

長井 敏：日本沿岸域におけるラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* の個体群構造の解明

近年、日本沿岸のみならず世界各地で有害・有毒なプランクトンを原因とする赤潮や貝類等の毒化が顕著に増加し、水産業と公衆衛生上の甚大な被害を及ぼしている。有害・有毒プランクトンの分布拡大経路については、船舶のバラスト水や水産種苗の移植等を介した海外からの移入などが推測されているが、現在のところ不明である。現時点において、同一種内における異なる地域個体群間の遺伝的類縁関係を明らかにし、新たな海域への移入等を科学的に知る方法は、顕微鏡を使った形態学的手法では達成不能であり、マイクロサテライトなどの高度多型分子マーカーを用いた集団遺伝学的解析が最も有効と考えられる。しかし、これまで植物プランクトンにおいて種内の遺伝的分化を解析し、それらの情報に基づいた地域個体群間の移動・交流を証明した学術報告はほとんどみられない。ワークショップでのタイトルは、「有害・有毒プランクトンの個体群構造の解明とそのグローバル化に及ぼす自然・人為的要因の影響について」であるが、複数の種についての研究結果を述べるスペースが無いので、本稿では、赤潮生物の中で最大級の分裂速度を示す *Heterosigma akashiwo* について (図 1)、多型分子マーカーの開発を行い、これを用いて日本沿岸各地に分布する個体群の遺伝的構造と類縁関係について解析した研究結果を取り上げ、本種の赤潮状態の海水中では、遺伝子レベルで個体群構造を見るとどのような状態なのか、単調あるいは複雑か、などの疑問について、これまでの研究によって得られた成果をもとに考察したい。

本研究の対象種である有害ラフィド藻 *H. akashiwo* は、両半球の主に温帯域を中心として世界の沿岸域に広く分布する。日本沿岸においても、本種の赤潮発生により、タイ・ハマチなどの天然・養殖の魚が大量に死滅し、九州および瀬戸内海の西日本を中心に、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きた。本種の栄養細胞は、1–30°C、2–<50 PSU の極めて広い範囲において水温・塩分耐性を示す (Konovalova 1995, Tomas 1978, Yamochi 1989)。有性生殖の報告がなく、他種に比べ著しく高い分裂速度 (2.0–5.0 divisions day⁻¹) を示

す (Honjo & Tabata 1985)。また、本種は耐久性のあるシストを形成し、海底泥表層に高密度で存在するため、これらが次期ブルームのシードポピュレーションの役割を果たす (Imai *et al.* 1993, Itakura *et al.* 1996)。このような本種の生理・生態学的特徴が分布のグローバル化を可能にした要因と推察する。

マイクロサテライト多型解析

DNA は G, A, T, C の 4 つの塩基配列により遺伝情報を伝える巨大分子である。例えば人の細胞には、30 億程度の塩基配列を含む DNA がある。この配列の中には多くの反復配列が含まれ、1 塩基から 6 塩基までの長さのモチーフが連続して繰り返されている部分をマイクロサテライトと呼んでいる。このモチーフの反復数には高度の多型があり、近年、個体群生態学、集団遺伝学、人の病気の遺伝子診断などに大いに利用されるに至っている。

最近、筆者らは、*H. akashiwo* のマイクロサテライト (以下、MS) マーカーの開発を行い、高度多型を有する 13 個のマーカー作成に成功した (Nagai *et al.* 2006)。まず、日本沿岸 6 地点 (愛知県三河湾 (Aichi)、三重県英虞湾 (Mie)、兵庫県播磨灘 (Hyogo)、広島県広島湾 (Hiro)、広島県廿日市瀬戸内海区水産研究所地先 (Ohno)、大分県高田湾 (Oita)) から採集した海水および底泥サンプルから、各地点 27–48 株のクローン培養株を確立した (合計 248 株) (図 2)。なお、採集した海水は、全て本種による褐色の着色が見られ赤潮状態であった (>5,000

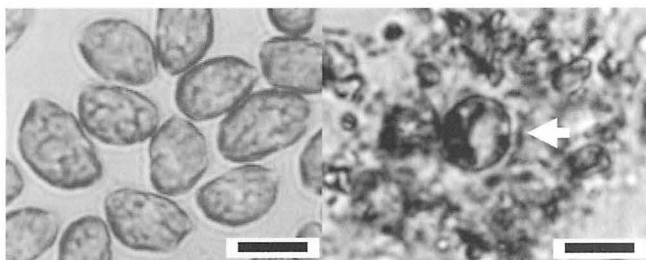


図 1 有害ラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* の光学顕微鏡写真 (左、栄養細胞; 右、シスト; スケールバー = 10 μm)

