ハプロタイプが見つかった。ハプロタイプ間の系統関係とおおまかな地理的分布を図5に示す。これらハプロタイプの地理的分布 (各集団における出現頻度) とハプロタイプ間の遺伝的距離をもとに日本沿岸の集団についてグルーピングを行うため SAMOVA 解析 (Spatial Analysis of MOlecular VAriance, Dupanloup *et al.* 2002) を行なった結果が図4である。

SAMOVA は AMOVA を利用したグルーピングの一手法で、最も大きな遺伝的分化を示すようなグループを検出する。SAMOVA では事前に遺伝的構造を仮定する必要がなく、結



図1-3 アカモクとシダモク。1. アカモクの藻体。2. アカモクの気胞。3. シダモクの気胞。スケールは図1は10 cm, 図2, 3は1 cm。

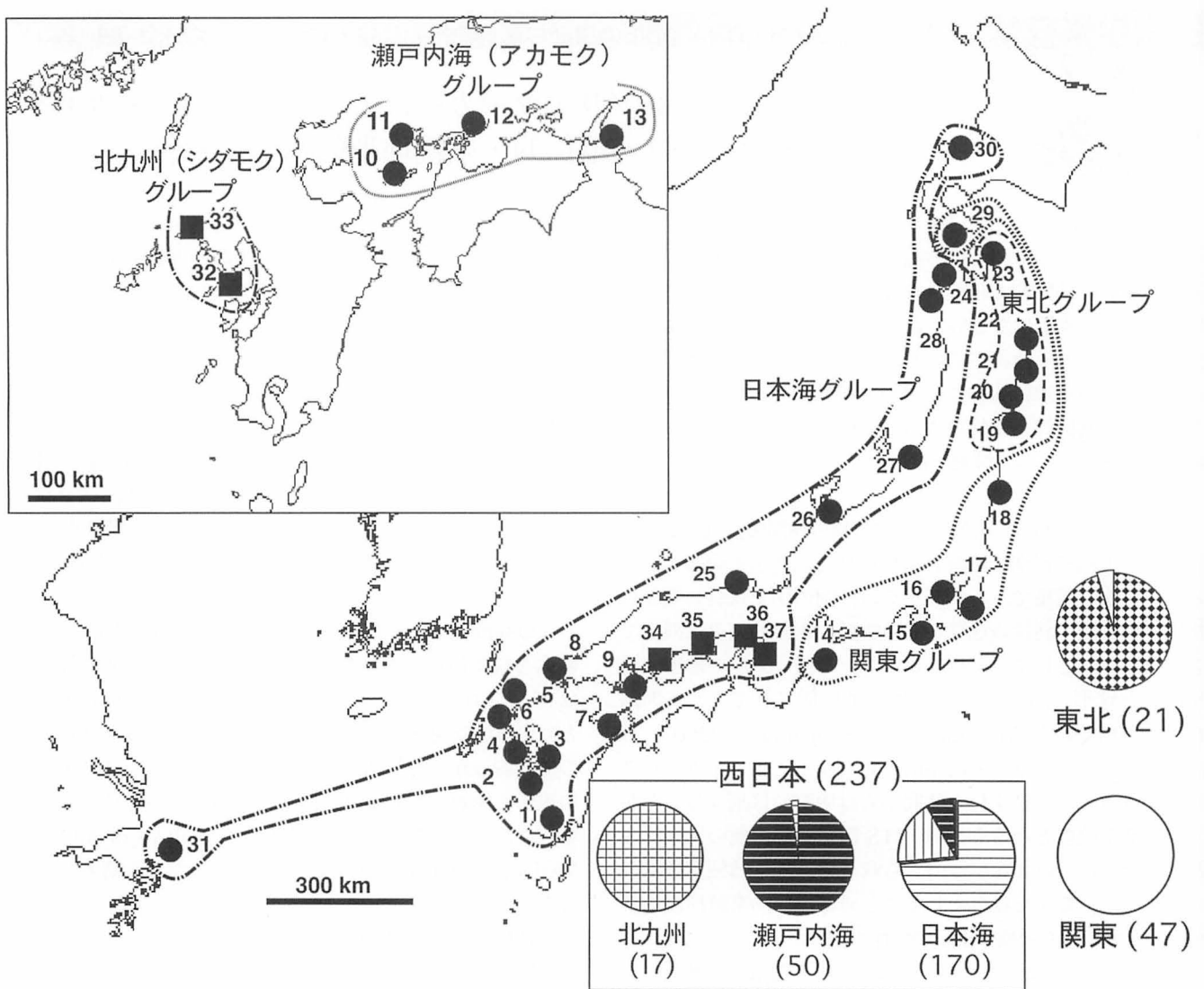


図4 サンプルポイントと SAMOVA グループの地理的分布。●はアカモク、■はシダモクを示す。円グラフは各 SAMOVA グループのハプロタイプ組成を表す。パターンは図5に対応。括弧内はサンプル数。西日本グループ ($k=3$) は日本海、瀬戸内海アカモク、北九州シダモク (いずれも $k=5$) を含む。関東・東北は $k=3$ と $k=5$ のいずれでも認識された。

