

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23770090

研究課題名(和文)比較分子系統地理学によるカブトガニと共生ウズムシの共進化および集団史の解明

研究課題名(英文)Comparative phylogeographic analyses between horseshoe crabs and their symbiotic planarian species, and understanding their co-evolutionary patterns and population histories.

研究代表者

西田 伸(Nishida, Shin)

宮崎大学・教育文化学部・准教授

研究者番号：40423561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：「生きた化石」として知られるカブトガニ類は、アジアに3種が生息する。日本のカブトガニ集団の遺伝的構造について、ミトコンドリアDNA・AT-rich領域およびマイクロサテライトDNA・8座位を用いて詳細に解析したところ、福岡県・糸島半島を境に東西に遺伝的に分化し、特にその境界に位置する壱岐島の集団は、他の隣接集団と有意に遺伝的に異なることが示唆された。本研究ではさらにカブトガニ類と本種群に寄生するカブトガニウズムシ類の分子系統を比較した。結果、寄生ウズムシの系統関係はほぼ地理的な分布と一致する一方で、一部の地域では宿主と寄生者の関係が入れ子状となり、寄生ウズムシの離合集散の歴史が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：There are three extant horseshoe crabs in Asia, known as a living fossil. Genetic subdivisions were detected in Japanese populations using mtDNA-AT rich marker and eight microsatellite loci. Two genetically distinct groups, the western and the eastern group were detected and the geographic boundary between these two groups is the Itoshima Peninsula, Fukuoka. Especially, population from the Iki Is., which lies in the bordering region between two genetic groups, was significantly differ from neighboring populations. I also studied about phylogenetic relationships of parasitic planarian species on Asian horseshoe crabs. The topology was almost consistent with their geographic distribution patterns. While, some region showed complicated relationships between host and parasites indicating that level of host specificity of this parasitic planarian species was not so high.

研究分野：分子系統・生態学

キーワード：カブトガニ カブトガニウズムシ 共進化 分子系統地理 東アジア 東南アジア

1. 研究開始当初の背景

(1) 「生きた化石」・カブトガニ類はアジアに3種(カブトガニ: *Tachypleus tridentatus*、ミナミカブトガニ: *T. gigas*、マルオカブトガニ: *Carcinoscorpius rotundicauda*) が生息し、いずれも人間活動の影響による生息環境の悪化から、絶滅が危惧される生物種である。日本のカブトガニ (*T. tridentatus*) 集団については、申請者がこれまでに、主にミトコンドリア (mt) DNA 領域を用いて集団遺伝学的解析を行い、国内において本種集団が大きく2つの遺伝的グループ: 西側グループと東側グループに分化していることを示した。また最終氷期頃に日本へ侵入し、創始者効果により遺伝的多様性が低いことを明らかにしている。一方で、離島の個体群である壱岐島の集団や、東側グループ内の詳細な遺伝的構造については不明瞭な部分もあった。

(2) 上述のアジアに生息するカブトガニ類3種には海産プラナリアの一種カブトガニウズムシ (*Ectoplana* spp.) が外部寄生しており、日本と東南アジアからそれぞれ1種が記載されている。カブトガニ (*T. tridentatus*) にのみ寄生するとされる *Ectoplana limuli* (Iijima and Kaburaki, 1916) と、東南アジア産のカブトガニ類の他の2種、ミナミカブトガニおよびマルオカブトガニに寄生するとされる *E. undata* (Sluys, 1983) が知られている(図1)。どちらも外部形態は非常によく似ており、体長6~8mm、体幅0.8~0.9mmで、宿主であるカブトガニ類の脚基部や鰓葉(エラ)に付着し、卵は鰓葉に生み付けられる(Kawakatsu and Sekiguchi, 1988)。しかしながら詳細なこれら寄生ウズムシの分布や、その系統地理的關係については、申請者が2010年に行った予備調査による分布の情報以外には全く知見がなかった。アジアのカブトガニ類生息地では、多くの場合、複数のカブトガニ種がほぼ同所的に生息しており、例えばインドネシア・東カリマンタンでは、