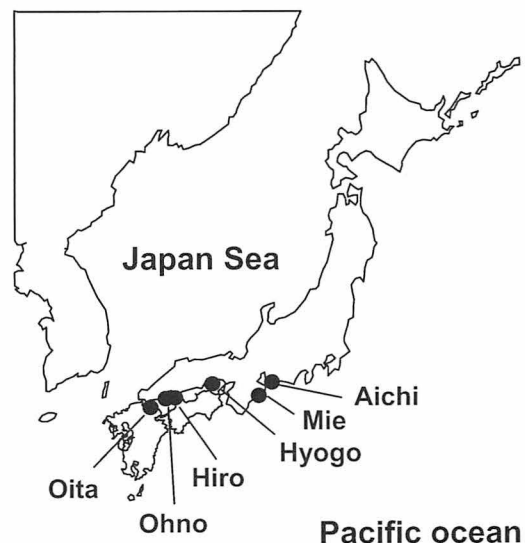


図 2 *Heterosigma akashiwo* を含む海水および海底泥のサンプリング地点

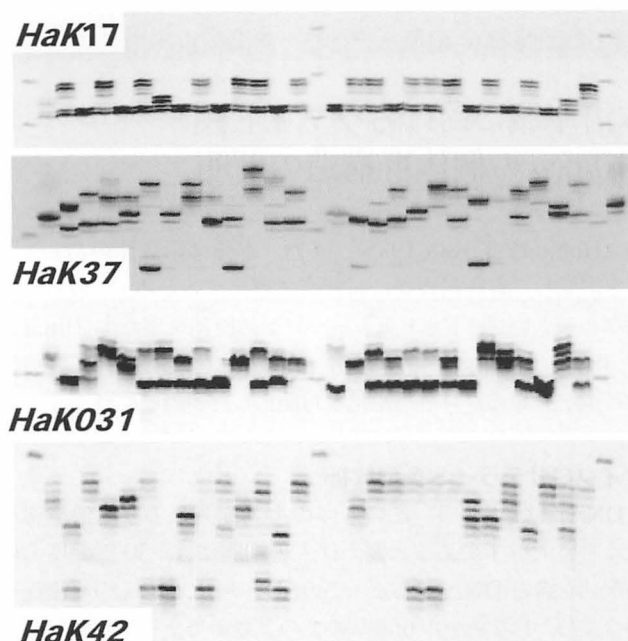


図3 マイクロサテライトマーカーにより増幅したPCR産物のゲル式シーケンサーによる電気泳動像。Gene-Scan 3000 (Corbett Robotics, Sydney, Australia) を用いて6% Long Ranger sequencing gel (Cambrex Bio Science, ME, USA) で電気泳動を行い、サイズマーカー (GeneScan-350, Applied Biosystems) から、フラグメント解析ソフト (1Dscan EX ver. 3.1) を用いてバンドサイズを決定した。標準図中の数字は、各遺伝子座の名前(マイクロサテライトマーカーの名前)を示す。広島湾から分離した培養株のDNAを用いた。

cells ml⁻¹)。培養株は改変 f/2 培地 (Nagai *et al.* 2004) を用いて、温度 25°C、光強度 100 μmol photons m⁻² s⁻¹、明暗周期 12hL : 12hD の光条件下で対数増殖後期まで培養し、集藻した後 -30°C で凍結保存した。DNA 抽出は CTAB 法 (Lian *et al.* 2001) を用いて行い、各株ごとに抽出した。

開発した 13 個の MS マーカーのうち、比較的 PCR 増幅の良好であった 9 個のプライマーペアを用いて、各株の DNA から PCR 増幅を試みた。各 PCR 産物を、Gene-Scan 3000 (Corbett Robotics, Sydney, Australia) を用いて 6% Long Ranger sequencing gel (Cambrex Bio Science, ME, USA) で電気泳動を行い、サイズマーカー (GeneScan-350, Applied Biosystems) から、フラグメント解析ソフト 1Dscan EX ver. 3.1 を用いてバンドサイズを決定した。各遺伝子座の対立遺伝子出

