

異なる塩濃度環境に生育するシオグサ類の遺伝的多様度と 分布パターンの比較

丹羽一夫¹・早川雄一郎¹・神谷充伸^{2*}

¹ 福井県立大学・生物資源学研究科 (〒917-0003 福井県小浜市学園町 1-1)

² 福井県立大学・海洋生物資源学部 (〒917-0003 福井県小浜市学園町 1-1)

Kazuo Niwa¹, Yu-ichiro Hayakawa¹ and Mitsunobu Kamiya^{2*}: Comparison of genetic variation and distribution pattern among *Cladophora* species growing different salinity regimes. Jpn. J. Phycol. (Sôrui) 61: 74-80, July 10, 2013

Because there seems to be less geographic barrier in marine habitats than in freshwater environments, this difference is expected to affect the dispersal range and the degree of gene flow and diversity in aquatic organisms. In order to verify this hypothesis, we analyzed intraspecific genetic variations of three species of *Cladophora* collected from marine, brackish and freshwater habitats. In *C. opaca*, 13 ribotypes (ribosomal haplotypes) and five heterozygous sequences were detected from marine and brackish regions: only one ribotype was widely distributed from Hokkaido to the western part of Honshu, whereas all the other ribotypes were endemic to the local areas. In contrast, nine ribotypes and six heterozygous sequences were found in *C. albida* collected from marine and brackish habitats, four of which were distributed broadly. Because *C. albida* grows on various substrates including macroalgae and appears for a wider range of seasons than *C. opaca*, this ecological property may have contributed to its long-distance dispersal and intrapopulational genetic exchange. *C. glomerata* growing in brackish and freshwater environments indicated more diverse and complicated genetic structures than the above marine species: a total of 15 ribotypes and seven heterozygous sequences were detected and many ribotypes showed a wide range of distribution regardless of habitats. These ribotypes were phylogenetically divided into four clades: there were no heterozygous ribotypes in the two clades, whereas all ribotypes were heterozygous in the other two clades. Because of no haploidic ribotype, the entities belonging to the latter two clades may not perform meiosis and reproduce by apomixis. Despite of the close relationship, the genetic diversity and dispersal range obviously differed among the three *Cladophora* species, and this may have resulted from the differentiation of ecological and reproductive properties.

Key Index Words: apomixis, biogeography, brackish water, heterozygote, internal transcribed spacer

¹Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Fukui Prefectural University, 1-1 Gakuen-cho, Obama, Fukui, 917-0003 Japan

²Faculty of Marine Bioscience, Fukui Prefectural University, 1-1 Gakuen-cho, Obama, Fukui, 917-0003 Japan

*Author for correspondence: mkamiya@fpu.ac.jp

緒言

海に生育する多くの生物、特に長距離分散に適した胞子や世代（遊走子、プランクトン幼生など）をもつ生物は、物理的な障壁が少ないことから、一般に分布域が広く、個々の集団サイズも大きく、かなりの頻度で集団間の遺伝的交流が起きていると考えられている (Palumbi 1994)。これが異所的種分化の大きな妨げとなっており、実際に海の生物の多様性は陸上のそれと比較して、わずか2%にも満たないといわれる (Briggs 1994)。ところが近年、遺伝情報をもとにした系統学的解析や集団遺伝学的解析が盛んに行われるようになってくると、海産生物は予想以上に遺伝的に多様であることが分かってきた。例えば、ナミノハナ属は現在7種が記載されているが、Payo *et al.* (2013) がフィリピン沿岸25箇所から採集した265個体のナミノハナ類について、EF2, *rbcL*, *cox2-3* 領域を用いて分子系統解析をしたところ、実に21種の隠蔽種が認識されるほど遺伝的に分化していることが明らかになっている。

一方で、河川や湖沼などに代表される淡水環境は海洋環境と比べると閉鎖性が高いため、たとえ近傍であっても集団間の遺伝的な交流は困難で、集団ごとに遺伝的な分化が進

んでいるのではないかと予想されるが、一般的には遺伝的多様度が低く同じ遺伝子型の個体が広域に分布している傾向が見られる。例えば、淡水紅藻のタニウシケノリ *Bangia atropurpurea* (Mertens ex Roth) C. Agardh では、アメリカ五大湖とヨーロッパの集団間では葉緑体 *rbcL* 遺伝子の配列にほとんど違いがみられない (Müller *et al.* 2003)。また、淡水緑藻のマリモ *Aegagropila linnaei* Kützinger では、リボソームITS領域の配列が全く同一の個体が日本、ヨーロッパ、アメリカに生育している (Boedeker *et al.* 2010)。はたして開放系の沿岸環境と閉鎖系の陸水環境という違いが、そこに生育する生物の集団構造や遺伝的交流にどのような影響を及ぼしているのだろうか。

我々は、海水湖・汽水湖・淡水湖で構成されている福井県の三方五湖において、大型藻類の調査を続けてきた。三方五湖全域に広く分布するシオグサ属藻類について1年間かけて調査を行ったところ、リボソームITS領域の解析によって合計12のリボタイプ（リボソームのハプロタイプ）が検出され、6種のシオグサ属藻類が同定された (Hayakawa *et al.* 2012)。この6種は系統的に近縁であるにも関わらず、種によって遺

Table 1. Information about *Cladophora* species analyzed in this study.

