

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291094

研究課題名(和文) ミジンコ個体群の遺伝的多様性に及ぼす温暖化に伴う越冬様式変化の影響

研究課題名(英文) Functional roles of reproductive mode in persisting population and maintaining genetic diversity of daphnia species.

研究代表者

占部 城太郎 (Urabe, Jotaro)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：50250163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：一般に、ミジンコは単為生殖により繁殖し、有性生殖により休眠卵を産卵する。しかし、越冬を担う休眠卵生産が遺伝的多様性や個体群の遺伝構造にどのような影響を及ぼすかよく分かっていない。そこで、本研究ではミジンコ類を対象に広域的な遺伝構造を把握するとともに、ミジンコ個体群の遺伝構造と休眠卵生産との関係について解析を行った。その結果、日本のミジンコは北米から侵入した4クローンを起源としており、絶対単為生殖型であることがわかった。1つの池に複数のクローンが生息出来るのは、競争が激化する前に休眠卵を産むためであり、環境変化に対する休眠卵生産の鋭敏さは集団の遺伝的多様性を維持する上でも重要であることが判った。

研究成果の概要(英文)：In general, Daphnia reproduce parthenogenetically but switch to sexual reproduction for producing resting eggs that are capable of overwintering. If certain parthenogenetic individuals are competitively superior to others, their success results to reduce genetic diversity. However, it not yet clear how competitive persistence of daphnia populations are related with maintenance of the genetic diversities. This study showed that some of competitively inferior individuals are highly sensitive to environmental changes in initiating production of the resting or sexual eggs By producing these eggs before intensifying the competitive interactions, daphnia species maintained their genetic diversities.

研究分野：生態学

キーワード：プランクトン 遺伝的多様性 個体群動態 ミジンコ 湖沼 休眠卵 絶対単為生殖 外来種

1. 研究開始当初の背景

ミジンコ (*Daphnia*) は湖沼の低次生産と高次生産を繋ぐ主要な動物プランクトンであり、物質循環や群集構造に支配的な影響を及ぼす湖沼生態系を特徴づけるキーストン生物である。このため、温暖化等の環境変化に伴うミジンコ個体群の応答は、湖沼生態系の環境変化応答を考える上で重要な生物である。一般に、ミジンコは単為生殖により繁殖し、有性生殖により休眠卵を産卵する。この休眠卵は湖底等に沈み、生育環境が好転すると孵化して再び単為生殖により繁殖する。冬期は水温が低く餌も少ないため、ミジンコ個体群は休眠卵により越冬するのが普通である。また、ミジンコの休眠卵生産は有性生殖の機会でもあるので、不適な環境を乗り越えるだけでなく、遺伝子型の多様性を創出・維持するうえでも重要である。研究代表者は温暖化により、冬期の温度上昇や餌環境が好転すると、ミジンコの浮遊越冬個体が増加する一方で休眠卵生産が減少することを指摘した。しかし、越冬様式の変化が個体群の遺伝構造にどのような影響を及ぼすかよく分かっていない。

2. 研究の目的

ミジンコの休眠卵は有性生殖により生産されるため、浮遊越冬個体の増加に伴う休眠卵の適応的価値の減少は、個体群の遺伝子型の多様度の低下を通じて、長期的には個体群を脆弱にさせる可能性がある。本研究は、この可能性を、遺伝構造や生殖様式の観点から検討することを目的とした。具体的には、本邦におけるミジンコ類の遺伝構造やその変化を広域のおよび経年的に把握するとともに、個体群内における各個体の有性生殖能や繁殖特性を詳細に解析することで、生活史に及ぼす温暖化影響とその個体群の遺伝的多様性への波及効果を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、(1)ミジンコ類の遺伝的多様性を把握するための広域野外調査、(2)山形県畑谷大沼を対象とした底質コアに埋蔵されている休眠卵を用いたレトロスペクティブ解析、(3)同沼におけるミジンコ類の季節性を把握するための定期調査、(4)個体群の遺伝構造解析による生殖様式解析、及び(5)有性生殖頻度が異なる個体間での競争実験を実施することにより進めた。

ミジンコ類の分類や生物地理は、近年、遺伝情報を手がかりとして国際的に整理されつつある。しかし、日本のミジンコ類については分類学的精査が十分にされておらず、遺伝情報にもとづく生物地理や遺伝的多様性についての知見は皆無である。そこで、本研究の基盤となるミジンコ類の広域的な遺伝構造や遺伝的多様性を把握するため、国内の