現頻度、ヘテロ接合度、ペア個体群間の遺伝距離、集団分化などの集団遺伝学的なパラメータについて、Arlequin (Excoffier *et al.* 2005), FSTAT (Goudet 1995), GENECLASS (Piry *et al.* 2004), TFPGA (Miller 1997), STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000) を用いて解析した。以上より、日本沿岸域に分布する *H. akashiwo* 個体群の遺伝的構造、集団分化及び遺伝子流動の程度について推定した。

各個体群において 9 個のプライマーペアを用いた PCR で増幅が認められた株の割合は 95–100% であり、いずれのプライマーペアも多型解析を行うために十分な PCR 増幅が見られた。シーケンシング上の各バンドは 1 ないし 2 本であり、従って本種の栄養細胞の核相は 2N であり、“Diploid” であることが判明した (図 3)。各遺伝子座の対立遺伝子数は 6–34 (15.9 ± 9.6, 平均 ± 標準偏差) の範囲にあり、座により大きく異なった。遺伝子座 (マーカー) ごとの Fst は 0.086–0.195 の範囲にあり、AMOVA による検定の結果、いずれも有意な集団分化を示した。1 個体群 1 遺伝子座当たりの平均対立遺伝子数は 4.6 (± 2.5)–9.1 (± 5.7)、同様にヘテロ接合度の観察値及び期待値はそれぞれ 0.573–0.737 (0.65 ± 0.05), 0.499–0.701 (0.62 ± 0.07) の範囲にあり (表 1)、広島湾 (Hiro) と播磨灘 (Hyogo) の個体群以外はハーディーワインバークの平衡から有意なずれ ($P < 0.05$) を示した。播磨灘の個体群では、 $t\%$ (他殖率) (Weir 1996) が 100% に近く、このことは個体間で活発な任意交配が行われていることを示唆し、有性生殖の観察例はないが、未知の有性生殖過程が存在する可能性も否定できない。個体群特異的対立遺伝子数は 0.08–0.37/ 個体の範囲にあり、播磨灘で最小、広島湾で最大値を示した。英虞湾 (Mie) 及び三河湾 (Aichi) における対立遺伝子数はそれぞれ 9.1/ 遺伝子座、4.6/ 遺伝子座であり、遺伝的多様性は英虞湾で他より多め、三河湾で他より著しく少ない値を示した。特に 2 遺伝子座における対立遺伝子数は、英虞湾及び三河湾ではそれぞれ 16 個と 3 個 (*HaK3*), 18 個と 2 個 (*HaK37*) であり (図 4)、遺伝子型についても英虞湾の個体群は 48 個体全てが異なる型を示したのに対して、三河湾の個体群では約 35% の割合で他と同じ遺伝子型を持つ個体が認められた (表 2)。従って、英虞湾の個体群は遺伝的多様性が極めて高く、逆に三河湾では多様性が他より極端に低く、創始者効果か過去に何らかの要因によりボトルネック効果が働いたことが示唆された。

表 1 *Heterosigma akashiwo* 個体群のマイクロサテライトマーカーによる多型解析の結果

Population	Sampling		N	A	Obs Hz	Exp Hz	t (%)	PA	Fis	P value
	year	Source								
Oita	2006	seawater*	48	8.6	0.737	0.604	156.1	0.15	-0.219	0.0009**
Hiro	2005	sediment	27	7.3	0.634	0.701	82.6	0.37	0.095	0.0033
Ohno	2006	seawater*	42	8.3	0.662	0.589	128.3	0.21	-0.124	0.0009**
Hyogo	2005	seawater*	37	7.9	0.651	0.661	97.0	0.08	0.015	0.3139
Mie	2005	seawater*	48	9.1	0.573	0.638	81.3	0.27	0.103	0.0009**
Aichi	2006	seawater*	48	4.6	0.620	0.499	163.9	0.10	-0.242	0.0009**

*、赤潮海水 (>5,000 cells ml⁻¹); N, 分析培養株数; A, 1 遺伝子座当たりの対立遺伝子数; Obs Hz; ヘテロ接合度の観察値; Exp Hz, ヘテロ接合度の期待値; t (%), 他殖率 ((1-Fis)/(1+Fis)×100); PA, 1 株当たりの個体群特異的な対立遺伝子数; Fis, 固有指数; **, ハーディーワインバーク平衡からの統計的に有意なずれ ($P < 0.05$)