Collecting site	Date	salinity ^a	Ribotype (number of specimens collected)		
			<i>C. opaca</i>	<i>C. albida</i>	<i>C. glomerata</i>
Miho Bay, Shimane	23 May 09	sea	-	1(1)	-
Nakaumi, Shimane	23 May 09	brackish	1(1)	-	-
Lake Shinji, Shimane	23 May 09	brackish	-	-	1(4)
Takeno, Hyogo	8 May 12	sea	1(1), 1/5(1), 9/10(1)	-	-
Yura, Sumoto, Hyogo	7 May 12	sea	-	3(2)	-
Tributary of the Kako Riv., Hyogo	6 May 2	fresh	-	-	5/6(2)
Akaguri zaki, Ooi, Fukui	14 Apr. 12	sea	-	2(1), 5(1), 6(1), 2/5/8(1)	-
Saburi Riv., Ooi, Fukui	1 Sep. 09	fresh	-	-	3(5)
Unose, Obama, Fukui	31 Jul. 12	fresh	-	-	5/9(2)
Lake Hiruga, Mihama, Fukui	Apr. 08 - Jan. 11	brackish	1(41)	1(12), 3(9), 4(33), 5(9), 6(6), 1/6(9), 4/6(8), 4/5(11), 5/6(1)	-
Lake Kugushi, Mihama, Fukui	Apr. 08 - Jan. 11	brackish	1(64)	1(4), 3(1), 6(1)	1(104), 2(1)
Lake Suigetsu, Wakasa, Fukui	Apr. 08 - Jan. 11	brackish	-	-	1(331), 2(3)
Lake Suga, Wkasa, Fukui	Apr. 08 - Apr. 09	brackish	-	-	1(7), 2(3)
Lake Mikata, Wakasa, Fukui	Apr. 08 - Apr. 09	brackish	-	-	1(29), 2(7), 3(3)
Shikimi, Wakasa, Fukui	14 Mar. 12	sea	1(2), 2(1), 5(1)	5(2)	-
Yukimatsu, Echizen, Fukui	2 Jun. 12	fresh	-	-	6/9(1), 6/14(1)
Akasumi, Shika, Ishikawa	2 Jun. 12	sea	1(1), 1/8(1)	-	-
Point1, Ganmon, Shika, Ishikawa	24 Mar. 12	fresh	-	-	5/9(2)
Point2, Ganmon, Shika, Ishikawa	24 Mar. 12	sea	3(1)	3(1)	-
Fujinami, Noto, Ishikawa	20 Mar. 12	sea	-	3(2)	-
Tsukumo Bay, Noto, Ishikawa	21 Mar. 12	sea	1(2)	3(1), 9(1)	-
Osyoro Fishing Port, Otaru, Hokkaido	16 Jul. 12	sea	-	1(2)	-
Syukutsu Toyoi, Otaru, Hokkaido	16 Jul. 12	sea	1(1), 6(1)	-	-
Hamamasu Riv., Ishikari, Hokkaido	16 Jul. 12	fresh	-	-	5/6(1)
Nobusya Riv., Mashike, Hokkaido	16 Jul. 12	fresh	-	-	5/6(1), 6/11(1)
Obirashibe Riv., Rumoi, Hokkaido	17 Jul. 12	fresh	-	-	7(2)
Odaira Beach, Rumoi, Hokkaido	17 Jul. 12	brackish	1(2)	-	-
Odaira Dam, Rumoi, Hokkaido	17 Jul. 12	fresh	-	-	7(3)
Nosyappu Cape, Wakkanai, Hokkaido	17 Jul. 12	sea	7(1)	-	-
Esashi Fishing Port, Esashi, Hokkaido	18 Jul. 12	brackish	1(2)	-	-
6gounosawa Riv., Saroma, Hokkaido	19 Jul. 12	fresh	-	-	5/6(1), 5/9(1)
Abashiri Fishing Port, Abashiri, Hokkaido	19 Jul. 12	sea	1(2)	-	-
Point1, Lake Abashiri, Abashiri, Hokkaido	19 Jul. 12	fresh ~ brackish	-	-	7(2)
Point2, Lake Abashiri, Abashiri, Hokkaido	19 Jul. 12	fresh	-	-	7(1), 10/12(1)
Shibetsu Fishing Port, Shibetsu, Hokkaido	20 Jul. 12	sea	1(2)	-	-
Akkeshi Mrine Station, Akkeshi, Hokkaido	21 Jul. 12	sea	1(2)	-	-
Chiyonoura Fishing port, Kushiro, Hokkaido	21 Jul. 12	sea	7(2)	-	-
Lake Akan, Akan, Hokkaido	21 Jul. 12	fresh	-	-	7(1)
Minamisanriku, Miyagi	3 Mar. 12	brackish	-	3(2)	-
Hinuma, Oarai, Ibaraki	5 Aug. 09	fresh ~ brackish	-	-	1(7), 3(5)
Tone Riv., Ibaraki	18 Mar. 10	fresh ~ brackish	-	-	1(12)
Lake Suwa, Suwa, Nagano	11 Jun. 10	fresh	-	-	1(7)
Takao Riv., Hachioji, Tokyo	19 Aug. 12	fresh	-	-	6/11(1)
Enzan, Kosyu, Yamanashi	14 Aug. 12	fresh	-	-	10/15/16(1)
Point1, Kano Riv., Shizuoka	6 Apr. 12	brackish	-	3(3)	-
Point2, Kano Riv., Shizuoka	6 Apr. 12	fresh	-	-	5/9(1), 6/9(1)
Point3, Kano Riv., Shizuoka	6 Apr. 12	fresh	-	-	9/11(1)
Kawatsu Riv., Kawatsu, Shizuoka	10 Apr. 12	fresh	-	-	7(1)
Shimoda MRC, Shimoda, Shizuoka	9 Apr. 12	fresh ~ brackish	-	3(1), 7(2), 1/7(1)	8(3)
Point1, Aono Riv., Shizuoka	9 Apr. 12	brackish	4(2), 4/11(1), 4/13(1), 12(1)	-	-
Point2, Aono Riv., Shizuoka	9 Apr. 12	brackish	-	-	7(2)
Point3, Aono Riv., Shizuoka	9 Apr. 12	fresh	-	3(1)	-
Omaezaki, Shizuoka	24 May 09	sea ~ brackish	-	4(1), 6(1)	-
Omaezaki, Shizuoka	16 Jun. 10	sea ~ brackish	-	3(1), 4(1)	-
Lake Hamana, Shizuoka	22 Mar. 10	fresh	-	-	3(1)
Ooyama, Okinawa	26 Mar. 09	fresh	-	-	4(1)
Manna Riv., Okinawa	30 Mar. 09	fresh	-	-	4(1)
Nago, Okinawa	30 Mar. 09	fresh	-	-	4(1)

^aThe salinity at the collecting time: fresh < 0.4 psu; 0.4psu ≤ brackish < 30 psu; 30 psu ≤ sea.

