

瀬戸内地方に隔離分布する絶滅危惧種アッケシソウの起源

星野卓二^a, 正木智美^a, 中村松寿^a, 市原和政^a, 池田 博^b,
狩山俊悟^c, 榎本 敬^d, 任 炯卓^e

^a岡山理科大学生物地球システム学科 700-0005 岡山県岡山市北区理大町 1-1
^b東京大学総合研究博物館 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
^c倉敷市立自然史博物館 710-0046 岡山県倉敷市中央 2-6-1
^d岡山大学資源生物科学研究所 710-0046 岡山県倉敷市中央 2-20-1
^e韓国全南大学校自然科学系生物学 500-757 韓国光州広域市光山区龍峰洞 300

Origin of *Salicornia europaea* L. (*Chenopodiaceae*) in the Seto Inland Sea (Setouchi) Area Inferred from DNA Sequences

Takuji HOSHINO^{a,*}, Tomomi MASAKI^a, Matsutoshi NAKAMURA^a, Kazumasa ICHIHARA^a,
Hiroshi IKEDA^b, Shungo KARIYAMA^c, Takashi ENOMOTO^d and Hyoung-Tak IM^e

^aDepartment of Biosphere-Geosphere System Science,
Okayama University of Science, 1-1, Ridai-cho, Okayama, 700-0005 JAPAN;

^bThe University Museum, The University of Tokyo,
7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033 JAPAN;

^cKurashiki Museum of Natural History,
2-6-1, Chuo, Kurashiki, Okayama, 710-0046 JAPAN;

^dResearch Institute for Bioresources, Okayama University,
2-20-1, Chuo, Kurashiki, Okayama, 710-0046 JAPAN;

^eDepartment of Biological Sciences, the Institute of Basic Sciences,
Chonnan University, Kwangju, 500-757, KOREA

*Corresponding author e-mail: hoshino@big.ous.ac.jp

(Received on December 16, 2009)

Salicornia europaea L. (*Chenopodiaceae*) grows in saline places along seashores in the temperate regions of the Northern Hemisphere. In Japan, *S. europaea* is disjunctively distributed in eastern Hokkaido and in the Seto Inland Sea (Setouchi) area. The populations of *S. europaea* in Setouchi area have been thought to be introduced from Hokkaido by Kitamae Ships (trader ships between Hokkaido and Setouchi areas in the 19th century). In order to clarify the origin of *S. europaea* in the Setouchi area, we analyzed phylogenetic relationships among populations of *S. europaea* in Hokkaido, the Setouchi area, and Korea by using DNA sequence data of nrITS, *atpB-rbcL* and *trnL-trnF*. The haplotypes in Setouchi area were identical with those in Korea, and different from those in Hokkaido by three deletions and one or two substitutions. The results clearly reject the hypothesis that *S. europaea* in the Setouchi area is derived from Hokkaido.

Keywords: *Chenopodiaceae*, chloroplast DNA, nuclear DNA, *Salicornia europaea*.



Fig. 1. Collection sites of *Salicornia europaea* in Japan and South Korea.

アッケシソウ *Salicornia europaea* L. はアカザ科アッケシソウ属の一年生草本で、北半球の海岸や内陸の塩湿地に広く分布している (Ball 1964, Wolf and Jefferies 1986). 日本では北海道厚岸町の厚岸湖、網走市の能取湖やサロマ湖、根室市の風蓮湖など、北海道東部に分布している (厚岸ふるさと友の会 2004). 本州では、宮城県からの報告 (北川 1982) があるが、現在では絶滅したとされる (環境庁自然保護局野生生物課 2000). また、北海道から遠く離れた瀬戸内地方の香川県や愛媛県の塩田跡地などにも分布がみられる (牧野 1913, 西尾 1984). 岡山県では、牛窓町 (現瀬戸内市牛窓町) の錦海塩田跡地にアッケシソウが生育することが知られていたが、それは香川県から持ち込まれた種子が人為的にまかれたものと判明している (杉原 1985). また、寄島町 (現浅口市) の寄島干拓地で 2003 年に発見されている. このように、現在ではアッケシソウは北海道と瀬戸内地方に隔離分布している. 本種は海岸の開発により減少傾向にあることから、日本版レッドデータブックでは絶滅危惧 IB 類とされている (環境庁自然保護局野生生物課 2000). アッケシソウの主な減少要因としては、湿地開発や植生遷移があげられている (高橋 2003).