	Oita	Hiro	Ohno	Hyogo	Mie	Aichi
186		11.1				
187	34.1	51.9	60.0	40.3	33.3	68.8
190			1.3			
191	2.3		2.5			
193	3.4		5.0	4.8	21.9	7.3
195	3.4	9.3	2.5	1.6		
197	1.1		1.3	3.2	4.2	
199	1.1		3.8	1.6	4.2	
201	4.5			3.2		
202	2.3					
203	12.5	14.8	2.5	6.5	6.3	
204			1.3		1.0	
205	2.3		5.0	3.2	1.0	
206			1.3	3.2		
207	2.3				1.0	
209	1.1	1.9				
211			1.3			
213	3.4	1.9	2.5	3.2	3.1	
215	1.1			16.1	2.1	
217	4.5	3.7				
218		1.9				
219				3.2		24.0
220	2.3		1.3	3.2		
223	1.1		1.3			
224	5.7			1.6		
225			1.3		1.0	
226				1.6		
227	1.1	1.9	1.3	3.2	10.4	
229	5.7	1.9	3.8		3.1	
230					4.2	
235	4.5					
237			1.3			
269					2.1	
270					1.0	

	Oita	Hiro	Ohno	Hyogo	Mie	Aichi
190		1.9			9.4	
200	7.8		3.6	8.1	1.0	1.0
201		3.8			5.2	
202	32.2		3.6	35.1	19.8	
203		15.4		1.4	2.1	
204	53.3	48.1	79.8	37.8	16.7	99.0
205		7.7		2.7	3.1	
206		7.7	4.8	6.8	6.3	
207		9.6	4.8			
208	1.1		2.4	2.7	11.5	
209					5.2	
210	3.3	5.8		2.7	7.3	
211					1.0	
212			1.2		6.3	
213					1.0	
214	2.2				1.0	
215					1.0	
216				1.4	1.0	
218				1.4	1.0	

図4 *Heterosigma akashiwo* の各対立遺伝子の出現頻度（上、遺伝子座 *HaK3*；下、遺伝子座 *HaK37*）。三河湾の個体群が持つ対立遺伝子を灰色のセルで示す。

集団分化

集団分化について、Fisher's exact test (Miller 1997) と AMOVA による pairwise *Fst* の有意差検定 (Excoffier *et al.* 2005) に加え Bonferroni correction (Rice 1989) による統計学的解析を行ったところ、いずれの方法でも全てのペア個体群間の集団分化は

表2 多型解析により検出された遺伝子型の重複について

Population	N	genotype	overlap
Oita	46	39	15.2
Hiro	27	27	0.0
Ohno	42	35	16.7
Hyogo	37	37	0.0
Mie	48	48	0.0
Aichi	48	31	35.4

N, 分析した株数；genotype, 検出された遺伝子型の数；overlap, 分析株数に対して遺伝子型の重複が見られた株数の割合（%）。広島湾、播磨灘および英虞湾のサンプルでは、同じ遺伝子型を示す株がなく、少量の赤潮海水中にさえも遺伝的に著しく多様な個体が混在する様子を示す。

有意で著しく ($P < 0.001$), Assignment test (Goudet 1995) の結果も各個体群の 69.0 ~ 94.6% の個体で、その起源が分離された海域の個体群にあることを示した。一方で、各個体群には、近隣の個体群起源と推定される個体も最大 19.0% の割合で検出された。*H. akashiwo* の個体群構造をさらに詳しく知るため、地理的情報なしに Genetic admixture analysis (Pritchard *et al.* 2000) を行ったところ、今回の全 248 個体は、13 個のクラスターに区分され、各海域の個体群が遺伝的に異なる複数のクラスターの混成により構成されていることが示唆された。本種は分裂速度が高く ($2.0\text{--}5.0$ divisions day^{-1}), パッチ状に赤潮を形成することから、多型解析に及ぼすサンプリングの偏りの影響が懸念されたが、遺伝距離と地理的距離の関係 (Isolation by Distance (IBD)) を調べると、1 ペア個体群を除けば有意な相関関係 ($r=0.56$, $P < 0.02$, Mantel test) (Mantel 1967) が見られたことから (図 5), その偏りは基本的に個体群間の遺伝的な変異量を大きく上回るものではないことが示唆された。