伝的多様度が大きく異なっていることが明らかになった。そこで本研究は、全く多型が見られなかったツヤナシシオグサ *Cladophora opaca* Sakai, 最も多くのリボタイプが見られたワタシオグサ *C. albida* (Nees) Kützing, および淡水域と汽水域でリボタイプが異なっていたカモジシオグサ *C. glomerata* (L.) Kützing の3種に焦点を当て、生育環境と集団構造の関連性について解明することを目的とした。具体的には、上記3種をより広域から採集してリボタイプを決定し、リボタイプ

の数、遺伝的距離、類縁関係、分布範囲などを種間で比較することにより、生育環境の違いが遺伝的多様性や集団間の遺伝子交流に及ぼす影響について考察を行った。

材料と方法

2008年4月から2012年10月にかけて、全国の50地点においてシオグサ属藻類を採集し (Table 1), 各調査地点で2~5個体ずつを選別してリボソーム ITS 領域の配列を決定した。

DNA 抽出用のサンプルは、付着物を極力取り除いた後、1本の枝からその先端 1cm 程度を切り取り、マイクロチューブに入れて DNA を抽出するまで -30°C で保存した。Hayakawa *et al.* (2012) の方法に準じて、リボソーム遺伝子の ITS 領域 (ITS1–5.8S rDNA–ITS2) を PCR で増幅し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。種の同定は分子系統解析の結果をもとに行った。個体内で複数の配列が検出された場合は TA クローニングによりすべての配列を決定した。Bakker *et al.* (1995a, b), Marks & Cummings (1996) の配列データを加え、BioEdit Sequence Alignment Editor ver. 7.1.11 (Hall 1999) を用いて種ごとにアラインメントデータを作成した。MEGA (Tamura *et al.* 2011) を用いて近隣結合系統樹 (NJ tree) を構築するとともに、1000 回のブートストラップ解析により各枝の信頼性を評価した。加えて、TCS version 1.21 (Clement *et al.* 2000) を用いてハプロタイプネットワーク系統樹を作成した。

結果

ツヤナシシオグサ 計 17 地点から採集した 138 個体について ITS 領域の塩基配列を決定したところ、合計で 13 のリボタイプが検出され、5 パターンのヘテロ接合型 (計 5 個体) が見られた (Table 1, Fig. 1)。リボタイプ間における遺伝的距離は平均 1.24%, 最大 2.67% であった。最も頻繁に見られたリボタイプは type1 で、1 道 4 県の計 13 地点 (計 108 個体) より採集されたのに加え、type1/5, 1/8 という 2 つのヘテロ接合型のリボタイプとしても検出された。type5・7 は 2 地点

から検出され、他のリボタイプは 1 地点からしか検出されなかった。type8・9・10・11・13 はヘテロ接合型のリボタイプとして検出されたが、単独では検出されなかった。ほとんどの個体は沿岸域から採集されたが、type1・4・12・4/11・4/13 が汽水環境から検出された。近隣結合系統樹では 2 つのクレードに分かれ、北海道・日本海クレードのリボタイプは互いに極めて近縁だったが、静岡クレードでは type11・12 と type4・13 の 2 つのサブクレードに分かれた。系統ネットワーク解析により、北海道・日本海クレードのほとんどのリボタイプが type1 から派生したことが明らかになった。

ワタシオグサ 計 15 地点から採集した 132 個体について遺伝子解析した結果、9 つのリボタイプが認識された (Table 1, Fig. 2)。さらに 6 パターンのヘテロ接合型 (計 32 個体) が見られ、そのうちの 30 個体が三方五湖から検出され、残り 2 個体は福井県赤礁崎と静岡県下田で採集された。リボタイプ間における遺伝的距離は平均 0.33%, 最大 0.97% であった。type2・7・8・9 はそれぞれ 1 地点からしか見つからなかったが、それ以外のリボタイプは広範囲から検出された。最も頻繁に見られたリボタイプは type3 で、5 県の 11 地点より計 24 個体が採集された。type8 はヘテロ接合型のリボタイプとしてのみ検出された。多くの個体が沿岸域から採集されたが、type1・3・5・7・1/7 が汽水環境から採集された。近隣結合系統樹では、静岡県下田からのみ採集された type7 が最も初期に分化し、次に type3・9 が分化したという系統関係が得られた。系統ネットワーク解析では、ツヤナシシオグサで示されたような中心的なリボタイプは認められず、分散的に分化

