

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：82503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07547

研究課題名(和文)クマノミ類の宿主イソギンチャク類の分類学的混乱の解決に向けて

研究課題名(英文) Toward a taxonomic revision of host sea anemones of clownfishes

研究代表者

柳 研介 (Yanagi, Kensuke)

千葉県立中央博物館・その他部局等・研究員(移行)

研究者番号：00321852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：クマノミ類の共生するイソギンチャク類の分類の混乱を解決することを目指し、本邦の約80地点からクマノミの共生するイソギンチャク類計300個体以上について、クマノミの種類・イソギンチャクの各種外部形態の観察を行った。同時に採取した触手数本についてDNA解析を実施し、これらのイソギンチャク類が従来考えられていたものと異なる、系統的に独立した3つの科レベルのグループに分類されることを明らかにした。種レベルの分類についてはDNAの部分配列から判断するのは困難であったが、サンゴイソギンチャクについてのより詳細な解析の結果、本邦産の種には少なくとも3種が含まれていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クマノミ類と共生するイソギンチャク類については、学術的な観点のみならず一般の人々にも大きな関心を持たれてきたが、その分類は非常に混乱しており、正しく種を認識することが不可能に近い状態だった。本研究の結果、従来の分類は「種レベル」の分類のみならず「科レベル」の分類についても大きく見直す必要があることが明らかとなった。このことは、イソギンチャク類の系統分類学的研究の発展に資するのみならず、共生関係の進化・生態学的研究においてもその基礎となり、今後既往の生態学的研究を見直すきっかけとなるだろう。同時にイソギンチャクの保全を考える上で慎重なデータ収集計画を立てる必要があることを強く示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：With the aim of resolving the confusion in the classification of sea anemones that coexist with anemone fishes, we investigated more than 300 individuals of sea anemones which coexist with anemone fishes from about 80 points in Japanese coast during 2017 to 2021. We observed species of anemone fish and various external morphology of sea anemones, at the same time, we collected several tentacles from observed sea anemones for the DNA analysis. These data clarified that these sea anemones are classified into three systematically independent family-level groups, which are different from traditionally thought. Species-level classification was difficult to determine from partial DNA sequences, but more detailed analysis of Entacmaea species (bubble-tip anemones) revealed that Japanese species contained at least three species.

研究分野：動物分類学

キーワード：イソギンチャク クマノミ 共生 分類 DNA

1. 研究開始当初の背景

熱帯から亜熱帯に多く生息するハタゴイソギンチャク科イソギンチャク類はクマノミ類の宿主として知られる。本科のイソギンチャク類には、19世紀から20世紀初頭にかけて設立された50以上の名義種が存在するが、<sup>(1)</sup>により、多くの名義属・種がシノニムとしてまとめられ、現在では2属9種が有効種として扱われている。しかし、本邦においては、フィールドガイドに4属14種が掲載されるなど<sup>(2)</sup>による分類体系との整合性がとれなくなっている(下表参照)。には種の同定根拠は示されておらず、各種の識別点も明瞭ではないが、本邦では一般にこの分類体系が用いられている。一方、<sup>(3)</sup>によってまとめられた9種についても多くの疑問点があり<sup>(4)</sup>、



図1. クマノミとハタゴイソギンチャク科の1種

<sup>(5)</sup>シノニムとされている種の一部は有効種である可能性が高いと思われる。このようなことから、これらの種の分類は非常に混乱しており、特に *Heteractis* 属の種においては現状では種同定がほとんど不可能と言ってよい。また、同様にクマノミを共生させるウメボシイソギンチャク科のサンゴイソギンチャクについても分類学的混乱が認められる(下表参照)。これらのイソギンチャク類の多くは原記載以降の記録が少なく、記載内容も現在要求される項目が満たされていないことから、文献情報のみに基づいて分類学的再検討を行うことは不可能である。一方、本科イソギンチャク類は口盤径が1メートルを超える大型個体も多く、各地において新規標本を採集し比較検討することが非常に困難である。このため、分類学的な問題が潜在することは認識されていたものの、その見直しは全く進んでいなかった。

表. <sup>(6)</sup>に基づく分類と <sup>(7)</sup>に基づく有効種の対照表

科名	和名	内田・楚山(2001)に掲載された種名	Dunn (1981)に基づく分類
ハタゴイソギンチャク科 Stichodactylidae	キッカイソギンチャク	<i>Antheopsis koseirensis</i> (Klunzinger, 1877)	<i>Heteractis aurora</i> (Quoy & Gaimard, 1833) <i>Heteractis crispa</i> (Hemprich & Ehrenberg in Ehrenberg, 1834) <i>Heteractis magnifica</i> (Quoy & Gaimard, 1833) <i>Heteractis malu</i> (Haddon & Shackleton, 1893) <i>Stichodactyla gigantea</i> (Forsk��l, 1775) <i>Stichodactyla haddoni</i> (Saville-Kent, 1893) <i>Stichodactyla mertensii</i> Brandt, 1835 <i>Stichodactyla tapetum</i> (Hemprich & Ehrenberg in Ehrenberg, 1834) <i>Stichodactyla helianthus</i> (Ellis, 1768) Klunzingerによる記載はない
	ジュズダマイソギンチャク	<i>Heteractis aurora</i> (Quoy and Gaimard, 1833)	
	シライトイソギンチャク	<i>Radianthus crispus</i> (Ehrenberg, 1834)	
	チクビイソギンチャク	<i>Radianthus lobatus</i> Kweilniewski, 1897	
	センジュイソギンチャク	<i>Radianthus nitens</i> (Kweilniewski, 1897)	
	アジサイイソギンチャク	<i>Antheopsis cookei</i> (Verrill, 1928)	
	ハタゴイソギンチャク	<i>Stichodactyla gigantea</i> (Forsk��l, 1775)	
	イボハタゴイソギンチャク	<i>Stichodactyla haddoni</i> (Saville-Kent, 1893)	
	アラビアハタゴイソギンチャク	<i>Stichodactyla mertensii</i> Brandt, 1835	
	グビジンイソギンチャク	<i>Stichodactyla tapetum</i> (Ehrenberg, 1834)	
	マメハタゴイソギンチャク	<i>Stichodactyla</i> sp. M Uchida & Soyama, 2001	
	シマキッカイソギンチャク	<i>Antheopsis maculata</i> (Klunzinger, 1877)	
	マバラシライトイソギンチャク	<i>Antheopsis dorensis</i> (Quoy & Gaimard, 1833)	
	ツマリシライトイソギンチャク	<i>Radianthus gelam</i> (Haddon & Shackleton, 1893)	
ウメボシイソギンチャク科 Actiniidae	サンゴイソギンチャク	<i>Entacmaea actinostoloides sensu Uchida, 1947</i>	<i>Macroductyla dorensis</i> (Quoy & Gaimard, 1833) <i>Entacmaea quadricolor</i> (Leuckart in R��ppell and Leuckart, 1828)
	オオサンゴイソギンチャク	<i>Entacmaea maxima sensu Uchida, 1975</i>	
	ウスカワイソギンチャク	<i>Entacmaea quadricolor</i> (R��ppell & Leuckart, 1828)	
	タマイダキイソギンチャク	<i>Entacmaea ramsayi</i> (Haddon & Shackleton, 1893)	
	マメサンゴイソギンチャク	<i>Entacmaea</i> sp. M	