様々な湖沼で採集し、集積整理してきたプランクトンサンプルを用いて(1)を実施した。また、数種のミジンコ類が生息している山形県畑谷大沼を対象に季節的なフェノロジーと、過去100年レベルでの変遷を明らかにするために(2),(3)を行った。さらに、(4),(5)において、同沼における *Daphnia dentifera* と *D. pulex* 個体群を対象に、詳細な遺伝構造解析と有性生殖及び休眠卵生産頻度を解析することで、越冬様式の遺伝的多様性への影響を調べた。

4. 研究成果

(1)ミジンコ類の遺伝的多様性と生物地理
日本各地の様々な湖沼で採集してきた動物プランクトン標本を精査し、遺伝解析を行ったところ、*D. galeata*, *D. dentifera*, *D. pulex*, *D. similis*, *D. tanakai*, *D. ambigua*, *D. pulicaria*, *D. cristata*, 及び2つの未確定もしくは未記載種 (*D. pulex* の近似種と *D. galeata* の近似種) の分布が確認された。このうち、*D. pulex* s.l. (和名ミジンコ) は代表的な動物プランクトン種としてしばしば紹介されてきたが、近年の遺伝解析から8種が含まれることが明されている。そこで、日本各地の湖沼で最終された個体についてミトコンドリアDNA及び核DNAの塩基配列を詳細に解析したところ、調べたすべての個体は panarctic *D. pulex* (*D. pulex* s.s.) であるものの、本来日本には生息していない北米に産する *D. pulicaria* の遺伝子も持つ

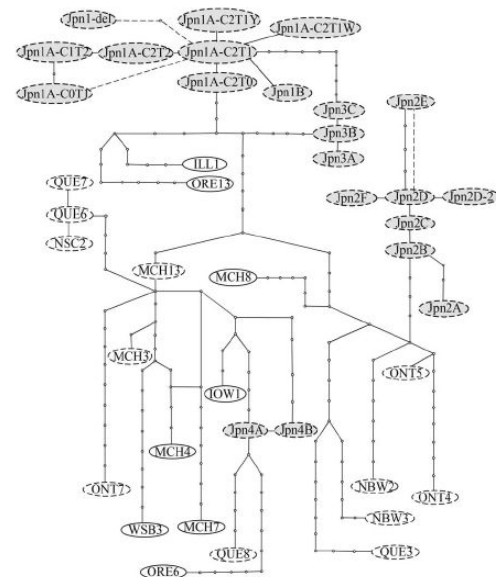


図1 日本における *D. pulex* (灰色) のハプロタイプネットワーク (So et al. 2015)

雑種個体であること、北米産の panarctic *D. pulex* と遺伝的にほぼ一致することから、北米からの外来種であること、いずれの個体も有性生殖をせず雌だけで休眠卵も生産する絶対単為生殖型であること、マイクロサテラ

イト 12 多座遺伝子型はたった 4 パターンしかなく、日本の *D. pulex* 個体は 4 クローン（系統）を起源としていること、そのうち 2 系統には mtDNA に変異があり（図 1）、一部の系統の日本への侵入は 700~4000 年前であること、などが判った。日本に生息している *D. pulex* の遺伝的多様性は極めて低いことが明らかとなる一方、有性生殖をせずになぜ長期間存続出来るのか、またどのような経緯で日本に侵入したのかなど、興味深い課題が提示された。

(2) ミジンコ個体群の長期的変遷

山形県畑谷大沼は標高 550m の山間部に位置する 19ha の山地湖沼であり、*D. dentifera* と *D. galeata* の雑種個体群と *D. pulex* 個体群が生息している。そこで、これらミジンコ類の長期的な変遷を明らかにするために、底質コアを採集し、年代測定を行うとともに、ミジンコ遺骸の定量解析や休眠卵の遺伝解析を行った。その結果、ミジンコ類はこの沼の富栄養化が進行する 1950 年代から徐々に増加し、当初は *D. dentifera* の D1 type という mtDNA を持つ集団だけがみられたが、1960 年代には D2 type、次いで *D. galeata* の mtDNA をもつ集団が増加した（図 2）、さらに、オオクチバスが閘放流された 1980 年代後半には *D. pulex* も見られるようになった。すなわち、ミジンコ類の量的及び種組成の変遷は、沼の栄養状態のみならず、魚の放流などのイベントなどを契機に変化していったことが伺われた。このように、休眠卵や遺骸を用いた遺伝解析を行うことで、これまで困難であった種レベルでのミジンコ類の変遷を解明出来ることが本研究から明らかとなった。