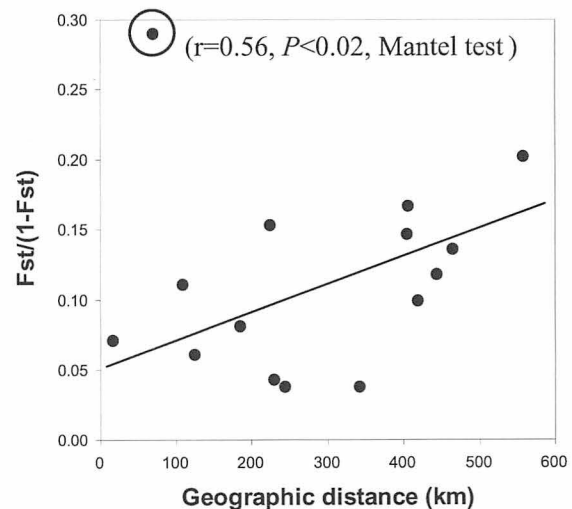


図5 *Heterosigma akashiwo* 個体群の遺伝距離と地理的距離の関係。Isolation by distance ($F_{st}/(1-F_{st})$ vs. geographic distance). 各プロットは各ペア個体群の値を示す。丸印で囲んだプロット (英虞湾と三河湾のデータ) の値を除くと、遺伝距離と地理的距離の関係は正の有意な相関を示す ($r=0.56$, $P < 0.02$, Mantel test) ことから、本種個体群は基本的に IBD の関係が成立することが示唆された。

