

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20922

研究課題名(和文) 遺伝マーカーおよび蛍光標識法を用いた沿岸性腹足類幼生の生態解明

研究課題名(英文) Studies on larval ecology of coastal gastropods by population genetics and fluorescent marking

研究代表者

福森 啓晶 (Fukumori, Hiroaki)

東京大学・大気海洋研究所・特任研究員

研究者番号：60746569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：沿岸性無脊椎動物の多くは、浮遊幼生期を持ち、広い分布域をもつ。アマオブネ科巻貝類は海産・陸水種を含み、河川種の多くは両側回遊をおこない、幼生期に海流によって分散する。マイクロサテライト解析の結果、小笠原群島・南西諸島集団を含めた回遊種の日本産集団内に明瞭な遺伝的構造は確認されず、同科海産種と同様に分散能力が高いことが示唆された。また、アマオブネ類幼生への蛍光標識付着をおこない、野外における幼生実験への基盤を確立した。

研究成果の概要(英文)：Many species of coastal invertebrates with a planktonic larval stage often have a wide geographical distribution. The gastropods of the family Neritidae (Neritimorpha) include marine and freshwater species. Many species of neritids living in coastal rivers have an amphidromous lifecycle, and their larvae are dispersed by ocean current. As a result of population genetics using microsatellite data, there was no spatial genetic structure within Japanese population (Mainland Japan, Ogasawara Islands and Nansei Islands) of amphidromous species, and they were found to have high dispersal ability as with marine relatives. Fluorescent marking of neritid larvae is expected to be a useful tool in the field experimental studies on larval ecology.

研究分野：集団遺伝学・生態学

キーワード：幼生分散 集団遺伝学的解析 蛍光マーカー 両側回遊 腹足類 沿岸域 海流 マイクロサテライト

1. 研究開始当初の背景

海洋生物の約 70%はその初期生活史において、浮遊幼生期を持ち、種によっては数千 km 以上の地理的に非常に広い範囲に分布する。海産動物がどのくらいの距離を分散するのか、という課題は各種の個体群動態、水産重要種の管理、海洋動物の多様性保全を理解する上で基盤となる情報である。

これまで、一般的に沿岸性生物の幼生個体の多くは産まれた環境とは離れた場所へ分散し、各地域集団は他の場所からの幼生供給によって駆動される開放的な生態系だと考えられてきた。しかし、近年発達してきた蛍光・同位体元素による幼生標識（炭酸カルシウムの耳石を利用）を用いた再捕獲法により、浮遊幼生期間（数日から1ヶ月以上）を持つ熱帯沿岸性魚類の複数種において、多くの幼生個体が産まれた場所に戻ってくることが明らかとなってきた。遺伝子マーカーを用いた沿岸性種の解析では、遠く離れた地域間における幼生分散の存在が示唆されているが、水産重要種以外では、解像度の高い核マイクロサテライトマーカー（数塩基の単位配列の繰り返し；集団遺伝解析に有用）が開発されている種は未だ少なく、地域間の独立性や交流の有無の検証は不十分である。自己再生産（セルフリクルートメント）率の割合については、浮遊幼生期をもつ多くの沿岸性種で情報が少ない。また、沿岸河川域には、淡水域で生まれた幼生が海へ下り、数ヶ月かけ成長したのち、河口付近で着底して川を遡る両側回遊をおこなう動物が息する。親のハビタットの違いが各種の遺伝的構造に与える影響については、近縁分類群間の比較が重要となる。

2. 研究の目的

沿岸性海洋生物の多くは浮遊幼生期を持ち、その個体群動態・生物地理を理解するためには、幼生の分散および生態の把握が必須である。その一方で、微少な幼生を追跡することは難しく、一つの個体とその初期生活史中にどのような挙動をとるかは多くの種でほとんどわかっていない。本研究では、炭酸カルシウムの殻をもつ点で優れた研究材料である軟体動物腹足類を用いて、各種の遺伝子マーカーおよび幼生蛍光標識法を開発、各地域・ハビタット間のコネクティビティを検証する。本研究課題は、以上の研究により、沿岸域における幼生分散・動態を把握する基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究課題では、沿岸性腹足類（アマオブネ科貝類など）について、分子・生態情報を基に幼生分散を評価する。まず、1)核 SSR マーカーの探索・作成により、2)各種の遺伝