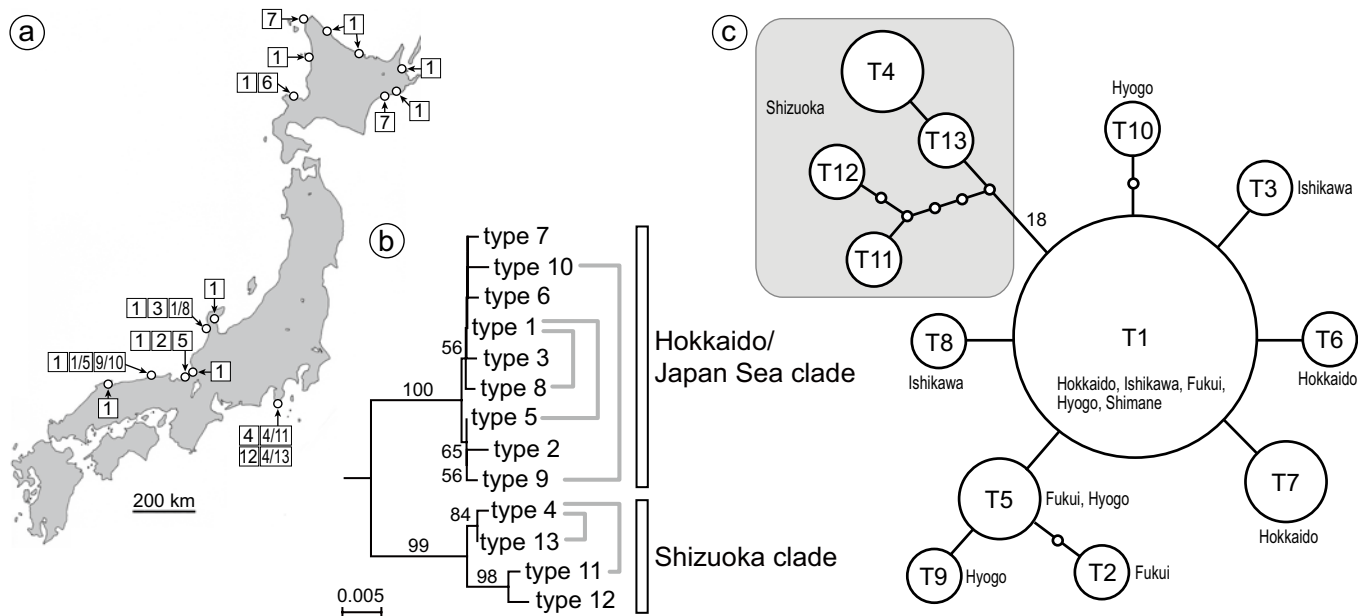


Fig. 1. Genetic diversity of *Cladophora opaca* based on the ribosomal ITS data. (a) The distribution of the 13 ribotypes. (b) NJ tree of the 13 ribotypes. The bootstrap value ($>50\%$) is given on each branch. The combinations of heterozygous ribotypes are connected by gray lines. (c) Network of the 13 ribotypes. The size of each large circle is proportional to the number of specimens examined. Line indicates one mutation step between ribotypes, and small open circles between lines indicate missing intermediate. The large number of substitutions is shown on the line.

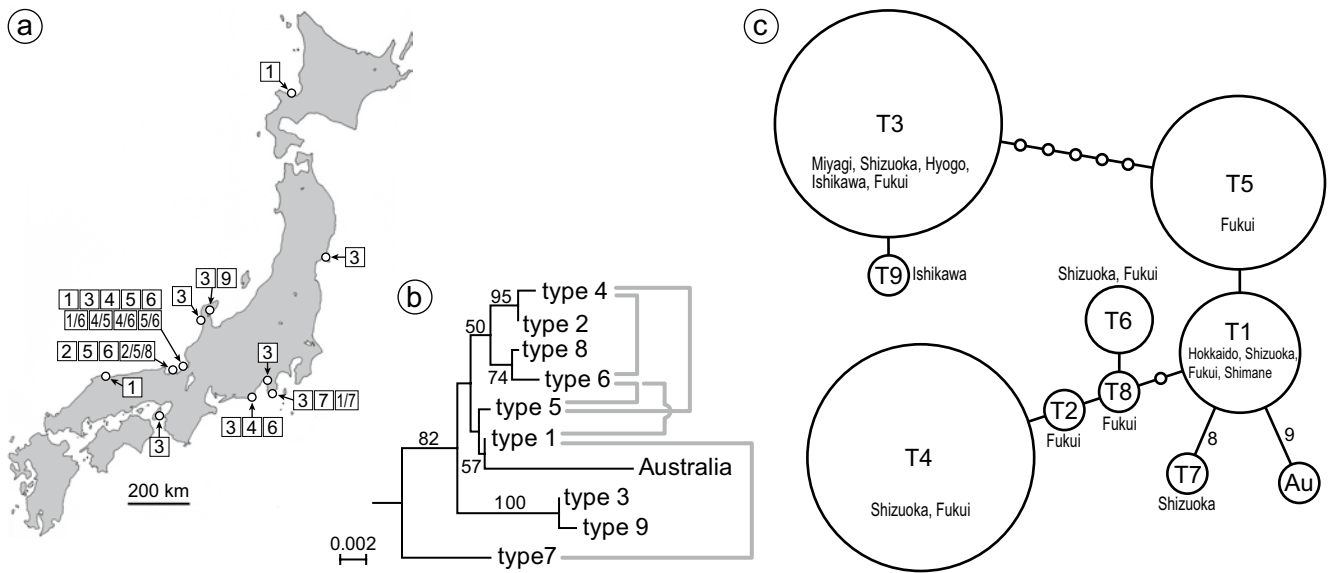


Fig. 2. Genetic diversity of *Cladophora albida* based on the ribosomal ITS data. (a) The distribution of the 9 ribotypes. (b) NJ tree of the 9 ribotypes and one Australian ribotype which was reported in Bakker *et al.* (1995a). (c) Network of the 9 ribotypes and the Australian ribotype (Au). Other information is the same as Fig. 1.

が起こったことが示唆された。

カモジシオグサ 計 32 地点から採集した 566 個体について ITS 領域の塩基配列を決定したところ、15 のリボタイプが認識され、7 パターンのヘテロ接合型 (計 18 個体) が見られた (Table 1, Fig. 3)。リボタイプ間における遺伝的距離は平均 1.95%, 最大 4.22% であった。type4・8 以外のリボタイプは複数の地点から検出され、特に type5・6・7・9 は北海道から西日本まで広域に分布していた。多くの個体は淡水環境から採集されたが、type1・2・3・7 が汽水環境から採集された。系統解析の結果、4 つのクレードに分かれ、クレード A・B・C とクレード D に大きな遺伝的差異が見られた。汽水域から採集された 4 つのリボタイプはいずれもクレード C に属していた。6 つのリボタイプはホモ接合型あるいは半数体として検出され、クレード B か C のいずれかに属していたのに対し、残りの 10 リボタイプはヘテロ接合型の対立遺伝子としてのみ検出され、クレード A か D に属していた。