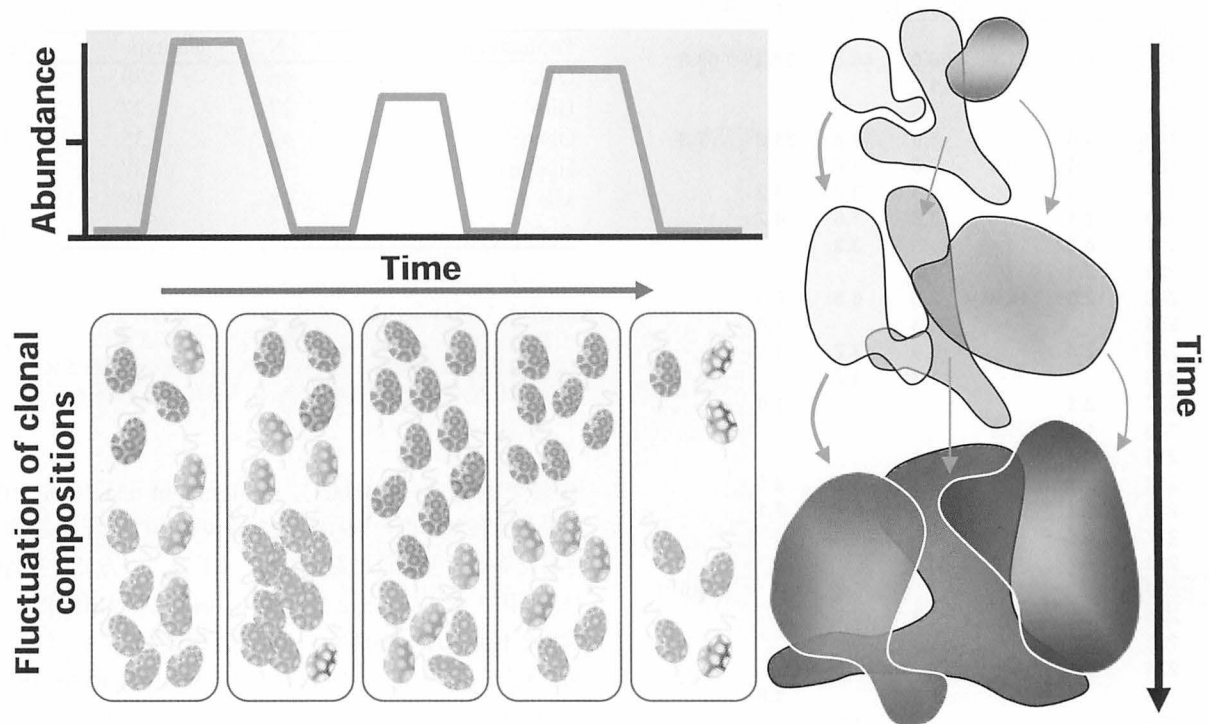


図6 *Heterosigma akashiwo* 赤潮の発達過程における個体群構造の概念図

赤潮海中における個体群構造

今回の *H. akashiwo* 個体群の多型解析を通して、本種の赤潮形成時の個体群構造について考察してみると図6のようになる。マイクロサテライトによる多型解析を行う前までは、*H. akashiwo* のような分裂速度の著しく大きい種では、赤潮形成時に同じ遺伝子型を持つ個体が増殖し、単調な個体群構造を形成すると考えていた。しかし予想に反して、*H. akashiwo* は数 mL のようなごく少量の海中にも複数の遺伝子型を持つ個体が混在し、赤潮の発達過程において、無性的な二分分裂で増殖することにより、各遺伝子型を持つ個体の細胞密度やその出現密度の割合は、時々刻々と変化していると推察される。このような変化は、ウイルス感染性からも示唆されている。海水中や海底泥中には *H. akashiwo* に特異的に感染し死滅させる藻類ウイルスが存在する (Tarutani *et al.* 2000, Tomaru *et al.* 2004)。彼らは、広島湾において数年にわたり、赤潮の発生・発達・消滅までの各過程で分離した *H. akashiwo* クローン培養株と複数のウイルス株との感染性を詳しく調べた結果、ウイルス感染性から見て、*H. akashiwo* に少なくとも6つの phenotype が存在し、各ウイルスタイプの存在密度により、各 phenotype の出現密度と割合が刻々と変化することを報告している。これらは、赤潮海中の個体群構造の変遷を示す先駆的研究例と言える。おそらく、マイクロサテライト多型解析により、*H. akashiwo* の赤潮の発達過程において、各過程に出現した個体群の遺伝子型について詳細に調べると、各遺伝子型の出現頻度と割合が刻々と変化する結果が得られるものと予想される。

マイクロサテライト領域のようなノンコードで単純な DNA 反復配列の進化については、DNA 複製時のスリップ (複製ミス) (Levinson & Gutman 1987, Wolff *et al.* 1991)、減数分裂時の不等交差 (Drake *et al.* 1983) や突然変異による塩基置換 (Harding *et al.* 1992, Tautz & Renz 1984) が主たる原因と言われている。植物プランクトンの複数の種において、卵配偶や同形・異形配偶による雌雄異株 (同株) 接合が知られており、活発な有性生殖に伴う頻繁な遺伝子組み換えにより、遺伝的多様性が促進あるいは維持されてきたと考えられる。一方、*H. akashiwo* では有性生殖の報告がないものの、他種に比べ著しく高い分裂速度を示すことから、主に無性的二分分裂時における DNA の複製ミスにより多様性を維持している可能性も考えられる。高等植物などでは、生活史様式や世代交代時間の違いにより、個体群構造 (遺伝子多様性、遺伝子流動の程度など) が大きく異なることは、既によく知られた事実である。

以上の研究により、本種の生態及び個体群構造について、幾つかの新たな知見が得られた。1) 本種の栄養細胞は2倍体である、2) 活発な任意交配 (有性生殖) が示唆される、3) 分裂速度の速い本種の赤潮海水においても、個体群は著しい遺伝的多様性を示す、4) 海域間で著しい集団分化を示し、遺伝子流動が強く制限されている、5) IBD の関係が基本的には成立している。一方で、以下のような疑問も新たに生じた。1) 有性生殖をしないならば、この高い遺伝的多様性はどの様に保持されるのか? 2) 何故このような多様性を生み出す必要があるのか? その利点は何か? 今後、三河湾において、水