図1 宿主カブトガニ類および寄生ウズムシ類の分布と寄生ウズムシ類における系統解析試料。(括弧およびグレー表示は試料が得られなかったこと、もしくは解析されていないことを示す。)

3種を同時にみることが出来る。寄生ウズムシと宿主カブトガニ類間における宿主特異性についても記録はほとんどない状態であった。もし宿主であるカブトガニ類3種と寄生カブトガニウズムシが共種分化の係にあるとすると、もう1種の存在が予測されるなど、宿主-寄生者の共進化關係を明らかにする上でも興味深い研究対象であるといえる。

2. 研究の目的

(1) カブトガニ日本集団における詳細な遺伝的構造の解明と保全ユニットの策定

(2) アジア地域におけるカブトガニ類と寄生カブトガニウズムシ類の分布調査

(3) アジアに生息するカブトガニ類3種と寄生カブトガニウズムシ類における比較系統地理学-共進化關係の解明

3. 研究の方法

(1) カブトガニ類の試料は、基本的に非侵襲的なサンプリングとし、体液約0.1mlを採取して、個体はすぐにリリースした。体液はRNAlater (ambion) もしくはDNeasy kit 付属の lysis buffer 中に攪拌し、冷蔵もしくは冷凍にて保管された。解析試料は国内11ヶ所の生息地より、後述する mtDNA 解析については600個体以上を、マイクロサテライトDNA解析については250個体以上を用いた。全DNAの抽出はDNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)による。解析領域は mtDNA・AT-rich 領域の396bpで、Nishida and Koike (2009)の方法による。マイクロサテライト(MS) DNA解析は、報告者が開発した8座位(Nishida and Koike 2010)を調査した。得られたデータは各種ソフトウェアを用い、集団遺伝学的解析・系統解析を行った。

(2) カブトガニウズムシ類のカブトガニ類への寄生状況を調査するため、インドネシア、フィリピン、マレーシアにおいて野外調査を行った(図1)。なお本調査・試料採取はインドネシア・ボゴール農業大学(代表: Yusli 博士)、フィリピン・国立博物館(代表: Manuel-Santos)、台湾中央研究院(Yang 博士)らとの共同研究として実施された。これまでにカブトガニ生息に関する情報のある地域を中心に、現地カウンターパートと共に、地元住民および漁業者への聞き込みとカブトガニ類の捕獲を依頼した。捕獲されたカブトガニ類は種同定後、形態計測、DNA解析用の体液の採取した後、個体腹面を中心に寄生ウズムシ類を探索した。発見されたウズムシ個体は99.5%エタノール中に固定した。

(3) 寄生ウズムシのDNA解析は、99.5%エタノールにて固定された1個体ずつから、QIAamp DNA micro kit (QIAGEN) を用い

て全 DNA を抽出した。系統解析は mtDNA・COI 遺伝子の一部配列を対象とし、本種群を特異的プライマーを設計し、313 bp を増幅した。

4. 研究成果

(1) 国内 11 ヶ所の生息地から 9 つの mtDNA・AT-rich ハプロタイプ (mtDNA タイプ) が得られた。図 2 はハプロタイプとその頻度分布を示している。糸島半島を境に博多湾 (HKT) より東側はほぼ全ての個体がハプロタイプ AT1 を示す一方で、加布里 (KFR) より西側は AT2、AT3 を保持し、遺伝的に大きく東側の集団とは異なっていた。壱岐島 (UUB) の個体は全て AT1 を示し、mtDNA 解析では東側グループに含まれた。両系 (母系 + 父系) 遺伝マーカーである MS-DNA 解析においては、250 個体以上を解析した。図 3 はそのデータを用いて帰属性解析の一つである STRUCTURE 解析を行った結果である。グラフの縦棒は各個体における集団要素の割合を示しており、本解析により日本集団において 4 つの集団要素 (図中の赤、青、黄、緑) が検出された。九十九島 - 佐世保 (KSB) および伊万里 (IMR)、そして壱岐 (UUB) の個体群に於いて青色集団要素が優占し、他の東側集団と区別できる。mtDNA では西側グループであった加布里は、MS 解析では東側グループに近い構成をみせた。