図 2 休眠卵から見た畑谷大沼のミジンコ

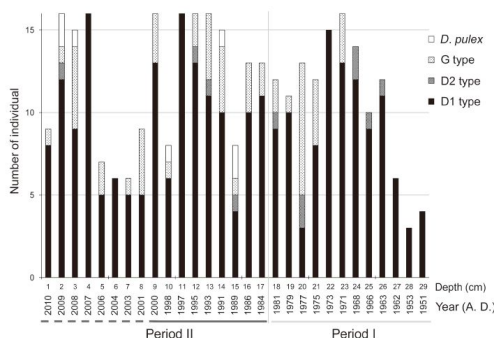


Fig. 8. Number of aphid carcasses with haplotypes D1, D2, G and *D. pulex* in different chronological layers. Total of 334 ECs were successfully analyzed. Two distinctly divided periods are denoted by a gray line (period I) and dark gray line (period II). Inaccurately estimated chronological years are shown with a broken underline.

種の変遷 (Ohtsuki et al. 2015)

(3) 個体群の遺伝構造とその維持機構

D. dentifera × *D. galeata* 雑種個体群
山形県畑谷大沼に生息している *D. dentifera* と *D. galeata* の雑種個体群を対象にその動態と遺伝構造について解析を行ったところ、互いに遺伝交流の乏しい 2 つの隠蔽個体群 (A, B 個体群) が存在していることが判った。

フェノロジーや遺伝的多様性を解析したところ、個体群 A は主に *D. dentifera* の D1 type もしくは *D. galeata* の mtDNA を持ち、春に出現し、核遺伝子型の遺伝的多様性は高いものの、夏以後ほとんどいなくなること、一方 B 個体群は *D. dentifera* の D2 type の mtDNA を持ち、核遺伝子型の遺伝的多様性は低いものの、冬季を含む通年出現することが判った。また、休眠卵生産量は A 個体群のほうが圧倒的に多いが、単為卵の生産量は B 個体群のほうが高く、プランクトンとしては B の個体群のほうが競争的に優位であることが伺われた。このことから、個体群 A は競争的に劣位であるが、競争が激化する前に有性生殖を行って休眠卵を生産することで多様な遺伝子型からなる個体群を維持していること、一方個体群 B は、有性生殖頻度は低いものの、競争的に優位で通年プランクトンとして生活していることが示唆された。

D. pulex 個体群

山形県畑谷大沼には 2 系統の *D. pulex* (JPN1 と JPN2) が分布していた。この 2 系統はともに絶対単為生殖型であるため、2 つの独立した個体群である。形態もサイズも同じであるためニッチは重複すると考えられるが、なぜ競争排除が起こらず 2 系統が共存するのか謎である。そこで、両個体群の動態や競争能力、休眠卵生産能力を調べた。その結果、JPN2 は JPN1 に比べプランクトンとしても資源獲得競争には劣位であるが、休眠卵を作りやすい性質を持ち、密度増加などにより容易に休眠卵を生産することが判った。このことから、JPN2 は JPN1 に比べ競争的に劣位であるが、競争が激化し排除される前に休眠卵を生産することで個体群を維持していることが判った。

休眠卵生産は、*D. pulex* にみるように個体群の維持機構のみならず、*D. dentifera* と *D. galeata* 雑種個体群のように遺伝的多様性を維持するうえでも重要な機能を有していることが判った。温暖化により休眠卵生産が低下するとすれば、個体群やその遺伝的多様性の維持にも深刻な影響を及ぼすと考えられる。

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 13 件)

- Iwata, T., N. Mochizuki, T. Suzuki, Ay. Kohzu, H. Kojima, M. Fukui, and J. Urabe (2016) Roles of Terrestrial Carbon Subsidies to Aquatic Community Metabolism in Mountain Lake Ecosystems. In G. Kudo (ed), Structure and Function of Mountain Ecosystems in Japan: Biodiversity and Vulnerability to Climate Change, pp 115-144, Springer (査読無し)