果から対象とした集団間に存在する遺伝子流動の障壁を検出することもできる。ただしグループの数を設定してやる必要があり、通常はある程度の範囲 (今回の場合 $k=2-9$, k はグループ数) で解析を繰り返す。

図4に示したグルーピングは $k=3$ ($F_{ct}=0.852$) と $k=5$ ($F_{ct}=0.871$) の場合のものである。 $k=3$ のときは九州から北海道までの日本海沿岸と瀬戸内海沿岸のアカモク・シダモク集団を含む西日本、三重から福島までの関東、そして東北太平洋岸の東北の3グループに分かれ、 $k=5$ の場合は西日本グループが細分されて瀬戸内海アカモク集団、北九州シダモク集団、そしてそれ以外の集団 (日本海沿岸のアカモク集団と瀬戸内海のシダモク集団) の3グループに分かれた。高い F_{ct} 値は各集団がほぼ例外なく一つの系統群 (図5の地理的グループ) に属するハプロタイプを持っていたこと、また特に $k=3$ の時は各グループのハプロタイプの間大きな遺伝的距離が見られたことに起因する。なお日本海のアカモクと瀬戸内海のシ

ダモクは $k=8$ まで分離することはなかった。

以上のように日本列島沿岸のアカモク・シダモク集団には明確な地理的分化 (地理的な遺伝的構造) がみられたが、このような地理的分化がどのような要因によって形成されてきたかを知るためには系統地理学的解析が必要となる。以前は系統地理的な考察はハプロタイプの地理的分布とハプロタイプ系統樹の分岐パターンとを照らし合わせて直感的に行なわれていたが、最近ではより客観的に解析を行なうための方法が提案されている (Avice 2000, Knowles & Maddison 2002)。その一つが Templeton *et al.* (1995) により考案された Nested clade analysis (NCA) である (Templeton 2004 の文献参照)。例えば地理的に分布域が隔離されている二つの集団において遺伝的分化が検出された場合を想定してみる。単にハプロタイプ頻度が統計的に異なる場合には両集団の間の遺伝子流動が制限されたため (つまり最近の出来事) と考

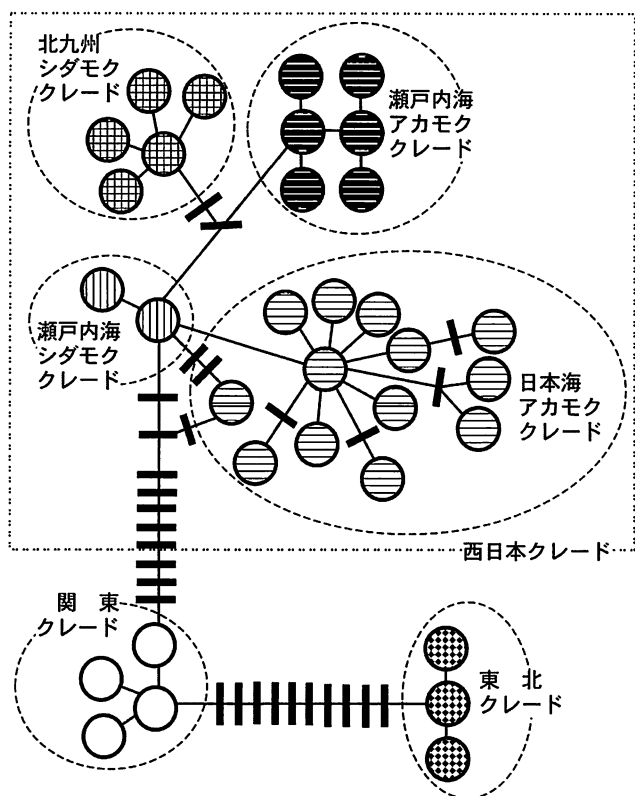


図5 ハプロタイプ間のネットワーク系統樹。マルで示したものが今回見つかったハプロタイプ、棒は仮想上のハプロタイプを示す。各クレードのおおまかな地理的分布を示す。SAMOVA グループとは完全に一致していないことに注意。

えられるし、両集団で見つかるハプロタイプが全く異なっていれば（加えてハプロタイプ間の遺伝的距離が大きければ）二集団は歴史的に分断されてきたと考えられる。このように検出された地理的分化がどのような過程をへて形成されたかを統計的に判断するのが NCA の特徴である。

NCA 自体は系統地理に限った解析方法ではなく、分子系統樹にみられる系統関係と他の形質状態の関係の相関を検証する方法である。近年開発された解析ソフト Geodis (Posada *et al.* 2000) により、系統地理的解析に頻繁に使われるようになった。NCA は次の 2 つの手順で行なわれる；まずネットワーク系統樹に対し Nesting と呼ばれる階層化を行う（図 6）。これは各ハプロタイプを 0-step クレードとし、近縁なハプロタイプ同士を一つの 1-step クレードにまとめ、近縁な 1-step クレードを一つの 2-step クレードにまとめ、というふうネットワークを階層化していく作業である（これによりハプロタイプ間の系統関係をテキストとして示せる）；次に Nesting の結果をもとに、ハプロタイプの地理的分布情報を記載（どのクレードにどの集団がどれくらい含まれているかという形式）していく作業を行う。二つ目の手順にはサンプリングサイト間の地理的な距離の計算も必要となる。

日本沿岸のアカモク・シダモク集団で NCA を行なうといくつかの有意な系統地理的推定が示される（表 1）。最も顕著なものが東北、関東、そして西日本の 3 クレードの間の分断

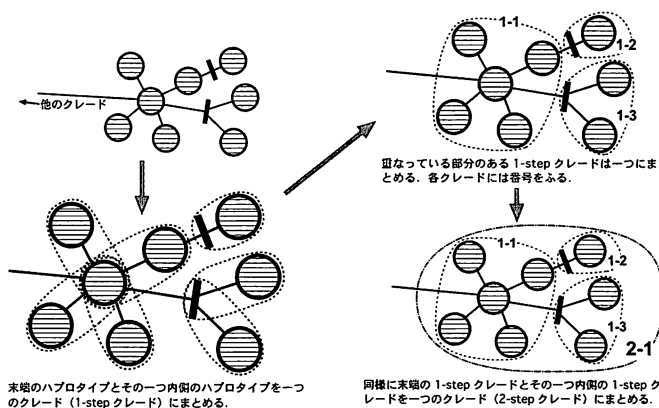


図 6 Nesting の作業手順。ネットワーク全体が一つにクレードに含まれるまで、この図に示す手順を繰り返した後に、系統関係をテキストで表すために各クレードに階層に準じた名前をつける（1-step クレードなら 1-1, 1-2, 1-3, 2-step なら 2-1, 2-2 など）。

である。k=3 のときの SAMOVA グループとネットワーク上で長い枝で分かれている 3 クレードそれぞれの分布域はほぼ一致している。これは歴史的に分断されてきた集団の間みられる特徴である。日本海のアカモクと瀬戸内海のシダモクを含むクレードと瀬戸内海のアカモク集団に相当するクレードには分布域の拡大が示唆された。西日本グループ全体に相当するクレードには遺伝子流動の制限が示唆された。

ここまでの結果から日本沿岸のアカモク・シダモク集団について以下のような考察ができる。まずアカモクとシダモクの関係であるが、今回の結果からは明らかに西日本のアカモクは東北や関東地方のアカモクよりはシダモクの方に遺伝的に近い。西日本グループ内をみるとアカモク集団とシダモク集団の間には明らかにハプロタイプ頻度の違いがみられるが、NCA ではこのような遺伝的分化は長い間隔離されてきた結果というよりは最近の遺伝的流動の制限が原因であることが示唆されている。他方関東・東北地方のアカモク集団とは形こそ似ているものの歴史的に遺伝的交流がなかったようである。ただ、形態的には西日本、関東、東北のアカモクを区別することは難しく、これらを別種とみなすことは困難である。これらの結果からはアカモクとシダモクは同種であることが示唆される。また日本海沿岸のアカモク集団、瀬戸内海のアカモク集団などに分布域の拡大が示唆されたことは最終氷期以降の沿岸環境の変化から説明できる。日本海は寒冷化と低塩分化で、また瀬戸内海は陸化していて、最終氷期の間（とくに 18,000–20,000 年前の極寒期）は海藻が生育するには適していなかったと推定されている。いずれの地域も最終氷期以降（日本海はおよそ 8,000 年前の対馬暖流の流入；大場 1983, 瀬戸内海は 13,000 年前後からの海水の流入；八島 1994）に、現在のような環境になったと言われているが、NCA で検出された分布域の拡大はこのような新しい生育地の出現と対応づけることが可能である。瀬戸内海の集団についてははっきりしないが、日本海の集団は東シナ海沿岸に分布している集団が分布を拡大したものと考えられる。

最後に今回見つかったような日本沿岸の遺伝的多様性がど

表1 Nested Clade Analysisの結果

クレード ¹	分布域	推定されたイベント
全体	日本全体	過去の分断
西日本	日本海と瀬戸内海	制限された遺伝子流動
日本海アカモク+瀬戸内海シダモク	日本海 (アカモクのみ) と瀬戸内海 (シダモクのみ)	分布域の拡大
瀬戸内海アカモク	瀬戸内海 (アカモクのみ)	分布域の拡大
関東	関東・東海と北海道函館	過去の分断
東北	東北太平洋岸	制限された遺伝子流動