考察

近年の分子進化学的研究により、遺伝的に分化が進んだ海藻種が存在することが明らかになりつつあるが (例えば Zuccarello & West 2003, Kamiya *et al.* 2011, Payo *et al.* 2013), 本研究でも 2 種の海産シオグサ類で多数のリボタイプが検出された。ツヤナシシオグサでは 13 のリボタイプが検出され、北海道および日本海沿岸に分布する 9 つのリボタイプと静岡の 4 つのリボタイプ間で大きな遺伝的なギャップが見られた (平均遺伝的距離 2.34%)。北海道・日本海クレードと静岡クレードの間には形態的な差異は見られなかったが、両者の間でヘテロ接合型が検出されなかったことを考え合わせると、すでに生殖的隔離が成立している可能性がある。北

海道・日本海クレードに属するリボタイプの分布を比較すると、type1 のみが北海道から島根まで広域に分布していたのに対し、他の 8 つのリボタイプはいずれも分布域が限定されており、集団間の遺伝的交流が活発ではないことが示唆された。さらに系統ネットワーク解析により、広域に分布する type1 からそれぞれの地域に特異的なリボタイプが分化したことが明らかになった (Fig. 1c)。この分化が最近起こったとすれば、type1 以外のリボタイプがごく限られた地域にしか分布していないのは説明がつくが、それを支持するデータはまだ得られていない。

一方、ワタシオグサでは太平洋側にも日本海側にも分布するリボタイプが複数見られた。リボタイプ間の平均遺伝的距離を比較すると、ワタシオグサ (0.33%) はツヤナシシオグサ (1.24%) よりも著しく小さく、日本においては遺伝的な分化が進んでいないことが示唆された。type7 は静岡県に特有のリボタイプだが、日本海側に多い type1 とのヘテロ接合型 (type1/7) が静岡県で採集されていることから、ワタシオグサは分散能力が高く、地理的に離れた集団間でも遺伝的交流が起こっていると考えられる。type7 はワタシオグサの中で最も祖先的で、他のリボタイプと系統的に離れているが (Fig. 2b), ネットワーク系統樹では type7 は type1 と最も近縁であるため (Fig. 2c), 両者の間では依然として生殖的親和性が維持されているのかもしれない。

ツヤナシシオグサとワタシオグサは北海道から九州まで幅広く分布し、潮間帯に見られる普遍的な海産種である (van den Hoek & Chihara 2000)。系統的にも近縁であり、どちらも同じような場所に生育しているにも関わらず (Hayakawa *et al.* 2012), なぜ遺伝的多様化の様式や分布パターンが大きく異なっているのだろうか。一般的に、どちらの種も岩礁や

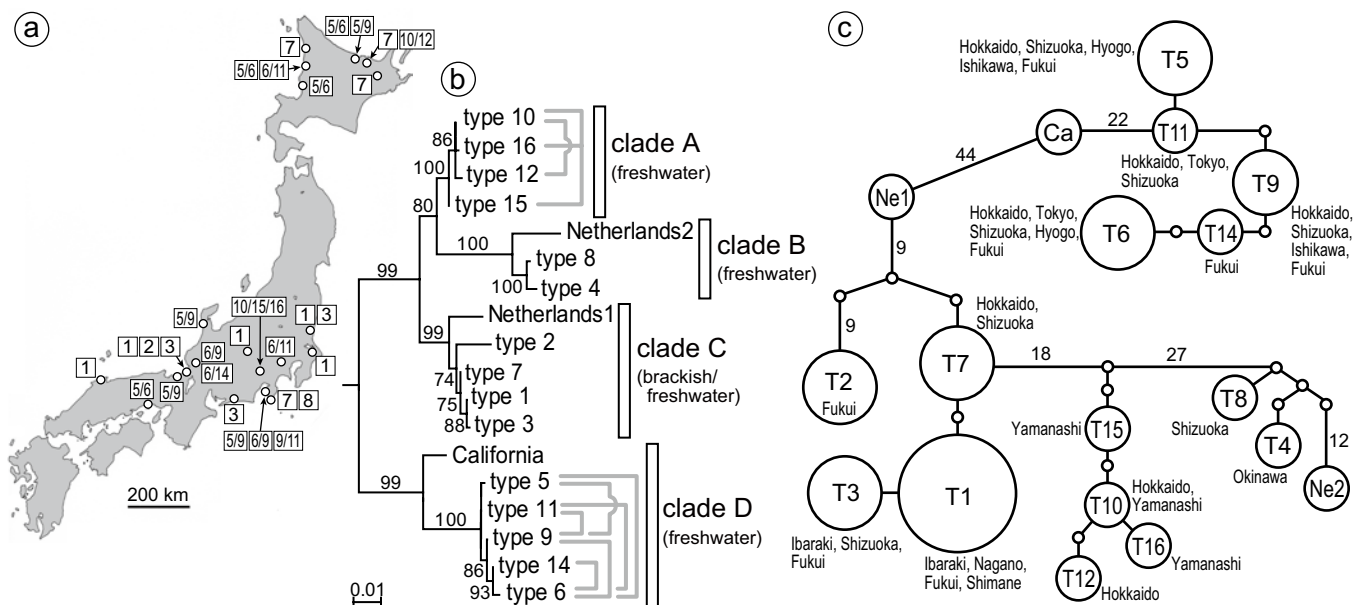


Fig. 3. Genetic diversity of *Cladophora glomerata* based on the ribosomal ITS data. (a) The distribution of the 15 ribotypes. (b) NJ tree of the 15 ribotypes and three foreign ribotypes which were reported in Marks & Cummings (1996). (c) Network of the 15 ribotypes and the three foreign ribotypes from California, USA (Ca) and the Netherlands (Ne). Other information is the same as Fig. 1.