的集団構造解析を遂行し得る基盤を作る。各集団の遺伝的組成を比較し、各地域における遺伝的偏りを把握することで、各種の幼生分散能力・海流分散の程度を検討する。次に、各地域集団の自己再生産率を直接的に検証するための基盤として、3)蛍光物質を用いた幼生標識法の確立をおこなう。

4. 研究成果

本課題では、潮間帯岩礁および河川域に息するアマオブネ科貝類を用いて、その遺伝的・幼生生態的知見を集積した。アマオブネ類の河川種の多くは両側回遊をおこない、海洋での浮遊幼生期をもつため、海産の近縁分類群との比較が可能である。

遺伝子解析に用いる試料を得るため、研究期間中に南西諸島・小笠原諸島・ニューカレドニアなどの島嶼域を中心に採集をおこなった。その結果、海産種（アマオブネ・キバアマガイなど）・河川種（イシマキ・フネアマガイなど）を含め、各地域において、十分な量のサンプルを得た。これまでに採集した腹足類サンプルとあわせ、各種約 500~1,000 個体より、遺伝的集団構造の解析に使用する個体を選別し、DNA を軟体部筋組織から抽出した。

抽出 DNA より、ミトコンドリア DNA のシトクロームオキシダーゼサブユニット I (COI) 遺伝子の相同塩基配列を増幅、塩基配列約 650 bp を決定した。得られた COI 配列から系統樹およびハプロタイプネットワークを形成し、各集団間の遺伝的交流の有無を検証した。その結果、地域的な遺伝的集団構造は確認されず、数千キロ離れた地点間でもハプロタイプの共有がみられた。

続いて、マイクロサテライト領域を用いた集団遺伝解析をおこなうため、東京大学大気海洋研究所所有の次世代シーケンサー（Roche/454 GS Junior）により、アマオブネ類 4 種について、Shotgun sequencing によるマーカー候補配列の探索をおこなった。得られた大量塩基配列データより、単純反復配列を含むリードを抽出し、マイクロサテライトマーカーの候補を選定した。その後、各個体を用い、マーカーの有効性を検証した。開発したマーカーについては、マルチプレックス PCR 系の構築をおこない、複数マーカーを同時に増幅できる Multiplex panel を作成した。マイクロサテライトデータについては、解析ソフト STRUCTURE を用いて各集団間の遺伝的交流の有無を検証した。その結果、海産・両側回遊性の種の両方について、小笠原群島・沖縄離島集団を含めた日本産集団に明瞭な遺伝的構造は確認されなかった（図 1）。これは各種の幼生分散能力が高いことを示し、各地の集団維持には自己再生産だけでなく他地域集団からの幼生加入が重要であることを示唆する結果となった。

続いて、Calcein (Ex/Em: 494/517 nm) によ

る幼生殻蛍光色素附着実験をおこなった。本課題では、水産重要種での既往研究をもとに

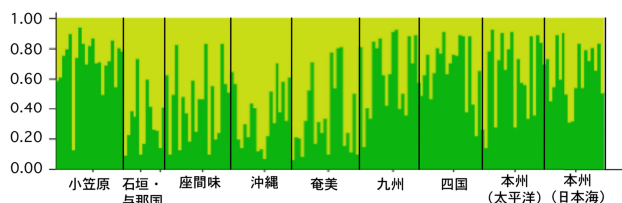


図1. 河川性アマオブネ類(イシマキ, N=180)のマイクロサテライト19座による遺伝構造解析(STRUCTURE, K=2).

アマオブネ類幼生での蛍光標識附着を検討したが、幼生時に Calcein 溶液に浸透することで殻体に蛍光物質が取り込まれる。野外から持ち帰ったアマオブネ類を飼育下で産卵させ、その卵のうより孵化した幼生を Calcein 海水(50-200 mg/L)で染色し、蛍光顕微鏡により孵化した幼生が殻体に蛍光物質を取り込んでいるのかを観察した。濃度の違いによる幼生残率に差はみられず、約2ヶ月間飼育することに成功し、野外実験への応用が期待できる。

