

mtDNA の遺伝子解析によるワレカラ (甲殻綱, 端脚目) の同定

谷 良夫*・阪口 正樹**

Identification of Caprellids (Crustacea, Amphipoda) by morphological and mtDNA molecular analysis

Yoshio TANI*, Masaki SAKAGUCHI**

Abstract :

In this study, we reported phylogenetic analysis based on both morphological and molecular features. We got sixteen kinds of skeleton shrimp in Osaka Bay and adjacent waters. Morphological phylogenetic tree was constructed by Cluster Analysis. Molecular phylogenetic tree was constructed by Maximum Likelihood Method based on mitochondrial DNA nucleotide sequence.

As a result, classification by morphological method of skeleton shrimps was almost all proper from molecular analysis. But, it was necessary to distinguish *C. penantis* S type from *C. penantis* R type as different taxon. We showed that it was proper to distinguish *C. algaceus* from *C. penantis*. We could accept *C. sp. A* as an independent species.

はじめに

大阪湾では20種類近くのワレカラが生息している(阪口 2009, 2012)。ワレカラはヨコエビなどととも端脚目に属する。日本には105種類生息し、その中で *Caprella* 属は71種を占める(TAKEUCHI 1999)。主に温帯および亜寒帯海域で生息している *Caprella* 属は、大阪湾にも各所に生息し、海藻やロープなどから簡単に採集できる。

今回、大阪湾および淡路島周辺で採集したワレカラの標本から形態学的に2属16種を同定し、外部形態の特徴から平均連結法を使用して系統樹を作成した。しかし、ワレカラは脱皮による成長で形態が変化し、季節によって成体の大きさも変化する。また個体変異もあるので、形態による同定は熟練を要する。そこで、この16種類のワレカラのミトコンドリアDNA(以下、mtDNA)のうち16S ribosomal RNA(以下、16S rRNA)領域およびシトクロームCオキシダーゼサブユニットI(以下、CO I)領域の遺伝子の塩基配列を決定し、最尤法(Maximum Likelihood Method)により分子系統樹を作成した。そして、外部形態による同定と同じように、分子レベルでワレカラの同定が可能であることがわかったので報告する。

方法

• 外部形態による系統関係 :

大阪湾各地と淡路島周辺11地点で海藻やロープからワレカラを採集した。大阪湾のアマモ場に一般的に生息している *C. kroyeri* が採集できなかったため、岡山県瀬戸内市牛窓産のものを用いた。採集したワレカラを直ちに99.5%エタノールまたは70%エタノールで固定した。形態的特徴(ARIMOTO 1976; 阪口 2009, 2012)により2属16種を同定した。また、第1触角、第2触角、頭部・第1胸節~第5胸節の長さ・突起の有無、第2咬脚、第5胸脚前節の把握棘の有無・位置など外部形態59項目から平均連結法によりクラスター分析図を作成した。

• DNA抽出試料 :

実体顕微鏡下で先細ピンセットと柄付き針を使って、試料のすべて、または試料の一部を切りだした。全DNAをQiagen社製のDNA抽出キット DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて全DNAを抽出した。mtDNAの分析には、PCR法により十分にDNAを増幅できた7地点の標本を用いた。

• mtDNAの増幅および塩基配列の決定 :

PCRには、mtDNAの16S rRNA領域のプライマーとして16SAR・16SBR(PALUMBI and BENZIE 1991)および、この度の研究のためにワレカラ解析用に新たに設計したプライマー16S424F(5'-GGCTGCGGTATACTAACTGTGCTAAGGT-3')と16S424R(5'

