

エビ類の生活史戦略と  
遺伝的集団構造に関する分子生態学的研究

2018 年

藤田 純太

エビ類の生活史戦略と  
遺伝的集団構造に関する分子生態学的研究

Molecular ecology on the life history strategies and  
genetic population structures of shrimp species

2018 年

藤田 純太

Yoshitaka Fujita

# 目次

第1章 序章	1
1.1 研究の背景	1
1.2 エビ類の生活史戦略	2
1.3 本論文の構成	4
1.4 本研究で扱う分子マーカー	5
第2章 純淡水性種ミナミヌマエビと 両側回遊性種ミゾレヌマエビにおける遺伝的集団構造の比較	7
2.1 背景と目的	7
2.2 材料と方法	8
2.3 結果	11
2.4 考察	14
第3章 純淡水性種ミナミヌマエビにおける河川内分散性の評価 ～由良川の大規模な河川争奪との関係～	16
3.1 背景と目的	16
3.2 材料と方法	19
3.3 結果	20
3.4 考察	23
第4章 両側回遊性ヌマエビ類3種における幼生の河川間分散の比較	25
4.1 背景と目的	25
4.2 材料と方法	28
4.3 結果	33
4.4 考察	40

第5章	クロザコエビ属エビ類の系統地理	44
5.1	背景と目的	44
5.2	材料と方法	45
5.2.1	ヒメクロザコエビとクロザコエビの遺伝的分化	45
5.2.2	クロザコエビ属の分子系統樹	45
5.2.3	クロザコエビの種内系統地理	48
5.3	結果	48
5.3.1	ヒメクロザコエビとクロザコエビの遺伝的分化	48
5.3.2	クロザコエビ属の分子系統樹	50
5.3.3	クロザコエビの種内系統地理	51
5.4	考察	54
5.4.1	ヒメクロザコエビとクロザコエビの遺伝的分化	54
5.4.2	クロザコエビ属の分子系統樹	54
5.4.3	クロザコエビの種内系統地理	55
第6章	クロザコエビとトゲザコエビの生態特性と遺伝的多様性の比較	56
6.1	背景と目的	56
6.2	材料と方法	58
6.3	結果	61
6.4	考察	67
第7章	総合考察	71
7.1	淡水性エビ類の遺伝的多様性	71
7.2	海産エビ類の遺伝的多様性	73
7.3	エビ類の生活史進化と多様性創出機構	74
要約		76
謝辞		81
引用文献		83

# 第 1 章 序章

## 1.1 研究の背景

地球上で現在認められる多様な生態系は、熱帯から極域、高山から深海底に至るまで、様々な環境要因が組み合わされて形成されている。そして、これらの環境基盤の上に、生物間の複雑な相互作用や食物連鎖が生態系を成り立たせている（環境省，<http://www.biodic.go.jp/biodiversity/>）。生物多様性は、このような生命の豊かさを表す概念であり、生態系の多様性・種の多様性・遺伝子の多様性という 3 つの階層で捉えられている（小池 & 松井 2003）。現在、地球上の生物多様性は、人間活動の直接的あるいは間接的な影響により急速に衰退してきており、多くの種が、存続を保障するために適切な保全的介入を必要としている（Pullin 2002）。

我々人類は、多くの恩恵を生物界から得ている。例えば、食料、医薬品、衣類繊維、住居としての木材など、生物資源には限りがない。さらに、自然界には、多くの潜在的に有益な資源が内在しており、多様な生物資源を保全することで、難病の治療や持続可能な資源開発についても解決の糸口が見つかるかもしれない。生態系サービスは、生物によって無償で提供される人類に有益な機能のことで、その経済的価値は、1 年あたり 33 兆 US ドルにものぼると見積もられている（Frankham et al. 2010）。この値は、全人類の 1 年あたりの総生産 18 兆 US ドルのほぼ 2 倍に相当し、生物多様性の保全がいかに人類にとって直近の課題かを如実に表している。

我が国では、国際生物多様性年にあたる 2010 年、生物多様性条約第 10 回締約国会議（COP10）が愛知県名古屋市で開催されたことを皮切りに、生物多様性保全への理解が一般社会に浸透しつつある。COP10 では、主に、遺伝資源へのアクセスと利益配分に関する名古屋議定書と、2011 年以降の新戦略計画（愛知目標）が採択された。戦略目標の 1 つと

して、「生態系、種、遺伝子の各階層の多様性を守る（戦略目標 C）」ことが掲げられ、目標達成のためには「農作物、家畜、漁業資源の遺伝的多様性を維持する（目標 13）」ことが求められている。しかし、遺伝的多様性は、生態系の中で維持されてきたもので、対象種のみでの遺伝的多様性を管理しても成功しないことは明確であり、生態系全体を基盤とした視点が必要である。生態系を基盤とした生物資源管理に関する基礎的知見を整備するために、生物の保有する生態特性や生息環境の特性と遺伝的多様性をリンクさせ、マクロな視点で遺伝的多様性を捉えるという新しい研究の方向性が求められている。

エビ類は、産業上有用な無脊椎動物であり、分類学上は、節足動物門・甲殻亜門・軟甲綱・十脚目に位置し、陸水生態系から深海生態系まであらゆる水圏環境に生息している（林 2011）。エビ類は、底層において集団で生活することが多く、地域によってはキーストーン種として生態系に大きな影響を与えている（Pringle et al. 1993; Covich et al. 1999; Crowl et al. 2001）。エビ類の遺伝的多様性は、近年急速に研究が進められてきたが（Hurwood & Hughes 2001; Page & Hughes 2007a; Page & Hughes 2007b; Page et al. 2008 など）、生態特性との関係からマクロな視点で検討した研究はほとんどない。本研究では、エビ類の生息環境を陸水域から深海域まで鉛直方向に捉えて、エビ類全体の遺伝的多様性創出機構を解明することを目的とした。

## 1.2 エビ類の生活史戦略

遺伝的多様性は、集団存続に対するリスクの指標とすることができる。遺伝的多様性が低いと、有害な遺伝子が固定しやすく、環境変化に弱くなるなど種の脆弱性が増し、絶滅のリスクが高まると考えられている（Frankham et al. 2010）。遺伝的多様性の程度は、その種の分散性と密接に関係している（鷲谷 & 矢原 1996）。高い分散性を示す種は、地域間で遺伝的に交流（以下「遺伝子流動」）するため、地域集団の遺伝的多様性は高い状態で維持さ

れる。一方、分散性が低い種は、地域間の遺伝子流動が制限され、遺伝的に異なる地域集団が生まれやすい。隔離された地域集団は、遺伝子頻度が確率的に固定しやすくなる遺伝的浮動や近親交配、自然選択による DNA 多型の選択的一掃などで遺伝的多様性が低下する傾向にある（井鷲 2012）。

エビ類の分散性は、個体発生初期において、卵から産出される稚仔の発育ステージに影響される（諸喜田 2003）。幼生が体サイズの小さな段階で産出される種は、卵サイズが小さく卵数が多い「小卵多産型」で、幼生は基質に捕まる力が弱いため、水に流されやすく高い分散性を示す。それに対し、より発生の進んだ段階で産出する種は、幼生期初期を卵内で過ごすため卵サイズは大きく、それに伴い卵数が少なくなる「大卵少産型」であり、孵化後すぐに着底して生活する直達発生を示すことが多く、地域間の分散性は相対的に低い。

エビ類の卵サイズ変異は、生活史戦略の一形質として知られており、特に淡水性のヌマエビ科エビ類（以下「ヌマエビ類」）を材料に研究が進められてきた（諸喜田 2003 など）。餌が豊かではない陸水環境では、飢餓耐性を高めるために、より発生の進んだ段階で稚仔を産出する大型の卵が適応上有利となり、河川上流部に生息することで稚仔の流下を最小限にする純淡水性の生活史が進化した（益子 2001; Closs et al. 2013）。それに対して、より体サイズの小さな幼生期に孵化し、川の流れに乗って河口域まで流下して、成長に必要な餌生物を生物生産力の高い河口域で摂取できるように適応した両側回遊性種は、より確実に幼生を河口域に届けるべく河川下流域に生息することが多い（Closs et al. 2013）。海洋環境は、体サイズが小さく遊泳能力の乏しい稚仔にとっては厳しく不安定であるため、卵数を増やすことは、高い初期死亡率（初期減耗）への対抗措置になると考えられる（星野 & 西村 2001）。

King & Butler (1985) は、深海性エビ類においても、陸水性種と同じような卵サイズ・卵数の変化を伴う生活史戦略が存在することを指摘した。太平洋に生息する深海性のコエビ下目エビ類の繁殖生態を比較したところ、より深海に分布するエビ類ほど、卵が大きく一腹

産子数が少ない大卵少産化の傾向が見られた。同様の現象は、南極沖合深層部に生息するイバラガニ類 (Morley et al. 2006) や本邦北海道近海に分布するタラバエビ類 (水島 2008) においても観察され、浅い海域に生息する種は小卵多産型で、より深海部に生息する種ほど大卵少産型が多いことが分かる。King & Butler (1985) は、水深が深くなるほど魚類の個体数が少なくなることに注目し、捕食者である魚類が少ない深海部に甲殻類が生息することの利点を推察した。一方、深海では水温が低く幼生の変態に時間がかかるため、天敵から襲われるリスクが上がり、幼生の餌生物も少ないため大卵化が有利であろうと考えられている (King & Butler 1985; Morley et al. 2006)。

### 1.3 本論文の構成

陸水域および海域におけるエビ類の生活史戦略は、生態学的に考察されているのみで、生活史が生み出す分散性、遺伝的分化、遺伝的多様性について、それぞれの生活圏で厳密に評価した研究はこれまでにない。遺伝的多様性を種間比較するためには、地形や海流などの物理構造や地史の影響が小さい同所的分布種、かつ DNA マーカーの塩基置換発生確率 (以下「進化速度」) の違いが反映しにくい近縁種、すなわち同所的近縁種を扱うのが望ましいとされる (Dawson et al. 2002)。しかし、種数の少ない淡水性および深海性エビ類では、生活史の異なる同所的近縁種を扱った厳密な比較研究系を得ることが難しい。本研究では、陸水性種として、西日本に広く分布するミナミヌマエビ *Neocaridina* sp. (中～上流分布・大卵少産型・純淡水性) とミヅレヌマエビ *Caridina leucosticta* (下流分布・小卵多産型・両側回遊性) を、海産種として日本海深層部に分布するクロザコエビ *Argis lar* (浅層分布・小卵多産型) とトゲザコエビ *Argis toyamaensis* (深層分布・大卵少産型) を比較対象とした。それぞれの比較対象種は、各生活圏で個体数が多く、分布域が重なるため、同所的に採集することで厳密に比較することができる。また、比較的近縁であるため、DNA マーカー



の進化速度の差異が反映されにくい。したがって、河川上流から深海底までのエビ類の遺伝的多様性を比較するうえで優れたモデルといえる。

本論文の第2章では、河川中流～上流に分布する純淡水性種ミナミヌマエビと下流部に分布する両側回遊性種ミゾレヌマエビの遺伝的多様性を種間比較した。第3章では、ミナミヌマエビの河川内での分散の制限について、第4章では、ミゾレヌマエビの河川間分散について詳しく調べた。第5章では、フィールドを日本海深層部に移し、まず、クロザコエビとトゲザコエビの系統分類学的情報を遺伝子レベルで整理した。次に、浅海性のクロザコエビについて分布域全体の遺伝的組成を調べ、海流構造や過去の地史的変動との関連を検討した。その結果を踏まえて、第6章では、浅海性小卵多産型のクロザコエビと深海性大卵少産型のトゲザコエビの遺伝的多様性を、生態情報と関連させて種間比較した。第7章では、第2章～第6章までの知見をまとめて、河川上流から深海底までのエビ類の遺伝的多様性について総合的に考察した。

#### 1.4 本研究で扱う分子マーカー

本研究では、エビ類の分散性と遺伝的多様性をDNAマーカーで評価する。生物の分散性は、標識再捕法による直接的手法でも評価が可能であるが、エビ類は脱皮をするためタグ付けが難しく、遺伝学的手法により調べるのが一般的である (Hughes 2007)。このように、生態学の問題を分子生物学的アプローチにより解明しようとする「分子生態学」は、近年世界的に注目されている新しい学問分野である (Beebee & Rowe 2008)。

分子マーカーを用いた生物の分散性の評価は、他の近縁な生物種との種間比較による相対評価でなければ意味をなさない (Dawson et al. 2002)。ゆえに、進化速度が種間で異なるマイクロサテライトの遺伝子座 (Frankham et al. 2010) は、分散性の種間比較を厳密に行うには不適である。例えば、比較的近縁な種Aと種Bの分散性をマイクロサテライトの結果

で比較しようとする場合、種Aは種Bより分散性が高いという結果になったとしても、その結果が真に分散性の差なのか、分子マーカーの進化速度の差なのかを判断することができない。このような観点から、本研究では、ミトコンドリア DNA（以下「mtDNA」）のダイレクトシーケンスによる塩基配列多型分析を遺伝学的手法として用いた。mtDNA は、好気性細菌由来の環状 DNA で、呼吸関連遺伝子群がイントロンをほとんど含まずにコンパクトに収められており、PCR 用プライマーの開発が容易である（小池 & 松井 2003）。加えて、これまでに多くの研究成果が蓄積されており、核 DNA よりも進化速度が安定していて、分子マーカーによる進化速度の差異が反映されにくいメリットがある。さらに、mtDNA は組換えが起こらず、系統を追跡することができるなどの遺伝学・系統学的な利点も多い。したがって、本研究の目的を達成するためには、mtDNA による多型分析が最も優れていると考えられる。

## 第2章 純淡水性種ミナミヌマエビと 両側回遊性種ミゾレヌマエビにおける遺伝的集団構造の比較

### 2.1 背景と目的

ヌマエビ類は、熱帯から温帯の淡水域に広く分布し、頭胸甲長（エビ類は、尾部が曲がるため、頭胸甲の長さで体長を測定）が最大でも 10 mm ほどの小型エビ類である（林 2007）。ヌマエビ類は、第 1、第 2 歩脚の先端に剛毛束があり、それをブラシのようにこすって、藻類やデトリタスを食べていると考えられている。ヌマエビ類は、流れの緩やかな川岸に集団で生息しているため、その存在の有無は河川底質環境に影響を及ぼすほどで、陸水生態系の基盤を支える構成員としての役割を担っている（Pringle et al. 1993; Covich et al. 1999; Crowl et al. 2001）。したがって、ヌマエビ類の生態を解明し、多様性を評価することは、河川生態系の保全を考えるうえで重要である。

ミナミヌマエビ *Neocaridina* sp. とミゾレヌマエビ *Caridina leucosticta* は、西日本に普通に見られるヌマエビ類である。両者は、頭胸甲長が約 8 mm（浜野ら 2000）、寿命が約 1 年（丹羽 & 浜野 1990）、流れの穏やかな川岸を好適な生息環境とする（丹羽 & 浜野 1990; 浜野ら 2000）など、生物学的特性が似ている。しかし、両者は河川における流程分布や生活史が大きく異なる。ミナミヌマエビは、河川の中流から上流部にかけて分布し、少数の大型卵（100~140 個、 $1.6 \times 1.05$  mm; 諸喜田 1981）を、年間を通して抱卵することができ、卵内で幼生期を過ごした稚エビを産出（直達発生）する一般的な純淡水性の生活史をもつ（丹羽 2001）。一方、ミゾレヌマエビは両側回遊性を示し、成体は河川下流域に分布して、多くの小型卵（平均 1109 個、 $0.51 \times 0.31$  mm; 諸喜田 1981）を春から夏にかけて抱卵し、初夏からゾエア幼生が流下、初秋から稚エビの河川遡上が観察される（山平ら 2007; Yatsuya et al. 2012, 2013）。また、ミナミヌマエビのカワリヌマエビ属 *Neocaridina* とミ

ゾレヌマエビのヒメヌマエビ属 *Caridina* は、かつて同属としてまとめられており (林 2007)、分子系統樹においてもヌマエビ科内で近縁であることが知られている (Page et al. 2008)。このように、ミナミヌマエビとミゾレヌマエビは同所的近縁種とみなすことができ、生態特性と遺伝的多様性の関係を調べるうえで優れた研究材料といえる。

## 2.2 材料と方法

本研究では、西日本を流れる 8 河川 (小矢部川 : OYB、伊佐津川 : ISZ、江の川 : GN、雪浦川 : YU、佐波川 : SB、加古川 : KK、仁淀川 : NYD、古座川 : KZ) において (Fig. 2-1)、2008 年春から夏にかけて、たも網を用いてミナミヌマエビとミゾレヌマエビを採集し、99.5%エタノールで固定した。遺伝子の分析には 1 河川 20 個体ずつ使用した。

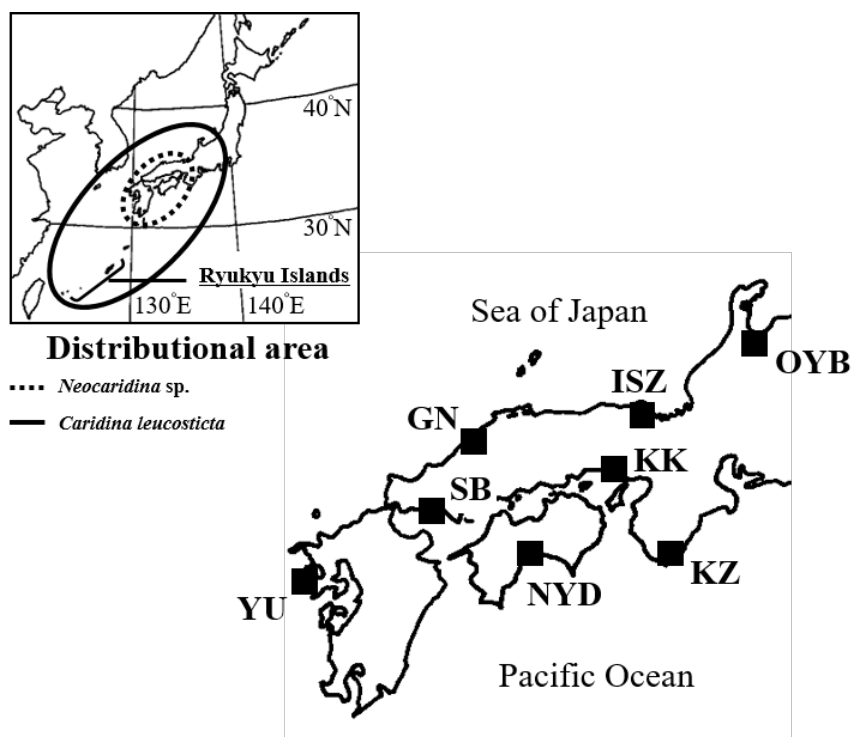


Fig. 2-1. Distributional area for each species and a map showing the sampling locations from the western part of Japan. Letters refer to collection locations, OYB, Oyabe River; ISZ, Isazu River; GN, Gono River; YU, Yukinoura River; SB, Saba River; KK, Kako River; NYD, Niyodo River; KZ, Koza River.

DNeasy Tissue Kit (Qiagen 社) により、マニュアルに従い DNA を抽出した後、Takara Ex Taq (タカラバイオ株式会社) を使って、mtDNA の NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) と NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) 遺伝子をそれぞれ PCR 法により増幅した。ND 遺伝子群は、他の動物群では集団生物学的研究によく用いられているが (例えば、魚類 : Salzburger et al. 2005; Yu et al. 2010; Hirase et al. 2012)、エビ類ではほとんど用いられていない。本研究では、ND2 と ND5 遺伝子を扱うことで、エビ類における分子マーカーとしての有用性も評価した。ND2 遺伝子と ND5 遺伝子は、これまでにミトコンドリアゲノムが全て解読されているコエビ下目 4 種 *Halocaridina rubra* (ヌマエビ科)、オニテナガエビ *Macrobrachium rosenbergii* (テナガエビ科)、イセエビ *Panulirus japonicus* (イセエビ科)、ウシエビ (ブラックタイガー) *Penaeus monodon* (クルマエビ科) の当該遺伝子領域周辺部を比較し、保存性の高い領域にプライマー

[ND2F-Neoden (5'-GTTTAYGYGGTTGTTTCCTCTTCAG-3')、  
ND2R-Neoden (5'-CTCTTATRGGAACTTTGAAGGCTAC-3')、  
ND2F-Carileu (5'-TTAACCTATGCTGTAGTATCTTCATCAG-3')、  
ND2R-Carileu (5'-TCTTATAAGAACTTTGAAGGCTGCTAG-3')、  
ND5F-Atyidae (5'-CCCCCTATTATYCGGATATCCTG-3')、  
ND5R-Atyidae (5'-GCGGCTATAACTAARAGRGC-3')] を設計した。PCR 法の温度条件は、[初期熱変性 : 94°C-5 分、35 サイクル× (熱変性 : 94°C-30 秒、アニーリング : 55°C-30 秒、伸長反応 : 72°C-30 秒)、最終伸長反応 : 72°C-7 分] である。PCR 産物は、ExoSAP-IT (GE Healthcare 社) で精製した後、BigDye Terminator Cycle sequencing Kit ver.1.1 (3.1) (Applied Biosystems 社) を用いて、ABI PRISM 310 (3730xl) Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) により Forward 側からシーケンス反応を行った (International Nucleotide Sequence Database, INSD: accession nos. AB524916-AB525038)。

近年、中国産ミナミヌマエビ（かつてはシナヌマエビ *Neocaridina denticulata sinensis* と称されたが、近年では分類学的混乱が生じているため、日本在来のミナミヌマエビを含めて *Neocaridina sp.* とされる。）が、釣エサ目的で大量に輸入され、日本国内の河川に放流されていることが分かってきた (Niwa et al. 2005)。中国産ミナミヌマエビは、日本在来のミナミヌマエビと形態的に識別ができず、日本在来とされる種もいくつかの系統に分かれる可能性が高いため、分類学的に混乱している。しかし、世界共通の DNA データベースである GenBank に、中国産ミナミヌマエビの DNA 配列 (mtDNA Cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) 遺伝子 : accession nos. AB300183–AB300187) が登録されていたので、本研究でも Folmer et al. (1994) のプライマーを使って、上記の PCR 条件で COI 遺伝子を増幅してシーケンス反応を行い、系統樹上で識別を試みた。

遺伝子解析については、まず、BioEdit (Hall 1999) でアラインメントをとり、MODELTEST (Posada & Crandall 1998) でベイズ情報量基準 (BIC) により推定した最適な塩基置換モデル [ミナミヌマエビ : Tamura-Nei +  $\Gamma$  ( $\Gamma=0.24$ )、ミゾレヌマエビ : Tamura-Nei +  $\Gamma$  ( $\Gamma=0.28$ )] を基に、MEGA ver.5 (Tamura et al. 2007) で近隣結合法 (NJ 法) により分子系統樹を推定した。樹形の頑健性は、ブートストラップ法 (1000 回反復) により評価した。また、DNAsp ver.6 (Librado & Rozas 2009) で遺伝的多様度 (ハプロタイプ多様度 :  $h$ 、塩基多様度 :  $\pi$ ) を、Arlequin ver.3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010) でペアワイズ  $\Phi_{ST}$  を計算し、分子分散分析 (AMOVA) を行った。ペアワイズ  $\Phi_{ST}$  と AMOVA については、100,000 回の無作為化検定により有意性を評価した。遺伝的分化指数  $\Phi_{ST}$  は、0 から 1 までの値をとり、0 から有意に高いかどうかで遺伝的分化の有無を調べる方法である。遺伝的分化が検出されれば集団間の分散性は低く、分化が認められなければ分散性は高いと評価することができる。

## 2.3 結果

本研究では、mtDNAのND2遺伝子(390 bp)とND5遺伝子(354 bp)について、分子マーカーの有効性を調べた。ランダムに選んだサンプル(ISZ:2個体、GN:3個体、YU:1個体、KK:3個体、SB:1個体、NYD:2個体)のmtDNA COI遺伝子(392 bp)を調べたところ、17.3%に変異が見られ、最大節約的に意味のある(以下「parsimony informative」)サイトは12.8%であった。同じサンプルに対してND2遺伝子とND5遺伝子を調べたところ、ND2の変異サイトは19.7%、parsimony informativeサイトは11.5%であった。またND5遺伝子領域では17.2%に変異が見られ、parsimony informativeサイトは10.7%であった。以上のことから、変異サイトはND2がやや多く、最大節約的にはCOIで意味のあるサイトがやや多い結果となった。全体としては変異量に大きな差はなく、ND2とND5は、種内集団間の遺伝的分化を調べるうえでは十分な多型量を有していることが明らかとなった。

推定されたNJ系統樹において、ミゾレヌマエビでは各河川から得られた個体が系統樹上で入り交じり、河川ごとにまとまらない結果となった(Fig. 2-2)。それに対して、ミナミヌマエビは、複数の種内系統が存在することが明らかとなった。ミナミヌマエビの系統Vには様々な河川の個体が含まれ、個体間の遺伝的分化も高く(外来種は複数の産地起源であり個体間の遺伝的差異も大きいと考えられる)、COI系統樹上でGenBankに登録されていた中国産*Neocaridina* sp.と最近縁であることから、系統Vを中国産外来種の系統とみなし、この後の集団遺伝学的解析ではそれらを除いて計算を行った。

ペアワイズ $\Phi_{ST}$ (Table 2-1)とAMOVAのoverall  $\Phi_{ST}$ (Table 2-2)によると、ミナミヌマエビでは高い遺伝的分化が検出されたが、ミゾレヌマエビでは河川間の遺伝的分化がほとんど検出されなかった。また、遺伝的多様度( $h$ ,  $\pi$ )を計算したところ、ミナミヌマエビでは各河川で多様度が小さい傾向が見られたのに対し、ミゾレヌマエビでは各河川で比較

的高い多様度が示された (Table 2-3)。

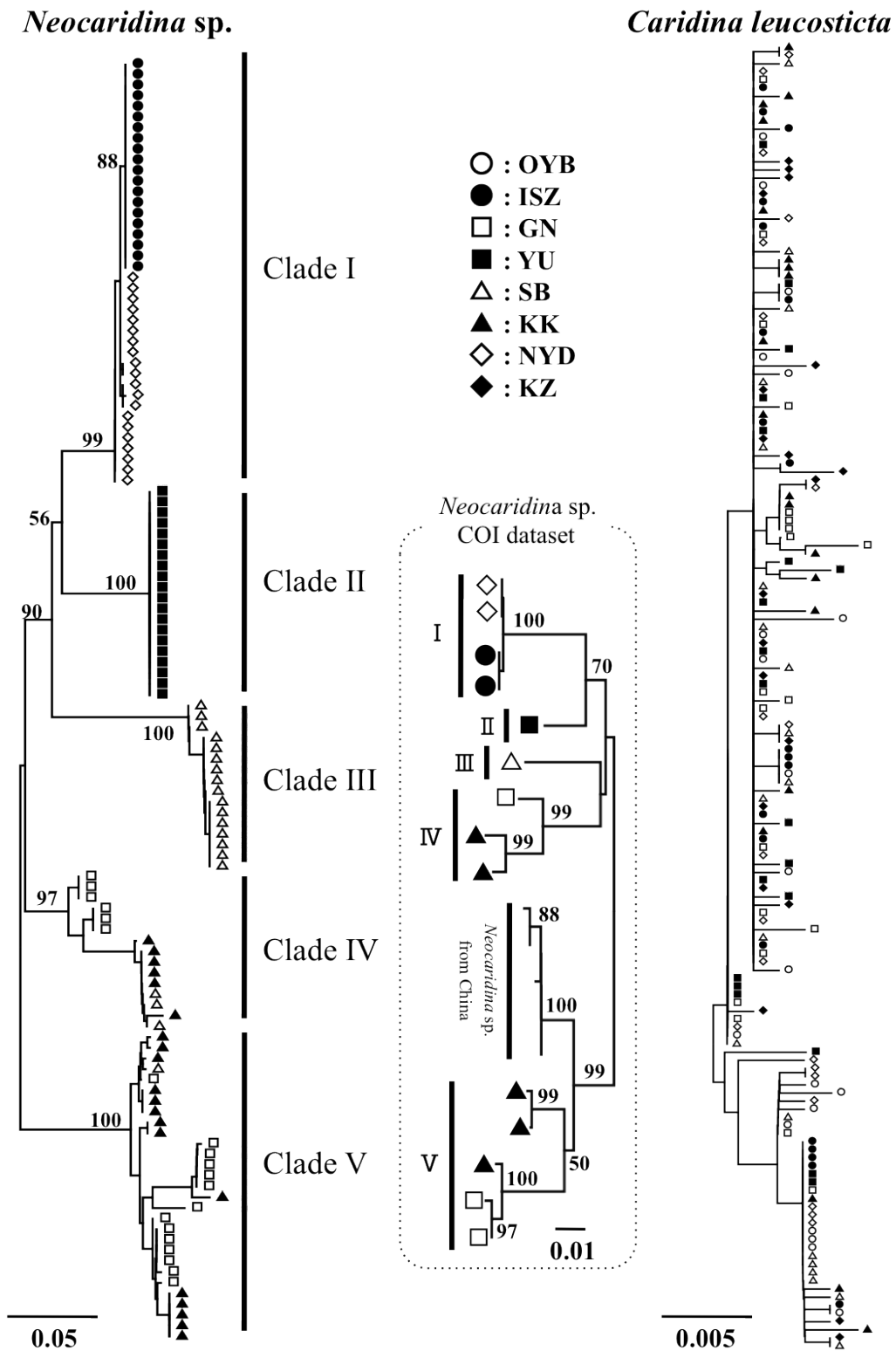


Fig. 2-2. Unrooted NJ tree for each species based on partial sequences of ND2 + ND5. Scores as percentages of 1000 bootstraps above 50 are shown above or below associated nodes. Letters refer to collection locations are shown in Fig. 2-1.



Table 2-1. Pairwise  $\Phi_{ST}$  values between populations for *Neocaridina* sp. (below diagonal) and *Caridina leucosticta* (above diagonal), excluding the putative invaded species. Letters refer to collection locations are shown in Fig. 2-1. (\*):  $P < 0.05$  without Bonferroni correction. \*\*, \*\* and \*\*\*:  $P < 0.05$ , 0.01 and 0.001 under Bonferroni correction, respectively. na = not analyzed.

	OYB	ISZ	GN	YU	SB	KK	NYD	KZ
OYB	-	0.0028	0.0989 (*)	0.0671	- 0.0296	0.0671	- 0.0218	0.0919 (*)
ISZ	na	-	0.0223	0.0058	- 0.0187	0.0016	- 0.0153	0.0135
GN	na	0.9751 ***	-	- 0.0041	0.0683	- 0.0222	0.0430	- 0.0168
YU	na	1.0000 ***	0.9784 ***	-	0.0440	0.0006	0.0223	- 0.0151
SB	na	0.8223 ***	0.6786 **	0.8245 ***	-	0.0406	- 0.0324	0.0634
KK	na	0.9933 ***	0.8531 *	0.9937 ***	0.7322 **	-	0.0237	- 0.0099
NYD	na	0.7480 ***	0.9494 ***	0.9836 ***	0.8030 ***	0.9747 ***	-	0.0416
KZ	na	na	na	na	na	na	na	-

Table 2-2. Results of the analyses of molecular variance (AMOVA) for *Neocaridina* sp. and *Caridina leucosticta* displaying the percentage of variation and associated  $\Phi_{ST}$ , based on data excluding the putative invaded species.

Species	Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	% of variation	$\Phi_{ST}$	P value
<i>Neocaridina</i> sp.	Among populations	5	1766.38	23.96	88.42	0.884	< 0.001
	Within populations	85	266.88	3.14	11.58		
	Total	90	2033.26	27.1			
<i>Caridina leucosticta</i>	Among populations	7	14.38	0.03	2.08	0.021	0.086
	Within populations	152	219.04	1.44	97.92		
	Total	159	233.42				

Table 2-3. Sample size ( $n$ ), number of haplotypes (Nhap), haplotype diversity ( $h$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ) for the two species. Abbreviations of collection locations are shown in Fig. 2-1. \*: The data excluding the putative invaded species. na = not analyzed.

Location	<i>Neocaridina</i> sp.				<i>Caridina leucosticta</i>			
	$n$	Nhap	$h$	$\pi$	$n$	Nhap	$h$	$\pi$
OYB	na	na	na	na	20	14	0.932	0.00482
ISZ	20	1	0.000	0.00000	20	7	0.763	0.00355
GN	6 *	2 *	0.600 *	0.00806 *	20	10	0.832	0.00284
YU	20	1	0.000	0.00000	20	11	0.868	0.00332
SB	19 *	4 *	0.754 *	0.02853 *	20	12	0.889	0.00428
KK	6 *	3 *	0.600 *	0.00296 *	20	12	0.900	0.00396
NYD	20	5	0.732	0.00204	20	10	0.832	0.00429
KZ	na	na	na	na	20	13	0.853	0.00353
Overall	91 *	15 *	0.88 *	0.05202 *	160	59	0.857	0.00390

## 2.4 考察

ヌマエビ類における集団遺伝学的・系統地理学的研究は、これまでも種ごとに行われてきた。例えば、Hurwood & Hughes (2001) や Page & Hughes (2007a) は、オーストラリアの純淡水性ヌマエビ *Caridina zebra* と *Caridina indistincta* が複数の地域集団に分かれることを明らかにした。一方、Page et al. (2008) は、プエルトリコ島における両側回遊性ヌマエビ類の遺伝的特徴を調べ、島内河川間の遺伝的分化がほとんど認められないことを明らかにした。これらの研究は、それぞれの種の多様性を評価しているのみで、生活史の違いがどの程度生物の分散性に寄与するかは明らかになっていない。本研究は、生活史の大きく異なる同所的近縁種ミナミヌマエビとミゾレヌマエビを使って、生活史特性と遺伝的多様性の関係を明確に示すことができた。純淡水性種ミナミヌマエビは、系統樹上で地域ごとにまとまったクレードが検出され (Fig. 2-2)、地域間の遺伝的分化が有意に高い結果となった (ペアワイズ  $\Phi_{ST} = 0.679$  [ $P < 0.01$ ] ~ 1.000 [ $P < 0.001$ ]; Table 2-1, AMOVA  $\Phi_{ST} = 0.884$  [ $P < 0.001$ ]; Table 2-2)。それに対して、両側回遊性種ミゾレヌマエビは、ミナミヌマエ

ビと同じ河川から採集したにも関わらず、系統樹では各河川の個体が遺伝的に入り交じっており (Fig. 2-2)、河川間の遺伝的分化もほとんど検出されない結果となった (ペアワイズ  $\Phi_{ST} = -0.030 \sim 0.099$ ; Table 2-1、AMOVA  $\Phi_{ST} = 0.021$  [ $P = 0.086$ ]; Table 2-2)。これらの違いは、ミズレヌマエビが幼生期に海洋を分散し、河川間を遺伝的に交流していることによると考えられる。すなわち、本研究により、陸水域で生活するヌマエビ類において、幼生期の海洋生活の有無が遺伝的集団構造や遺伝的多様度に大きな影響を与えることが明らかになった。

Page & Hughes (2007b) は、*Caridina indistincta* 複合種群に見られる 4 つの系統グループを卵サイズと分布域という観点から分類し、卵サイズの小さいグループは、採集地点間の遺伝的分化がほとんどなく広域に分布するが、卵サイズの大きいグループは、高い遺伝的分化を示して分布域が狭く限定されていることを明らかにした。本研究では、ミズレヌマエビとミナミヌマエビでも同様の傾向が確認された。ミズレヌマエビは、両側回遊性の生活史を示し、卵サイズは小さく、集団分化もほとんど認められず (Fig. 2-2, Table 2-1, 2-2)、日本本土以外にも南西諸島や韓国からも分布の報告がある (林 2007, Fig. 2-1)。それに対して、ミナミヌマエビは、純淡水性で卵サイズが大きく、遺伝的に異なる地域集団が多数認められる (Fig. 2-2)。また、ミナミヌマエビは日本本土南西部にのみ生息しており (林 2007, Fig. 2-1)、分布域はミズレヌマエビより狭い。ただし、*C. indistincta* と異なり、ミナミヌマエビ地域集団の系統間遺伝的距離 (7.7~12.2%) は、同属甲殻類の COI 分化率 (15.4%, Hebert et al. 2003) よりもやや低い値を示し、ミナミヌマエビの系統が種レベルに相当するかは今後の検討課題である。いずれにせよ、ミナミヌマエビ内に見られる地域集団を「進化的に重要な単位 (ESU: evolutionary significant unit)」として保全管理する必要があると考えられる (Moritz 1995)。

### 第3章 純淡水性種ミナミヌマエビにおける河川内分散性の評価 ～由良川の大規模な河川争奪との関係～

#### 3.1 背景と目的

第2章では、両側回遊性種ミゾレヌマエビ *Caridina leucosticta* は分散により幼生が河川間を移動するが、一生淡水域に生息するミナミヌマエビ *Neocaridina* sp.は、河川内に留まるために河川間をほとんど分散しないことが明らかとなった。第2章の結果の中で、島根県中央を日本海側に流れる江ノ川の上流部に生息するミナミヌマエビは、瀬戸内海側の遺伝的組成を示した (Clade IV; Fig. 2-2)。これは、江ノ川上流部がかつては瀬戸内海に流れ込んでいたという地質学的データと対応している (君塚 1987)。このように、河川の一部を別の河川が自らの流域に組み入れることを「河川争奪」と呼び、淡水生物の生物多様性形成に深く関与していることが知られている (BurrIDGE et al. 2006; Craw et al. 2007)。

ミナミヌマエビは、河川中流から上流における流れの穏やかな浅瀬の抽水植物や小川の沈水植物に群がって生息しており (丹羽 2001)、増水時には植物などの陰に潜んで流されないようにしていることが推察され、河川内での分散性は低いと考えられる (Hughes 2007)。また、同じ淡水性のエビ類であるテナガエビ類は、大雨で川の流れが急増した際に、陸上に這い上がっていたという観察報告がある (和田恵次博士 私信)。もしヌマエビ類でも同様の特異な行動を示すのであれば、河川内での分散性は他の動物群と比較しても著しく低いことが推測され、保全生物学的にも興味深い知見となる。

由良川は、京都府の北部山間地域に端を発し、京都府綾部市を通過して福知山市を西に流れた後、途中で北向きに方向を転じ、日本海に注ぐ (Fig. 3-1)。由良川の支流の一つ、竹田川の上流部に位置する石生 (いそう) は、日本列島の中央を背骨のように走る脊梁山脈の高度が最も低い場所 (標高 95m) で、暖温帯系生物の分布や人間の移動のための通路となって

いることから「氷上回廊」と呼ばれている（福間ら 1996; 堀 2000; 久保 2007）。氷上回廊は、我が国の生物地理学上注目すべき地域である。淡水魚アマゴとヤマメの分布を調べた昭和の魚類学者である大島正満の功績をたたえて、西日本における日本海側と太平洋側の境界線を「大島線」と呼ぶ（大島 1957）。その大島線を境にして南北の生物が、氷上回廊を超えて分布を拡大した可能性が指摘されている。たとえば、大手ら（1986）と服部（2002）は、カナメモチ *Photinia glabra* やナナメノキ *Ilex chinensis*、マンリョウ *Ardisia crenata*、リンボク *Prunus spinulosa*、クロバイ *Symplocos prunifolia* などの植物は、瀬戸内海と太平洋側に分布しており、日本海側では唯一由良川沿いに分布が拡大していることを明らかにした。これは、植物が、氷上回廊を通過して日本海側に分布を拡大してきた結果と理解されている。さらに興味深いことに、8~20 万年前の由良川中流~上流部は、この氷上回廊を通過して現在の加古川水系と合流し、瀬戸内海に流れていたと考えられている（岡田 & 高橋 1969; 柴田 1976, 1990; 小橋 1985; 福間 1996; 小滝ら 2002; 加藤ら 2006, 2007）。したがって、瀬戸内海側の淡水生物は、由良川中流~上流部に分布を北上させていた可能性がある。

由良川は、このような興味深い歴史的背景を有しているにもかかわらず、その淡水生物については、由良川上流部の淡水魚類相（水野 1977）の調査に加えて、由良川の 1 地点とその周辺河川に生息するメダカ [キタノメダカ *Oryzias sakaizumi* とミナミメダカ *Oryzias latipes* (Asai et al. 2011)] (酒泉 1987) やカマツカ *Pseudogobio esocinus* (Tominaga et al. 2016)、オイカワ *Opsariichthys platypus* (Kitanishi et al. 2016)、イチモンジタナゴ *Acheilognathus cyanostigma* (Kitazima et al. 2015) の遺伝子型分布の報告がある程度で、由良川に生息する淡水生物の詳細な遺伝的組成は明らかとなっていない。本研究では、第 2 章で、ミナミヌマエビの日本海側（系統 I）と瀬戸内海側（系統 IV）の系統を DNA 分析により識別しており（Fig. 2-2）、由良川にこの 2 系統が混在しているかどうかを調べるのが可能である。もし、由良川に 2 系統が混在しているならば、2 系統の頻度差により河川内の

分散性を調べることができる。本研究では、由良川をフィールドに、ミナミヌマエビの河川内での分散性を評価することを目的とした。

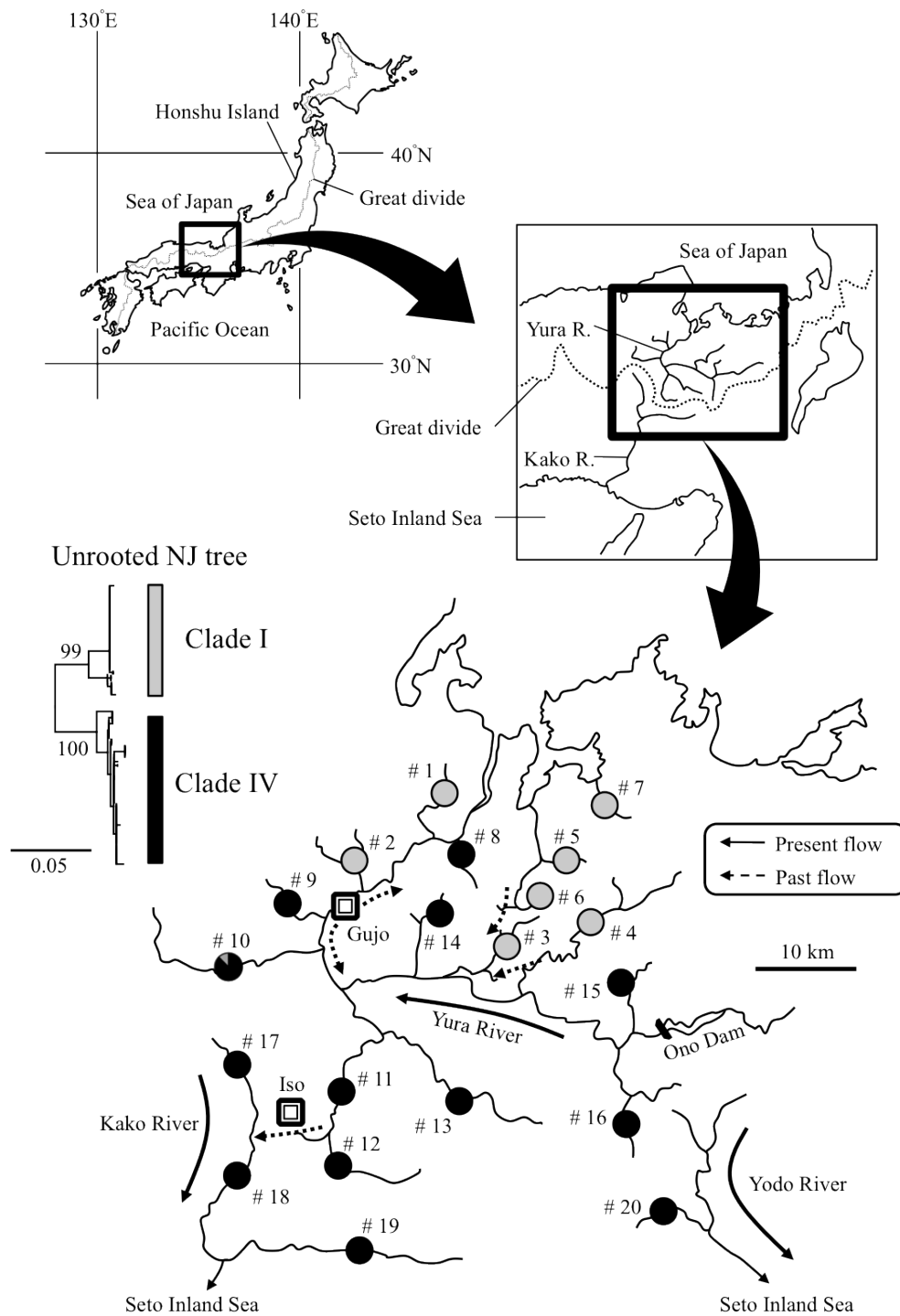


Fig. 3-1. Schematic representation of the study area with pie charts showing frequencies of Clade I (gray) and Clade IV (black) at each site. Haplotypes of Clade I were from rivers draining into the Sea of Japan, while those of Clade IV were from rivers draining into the Seto Inland Sea. Further information about the location code numbers can be found in Table 3-1. Phylogenetic relationship was derived by the neighbor-joining (NJ) method under the TrN +  $\Gamma$  model of evolution. Numbers above/below main branches indicate nonparametric bootstrap values of main splits based on 1000 pseudoreplicates in percent.

Table 3-1. Sampling locations (numbers plotted in Fig. 3-1), sample sizes ( $n$ ), number of haplotypes, and genetic diversity indices (haplotype diversity,  $h$ ; nucleotide diversity,  $\pi$ ) for each population and clade used in the present study. In this study field, Clades I and IV correspond to phylogroups distributed along the Sea of Japan and the Seto Inland Sea (excluding one sample in the Maki River, # 10), respectively.

Lineage	River System	Tributary	Location #	$n$
Clade I	Yura River	Okada River	1	12
		Miya River	2	20
		Yata River	3	10
		Kanbayashi River	4	16
	Isazu River	Ikeuchi River	5	10
		Yurigatsubo River	6	20
	Yohoro River	7	10	
		Overall		98
Clade IV	Yura River	Kutami River	8	3
		Oro River	9	10
		Maki River	10	7
		Takeda River	11	20
			12	4
		Haze River	13	10
		Sai River	14	10
		Kamiwachi River	15	14
	Kako River	Takaya River	16	10
		Saji River	17	2
			18	20
	Yodo River	Sasayama River	19	18
		Katsura River	20	10
		Overall		138

### 3.2 材料と方法

2008年、2009年に由良川内の支流とその近隣河川（伊佐津川、与保呂川、加古川、淀川支流の桂川）からミナミヌマエビを採集して（Fig. 3-1, Table 3-1）、99.5%エタノールで固定した。分子マーカーとして、第2章で扱った2種類のマーカーのうち、より変異量の多

かった ND2 遺伝子 (390 bp) を用いた。プライマーや PCR 温度条件、DNA 塩基配列のアラインメント (accession nos. AB598416–AB598479) は、第 2 章と同じである。系統樹については、MEGA ver.6 (Tamura et al. 2013) を使って、最適塩基置換モデル [Tamura-Nei +  $\Gamma$  ( $\Gamma=0.27$ )] を基に、NJ 法により推定した。樹形の頑健性は、ブートストラップ法 (1000 回反復) により評価した。次に、TCS (Clement et al. 2000) により最大節約法によるハプロタイプネットワークを作成した。ハプロタイプネットワークは、塩基置換の少ない種内の系統関係を調べるのに適した方法であり、各ハプロタイプを円で示し、そのハプロタイプを示す個体数を円の大きさで表す。さらに、1 塩基異なるごとにその様子を線で示すことで、ハプロタイプ間の系統関係を直接的に表すことができる。

### 3.3 結果

本研究の結果、由良川とその近隣河川から得られたミナミヌマエビは、最大節約法で 24 塩基異なる 2 つの系統に分かれた (Fig. 3-1)。一方は、日本海側に流れる河川に多く見られるので「日本海型」(第 2 章では系統 I と対応)、もう一方は、瀬戸内海に注ぐ河川に多く見られるので「瀬戸内海型」(第 2 章では系統 IV と対応) と称することにする。日本海型と瀬戸内海型の 2 系統を地図にマッピングしたところ、牧川 (# 10) 以外はどちらかの系統に固定していた。由良川の中流～上流にかけての多くの支流では、他の瀬戸内海側に流れる河川と同じ瀬戸内海型の遺伝的組成を示し、由良川の下流では日本海型を示した。由良川中流の支流である八田川 (# 3) と上林川 (# 4) から得られた個体は全て日本海型を示し、由良川下流の久田美川 (# 8) から得られた 3 個体は瀬戸内海型を示した。

各採集地点におけるハプロタイプの組成を円グラフで表現したところ、日本海型 (Fig. 3-2 上図) ではさらに 11 塩基異なる 2 つの系統 (赤・紫・桃色のハプロタイプと黄・緑・橙・水色のハプロタイプ) に分かれることが明らかとなった。由良川支流の岡田川 (# 1) と八



田川 (# 3)、伊佐津川上流部の由里ヶ坪川 (# 6)、与保呂川 (# 7) は最も出現頻度の高いハプロタイプ (赤) で固定されていた。それに対し、同じ由良川支流の上林川 (# 4)、宮川 (# 2)、伊佐津川支流の池内川 (# 5) は 11 塩基離れた 2 系統が共存する結果となった。特に、由良川上流部の上林川 (# 4) については、最も出現頻度の高いハプロタイプ (赤) が少なく、別系統のオレンジ色で示したハプロタイプの頻度が高いという地理的異質性が示された。一方、瀬戸内海型 (Fig. 3-2 下図) のハプロタイプネットワークとその組成については、大きな地理的傾向は見られず、採集地点が近接しているハプロタイプにおいても組成が大きく異なる様子が認められた。

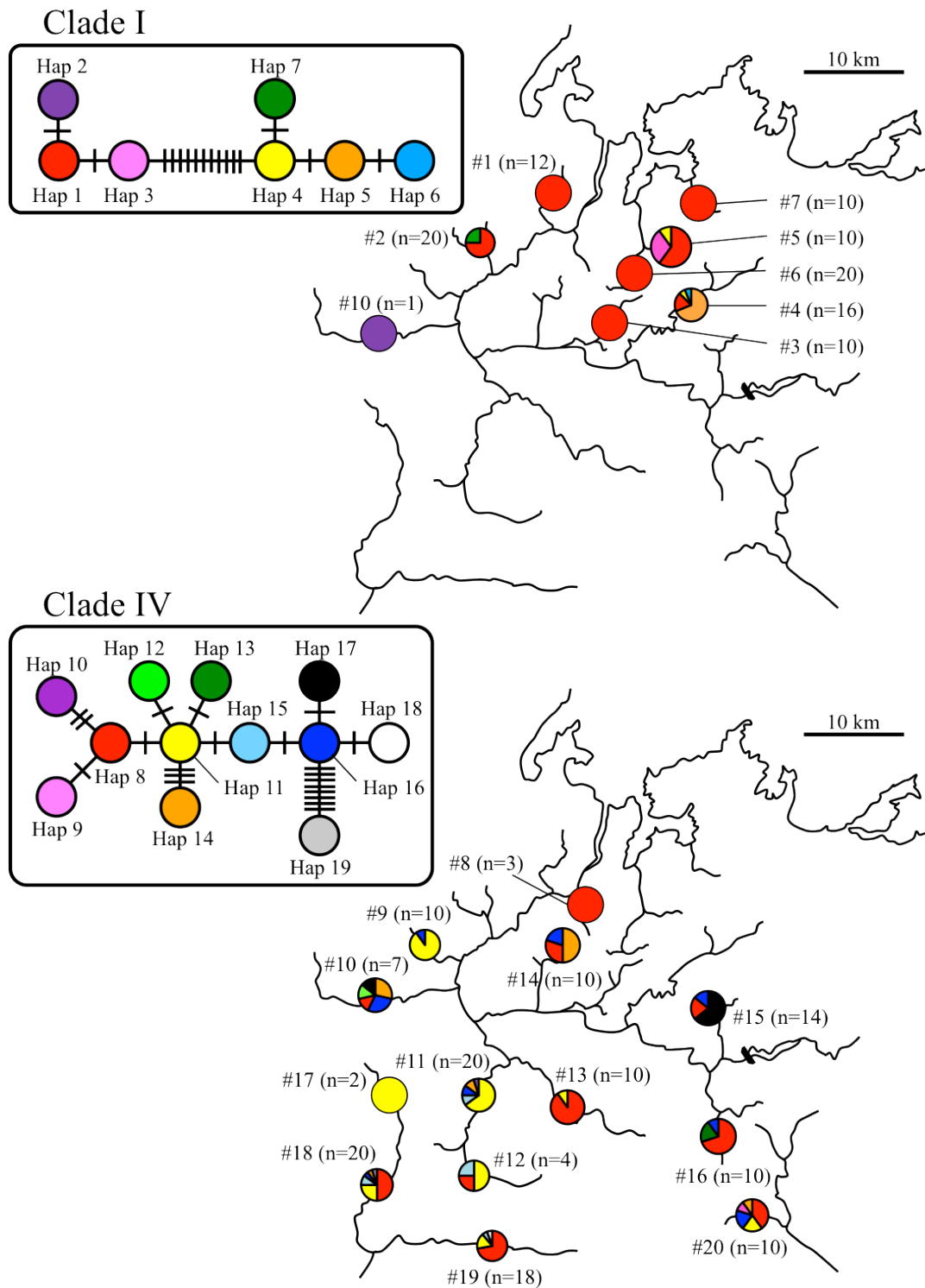


Fig. 3-2. Schematic representation of the study area with pie charts showing frequencies of Clade I and Clade IV haplotypes at each site in *Neocaridina* sp. Inset shows maximum parsimony networks on the basis of minimum sequence differences between haplotypes. The number of slashes between haplotypes corresponds to the number of mutation steps.

### 3.4 考察

本研究の結果、京都府北部を日本海に流れる由良川の中流～上流にかけては、瀬戸内海型の遺伝的組成をもったミナミヌマエビが分布していることが明らかとなった (Fig. 3-1)。日本海型と瀬戸内海型の境界線は、河川争奪以前の分水界であった福知山市公庄 (Gujo; Fig. 3-1) 地区 (岡田 & 高橋 1969) と概ね対応しており、由良川上流部が日本海に方向を転じて8～20 万年もの間、ミナミヌマエビは河川内をほとんど分散していない可能性が示唆された。丹羽 & 横山 (1997) は、兵庫県夢前川の支流、菅生川において、ミナミヌマエビの成体をトリパンレッドという色素で標識し、その遡上生態を観察した。河川での放流から3週間後に再捕獲したところ、放流ポイントより下流では標識個体を全く採集できなかったが、放流ポイントより最大 64.2 m 上流で標識個体が再捕獲される結果となった。この結果は、ミナミヌマエビが河川の支流を上流方向に移動する習性を持ち、下流方向にはほとんど流されないことを意味している。由良川のミナミヌマエビが、過去の河川争奪以降ほとんど支流間で移動していないのは、このような種固有の生態特性が影響していると推測される。

一方、由良川の河川争奪については、加古川との間だけではなく、由良川上流の高屋川 (# 16) と淀川水系の桂川との間に位置する胡麻地域にも河川争奪の痕跡が確認されている (上治 1927; 山内 2002; 河原 2006; 岩田 2006)。したがって、由良川の上流部に広がっているミナミヌマエビ瀬戸内海型は、桂川経由で分布を拡大した可能性も考えられる。

八田川 (# 3) と上林川 (# 4) は、その近隣の支流が瀬戸内海型の遺伝的組成を示しているにも関わらず、日本海型を示した。これは、八田川と上林川の河川争奪や流路変動が影響している可能性が考えられる。舞鶴湾に流れる伊佐津川の上流部 (# 6) はかつて八田川 (# 3) に流れていた可能性が指摘されている (岡田 & 高橋 1969)。したがって、伊佐津川経由で日本海型が入ってきた可能性がある。また、上林川 (# 4) についても、下流が八田川 (# 3) と合流した可能性が知られている (水山 1961)。しかし、河川争奪が起こるその瞬

間、水は両方向に流れることになるため、日本海型と瀬戸内海型のどちらが分布を拡大するかはおそらくランダムである。また、ハプロタイプの分布が地点間で不均一であることから、ミナミヌマエビは、支流内でも移動が大きく制限されており、各地域集団の集団サイズは極めて小さく、遺伝的浮動（ランダムな遺伝子型の固定）が起これやすいと考えられる（Fig. 3-2）。したがって、日本海型と瀬戸内海型が過去に共存したとしても、いったん集団サイズが小さくなった時に遺伝的組成がどちらかの系統に固定したのかもしれない。

上林川（# 4）は、京都府綾部市の上林地域を縦断する由良川の一支流である。この河川は、断層の上を流れる特異な河川で、その河川構造は、下流域がやや盛り上がったスプーン状を呈しているため下流の流路が蛇行している（水山 1961）。本研究により、上林川に生息するミナミヌマエビの遺伝的組成は、隣接する河川に比べて特に異質であることが明らかとなった（Fig. 3-2）。したがって、上林川は、他の地域と地理的に隔離された固有の淡水生物相が形成されているのかもしれない。

以上述べたきたように、ミナミヌマエビは、由良川の支流の中でさえも分散が制限されるほど、極端に低い分散性が認められた。これには、隣接河川と陸域を介して物理的に遮断されるという陸水生態系特有の環境要因、孵化直後に着底する本種の個体発生上の特性（直達発生）、さらに、本種の成体が支流の上流方向に移動するという種特異的な生態特性の3点が発見されていると考えられる。

## 第4章 両側回遊性ヌマエビ類3種における幼生の河川間分散の比較

### 4.1 背景と目的

本論文の第2章では両側回遊性種ミズレヌマエビ *Caridina leucosticta* と純淡水性種ミナミヌマエビ *Neocaridina* sp. の遺伝的集団構造を比較して、生活史の差異がどの程度遺伝的多様性に影響するかを明らかにした (Fig. 2-2)。しかし、同じ両側回遊性種でも、種によって少しずつ生態的特性が異なっているため、両側回遊性という生活史が創出する分散特性は、地理的分布の重なる他の両側回遊性種と比較して厳密に評価する必要がある。

Yatsuya et al. (2012, 2013) は、京都府北部を日本海に向けて流れる伊佐津川や由良川をフィールドとして、ミズレヌマエビの生活史を調査した。ミズレヌマエビは、春から夏にかけて抱卵し、初夏から河川下流域でゾエア幼生の流下が観察される。その後、秋口から稚エビの遡上が観察され、次の世代に移行する。また、Yatsuya et al. (2013) は、舞鶴湾内において、大型のプランクトンネット (ORI ネット) によりミズレヌマエビの幼生分布を調査した。調査結果によると、河川内で大量に採集できる流下幼生は、海洋環境下ではほとんど採集されず、幼生が実際に外海に出て河川まで戻ってくるのかについて疑問が残った。中原ら (2005) は、ミズレヌマエビのゾエア第 I 期を淡水から海水までの塩分条件で飼育し、幼生から稚エビまでの生残率 (変態率) を調べた。その結果、ミズレヌマエビ幼生の生残率は汽水で最大値をとり、海水で著しく下がることが明らかとなった。さらに、中原ら (2005) は、同属のトゲナシヌマエビ *Caridina typus* ・ヤマトヌマエビ *Caridina multidentata* との地理的分布を比較し、ミズレヌマエビは内海に注ぐか外海に注ぐかを問わずに河川に分布しているのに対して、トゲナシヌマエビとヤマトヌマエビは外海に面した河川に多く分布することを報告した。したがって、ミズレヌマエビの幼生は、沖合まで流されずに河口域付近に生息し、河川間を飛び石状に移動していると推察された (Fig. 4-1)。また、ミズレヌマエ

ビの幼生が和歌山県古座川の河口域付近で大量に採集されたという報告（大和茂之博士 私信）は、この推察を支持している。

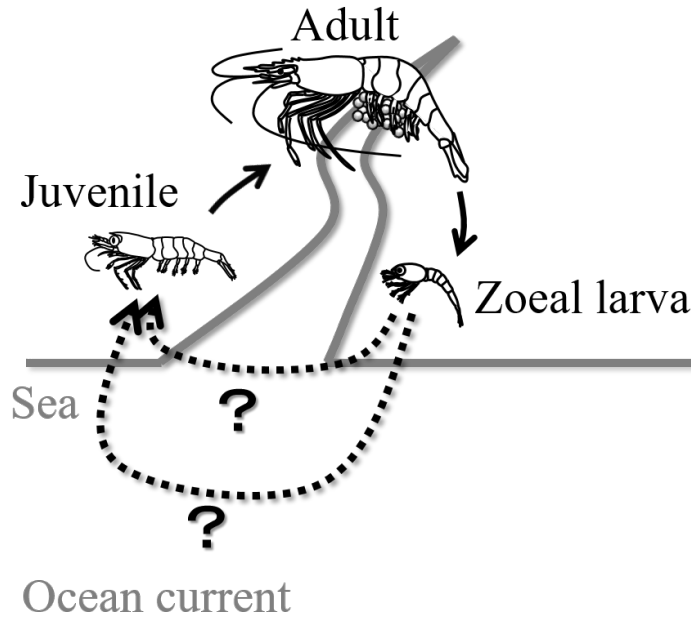


Fig. 4-1. Schematic diagram of the life history in amphidromous atyid shrimps.

諸喜田（1979）は、両側回遊性のテナガエビ類を比較し、ミナミテナガエビ *Macrobrachium formosense* のように幼生期の短い種は幼生の発育に必要な塩分が低く、種の分布域が狭くなるのに対して、コンジテンテナガエビ *Macrobrachium lar* のように幼生期の長い種は発育に必要な塩分が高く、分布域は広域に広がることを指摘した。しかし、諸喜田（1979）は生態特性の傾向を考察したのみで、種の分散性との関係の妥当性については未だ検証されていない。そこで本研究では、種の分布域の広がり、海洋生活期における幼生分散の程度を表していると考え、これらの生態情報をまとめて、「幼生期の長さ—発育に必要な塩分—幼生分散の程度—分布域の広がり」に関係性があることを仮説（以下、「諸喜田（1979）の仮説」； Fig. 4-2）として、この仮説をヌマエビ類で遺伝的側面から検証することを目的に研究を行った。

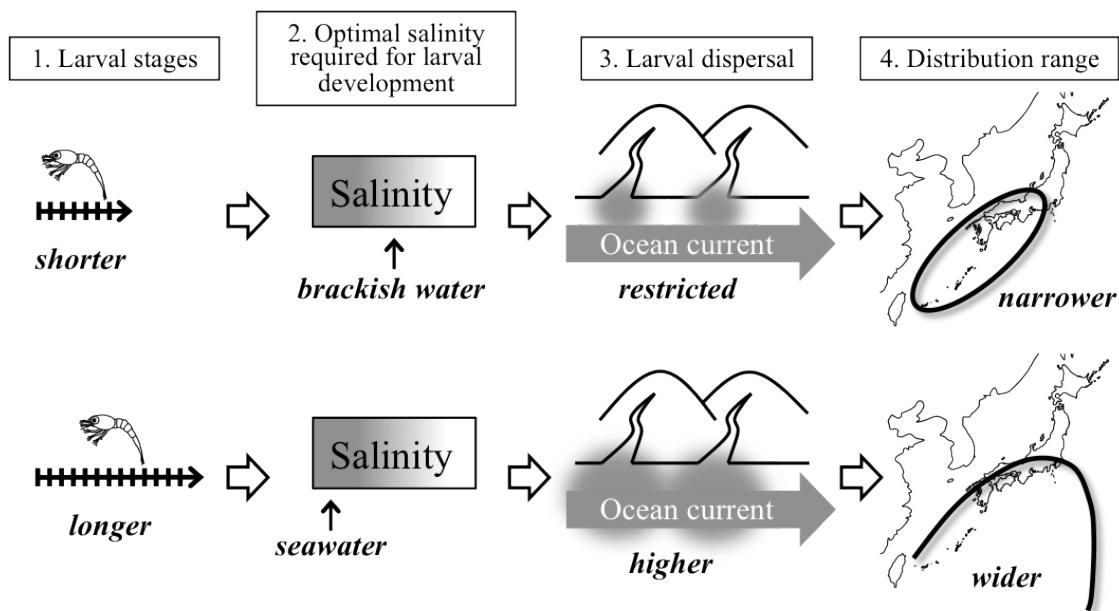


Fig. 4-2. Hypothesized ecological relationships for amphidromous atyid shrimps. Species with shorter larval stages require lower salinities for larval development and exhibit restricted larval dispersal, resulting in narrower geographic distributions (upper panels), whereas species with longer larval stages exhibit the opposite pattern (lower panels).

第4章の研究材料は、両側回遊性で同属のミズレヌマエビ・トゲナシヌマエビ・ヤマトヌマエビとした。これら3種は、幼生期の長さ、幼生発育に必要な塩分、地理的分布が調べられており（諸喜田 1981; 中原ら 2005, 2007; 林 2007）、仮説を検証するのにふさわしい材料である。ミズレヌマエビは7期（水温 25~27°Cの飼育環境下で14日間）の幼生期をもち、ゾエア第I期の生残率は塩分17（汽水）で最大値をとる（中原ら 2005, 2007）。それに対して、トゲナシヌマエビはより長い幼生期（9期・30日間 / 25~27°C）を示し、幼生の生残率はより高塩分の25.5で最大となる（中原ら 2005, 2007）。一方、ヤマトヌマエビでは、幼生期は長い（9期・35日間 / 25°C）が、幼生の生残率は塩分17で最大値をとる（Hayashi & Hamano 1984）。地理的分布については、ミズレヌマエビが我が国では個体数が多く、日本海側では新潟県まで、太平洋側では瀬戸内海を含む房総半島までが分布域である（林 2007）。また、ミズレヌマエビは、韓国からも分布が報告されている（Kim 1977）。それに対し、トゲナシヌマエビとヤマトヌマエビは、日本海側と瀬戸内海にはほとんど分布せず、太平洋側ではミズレヌマエビ同様に房総半島まで分布するが、南方はフィリピン、イ

インドネシアにまで分布が広がる（林 2007）。以上の生態パラメーターを諸喜田（1979）の仮説と照らし合わせると、ミゾレヌマエビは分散性が低いのに対して、トゲナシヌマエビは分散性が高いと推測される。ヤマトヌマエビは、両側回遊性ヌマエビ類の中でも特異な生態を示す。多くの両側回遊性種が河川の下流を中心に分布するのに対して、ヤマトヌマエビは稚エビ期に河川の支流最上流部まで上り詰め、そこで成体期を過ごすことが知られている（浜野 & 林 1992）。ヤマトヌマエビは、幼生期が長く（Hayashi & Hamano 1984）、分布域もマダガスカルまで広域に広がるため（Cai et al. 2006; 林 2007）、分散性は高いと推測される。しかし、幼生の好適な塩分は汽水域の値を示すため（Hayashi & Hamano 1984）、一連の關係に矛盾がある。本章では、今回得られたデータとともに、この点についても考察を行った。

## 4.2 材料と方法

本研究では、ミゾレヌマエビ、トゲナシヌマエビ、ヤマトヌマエビの3種を、日本国内の分布域を網羅するように1地点20個体ずつ採集した。ただし、西表島浦内川で採集したミゾレヌマエビについては24個体を分析に供じた（Fig. 4-3, Table 4-1）。ミゾレヌマエビの日本本土の標本（鹿児島県一ノ谷川を除く）は第2章と同じものを用い、ミゾレヌマエビの鹿児島県一ノ谷川と南西諸島の各河川、およびトゲナシヌマエビとヤマトヌマエビについては、2010年7～8月に採集を行った。

本研究ではmtDNAのCOI遺伝子を分析に供じた。COI遺伝子は、これまでも主に無脊椎動物の集団遺伝学的解析でよく用いられている分子マーカーで、第2章と第3章で扱ったND遺伝子群と比べて進化速度の挙動が安定しており、エビ類ではテッポウエビ類で100万年当たり1.4%の塩基置換率が推定されている（Knowlton & Weigt 1998）。この進化速度の値を使って、系統間の分岐年代や集団拡大の年代を大まかに推定することができ、地史



との関係を考察しやすい。



Fig. 4-3. Sampling locations for *Caridina leucosticta*, *C. typus*, and *C. multidentata* (see Table 4-1 for collection site names).

Table 4-1. Polymorphism statistics for *Caridina leucosticta*, *C. typus*, and *C. multidentata*. Data include sampling locations (abbreviation); n, number of individual samples; sampling date (month/year); nHp, number of haplotypes; h, haplotype diversity;  $\pi$ , nucleotide diversity (%); and Tajima's D. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , ns = not significant

	<i>Caridina leucosticta</i>						<i>Caridina typus</i>						<i>Caridina multidentata</i>					
	n	Sampling (mo/yr)	nHp	h	$\pi$ (%)	Tajima's D	n	Sampling (mo/yr)	nHp	h	$\pi$ (%)	Tajima's D	n	Sampling (mo/yr)	nHp	h	$\pi$ (%)	Tajima's D
All	244		63	0.758	0.461	-2.30 **	140		51	0.874	1.088	-1.27 ns	120		81	0.982	1.360	-1.77 ns
Japanese mainland	180		50	0.740	0.298	-2.48 ***	80		31	0.870	0.997	-1.06 ns	80		59	0.986	1.416	-1.69 ns
Nansei Islands	64		15	0.734	0.723	-0.08 ns	60		27	0.879	1.216	-0.88 ns	40		30	0.974	1.257	-1.19 ns
Lineage A	210		56	0.706	0.278	-2.54 ***	118		44	0.831	0.277	-2.52 ***						
Lineage B	34		8	0.537	0.129	-1.84 *	22		7	0.723	0.209	-0.85 ns						
1. Oyabe River (OYB)	20	May 08	7	0.774	0.270	-0.72 ns	not distributed						not distributed					
2. Isazu River (ISZ)	20	May 08	4	0.537	0.190	-0.11 ns	not distributed						not distributed					
3. Gono River (GN)	20	Aug 08	8	0.700	0.274	-1.56 ns	not distributed						not distributed					
4. Yukinoura River (YU)	20	May 08	13	0.905	0.497	-2.08 *	20	Jul 10	11	0.900	0.913	-1.12 ns	20	Jul 10	19	0.995	1.469	-0.78 ns
5. Kako River (KK)	20	Jul 08	7	0.637	0.194	-1.45 ns	not distributed						not distributed					
6. Saba River (SB)	20	Aug 08	6	0.705	0.270	-0.72 ns	not distributed						not distributed					
7. Koza River (KZ)	20	Aug 08	7	0.637	0.182	-1.56 ns	20	Jul 10	12	0.879	0.848	-1.42 ns	20	Jul 10	17	0.984	1.360	-1.01 ns
8. Niyodo River (NYD)	20	Aug 08	11	0.858	0.405	-1.67 ns	20	Jul 10	9	0.821	1.064	-0.53 ns	20	Jul 10	18	0.989	1.417	-0.80 ns
9. Ichinotani River (ICT)	20	Jul 10	10	0.837	0.359	-1.42 ns	20	Jul 10	9	0.863	1.218	-0.05 ns	20	Jul 10	17	0.979	1.412	-1.13 ns
10. Kawauchi River (KWU)	20	Jul 10	8	0.758	0.743	0.57 ns	20	Jul 10	11	0.895	0.829	-1.47 ns	20	Jul 10	17	0.979	1.335	-0.99 ns
11. Yona River (YON)	20	Jul 10	4	0.489	0.448	0.03 ns	20	Jul 10	11	0.805	0.808	-1.62 ns	20	Jul 10	16	0.974	1.148	-0.88 ns
12. Omija River (OMJ)	24	Jul 10	7	0.645	0.342	-2.23 **	20	Jul 10	11	0.905	1.812	1.04 ns	not collected					

本研究では、まず、第 2 章と同じ方法で、標本固定、DNA 抽出、PCR、シーケンス、配列のアラインメント (accession nos. AB598416–AB598479)、NJ 系統樹の推定を行った。mtDNA の COI 遺伝子 (571 bp) については、Folmer et al. (1994) の汎用プライマーの内部に Forward 側 [COIF-leugra (5'-GGAATAGTAGGWACAGCYYTAAGTC-3')、COIF-typus (5'-GGAATAGTTGGCACTGCTCTCAGAC-3')、COIF-mul (5'-GGAATAGTAGGTACAGCCCTCAGA-3')] を作り、Reverse 側 [COIR-Caridea (5'-TAKACTTCTGGGTGVCCRAARAAYCA-3')] についてはコエビ下目で特異的となるように設計した。次に、MEGA ver.6 で最適塩基置換モデル [ミゾレヌマエビ: T92+ $\Gamma$ +I ( $\Gamma=0.19$ )、トゲナシヌマエビ: T92+ $\Gamma$ +I ( $\Gamma=0.51$ )、ヤマトヌマエビ: T92+ $\Gamma$  ( $\Gamma=0.16$ )] を基にした NJ 系統樹を作成した。また、TCS 法によるハプロタイプネットワークを作成して系統の詳細を調べた。そして、DnaSP ver.5 (Librado & Rozas 2009) で、遺伝的多様度指数 ( $h$ 、 $\pi$ ) を算出し、中立性検定 (Tajima's  $D$ ) を行った。Tajima's  $D$  は、対象とする塩基配列に自然選択がかかっていないことを確認することが元来の目的であるが、集団生物学的研究においては、その集団の急速な個体数拡大が発生したかどうかを調べる方法として扱うことが多い (Tajima 1989)。

本研究では、第 2 章と同様に、各地点間の遺伝的分化を調べるためにペアワイズ  $\Phi_{ST}$  を算出し、種全体での遺伝的分化を AMOVA 分析により評価した。さらに、採集地点間の地理的距離と遺伝的分化指数 ( $\Phi_{ST}$ ) の相関関係を「距離による隔離 (isolation by distance: IBD)」モデルで評価した。ペアワイズ  $\Phi_{ST}$ 、AMOVA 分析、IBD は、Arlequin ver.3.5.1.2 により、100,000 回の無作為化検定で統計的に査定した。IBD については、地理的距離として、通常の緯度経度から計算する Vincenty の方法 (Vincenty 1975) と、近年海洋生物の集団遺伝学的研究で用いられている海流の流路を加味した距離 (海洋距離) の 2 種類を扱った。海洋距離を用いた IBD は、「海洋距離による隔離 (isolation by oceanographic distance:

IBOD)」と称され (White et al. 2010, Alberto et al. 2011)、我が国における海洋生物の集団遺伝学研究においては本研究で初めて行うことになる。海洋距離の算出については、2004年から2005年の黒潮蛇行期と2006年から2010年の非蛇行期の平均値を算出し、黒潮に面した地点のみを対象として分析を行った(錢本 未発表データ)。この方法は、地理的距離と遺伝的距離に相関があれば、分散は距離により制限されていることを示す方法で、両側回遊性種のように河川間を飛び石状に分散することが推測される生物種においては有効と考えられる。

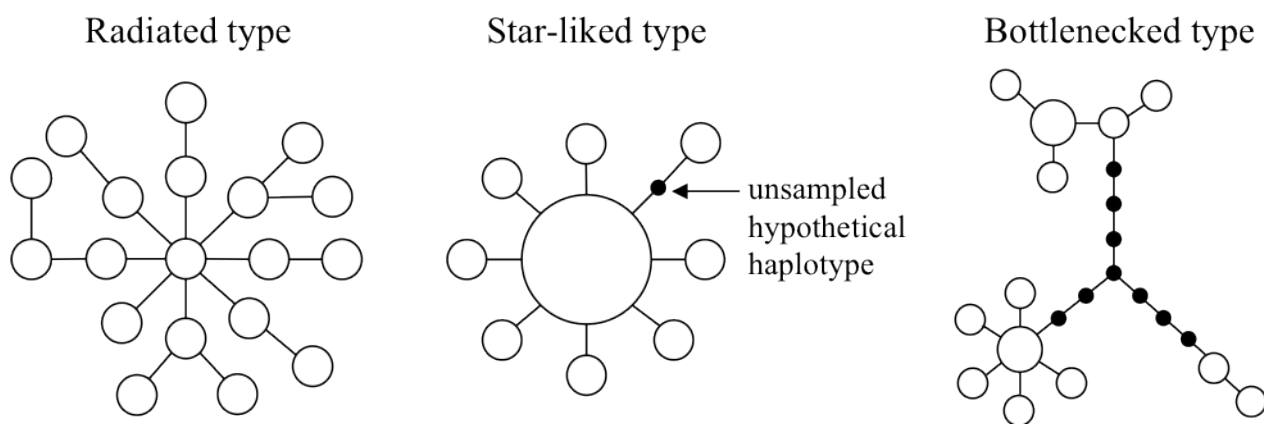


Fig. 4-4. Three types of haplotype network.

本研究では、ハプロタイプネットワークの形状により、集団の歴史的な個体群動態の変遷を評価した (Fig. 4-4 ; 小池 & 松井 2003)。その種 (集団) が歴史的に安定して個体数を増加させてきたならば、ランダムに生じた塩基置換によりハプロタイプの数は増加し続ける。したがって、ネットワークは「放散型」を呈する。それに対して、氷期などの厳しい環境下で過去に個体数が急激に減少し、その後個体数が回復 (びん首効果) したのであれば、特定のハプロタイプを示す個体数が多く、そこから1・2個塩基置換が派生した「星状型」を示す。さらに、介在する仮想ハプロタイプが多く検出されるネットワークは、系統の歴史が古く、多くの遺伝子型がびん首効果により消失したと考えられる。この樹型は「ボトルネック

型」と呼ばれ、出現するハプロタイプは、例えば氷期において氷河に覆われなかったような避難場所（以下「レフュジア」）で生き残ったことが推察され、地域ごとにまとまったハプロタイプを示すことが多い。また、本研究では、集団の歴史的な個体群動態を調べるために、BEAST ver.1.8.1 (Drummond et al. 2012) で Bayesian skyline plot (BSP) を計算した。この方法は、近年集団遺伝学で新たな方法として注目されている Coalescent 理論をもとにした方法で、DNA 塩基配列の塩基置換情報から、経時的に個体群動態をベイズ推定することができる。本研究では、エビ類で汎用されている進化速度の値 (1.4%) を用いて、集団サイズの拡大期についても推定を試みた。

### 4.3 結果

ミゾレヌマエビの南西諸島集団には、最大節約法で 3 塩基異なる 2 系統 (系統 A、B) が混在し、系統 A は日本本土と南西諸島の両方から検出されたが、系統 B は南西諸島固有の系統であった (Fig. 4-5, 4-6)。また、ハプロタイプネットワークは、系統 A 内に大きな 2 つのハプロタイプグループ (A-1、A-2) があり、それぞれ星状型を呈した。最も主要なハプロタイプグループ (A-1) は、南西諸島も含めて全地点から形成されているが、ハプロタイプグループ A-2 は日本本土のみから形成されていた。系統 B では、3 地点のハプロタイプが不均一に分布しているが、特に西表島の個体が固有のハプロタイプを示す傾向があり、 $\Phi_{ST}$  値も高いことから (Table 4-2)、西表島は地理的に異質である結果となった。トゲナシヌマエビも同様に、2 つの大きな系統 (系統 A、B) が確認され (Fig. 4-5)、両系統は相互に単系統で星状型のネットワーク樹を示し、それぞれの系統の頻度は地点間で概ね均一であった (Fig. 4-6)。ただし、ミゾレヌマエビ同様に、トゲナシヌマエビにおいても西表島の個体が固有のハプロタイプを示す傾向があり、2 系統の頻度も西表島のみ異なり、 $\Phi_{ST}$  値も高いことから (Table 4-2) 西表島の異質性が示唆された。これに対して、ヤマトヌマエビは、

系統樹上では分化が認められず (Fig. 4-5)、ネットワークは放散型を呈した (Fig. 4-6)。これらの結果は、Tajima's  $D$  (Table 4-1) や Coalescent 解析 (BSP) でも支持され (Fig. 4-5)、ミズレヌマエビとトゲナシヌマエビは10~15万年前に集団サイズの急速な拡大を経験しているのに対して、ヤマトヌマエビは集団サイズが歴史的に安定していたことが示唆された。遺伝的多様性については、ヤマトヌマエビで他の種に比べて高い塩基多様度とハプロタイプ多様度が確認された (Table 4-1)。

集団間の遺伝的分化をペアワイズ  $\Phi_{ST}$  (Table 4-2) と AMOVA 分析 (Table 4-3) で調べたところ、ミズレヌマエビの南西諸島と日本本土集団のペアに遺伝的分化が検出され、IBD、IBOD においてもミズレヌマエビのみ地理的距離と遺伝的距離に有意な相関関係が認められ、幼生分散の制限が確認された (Fig. 4-7)。また、IBD と IBOD では、IBOD の方が当てはまりがよい結果となった。

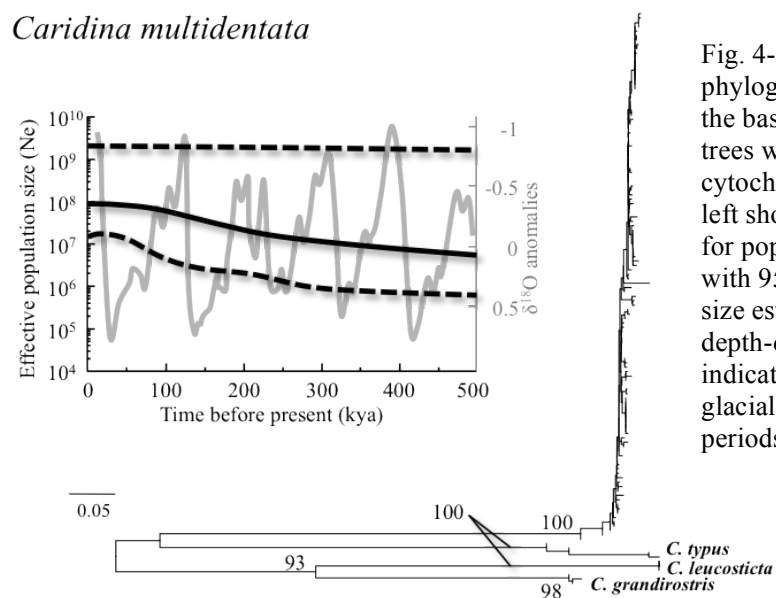
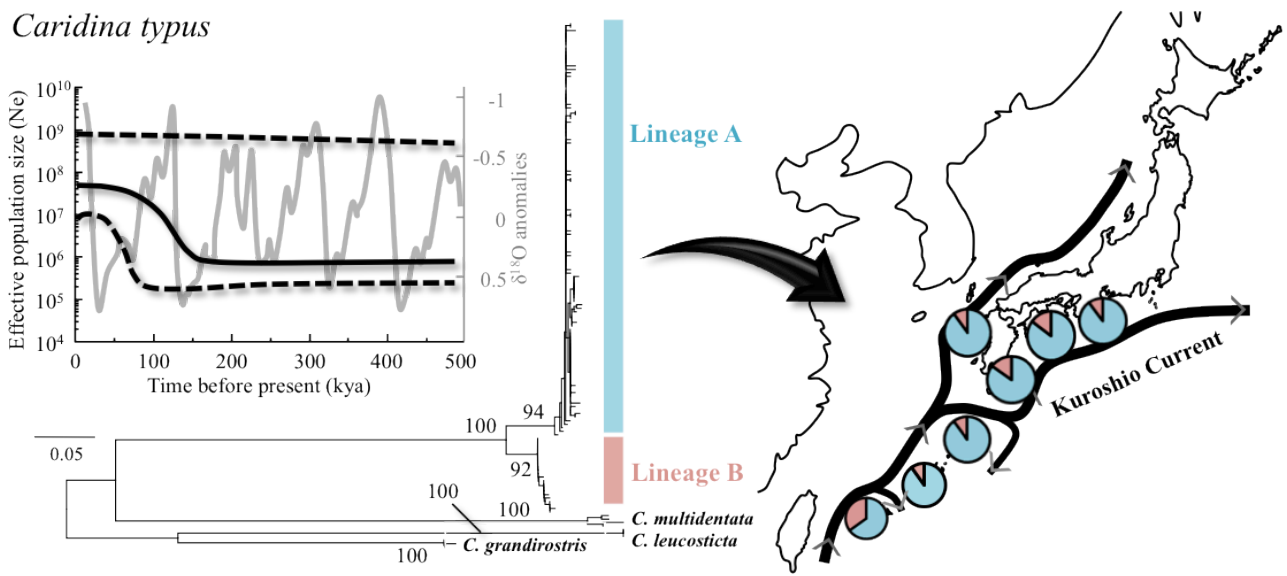
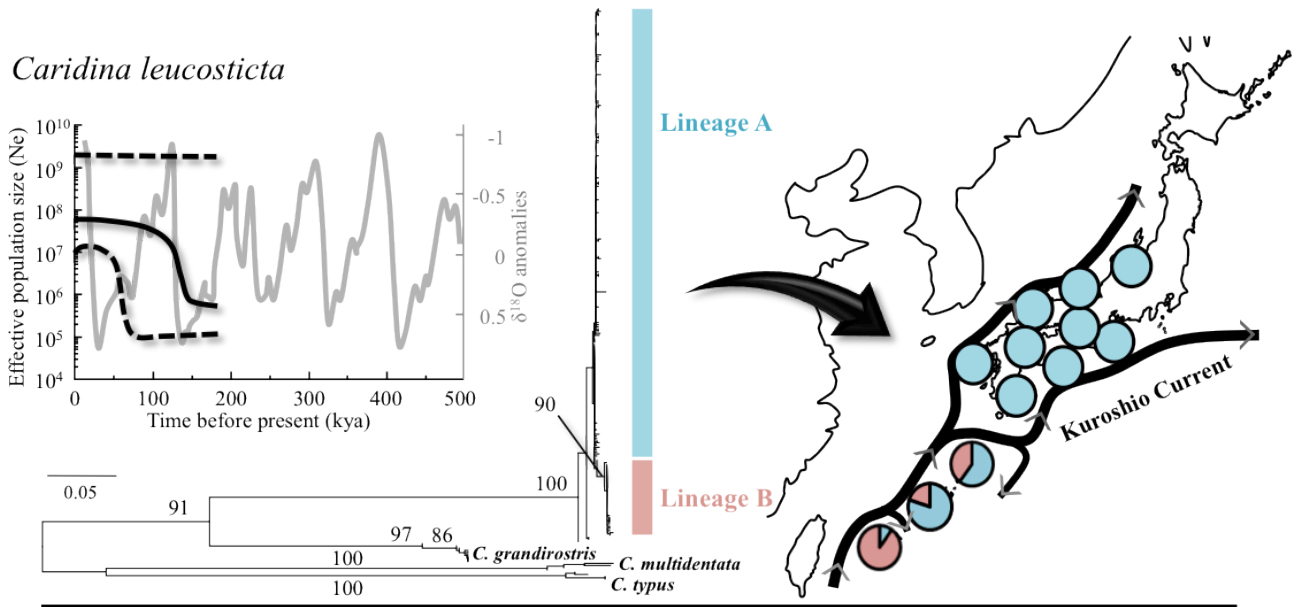


Fig. 4-5. Geographic distributions of distinct phylogenetic groups with high bootstrap support on the basis of Neighbor Joining trees. Phylogenetic trees were built from the mitochondrial DNA cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) gene. Upper left shows Bayesian skyline plots. Median estimates for population size over time are shown (black lines) with 95% highest posterior intervals for population size estimates (dashed lines). Anomalies in  $\delta^{18}O$  on a depth-derived timescale (Huybers 2007) are indicated (gray lines), whereby the maxima indicate glacial periods and the minima indicate interglacial periods.

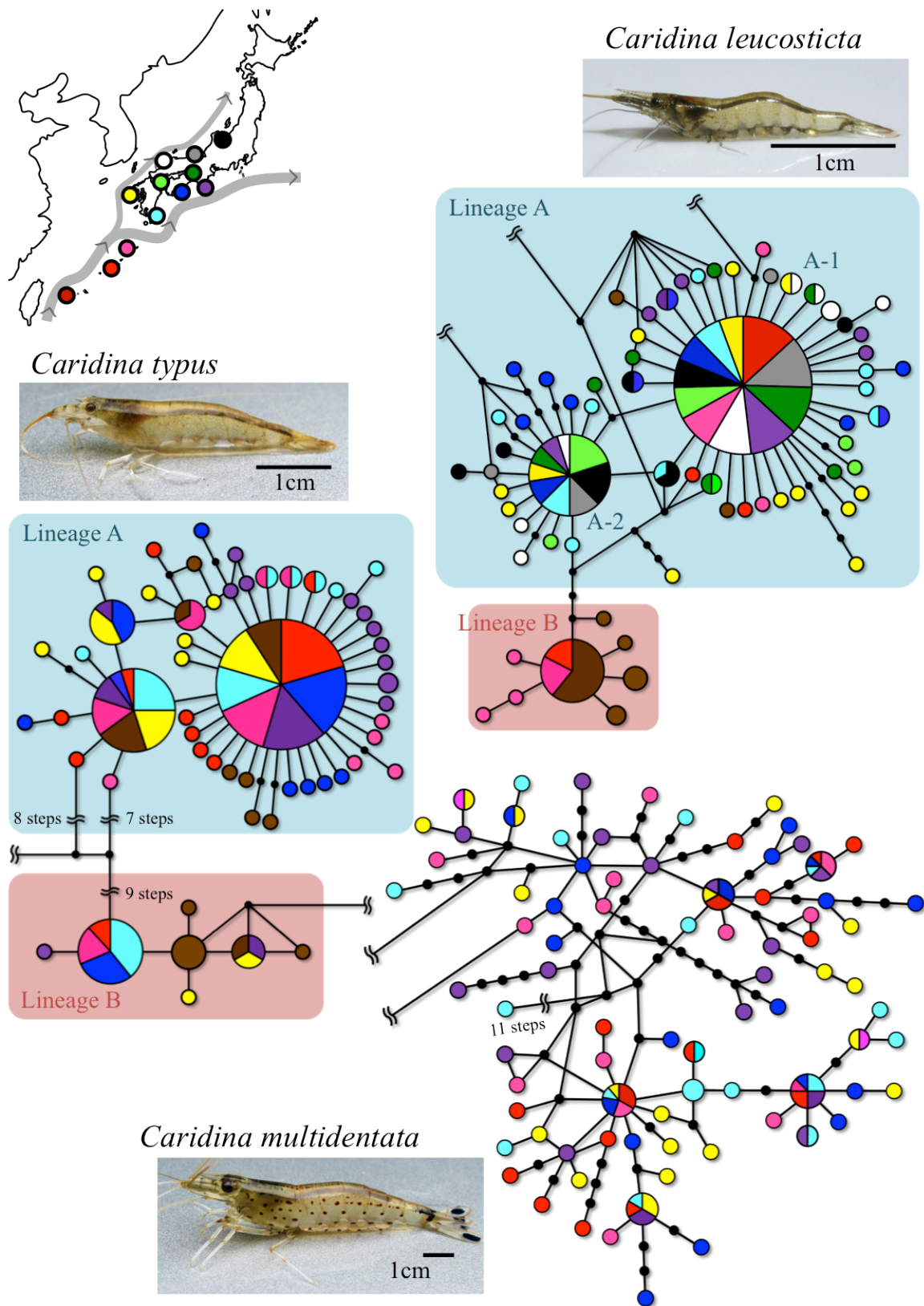


Fig. 4-6. Statistical parsimony networks for mitochondrial DNA cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) gene. The area of each shape is proportional to the frequency at which that haplotype was observed (smallest circle,  $n = 1$ ; largest circle for *Caridina leucosticta* and *C. typus*,  $n = 106$  and  $44$ , respectively). Color patterns represent the locations from which haplotypes were sampled (see upper left). Each branch between any two shapes represents a single nucleotide substitution. Light black circles represent unsampled hypothetical haplotypes. Ancestral sequences were inferred from the Maximum Parsimony criterion. Lineages A and B in *C. leucosticta* and *C. typus*, respectively, are robust phylogenetic groups inferred from the Neighbor Joining tree (see Fig. 4-5).



Table 4-2 Pairwise  $\phi_{ST}$  (below diagonal) and  $F_{ST}$  (above diagonal) values based on 10 100 replicates for *Caridina leucosticta*, *C. typus* and *C. multidentata*. See Fig. 4-3 and Table 4-1 for site numbers and abbreviations, respectively. (\*) $P < 0.05$ , (\*\*) $P < 0.01$  without Bonferroni correction, (\*\*\*) $P < 0.001$  with Bonferroni correction

	Japanese mainland												Nansei Islands			
	Japanese mainland												Nansei Islands			
	1. OYB	2. ISZ	3. GN	4. YU	5. KK	6. SB	7. KZ	8. NYD	9. ICT	10. KWU	11. YON	12. OMJ	10. KWU	11. YON	12. OMJ	
1. OYB		0.345 ***	0.263 ***	0.161 ***	0.295 ***	0.261 ***	0.295 ***	0.184 ***	0.195 ***	0.234 ***	0.368 ***	0.293 ***	0.234 ***	0.368 ***	0.293 ***	
2. ISZ	0.024		0.382 ***	0.279 ***	0.413 ***	0.379 ***	0.413 ***	0.303 ***	0.313 ***	0.353 ***	0.487 ***	0.407 ***	0.353 ***	0.487 ***	0.407 ***	
3. GN	0.084	-0.010		0.197 ***	0.332 ***	0.297 ***	0.332 ***	0.221 ***	0.232 ***	0.271 ***	0.405 ***	0.329 ***	0.271 ***	0.405 ***	0.329 ***	
4. YU	0.023	-0.022	-0.014		0.229 ***	0.195 ***	0.229 ***	0.118 ***	0.129 ***	0.168 ***	0.303 ***	0.229 ***	0.168 ***	0.303 ***	0.229 ***	
Mainland	0.119 (*)	-0.004	-0.022	-0.011		0.329 ***	0.363 ***	0.253 ***	0.263 ***	0.303 ***	0.437 ***	0.359 ***	0.303 ***	0.437 ***	0.359 ***	
6. SB	-0.028	-0.002	0.053	0.003	0.074		0.329 ***	0.218 ***	0.229 ***	0.268 ***	0.403 ***	0.326 ***	0.268 ***	0.403 ***	0.326 ***	
7. KZ	0.140 (*)	0.009	-0.016	-0.001	-0.025	0.098		0.253 ***	0.263 ***	0.303 ***	0.437 ***	0.359 ***	0.303 ***	0.437 ***	0.359 ***	
8. NYD	-0.017	-0.016	0.022	-0.010	0.034	-0.025	0.046		0.153 ***	0.192 ***	0.326 ***	0.252 ***	0.192 ***	0.326 ***	0.252 ***	
9. ICT	-0.031	0.009	0.060	0.006	0.082	-0.029	0.101 (*)	-0.033		0.203 ***	0.337 ***	0.262 ***	0.203 ***	0.337 ***	0.262 ***	
10. KWU	0.208 (**)	0.221 (**)	0.222 (**)	0.163 (**)	0.240 (**)	0.203 (**)	0.248 (**)	0.171 (**)	0.175 (**)		0.376 ***	0.301 ***	0.171 (**)	0.376 ***	0.301 ***	
Islands	0.128 (*)	0.071	0.059	0.031	0.066	0.105 (*)	0.069	0.064	0.090 (*)	0.045		0.429 ***	0.045		0.429 ***	
12. OMJ	0.716 ***	0.757 ***	0.743 ***	0.669 ***	0.769 ***	0.720 ***	0.774 ***	0.681 ***	0.684 ***	0.365 ***	0.610 ***		0.365 ***	0.610 ***	0.684 ***	

	Japanese mainland												Nansei Islands			
	Japanese mainland												Nansei Islands			
	4. YU	7. KZ	8. NYD	9. ICT	10. KWU	11. YON	12. OMJ	4. YU	7. KZ	8. NYD	9. ICT	10. KWU	11. YON	12. OMJ		
4. YU		0.111 ***	0.139 ***	0.118 ***	0.103 ***	0.147 ***	0.097 ***		0.111 ***	0.139 ***	0.118 ***	0.103 ***	0.147 ***	0.097 ***		
7. KZ	-0.009		0.150 ***	0.129 ***	0.113 ***	0.158 ***	0.108 ***	-0.009		0.150 ***	0.129 ***	0.113 ***	0.158 ***	0.108 ***		
Mainland	-0.028	-0.027		0.158 ***	0.142 ***	0.187 ***	0.137 ***	-0.028	-0.027		0.158 ***	0.142 ***	0.187 ***	0.137 ***		
9. ICT	-0.004	-0.004	-0.035		0.121 ***	0.166 ***	0.116 ***	-0.004	-0.004	-0.035		0.121 ***	0.166 ***	0.116 ***		
10. KWU	-0.021	-0.038	-0.032	-0.010		0.150 ***	0.100 ***	-0.021	-0.038	-0.032	-0.010		0.150 ***	0.100 ***		
Islands	-0.008	-0.037	-0.028	-0.003	-0.041		0.145 ***	-0.008	-0.037	-0.028	-0.003	-0.041		0.145 ***		
12. OMJ	0.090	0.105 (*)	0.051	0.017	0.106 (*)	0.116 (*)		0.090	0.105 (*)	0.051	0.017	0.106 (*)	0.116 (*)			

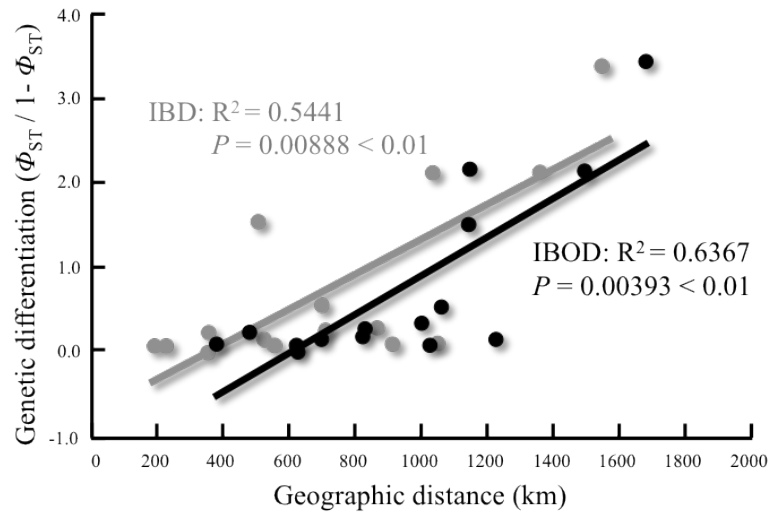
  

	Japanese mainland												Nansei Islands			
	Japanese mainland												Nansei Islands			
	4. YU	7. KZ	8. NYD	9. ICT	10. KWU	11. YON	12. OMJ	4. YU	7. KZ	8. NYD	9. ICT	10. KWU	11. YON	12. OMJ		
4. YU		0.011	0.008	0.013	0.013	0.016 (*)	0.016 (*)		0.011	0.008	0.013	0.013	0.016 (*)	0.016 (*)		
7. KZ	-0.0002		0.013 (*)	0.018 (*)	0.018 (*)	0.021 (**)	0.021 (**)	-0.0002		0.013 (*)	0.018 (*)	0.018 (*)	0.021 (**)	0.021 (**)		
Mainland	-0.015	-0.025		0.016 (*)	0.016 (*)	0.018 (*)	0.018 (*)	-0.015	-0.025		0.016 (*)	0.016 (*)	0.018 (*)	0.018 (*)		
9. ICT	0.007	0.032	0.007		0.021 (*)	0.024 (**)	0.024 (**)	0.007	0.032	0.007		0.021 (*)	0.024 (**)	0.024 (**)		
10. KWU	-0.004	-0.021	-0.025	0.030		0.024 (**)	0.024 (**)	-0.004	-0.021	-0.025	0.030		0.024 (**)	0.024 (**)		
Islands	0.001	0.033	0.005	-0.006	0.025		0.025	0.001	0.033	0.005	-0.006	0.025		0.025		

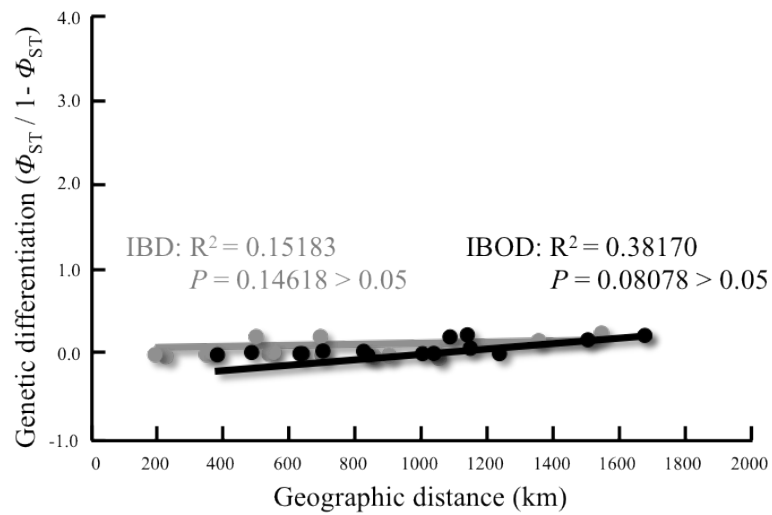
Table 4-3. Analysis of molecular variance (AMOVA) results based on 10 100 replicates using frequency of *Caridina leucosticta*, *C. typus*, and *C. multidentata* haplotypes. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , ns = not significant.

Global AMOVA						
<i>Caridina leucosticta</i>						
Source of Variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of Variation	$\Phi$ -Statistics	<i>P</i>
Among populations	11	121.68	0.495	33.30	$\Phi_{ST} = 0.333$	***
Within populations	232	230.21	0.992	66.7		
Total	243	351.89	1.488			
<i>Caridina typus</i>						
Source of Variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of Variation	$\Phi$ -Statistics	<i>P</i>
Among populations	6	25.34	0.058	1.88	$\Phi_{ST} = 0.019$	ns
Within populations	133	406.35	3.055	98.12		
Total	139	431.69	3.114			
<i>Caridina multidentata</i>						
Source of Variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of Variation	$\Phi$ -Statistics	<i>P</i>
Among populations	5	20.50	0.011	0.29	$\Phi_{ST} = 0.003$	ns
Within populations	114	441.55	3.873	99.71		
Total	119	462.05	3.885			

*Caridina leucosticta*



*Caridina typus*



*Caridina multidentata*

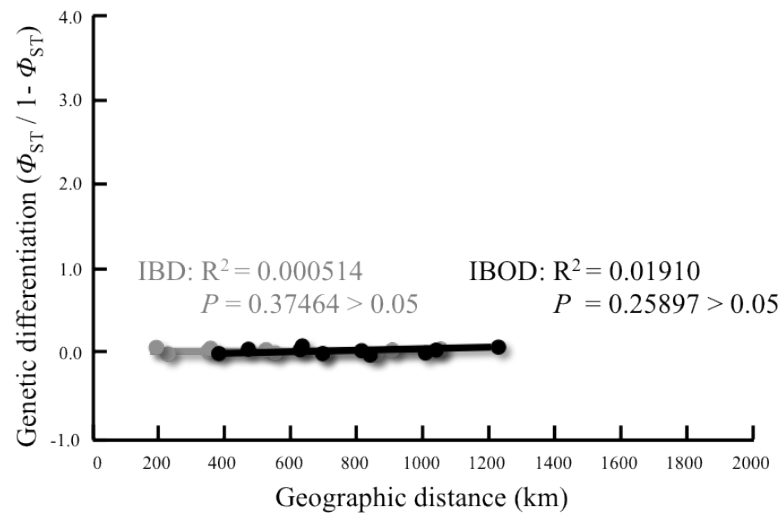


Fig. 4-7. Correlations between pairwise genetic differentiation and geographic distance (isolation by distance, IBD, see gray circle and line) and oceanographic distance (isolation by oceanographic distance, IBOD, see black circle and line)

## 4.4 考察

本研究の結果、ミゾレヌマエビでは島嶼間で2系統の頻度が不均一なのに対し、トゲナシヌマエビは南西諸島から日本本土の各集団でほぼ均一な頻度を示した (Fig. 4-5)。また、ミゾレヌマエビは、日本本土内でもいくつかの集団ペアで有意に高い遺伝的分化が確認された (Table 4-2)。この結果をこれまでの生態情報と対応させると、ミゾレヌマエビは、幼生期が短く、幼生の発育に必要な塩分は汽水程度 (塩分 17.0) で、幼生期における河川間の分散性が低いため、種の分布はそれほど広がらないという関係性を捉えることができる。一方で、トゲナシヌマエビは幼生期が長く、幼生の発育には汽水よりも高塩分 (塩分 25.5 で最大) が適しており、河川間の幼生分散が高いため、種の分布域は広域に広がりやすいと考えられる。したがって、ミゾレヌマエビとトゲナシヌマエビは、諸喜田 (1979) の仮説と合致する結果となり、両側回遊性ヌマエビ類における幼生分散と生態パラメーター (幼生期の長さ、幼生の発育に必要な塩分、地理的分布) の関係性を示すことができた (Fig. 4-2)。そして、これまで考えられてきたように、ミゾレヌマエビは河口域付近に幼生が留まるのに対して、トゲナシヌマエビの幼生は外海まで拡散することが推察された。また、生物多様性保全という観点からは、両種とも河口域で幼生が健全に生育できることが鍵となるため、河口域の環境保全が重要と考えられる。

一般的に、ヌマエビ類は熱帯性の淡水生物であり、分布の中心は熱帯/亜熱帯である (林 2007)。本研究で扱ったトゲナシヌマエビとヤマトヌマエビにおいても、インドネシアやフィリピンなどの熱帯地域を中心に分布するが、日本国内では黒潮流域下に分布が制限され、冬期に低温になる日本海側や瀬戸内海には分布しない (浜野ら 2000)。一方、ミゾレヌマエビは、日本海側や瀬戸内海などの温帯域まで分布しており (林 2007)、日本本土内で個体数が多く南西諸島では少ない。これは、ミゾレヌマエビがより低水温に適応していることを示唆するが、本種の水温と生き残りとの関係に関する知見は無い。

ミゾレヌマエビとトゲナシヌマエビの結果から明らかになった南西諸島と日本本土間の地理的隔離は、「トカラギャップ」あるいは「渡瀬線」と称される一般的な生物地理区の境界線と対応する(小島 2009; 向井 2010)。黒潮は日本本土と南西諸島の間を横断するため、高水温で貧栄養な黒潮を好まない海洋生物は、分布が遮られることが多い(松浦 2012)。一方で、黒潮は南西諸島から日本本土へ生物を輸送するベルトコンベアとしての役割も担っている(松浦 2012)。本研究では、ミゾレヌマエビにおいて、日本本土-南西諸島間で遺伝的分化が認められることから、黒潮の分布障壁機能を反映していると考えられる。また、トゲナシヌマエビについては、2系統の頻度が集団間で均一になる傾向から、黒潮のベルトコンベア機能が反映されている可能性がある。さらに、ミゾレヌマエビとトゲナシヌマエビで見られる西表島の地理的隔離は、陸生生物の分布境界線「慶良間ギャップ」(蜂須賀線)と対応している(小島 2009; 向井 2010)。慶良間ギャップは、水深が深いために、氷期においても陸化しにくかったと考えられている。両側回遊性エビ類では、水深の深い海域を幼生が横断しにくいことも考えられるが、黒潮の反流(Fig. 4-5)がちょうど先島諸島の東部に流れるため(Qiu & Imasato 1990)、黒潮反流が分散の障壁となっている可能性もある。

本研究のヤマトヌマエビの結果は、他の2種に比べて少し異なる。ヤマトヌマエビは日本国内では明瞭な系統分化がなく、その代わりに同じ河川内でも個体レベルで遺伝的に異なるほど遺伝的多様性が高い結果となった(Fig. 4-5, Table 4-1)。Dawson et al. (2014)は、浮遊幼生期の異なる潮間帯無脊椎動物のCOI遺伝子解析結果を比較し、「低分散」(浮遊幼生期: 0~1日)、「中分散」(浮遊幼生期: 1~2週間)、「高分散」(浮遊幼生期: 1~2ヶ月)の3グループに分類して、ハプロタイプネットワークの樹形を比較した。その結果、「低分散」の種はボトルネック型のネットワークを示し、「中分散」の種は星状型、「高分散」の種は放散型を呈した(Fig. 4-4)。ボトルネック型や星状型のネットワークは、氷期におけるレフュジアで集団が生き残ったことを示し、分散性が低いために氷期の影響を直接受けたと推

察することができる。それに対して、放散型のネットワークは、分散性が高いために、氷期に発生した閉鎖空間に閉じ込められず、より南方に分布域を移して氷期の影響を逃れた可能性が考えられている (Dawson et al. 2014)。本研究では、ミゾレヌマエビとトゲナシヌマエビは、ハプロタイプネットワークが星状型を呈しているため「中分散」に、ヤマトヌマエビはネットワークが放散型で「高分散」に分類される (Fig. 4-6)。したがって、ミゾレヌマエビとトゲナシヌマエビは「中分散」の範疇で分散性に差があり、ヤマトヌマエビは、それら 2 種よりもはるかに分散性が高いと推察される。以上の結果より、ヤマトヌマエビにおいても、幼生期が長く、分散性が高く、分布も広がりやすい、という関係性が認められた。ただし、幼生の発育に好適な塩分が低い (塩分 17.0) という結果とは矛盾しており、ヤマトヌマエビの幼生では、塩分耐性が発育ステージによって変化する可能性が示唆された。すなわち、幼生期中期には広塩性を有して外海まで広く分散できるが、幼生期の初期あるいは後期には高塩分環境で致死するため、ゾエア I 期から稚エビまでの全体を通してみると、汽水環境が最適となった可能性も考えられる。このことは、幼生の発育に必要な塩分は、分散性の傾向を調べるには有効であるが、幼生のステージごとに塩分耐性が異なる可能性があるため、種によっては必ずしも分散性を反映するとは限らないことを示唆している。

ヤマトヌマエビの成体は、山奥の溪流に近い環境に生息しており、生息環境だけを見ると閉鎖性の高い空間で生活している (浜野 & 林 1992)。一般に閉鎖的な空間では、近親交配や遺伝的浮動などで遺伝的多様性が低下することが知られている (安田 2007)。ところが、本研究では、ヤマトヌマエビは、その空間に生息する 1 個体ごとに遺伝的に異なるほど、遺伝的多様性が極端に高い結果となった (Table 4-1)。これは、本種が両側回遊性という生活史の中で、とりわけ河川間の幼生分散が大きく、種の分布域全体が 1 つの集団 (個体群) として機能していることを示している。さらに、河口と上流との間のふ化幼生の流下と稚エビの遡上を考えると、本種の生物多様性保全には、海から山までの統合的な河川管理が必要と

考えられる。

## 第 5 章 クロザコエビ属エビ類の系統地理

### 5.1 背景と目的

第 2 章～第 4 章では、陸水生態系に生息するヌマエビ類の生活史戦略に着眼し、純淡水性種ミナミヌマエビ *Neocaridina* sp. (大卵少産型) と、両側回遊性ヌマエビ類 3 種 (小卵多産型) の遺伝的多様性を比較した。そこで、ヌマエビ類で示された生活史戦略と遺伝的多様性の関係が、深海性エビ類でも当てはまるのではないかと推測し、日本海深部に分布するクロザコエビ *Argis lar* とトゲザコエビ *Argis toyamaensis* に注目した。これら 2 種は、日本海において水深帯を分かちように棲み分けており、卵サイズに違いが見られることが知られている (氏 1994; 沢田 1994)。また、同じクロザコエビ属 *Argis* であることから同所的近縁種とみなすことができ、深海性種の遺伝的多様性を比較するうえで優れた研究材料である。

エビジャコ科クロザコエビ属エビ類 (以下「クロザコエビ類」) は、日本海沿岸地域において重要な漁業対象種であり、1990 年代前半を中心に資源価値が見直され、生態学的特性が詳しく研究されてきた (石川県水産試験場 1991, 1992, 1993 など)。クロザコエビ類の産業価値が高まる中、Komai (1997) は、クロザコエビ属全 10 種の形態を精査して、種の検索表を作成した。しかし、クロザコエビ類は形態的差異が僅かで、特に、クロザコエビは、ヒメクロザコエビ *Argis hozawai* と形態的に酷似しており、2 種は別種として資源評価されていないのが現状である。本論文では、クロザコエビ種内の遺伝的多様性をトゲザコエビと比較することが目的であり、予めヒメクロザコエビとクロザコエビの遺伝的差異を確認しておく必要がある。そこで、第 5 章では、まずクロザコエビとヒメクロザコエビとが別種であることを遺伝的に査定した。次に、クロザコエビとトゲザコエビの系統的位置関係を、クロザコエビ属全体の分子系統樹から確認した。最後に、小卵多産型のクロザコエビについて、



日本列島周辺部とベーリング海、アラスカ湾から標本を収集して、遺伝的集団構造を明らかにした。クロザコエビは、トゲザコエビより浅い分布水深を示し、卵サイズも相対的に小さいことから、より分散性が高いことが推測される。もし高い分散性を示すのであれば、クロザコエビの遺伝的構造は日本列島周辺を流れる海流の影響を受けている可能性が高い。

## 5.2 材料と方法

### 5.2.1 ヒメクロザコエビとクロザコエビの遺伝的分化

本研究の採集調査は、2010年7月に、京都府の丹後半島沖〔ヒメクロザコエビ(30個体)：35°52.30'N, 135°25.20'E (180 m)、クロザコエビ(30個体)・トゲザコエビ(2個体)：35°55.85'N, 134°55.07'E (249 m)〕において、平安丸(京都府農林水産技術センター海洋センター)によりビームトロールを使って行った。採集後は、70%エタノールで固定し、Komai & Amaoka (1992) と Komai (1997) を参考に種を同定した。次に、mtDNA COI 遺伝子を対象としてDNA分析を行った。COI 遺伝子は、Folmer et al. (1994) の汎用プライマー内部に、クロザコエビ属特異的プライマー(Forward側)を新たに設計し

[COIF-Argis (5'-CCGGTATAGTAGGAACCGCCCTAAGTTTA-3')]、Reverse側については第4章と同じプライマー(COIR-Caridea)を使用した。DNA抽出、PCR、シーケンス、塩基配列のアラインメント(accession nos. AB640849-AB640860)、NJ法による系統樹の推定はこれまでと同様の方法で行った。また、種の査定に使う純塩基置換率はMEGA ver.6で計算した。

### 5.2.2 クロザコエビ属の分子系統樹

本研究では、2010年春から秋にかけて、National Oceanic Atmospheric Administration (NOAA)の資源調査でベーリング海とアラスカ湾(Table 5-1 A)から採集された、ミツトゲ

クロザコエビ *Argis crassa* (1 個体)、*Argis levior* (1 個体)、*Argis alaskensis* (1 個体)、*Argis dentata* (1 個体)、クロザコエビ (6 個体) と、前述の 2010 年春に京都沖で採集されたヒメクロザコエビ (1 個体)、クロザコエビ (1 個体)、トゲザコエビ (1 個体)、同年春に宮城沖 [38°29.16'N, 141°56.36'E (292 m)] で水産庁委託事業「日本海ズワイガニ等底魚資源調査」により但州丸 (兵庫県立香住高等学校) を使って採集されたクロザコエビ (1 個体) を用いた。形態的な種の識別については、Komai & Amaoka (1992) と Komai (1997) を参考にした。ミットゲクロザコエビは、クロザコエビと同様に日本海からアラスカ湾まで広域に分布するが、小型で水深 10 m 程度に生息する浅海性種であるため、深海性種に注目する本研究では大きく扱わない。その他の *A. levior*、*A. alaskensis*、*A. dentata* は、ベーリング海やアラスカ湾にのみ分布しており、日本近海には生息していない。

分子系統樹の推定にあたって、本研究では、5.2.1 の mtDNA COI (571 bp) に加えて、ND2 遺伝子 (789 bp) の PCR 用プライマーを新たに設計し、分析に供した。ND2 遺伝子は、12S rRNA と COI の両方向からプライマーウォーキング法により順に塩基配列を読み、保存性の高い領域にプライマーを設計した

[ND2F-*Argis* (5'-GCTCATACCCCGTCTATGATTC-3'),

ND2R-*Argis* (5'-TAAGGTTTAAGAGGCTTCTCC-3')]。採集後の標本固定、DNA 抽出、PCR、シーケンス、塩基配列のアラインメント (accession nos. LC203230–LC203289)、はこれまでと同様の方法で行った。クロザコエビ属の系統関係は、各種 1 個体とクロザコエビ種内系統 1 個体を選び解析に供したが、クロザコエビの系統 C については、個体間で遺伝的差異が大きかったため、全 6 個体を系統解析に供した。系統樹は、BEAST ver.1.8.1 にてベイズ法により推定し、内部枝の頑健性はベイズ法の事後確率、NJ 法・ML 法 (MEGA ver.6) のブートストラップ確率 (1000 回の無作為化検定) で統計的に査定した。種の査定に使う COI の遺伝的距離については、MEGA ver.6 で Kimura 2 parameter (K2P) 法に

より計算した。系統樹は、MEGA ver.6 で最適塩基置換モデルを BIC 基準により選び、それを基に推定した。また、系統樹上の分岐年代を、BEAST ver.1.8.1 により進化速度 1.4% / 100 万年 (Knowlton & Weigt 1998) を基にしてベイズ推定した。

Table 5-1. Sampling locations (Station numbers plotted in Fig.5-5), sampling date and sample sizes (*n*) in the present study. SOJ, SOO, NPO, BS and GOA correspond to the Sea of Japan, the Sea of Okhotsk, the northwestern Pacific off the Japanese Islands, the Bering Sea and the Gulf of Alaska, respectively.

Species name	Station No. (Fig. 5-5)	Distribution area	Latitude	Longitude	Depth (m)	Cruise	<i>n</i>
A							
<i>Argis crassa</i>		BS	60°09.15'N	- 172°18.24'E	57	Jan, 2011	1
<i>Argis levior</i>		GOA	54°51.47'N	- 164°51.47'E	82	Jan, 2011	1
<i>Argis alaskensis</i>		GOA	56°21.41'N	- 135°01.36'E	126	Jan, 2011	1
<i>Argis dentata</i>		GOA	60°11.58'N	- 145°58.04'E	114	Jan, 2011	1
<i>Argis lar</i>	1	BS	60°20.29'N	- 168°38.32'E	36	Jan, 2011	3
	2	BS	59°19.31'N	- 168°33.45'E	42	Jan, 2011	2
	3	GOA	55°26.18'N	- 168°30.27'E	38	Jan, 2011	1
B							
<i>Argis lar</i>	4	SOJ	35°34.27'N	130°53.30'E	225	May, 2010	8
	5	SOJ	35°47.38'N	134°29.85'E	220	May, 2010	8
	6	SOJ	36°49.92'N	136°22.08'E	222	Jun, 2010	8
	7	SOJ	38°08.35'N	138°35.52'E	254	Jul, 2011	7
	8	SOJ	44°02.24'N	141°13.45'E	203	Jul, 2011	8
	9	SOO	44°55.33'N	144°10.06'E	214	Apr, 2010	3
	10	NPO	42°14.48'N	143°40.16'E	220	May, 2011	13
	11	NPO	40°57.47'N	141°32.08'E	350	Apr, 2010	2
	12	NPO	38°29.16'N	141°56.36'E	292	Apr, 2010	6

### 5.2.3 クロザコエビの種内系統地理

次に、クロザコエビの遺伝的集団構造を調べた。標本は、前述のものに加え、みずほ丸（日本海区水産研究所）、探海丸（北海道区水産研究所）で採集されたものを用いた（Table 5-1 B）。分子マーカーとしては、5.2.1 と同じ mtDNA COI 遺伝子を扱った。採集後の標本固定、DNA 抽出、PCR、シーケンス、塩基配列のアラインメント、ハプロタイプネットワークの作成、遺伝的多様度（ $h$ 、 $\pi$ ）と Tajima's  $D$  の計算はこれまでと同様の方法で行った。さらに、クロザコエビ *A. lar* 種内系統の歴史的個体群動態を、ミスマッチ分布で簡易的に表現した。ミスマッチ分布は、ハプロタイプネットワークの形状をグラフで表現しており、集団サイズの急速な拡大を経験している星状型ネットワーク樹の場合は、グラフの最頻値が左側に寄り、放散型になるにつれて最頻値が右に移動していく（小池 & 松井 2003）。

## 5.3 結果

### 5.3.1 ヒメクロザコエビとクロザコエビの遺伝的分化

COI 遺伝子 (571 bp) を調べたところ、85 塩基 (14.9%) に変異が見られ、80 塩基 (14.0%) が parsimony informative であった。最適塩基置換モデル [T92+I (I=0.73)] を基に NJ 系統樹を作成した結果、形態によりヒメクロザコエビ、クロザコエビと識別された個体 (Fig. 5-1) は、それぞれ明瞭なクレードとして検出された (Fig. 5-2)。純塩基置換率 ( $D_A$ ) を計算したところ、ヒメクロザコエビとクロザコエビの種内ではそれぞれ 0.0%、0.2% と低い値を示したのに対し、種間では 8.3% と高い値となった。

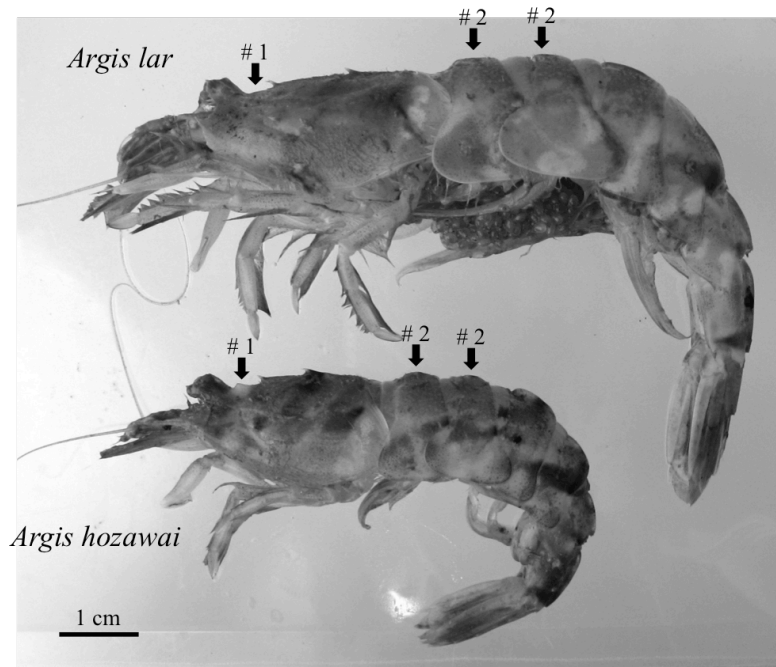


Fig. 5-1. Morphological differences (black arrows) between *Argis lar* and *Argis hozawai* (photo by J. Fujita). *A. hozawai* is distinguished by the presence of a tooth-like tubercle just behind the rostrum (compare # 1) and a more distinct median carina on the anterior two abdominal somites (compare # 2).

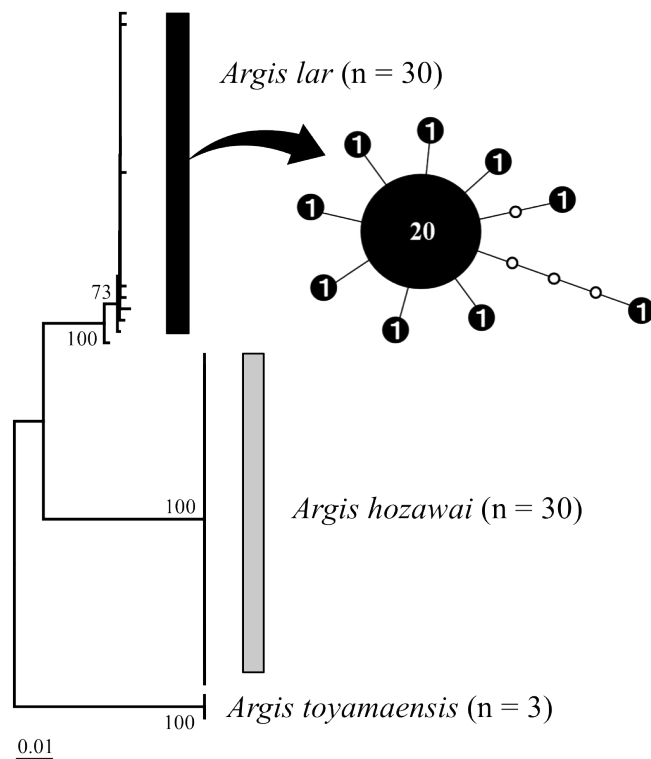


Fig. 5-2. Neighbor-joining tree under the TrN + I nucleotide substitution model illustrating the relationships of mtDNA COI haplotypes of 30 *Argis lar* and 30 *Argis hozawai* from the sympatric sampling station in the Sea of Japan. Numbers at tree nodes indicate bootstrap values (only values > 70 % are shown). Scale bar: 0.01 of TrN + I distance. The haplotype network of *Argis lar* is illustrated to the right. Each black-filled circle represents a unique haplotype with its frequency as indicated. Open circles indicate the presumed ancestral haplotypes.

### 5.3.2 クロザコエビ属の分子系統樹

COI 遺伝子 (571 bp) と ND2 遺伝子 (789 bp) を調べたところ、変異サイトは COI で 169 箇所 (29.6 %)、ND2 で 227 箇所 (28.8 %) 検出され、parsimony informative サイトは COI で 111 箇所 (19.4 %)、ND2 で 148 箇所 (18.8 %) であった。COI と ND2 を組み合わせた 1360 bp を使って、最適塩基置換モデル [TN93] によりクロザコエビ属の分子系統樹を推定したところ、形態で分類した種に対応する樹形が明らかとなった (Fig. 5-3)。日本海深層部に分布するクロザコエビとトゲザコエビは、相互に単系統ではなく、別の系統であることが明らかとなった。形態的に似ているヒメクロザコエビとクロザコエビは、やはり分子系統樹からも最近縁であることが確認された。また、形態的にクロザコエビと同定された標本は、3 つの遺伝的に異なる系統 (系統 A、B、C) に分かれ、系統 B から系統 A、系統 C の順に派生する形状が明らかとなった (Fig. 5-3)。

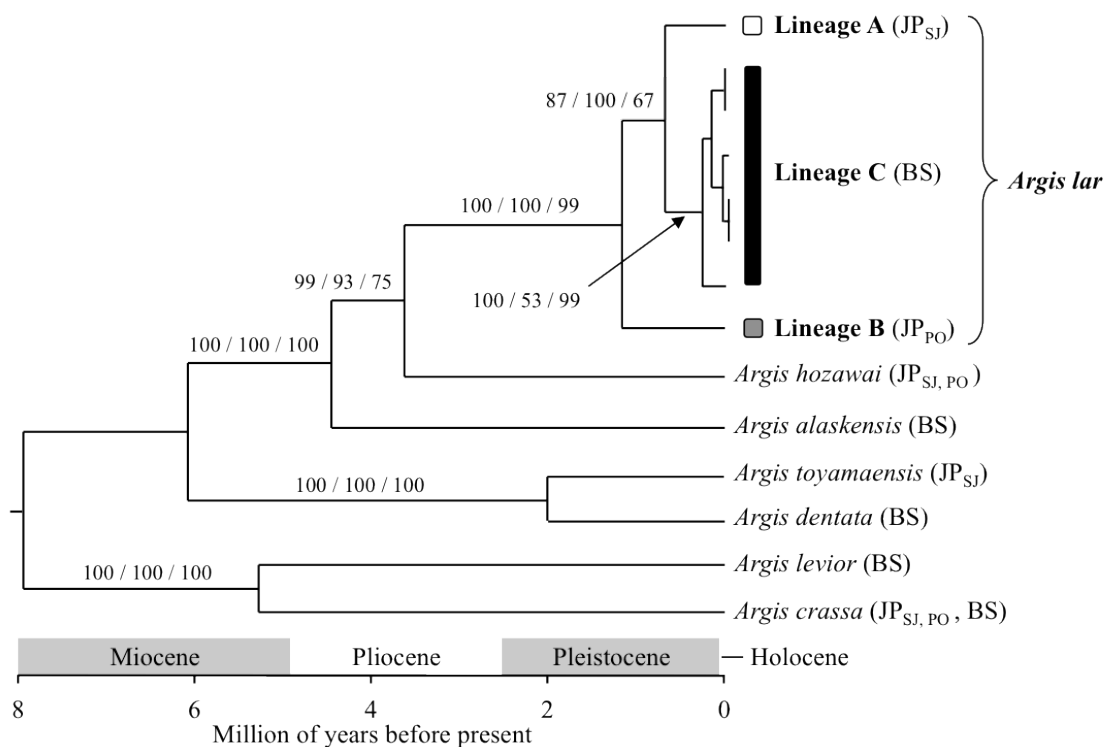


Fig. 5-3. Bayesian phylogeny of COI-ND2 combined dataset among members of *Argis* shrimps. Bayesian posterior probability / maximum likelihood bootstrap / neighbor joining bootstrap values are shown above node. Geographic distributions of each species and lineage are shown in parentheses. JP<sub>SJ</sub> and JP<sub>PO</sub> correspond to the Sea of Japan and the northwestern Pacific off the Japanese Archipelago, respectively, and also BS represents the Bering Sea / the Gulf of Alaska.

### 5.3.3 クロザコエビの種内系統地理

北部太平洋から得られたクロザコエビ (Table 5-1) を基に、mtDNA COI 遺伝子 (571 bp) を使って、最大節約法によるハプロタイプネットワークを作成したところ、系統Aは典型的な星状型、系統Bはやや崩れた星状型、系統Cは放散型を呈する傾向が認められた (Fig. 5-4)。また、ミスマッチ分布もネットワークを反映しており、系統A、系統B、系統Cの順にグラフの最頻値が右に移行することが明らかとなった。

次に、各系統の地理的組成を地図上で表したところ、系統Aは日本海、オホーツク海、太平洋側（三陸海岸沖）に分布し、系統Bは道東・三陸海岸沿い、系統Cはベーリング海やアラスカ湾に分布していることが確認された (Fig. 5-5)。各系統の遺伝的多様性を調べたところ、日本海の組成を表している系統Aで多様度は最も低く、系統Bで中程度、系統Cで多様度が高くなる傾向が確認された。Tajima's  $D$  は系統Aのみで有意に大きな負の値を示した。

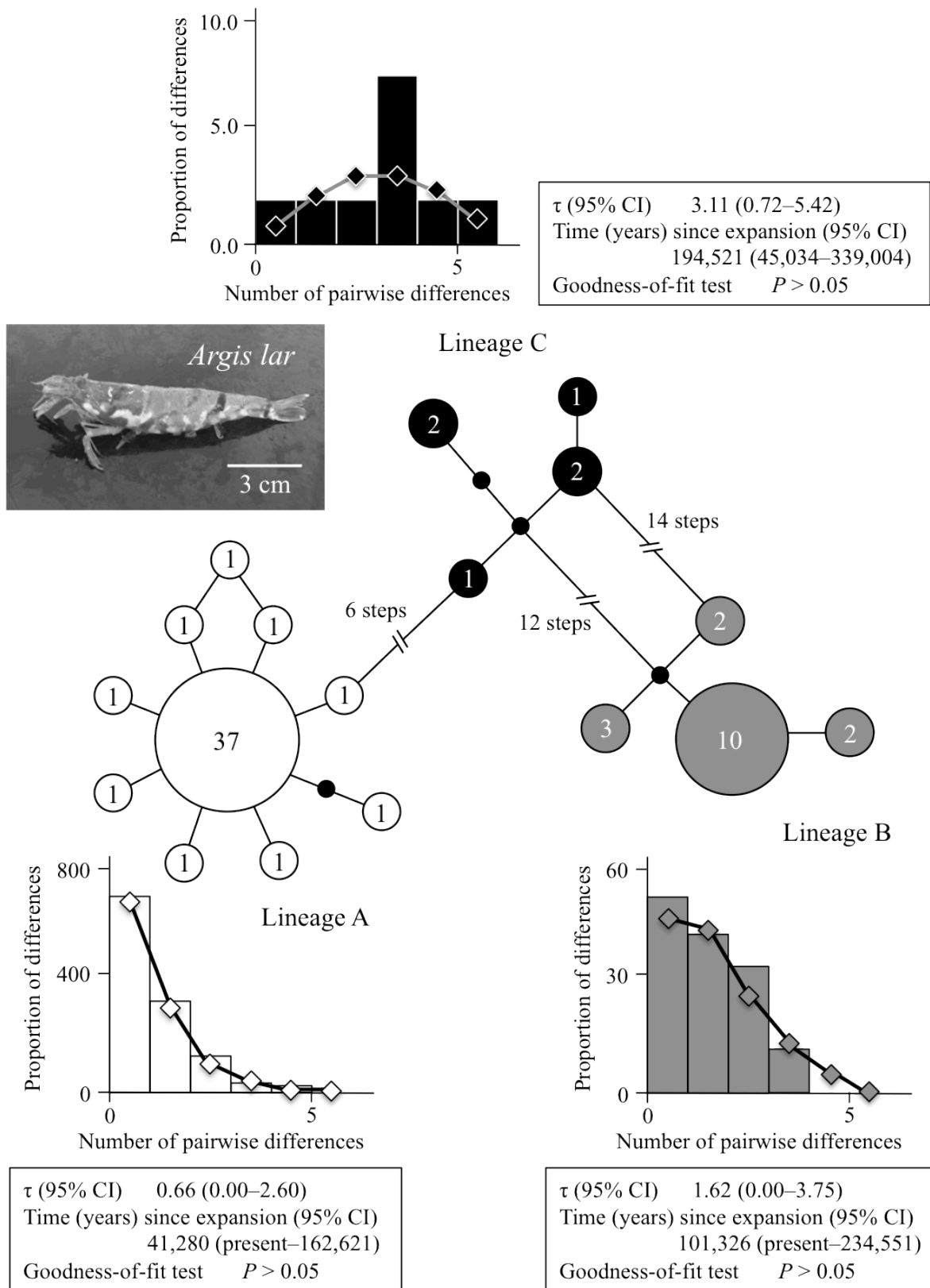


Fig. 5-4. Statistical parsimony network for mtDNA COI haplotypes from *Argis lar* collected across its distribution range. Large white, grey and black circles represent unique haplotypes from Lineage A, Lineage B and Lineage C, respectively. Small black circles represent unsampled hypothetical haplotypes. For each lineage, observed pairwise numbers of differences (bar charts) against models of sudden expansion (diamonds and plain lines) and their summary statistics are obtained.



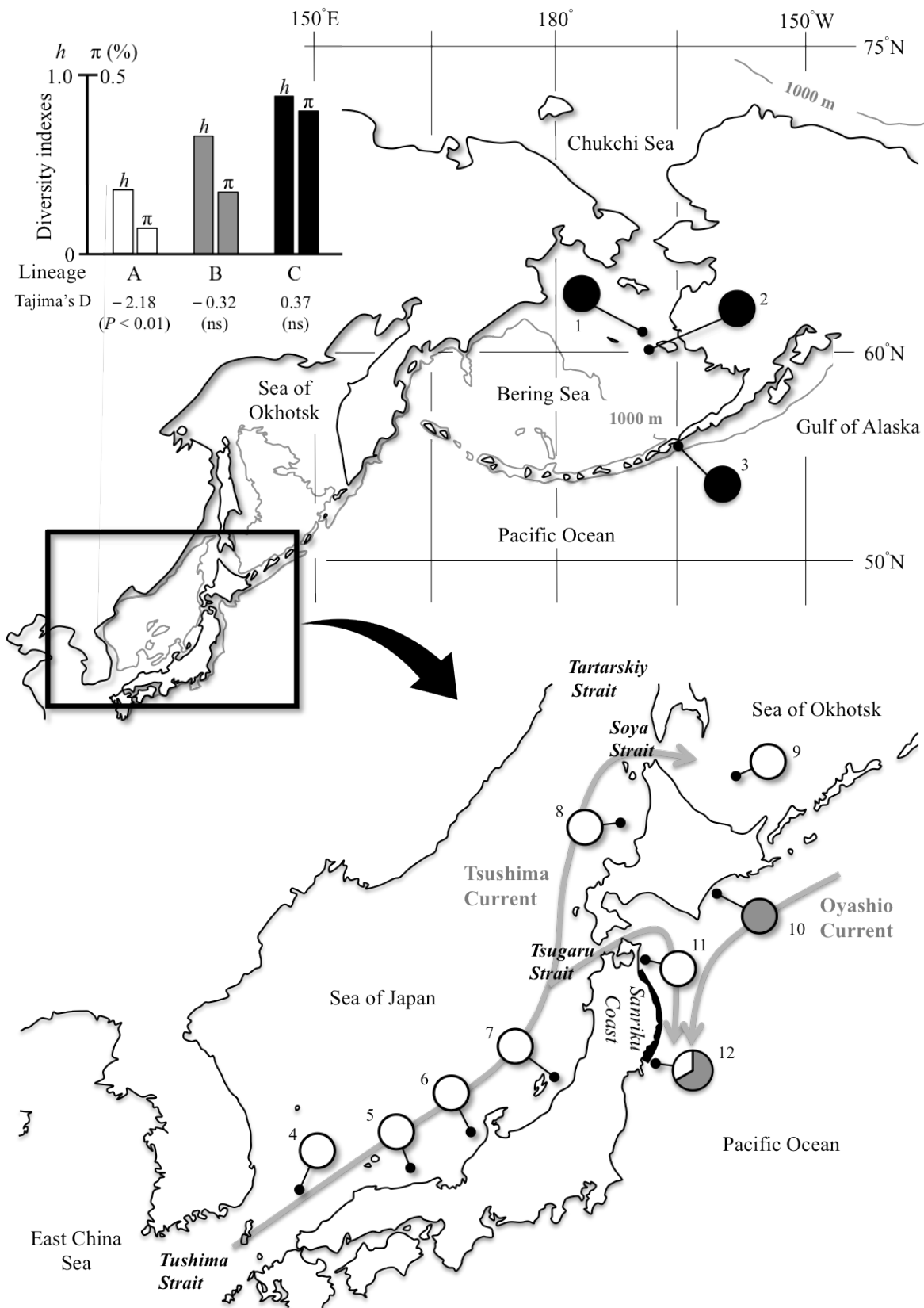


Fig. 5-5. Geographic distribution of mtDNA COI lineages (see Fig. 5-4) and their summary statistics ( $h$ , haplotype diversity;  $\pi$ , nucleotide diversity; Tajima's  $D$ ) in *Argis lar*. White, grey and black colour in pie charts and bars correspond to Lineage A, Lineage B and Lineage C, respectively. See Table 5-1 for collection station names and coordinates.

## 5.4 考察

### 5.4.1 ヒメクロザコエビとクロザコエビの遺伝的分化

ヒメクロザコエビとクロザコエビは、形態的に識別が難しく、長い間分類学的に混乱していた。Komai & Amaoka (1992) は、この状況を踏まえて、初めて形態を精査し、両者を別種として区別した。それによると、ヒメクロザコエビは、額角の直後に明瞭な結節状突起があること、第 1 および第 2 腹節上の正中隆起が明瞭であること、第 1 胸脚のはさみの掌部が比較的太いこと、および体がやや小型であることで、クロザコエビと識別できるという (Fig. 5-1)。しかし、両者の形態的差異は僅かであり、中間形質なども報告され、色彩での区別は困難なことから、形態で分類された今もなお混乱が続いている。また、両種を区別して資源評価を行っている日本海側の地域は少ない。本研究では、そのような現状を踏まえて、mtDNA COI 遺伝子による分子分類を行った。系統樹で 2 種が明瞭に区別されること (Fig. 5-2)、純塩基置換率が種内よりも種間で高い値となったことから、両種の系列選別は完了しており、両種は別種として識別されるべきであると結論づけることができる。

### 5.4.2 クロザコエビ属の分子系統樹

クロザコエビ類は、北部太平洋を中心に 10 種が記載されており、本研究では属内の全ての生物種を網羅する taxon sampling が不十分であるため、系統関係については深く考察することができない。しかし、日本海深層部に分布するクロザコエビとトゲザコエビが相互に単系統でないことは明らかで (Fig. 5-3)、両者は日本海で種分化したわけではなく、別々の歴史をもつ 2 種が現在日本海深海部で棲み分けていると考えられる。形態的に似ているヒメクロザコエビとクロザコエビは、やはり分子系統樹からも最近縁であることが確認され、この 2 種についてはおそらく日本近海で種分化が進んだのであろう。また、トゲザコエビは、オホーツク海固有種トゲクロザコエビ *Argis ochotensis*、ベーリング海固有種 *A. dentata*

とともに、形態的に類似していることから、かつては「*Argis dentata*」1種としてまとめられていた（以下「*Argis dentata* 種群」）（Komai 1997）。これらの近縁性も分子系統樹から支持されている。残念ながら、トゲクロザコエビ *A. ochotensis* は標本が収集できておらず、*Argis dentata* 種群の系統進化については論じられないが、トゲザコエビと *A. dentata* の系統分岐（約 200 万年前〈前期更新世〉）は、ヒメクロザコエビとクロザコエビの分岐（約 350 万年前〈中期鮮新世〉）よりも新しく、急速に異所的種分化が進んだことが示唆された（Fig. 5-3）。

#### 5.4.3 クロザコエビの種内系統地理

本研究では、クロザコエビ種内に明瞭な 3 つの系統が存在することが明らかとなり（Fig. 5-4）、日本列島周辺部では、系統 A と系統 B の遺伝子型組成が海流構造（系統 A - 対馬海流と津軽海流、系統 B - 親潮）と対応しており、日本列島周辺部におけるクロザコエビの分布は海流の影響を受けることが示唆された（Fig. 5-5）。このことは、クロザコエビが、より海流の影響を受けやすい浅層分布（水深 200~250 m）を示し、トゲザコエビと比べて卵サイズが小さく、個体発生初期における幼生期の分散性が大きいという予測と一致している。さらに、分散性が高いために種の分布も広がりやすいという、ヌマエビ類で明らかになった関係性（第 4 章）とも対応している。次章では、日本海に焦点を当てて、クロザコエビとトゲザコエビを同所的に採集し、両種の遺伝的多様性を比較した。

## 第 6 章 クロザコエビとトゲザコエビの生態特性と遺伝的多様性の比較

### 6.1 背景と目的

クロザコエビ *Argis lar* (水深 200~250 m) とトゲザコエビ *Argis toyamaensis* (250~1250 m) は、日本海の深層部で水深帯を分かちように棲み分けており、体サイズが同程度であるにもかかわらず、卵サイズや卵数 (クロザコエビ: 平均 1.5×1.2 mm・1575 個、トゲザコエビ: 2.2×2.0 mm・124 個)、産卵期と幼生ふ出期から推定される抱卵期間 (クロザコエビ: 約 13 ヶ月、トゲザコエビ: 20 ヶ月) に差異が認められることが知られている (氏 1994; 沢田 1994) (Fig. 6-1)。したがって、より浅い海域に生息するクロザコエビは小卵多産型で、トゲザコエビはより深い海域に生息して大卵少産型を示す。これら 2 種は、重要な漁業対象種にもなっていることから、生態が詳しく調べられており (石川県水産試験場 1991, 1992, 1993 など)、深海性甲殻類の生活史戦略を検討するうえで優れたモデルと考えられる。これまでの研究では、小卵多産型のクロザコエビは 2 期の幼生期を示し、水温 5°C では 15~20 日の幼生期間を有することが分かっている (中野 1993)。トゲザコエビについては、クロザコエビより大卵であるため、発生がより進んだ直達発生に近いステージで産出されることが推察される。このように、興味深い生態特性が知られているにも関わらず、両種の分散性の差異や遺伝的多様性はこれまで調べられていない。本研究では、クロザコエビとトゲザコエビの遺伝的集団構造を比較して両種の分散性を評価し、深海環境における生活史戦略と遺伝的多様性について考察した。

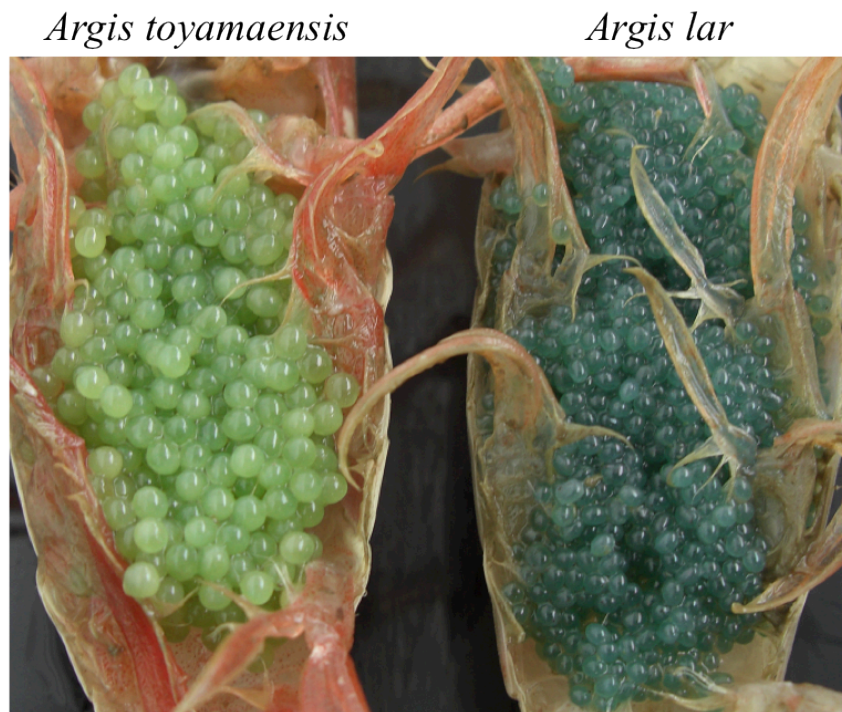
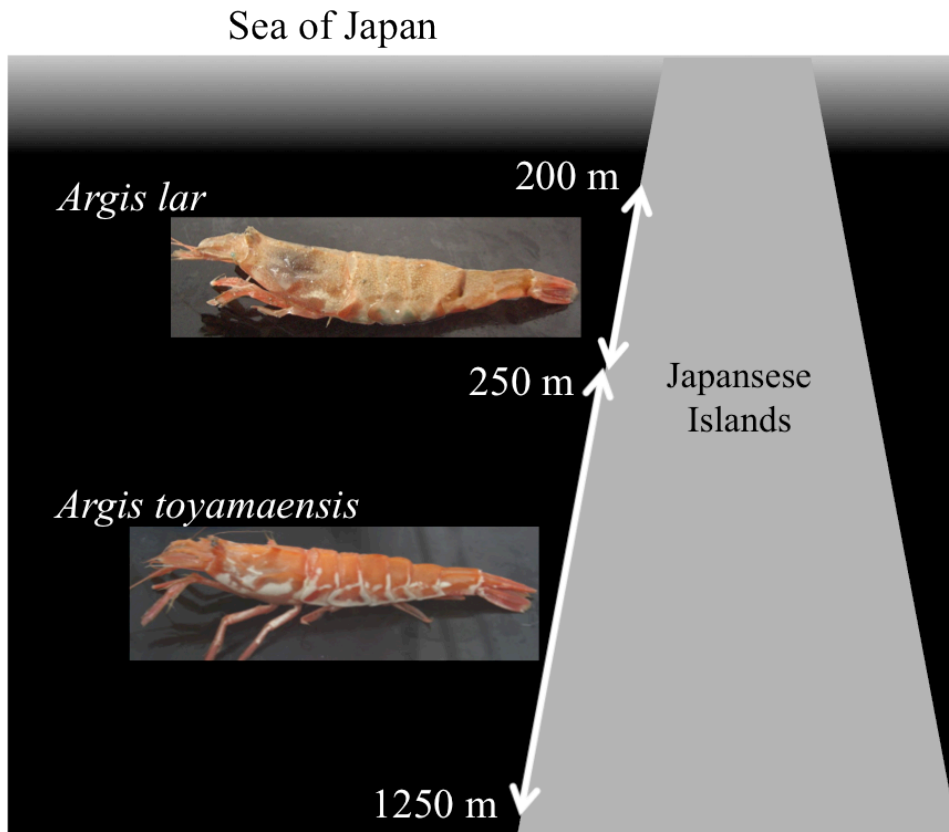


Fig. 6-1. Vertical distributions for *Argis lar* and *Argis toyamaensis* in the Sea of Japan (upper panel). Below panel shows the egg size differences between *A. lar* and *A. toyamaensis*.

## 6.2 材料と方法

本研究では、第 5 章で採集した標本に加えて、2010 年秋に秋田県沖 [千秋丸 (秋田県水産試験場)] および山形県沖 [最上丸 (山形県水産試験場)] で採集された標本を (Fig. 6-2、Table 6-1)、mtDNA 塩基配列多型分析に供した。前章において、クロザコエビ類の分散性の差異を調べるには mtDNA COI 遺伝子では多型量が少ない傾向にあったため、本章ではより多型情報量の多い mtDNA Control Region で分析を行った。Control Region は、アミノ酸をコードしないため、種間で PCR 用プライマーが設計しにくいという欠点がある。そこで本研究では、前章と同様、Control Region の両サイドにある 12S rRNA と COI からプライマーウォーキング法により塩基配列を順次読み、クロザコエビとトゲザコエビで塩基置換の差が少ない箇所にプライマーを設計した

[CRF-Argis2 (5'-GTACCCTCACCACAAAGGTAG-3')、  
CRR-Argis4 (5'-CTTATTCCGCTAGAATAGGAGG-3')]

サンプリング後の DNA 抽出から塩基配列のアラインメント、ハプロタイプネットワークの作成、遺伝的多様度 ( $h$ ,  $\pi$ ) と Tajima's  $D$  の計算は、前章までと同様の方法で行った。また、分散性の違いを、ペアワイズ  $\Phi_{ST}$  と AMOVA 分析、Isolation By Distance (IBD) で表現した。AMOVA 分析は、日本海で個体数が 20 個体確保できている地点を選び、日本海全域での分散性として評価した。ペアワイズ  $\Phi_{ST}$ 、AMOVA 分析、IBD は、Arlequin ver.3.5.1.2 により、100,000 回の無作為化検定で統計的に査定した。

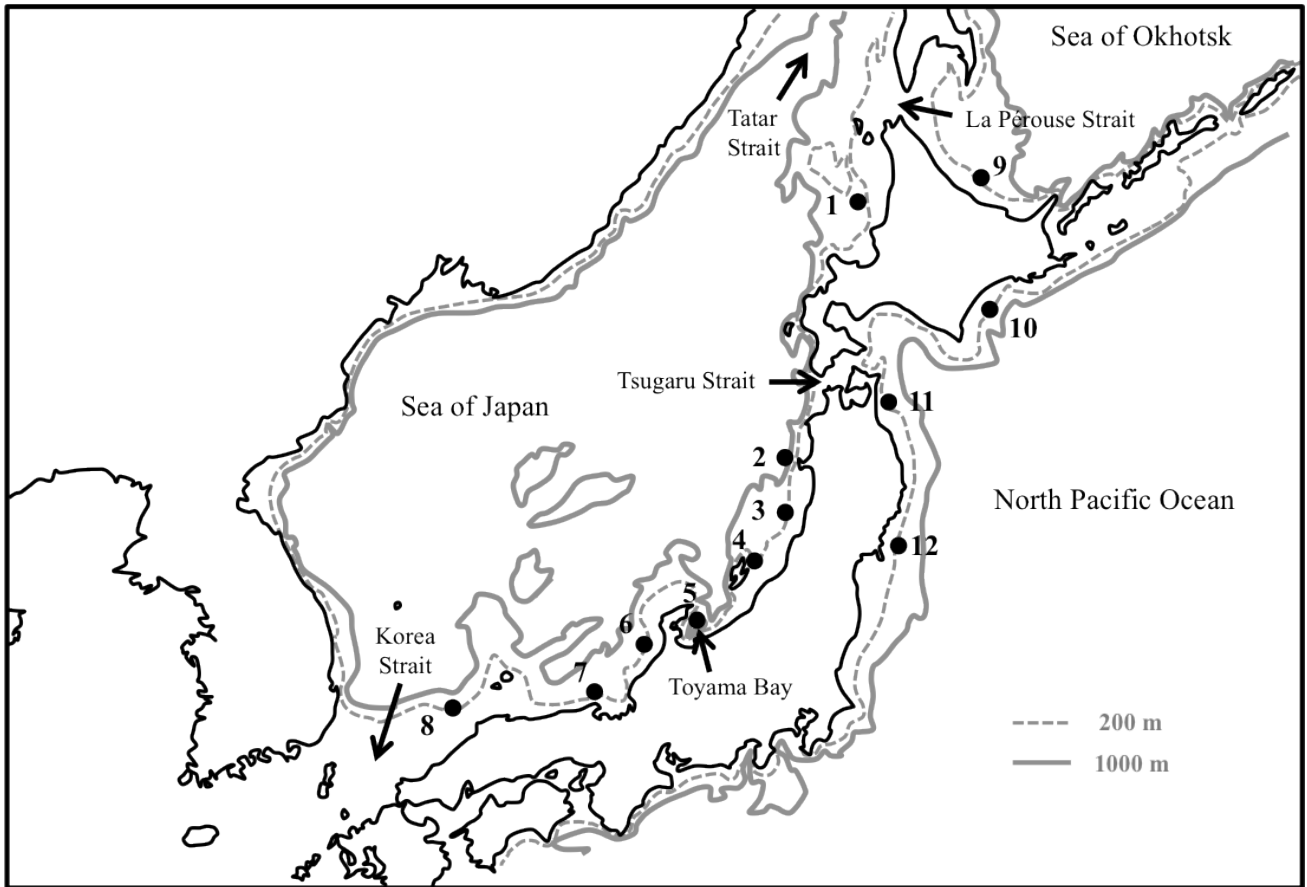


Fig. 6-2. Sampling locations for *Argis lar* and *Argis toyamaensis*. See Table 6-1 for collection site.

Table 6-1. Sampling locations, sample sizes ( $n$ ), number of haplotypes (nHp), haplotype diversities ( $h$ ), nucleotide diversities ( $\pi$ ) and Tajima's  $D$ s for each species and population group in the present study. ns = not significant.

	<i>Argis lar</i>					<i>Argis toyamaensis</i>				
	$n$	nHp	$h$	$\pi$	Tajima's $D$	$n$	nHp	$h$	$\pi$	Tajima's $D$
All	186	42	0.734	1.431%	- 0.091 (ns)	160	15	0.622	0.188%	- 1.156 (ns)
Lineage A	139	39	0.626	0.171%	- 2.542 ( $P < 0.001$ )	-	-	-	-	-
Lineage B	47	3	0.084	0.015%	- 1.471 (ns)	-	-	-	-	-
Sea of Japan										
1. Off Sapporo	8	4	0.857	0.214%	- 1.030 (ns)	20	5	0.726	0.241%	- 0.203 (ns)
Eastern region										
All	32	11	0.575	0.157%	- 2.282 ( $P < 0.01$ )	80	9	0.629	0.180%	- 0.438 (ns)
2. Off Akita	20	8	0.647	0.161%	- 2.041 ( $P < 0.05$ )	20	5	0.679	0.245%	- 0.135 (ns)
3. Off Yamagata	20	6	0.516	0.125%	- 1.888 ( $P < 0.05$ )	20	3	0.542	0.110%	0.173 (ns)
4. Off Niigata	11	5	0.618	0.165%	- 1.791 ( $P < 0.05$ )	20	6	0.726	0.248%	- 0.112 (ns)
5. Toyama Basin	1	1	-	-	-	20	3	0.542	0.105%	0.063 (ns)
Western region										
All	60	22	0.622	0.168%	- 2.437 ( $P < 0.01$ )	60	10	0.502	0.162%	- 1.624 (ns)
6. Off Ishikawa	20	4	0.284	0.072%	- 1.868 ( $P < 0.05$ )	20	5	0.368	0.073%	- 1.868 ( $P < 0.05$ )
7. Off Kyoto	20	11	0.763	0.214%	- 2.034 ( $P < 0.05$ )	20	6	0.637	0.243%	- 0.678 (ns)
8. Off Shimane	20	10	0.758	0.216%	- 2.186 ( $P < 0.01$ )	20	4	0.489	0.154%	- 1.232 (ns)
9. Sea of Okhotsk										
7	7	3	0.524	0.104%	- 0.237 (ns)	-	-	-	-	-
Northwestern Pacific										
10. Off Kushiro	20	2	0.100	0.018%	- 1.164 (ns)	-	-	-	-	-
11. Off Aomori	20	4	0.363	0.946%	- 0.450 (ns)	-	-	-	-	-
12. Off Miyagi	12	3	0.318	1.024%	- 0.644 (ns)	-	-	-	-	-



## 6.3 結果

採集されたクロザコエビ（186 個体）とトゲザコエビ（160 個体）を対象として mtDNA Control Region（552 bp）を調べたところ、2 種全体で 114 箇所（20.7%）〔クロザコエビで 47 箇所、トゲザコエビで 10 箇所〕に変異が見られ、103 箇所（18.7%）〔クロザコエビで 32 箇所、トゲザコエビで 6 箇所〕が parsimony informative であった。

ハプロタイプネットワークを推定したところ、クロザコエビでは、前章と同様に、概ね日本海側と太平洋側で異なる系統に分かれ、日本海側では星状型を呈した（Fig. 6-3）。トゲザコエビは、クロザコエビよりハプロタイプの種類が少なく、系統間を介在する仮想ハプロタイプが多くボトルネック型を呈した。要約統計量を調べたところ、遺伝的多様度は種間ではほとんど差はなく、Tajima's  $D$  はクロザコエビの系統 A で有意な負の値を示した（Table 6-1）。また、集団レベルでは、石川県沖で、クロザコエビ・トゲザコエビ共に顕著に低い遺伝的多様度を示し、Tajima's  $D$  も有意に低い値を示した。

集団間の分散性をハプロタイプの頻度分布で見ると、クロザコエビは概ね均一な頻度を示し、トゲザコエビは不均一な頻度となる傾向が確認された（Fig. 6-4）。ペアワイズ  $\Phi_{ST}$  を比較したところ、クロザコエビでは日本海側－太平洋側間で有意な差が認められた（Table 6-2）。日本海内では、クロザコエビに遺伝的分化はほとんど認められず、トゲザコエビでは石川県沖とのペアで集団間の遺伝的分化が検出された。また、AMOVA 分析では、トゲザコエビのみ集団間の有意な遺伝的分化が検出された（クロザコエビ  $\Phi_{ST} = 0.0016$  [ $P = 0.45$ ]、トゲザコエビ  $\Phi_{ST} = 0.0743$  [ $P < 0.01$ ] ; Table 6-3)。IBD では、クロザコエビ・トゲザコエビともに有意な相関を示さなかったが、トゲザコエビは、近隣集団でも比較的高い  $\Phi_{ST}$  値を示すため、グラフ上の縦軸（遺伝的分化）の取り得る幅が広い傾向が確認された（Fig. 6-5）。

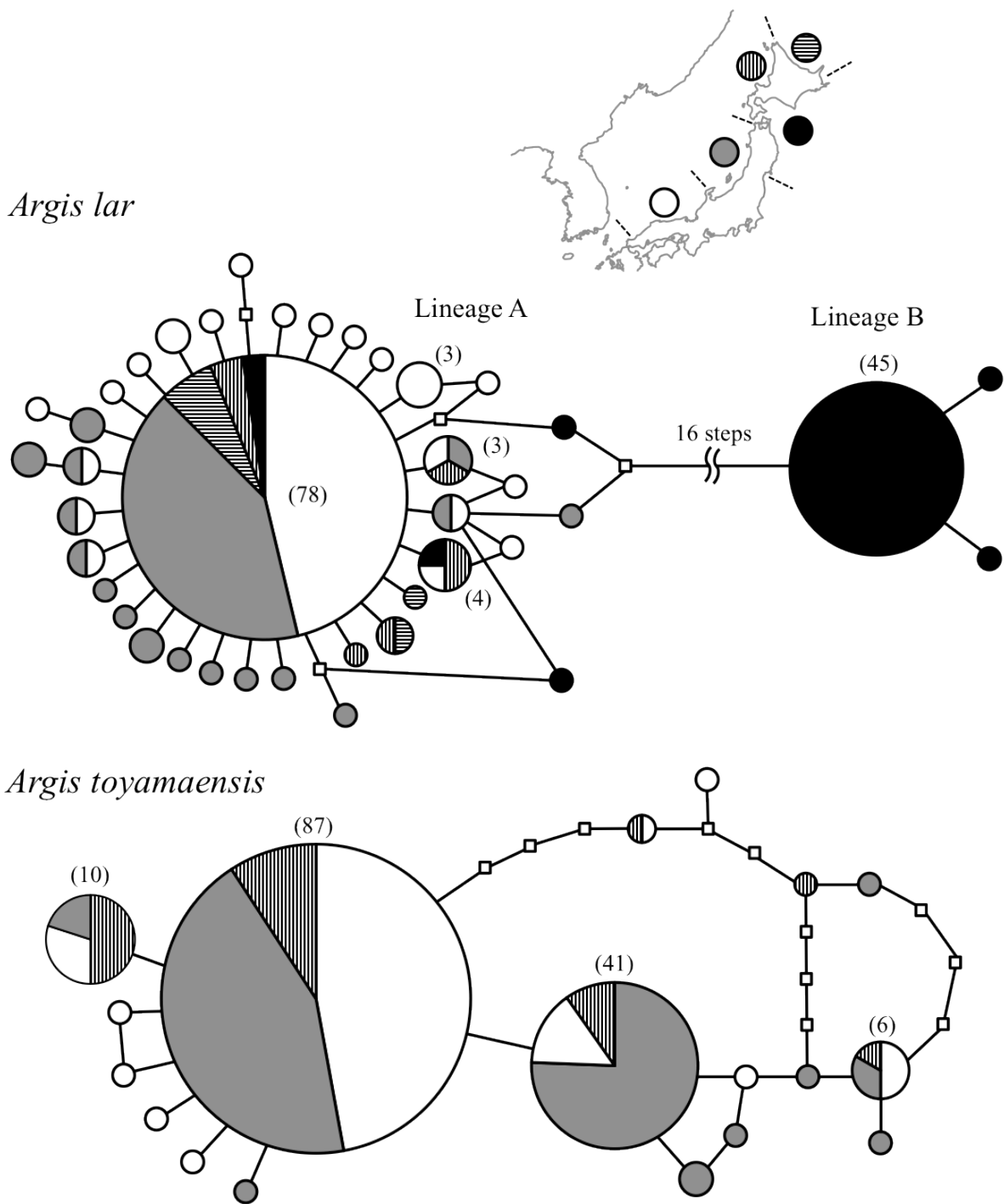


Fig. 6-3. Statistical parsimony networks for mitochondrial DNA Control Region. The area of each shape is proportional to the frequency at which that haplotype was observed (smallest white circle,  $n = 1$ ). The number of individuals is shown in parentheses. Color patterns ( $n > 1$ ) represent the locations from which haplotypes were sampled (see map, upper right). Each branch between any 2 shapes represents a single nucleotide substitution. Small white squares represent unsampled hypothetical haplotypes.

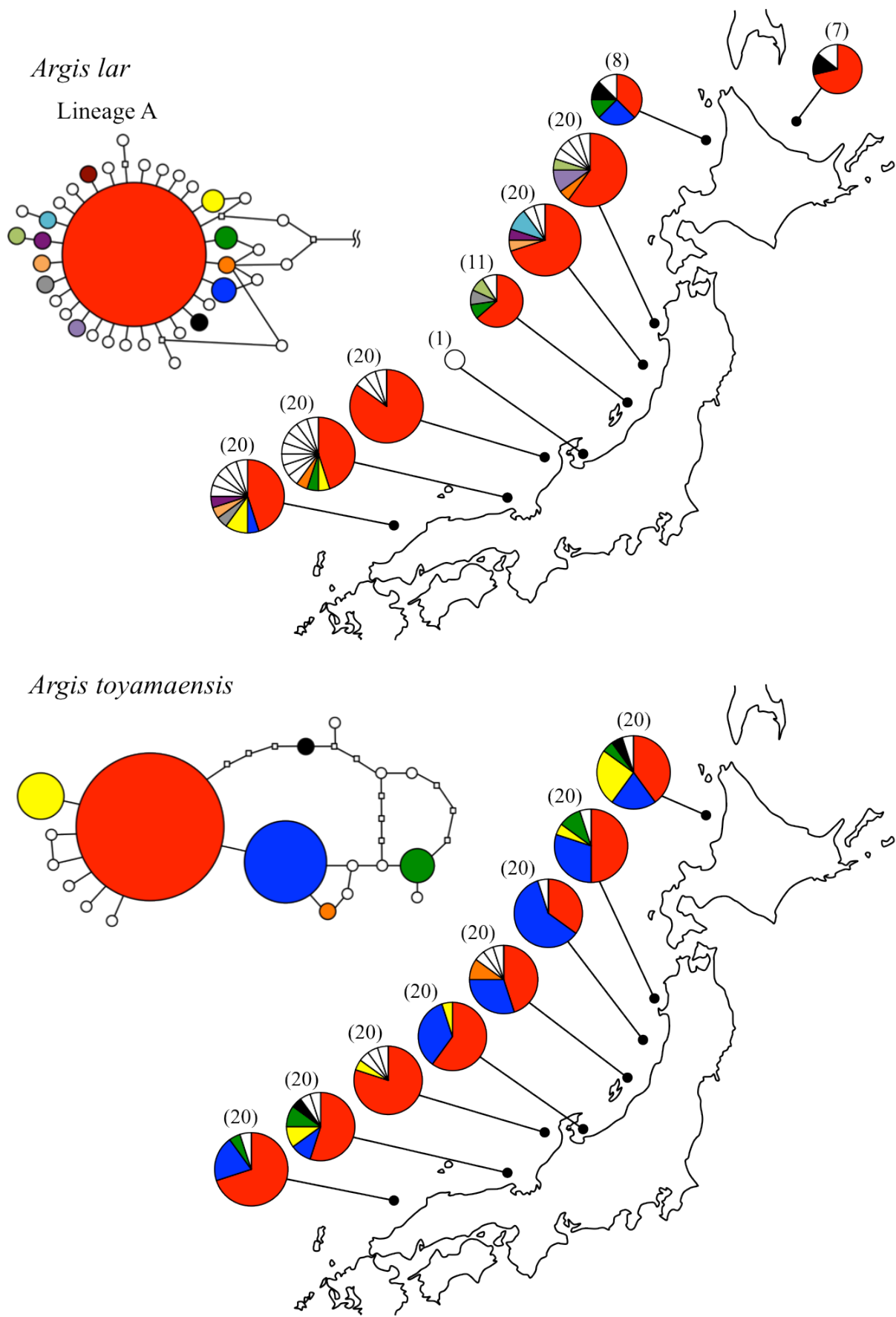


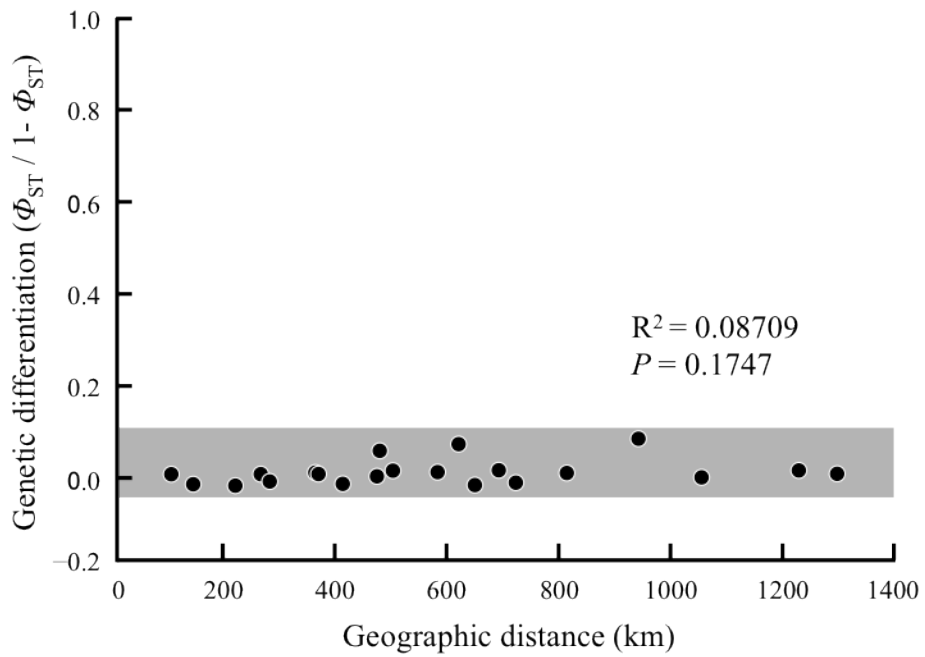
Fig. 6-4. Geographic distributions of obtained haplotypes for each species in the Sea of Japan. The number of individuals is shown in parentheses.



Table 6-3. Analysis of molecular variance (AMOVA) results based on 10 100 replicates using frequency of *Argis lar* and *A. toyamaensis* haplotypes.

Species	Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	% of variation	$\Phi_{ST}$	P value
<i>Argis lar</i>	Among populations	4	1.920	0.00076	0.16	0.00164	0.45000
	Within populations	95	44.150	0.46474	99.84		
	Total	99	46.070	0.46550			
<i>Argis toyamaensis</i>	Among populations	4	5.550	0.04274	7.43	0.07429	< 0.01
	Within populations	95	50.600	0.53263	92.57		
	Total	99	56.150	0.57537			

*Argis lar* (Lineage A)



*Argis toyamaensis*

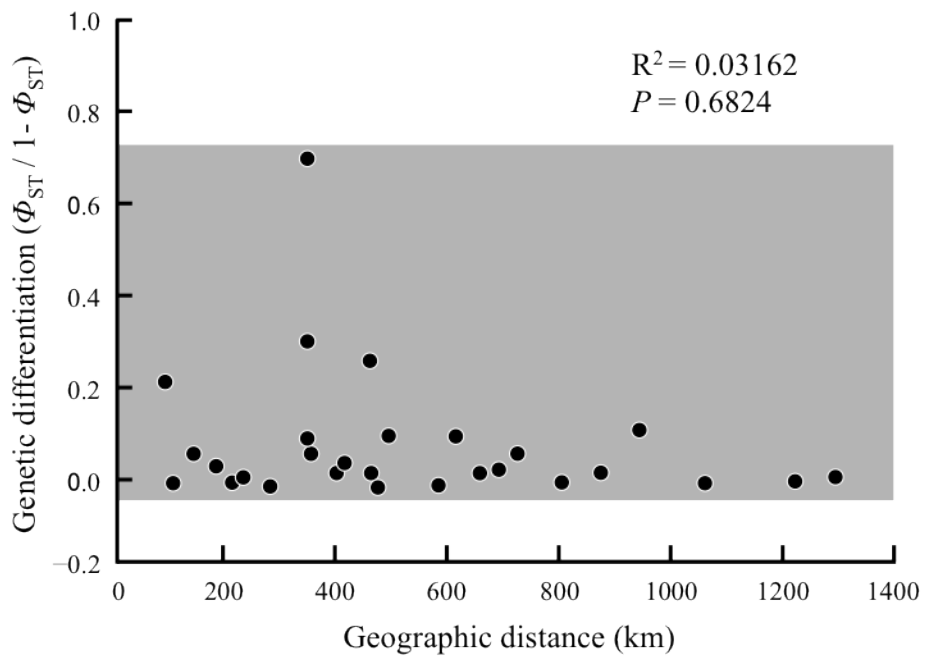


Fig. 6-5. Correlations between pairwise genetic differentiation and geographic distance (isolation by distance, IBD) for each species. Shaded regions indicate the scatter of the data points.

## 6.4 考察

海洋生態系に生きる生物は、一般的に卵サイズを小さくして卵数、すなわち産出する稚仔の数を増やし、高い初期死亡率（初期減耗）でも再生産まで生き残ることができる確率を上げるように適応している（星野 & 西村 2001）。日本海において、対馬海流が影響を及ぼすのは最大で水深 200m 程度であり（気象庁：

[http://www.data.jma.go.jp/gmd/kaiyou/data/db/maizuru/knowledge/tsushima\\_current.html](http://www.data.jma.go.jp/gmd/kaiyou/data/db/maizuru/knowledge/tsushima_current.html)）、クロザコエビの分布水深下限の水深 250 m は、対馬海流の影響する水深よりもやや深く、クロザコエビは海流の影響を直接受ける水深帯には分布していないことが分かる（氏 1994; 沢田 1994）。ところが、第 5 章の結果から明らかなように、クロザコエビの遺伝的組成は、日本列島を流れる海流構造と対応関係にあり、おそらく分散性の高い幼生期に海流に乗って分布を広げる傾向があると推察される。それに対して、より深い海域（水深 250 ~1250 m）に分布するトゲザコエビは、卵サイズが相対的に大きく、大卵少産型を示す（氏 1994; 沢田 1994）（Fig. 6-1）。したがって、ヌマエビ類に見られる生活史戦略を当てはめると、クロザコエビは分散性が高く、トゲザコエビは分散性が低いことが推測される（第 4 章 参照）。また、クロザコエビはオホーツク海や太平洋側にまで分布が広がるのに対して、トゲザコエビは日本海固有種であるため、分布の広さからも分散性の差異が推察される。

本研究では、クロザコエビは星状型のハプロタイプネットワークを呈するのに対し、トゲザコエビは系統間を介在する仮想ハプロタイプが多いボトルネック型を呈した（Fig. 6-3）。また、トゲザコエビでは集団間に統計的に有意な遺伝的分化が認められ（Table 6-2, 6-3）、黄色で示したハプロタイプが北海道沖に集中するなど（Fig. 6-4）、クロザコエビに比べて分散が制限されている様子が確認された。IBD の分析結果によると、両種とも地理的距離と遺伝的距離に相関関係は見られなかったが、トゲザコエビの方が縦軸（遺伝的分化）の幅が広いグラフとなった（Fig. 6-5）。IBD では、グラフ縦軸の幅が広い種は、遺伝子流動より

も遺伝的浮動が優占していることを示している (Hutchison & Templeton 1999)。すなわち、トゲザコエビは、クロザコエビよりも分散性が低いことがこの結果からも推察される。

クロザコエビ (水深 200~250 m) とトゲザコエビ (水深 250~1250 m) は、日本海において分布水深が異なるため、各水深帯での流速が種の分散に影響している可能性は否定できない。日本海における流速データは断片的であるが、対馬周辺海域の表層部は、対馬暖流の影響により 0~60 cm/s 以上と様々な流速を示すのに対し、水深 137 m の地点では 10~30 cm/s (伊藤ら 2008)、水深 1000 m 以上の日本海深海底では最大 10 cm/s 程度である (金ら 2002; 福島 2007)。このように、流速は水深とともに減少することから、遺伝的分析結果に反映された種の分散性は、卵サイズと分布水深帯の両方の要因が働いていることが推察される。

本研究のトゲザコエビでは、日本海において明瞭な遺伝的分化は検出されなかった。トゲザコエビと同様に水深 200 m 以深に分布し、完全な直達発生種として知られるツバイ *Buccinum tsubai* は、日本海内で大きな系統に分かれる。一方、日本海に生息しツバイと同じ直達発生種であるチジミエゾボラ *Neptunea constricta* は海域間で有意な遺伝的分化を示すが、系統樹上では明瞭なクレードに分かれない (Iguchi et al. 2007)。このようなツバイとチジミエゾボラの違いは、種間で異なる時期に日本海に分布を拡大したことが原因と考えられている。すなわち、ツバイは、約 500 万年前の鮮新世の地層から日本海で見つかるのに対し、チジミエゾボラは見つからない (Amano 1997; Amano et al. 2001)。このことは、ツバイはチジミエゾボラよりも以前から日本海に生息していた可能性を示唆している。したがって、ツバイは古くから日本海に分布し、直達発生であることもあいまって、系統樹上で明瞭なクレードに分かれるが、チジミエゾボラは日本海に分布を拡大してから時間が十分に経っていないために、系統樹上の明瞭なクレードは検出されなかったと考えられている (井口 2008)。



クロザコエビ類については、前章で COI 遺伝子による分岐年代を推定した。前章では、トゲザコエビと *Argis dentata*、オホーツク海固有種トゲクロザコエビ *Argis ochotensis* の形態が似ており姉妹種と推定した (*Argis dentata* 種群) が、本研究ではトゲザコエビと *A. dentata* しか採集できていないため、系統関係や分岐年代の詳細は不明である。しかし、トゲザコエビと *A. dentata* 間の分岐が約 200 万年前と推定されているため、*Argis dentata* 種群がオホーツク海から日本海に分布を広げたのは、ツバイの化石記録よりも後の更新世に入ってからと推定される。したがって、トゲザコエビは、チジミエゾボラ同様に、日本海に分布を拡大してから十分な時間が経っておらず、系統樹上で明瞭なクレードに分かれにくいのかもかもしれない。

海洋生物では、稚仔にとって餌生物の少ない厳しい環境に生息する種ほど、卵サイズは大きくなる傾向がある。例えば、巻貝や多毛類などの海産底生無脊椎動物では、大卵直達発生種の割合が、一次生産量の低い高緯度地域ほど高い傾向を示す (Thorson 1950)。同様の傾向は同一種内の地域間変異パターンでも認められており、河川や湖沼に生息するテナガエビは、餌資源の少ない閉鎖された湖沼に生息する個体群の方が、餌の豊富な河口域に生息する個体群に比べて卵サイズが大きい (Mashiko 1982)。トゲザコエビは、低温で太陽光が全く届かないために一次生産量がほとんど無く、沈降有機物に依存する深海性の底生無脊椎動物である。深海環境では餌生物が極端に少ないため、トゲザコエビは卵サイズを大型にすることで飢餓耐性を高める繁殖戦略をとっていることが考えられる。

日本海は、ユーラシア大陸東部の末端に位置する縁海で、4つの浅い海峡 (間宮海峡 : 15 m、宗谷海峡 : 55 m、津軽海峡 : 130 m、対馬海峡 : 130 m) に囲まれている (Tyler 2002)。今から約 1 万年前まで続いた最終氷期 (last glacial maximum: LGM) には、海面が 100 m 以上上がり、日本海は周辺海域からほぼ完全に孤立していた。隔離された日本海は、大陸から大量に流入する河川水により表層が低塩分化し、それによって塩分躍層が発達して水塊の

鉛直混合が不十分となり、深層部は有機物の分解により貧酸素状態となった (Nishimura 1965a–1969; Okiyama 2004; Itaki et al. 2004; Itaki 2016)。したがって、日本海の深層部に生息していた動物群集の多くが絶滅あるいは避難場所 (レフュジア) に退避していたと考えられている (Kojima et al. 2001)。トゲザコエビは、最終氷期に餌環境が悪化した日本海深層部に適応するべく、飢餓耐性の高い大型の稚仔を産出するように進化し、現在観察される大卵少産型の繁殖生態はその結果と理解することもできる。実際、日本海を中心に分布するクロザコエビ系統Aのハプロタイプネットワークは、過去の個体数減少を示す星状型であるが、トゲザコエビはボトルネック型のハプロタイプネットワークを示しており、より深層に分布する種の方が強く氷期の環境変動の影響を受けていることを示唆している。

日本海は、全海洋の体積の 0.13 % と小さな縁海で、表層と深層間の海水循環に全海洋では 1000~2000 年を要するが、日本海は 100~200 年程度である。したがって、日本海は、現在の地球環境の変化が全海洋に先駆けて鋭敏に現われると考えられており、世界的にも注視されている (蒲生 2016)。近年、日本海底層水の溶存酸素濃度が過去 30 年間に 10 パーセント減少したことが判明した (Gamo et al. 2014)。これは、日本海の熱塩循環が、地球温暖化の影響で規模を縮小していることが原因と考えられている。地球温暖化に代表される地球規模の気候変動は、日本海の深層にまで影響を及ぼし、特に分散性の乏しい底生無脊椎動物には影響が大きいと考えられる。近年、日本海底生生物の生物多様性に関する知見が蓄積されつつあるが (Iguchi et al. 2007; Kojima et al. 2011; Sakuma et al. 2014 など)、固着性の強い底生無脊椎動物を扱った研究例は少ない。底生無脊椎動物も含めた包括的な日本海深層部の生物多様性保全を考えていく必要がある。

## 第7章 総合考察

遺伝的多様性は、狭義では地域集団内の遺伝的多様度として計算されるもので、変化し続ける環境に集団が適応していくために必要な評価である。例えば、工業汚染を受けた地域において、およそ 200 種のカで工業暗化が進化した (Kettlewell 1973)。同様に、多数の害虫で、殺虫剤や除草剤、抗生物質などに対する抵抗性が進化した (Georghiou 1986; McKenzie 1996)。これらの例は、高い遺伝的多様度を有する集団は、環境の変化にうまく応答して適応進化することができるが、遺伝的多様度が低い集団では短期的な進化は起こらないことを示している。一方、遺伝的多様性は、集団の遺伝的独立性や集団間の遺伝子流動が強く影響するため、対象生物の分散性を考慮して総合的に評価されなければならない。したがって、現在では、地域集団内の遺伝的多様度と、地域集団間の遺伝的分化の両方を遺伝的多様性として捉えられている (小池 & 松井 2003)。

本研究は、エビ類の生息環境を河川上流から深海底まで鉛直方向に捉え、卵サイズ変異を伴う生活史戦略と遺伝的多様性 (集団間の遺伝的分化および集団内の遺伝的多様度) との関係进行分析して、エビ類の生物多様性保全のための基礎的知見を整備することを目的とした。本研究の結果、エビ類の生息環境は、河川上流 - 下流 - 沿岸域 - 深海底と移行するにつれて、卵サイズ・卵数の関係は、大卵少産型 - 小卵多産型 - 大卵少産型と変化する傾向があり、それらは特有の遺伝的多様性の特徴と深く関係することが明らかとなった。第7章では、本研究で得られた知見をまとめたうえで、エビ類における遺伝的多様性の保全策について提言し、エビ類の多様性研究について今後の展望を述べる。

### 7.1 淡水性エビ類の遺伝的多様性

本研究では、河川上流に分布して大卵少産型を示す純淡水性種ミナミヌマエビ

*Neocaridina* sp.と、河川下流に分布して小卵多産型を示す両側回遊性種ミズレヌマエビ *Caridina leucosticta* の遺伝的特徴を比較し、両者の分散性や遺伝的多様度が極端に異なることを明らかにした（第2章）。この結果は、生活史の一部を海洋環境下で送る種は、海洋にて幼生が分散するため、地域集団の遺伝的分化は蓄積しにくく、異所的種分化による種多様性は生まれにくいだが、遺伝的多様度は高い状態で維持されやすく、集団として環境変化への抵抗力が高いことを示している。しかし、ミズレヌマエビは、同属の両側回遊性種であるトゲナシヌマエビ *Caridina typus* やヤマトヌマエビ *Caridina multidentata* と比べると、幼生が河口域周辺にとどまり幼生分散が抑制される傾向にあり、同じ両側回遊性種でも幼生期のわずかな生態特性の差で遺伝的特徴は異なることが明らかとなった（第4章）。したがって、両側回遊性種の遺伝的多様性保全には、幼生が健全に発育し、河川間を適切に分散して高い遺伝的多様度を維持できるように河口域の環境を保全していくことが重要と考えられる。また、種ごとに幼生期のマイクロハビタットや餌生物を特定し、幼生期の分散過程や遡上機構を解明することが、両側回遊性ヌマエビ類の遺伝的多様性を保全するためには必要と考えられる。

また、本研究では、ミナミヌマエビにおいて、同じ支流内でもハプロタイプの頻度が異なることから、分散性が著しく低いことが明らかとなった（第3章）。これは、下流方向には流下せず、基質につかまってその場に留まるか、上流方向に移動する行動特性（丹羽 & 横山 1997）を反映していると考えられる。Hughes (2007) は、分子マーカーを使って、河川内の分散性を分類群ごとに調べ、甲殻類は、低地で隆起の少ない地形であっても魚類や腹足類より地域集団間における遺伝的分化の程度が大きいことを示した。この結果は、分類群によって、種多様性の創出速度が異なることを表しており、純淡水性エビ類は集団が分化しやすく、それゆえ多様な種が生まれやすいことを示している。一方、集団内の遺伝的多様度は低下する傾向にあり、環境変化に適応しにくく集団が絶滅しやすいことを示唆している。し

たがって、純淡水性種の遺伝的多様性保全には、遺伝的に独立した地域集団を明らかにし、遺伝的多様度が下がらないように定期的にモニタリングしていく必要があると考えられる。一般的に、水圏生物の多様性研究は、魚類が主導する傾向があるが(宮 & 西田 2009 など)、特定の分類群に的を絞った保全策では、生態系全体を保全するという観点からは不十分である。今後は、陸水域に分布が限定される無脊椎動物でも、遺伝的多様性研究の進展が期待される。

## 7.2 海産エビ類の遺伝的多様性

本研究では、海産エビ類の比較対象として、クロザコエビ *Argis lar* とトゲザコエビ *Argis toyamaensis* を扱った。両種は、系統的に近縁で、日本海において分布が重なるため、卵サイズの変化がどの程度遺伝的多様性に影響するかを探るうえで優れた材料である。結果として、より浅い海域に分布する小卵多産型のクロザコエビより、深層に分布する大卵少産型のトゲザコエビの方が、分散性が乏しいことが分かった(第6章)。全体として、海産種では、浅海域と深海域に分布する種で分散に関わる生活史戦略が異なり、浅海性種は海流の影響を受けて分散しやすいが(第5章)、深海性種は分散しにくく、集団間の遺伝的分化が起こりやすいといえる(第6章)。ただし、純淡水性種と異なり、隣接する地域間に物理障壁はないため大卵少産型の種であっても地域間の移動が可能であり、遺伝的分化の程度は低く、遺伝的多様度は小卵多産型の種と比較してもほとんど変わらない結果になったと考えられる。

深海性エビ類の大卵化は、他海域でもこれまで報告されてきたが、遺伝的多様性との関係については研究例がない。本研究は、深海性エビ類の大卵化と遺伝的多様性との関係を探る初めての試みとなる。ただし、第6章でも考察したように、日本海の深層部は、最終氷期に貧酸素状態に陥ったため、全海洋の中では特殊な歴史を有している。分散性の高いクロザコエビにおいてもその影響は強く、ベーリング海やアラスカ湾の外海集団よりも、日本海集団

の方が遺伝的多様度は低い(第5章)。また、Tajima's  $D$  も有意に低い値を示したことから、過去の急激な個体数増加を経験していることが示唆された。したがって、今後は、開放的な太平洋や大西洋の外海深層域でもエビ類の大卵化と遺伝的多様性や集団の遺伝的分化との関係を調べ、これらの関係の普遍性を確認する必要がある。

### 7.3 エビ類の生活史進化と多様性創出機構

これまで述べてきたように、我が国の日本海側地域においては、河川中流から上流域にかけて大卵少産型の純淡水性種、河川下流域には小卵多産型の両側回遊性種のエビ類が分布し、海域では、沿岸域は小卵多産型、深海では大卵少産型のエビ類が分布している。卵サイズの差異は、産まれてくる稚仔の発育ステージに反映され、小さい卵からは発育段階があまり進んでいない小型の流れに弱い幼生が生まれ、大きい卵からは固着力のある発生の進んだ段階で産まれる。したがって、エビ類は、生息環境と卵サイズを密接に関連させて遺伝的分化が進んだことが推察される。

mtDNA 全塩基配列を比較した分子系統樹によると、エビ類は、海洋生活を起源として、テナガエビ科やヌマエビ科のグループが淡水環境に進出したことが分かる (Ivey & Santos 2007)。さらに、核 DNA 3 種類と mtDNA 2 種類を使ったテナガエビ類の大規模な分子系統解析 (Wowor et al. 2009) や、mtDNA 2 種類を使ったヌマエビ類の分子系統解析 (Page et al. 2008) は、小卵型の両側回遊性種から大卵型の純淡水性種への進化が、系統ごとに複数回起こったこと示している。一方、Ortmann (1895) は、エビジャコ科エビ類の分布様式を比較し、沿岸性の種から深海環境に適応した種が分化したことを推測した。実際、Yang et al. (2014) は、クルマエビ科サケエビ属の分子系統樹 (核 DNA 2 種類、mtDNA 2 種類) を作成し、沿岸性種の中から深海に適応した種が分化したことを明らかにした。このように、エビ類の進化の方向は、沿岸性で小卵多産型の種が起源となり、河川上流部や深海環境に進

出して、各生活圏で飢餓耐性を高めるために大卵化が進み、遺伝的分化が促進されたと考えられる。興味深いことに、テナガエビ *Macrobrachium nipponense* は、日本列島の閉鎖性内湾や湖沼に陸封化され、種内で大卵化が多所的に平行進化している（多所的平行進化説；益子 2001）。また、本論文の材料にもなっている両側回遊性のヌマエビ類は、日本本土、沖縄諸島、先島諸島の順に卵がわずかに大きくなる（諸喜田 1979）。したがって、エビ類にとって、卵サイズは環境に応じて変化しやすい適応形質なのかもしれない。今後は、エビ類の卵サイズ変異を生み出す遺伝子を特定し、遺伝子レベルで自然選択がどのように働くかを系統ごとに調べ、マクロな視点で遺伝的多様性を捉える研究をさらに押し進めて行く必要があると考える。

## 要約

エビ類は、節足動物門 甲殻亜門 軟甲綱 十脚目に属する産業上有用な無脊椎動物であり、陸水生態系から深海生態系まであらゆる水圏環境に生息している。エビ類は、それぞれの生活圏において異なる生活史戦略を有することが知られている。河川上流部に生息する純淡水性のエビ類は大卵少産型を示し、幼生期を卵内で過ごして、発育ステージの進んだ大型の幼生が産出される。また、河川下流部に分布することの多い両側回遊性のエビ類は、小卵多産型を示し、孵化した小型の幼生は川の流れによって海に流下して、幼生期を海洋環境で生活する。一方、海産エビ類においても卵サイズの差異が認められ、浅海性種は小卵多産型を、深海性種は大卵少産型を示す傾向が知られている。このように、エビ類では、分散性の差異を伴う生活史戦略が知られているにもかかわらず、エビ類の遺伝的集団構造を川から海までの生活史戦略という観点から調べた研究は極めて限られている。そこで、本研究では、エビ類の生息環境を河川上流から深海まで垂直方向に捉えて、各生活圏におけるエビ類の生活史戦略と遺伝的集団構造の関係を明らかにすることを目的とした。本研究では、淡水エビ類としてヌマエビ科エビ類を、海産エビ類としてエビジャコ科クロザコエビ属エビ類をモデルとした。これらのエビ類は、各生活圏で個体数が多く、分布域が重なるため、同所的に採集することで厳密な比較が可能となる。また、系統的に近縁であるため、分子マーカーの進化速度の差異が反映されにくい。したがって、遺伝的集団構造を比較するうえで優れたモデルといえる。

### 純淡水性種 ミナミヌマエビ と

#### 両側回遊性種 ミゾレヌマエビ における 遺伝的集団構造の比較

ミトコンドリア DNA (mtDNA) の NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) 遺伝子と



ND5 遺伝子 (合計 744 bp) をもとに分子系統樹を推定したところ、大卵少産型で純淡水性を示すミナミヌマエビ *Neocaridina* sp. は、各河川から得られた個体が地域的にまとまったクレードを形成する傾向が示されたのに対し、小卵多産型で両側回遊性を示すミゾレヌマエビ *Caridina leucosticta* は、系統樹上で河川ごとにまとまらない結果となった。この結果は、遺伝的分化指数  $\Phi_{ST}$  において明確に示され、ミナミヌマエビでは  $\Phi_{ST} = 0.884$  ( $P < 0.001$ )、ミゾレヌマエビでは  $\Phi_{ST} = 0.021$  ( $P > 0.05$ ) となった。遺伝的多様度は、ミナミヌマエビで低く (ハプロタイプ多様度  $h = 0.00 \sim 0.75$ 、塩基多様度  $\pi = 0.00 \sim 2.85\%$ )、ミゾレヌマエビで高い傾向が明らかとなった ( $h = 0.83 \sim 0.93$ 、 $\pi = 0.33 \sim 0.48\%$ )。これらの違いは、ミゾレヌマエビが幼生期に海洋を分散し、河川間を遺伝的に交流していることによると考えられる。すなわち、本研究により、陸水域で生活するヌマエビ類において、幼生期の海洋生活の有無が遺伝的分化や遺伝的多様性に大きな影響を与えることが明らかになった。

## 純淡水性種ミナミヌマエビにおける河川内分散性の評価

### ～由良川の大規模な河川争奪との関係～

上記の結果より、ミナミヌマエビは、河川内においても分散性が乏しいことが推測される。そこで、京都府北部を流れる由良川をフィールドとして、上記と同じ分子マーカーを用い、由良川の支流とその周辺河川からミナミヌマエビを採集して遺伝的組成を調査した。その結果、由良川のミナミヌマエビは、大きく 2 つの系統に分かれることが明らかとなった。由良川の下流部は、日本海側に注ぐ他の河川と同じ系統を示すのに対し、由良川の中流から上流部に生息するミナミヌマエビは、瀬戸内海側に注ぐ河川と同じ系統を示した。これは、由良川の中流から上流部が、今から約 8～20 万年前まで瀬戸内海に流れていたという地史と対応している。さらに、その時代の分水界が、現在のミナミヌマエビの日本海型-瀬戸内海型の境界線と一致する結果となった。したがって、由良川上流部が日本海に方向を転じて 8～

20 万年もの間、ミナミヌマエビは由良川内の支流間をほとんど分散していない可能性が示唆された。

### 両側回遊性ヌマエビ類 3 種における幼生の河川内分散の比較

両側回遊性種であるミゾレヌマエビは、他の両側回遊性ヌマエビ類に比べて幼生期が短く、分布が広域に広がりにくいなど、河川間の幼生分散が制限されていることを示唆する生態的知見が示されている。そこで、両側回遊性種でも種によって幼生分散が異なることを明らかにすることを目的として、両側回遊性のミゾレヌマエビ、トゲナシヌマエビ *Caridina typus*、ヤマトヌマエビ *Caridina multidentata* を対象に、種間の遺伝的多様性を比較した。南西諸島から日本本土まで同じ河川から 3 種 20 個体ずつ採集し、mtDNA Cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) 遺伝子 (571 bp) により分析した結果、ミゾレヌマエビでは南西諸島において出現する系統の頻度が不均一であるのに対し、トゲナシヌマエビでは系統の頻度が南西諸島から日本本土まで均一であった。 $\Phi_{ST}$  値においても幼生分散の程度に種間差があることが明らかになった (ミゾレ:  $\Phi_{ST} = 0.333 [P < 0.001]$ 、トゲナシ:  $\Phi_{ST} = 0.019 [P > 0.05]$ 、ヤマト:  $\Phi_{ST} = 0.003 [P > 0.05]$ )。また、本研究は、幼生分散の遺伝的評価が、幼生期の長さ、幼生の発育に必要な塩分、地理的分布の広がりと密接に関連することを示した。

### クロザコエビ属エビ類の系統地理

日本海の深部に分布するクロザコエビ *Argis lar* (水深 200~250 m) とトゲザコエビ *Argis toyamaensis* (水深 250~1250 m) は、水深帯を分かちように棲み分けており、体サイズが同程度であるにもかかわらず、卵サイズと卵数に違いが見られる (クロザコ: 平均  $1.5 \times 1.2$  mm・1575 個、トