

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月16日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22770076

研究課題名（和文）日本の湖沼のもつ氷河期退避地としての重要性を枝角類の種系統と系統地理から検証する

研究課題名（英文）Phylogenetic and phylogeographic studies of Japanese Cladocera to test the hypothesis of glacial refugia for freshwater zooplankton species in the Far East

研究代表者

石田 聖二 (ISHIDA SEIJI)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：80547331

研究成果の概要（和文）：

本研究は、日本を含む全球規模に分布するミジンコ類（枝角類）の *Bosmina longirostris* が、極東域でのみ種分化の過程にあることを示した。極東域では、約10万年スケールの氷河期サイクルを通して比較的湿潤で穏やかな気候を維持してきたために、湖沼生物種の多様な系統が生残り、独自の進化を遂げたと考えられる。一方で、近縁種の *Bosmina freyi* が近年に北米から日本（千葉県および瀬戸内海沿岸のため池）に侵入したことも示した。

研究成果の概要（英文）：

This study revealed that *Bosmina longirostris*, which distributes in a global scale including Northern Africa, Europe, Siberia, East Asia, South America, and Antarctic Peninsula, is undergoing the process of speciation only in the Far East. The results suggest that various genetic lineages of lacustrine species may have survived and evolved in the Far East, since climate of the Far East has been relatively mild and wet during the 100,000-year glacial cycles. On the other hand, this study also indicated that another closely related species *Bosmina freyi* recently introduced from North America to Japan (reservoirs in Chiba Prefecture and around Seto Inland Sea).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：系統地理、氷河期サイクル、生物多様性、湖沼生態系、ミジンコ類、枝角類、氷期退避地、外来種

1. 研究開始当初の背景

(1) 極東は亜寒帯から温帯の湖沼生物の多様性のホットスポットの一つかもしれない

数万年単位で氷期と間氷期が切り替わる氷河期サイクルは、さまざまな生物種の分布域や遺伝的多様性に大きな影響を及ぼしてきた。約2万年前の最終氷期の最寒冷期、現在の北米やヨーロッパの北部に氷床が拡大し

た。氷床の直下で生物は生存できないので、このような氷床の拡大と後退が繰り返される地域では、大規模な絶滅と再移入が数万年ごとに繰り返されたことになる。一方で氷床が拡大しなかった地域（たとえば、ベーリング海峡付近、北米の沿岸部や南部、ヨーロッパの南部）は、氷河期サイクルによる環境激変の影響が比較的緩やかなので、さまざまな生物種にとって、氷期をやり過ごすための退避地として役立つ。氷期から間氷期に切り替わり、氷床が大規模に後退すると、これら退避地に生息していた生物種は分布域を一斉に拡大する。新しく広がった分布域では遺伝的多様性が減少する。なぜなら、新しい生息地に移入する際に元の生息地での遺伝的多様性の一部のみが新しい生息地に受け継がれるからだ。このように氷河期サイクルに応じて分布域を大きく変動させる生物種にとって、退避地は遺伝的多様性を維持する上で重要な拠点となっている。

日本列島を含む極東域は、氷河期サイクルを通じて比較的湿潤な環境が維持されてきたことから、亜寒帯から温帯の湖沼生物にとっての氷期退避地として機能してきたかもしれない。実際に、ミジンコ属の種である *Daphnia tanakai* Ishida, Kotov et Taylor 2006, *Daphnia sinevi* Kotov, Ishida, et Taylor 2007 をはじめ、極東域に固有な枝角類の新種が近年に多数発見されている。さらに、Ishida and Taylor (2007) は、日本と北米に生息する *Daphnia dentifera* の遺伝子構造を解析し、日本の *D. dentifera* の遺伝的多様性が北米のもの比べて2倍以上も高いことを示した。北米の *D. dentifera* の分布域は、アラスカ、カルフォルニアなどの西海岸から、コロラドやカナダ中部の内陸、五大湖およびニューヨークなどの西海岸までの東西 6,000km におよぶ範囲である。これらの *D. dentifera* の個体群の氷期退避地はベーリング海峡付近で、最終氷期以降に北米全土に分布域を広げた。一方で、日本の *D. dentifera* の分布域は、北海道から中部地方までの南北 1,000km 程度であるが、それぞれの地域の個体が独自の種内系統を構成し、それぞれの系統間の遺伝的差異は北米全域の遺伝的多様性に比べて圧倒的に大きい。氷河期サイクルを通じて、*D. dentifera* が日本の各地域の湖沼に生息し続けたので、それぞれの地域に特有な種内系統が独自に進化したと推測できる。

一方で、Ishida and Taylor 2007 は、北米、アジア、ヨーロッパにかけて分布するコスモポリタン種である *Daphnia galeata* (カプトミジンコ) でも全球規模の遺伝子構造を解析したところ、日本の *D. galeata* は *D. dentifera* でみられるような顕著な地理的構造を持たな

