

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24760439

研究課題名(和文) 海洋生物がメソスケールにおいて形成するメタ個体群の変動性を評価する試み

研究課題名(英文) Estimation of marine metapopulation dynamics in mesoscale

研究代表者

上村 了美(Kamimura, Satomi)

大阪市立大学・大学院工学研究科・客員研究員

研究者番号：10450785

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)：生息地の消失や創造の起こりやすい東京湾のようなメソスケールにおいて、分散能力など生態的特徴の異なるムラサキイガイとホソウミナナのメタ個体群構造を明らかにし、環境変動に対するメタ個体群構造の応答が異なる可能性についても検証した。既往文献と独自に開発したSSRマーカーを使って解析し、1)ムラサキイガイとホソウミナナには遺伝的分化の程度に大きな差のないこと、2)両種ともに西岸と東岸の一部の個体群間に遺伝的交流のある可能性、3)ホソウミナナの方が保守的なメタ個体群構造である可能性、を示唆する結果が得られた。これらの結果について、分散能力(内的要因)と循環流(外的要因)との関連から考察した。

研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate the structures of the *Mytilus galloprovincialis* (planktonic larvae) and *Batillaria attramentaria* (*B. cumingii*, benthic juveniles) metapopulations in Tokyo Bay, where anthropogenic disturbance leads to the frequent disappearance and regeneration of their habitat. The metapopulation structures were assessed using microsatellite markers and no genetic distance (DA) was detected among *M. galloprovincialis* and *B. cumingii* populations. The result of NJ trees suggests that there is gene flow between the subpopulations of the west and east coasts, in both species. *B. cumingii* could maintain similar metapopulation structures in different cohorts, and the *M. galloprovincialis* metapopulation exhibited structural dynamics. We discuss the relationship between these results and the potential role played by dispersal ability (internal factor) and circulating flow (external factor) in driving these dynamics in Tokyo Bay.

研究分野：海洋生態学

 キーワード：マイクロサテライトマーカー 汎用蛍光プライマー 集団遺伝子解析 次世代シーケンサー 東京湾  
ウミナナ類 ムラサキイガイ マルチプレックスPCR

## 1. 研究開始当初の背景

生物は、加入と供給（シンクとソース）の役割を担う複数の局所個体群が連結するネットワーク、すなわちメタ個体群を形成し、局所個体群間を移動・分散しつつ、種を存続させている。近年の海外におけるメタ個体群に関する研究では、局所個体群の絶滅がメタ個体群全体に広がる影響や（Gouhier and Guichard, 2007）、メタ個体群全体の成長とソースとなる局所個体群への加入量の関係が示されるなど（Carson et al., 2011）、メタ個体群の形成と絶滅のメカニズムが解明されつつある。国内においては、海洋生物の回復が急務である都市型の沿岸域、特に東京湾において、海洋生物のメタ個体群構造を利用した施策が提案されているが（粕谷ら, 2003; Furota et al., 2002 など）、しかしながらメカニズムの解明には至っていない。

メタ個体群研究の発展的研究であるメタ群集研究において、移動分散能力に代表される生態的特徴の違いがメタ個体群構造を決定する重要な要因であると考えられているが（瀧本, 2008）、先に示したように国内外のメタ個体群研究では、メタ個体群の実態を把握することに主眼が置かれており、生態的特徴とメタ個体群構造の関連性を示した実証的解明はほとんど行われていない。沿岸域の代表種であるウミニナ類の個体群動態研究やムラサキイガイを含む付着生物の分布調査から、これらがメソスケール（1つの湾レベルの大きさ）においてメタ個体群を形成し、それが分布や個体群動態に関連していることは容易に推測できたが、メタ個体群構造の解明には至っていない。ホソウミニナは直達発生を行うため分散能力は低く、ムラサキイガイについては浮遊期を持つため比較的分散能力が高いという特徴がある。以上のことから、この2種のような移動分散に関する生態的特徴が異なる種を比較することによって、生態的特徴とメタ個体群構造の関係の

実証的検証が可能になるという着想に至った。さらに、都市型の沿岸域、特に東京湾では、埋立てによる生息地の消失や貧酸素によって移動の制限が起こりやすい。一方で、生息場所の造成によって、海洋生物の生息地を増やす試みが行われている。先に示した2種がこのような状況にあると、既存のメタ個体群の加入と供給が減少したり、局所個体群間の連結性や役割が変化するなどのネットワークの再構成が起こることが予想される。その際に、分散能力の違いにより、異なる応答が生じるのではないかと推測された。そこで本研究では、生態的特徴が異なる種を比較し、環境変動に対するメタ個体群構造の応答が異なる可能性についても検証する必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