¹ 図5のクレード。

の時代に生まれたものかを考察したい。前述のようにミトコンドリアゲノムは組み換えがなく、また今回の場合はDNAの塩基配列を決定しているため、*cox3* 遺伝子の進化速度が分かればそれぞれのクレードの分岐した時代を推定できる。残念ながら *cox3* の進化速度は不明であるが、Hoarau *et al.* (2007) が *Fucus serratus* でミトコンドリアゲノムのスペーサー領域の分子進化速度 (100 万年あたり 2–3.4%) を算出しているので、多少不正確さは承知の上でその値からそれぞれのグループの分岐年代 (Time to Most Recent Common Ancestor; TMRCA) を求めてみた。計算には Beast v1.4 (Drummond & Rambaut 2003) を用いた。なお詳細は省かせてもらうが、この Beast を用いることで分岐年代だけでなく、対象集団の集団サイズの歴史の変動を推定することも可能である。表2が分岐年代の推定結果をまとめたものである。関東グループや東北グループのような遺伝的変異の少ないグループでも、分岐時代は 12 万年前後であり、時代としては最終間氷期の時代に相当した。また多様性の高い西日本グループは 37 万年前、アカモク・シダモク全体にいたっては約 100 万年前という値が出ている。この結果を信じるなら、最終氷期が日本沿岸のアカモク・シダモク集団に与えた影響は、少なくとも遺伝的多様性を減少させるような強力なものではなかったと推定される。また各グループの多様化が最終氷期以前であることから、主要3グループ (クレードともいえる) の分断は、少なくとも最終間氷期から続いていることも示唆された。

以上のように日本沿岸におけるアカモクの遺伝的構造と系統地理について、日本藻類学会第31回大会ワークショップでの発表をもとに一部改変した内容を本稿では紹介した。ミトコンドリアマーカによるDNA塩基配列の変異解析は、系統地理的解析に向いており、分岐年代や集団サイズの歴史的变化の解析に盛んに用いられている。一方で例えば西日本グループ内部での遺伝子流動がどのようになっているかを明らかにするためには、より分解能の高いDNAマーカー (マイクロサテライトのような核ゲノムの共優性マーカー) を用いる

表2 各クレードの分岐時代推定

クレード ¹	分岐年代 (100 万年)	95% lower-upper confidence limit	Effective sample size
全体	0.986	0.626–1.39	47210
関東	0.136	0.062–0.230	12000
東北	0.118	0.050–0.197	11020
西日本	0.378	0.207–0.583	24940
瀬戸内海アカモク	0.141	0.057–0.214	7133
北九州シダモク	0.122	0.065–0.182	5257
日本海アカモク ²	0.171	0.093–0.256	8932

¹ 図5のクレード。² 瀬戸内海シダモクはのぞく。

必要があり、今後の課題といえる。

引用文献

- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography. The history and formation of species.* Harvard University Press. Cambridge. Massachusetts. London.
- Drummond, A. J. & Rambaut, A. 2003. BEAST, v1.0. <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/beast>.
- Dupanloup, I., Schneider, S. & Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.* 11: 2571–2581.
- 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.* (in press).
- Knowles, L. L. & Maddison, W. P. 2002. Statistical phylogeography. *Mol. Ecol.* 11: 2623–2635.
- 奥田武雄 1977. シダモクの雌雄性における新たな性質および日本での分布. *藻類* 25: 265–269.
- 大場忠道 1983. 最終氷期以降の日本海古環境. *月刊地球* 5: 37–46.
- Posada, D., Crandall, K. A. & Templeton, A. R. 2000. GEODIS: a program for cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Mol. Ecol.* 9: 487–488.
- 沢田武男 1955. シダモクに関する二三観察. *九大農芸誌* 15: 71–76.
- Stieger, V., Horiguch, T., Yoshida, T., Coleman, A. W. & Masuda, M. 2003. Phylogenetic relationships within the genus *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae), inferred from ITS-2 nrDNA, with an emphasis on the taxonomic subdivision of the genus. *Phycol. Res.* 51: 1–10.
- Templeton, A. R. 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Mol. Ecol.* 13: 789–809.
- Templeton, A. R., Routman, E. & Phillips, C. A. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140: 767–782.
- 八島邦男 1994. 瀬戸内海の高釜地形に関する研究. *水路部研究報告* 30: 237–327.
- Yoshida, T. 1983. Japanese species of *Sargassum* subgenus *Bactrophyucus* (Phaeophyceae, Fucales). *Journ. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. V (Botany)* 13: 99–246.

(京都大学)