遺伝子分化係数でみると、MS 解析は mtDNA 解析よりも高い解像度を示し、西側グループの九十九島 - 佐世保 (KSB)、伊万里 (IMR)、加布里 (KFR) は互いに有意に遺伝的に異なっていた。さらに mtDNA ではほぼ単系統であった東側グループ内においても、最も東側の解析個体群であった平生 (HRO) が、隣接地域個体群と有意な遺伝的異なりを示した。壱岐 (UUB) についても、値は非常に小さいものの隣接する伊万里 (IMR) および博多湾 (HKT) とは有意な遺伝的分化が検出され、この離島の個体群は一つの管理ユニットとすべきであることが示唆された。日本の各地域個体群の遺伝的多様度 (ヘテロ接合度の観測値) は例えば中国本土の本種個体群と比べて、0.42 - 0.57 と低い値を示した。これは最北端の集団である日本個体群が、最終氷期頃に東南アジアから大陸沿岸を經由してきたと推測されることと関連し、その過程において創始者効果もしくはボトルネックイベントを受けたことを示唆している。

図 4 はこれら遺伝的解析データに基づき策定した保全管理ユニット案である。大きく 2 つの遺伝的グループ: 西側グループと東側グループをコアとして、各グループ内も遺伝的分化の程度が有意ではないものを一つのグループ・地域管理ユニットとした。西側の各地域個体群はそれぞれが管理ユニットを構成している。壱岐および平生個体群も他の隣接個体群とは別に管理されるべきであろう。

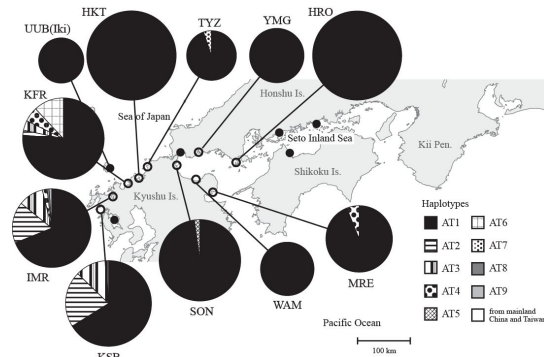


図 2 ミトコンドリア DNA・AT-rich 領域におけるハプロタイプ頻度分布図 (Nishida et al. 2015 を改変)

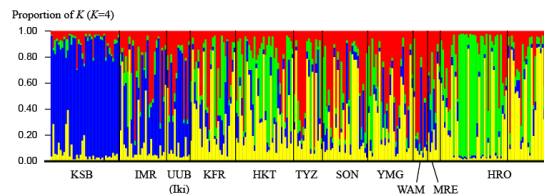


図 3 マイクロサテライトマーカーによる STRUCTURE 解析結果

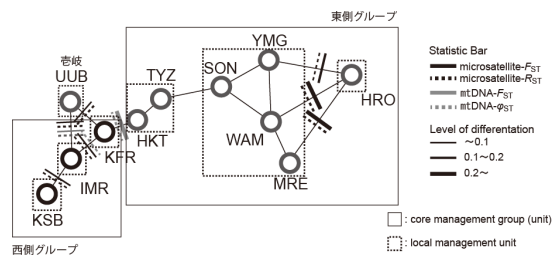


図 4 日本のカプトガニ集団における遺伝的保全管理ユニット案 (Nishida et al. 2015 を改変)

(2) カプトガニおよび寄生ウズムシ類の生息/試料採取調査では、本課題以前の予備調査も含めてインドネシア: 西ジャワ、東ジャワ、ジャワ島南部沿岸部、スマトラ中東部、東カリマンタン、フィリピン: パラワン島、ルソン北西部(ザンパレス)地方、マレーシア: ジョホール西岸を調査した。結果、ジャワ島南部沿岸部、スマトラ島西部沿岸、フィリピン・ルソン北西部を除き、カプトガニ類の生息を確認、さらにこれら全ての調査地においてカプトガニウズムシ類の寄生が確認され、試料を採取できた (図 1)。本調査地からの寄生ウズムシの報告は全て初めてとなる。ジャワ島南部沿岸部およびフィリピン・ルソン北西部はカプトガニ類の生息を示す確かな証拠は発見されず、本種群が生息していない可能性が高い。ジャワ島南部沿岸部については、個体は得ることができなかったものの聞き取り調査等により、カプトガニの生息は確かなようであった。スマトラ島中東部や一部の地域を除きインドネシアの多くのカプトガニ類生息地において、ミナミカプトガニとマルオカプトガニはほぼ同所的に生息していた。特に東カリマンタンでは 3 種のカプトガ

二類が捕獲された。調査されたカプトガニ類の総個体数は 500 を越え、100 以上の個体から寄生ウズムシ類の試料を得た。

(3) 宿主カプトガニ類および寄生者カプトガニウズムシ類の共進化関係について、カプトガニ類の分子系統関係と、寄生ウズムシ類の mtDNA・COI 遺伝子における系統解析結果 (図 5) とを比較した。試料は上述の通り、日本、台湾、フィリピン・パラワン島、マレー半島南部、東カリマンタン、ジャワ島東部・西部、スマトラ島北部・中西部から得た。本 DNA 解析から、寄生ウズムシ類の既知とされる 2 種を明確に区別することはできず、その樹形は地理的分布とほぼ一致し、また大きく 3 つのクレードが確認された。このうち 2 つのクレードにおいては、宿主と寄生者の関係が入れ子状態であり、カプトガニ類と寄生ウズムシ間における宿主特異性は高くないことを示唆した。一方で東カリマンタンにおいて、ほぼ同所的に生息するミナミカプトガニおよびマルオカプトガニより得られたウズムシのうち、マルオカプトガニに寄生するもののみが、他と比較的離れたクレードを形成した。マルオカプトガニは他種に比べて、マングローブ帯への依存が強く、このマイクロハビタットの異なりが、この地域においてマルオカプトガニからミナミカプトガニおよびカプトガニへの宿主転換を制限している可能性がある。このようにある程度の地域性を持つ大きなクレード、および宿主 - 寄生者特異的クレードの形成、一方で宿主 - 寄生者が入れ子となる状態は、寄生ウズムシ類の過去の分化とその後の集合、つまり離合集散の歴史を反映していると推測され、おそらくこれは、氷期 - 間氷期イベントの影響を強く受け、さらには宿主カプトガニ類における分化と再集合の歴史をも反映していると推察される。

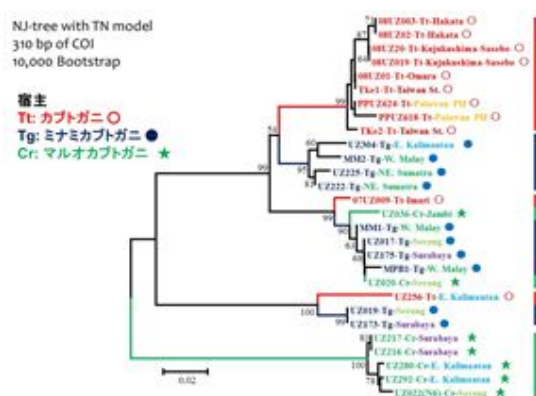


図 5 カプトガニウズムシ類 *Ectoplana* spp. の mtDNA・COI 遺伝子に基づく系統関係

< 引用文献 >

Ijima, I. and Kaburaki, T., 1916. Preliminary descriptions of some Japanese Triclad. Annot. Zool. Japon.,

9: 153-171.