* 兵庫県立尼崎小田高等学校

** 〒662-0824 西宮市門戸東町1-26

e-mail:warekara@bca.bai.ne.jp

2013年3月29日受理

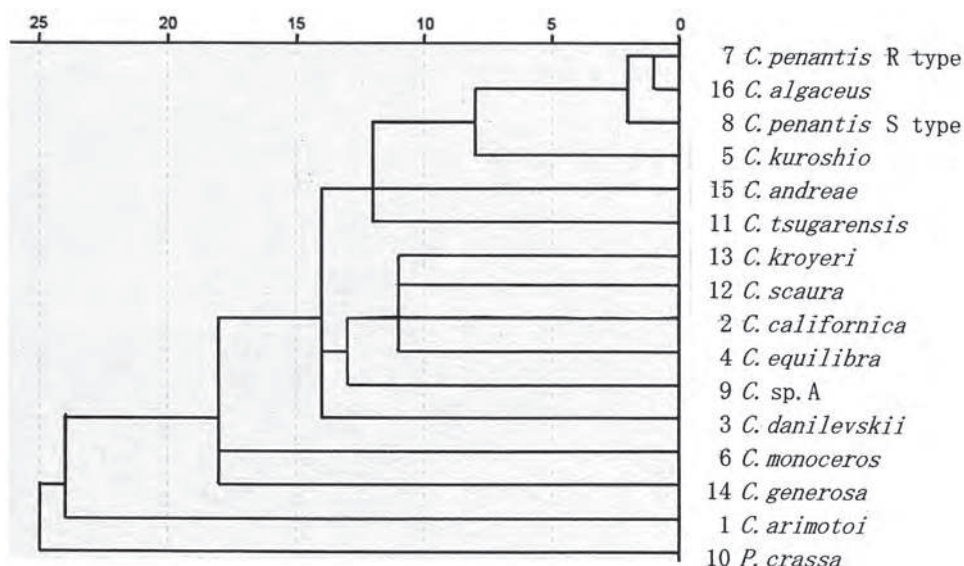


Fig. 1 大阪湾および近海に生息するワレカラの外部形態より平均連結法で求めたクラスター分析図。種名の前の数字はTable 2とFig. 2の数字と対応する。
The figure of Cluster Analysis of skeleton shrimps based on the average linkage in Osaka Bay and adjacent waters.

Table 1 試料としたワレカラのデータ Details of caprellid specimens used

Species name	Location of collection	Date of collection
<i>Caprella kroyeri</i> (1)	Okayama, Setouchi, Ushimado	27 Jul. 2012
<i>C. algaceus</i> (6)	Nishinomiya, Koshien beach	17 May 2011
<i>C. equilibra</i> (2)	Amagasaki, Amagasaki port	15 May 2011
<i>C. scaura diceros</i> (3)	Amagasaki, Amagasaki port	15 May 2011
<i>C. andreae</i> (2)	Sumoto, Yura	26 Apr. 2010
<i>C. arimotoi</i> (3)	Awaji, Iwaya, Tanoshiro beach	10 Nov. 2011
<i>Paracaprella crassa</i> (2)	Awaji, Iwaya, Tanoshiro beach	10 Nov. 2011
<i>C. danilevskii</i> (3)	Awaji, Iwaya, Tanoshiro beach	10 Nov. 2011
<i>C. monoceros</i> (1)	Awaji, Iwaya, Tanoshiro beach	10 Nov. 2011
<i>C. sp.A</i> (竹内) (3)	Awaji, Iwaya, Tanoshiro beach	10 Nov. 2011
<i>C. tsugarensis</i> (3)	Awaji, Iwaya, Tanoshiro beach	10 Nov. 2011
<i>C. generosa</i> (2)	Awaji, Iwaya, Yamatojima	24 Nov. 2011
<i>C. penantis</i> R type (6)	Awaji, Iwaya, Yamatojima	16 May 2011
<i>C. kuroshio</i> (4)	Awaji, Iwaya, Yamatojima	16 May 2011
<i>C. californica</i> (1)	Kobe, Tarumi	19 Jul. 2012
<i>C. penantis</i> S type (1)	Kobe, Tarumi	19 Jul. 2012

():Population which we inspected

-AATTAAGGGTTGAACAAACCCTCCTTTA-3')を用いた。またmtDNAのCO I領域のプライマーとしてLCO1490・HCO2198 (FOLMER et al. 1994)を用いた。サーマルサイクラーとして株式会社アステック製PC-708を使用した。増幅条件はともに95℃ 4min., (95℃ 15sec., 55℃ 15sec., 68℃ 30sec.) × 37cycles, 68℃ 5min., 4℃ ∞とした。増幅したPCR産物は、北海道システム・サイエンス株式会社に依頼し塩基配列を決定した。外群として甲殻類のカメノテ(*Capitulum mitella*)のデータをDDBJ (DNA Data Bank of Japan)

