

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22570101

研究課題名(和文) 暖温帯～熱帯域の浅海生物の遺伝的多様性からみた起源に関する研究 甲殻異尾類を例に

研究課題名(英文) Study on origin of marine shallow water organisms in warm temperate and tropical regions - case study on crustacean anomoumeans

研究代表者

朝倉 彰 (Asakura, Akira)

京都大学・フィールド科学教育研究センター・教授

研究者番号：40250138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：暖温帯から熱帯に分布する種の起源を調べるために、浅海性ヤドカリ類をモデル生物として種内の遺伝的分化を調べた。ホンヤドカリは親潮域から黒潮域まで幅広く分布し、親潮域の集団は夏繁殖型で短期間に繁殖し、オス同士の闘争は激しい。一方黒潮域の集団は冬繁殖型であるが繁殖期は長期にわたり、オス同士の闘争は緩やかである。日本各地の集団についてmtDNAのCOI遺伝子の変異をみたが顕著な差はなく、表現形変異である可能性が示唆された。イソヨコバサミは関東地方から広くインド-西太平洋の熱帯域に分布する。そのcox遺伝子を調べたところ、東南アジアの一部集団は日本とは異なることが明らかになり種分化の萌芽が見られた。

研究成果の概要(英文)：To reveal origins of warm and tropical marine fauna, we examined genetic divergence using shallow water hermit crabs as model organisms. *Pagurus filholi* is widely distributed from Oyashio Current area to Kuroshio Current area. Population in Oyashio area has winter reproductive period with short duration, and males are very aggressive for other males. But, population in Kuroshio area has summer reproductive season and male-male competition is mild. By mtDNA COI gene, no significant difference in genetic structure, so that these difference may be attributable to phenotypic originated from different water temperature. *Clibanarius virescens* is tropical Indo-west Pacific species but is extended its distribution toward the north to Kanto District. We examined COXI gene and found that some populations in Southeast Asia have different genetic structure from those in temperate Japan. This suggests that some genetic divergence occurs between temperate area and tropical area.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 生物多様性・分類

キーワード：遺伝的多様性 熱帯 ヤドカリ類 黒潮 親潮

1. 研究開始当初の背景

地球上の生物分布を考える時、温帯フォナは、熱帯と寒帯の間であって様々な要素の複合体である。日本列島の温帯域潮間帯生物は主として、暖流の黒潮の影響下の関東～九州地域の「暖温帯要素」、琉球列島の「熱帯要素」、北海道～九州の「東亜固有要素」、寒流の親潮の影響下の東北～北海道の「冷温帯要素」から成る。またこれに加え閉鎖的な日本海で固有種や固有亜種が知られる。日本周辺の生物地理要素の成立プロセスは、非常に複雑かつ多様であると考えられ、それは第四紀更新世の氷期と間氷期の繰り返しによる海水準変動による陸橋の形成などの大規模な地形変化、またそれともなう熱帯生物の分布の分断やあるいは地理分布における分布拡大や縮小、大きな海流系とその分岐流の複雑な流れとその変化などによると推測される。そしてそこで見いだされる種分化プロセスは、地球上の温帯性生物の多様性を理解する上での、良いモデルケースである。しかしこの方面の詳細な研究は不十分な状況にある。

2. 研究の目的

本研究は潮間帯性ヤドカリ類(十脚目異尾亜目 Crustacea: Decapoda: Anomura)を材料とし、日本列島とその関連する地域の分集団構造を調べ、それを種分化の萌芽であることとらえることによって、日本列島域での複雑な種分化プロセスを推測することを目的とする。

3. 研究の方法

潮間帯性ヤドカリ類を材料とし、日本列島の集団およびそれと関連するアジアの集団について、DNAを抽出し、集団遺伝学的解析を行う。またその中でも日本列島周辺の集団は、特に詳細に調べる必要があるため、太平洋岸の関東から九州まで、また日本海側の集団などにわけて調べる。

DNAは以下の2つの方法を用いて抽出した。

(1)ヤドカリの腹部をホモジナイズバッファ(0.25M Sucrose, 150mM EDTA 30mM, Tris-HCl pH7.5) 500 μ lを用いて、ホモジナイズした。その後バッファをさらに200 μ l加え攪拌した。10%SDS溶液60 μ lを加え攪拌した。5M NaCl 60 μ lとフェノールクロロホルム(PhenolとChloroformを1:1で混合)600 μ lを加え、よく攪拌した。遠心(12000rpm, 10min)後、上清を回収し、100% Ethanol 500 μ lと混合した。遠心(3000rpm, 10min)後に上清を除去し、4 \square で保存した70% Ethanol 1000 μ lを加えた。攪拌し、遠心(5000rpm, 5min)後に上清を除去した。風乾して残量したエタノールを除去した後、TE (pH 8.0)を加え、攪拌して、DNA溶液を得た。

(2)核酸がシリカゲルに吸着する性質を利用して、ヤドカリの腹部からDNAを抽出し

た。(Boom et al., 1990)。歩脚1本を400 μ lのBinding Buffer (1M Tris-HCl 10ml; DW 40ml)を用いてホモジナイズし、遠心(12,000rpm, 1min)して得た上清を回収した。シリカゲル10 μ lを加え、1分ごとに攪拌しながら5分間静置した。遠心後に上清を除去し、Binding Bufferを加え攪拌した。遠心後に上清を除去し、Wash Buffer (10mM Tris-HCl (pH 7.5); 100mM NaCl: Ethanol=1:4)を加え、攪拌し、遠心後に上清を除去した。Wash Bufferによる洗浄と上清の除去を2度行った。風乾して残量したエタノールを除去した後、TE (pH 8.0)を加え、攪拌、遠心した後、上清を回収して、DNA溶液を得た。

抽出したDNAを鋳型とし polymerase chain reaction 法によってCOIを増幅した。25 μ lのPCR反応液(50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.5, 2mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 0.2mM each dNTP, 20-60mM each primer, template DNA, and 2.5 units of taq DNA polymerase)を調整し、サーマルサイクラーを用い、94 \square 3分の後、95 \square 15秒、54-50 \square 30秒、72 \square 50秒を1サイクルとして、35サイクル行い最後に72 \square 7分を伸張反応を行った。

PCR産物にBinding Buffer 100 μ lを加え、よく攪拌した。シリカゲル10 μ lを加えて混合した後1分ごとに攪拌しながら5分間静置した。遠心(12000rpm, 1min)し上清を除去し、Wash Bufferを加え攪拌し遠心後に上清を除去した。Wash Bufferによる洗浄と上清の除去を2度行った。風乾して残量したエタノールを除去した後、DW 22 μ lを加え、攪拌、遠心した後上清を回収して、DNA溶液を得た。

DNAの濃度が20ng/ μ lになるように精製後のDNA溶液を調整した。それを鋳型とし、シークエンス反応を行った。シークエンス反応には、BigDyeTM Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequence Kit (Applied Biosystem)を用いた。反応に用いたプライマーは、PCRに用いたプライマーを1,6pmol/ μ lに希釈したものを使用した。

反応後、不純物を除去するため、エタノール沈殿を行った。シークエンス反応後の産物にDW 30 μ lを加え攪拌した。3M NaAC 3 μ l, 100% Ethanol 100 μ lを加え、攪拌し、遮光した状態で15分間(常温)静置した。その後、20分間遠心(12,000rpm, 4 \square)し、上清を捨てた。そこに、70% Ethanol 200 μ lを加え、攪拌し、5分間遠心(12,000rpm, 4 \square)し、上清を捨てた。風乾して残量したエタノールを除去した後、High Dye ホルムアミド 15 μ lを加え、攪拌した。塩基配列決定は、ABI3130xlでシークエンスを行った。

プライマーによって増幅された領域のうち、ホンヤドカリのCOI631bp、イソヨコバサミのCOI608bpの塩基配列を系統解析に用いた。解析にはソフトウェア MEGA version 5.0 (Tamura et al. 2011)を使用した。

さらに本研究を通じて得られたヤドカリ類の分類学的研究を進めることにより、日本

とその関連する地域のヤドカリ類の生物地理的構成の知見をより集積し、これまで以上の高解像度で温帯域の同分類群を通じての、状況を把握できるようにする。

4. 研究成果

(1) ホンヤドカリ *Pagurus filholi*

全国で採集されたホンヤドカリのハプロタイプネットワークを図1に示す。主たる2つのハプロタイプについて1塩基対の違いしかなく、全体として変異は極めて少ないことが示された。

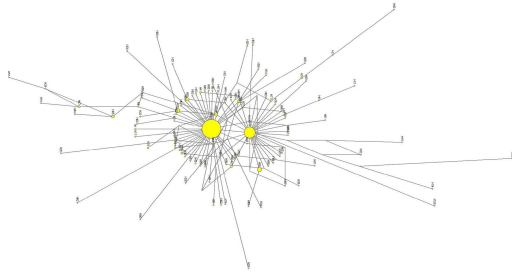


図1. ホンヤドカリのハプロネットワーク

これらを地図上にその出現頻度によりプロットしたのが図2である。出現頻度の高いものは色分けし、7位以下は黄色で示した。

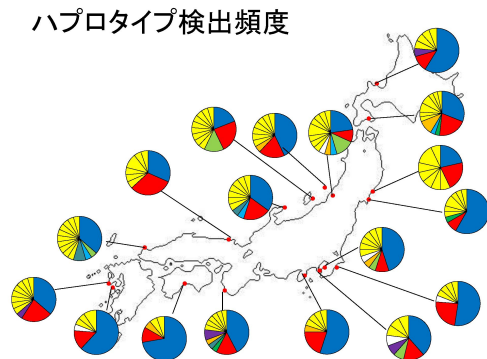


図2. ホンヤドカリのハプロタイプ検出頻度。

頻度にばらつきは若干あるものの、青色と赤色のハプロタイプがほとんどの集団で高頻度に検出されるなど、この解析の限りでは、地域間に顕著な遺伝的分化は認められなかった。集団間分化の指標である F_{st} は 0.026 と、低い値であった。