Sluys, R. 1983. A new marine triclad ectoparasitic on Malaysian and Indonesian horseshoe crabs (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida). Bijdr. tot de Dierkunde 53:218-226.

Kawakatsu, M. and Sekiguchi, K. 1988. Redescriptions of *Ectoplana limuli* (IJIMA et KABURAKI, 1916) and *Ectoplana undata* SLUYS, 1983 (Turbellaria, Tricladida, Maricola), Collected from the Three Extant Species of Asian Horseshoe Crabs. Jobu J. Manag. Infor. (上武大学経営情報学部論集) 5, 57-94.

Nishida, S. and Koike, H. 2010. Isolation and characterization of compound microsatellite loci in the tri-spine horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Conservation Genetics Resources 2(1): 31-33.

Nishida, S. and Koike, H. 2009. Genetic structure of Japanese populations of *Tachypleus tridentatus* by mtDNA AT-rich region sequence analysis. In: Tanacredi, J., Botton, M. and Smith, D. (eds) Biology and Conservation of Horseshoe Crabs. Springer, pp183-196.

Nishida, S., Kuroyanagai, K. and Koike, H. 2015. Genetic features of *Tachypleus tridentatus* in Japan and an alien (non-native) population founded at Ise-Mikawa Bay, Chubu Region, central Japan. In: Carmichael, R. H., Botton, M. L., Shin, P. K. S., Cheung, S. G. (Eds.) Changing Global Perspectives on Horseshoe Crab, Biology, Conservation and Management. (in press)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

西田 伸 2013. 宿主カプトガニと寄生者カプトガニウズムシの共進化 - カプトガニウズムシ類の分子系統解析 -. かぶとがに 33: 14-18. 査読無

西田 伸 2012. インドネシア、フィリピン、マレーシアのカプトガニ類とカプトガニウズムシ類 - 2011 年度東南アジア調査 -. かぶとがに 32: 25-30. 査読無

西田 伸 2011. カプトガニの Hot Spot - インドネシアでのカプトガニ調査 -. かぶとがに 31: 12-23. 査読無

〔学会発表〕(計2件)

西田 伸. アジア産カブトガニ類に外寄生するカブトガニウズムシ類 (*Ectoplana* spp.) の分子系統. G2-20, 第60回日本生態学会. 静岡. 2013年3月8日.

Nishida S. and Koike H. Genetic population structure of *Tachypleus tridentatus* in Japan and attempt to comparative phylogenetic study with parasitic planarian species on Asian horseshoe crabs. International Workshop on the Science and Conservation of Asian Horseshoe Crabs. Hong Kong, China, 13-16th June, 2011.

〔図書〕(計2件)

Nishida, S., Kuroyanagai, K. and Koike, H. 2015. Genetic features of *Tachypleus tridentatus* in Japan and an alien (non-native) population founded at Ise-Mikawa Bay, Chubu Region, central Japan. In: Carmichael, R. H., Botton, M. L., Shin, P. K. S., Cheung, S. G. (Eds.) Changing Global Perspectives on Horseshoe Crab, Biology, Conservation and Management. (in press) 査読有

西田 伸. 2014. 生きている化石! 「カブトガニ」. pp228-230., 石瀧豊美(編著). 新人物文庫 博多謎解き散歩. KADOKAWA, 東京. 287pp. (2014年1月刊行)

〔その他〕

ホームページ等

Horseshoe crabs in Asia (species identification) :

<https://sites.google.com/site/snnishida/home/studies-and-topics/horseshoe-crabs-in-asia>

アジアのカブトガニ類と種の判別 :

<https://sites.google.com/site/snnishida/home/studies-and-topics/horseshoe-crabs-in-asia-jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西田 伸 (SHIN, Nishida)

宮崎大学・教育文化学部・准教授

研究者番号 : 4 0 4 2 3 5 6 1