研究期間全体を通して、アマオブネ類を対象に集団遺伝学的・幼生生態学的手法から、各種の各集団間におけるコネクティビティを検討した。その結果、地理的に孤立した海洋島集団においても、短時間(数世代程度)・高頻度で起きる幼生の長距離輸送により、現存集団の遺伝的多様性が維持され、攪乱等によるボトルネック後の個体群・多様性回復ポテンシャルが高いことが示唆された。また、魚類では一般的ツールとして定着している幼生蛍光標識法を、幼生の遊泳力が魚類よりも低く、受動的に海流により輸送されると考えられる海産無脊椎動物の幼生に応用したことは、今後、幼生分散や自己再生産(セルフリクルートメント)率の割合について、直接的に検証するために重要となる。

研究期間内に得られた主な成果については、国際誌上や学会大会で発表した。現在も論文投稿中・投稿準備中の原稿があり、今後の出版を見込んでいる。

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5件)

Yahagi, T., Fukumori, H., Warén, A., Kano, Y. 2017. Population connectivity of hydrothermal-vent limpets along the northern Mid-Atlantic Ridge (Gastropoda: Neritimorpha: Phenacolepadidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, in the press.
<https://doi.org/10.1017/S0025315417001898>
査読あり。

Chaban, E.M., Kano, Y., Fukumori, H., Chernyshev, A.V. 2017. Deep-sea gastropods of the family Ringiculidae (Gastropoda, Heterobranchia) from the Sea of Okhotsk, Kuril-Kamchatka Trench, and adjacent waters with the description of three new species. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, in the press.
<https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2017.11.008> 査読あり。

Fukumori, H., Hasegawa, K., Kano, Y. 2017. Abyssal gastropods in the Sea of Okhotsk (Vetigastropoda and Caenogastropoda). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, in the press.
<https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2017.09.013> 査読あり。

Castillo-Paez, A., Rocha-Olivares, A., Bisbal-Pardo, C.I., Zhu, D., Zhu, D., Itoh, H., Fukumori, H., Koseki, J., Garza, J.C., Urabe, J., Lv, Y., Maki, M., del Rio-Portilla, M.A., Chiba, S., Makino, W., Wang, W., Song, W., Chai, X., Kano, Y., Wang, Y. & Hu, Z. 2017. Microsatellite Records for volume 9, Issue 1. *Conservation Genetics Resources*, 9: 165-171. 査読あり。

Fukumori, H., Itoh, H., Kano, Y. 2016. The complete mitochondrial genome of the stream snail *Clithon retropictus* (Neritimorpha: Neritidae). *Mitochondrial DNA Part B: Resources*. 1: 820-821. 査読あり。

[学会発表](計10件)

狩野泰則・福森啓晶・神原佑理子・菊地宏和・加瀬友喜・属は常に単系統であるべきか? 「生きている化石」アマガイモドキの例から、日本貝類学会平成29年度大会、2017年4月。

狩野泰則・福森啓晶・Ira Richling・加瀬友喜・アマオブネ亜綱の驚くべき生態的放散と、なぜか少ない種数のワケ、2016年度日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会、2016年9月。

Fukumori, H., Kano, Y. Species diversity and biogeography of amphidromous neritid gastropods in the Indo-West Pacific. World Congress of Malacology 2016, July, 2016.

Kano, Y., Fukumori, H., Richling, I., Kase, T. Evolutionary ecology of neritimorph gastropods: how they have made extraordinary habitat transitions but with so few species? World Congress of Malacology 2016, July,

2016.

福森啓晶・伊藤萌・狩野泰則．遺伝マーカーを用いた両側回遊種イシマキ小笠原集団の独立性検証，日本貝類学会平成 28 年度大会，2016 年 4 月．

福森啓晶．川と海を旅する巻き貝：河川性アマオブネ科貝類の進化と種多様性，日本生態学会第 63 回大会 自由集会 貝類を通して生命現象に迫る 4：生活史，2016 年 3 月．

福森啓晶・狩野泰則．河川性アマオブネ類多様性の中心はどこか？：インド西太平洋における生物地理パターン，日本貝類学会平成 27 年度大会，2015 年 5 月．

6．研究組織

(1)研究代表者

福森 啓晶 (FUKUMORI, Hiroaki)
東京大学・大気海洋研究所・特任研究員
研究者番号：60746569