沿岸域の代表的種であるムラサキイガイとホソウミニナについて、集団遺伝学的手法を用いて、メタ個体群構造を解明し、生態的特徴とメタ個体群構造の関連性を明らかにする。さらに、加入時期が異なるコホート毎に集団遺伝学的解析を行い、各コホートのメタ個体群構造を明らかにする。これより、メタ個体群構造の環境変動に対する応答が異なる可能性を検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 遺伝子マーカーの探索：既発表論文の応用および独自に開発を行う。

(2) 生態的特徴とメタ個体群構造との関連の解明：各局所個体群の遺伝的組成を明らかにし、メタ個体群構造を解明し、2種の違いを明らかにする。これより、生態的特徴とメタ個体群構造の関連性を示す。

(3) メタ個体群の変動性の検討：加入時期の異なるコホート毎に同様の解析を行い、メタ個体群構造の変動性（先述のメタ個体群構

造がどのように変化するのか)を検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 遺伝子マーカーの探索

ムラサキイガイについては、海外で報告されたマイクロサテライト遺伝子マーカーについて、東京湾のサンプルについて PCR 効率のよいものをスクリーニングした。ホソウミニナについては、次世代シーケンサーにより作成したライブラリーを活用し、マイクロサテライト領域を抽出、プライマー設計およびスクリーニングを行った。それぞれについて、マルチプレックス PCR および汎用蛍光プライマー法 (fluorescently labelled universal primer, Blacket et al. 2012) を用いた PCR の条件設定を行った。遺伝子マーカーについては表 1、2 に示す。

表 1. ムラサキイガイの遺伝子マーカー。

locus	repeat motif	size range	Na	reference	set
Mc65	AG	164-214	4-8	1	A
Mc84	AT	144-192	3-8	1	A
Mc137	AT	134-182	8-12	1	A
Mc172	AT	152-218	4-10	1	A
MGE001	TA	156-190	4-9	2	B
MGE002	CA	281-297	1-5	2	B
MGE005	TGA	240-264	4-8	2	B
MGE008	AT	273-317	3-9	2	B
MT203	CA	188-228	5-10	3	B
MT282	GT	348-400	5-11	3	B

表 2. ホソウミニナの遺伝子マーカー。

locus	repeat motif	size range	Na	reference	multiplex set
BAttr105	(TAAG)7	102-152	2-8	-	-
BAttr106	(CAGTT)6	170-195	2-5	-	-
BAttr107	(CAATA)3(CAACA)2 (CAATA)7	188-228	5-9	-	-
BAttr103	(CACT)6	122-136	1-3	-	-
BAttr104	(TCA)8	252-267	1-5	-	-
BAttr101	(GTTT)6	159-179	2-5	-	-
BAttr102	(ATT)5	209-236	1-4	-	-
BAttr108	(CAA)5	164-204	3-7	-	-
BAttr109	(AAC)9	203-251	2-9	-	-
BAttr05	CA	169-237	13-22	-	-
BAttr18	A)7CCA(TCA)4GTA(TCA)3G	119-152	3-5	-	-
BAttr36	(CA)25	246-282	8-16	-	-
BAttr41	(GT)7GC(GT)3	203-213	3-6	-	-
BAttr44	(GT)4GC(GT)7	144-200	2-4	-	-

マルチプレックス PCR および汎用蛍光プライマー法は近年注目されている技術であり、マーカーの開発および解析に必要な時間や費用のコストを削減し、効率的解析を可能にする。しかしながら、PCR 効率の不安定さ、マルチプレックスの組み合わせを決定する煩雑さなどの問題点が指摘され、実用された例は多くなかった。この問題点については、

マルチプレックス PCR 用に調整された PCR 酵素 (Quiagen Multiplex PCR Kit) の使用、複数のプライマーの組み合わせを設計するソフトの活用 (Multiplex manager 1.2 Holleley & Geerts 2009)、必要数の 3~10 倍のマーカー候補をスクリーニングすること、などで問題点を解決した。

##### (2) 生態的特徴とメタ個体群構造との関連

先の遺伝子マーカーを用いて、メタ個体群構造の解析を行った。ムラサキイガイについては、2009 年 12 月から 2010 年 2 月に採集した個体を用いて実験し、大型個体と小型個体に分けて、異なる時期に加入した個体群として扱った。ホソウミニナについては、2010 年と 2014 年に採集した個体を用い、異なる時期に加入した個体群として解析した。データ解析には POPTREEW (Takezaki et al. 2014) を用い、遺伝的距離 DA を計算し、NJ 法によって個体群のクラスタリングを行った (図 1、3)。この結果の空間分布を図 2、4 に示す。

ムラサキイガイについて、大型個体群の遺伝的距離 DA の値は  $0.108 \pm 0.025$  で、大きく 3 つのクラスターに分かれた (図 1)。最も多くの地点を含んだクラスターは、西湾口 (TP02, TP04)、湾中央部 (TP06)、湾奥部 (TP10) の地点を含んでいた。東湾口 (TP14) は別のクラスターに分類され、湾中奥部の西 (TP08) 1 地点と東岸湾中央部 1 地点 (TP12) が同じクラスターに分類された。

ホソウミニナでは、2010 年の個体群の遺伝的距離 DA の値は  $0.102 \pm 0.029$  で、大きく 2 つのクラスターに分かれた。西岸湾口 (野島)、湾奥部 (谷津)、東岸湾中央部 (小櫃川) が同じクラスターに分類され、東岸の湾口 (富津) 1 箇所と湾中奥部 (玉前) 1 箇所が同じクラスターに分類された。

ムラサキイガイの大型個体とホソウミニナの 2010 年個体群の空間分を比較すると、ムラサキイガイは大きく 3 つのクラスターに分かれたのに対し、ホソウミニナは 2 つの

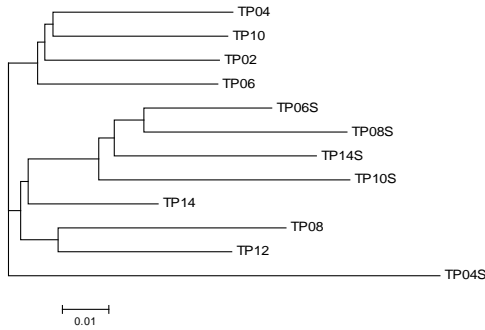


図 1 . ムラサキイガイの各個体群のクラスタリング . 地点名のみは大型個体群、S は小型個体群を示す .

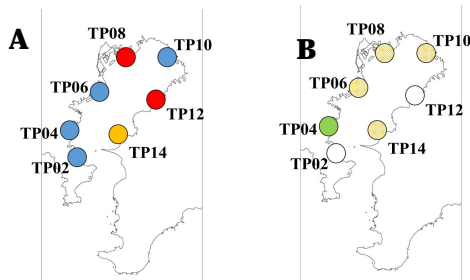


図 2 . ムラサキイガイの遺伝子集団の空間分布 . A は大型個体、B は小型個体 . 同色は同じクラスターに分類されたことを示す . 白丸で示した地点はデータなし .

クラスターに分かれたが、それぞれの遺伝的距離に大きな差はなかった . これは、ムラサキイガイとホソウミニナの遺伝的分化の程度にほとんど差がないことを示唆している . また、両種の個体群では、西岸と東岸に同じクラスターの個体群があり、西岸と東岸の個体群間に遺伝的交流のあることが示唆された .

### (3) メタ個体群の変動性の検討

ムラサキイガイの小型個体の集団について、西岸中央部 (TP06, TP08)、湾奥 (TP10) および東岸湾口部 (TP14) が同じクラスターに分類され、これらとは別に西岸湾口 (TP04) の 1 地点が別のクラスターを形成した (図 1 および図 2B) . この結果を大型個体と比較すると、小型個体群では西岸の湾口部の個体群 (TP04) が主たるクラスターから外れたり、東岸湾口部の個体群 (TP14) が主たるクラスターに含まれるという違いが見られた . また、

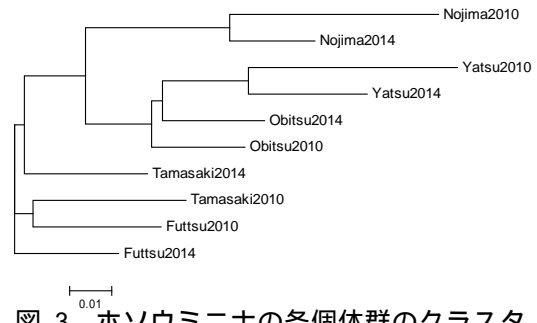


図 3 . ホソウミニナの各個体群のクラスタリング . 地点名の後に記載した 2010 は 2010 年採集、2014 は 2014 年に採集した個体群 .

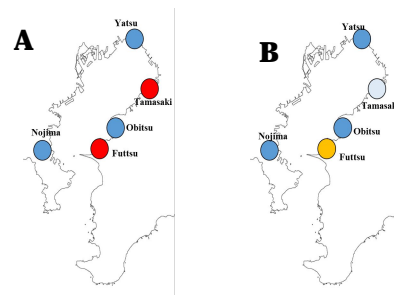


図 4 . ホソウミニナの遺伝子集団の空間分布 . 同色は同じクラスターに分類されたことを示す . A は 2010 年、B は 2014 年に採集した個体群 .

同じ調査地点から採集した大型個体と小型個体には相対的に遺伝的距離があり、大型個体群もしくは小型個体群が同じクラスターを形成する傾向がみられた .

ホソウミニナの 2014 年の個体群では、西岸湾口 (野島)、湾奥部 (谷津)、東岸湾中央部 (小櫃川) が同じクラスターに分類され、さらに、東岸の湾口 1 箇所 (富津) と湾中央部 1 箇所 (玉前) がそれぞれ別のクラスターに分類された (図 3 および図 4B) . この結果を 2010 年の個体群と比較すると、共通点は西岸湾口、湾奥部、東岸湾中央部が同じクラスターに分類されたことがあげられる . 異なるのは、東岸の湾口 1 箇所と湾中央部 1 箇所が 2014 年の個体群では別のクラスターに分けられたことである . 同じ調査地点から採集した 2010 年と 2014 年の個体群については、西岸湾口 (野島)、湾奥部 (谷津)、東岸湾中央部 (小櫃川) では、同じ採集地の個体群は

同じクラスターに分類され、遺伝的に近いことが示された。一方で、東岸の湾口（富津）と湾中央部（玉前）は、2010年と2014年で異なるクラスターに分類され、遺伝的距離のあることが示唆された。

さらにメタ個体群構造の変動性について、2種を比較すると、ホソウミニナでは主たるクラスターに分類される個体群がほとんど変動しないのに対し、ムラサキイガイでは西岸中央部（TP06）と湾奥（TP10）以外は変動していることが示された。さらに、ホソウミニナは同じ採集地の異なる年代の個体群は同じクラスターに分類される傾向があったのに対し、ムラサキイガイでは大型個体と小型個体には相対的に遺伝的距離があった。このことは、ホソウミニナの方が、保守的なメタ個体群構造である可能性を示唆している。

#### （4）考察

ムラサキイガイは浮遊幼生期を持ち、ホソウミニナは直達発生であることから、ホソウミニナの方の分散能力が低く、各個体群の遺伝的分化が進んでいるのではないかと推測したが、本結果はこの推測を支持しなかった。その理由のひとつとして、ホソウミニナの直達発生後にフローティングによって移動分散する機構が東京湾スケールすなわちメソスケールにおいて遺伝的交流に機能している可能性が考えられた。また、遺伝的分化に深く関連する彼らの分散の範囲や方向は、分散する時期の循環流にも影響されると推測される。東京湾の循環流については、近年のHFレーダーによる観測データの解析から、5月から9月にかけて湾奥～中央（東京横断道路より北）の表層において時計回りの循環流が発生し、冬にはこの循環が弱くなる（鈴木、2013）。ホソウミニナのフローティングは6月から7月頃に多く見られるとの報告があり（Adachi and Wada 1999）循環流が発生する時期と重なっている。ムラサキイガイの繁殖期は10月から3月であり（劉・梶原、1983）

循環流の弱まる時期と一致する。以上のことから、分散する時期の循環流の強さによって分散能力の差が縮まり、遺伝的分化の程度に影響した可能性が考えられた。またムラサキイガイ、ホソウミニナともに、西岸と東岸で遺伝的交流のあることが示唆されたことも、循環流が寄与している可能性が考えられる。

メタ個体群構造の変動性について、ムラサキイガイよりもホソウミニナの方が保守的と考えられる結果が得られたことは、浮遊幼生のムラサキイガイよりも直達発生のホソウミニナの方の変動性が低いとした、当初の予測を支持する結果となった。ホソウミニナで同じ採集地の異なる年代の個体群は同じクラスターに分類される傾向があったことは、自らの集団が個体群の維持に寄与する程度が大きいと考えられる。一方で、ムラサキイガイは大型個体と小型個体には相対的に遺伝的距離があったことから、自らの集団からの加入よりも他集団との連結性が個体群の維持に重要であることが示唆される。

ムラサキイガイの大型個体と小型個体の各個体群について、西岸や東岸の湾口部の個体群が主たるクラスターから外れたり含まれるなど変動したことについて、西岸・東岸ともに湾口にある集団は遺伝的に変動しやすい可能性が示唆された。この理由として、湾口にある集団は湾外の集団の影響を受けやすく、湾内の個体群との遺伝的距離が変動しやすいのではないかと推測している。

#### （5）今後の研究の展開

本研究の結果をふまえ、視点を湾外に広げ、湾内と湾外との連結性について、その変動性を解明するといった研究の展開が期待できる。湾内のメタ個体群の維持もしくは劣化したメタ個体群の回復には、湾内のネットワークだけでなく、湾外との連結性がどのように寄与するのか、また生態的特徴との関連性についても考察すれば、メタ個体群およびメタ群集研究の発展に寄与することが可能とな

る。

#### <引用文献>

Gouhier, T. C., & Guichard, F. (2007) Local disturbance cycles and the maintenance of heterogeneity across scales in marine metapopulations. *Ecology*, 88(3), 647-657.

Carson, E. et al. (2011). Population structure, long-term connectivity, and effective size of mutton snapper (*Lutjanus analis*) in the Caribbean Sea and Florida Keys. *Fishery Bulletin*, 109(4), 416-428.

粕谷智之 他(2003): 夏季東京湾におけるアサリ (*Ruditapes philippinarum*) 浮遊幼生の出現密度の時空間変動. 国土技術政策総合研究所研究報告, 第8号, pp. 1-13.

Furota, et al. (2002) Contrasting population status between the planktonic and direct-developing batillariid snails *Batillaria multiformis* (Lischke) and *B. cumingi* (Crosse) on an isolated tidal flat in Tokyo Bay. *Venus*, 61, 15-23.

瀧本 岳 (2008) 「メタ群集の理論と適用」大串隆之・近藤倫生・野田隆史編『生物群集と空間』(シリーズ「群集生態学」第5巻):73-86.

Blacket et al. (2012) Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—An efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Molecular Ecology Resources* 12: 456-463

Takezaki et al. (2014). POPTREEW: web version of POPTREE for constructing population trees from allele frequency data and computing some other quantities. *Molecular biology and evolution*, msu093.

Holleley, C. E., & Geerts, P. G. (2009). Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *Biotechniques*, 46(7), 511-517.

鈴木 高二朗 (2013) 東京湾の海水交換と貧

酸素化に及ぼす淡水流入と風の影響について 港湾空港技術研究所資料 (1276), 3-97.

Adachi, N., & Wada, K. (1999). Distribution in relation to life history in the direct-developing gastropod *Batillaria cumingi* (Batillariidae) on two shores of contrasting substrata. *Journal of Molluscan Studies*, 65(3), 275-288.

劉明淑& 梶原武. (1983). ムラサキイガイの繁殖生態. 付着生物研究, 4(2), 11-21.

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

上村了美、地中海原産のムラサキイガイ *Mytilus galloprovincialis* の遺伝子は日本沿岸にどの程度侵入しているのか?、日本生態学会第62回全国大会、2015年3月21日、鹿児島大学 郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)

KAMIMURA, Satomi, Genetic characteristics of the invasive species *Mytilus galloprovincialis* in Japan, The 2nd Asian Marine Biology Symposium, 1 - 2 October 2014, Jeju(Korea).

上村了美 他、次世代シーケンサーによるウミナメの効率的 SSR マーカー開発、2012年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会、2012年10月7日、東邦大学 習志野キャンパス(千葉県船橋市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

上村 了美 (KAMIMURA, Satomi)  
大阪市立大学・工学研究科・客員研究員

研究者番号: 10450785