2. Lewandowska¹, A. M., A. Biermann., El. T. Borer., M. A. Cebrian-Piqueras, S. A. J. Declerck., L. De Meester., E. Van Donk, L. Gamfeldt, D. S. Gruner., N. Hagenah, W. Harpole, K. P. Kirkman, C. A. Klausmeier, M. Kleyer, J. M. H. Knops, P. Lemmens, E. M. Lind, E. Litchman, J. Mantilla-Contreras, K. Martens, S. Meier, V. Minden, J. L. Moore¹, H. Olde Venterink, E. W. Seabloom⁴, U. Sommer, M. Striabel, A. Trenkamp, J. Trinogga, J. Urabe, W. Vyverman, D. B. Van de Waal, C. E. Widdicombe and H. Hillebrand. (2016) The influence of balanced and imbalanced resource supply on biodiversity-functioning relationship across ecosystems. *Philosophical Transactions B*, 371 doi: 10.1098/rstb.2015.0283. (査読有り)
 3. Lakatos, C., J. Urabe., W. Makino. (2015) Cryptic diversity of Japanese *Diaphanosoma* (Crustacea: Cladocera) revealed by morphological and molecular assessments. *Inland Waters* 5:253-262. doi: 10.5268/IW-5.3. 847(査読有り)
 4. So, M., H. Ohtsuki, W. Makino, S. Ishida, H. Kumagai, K. G. Yamaki, J. Urabe. (2015) Invasion and molecular evolution of *Daphnia pulex* in Japan. *Limnology and Oceanography* 60: 1129-1138. doi: 10.1002/lno.10087(査読有り)
 5. Ohtsuki, H., T. Awano, N. K. Tsugeki, S. Ishida, H. Oda, W. Makino, J. Urabe. (2015) Historical changes in the plankton community of a small mountain lake over the past 60 years as revealed by *Daphnia* ephippial carapaces stored in lake sediments. *PLoS One*: doi:10.1371/journal.pone.0119767(査読有り)
 6. Miura, A. and J. Urabe. (2015) Spatial and seasonal changes in species diversity of epilithic fungi along environmental gradients of a river. *Freshwater Biology*, 60:673-685.
 7. Mukai, Y., T. Suzuki, W. Makino, T. Iwabuchi, M. So and J. Urabe. (2014) Ecological impacts of the 2011 Tohoku Earthquake Tsunami on aquatic animals in rice paddies. *Limnology*, 15: 201-211. (査読有り)
 8. Tsugeki, K. N., J. Urabe. (2014) An experimental test of the ability of *Daphnia galeata* to produce resting eggs in Lake Biwa, *Journal of Limnology*, 73(1)569. (査読有り)
 9. 林 竜馬・槻木玲美・小田寛貴・大槻朝・粟野 将・牧野 渡・占部城太郎 (2014) 山形県畑谷大沼堆積物の花粉分析に基づく過去60年間の植生とスギ花粉年間推定量の変化. *日本花粉学会誌* 60: 13-25. (査読有り)
 10. Hessen, D. O., J. E. Elser, R. W. Sterner and J. Urabe. (2013) Ecological stoichiometry: An elementary approach using basic principles. *Limnology and Oceanography*, 58:2219-2236. (査読有り)
 11. Tomimatsu, H., T. Sasaki, H. Kurokawa, J.R. Bridle, C. Fontaine, J. Kitano, D.B. Stouffer, M. Vellend, T. M. Beemer, T. Fukami, E. A. Hadly, M.G.A van der Heijden, M. Kawata, S. Kefi, N. J.B.Kraft, K. M. McCann, P. J. Mumby, T. Nakashizuka, O. L. Petchey, T. N. Romanuk, K. N. Suding, G. Takimoto, J. Urabe and S. Yachi. (2013) Sustaining ecosystem functions in a changing world: a call for an integrated approach. *Journal of Applied Ecology*, 50:1124-1130. DOI: 10.1111/1365-2664.12116(査読有り)
 12. Makino, W., H. Ohtsuki, J. Urabe. (2013) Finding copepod footprints: DNA barcoding for the diapausing eggs in lake sediments. *Limnology*, 14:269-282. (査読有り)
 13. Tsugeki, K. N. and J. Urabe. (2013) Eutrophication, Warming and Historical Changes of the Plankton Community in Lake Biwa during the Twentieth Century. In C. Goldman, M. Kumagai and R. Robarts (eds), *Climate Change and Inland Waters: Impacts and Mitigation for Ecosystems and Societies*, pp. 111-130, Wiley-Blackwell (査読有り)
- 〔学会発表〕(計14件)
1. 岩淵翼・小黒芳生・山口弘子・日出間純・占部城太郎 「高山性ミジンコは紫外線に強いのか?平地種との比較による検証」日本生態学会 2014年3月17日 広島国際会議場(広島県広島市)
 2. 八巻健有・熊谷仁志・大槻朝・牧野渡・占部城太郎 「絶対単為生殖型 *Daphnia pulex* 2クローンの季節的消長と経年変化」日本生態学会 2014年3月17日 広島国際会議場(広島県広島市)
 3. 熊谷仁志・石田聖二・牧野渡・占部城太郎 「ミジンコにおける隠蔽個体群の共存機構」日本生態学会 2014年3月17日 広島国際会議場(広島県広島市)
 4. 八巻圭佑・熊谷仁志・大槻朝・牧野渡・占部城太郎 「Microsporidian パラサイトの *Daphnia* 個体群に対する感染率;季節変化

と宿主遺伝子型の選択性」日本生態学会
2014年3月17日 広島国際会議場（広島
県広島市）

5. 八巻 圭佑・八巻 健有・牧野 渡・占部 城
太郎「微孢子虫と微塵子;寄生者の感染率
に及ぼす宿主個体群の遺伝構造の影響」日
本生態学会 2015年3月19日 鹿児島大
学（鹿児島県鹿児島市）
6. 八巻健有・八巻圭佑・牧野渡・占部城太郎
「クローナル個体群間の競争と共存
-Daphnia pulex を用いた野外実験による
検証響」日本生態学会 2015年3月19日
鹿児島大学（鹿児島県鹿児島市）
7. 八岩淵翼・小黒芳生・山口弘子・日出間純・
占部城太郎「高山性ミジンコの紫外線耐
性：DNA 損傷と行動解析から」日本生態学
会 2015年3月21日 鹿児島大学（鹿児
島県鹿児島市）
8. 松谷祐一郎・牧野渡・占部城太郎「餌条件
変化に対する植食者の応答 消化酵素か
ら考える」日本生態学会 2015年3月
21日 鹿児島大学（鹿児島県鹿児島市）
9. 相川 奈津美・占部城太郎・牧野渡・大槻
朝・柳沼 康平「ハリナガミジンコ
(*Daphnia dentifera*) 集団は任意交配し
ているのか？」日本生態学会 2015年3月
22日 仙台国際センター（宮城県仙台市）
10. 柳沼 康平・相川 奈津美・牧野渡・占部
城太郎「成体越冬は種内競争に有利か？
-ハリナガミジンコ個体群の遺伝構造応
答による解析-」日本生態学会 2015年3
月22日 仙台国際センター（宮城県仙台
市）
11. 八巻健有・八巻圭佑・大槻朝・牧野渡・
占部城太郎「ミジンコ (*Daphnia pulex*)
隠蔽個体群の維持機構」日本生態学会
2015年3月22日 仙台国際センター（宮
城県仙台市）
12. 牧野渡・松木悠・陶山佳久・占部城太郎
「MIG-seq を用いた集団遺伝学的解析：動
物プランクトンへの適用」日本生態学会
2015年3月24日 仙台国際センター（宮
城県仙台市）
13. 松谷祐一郎・占部城太郎・牧野渡「植食
者の消化応答からみた藻類多様性の生態
系機能」日本生態学会 2015年3月22日
仙台国際センター（仙台市）
14. 山元綾弥香・牧野渡・占部城太郎「日本
のホロミジンコ：その正体を探る」日本生
態学会 2015年3月24日 仙台国際セン
ター（宮城県仙台市）

〔図書〕(計 1 件)

1. 占部城太郎(編・著)「湖沼近過去調査法：
より良い湖沼環境と保全目標設定のために」
共立出版 2014年 256ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://meme.biology.tohoku.ac.jp/Macrocol/urabe/Project1.html>

http://meme.biology.tohoku.ac.jp/Macrocol/urabe_blog/Topics/entori/2015/4/9_puresuririsuwoshimashita_mijinkohatattage_tiwqi_yuantosuru_bei_mikarano_gui_hua_zhongdatta_ri_benni_sheng_xisuru_she ng_wuno_yi_waina_you_lai.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

占部城太郎 (URABE JOTARO)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：50250163

(2)研究分担者

なし

研究者番号：

(3)連携研究者

牧野 渡 (MAKINO WATARU)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：90372309