かった。しかしながら、最も分岐年代の古い種内系統が日本でのみ広く分布しており、極東域が氷期退避地として遺伝的多様性を維持する拠点の一つであることが示唆された。

全球規模での枝角類の系統地理学の研究を推し進めることで、極東域は淡水生物の氷期退避地として生物多様性保全の重要な拠点であることを指し示すことができるだろう。

(2) 日本産の枝角類の分類学的な整理は不十分である

日本の枝角類の分類学的な整理はまだ充分ではなく、日本産枝角類での隠蔽種の発見が相次いでいる。Ishida et al. (2007) による全球規模の *D. dentifera* の研究がなされるまで、日本産の *D. dentifera* は、ヨーロッパを中心に分布する *D. longispina*, *D. rosea*, *D. hyalina* の3種に誤記載されていた。さらに、Kotov et al. (2009) は、北海道および青森県に広く分布する *Bosmina tanakai* を新種記載した。本種はそれまで *Bosmina coregoni*、あるいは *Bosmina longispina* と記載されてきたが、分子系統および形態観察からタイプ標本のものとは別種であることが明らかになった。同様に Ishida et al. (2006) は飛騨山脈の山岳湖沼に生息する *Daphnia tanakai* を新種記載した。本種はそれまで *Daphnia curvirostris* と記載されていた。

2. 研究の目的

(1) 日本国内の枝角類の分子系統を解析し種系統の多様性を明らかにする

日本国内にいる4属の枝角類 (*Bosmina*, *Ceriodaphnia*, *Diaphanosoma*, *Bosminopsis*) について、分子系統にもとづく分類学的な整理に取り組む。

(2) 全球規模に分布するミジンコ類の種の系統地理のパターンを明らかにする

前述の国内の枝角類の分子系統解析の結果から、*Bosmina longirostris* と *Bosmina freyi* が日本に生息することを確認した。これらの生物種について、さらに詳細な解析をすすめる。

Bosmina longirostris はアフリカ・ヨーロッパ・シベリア・極東・南米に分布している。これほど広範囲に分布する枝角類の種はめずらしく、全球規模の系統地理研究の材料として極めて有用である。そこで日本を含む全球規模で採集した本種のサンプルを利用して、極東域のもつ湖沼生物の氷期退避地としての重要性を検証する。本種の氷期退避地が極東域であるならば、極東域の個体群の遺伝的多様性は高くなる。さらに明瞭な地理的構造も示すかもしれない。

Bosmina freyi は北米に分布しているが、日本では未記載種である。日本に分布する *B. freyi* は、近年に北米から侵入したものかもしれない。侵入種であれば、日本産の遺伝系統あるいはハプロタイプが北米産のものと同一で、遺伝的多様性は北米のものに比べて圧倒的に低くなる。もしも本種が近年の侵入種ではなく、日本に古くから生息するものであれば、北米のものと遺伝系統が異なるだろう。日本および北米で採集した本種のサンプルを解析することで、日本における本種の起源について検証する。

3. 研究の方法

(1) 国内試料の採集の遺伝解析

本研究は日本全国 315 地点の湖沼で枝角類を採集し、無水エタノールで固定した。*Bosmina*, *Ceriodaphnia*, *Diaphanosoma*, *Bosminopsis* の 4 属のサンプルの一部から一頭ずつゲノム DNA を抽出し、ミトコンドリア(mt)DNA にある 16SrRNA の遺伝子配列(c.480bp)を増幅するために PCR を行った。加えて、*Bosmina longirostris* については、核 DNA HSP90 遺伝子の配列(c.600bp)を増幅するために PCR を行った。得られた DNA 配列をもとに分子系統樹を作成した。

(2) 海外試料の遺伝解析

海外共同研究者である Derek J. Taylor (ニューヨーク州立大) と Alexey A. Kotov (ロシア科学アカデミー) の協力のもと、*Bosmina longirostris* および *Bosmina freyi* のサンプルからゲノム DNA を抽出し、ミトコンドリア(mt)16SrRNA の遺伝子配列(c.480bp)を増幅するために PCR を行った。加えて、*Bosmina longirostris* については、核 DNA HSP90 遺伝子の配列(c.600bp)を増幅するために PCR を行った。ここで得られた DNA 配列と国内のサンプルから得られた DNA 配列をもとに分子系統樹を作成した。