したがって、現状では、これらのイソギンチャク類について正確な種同定を行うことはほぼ不可能であり、これらの種を対象とした各種研究においては、分類学的混乱による同定の不確かさから、研究の再現性が保証されているとは言い難い状況であった。特に、クマノミ類の共生関係の成立についての研究などでは、観察対象のイソギンチャク類の操作分類単位 (Operational Taxonomic Unit = OTU) が確立していなければ、観察結果に基づく議論は根幹から揺らぐことになり、実際に、過去に行われた研究については再現性を検証できないものも少なくない(例えば<sup>(8)</sup>)。また、本科のイソギンチャク類については、生活史や再生産、寿命など、生態学的な基礎情報が極めて限られているものの(例えば<sup>(9)</sup>)、人為的な採集による種の存続に対するインパクトは極めて大きいと推測されている(例えば<sup>(10)</sup>)。本邦においてもこれらのイソギンチャク類は観賞用に採集されているとされ、何らかの保全策を講じる必要性が高いと考えられるが、評価対象とすべき OTU が不明瞭であるため、その保全上の評価を行うことが難しい状況となっていた。

2. 研究の目的

本科イソギンチャク類の種分類を完全に整理するためには、ほぼ全ての名義種について、タイプ産地を始めとする世界各地において標本を採集するとともにタイプ標本を検討する必要はあるが、これを短期間で遂行することは現実的ではない。一方、本邦周辺海域におい

では、実学的な面、あるいは社会的な要請から、早急に分類学的混乱を解決する必要がある。このようなことから、本研究課題においては、命名行為を見据えたうえで、対象とするイソギンチャク類について、主に分子情報に基づいて種レベルと考えられる OTU を特定し、それらが示す外部形態の特徴を割り出すなどして、操作対象を正しく認識できるようにすること、種分類の見直しのための基礎情報を提供することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試料収集

対象とするイソギンチャク類の採集は、上記のように環境への負荷が大きいと考えられるため、非侵襲的な試料収集（水中での外部形態観察および刺胞・分子解析用の触手数本の採集）を行った。申請者がこれまでに同様の方法によって収集した約 30 点の試料についても本研究課題に利用し、少なくとも既知の表現型約 14 タイプおよびサンゴイソギンチャク類について、各タイプ最低 10 個体分の試料を収集した。採集は対象とするイソギンチャク類の生息する最低 7 地域以上で実施することとした。

#### (2) DNA 解析

イソギンチャク類はミトコンドリア DNA の進化速度が極めて遅いため（ ）種レベルの系統解析に用いる領域は必ずしも一般化されていない。このため、従来イソギンチャク類の分類に利用されている領域に加えて新規の領域の検討を行うこととしていたが、種レベルの分岐を反映していると考えられるクレードを示すことはできなかったため、予備的に一部のサンプル（37 個体分）について、海外の共同研究者とともに 1 塩基置換（SNPs）による多型解析を実施した。