コンクリートブロックに付着して生育するが、ワタシオグサはホンダワラ類などの大型海藻に着生しているのを見かけることがある (Hayakawa *et al.* 2012)。ホンダワラ類は流れ藻として海流に乗って分散するため、それに着生したワタシオグサは分布を広げやすいのかもしれない。また、三方五湖における1年間の調査により、ツヤナシシオグサは夏から秋にかけて消失するのに対し、ワタシオグサはほぼ1年中生育していることが明らかになっている (Hayakawa *et al.* 2012)。流れ藻としての生物量は春から夏にかけて最大となるため (Hirata *et al.* 2001, 八谷ら 2005)、この期間に生育しているワタシオグサは流れ藻とともに分散する機会が増えるのではないかと推察される。ワタシオグサは世界中に広く分布するのに対して、ツヤナシシオグサは西太平洋沿岸に分布が限られており (Guiry & Guiry 2013)、これも両種の生態的特性の違いが関係している可能性がある。

海と比べると、湖沼や河川は陸地によって地理的に隔てられているため、それが分散の障壁になって遺伝的な多様度が増すように思われるが、小型の水生生物の場合は水鳥などに運ばれることによって予想以上に頻りに集団間を行き来していると考えられている (Kristiansen 1996, Figuerola & Green 2002)。実際に、淡水大型藻類の遺伝的多様度は低く、同じ遺伝子型の個体がかかなり広域に分布する傾向が見られる (例えば Müller *et al.* 2003, Boedeker *et al.* 2010 など)。淡水産のカモジシオグサの場合も、各リボタイプの分布は必ずしも局所的ではなく、広域な分布範囲を示すリボタイプが多数検出されたが、多様性に関しては海産のシオグサ2種よりも遺伝的分化は進んでおり、多くの集団が複数のリボタイプで構成されていた。カモジシオグサは世界中に広く分布する汎存種であり、時に大きなブルームを形成することがあるため、生

態的な研究は盛んに行われているが (Dodds & Gudder 1992, Higgins *et al.* 2008, Zulkifly *et al.* 2013)、多様性に関する研究は進んでおらず (Ross *et al.* 2006)、本研究によって初めてカモジシオグサの高い遺伝的多様性が明らかとなった。

本研究では淡水産シオグサは4つのクレードに分かれたが、クレード間には明確な形態的差異は認められなかったため、すべてカモジシオグサと同定した。日本の淡水産シオグサ類については、ウキシオグサ *C. crispata* (Roth) Kützinger がカモジシオグサの1変種とされ (van den Hoek 1963)、マリモが *Aegagropila* に移されたことで (Hanyuda *et al.* 2002)、現在はカモジシオグサとフタマタシオグサ *C. fracta* (Müller ex Vahl) Kützinger の2種が識別されている (Sakai 1964, 広瀬・山岸 1977)。フタマタシオグサは分枝が疎らで枝が短いことで特徴づけられているが、遺伝的にはカモジシオグサとほとんど区別できない (Marks & Cummings 1996, Ross *et al.* 2006, 丹羽・神谷 未発表データ)。カモジシオグサは藻体の生長段階や生育環境によって形態が大きく変化することが知られているため (van den Hoek 1963, 新山 1986, Hayakawa *et al.* 2012)、淡水産シオグサ類については分類学的な再検討が必要であろう。

カモジシオグサの4つのクレードのうち、クレードA・Dに属するリボタイプはすべてヘテロ接合型として検出された。カモジシオグサは2本鞭毛の遊走子だけで無性的に繁殖すると考えられていたが (van den Hoek 1963)、このようなヘテロ接合型の存在は、少なくとも過去に有性生殖を行っていた可能性を示唆している。有性生殖を行う一般的なシオグサ属藻類の場合、異なるリボタイプの半数体 (配偶体) 間で交雑が起こるとヘテロ接合型の2倍体 (胞子体) となるが、胞子体から放出される減数胞子 (遊走子) が発芽して、再び半

数体が生じる。今回、クレード A・D がすべてヘテロ接合型で、半数体が全く検出されなかった理由として、交雑によるアポミクシス¹が考えられる。種子植物やシダ植物では、倍数性の異なる個体間で交雑することによって生じた異質倍数体がアポミクシスを行うことが知られている (Wagner & Wagner 1980, Richard 2003)。海藻ではスジアオノリ (*Ulva prolifera* Müller) でヘテロ接合型のアポミクトが見つかり、異なるリボタイプ間での交雑によって生じた可能性が示唆されている (Ogawa *et al.* 投稿中)。紅藻のニセアヤギヌ *Caloglossa monosticha* Kamiya やセイヨウアヤギヌ *C. lepriurii* (Montagne) J. Agardh では、遺伝的に異なる特定の培養株間で掛け合わせるにより F₁ 胞子体がアポミクシスを行うことが明らかになっている (Kamiya & West 2008, Kamiya *et al.* 2011)。

カモジシオグサにおいても異なるリボタイプ間での交雑によってアポミクシスが生じたとすれば、ヘテロ接合型の親である半数体のリボタイプが見つからなかったのは何故だろうか。アポミクシスのメリットとして、配偶体や配偶子を作るコストを省くことができる上に、パートナーがいなくても単独で繁殖が可能であるということが挙げられる (Tomiuk & Köhler 2007)。また、有性生殖個体の場合、交雑によって雑種強勢 (雑種第一代が、サイズ、耐性、繁殖能力などが両親よりも優れた形質を表す現象) が起こったとしても、(減数分裂と有性生殖のせいで) その遺伝子型が次世代でも再現する確率は極めて低くなるが、アポミクシスでは何世代でも雑種強勢個体を作り続けることができる (Spielman *et al.* 2003, Nybom 2007, Birchler *et al.* 2010)。カモジシオグサのクレード A および D のリボタイプの場合、厳しい自然選択によって有性生殖集団が淘汰され、雑種強勢を示すヘテロ接合型のアポミクト集団だけが生き残ったというストーリーが考えられる。

一方、カモジシオグサのクレード B・C ではヘテロ接合型が見つからない。クレード B に関しては調べた集団数・個体数ともに少ないため、調査個体数や集団数を増やすことによってヘテロ接合型が検出される可能性はあるが、クレード C のリボタイプ (type 1・2・3) が生育する三方五湖では、400 個体以上のカモジシオグサを調べてもヘテロ接合型は検出されていない。リボタイプ間の遺伝的な違いはクレード C 内で最大 9 塩基しかなく、他の 2 つのクレード内の違いとあまり変わらないが、すでにリボタイプ間で生殖的隔離が成立しているのかもしれない。

今回解析した 3 種はいずれも汽水域にも生育していたが、汽水環境への適応能力はどのように獲得されたのだろうか。ツヤナシシオグサでは、太平洋側固有の 4 つのリボタイプがいずれも河口域から採集されているが、調査した集団数・個

体数ともに少ないため、汽水域に特化したリボタイプなのかどうかは判断できない。ワタシシオグサに関しては、汽水環境から検出されたリボタイプ (type 1・3・5・7) は必ずしも系統的に近縁ではなかったことから、汽水環境への適応能力が何度も獲得されたのか、あるいはどのリボタイプも潜在的に汽水環境で生育可能なのかもしれない。一方、カモジシオグサでは、4 つのリボタイプ (type 1・2・3・7) が淡水～汽水域から採集されており、すべてクレード C に属していた。Fig. 3 の系統樹を見ると、このクレード C のリボタイプが派生的に汽水環境への適応能力を獲得したと解釈するのが最も節約的のように見える。しかしながら、海水または汽水域に生育するワタシシオグサ *C. vagabunda* (L.) Hoek がカモジシオグサに最も近縁であることを考えると (Hayakawa *et al.* 2012)、カモジシオグサはもともと汽水域に生育できる能力を持っており、クレード A・B の共通祖先とクレード D で派生的にその能力を失った (つまり淡水環境に特化して生育するようになった) と考えることもできる。いずれにせよ、汽水環境適応能力が系統的に近縁な種間・種内で何度も変化するというのは、進化生態学的にも細胞分子生物学的にも興味深い現象である。

本研究ではリボソーム ITS 領域を用いて遺伝子型を特定したが、リボソームシストロンは数十から数百のコピー配列がタンデムに並んでいるため、染色体交叉が起これば半数体でも個体内多型が生じる可能性がある (Feliner & Rosselló 2007)。つまり、個体内で 2 種類のリボタイプが検出されたからといって複相世代と断定はできないのである。一方、そのような複数コピーが並ぶ遺伝子では、コピー内の変異が遺伝子変換 (gene conversion) と呼ばれる組換え作用によって他のコピーにも伝搬し、やがてコピー全部の配列が同一になる現象 (協調進化 concerted evolution) が起こる (Liao 1999)。要するに、ヘテロ接合の場合は同じ遺伝子型が長期間にわたって維持される保証はないということになる。このように、集団遺伝学的な解析にリボソーム ITS 領域を用いると遺伝子型を正しく判別できない可能性があるため、シングルコピーの核コード遺伝子マーカーかマイクロサテライトマーカーの開発が求められる。また、たとえ適当な分子マーカーを用いたとしても、複相のホモ接合体と単相の配偶体を遺伝子型だけで識別することは困難であるため、染色体数や遊走細胞の鞭毛数をチェックするなどして世代を判別する必要がある。

結論として、海産のツヤナシシオグサとワタシシオグサや、淡水産カモジシオグサの 4 つのクレードのように、同じような環境に生育していても集団構造や分布パターンに顕著な違いが見られることが明らかになり、遺伝的な交流や分散範囲は生育環境以外の要因によっても影響されることが考えられる。また、カモジシオグサではアポミクシスや雑種強勢が起こっている可能性が示唆されたことから、生活環や遺伝的な特性の違いも集団構造に影響を与えている可能性がある。今後、種間あるいはリボタイプ間の生態・生理特性や生活環の違いを詳しくすることにより、シオグサ類における進化プロセ

¹ 受精や減数分裂を伴わない生殖様式の総称。「無性生殖」という用語は意味が広く、世代交代を行う胞子体にも適用されることがあるため、ここでは「配偶子を作らず遊走子だけで繁殖を繰り返す生殖様式」をアポミクシスと呼ぶ。

スを解明していきたいと考えている。

謝辞

本研究の一部は、科学研究費（課題番号 24570106）、公益信託ミキモト海洋生態研究助成基金、藤原ナチュラリストリー振興財団学術研究助成の助成を受けて実施された。本研究を進めるに当たって、山梨大学の芹澤如比古氏、芹澤和世氏、海藻研究所の新井章吾氏、島根大学の太谷修司氏、国立科学博物館の北山太樹氏、神戸大学の羽生田岳昭氏、東邦大学の宮地和幸氏、福井県海浜自然センターの皆様、福井県立大学の大城香氏、吉川伸哉氏にご協力いただいた。この場を借りて謝意を表する。

引用文献

- Bakker, F. T., Olsen, J. L. & Stam, W. T. 1995a. Evolution of nuclear rDNA ITS sequences in the *Cladophora albidula/sericea* clade (Chlorophyta). *J. Mol. Evol.* 40: 640–651.
- Bakker, F. T., Olsen, J. L. & Stam, W. T. 1995b. Global phylogeography in the cosmopolitan species *Cladophora vagabunda* (Chlorophyta) based on nuclear rDNA internal transcribed spacer sequences. *Eur. J. Phycol.* 30: 197–298.
- Birchler, J. A., Yao, H., Chudalayandi, S., Vaiman, D. & Veitia, R. A. 2010. Heterosis. *The Plant Cell Online* 22: 2105–2112.
- Boedeker, C., Eggert, A., Immers, A. & Wakana, I. 2010. Biogeography of *Aegagropila linnaei* (Cladophorophyceae, Chlorophyta): a widespread freshwater alga with low effective dispersal potential shows a glacial imprint in its distribution. *J. Biogeogr.* 37: 1491–1503.
- Briggs, J. C. 1994. Species diversity: land and sea compared. *Syst. Biol.* 43:130–135.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9: 1657–1660.
- Dodds, W. K. & Gudder, D. A. 1992. The ecology of *Cladophora*. *J. Phycol.* 28: 415–427.
- Feliner, G. N. & Rosselló, J. A. 2007. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44: 911–919.
- Figuerola, J. & Green, A. J. 2002. Dispersal of aquatic organisms by waterbirds: a review of past research and priorities for future studies. *Freshwat. Biol.* 47: 483–494.
- Guiry, M. D. & Guiry, G. M. 2013. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>.
- Hall, T. A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Hanyuda, T., Wakana, I., Arai, S., Miyaji, K., Watano, Y. & Ueda, K. 2002. Phylogenetic relationships within Cladophorales (Ulvophyceae, Chlorophyta) inferred from 18S rRNA gene sequences with special reference to *Aegagropila linnaei*. *J. Phycol.* 38: 564–571.
- Hayakawa, Y., Ogawa, T., Yoshikawa, S., Ohki, K. & Kamiya, M. 2012. Genetic and ecophysiological diversity of *Cladophora* (Cladophorales, Ulvophyceae) in various salinity regimes. *Phycol. Res.* 60: 86–97.
- Higgins, S. N., Malkin, S. Y., Todd Howell, E., Guildford, S. J., Campbell, L., Hiriart-Baer, V. & Hecky, R. E. 2008. An ecological review of *Cladophora glomerata* (Chlorophyta) in the Laurentian Great Lakes. *J. Phycol.* 44: 839–854.
- Hirata, T., Tanaka, J., Iwami, T., Ohmi, T., Dazai, A., Aoki, M., Ueda, H., Tsuchiya, Y., Sato, T. & Yokohama, Y. 2001. Ecological studies on the community of drifting seaweeds in the south-eastern coastal waters of Izu Peninsula, central Japan. I: Seasonal changes of plants in species composition, appearance, number of species and size. *Phycol. Res.* 49: 215–229.
- 広瀬弘幸・山岸高旺 1977. 日本淡水藻図鑑. 内田老鶴圃. 東京.
- Kamiya, M. & West, J. A. 2008. Origin of apomictic red algae: outcrossing studies of different strains in *Caloglossa monosticha* (Ceramiales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 44: 977–984.
- Kamiya, M., West, J. A. & Hara, Y. 2011. Induction of apomixis by outcrossing between genetically divergent entities of *Caloglossa lepreurii* (Ceramiales, Rhodophyta) and evidence of hybrid apomicts in nature. *J. Phycol.* 47: 753–762.
- Kristiansen, J. 1996. Dispersal of freshwater algae – a review. *Hydrobiologia* 336: 151–157.
- Liao, D. 1999. Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 24–30.
- Marks, J. C. & Cummings, M. P. 1996. DNA sequence variation in the ribosomal internal transcribed spacer region of freshwater *Cladophora* species (Chlorophyta). *J. Phycol.* 32: 1035–1042.
- Müller, K. M., Cole, K. M. & Sheath, R. G. 2003. Systematics of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) in North America. II. Biogeographical trends in karyology: chromosome numbers and linkage with gene sequence phylogenetic trees. *Phycologia* 42: 209–219.
- 新山優子 1986. 北海道産カモジシオグサ *Cladophora glomerata* (L.) Kützinger の形態と季節的变化. *藻類* 34: 216–224.
- Nybohm, H. 2007. Unique reproduction in dogroses (*Rosa* sect. *Caninae*) maintains successful and highly heterozygous genotypes. In Hörandl, E., Grossniklaus, U., Van Dijk, P.J. & Sharbel, T.F. [eds] *Apomixis: Evolution, Mechanisms, and Perspectives*. pp. 281–298. Lubrecht & Cramer Ltd, Koenigstein, Germany.
- Palumbi, S. R. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25: 547–572.
- Payo, D. A., Leliaert, F., Verbruggen, H., D'hondt, S., Calumpong, H. P. & De Clerck, O. 2013. Extensive cryptic species diversity and fine-scale endemism in the marine red alga *Portieria* in the Philippines. *Proc. Royal Soc. B: Biol. Sci.* 280 20122660; doi:10.1098/rspb.2012.2660.
- Richards, A. J. 2003. Apomixis in flowering plants: an overview. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 358:1085–1093.
- Ross, S. J., Sheath, R. & Muller, K. 2006. Molecular phylogeography and species discrimination of freshwater *Cladophora* (Cladophorales, Chlorophyta) in North America. MSc Thesis, University of Waterloo, Waterloo, Canada. Available at: <http://hdl.handle.net/10012/2977>.
- Sakai, Y. 1964. The species of *Cladophora* from Japan and its vicinity. *Sci. Pap. Inst. Algol. Res. Hokkaido Univ.* 5: 1–104.
- Spielman, M., Vinkenoog, R. & Scott, R. J. 2003. Genetic mechanisms of apomixis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 358: 1095–1103.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731–2739.
- Tomiuk, J. & Köhler, W. 2007. Population genetics: evolutionary features of asexual species. *Prog. in Bot.* 68: 130–150.
- van den Hoek, C. 1963. Revision of the European Species of *Cladophora*. Brill Archive, Leiden.
- van den Hoek, C. & Chihara, M. 2000. A taxonomic revision of the marine species of *Cladophora* (Chlorophyta) along the coasts of Japan and the Russian far-east. National Science Museum, Tokyo.
- Wagner, W. H. Jr. & Wagner, F. S. 1980. Polyploidy in pteridophytes. In Lewis, W. H. [Ed] *Polyploidy*. pp. 199–214. Plenum Press, London, UK.
- 八谷光介・西垣友和・井谷匡志・和田洋藏 2005. 若狭湾西部養老地先における流れ藻発生量の水底とその比重測定による浮遊期間の推定. *月刊海洋* 7: 516–521.
- Zuccarello, G. C. & West, J. A. 2003. Multiple cryptic species: molecular diversity and reproductive isolation in the *Bostrychia radicans/B. moritziana* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) with focus on North American isolates. *J. Phycol.* 39: 948–959.
- Zulkifly, S. B., Graham, J. M., Young, E. B., Mayer, R. J., Piotrowski, M. J., Smith, I. & Graham, L. E. 2013. The Genus *Cladophora* Kützinger (Ulvophyceae) as a globally distributed ecological engineer. *J. Phycol.* 49:

(Received May 10, 2013; Accepted May 30, 2013)