アッケシソウがなぜ北海道と瀬戸内地方に隔離分布しているのかについては、江戸時代から明

治時代にかけて北海道と瀬戸内地方を交易のために往復していた北前船により北海道から瀬戸内地方に持ち込まれたという「北前船説」がある. すなわち、北海道からコンブやワカメなどの海産物を積み出す際、船のバランスを保つために海岸の砂を積み込み、瀬戸内地方で海産物と塩を積み替える際に砂を捨てていたが、その砂の中にアッケシソウの種子が混じっていた、というものである (大久保 1989). もっともらしい説ではあるが、アッケシソウがもともと瀬戸内地方に生育していた、あるいは別のルート (朝鮮半島経由など) から来た、という可能性も考えられる.

小熊他 (2003), Sagane et al. (2003) は、北海道と岡山県牛窓町産のアッケシソウについて、RAPD (random amplified polymorphic DNA) 法により遺伝的近縁度を解析し、北海道の集団と岡山の集団が遺伝的に離れていることを示している. しかし、彼らを使用した集団は岡山県の 1 集団のみであり、その集団もほかから移入されたものである. また、韓国産の集団は解析していないため、瀬戸内地方のアッケシソウの由来は分かっていない. そこで、本論文では、北海道と瀬戸内地方および韓国産のアッケシソウの遺伝子を解析し、瀬戸内地方に隔離分布するアッケシソウの由来を明らかにすることを目的とした.

Table 1. Localities used in this study and Genbank accession numbers of *Salicornia europaea*. Vouchers are deposited at OKAY

採集地 (OKAY 標本番号)	DDBJ/EMBL/GenBank 登録番号			
	ITS	<i>trnL-trnF</i>	<i>atpB-rbcL</i>	
日本				
北海道根室市風蓮湖	19610	AB537514	AB537541	AB537528
北海道網走市能取湖	19615	AB537515	AB537540	AB537527
北海道網走市サロマ湖	19640	AB537516	AB537542	AB537529
愛媛県新居浜市新居浜	19649	AB537517	AB537543	AB537530
香川県坂出市王越町木沢	19477	AB537518	AB537544	AB537531
岡山県浅口市寄島町	19392	AB537519	AB537545	AB537532
岡山県浅口市寄島町	19694-1	—	AB537546	AB537534
岡山県浅口市寄島町	19694-2	AB537521	AB537547	AB537533
岡山県浅口市寄島町	19694-3	AB537520	AB537550	AB537535
韓国				
仁川市龍游島	22217	AB537523	AB537551	AB537536
仁川市龍游島	22218	AB537524	AB537548	AB537537
仁川市龍游島	22219	AB537525	—	—
仁川市龍游島	22220	AB537526	—	—
全羅南道新安郡沙玉島	22224	—	AB537552	AB537539
全羅南道新安郡沙玉島	22225	AB537522	AB537549	AB537538
ヨーロッパ				
Germany: Prov.Sachsen-Anhalt, Hecklingen		AY181879	—	AY181814
NE Spain: Catalonia, Ebro delta		AY181880	—	AY181815
France: Saint Goustan		—	AY996296	—

材料と方法

北海道から 3 ヶ所、瀬戸内地方(岡山県, 香川県, 愛媛県) からそれぞれ 1 ヶ所, それに韓国 2 ヶ所よりアッケシソウを採取した (Fig. 1).

解析には, 核リボソーム遺伝子 ITS (internal transcribed spacer) 領域, 葉緑体 *trnL-trnF* 遺伝子間領域, および葉緑体 *atpB-rbcL* 遺伝子間領域の塩基配列を用いた. 生植物 0.1 g から Nucleon Phytopure Plant and Fungal DNA Extraction Kit (Amersham Biosciences Co.) を用いて全 DNA を抽出し, PCR 法により解析領域の増幅を行った.