親潮域と黒潮域で有意な差は出なかったものの、北海道、東北沿岸でユニークなハプロタイプ頻度がやや高いこと、日本海側と太平洋岸では、頻度にやや違いがあることが示唆された。

(2) イソヨコバサミ *Clibanarius virescens*

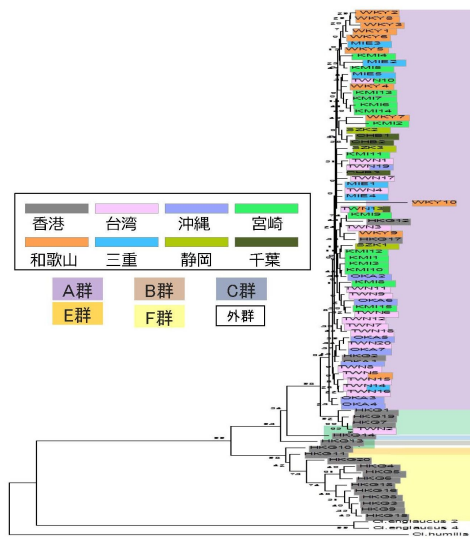
日本沿岸 6 地点と台湾・香港から採集されたイソヨコバサミ 107 個体において COXI の部分配列(556bp)塩基配列を決定したところ、83 のハプロタイプ(C1 - C83)に区分された(表 1)。

表1. イソヨコバサミのハプロタイプ

採集地点	個体数	ハプロタイプ
千葉県富津市竹岡	5	C1,C2,C3,C76,C78
静岡県下田市鍋田湾	6	C4(2),C5,C8C76,C78
三重県志摩市船越	11	C7,C8,C9,C10,C11,C12, C13(2),C19(2),C78
和歌山県西牟婁郡白浜町	9	C14,C15,C16(2),C17,C18,C19,C20,C78
宮崎県宮崎市巾着島	20	C21,C22,C23,C24,C25,C26,C27,C28,C29,C30,C31,C32,C33,C34,C35,C36(2),C37, C71,C78
沖縄県うるま市金武湾具志川	8	C38,C39C40,C41,C42,C43,C44, C83
台湾 新北市	27	C65,C66,C67,C68,C69(2),C70(2),C71,C72,C73,C74,C75,C76,C77,C78(4),C79,C80,C81,C82,C83(3),
香港 石澳	21	C45,C46,C47,C48,C49,C50,C51(2),C52,C53,C54,C55,C56,C57,C58,C59,C60,C61,C62,C63,C64

DNA データベース DDBJ に登録されたヨコバサミ属のマタラヨコバサミ *C. humilis* と *C. englaucus* の COXI 配列を外群として ML 法と NJ 法で系統樹を作成した。両系統樹のトホロジはほぼ一致し、高いブートストラップ確率(99%)で単系統群を形成した(図3)。系統樹ではイソヨコバサミ COXI は大きく 6 群、A 群 - F 群に区別できた(ブートストラップ確率 99-89%)。日本の 6 地点で見られたハプロタイプは全て A 群に含まれた。また、台湾集団から得られたハプロタイプも 1 種類のみ B 群に含まれたが、それ以外はすべて A 群に含まれた。そのうちいくつかのハプロタイプは千葉の集団のタイプとともにクレードを形成したが、そのブートストラップ支持率は低かった。香港から得られた 20 種類のハプロタイプのうち、3 種類は A 群に、のこりは B-F 群に含まれた。

図3. イソヨコバサミ地域集団の系統樹



ハプロタイプの地理的な位置関係を見るため、図 4 にハプロタイプの分布図を作成した。

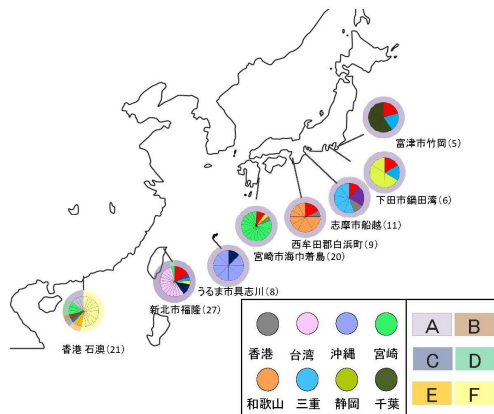


図 4 . イソヨコバサミのハプロタイプの地理的分布

種内の遺伝的多様性と地理的分布の関係を調査するために TCS ver1.21 (Clement et al. 2000)を用いてハプロタイプに基づく最大節約原理による最小全域ネットワーク樹の構築を行った。えられたネットワーク樹に先に A-F 群を図示したものが図 5 である。