から引用して使用した。解読した塩基配列のうち、16S rRNAは471塩基を、CO Iは247塩基を解析に使用した。解析ソフトMEGA5を使用し、最尤法により分子系統樹を作成した。

結果

試料とした大阪湾とその周辺から得た2属16種のワレカラの採集データをTable 1に示した。また、それら59項目の外部形態の特徴をTable 2に示し、平均連結法を使用してクラスター分析図(Fig.1)を作成し

た。それによると、*Paracaprella*属は*Caprella*属の外に位置し、*Caprella*属は一つの分類群としてまとまった。*Caprella*属の中では*C. penantis* R type (Fig.2-7)と*C. penantis* S type (Fig.2-8), *C. algaceus* (Fig.2-16)は形態的によく似たグループを形成した。また、これら3種と*C. kuroshio* (Fig.2-5), *C. andreae* (Fig.2-15), *C. tsugarensis* (Fig.2-11)も、形態的によく似たグループを形成した。これら6種の共通点は、頭部には前方突起があり、各胸節の長さがほぼ等しく、また各胸節には背側突起は認められないことであった。これとは別に、*C. kroyeri* (Fig.2-13), *C. scaura* (Fig.2-12), *C. californica* (Fig.2-2), *C. equilibra* (Fig.2-4), の4種も形態的によく似たグループを形成した。これらの共通点は第2胸節が最長となることであった。

すべてのワレカラについてmtDNAの16S rRNA領域とCO I領域のPCR法によるDNA増幅と増幅産物のシーケンスを試みた。その結果、良好な塩基配列データが得られたものについて、MEGA5を用いて、アラインメント解析を行った。16S rRNA領域の解析からは15種類のワレカラの最尤法による系統樹 (Fig.3) が得られた。それぞれのワレカラは種ごとに遺伝的に分化していた。また、mtDNAのCO I領域から最尤法により作成した系統樹 (Fig.4) も得られた。DDBJから得た3種類のデータを加えて12種類のワレカラの系統樹を作成した。16S rRNA領域で得られたと同じく、それぞれのワレカラは種ごとに遺伝的に分化していた。

このように、16S rRNA領域から作成した系統樹でもCO I領域から作成した系統樹でも、それぞれの種は遺伝的に分化していた。

分子系統樹 (Fig.3, Fig.4) によると、*Paracaprella*属は*Caprella*属の外に位置し、*Caprella*属は一つの分類群としてまとまった。これは外部形態から求めたクラスタ分析図と同じであった。しかし、外部形態から近縁と示された*C. penantis* R type, *C. penantis* S typeと*C. algaceus*は、分子系統樹からそのような関係は認められなかった。また同じく外部形態から近縁と示された*C. kroyeri*, *C. scaura*, *C. californica*, *C. equilibra*についても、分子系統樹からは近縁な関係は認められなかった。しかし、その中でも*C. penantis*と*C. andreae*, *C. dilatata*の3種類は分子系統樹 (Fig. 4) から近縁性が示された。

考察

今回、外部形態により同定した2属16種のワレカラのクラスタ分析図と、mtDNAの16S rRNA領域とCO I領域の塩基配列より分子系統樹を求めた。遺伝子解析の結果は、外部形態により同定した種ごとに遺伝的に分化していた。このことは、外部形態による分

類が妥当であることを強く示唆している。

従来、大阪湾で採集したワレカラで*C. penantis* R typeとして扱われてきたものの中に、胸脚前節に把握棘のないものが含まれていることに着目し、阪口 (2009) はそれを*C. algaceus*と同定した。16S rRNA領域の系統樹 (Fig. 3) でもCO I領域の系統樹 (Fig. 4) でも遺伝的に分離したので、形態により*C. penantis* R typeと*C. algaceus*に分けたことが妥当であったことを示している。