目的領域の増幅のために, DNA サーマルサイクラー (Program Temp Control System PC-320, Astec Inc.) を用いて PCR 反応を行った. 反応酵素として, *TaKaRa Ex Taq* polymerase (TaKaRa Inc.) を用いた. ITS 領域の増幅にはフォワードプライマー ITS-L (5'-CGTAACAA GGTTCGCTAGGTG-3') とリバースプライマー ITS-4 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGA-3') を用いた (Hsiao et al. 1994, White et al. 1990). 反応は, 95°C 2 分の熱変性処理の後,

93°C 35 秒の熱変性処理, 49°C 35 秒のアニーリング処理, 72°C 120 秒の伸長反応処理を 35 サイクル行い, 最後に 72°C 7 分の伸長反応処理を行った. *trnL - F* 遺伝子間領域の増幅には, フォワードプライマー (5'-TCGTGAGGGTTCAA GTCC - 3') とリバースプライマー (5'-AGATTG AACTGGTGACACG-3') を用いた. 反応は, 94°C 3 分の熱変性処理の後, 94°C 60 秒の熱変性処理, 50°C 60 秒のアニーリング処理, 72°C 120 秒の伸長反応処理を 35 サイクル行い, 最後に 72°C 7 分の伸長反応処理を行った. *atpB-rbcL* 領域の増幅には, フォワードプライマー f (5'-GAAGTAGTAGGATTGATTCTC-3') とリバースプライマー r (5'-CAACACTTGC TTAGTCTCTG-3') を用いた (Shinozaki et al. 1986). 反応は, 94°C 3 分の熱変性処理の後, 93°C 60 秒の熱変性処理, 49°C 60 秒のアニーリング処理, 72°C 120 秒の伸長反応処理を 35 サイクル行い, 最後に 72°C 7 分の伸長反応処理を行った. PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Co.) を用いて精製し, BigDye

Table 2. Variation of *Salicornia europaea* in ITS sequences. Three nucleotide substitutions were observed. The numbers indicate the relative positions determined from the result of multiple alignments

採集地 / 塩基配列の順番	190	373	417
北海道風蓮湖 19610	A	G	C
北海道能取湖 19615	A	G	C
北海道網走市サロマ湖 19640	A	G	C
愛媛県新居浜市 19649	A	G	C
香川県王越町 19477	A	G	C
岡山県寄島町 19392	A	G	C
岡山県寄島町 19694-2	A	G	C
岡山県寄島町 19694-3	A	G	C
韓国龍游島 22217	A	G	C
韓国龍游島 22218	A	G	C
韓国龍游島 22219	A	G	C
韓国龍游島 22220	A	G	C
韓国沙玉島 22225	A	G	C
NE Spain: Catalonia, Ebro delta	G	T	T
Germany: Prov.Sachsen-Anhalt, Hecklingen	G	G	C

Terminators v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc.) を用いてサイクルシーケンスをおこない、塩基配列を決定した。その後、CLUSTAL W (Thompson et al. 1994) を用いてアライメントをおこなった後、塩基配列を比較した。また、比較として、ヨーロッパ（ドイツ、スペイン、フランス）産アッケシソウの塩基配列データを GenBank からダウンロードし、用いた (Table 1)。

系統関係を調べるため、PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002) を用いて、最節約法によって系統樹を構築した。塩基置換と挿入／欠失は同等の重みで扱った。GapCoder (Young and Healy 2003) を用いて挿入／欠失は 1 回の突然変異で生じたと考え、1 つの数字で表した。系統解析は、1 塩基反復配列の反復数変異を含まないデータセットで行った。系統樹の分岐の信頼度は、1000 回反復のブートストラップ確率により評価した。外群として *S. ramosissima* (GenBank 登録番号: DQ340161, DQ340117), *S. pojarkovae* (DQ340158, DQ340114), *S. procumbens* (DQ340159, DQ340115) の 3 種を用いた。