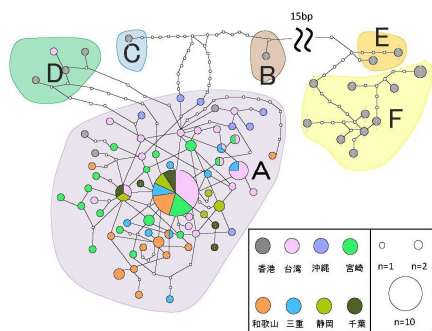


図 5 . イソヨコバサミのハプロタイプネットワーク

いくつかのハプロタイプは、異なる地域個体で見られ、例えば図 5 の A 群の中央にみられる大きな円で示したハプロタイプには沖縄を除く、日本の 5 地域に加え、台湾からも 26 個体から得られた。このハプロタイプを含め、7 ハプロタイプが複数の地域

で共有されており、そのうち 6 つは日本と台湾集団との間で共有されていた。分岐状態からみると沖縄のハプロタイプは日本、本州地域のハプロタイプより、台湾に固有なものとのつながりがより強かった。

遺伝的多様性保有量の尺度である塩基多様度とハプロタイプ多様度を算出したところ、それぞれ $h = 0.004$ (最低値 千葉) - 0.043 (最高値 香港)、 $h = 0.933$ (最低値 静岡) - 1.000 (最高値 千葉)であった(表 4)。香港を除く全ての地域で塩基多様度は低く、ハプロタイプ多様度は高い傾向にあった。香港の集団だけは塩基多様度が低くなく、ハプロタイプ多様度は高かった。

(3) その他のヤドカリ類

これらの調査を通じて採集された様々な分類群のヤドカリ類の記載分類学的研究を行った。特に重点を置いて調べたのは、オカヤドカリ科 Coenobitidae、ホンヤドカリ科 Paguridae、ヤドカリ科 Diogenidae に所属する種類である。未記載種が発見された場合には新種記載を行った。またその研究をさらに現在も継続中である。

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)

Sonoda, K, A. Asakura, M. Minoura, R. W. Elwood and Y.-P. Gunji (2012) Hermit crabs perceive the extent of their virtual bodies. *Biology Letters* doi:10.1098/rsbl.2012.0085.

Asakura, A., and H. Tachikawa (2010) *Diogenes holthuisi*, a new species of hermit crab (Decapoda, Anomura, Diogenidae) from shallow waters of the Ogasawara (Bonin) Islands, Japan. *Crustaceana Monographs*, 14: 133-144.

Asakura, A.(2010) A new species of hermit crab of the *teevana* group of *Pylopaguropsis* (Decapoda: Anomura: Paguridae) from the western Pacific, collected during the PANGLAO Expedition. *Nauplius*, 18: 35-43.

Tudge, C.C., A. Asakura and S. Ahyong. (2012). Chapter 70: Anomura. In: Frederick D. Schram and J. Carel von Vaupel Klein (eds.). *Traité de Zoologie: Crustacea: Decapoda*. Brill, Leiden, The Netherlands.

日本ベントス学会編（共著執筆：朝倉彰）
（2012）干潟の絶滅危惧動物図鑑-海岸ベントスのレッドデータブック. 東海大学出版、
神奈川 . 285 pp.

〔雑誌論文〕(計 3 件)

〔図書〕(計 2 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://aki-raasakura12.blogspot.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

朝倉 彰 (ASAKURA, Akira)
京都大学フィールド科学研究教育センター
瀬戸臨海実験所 教授
研究者番号：40250138

(2) 研究分担者

青塚 正志 (AOTSUKA, Tadashi)
首都大学東京 理工学部 教授
研究者番号：40106604

(3) 連携研究者

伊谷 行 (ITANI, Gyo)
高知大学教育学部 准教授
研究者番号：10403867

嶋永 元裕 (SHIMANAGA, Motohiro)
熊本大学 沿岸域環境科学教育研究センター
准教授
研究者番号：70345057

高田 宜武 (TAKADA, Yoshitake)
日本海区水産研究所 室長
研究者番号：30372006

古賀 庸憲 (KOGA, Tsunenori)
和歌山大学教育学部 教授
研究者番号：50324984

佐藤 琢 (SATO, Taku)
西海区水産研究所 研究員
研究者番号：20455504