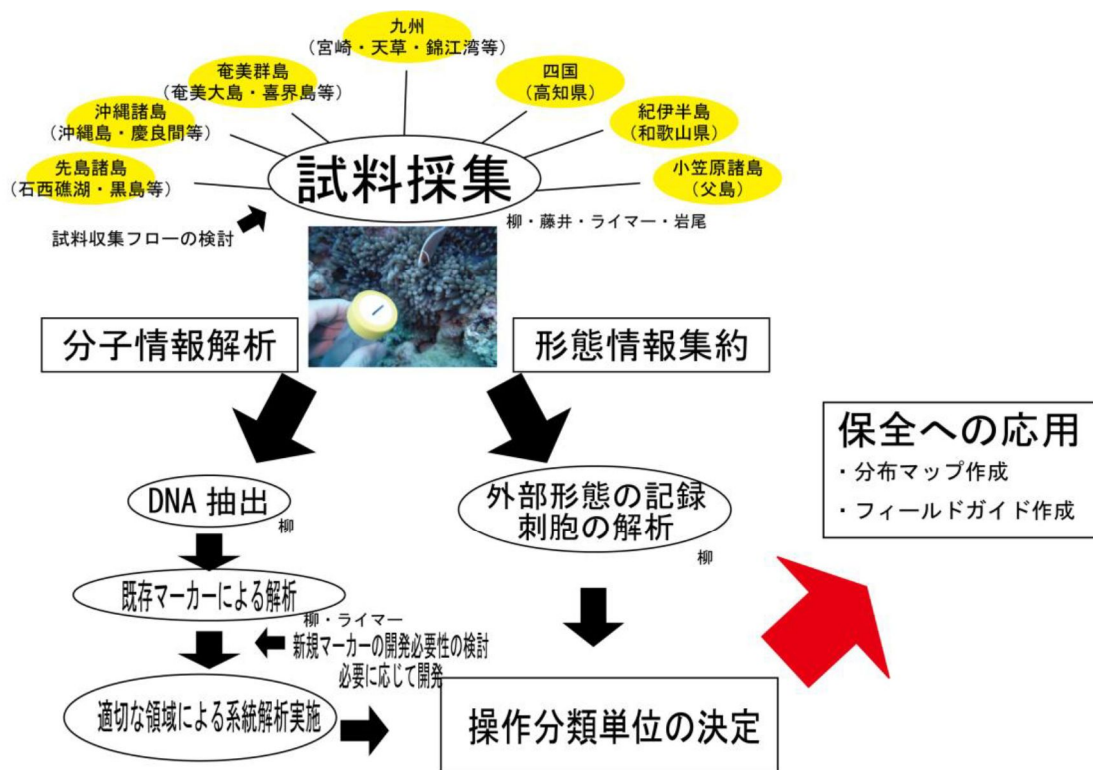


図 2. 研究遂行の概念図

### 4. 研究成果

#### (1) 資料収集

琉球列島、九州、四国、紀伊半島、伊豆半島、房総半島、小笠原諸島など、計約 80 地点（図 3）から 304 個体について共生するクマノミの種類・イソギンチャクのサイズの計測・各種外部形態の写真撮影を行い、その触手数本を採取した。このうち *Entacmaea* 属の種については、約 10 個体（クローンは 1 個体とみなす）をまるごと採取した。採取した触手サンプルは -20 にて 99% エタノール中に保存し、順次 DNA 解析を実施するとともに、このうち 37 個体分については、海外の共同研究者による 1 塩基置換（SNPs）による多型解析を実施



図 3. 資料の採集地点



するため、試料の一部を分譲した。収集した試料は全て将来的に用いることができるように生時の情報と紐付けて登録・整理・保管した。

## (2) DNA 解析結果

採取した触手について DNA 解析を行い、これらのイソギンチャク類が従来考えられていたものとは異なる、系統的に独立した 3 つの科レベルのグループに再分類する必要があることが明らかとなった( ) (図 4)。しかし種レベルの差異については核・ミトコンドリア DNA の部分配列から判断するのは困難であった。このうち特に形態学的にもバリエーションが認められたサンゴイソギンチャク *Entacmaea quadricolor* については、海外の共同研究者らと共同して次世代シーケンサーを用いた詳細な解析 (1 塩基置換 3400 箇所に基づいた DAPC 解析) を実施したところ、少なくとも本邦産の種は *E. quadricolor* ではないことに加え、これらが少なくとも 3 種に分類される可能性を示唆することができた (未発表)。

## (3) 現状の整理と今後の展望

コロナ禍における研究環境の制限により、計画した全ての解析を終了することができなかったが、これまで得られたデータにより、種レベルの分類のみならず高次分類群の分類の再編が必要であることが判明し、後者については により報告した。特に高次分類群の再編においては、これまでセンジュイソギンチャク *Heteractis magnifica* は、シライトイソギンチャク *H. crispera* と同属と考えられていたが、ハタゴイソギンチャク *Stichodactyla haddonii* やエンタクイソギンチャク *Cryptodendrum adhaesivum* 等と同一クレードになることが明らかにされた (図 4)。一方、各クレード内における種レベルの分類については、十分な解析が行えていないものの、本邦産のサンゴイソギンチャク類 *Entacmaea* spp. は、従来本種の学名として充てられていた紅海をタイプ産地とする *E. quadricolor* とは別種であるとともに、本邦には種レベルの差異があると考えられる 3 つの OTU が存在することが明らかになった。今後、各種レベルの OTU についてさらなる検証を行うとともに、引き続きそれらの外部形態による識別方法の確立を目指す必要がある。*Entacmaea* 属については、現在 *E. quadricolor* の 1 種にまとめられているが、同属には 15 の名義種が存在する。今後、本研究で認識できた各 OTU に学名を与えるには、タイプ標本を含めた多くの博物館標本の検討を進めるとともに、タイプ産地で追加個体を採集するなどして DNA 解析を行う必要が残されている。また特にシライトイソギンチャク *H. crispera* を含む *Heteractis* 属においては、種レベルの OTU をより正しく認識するために、本研究で実施できなかった SNPs 等を用いた解析が必要であると考えられる。

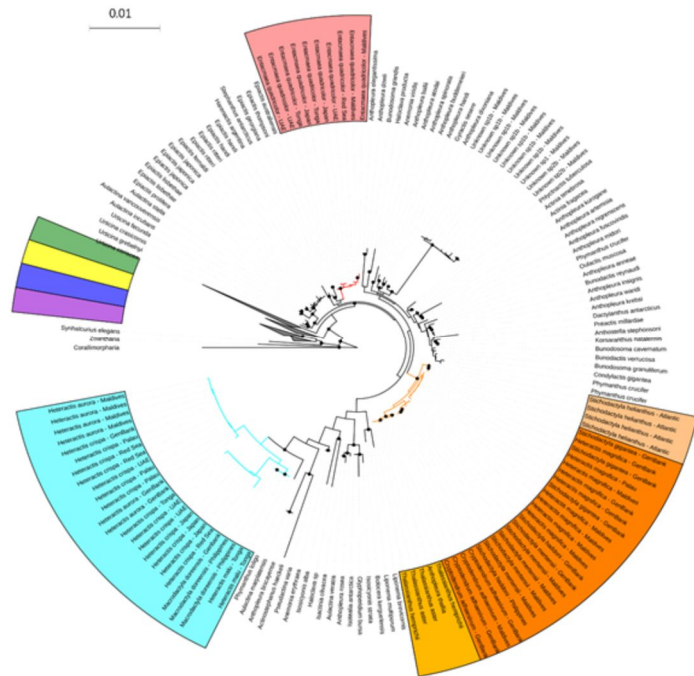


図 4. クマノミと共生するイソギンチャク類を含むイソギンチャク類の CO3, 12S, 16S, 18S, 28S の部分塩基配列に基づく系統樹。水色、オレンジ色 (グラデーション)、ピンク色が、クマノミと共生するイソギンチャク類の分離された 3 つのクレードを示す。ピンク色はサンゴイソギンチャク類 *Entacmaea* spp. からなるクレード、オレンジ色はハタゴイソギンチャク類 *Stichodactyla* spp. とセンジュイソギンチャク *Heteractis magnifica*、エンタクイソギンチャク *Cryptodendrum adhaesivum* 等からなるクレード、水色はシライトイソギンチャク類 *Heteractis* spp. からなるクレードを示す。

の Fig. 2 を引用

## <引用文献>

Dunn DF (1981) The clownfish sea anemones: Stichodactylidae (Coelenterata: Actiniaria) and other sea anemones symbiotic with pomacentrid fishes. Trans Am Philos Soc 71:1-115.

内田紘臣・楚山 (2001) イソギンチャクガイドブック. 160 pp, ティビーエス・ブリタニカ, 東京.

Yanagi, K. (2006) Sea anemones around the Sagami Sea with the list of Japanese species. *Memoirs of the National Science Museum*, (40):113-173.

柳研介 (2016) 第4章 イソギンチャク in 日本付着生物学会編 新・付着生物研究法. Pp. 53-87, 恒星社厚生閣, 東京.

Uchida, H., Okamoto, K., Fukuda, T. (1975) Some observations on the symbiosis between anemonefishes and sea-anemones in Japan. *Bull. Mar. Park Res. Sta.*, 1(1): 31-46.

Scott A, Harrison PL (2007) Broadcast spawning of two species of sea anemone, *Entacmaea quadricolor* and *Heteractis crispa*, that host anemonefish. *Invertebr Reprod Dev* 50:163-171

Shuman CS, Hodgson G, Ambrose RF (2005) Population impacts of collecting sea anemones and anemonefish for the marine aquarium trade in the Philippines. *Coral Reefs* 24:564-573.

Shearer, T L, Van Oppen, MJH, Romano, SL., Wörheide, G. (2002) Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Mol Ecol*. 11:2475-2487.

Titus, BM, Benedict C., Laroche, R., Gusmão, LC., Van Deusen, V., Chiodo, T., Meyer, CP., Berumen ML., Bartholomew, A., Yanagi, K., Reimer, JD, Fujii, T., Daly, M., Rodríguez E. (2019) Phylogenetic relationships among the clownfish-hosting sea anemones. *Mol Phylogenetics Evol*. 139:106526

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Titus, B.J., Benedict, C., Laroche, R., Luciana, Gusmao, C., Deusen, V.V., Chiodo, T., Meyer, C.P., Berumen, M.L., Bartholomew, A., Yanagi, K., Reimer, J.D., Fujii, T., Daly, M., Rodriguez, E.	4. 巻 139
2. 論文標題 Phylogenetic relationships among the clownfish-hosting sea anemones	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular phylogenetics and evolution	6. 最初と最後の頁 106526
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ympcv.2019.106526	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 大久保奈弥・田所 悟・松永 敬・柳 研介	4. 巻 (40)
2. 論文標題 神奈川県逗子市小坪大崎で確認された最北限のサンゴイソギンチャク個体群	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 神奈川自然誌資料	6. 最初と最後の頁 25-28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柳 研介・James Davis Rimer・磯村尚子・藤井琢磨・Benjamin Taitus・Estefania Rodriguez
2. 発表標題 クマノミ類の宿主イソギンチャク類の分類の現状と展望
3. 学会等名 日本動物分類学会第55回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳 研介・James Davis Rimer・磯村尚子・藤井琢磨・Benjamin Taitus・Estefania Rodriguez
2. 発表標題 見直しが進むクマノミ類の宿主イソギンチャク類の分類
3. 学会等名 2019年日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳 研介・James Reimer・磯村尚子・藤井琢磨
2. 発表標題 クマノミの住むイソギンチャクは何もの？
3. 学会等名 第13回日本刺胞動物・有櫛動物研究談話会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 C. Benedict, B.M. Titus, R. Laroche., L.C. Gusmao, V. Van Deusen, T. Chiodo, C.P. Meyer, M.L. Berumen, A. Bartholomew, K. Yanagi, J.D. Reimer, JD, T. Fujii, M. Daly, E. Rodriguez
2. 発表標題 Phylogenetic relationships among the clownfish hosting sea anemones
3. 学会等名 Society for Integrative and Comparative Biology (SICB) Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	Reimer J・D  (Reimer James Davis)  (20452956)	琉球大学・理学部・准教授   (18001)	
研究 分担者	磯村 尚子  (Isomura Naoko)  (90376989)	沖縄工業高等専門学校・その他部局等・准教授   (58001)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	藤井 琢磨  (Fujii Takuma)  (30772462)	鹿児島大学・学内共同教育研究学域学内共同教育研究学系国際島嶼教育研究センター・特任助教   (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------