なお、証拠標本は岡山理科大学植物標本庫 (OKAY) に収蔵した。

Table 3. Variation of *Salicornia europaea* in *trnL-trnF* sequences. Two nucleotide substitutions and four indels were observed

採集地 / 塩基配列の順番	398	533	797	798	799	800
北海道風蓮湖 19610	C	G	A	T	A	A
北海道能取湖 19615	C	G	A	T	A	A
北海道網走市サロマ湖 19640	C	G	A	T	A	A
愛媛県新居浜市 19649	C	A	—	—	—	—
香川県王越町 19477	C	A	—	—	—	—
岡山県寄島町 19392	C	A	—	—	—	—
岡山県寄島町 19694-1	C	A	—	—	—	—
岡山県寄島町 19694-2	C	A	—	—	—	—
岡山県寄島町 19694-3	C	A	—	—	—	—
韓国龍游島 22217	C	A	—	—	—	—
韓国龍游島 22218	C	A	—	—	—	—
韓国沙玉島 22224	C	A	—	—	—	—
韓国沙玉島 22225	C	A	—	—	—	—
France: Saint Goustan	T	G	—	—	—	—

結果と考察

ITS 領域の比較には、ITS1 240 bp, 5.8S 164 bp, ITS2 220 bp の計 624 bp を用いた。日本産と韓国産のアッケシソウの ITS 領域の塩基配列は 100% 一致し、違いは見られなかった。一方、日本・韓国産とスペイン産・ドイツ産の配列の間には、2 つの塩基置換が見られた (Table 2)。

trnL-trnF の遺伝子間領域の比較には、北海道産 935 bp, 瀬戸内地方産と韓国産 931 bp を用いた。瀬戸内地方産と韓国産の *trnL-trnF* の遺伝子間領域の塩基配列は 100% 一致した。一方、瀬戸内地方産・韓国産と北海道産の配列の間には、1 ヶ所の挿入／欠失と、1 つの塩基置換が見られた。また、フランス産と瀬戸内地方産・韓国産の配列の間には、2 つの塩基置換が見られた (Table 3)。

atpB-rbcL の遺伝子間領域の比較には、北海道産 724 bp, 瀬戸内地方産 736 bp, 韓国産 736 bp を用いた。北海道の 3 場所については、サロマ湖産に 1 つの塩基置換が見られた。瀬戸内地方と韓国の間では塩基配列は 100% 一致した。北海道産と瀬戸内地方・韓国産の間には、2 ヶ所の挿入／欠失と 2 つの塩基置換が見られた。また、ヨーロッパ産と瀬戸内地方産・韓国産の配列の間には、3 ヶ所の挿入／欠失と 2 つの塩基置換が見られた (Table 4)。

核遺伝子と葉緑体遺伝子を比較した結果、瀬戸

Table 4. Variation of *Salicornia europaea* in *atpB-rbcL* sequences. Three nucleotide substitutions and 18 indels were observed

採集地 / 塩基配列の順番	25	26	27	28	29	52	67	85	86	87	88	89	115	194	436	437	438	439	440	441	442	
北海道風蓮湖 19610	—	—	—	—	—	—	G	T	A	A	A	T	A	T	—	—	—	—	—	—	—	—
北海道能取湖 19615	—	—	—	—	—	—	G	T	A	A	A	T	A	T	—	—	—	—	—	—	—	—
北海道サロマ湖 19640	—	—	—	—	—	—	G	T	A	A	A	T	C	T	—	—	—	—	—	—	—	—
愛媛県新居浜市 19649	A	A	T	T	A	—	G	T	A	A	A	T	A	G	C	A	T	A	A	T	T	T
香川県王越町 19477	A	A	T	T	A	—	G	T	A	A	A	T	A	G	C	A	T	A	A	T	T	T
岡山県寄島町 19392	A	A	T	T	A	—	G	T	A	A	A	T	A	G	C	A	T	A	A	T	T	T
岡山県寄島町 19694-1	A	A	T	T	A	—	G	T	A	A	A	T	A	G	C	A	T	A	A	T	T	T
岡山県寄島町 19694-2	A	A	T	T	A	—	G	T	A	A	A	T	A	G	C	A	T	A	A	T	T	T
岡山県寄島町 19694-3	A	A	T	T	A	—	G	T	A	A	A	T	A	G	C	A	T	A	A	T	T	T
韓国龍游島 22217	A	A	T	T	A	—	G	T	A	A	A	T	A	G	C	A	T	A	A	T	T	T
韓国龍游島 22218	A	A	T	T	A	—	G	T	A	A	A	T	A	G	C	A	T	A	A	T	T	T
韓国沙玉島 22224	A	A	T	T	A	—	G	T	A	A	A	T	A	G	C	A	T	A	A	T	T	T
韓国沙玉島 22225	A	A	T	T	A	—	G	T	A	A	A	T	A	G	C	A	T	A	A	T	T	T
NE Spain: Catalonia, Ebro delta	A	A	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	A	T	—	—	—	—	—	—	—	—
Germany: Prov.Sachsen-Anhalt, Hecklingen	A	A	T	T	A	A	G	—	—	—	—	—	A	T	—	—	—	—	—	—	—	