一方、*C. penantis* R typeと*C. penantis* S typeは、今回の遺伝子解析の結果では遺伝的に分化していた。これは両者が別種である可能性を強く示唆するものである。両者は形態的に、第1触角、第2咬脚から識別できる。また、R typeは体節が太く、S typeは体節が細い (竹内 1995) ことで識別できる。CO I領域の解析でも、*C. penantis* R typeとDDBJに登録された*C. penantis*は遺伝的に分化している。このことは*C. penantis*グループの分類について詳しい研究を必要としている。*C. penantis* R typeも*C. penantis* S typeも未記載種の可能性がある。

16S rRNA領域の系統樹 (Fig. 3) から同様な結果が得られた。*C. penantis* R typeと*C. penantis* S typeとが種ごとに遺伝的に分化していた。また、CO I領域の系統樹 (Fig. 4) からは、DDBJ上の*C. penantis*と*C. penantis* R typeが遺伝的に分化していた。これまで同種として扱ってきた3つの分類群の間に別種として扱うべき遺伝的距離を保って隔てられていることを示している。今後の形態的、生態的研究により異種として記載されるべきグループであると考えられる。*C. sp. A*は16S rRNAの結果および外部形態からも独立した種として認めることができた。未記載種の可能性がある。

まとめ

1 大阪湾周辺の海で採集した16種類のワレカラを試料として、形態的特徴を基に平均連結法によりクラスタ分析図を作成した。またmtDNAの塩基配列 (16S rRNA471塩基対, CO I 247塩基対) を基に最尤法により分子系統樹を作成した。その結果、これまで行われていた形態による同定どおりに、遺伝子解析でも同定できることが示された。

2 遺伝子解析からは、*C. penantis* R typeと*C. penantis* S typeは異なる分類群とする必要があることを示した。また、これまで*C. penantis*として扱われてきた中に胸脚前節の把握棘がないことで*C. algaceus*を区別したが、遺伝子解析からもそれが妥当であることを示した。

3 *C. sp. A*も遺伝子解析の結果から独立した種と認識できる。

謝辞

試料採集において、兵庫県立人と自然の博物館の鈴木武氏のお世話になった。遺伝子解析では兵庫県立尼崎小田高等学校のお世話になった。兵庫県立西宮甲山高等学校の石川正樹氏には有益な助言をいただいた。また、須磨海浜水族園の2011年度および2012年度のスマスイ自然環境保全助成を受けた。共にお礼を申し上げる。

引用文献

- ARIMOTO, I. 1976. Taxonomic studies of caprellids(Crustacea, Amphipoda, Caprellidae) found in the Japanese and adjacent waters. Spec. Publ. Seto Mar. Biol. Lab., ser. III . 229pp.
- FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ R. and VRIGENHOEK, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol., 3:294-299.
- PALUMBI, SR. and BENZIE, J. 1991. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. Mol. Mar. Biol. Biotechnol., 1(1):27-34.
- 阪口正樹. 2009. 大阪湾初記録のウミモワレカラ(端脚目, ワレカラ科). 南紀生物, 51(2):163-164.
- 阪口正樹. 2012. 大阪湾産のワレカラ(甲殻綱・端脚目). 兵庫生物, 14(3):201-212.
- 竹内一郎. 1995. ワレカラ亜目. in西村三郎編, 原色検索日本海岸動物図鑑[Ⅱ], 193 - 205. 保育社, 大阪.
- TAKEUCHI, I. 1999. Checklist and bibliography of the Caprellidea(Crustacea: Amphipoda) from Japanese waters. Otsuchi Marine Science, 24:5-17.

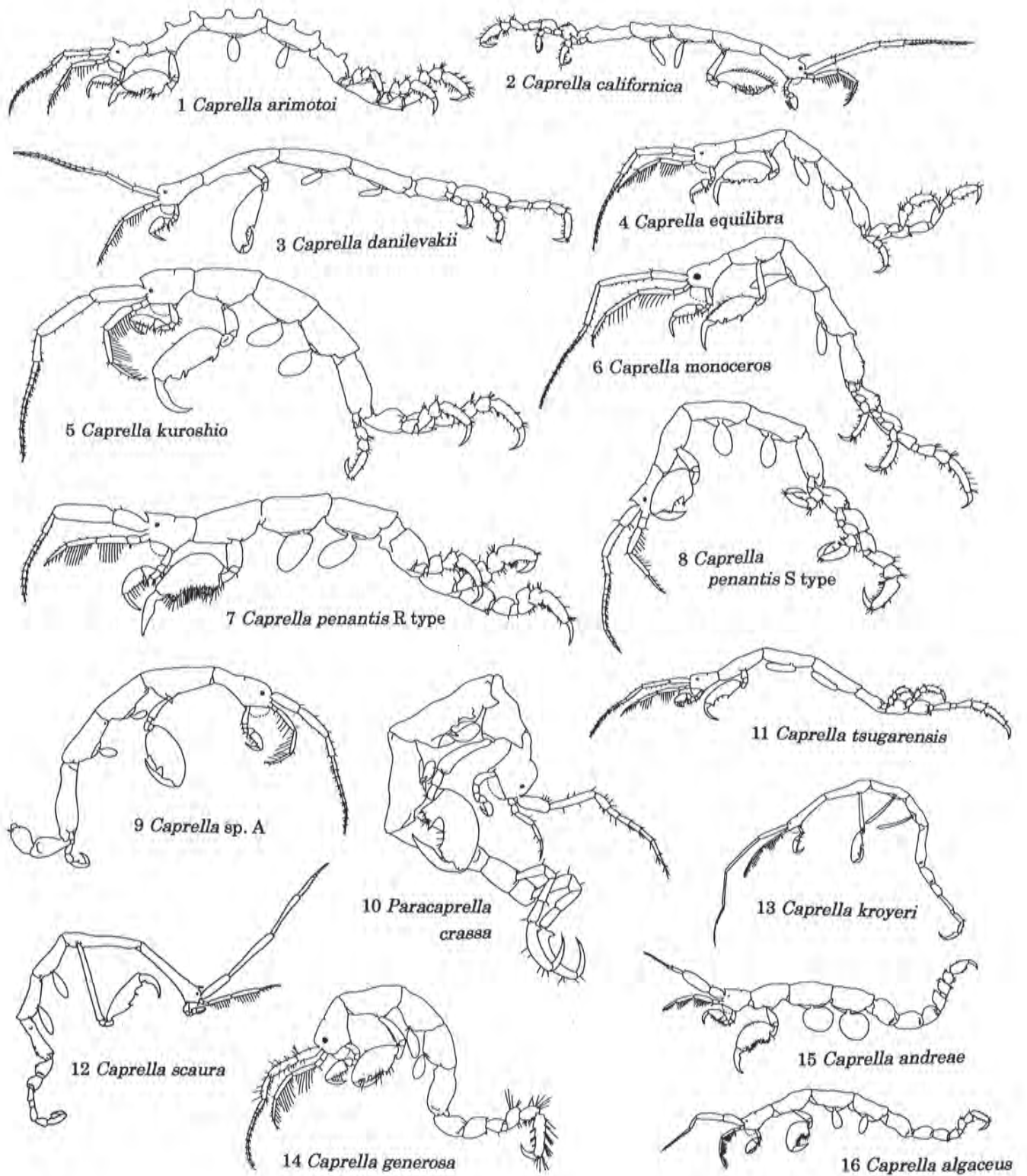


Fig. 2 大阪湾および近海で採集したワレカラ。1～11は許可を得て『兵庫生物』14巻3号より引用した。Skeleton shrimps collected in Osaka Bay and adjacent waters. We quoted figure 1-11 from "Hyogo Biology" 2012. 14(3):201-212.

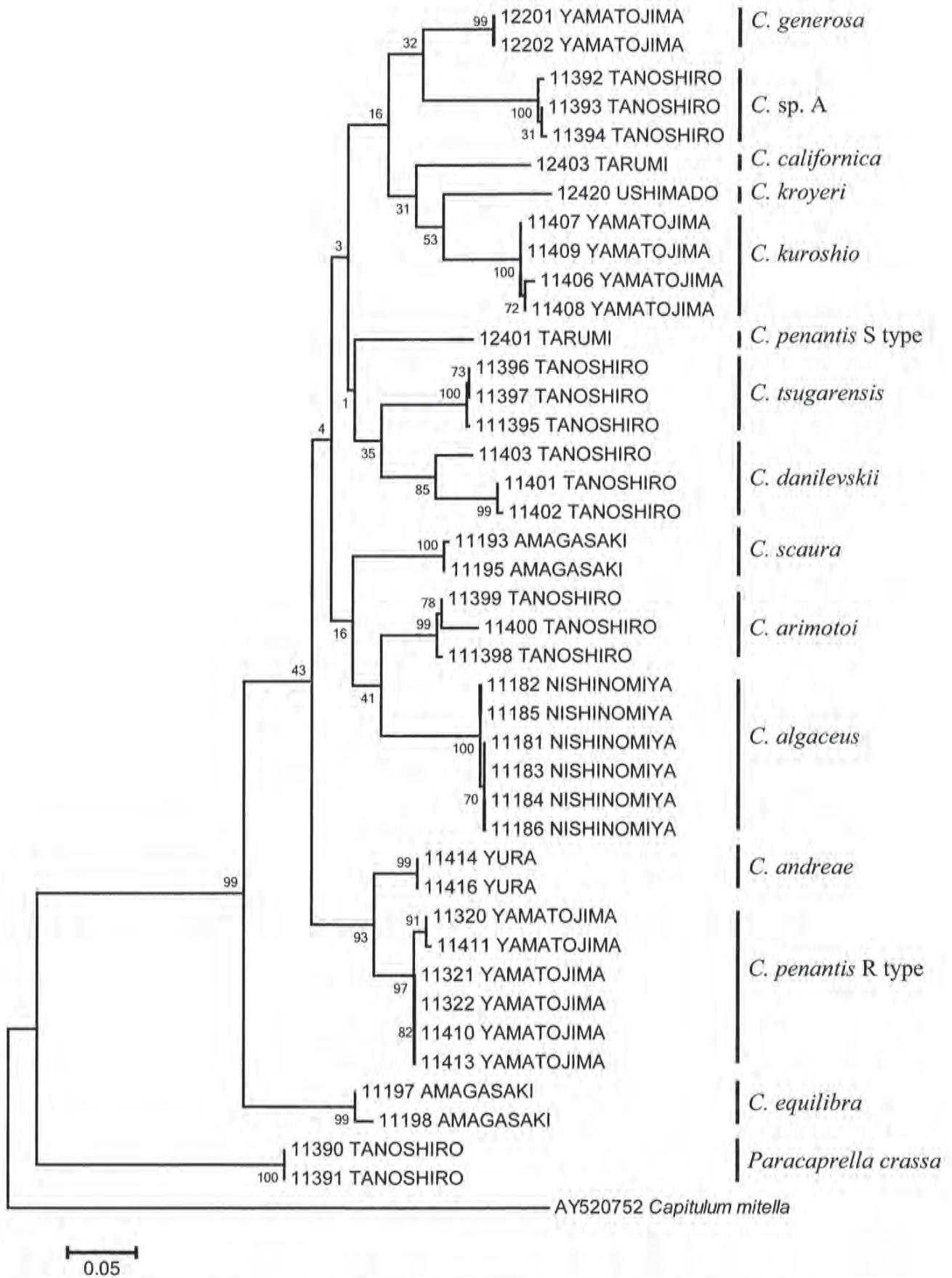


Fig. 3 ミトコンドリアDNA 16S rRNA (471塩基対)によるワレカラの分子系統樹。Maximum Likelihood Tree based on genetic distances estimated from mitochondrial 16S rRNA gene sequences (471bp) in skeleton shrimps, collected from Osaka Bay and adjacent waters.

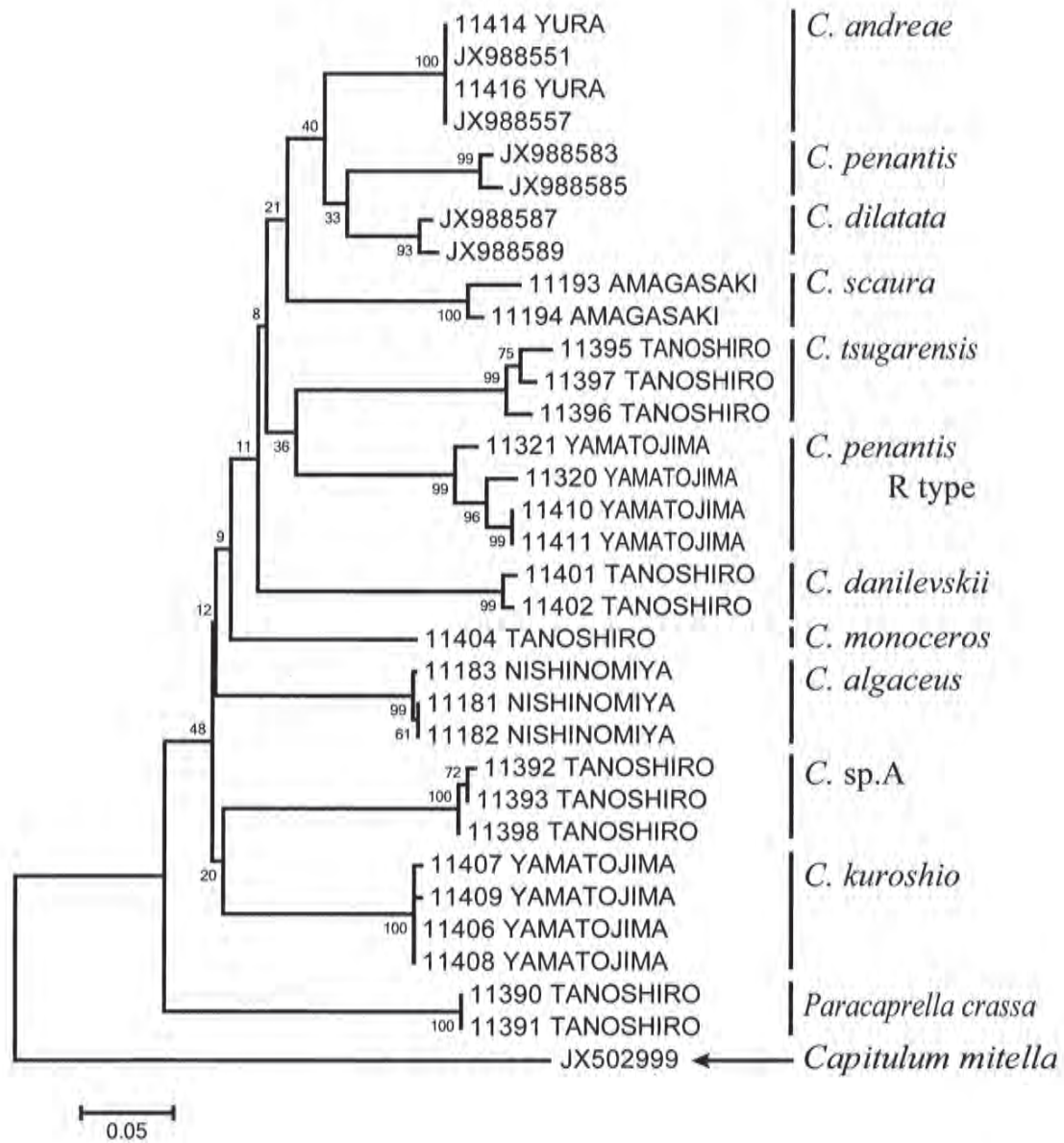


Fig. 4 ミトコンドリアDNA CO I (247塩基対)によるワレカラの分子系統樹。Maximum Likelihood Tree based on genetic distances estimated from mitochondrial CO I gene sequences (247bp) in skeleton shrimps, collected from Osaka Bay and adjacent waters.