平的・経時的に詳細なサンプリングを行うことにより、赤潮発達過程における遺伝的構造の変遷などについて、さらに明らかにしていきたい。

今後の課題・展望

以上述べた *H. akashiwo* のように、マイクロサテライト領域の変異の程度が大きく、各海域に出現する個体群の集団分化が著しく進行し細分化されているような種については、地方個体群間の遺伝的類縁性を反映する、もう少し進化速度の遅い分子マーカーの開発も必要になると思われる。現在、環境省の地球環境研究推進費や文部科学省の科研費基盤研究費の課題として、海域間輸送中の水産種苗や活魚輸送トラックの海水中に、どの程度、有害・有毒プランクトンが含まれているのか、その検出・定量を試みており、これら有害種の分布拡大に及ぼす人間活動の影響を明らかにしていく予定である。また、アメリカ合衆国、フランス、ドイツ、ロシア、イギリス、中国、韓国など複数の国の研究者と個体群の遺伝的類縁性と分化に関する共同研究を行っており、今後、全地球規模スケールで、有害・有毒プランクトンの分布拡大に及ぼす自然現象・人間活動の影響を評価したい。

引用文献

- Drake, J. W., Glickman, B. W. & Ripley, L. S. 1983. Updating the theory of mutation. *Am. Sci.* 71: 621–630.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. 2005. Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1: 47–50.
- Goudet, J. 1995. FSTAT, A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from www.unil.ch/izea/software/fstat.html Updated from Goudet.
- Harding, R. M., Boyce, A. J. & Clegg, J.B. 1992. The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. *Genetics* 132: 847–859.
- Honjo, T. & Tabata, K. 1985. Growth dynamics of *Olithodiscus luteus* in outdoor tanks with flowing coastal water and in small vessels, *Limnol. Oceanogr.* 30: 653–664.
- Imai, I., Itakura, S. & Itoh, K. 1993. Cysts of the red tide flagellate *Heterosigma akashiwo*, Raphidophyceae, found in bottom sediments of northern Hiroshima Bay, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 1669–1673.
- Itakura, S., Nagasaki, K., Yamaguchi, M. & Imai, I. 1996. Cyst formation in the red tide flagellate *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *J. Plankton Res.* 18: 1975–1979.
- Kononova, G. 1995. The dominant and potentially dangerous species of phytoplankton in the coastal waters of East Kamchatka. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard-LeDenn, E., Gentien, P. & Marcaillou-Lebaut, C. (eds.) *Harmful Algal Blooms*. pp. 169–174. Lavoisier, Paris.
- Lian, C., Miwa, M. & Hogetsu, T. 2001. Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. *Heredity* 87: 88–98.
- Levinson, G. & Gutman, G. A. 1987. Slipped-strand miss-pairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 4: 203–221.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209–220.
- Miller, M. P. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- Nagai, S., Matsuyama, Y., Oh, S. J. & Itakura, S. 2004. Effect of nutrients and temperature on encystment of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Plankton Biol. Ecol.* 51: 103–109.
- Nagai, S., Yamaguchi, S., Lian, C. L., Matsuyama, Y. & Itakura, S. 2006. Development of microsatellite markers in the noxious red tide-causing algae *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Mol. Ecol. Notes* 6: 477–479.
- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J. M., Paetkau, D., Baudouin, L. & Estoup, A. 2004. GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *J. Hered.* 95: 536–539.
- Pritchard, J. K., Stephan, M. & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical data. *Evolution* 43: 223–225.
- Tarutani, K., Nagasaki, K. & Yamaguchi, M. 2000. Viral impacts on total abundance and clonal composition of the harmful bloom-forming phytoplankton *Heterosigma akashiwo*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4916–4920.
- Tauz, D. & Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids. Res.* 12: 4127–4138.
- Tomaru, T., Tarutani, K., Yamaguchi, M. & Nagasaki, K. 2004. Quantitative and qualitative impacts of viral infection on a *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) bloom in Hiroshima Bay, Japan. *Aquat. Microb. Ecol.* 34: 227–238.
- Tomas, C. R. 1978. *Olithodiscus luteus* (Chrysophyceae) I. Effects of salinity and temperature on growth, motility and survival. *J. Phycol.* 14: 309–313.
- Weir, B. S. 1996. Methods for discrete population genetic data. In: *Genetic Data Analysis II*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Wolff, R. K., Plaek, R., Jeffreys, A. J. R. & White, R. 1991. Unequal crossing over between homologous chromosomes is not the major mechanism involved in the generation of new alleles at VNTR loci. *Genomics* 5: 382–384.
- Yamochi, S. 1989. Mechanisms for outbreak of *Heterosigma akashiwo* red tide on Osaka Bay, Japan. In: Okaichi, T., Anderson, D. M. & Nemoto, T. (eds.) *Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*. pp. 253–256. Elsevier, Amsterdam.

(独立行政法人水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所)