内地方産と韓国産のアッケシソウは、調べた塩基配列について 100%一致し、変異はみられなかった。一方、北海道産と瀬戸内地方産・韓国産の間には、葉緑体遺伝子 *trnL-trnF* と *atpB-rbcL* の遺伝子間領域の塩基配列に、挿入／欠失や塩基置換など遺伝的変異が観察された。また、最節約法による分子系統樹から、本研究に用いたアッケシソウ

は北海道産、瀬戸内地方産・韓国産およびドイツ産・スペイン産の 3 つのクレードに分かれることが明らかになった (Fig. 2)。

瀬戸内地方のアッケシソウが江戸時代から明治時代にかけて北海道から持ち込まれたものである、とする「北前船説」に従えば、アッケシソウが瀬戸内地方に広がったのはせいぜい 100 年から

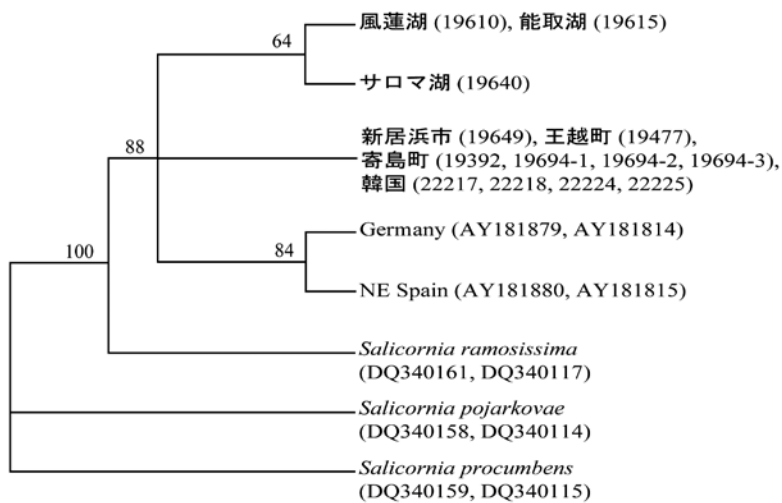


Fig. 2. Strict consensus tree of the two equally most parsimonious trees of *Salicornia europaea* based on the sequences of ITS and *atpB-rbcL* (Tree length = 39, CI = 1.00, RI = 1.00). Numbers at branches are bootstrap probabilities more than 50% of 1000 replications.

300年前のことになる。しかし、今回明らかになった瀬戸内地方産と北海道産のアッケシソウの塩基配列の違いが、そのような短期間に生じたとは考えられない。韓国では、アッケシソウは干潟や塩田の周辺に多く見られる (Lee 1996)。瀬戸内地方のアッケシソウも塩田跡に集中していることから、過去の交易の際に朝鮮半島から人為的に瀬戸内地方に導入されたかもしれない。あるいは、もともと日本各地の塩湿地に広く分布していたアッケシソウが、開発や埋め立てにより生育地が減少し、瀬戸内地方の塩田跡地のような特殊な環境に生き残ったかもしれない。いずれにせよ、今回の結果は、瀬戸内地方のアッケシソウが北前船によって北海道から来たのでは無いことを示している。今後は、沿海州やサハリン、千島列島など、日本の周辺地域の集団を解析することにより、日本のアッケシソウの起源を解明できると考えられる。

本研究を遂行するに当たり、寄島町教育委員長であった作田雅利氏には寄島町干拓地の調査を快く許可していただき、さらに、浅口市寄島町アッケシソウを守る会の方々には有益な助言をいただいた。系統樹の作成には東京大学の矢野興一氏にお世話になった。また、本研究の一部は、2004年度財団法人ウエスコ学術振興財団の助成を受けたものである。記して感謝の意を表す。

引用文献

- 厚岸ふるさと友の会 2004. アッケシソウ保護増殖推進・交流事業報告書. 40 pp. 厚岸ふるさと友の会, 北海道.
- Ball P. W. 1964. A taxonomic review of *Salicornia* in Europe. Feddes Report. **69**: 1–8.
- Hsiao C., Chatterton N. J., Asay K. H. and Jensen K. B. 1994. Phylogenetic relationships of 10 grass species: an assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in Monocots. *Genome* **37**: 112–120
- 環境庁自然保護局野生生物課 (編) 2000. 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物 - レッドデータブック - 8 植物 I (維管束植物). (財) 自然環境研究センター, 東京.
- 北川政夫 1982. アカザ科. 佐竹義輔, 大井次三郎, 北村四郎, 亘理俊次, 富成忠夫 (編), 日本の野生植物 草本 II. pp. 49, 50. 平凡社, 東京.
- Lee Y.-N. 1996. Flora of Korea. 1247 pp. Kyo-Hak Publishing, Seoul.
- 牧野富太郎 1913. 伊豫ニ於イテあつけしさうノ發見. 植物学雑誌 **27**: (557).
- 西尾一昭 1984. 瀬戸内アッケシソウ自生地の現状とそのナゾを探る. 岡山県植物研究会会報 (3): 1–3.
- 小熊俊雄, 佐藤響太, 相根義昌, 桃木芳枝 2003. 湊湖湖浚渫土壌からの巨大アッケシソウ出現要因の特定. 日本作物学会記事 **72**: 280, 281.
- 大久保一治 1989. 私の採集した岡山県自生植物目録. 付帰化植物・栽培植物. 347 pp. 岡山花の会, 岡山.
- Sagane Y., Sato K. and Momonoki Y. S. 2003. Identification of *Salicornia* populations: comparison between morphological characterization and RAPD fingerprinting. *Plant Prod. Sci.* **6**(4): 287–294.
- Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M., Wakasugi T., Hayashida N., Matsubayashi T., Zaita N., Chunwongse J., Obokata J., Yamaguchi-Shinozaki K., Ohto C., Torazawa K., Meng B. Y., Sugita M., Deno H., Kamogashira T., Yamada K., Kusuda J., Takaiwa F., Kato A., Tohdoh N., Shimada H., and Sugiura M. 1986. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* **5**: 2043–2049.
- Swofford D. L. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0610 Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- 杉原操 1985. 錦海湾塩田跡地のアッケシソウについて. 岡山県植物研究会会報 (11): 1, 2.
- 高橋英樹 2003. アッケシソウ. 矢原徹一 (監), ヤマケイ情報箱 レッドデータプランツ. p. 376. 山と溪谷社, 東京.
- Thompson J. D., Higgins D. G. and Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673–4680.
- White T. J., Bruns T., Lee S. and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (eds.), PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications. pp. 315–322. Academic Press, New York.
- Wolf S. L. and Jefferies R. L. 1986. Morphological and isozyme variation in *Salicornia europaea* (s. l.) (*Chenopodiaceae*) in northeastern North America. *Can. J. Bot.* **65**: 1410–1419.
- Young N. D. and Healy J. 2003. GapCoder automates the use of indel characters in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* **4**: 6.