4. 研究成果

(1) 国内の枝角類の分子系統の解析

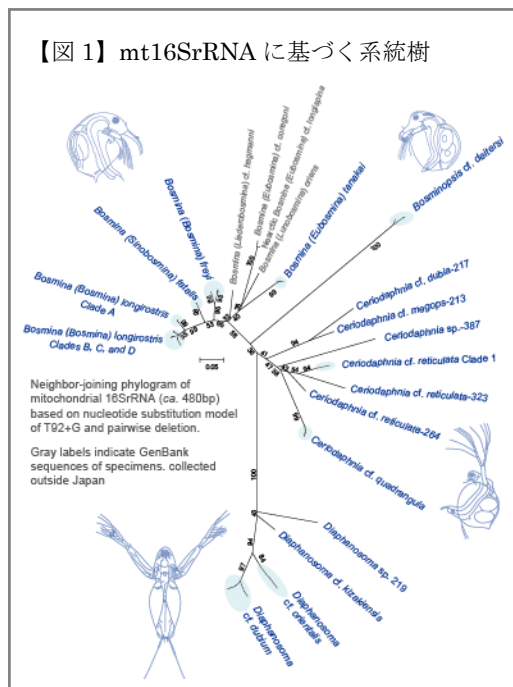
国内の 120 の湖沼から得られた枝角類 4 属 (*Bosmina*, *Ceriodaphnia*, *Diaphanosoma*, *Bosminopsis*) の 211 個体のサンプルの mt16SrRNA 遺伝子の領域にもとづき、分子系統樹を作成した。それぞれの系統の分布パターンを調べたところ下記のことが分かった。

- ① 日本の 106 湖沼にいる 299 個体の *Bosmina longirostris* を解析したところ、4 つの種内系統により構成されていることが分かった(図 1)。それぞれの系統の国

内での分布パターンには特徴があった。研究成果(2)で海外サンプルと比較した結果を示す。

- ② *Bosmina freyi* は、北米に分布し日本では未記載種である。本研究で日本の 32 湖沼にいる 124 個体を解析したところ、ハプロタイプ数は 4 しかなかった。千葉および瀬戸内海付近の湖沼に分布する。日本における本種の起源については、研究成果(3)で示す。
- ③ *Bosmina tanakai* は北海道および青森に分布する。
- ④ 日本の *Bosminopsis* cf. *deitersi* では、系統およびハプロタイプ間の地理的なパターンは明瞭ではなかった。
- ⑤ *Ceriodaphnia* cf. *reticulata* は 3 つの系統から構成されていた(図 1)。それぞれの系統は別種である可能性がある。
- ⑥ *Diaphanosoma* 属は 4 つの種系統があった(図 1)。但し、Korovchinsky (2013)によれば、6 から 7 種の *Diaphanosoma* が日本に生息する。今回のサンプリングだけでは、日本の *Diaphanosoma* 属を網羅的

【図 1】 mt16SrRNA に基づく系統樹



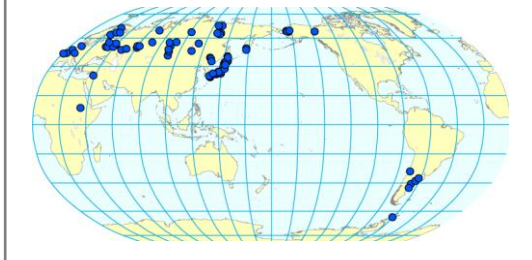
に収集できなかった。

(2) 全球規模の *Bosmina longirostris* の系統地理-氷河期退避地仮説の検証

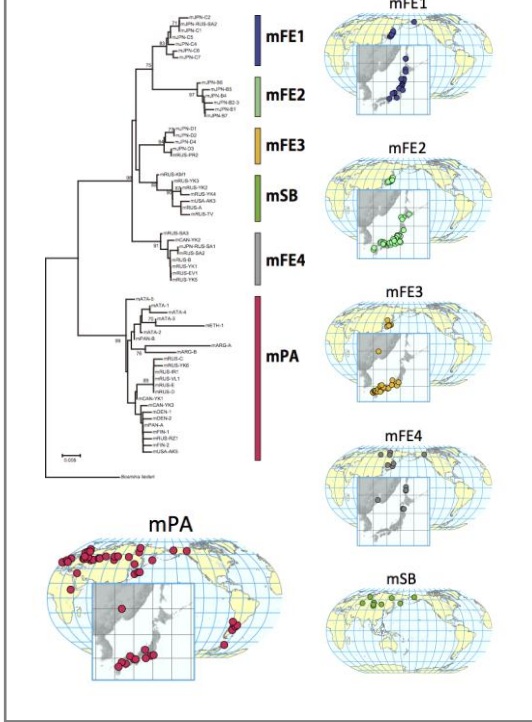
前述の日本の 106 湖沼で採集した *Bosmina longirostris* に加えて、海外 104 湖沼にいる同種のサンプルを mt16SrRNA と核 HSP90 遺伝子の配列を解析した(図 2)。ミトコンドリアと核の双方の座位で全球に分布するコスモポリタンの系統(mPA)がある一方で、極東域に固有な種内系統が 4 つ存在した。極東域の 4 系統はそれぞれ分布パターンに特徴があ

った(図3、図4)。このことから、極東域が本種の氷期退避地であり、複数の系統が種分化の過程にあることが示された。すなわち、極東域は氷期退避地としてコスモポリタンの淡水動物プランクトン種の多様性を創出する中心地の一つである。

【図2】 *Bosmina longirostris* のサンプル採集地点



【図3】 *Bosmina longirostris* のミトコンドリア系統樹と、各系統の分布図

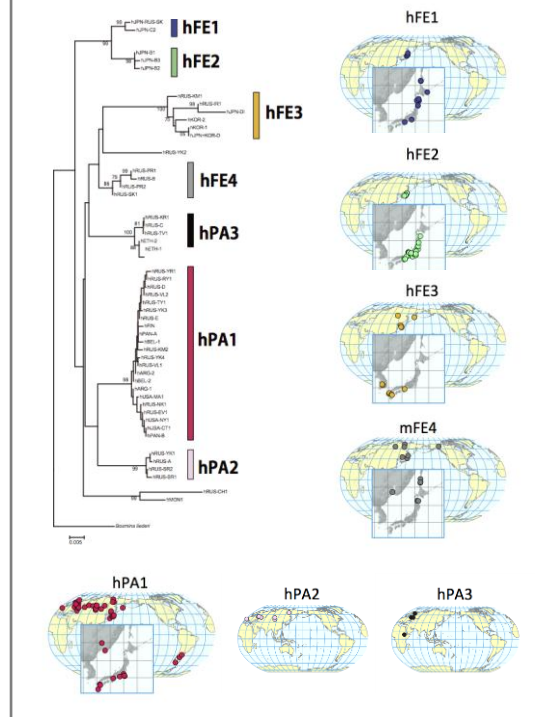


(3) 日本の未記載種の *Bosmina freyi* は北米からの侵入種であった

前述の日本の32湖沼で採集した *Bosmina freyi* に加えて、北米の31湖沼にいる同種のサンプル66個体の mt16SrRNA の配列を解析した。北米のハプロタイプ数は14なのに対して、日本のものは4であった。そのうち3つは北米のものと同じハプロタイプであり、残り1つも北米のものと同じ塩基しか変わらないハプロタイプであった。このことから、日本の *Bosmina freyi* が北米のものとは独立に進化し

たとえ考えられず、近年に北米から移入してきたことが示される。

【図4】 *Bosmina longirostris* の核 HSP90 遺伝子の系統樹と、各系統の分布図



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2件)

(1) Ishida S, Ohtsuki H, Awano T, Tsugeki N, Makino W, Suyama Y, and Urabe, J. (2012) DNA extraction and amplification methods for ephippial cases of *Daphnia* resting eggs in lake sediments: a novel approach for reconstructing zooplankton population structure from the past. *Limnology*, 査読有 13: 261-267. DOI:10.1007/s10201-012-0380-x

(2) Ishida S, Takahashi A, Matsushima N, Yokoyama J, Makino W, Urabe J, and Kawata M. (2011) The long-term consequences of hybridization between the two *Daphnia* species, *D. galeata* and *D. dentifera*, in mature habitats. *BMC Evolutionary Biology*, 査読有 11(209): 1-13. DOI:10.1186/1471-2148-11-209

〔学会発表〕(計4件)

① 石田聖二, Derek J. Taylor, Alexey A. Kotov 「全球規模のゾウミジンコの系

統地理から探る極東域の氷期退避地仮説」日本生態学会, 静岡 2013/3/8.

- ② Ishida S. Biodiversity of freshwater zooplankton (Cladocera: *Bosmina*, *Ceriodaphnia*, *Diaphanosoma*, and *Bosminopsis*) in a glacial refugium, Japan. *Advanced Society of Limnology and Oceanography*. 大津 2012/6/10.
- ③ 石田聖二、大槻朝、陶山佳久、占部城太郎「湖底に堆積する動物プランクトン遺骸（ミジンコ休眠卵鞘）の遺伝解析手法の開発」日本生態学会, 札幌 2011/3/9.
- ④ Ishida S., Ohtsuki H, Suyama Y, Urabe J. Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic remains. International Forum for Adaptability Science II: Technologies for a Sustainable Society. 仙台 2010/12/1.

〔図書〕(計1件)

- (1) 石田聖二・牧野渡 (2012) 淡水動物プランクトン種の地理的構造を形成した歴史的過程 *In: 吉田丈人、鏡味麻衣子、加藤玄海 編「淡水生態学のフロンティア」* 共立出版, pp. 1-8.
ISBN:978-4-320-05737-1.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 聖二 (SEIJI ISHIDA)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号: 80547331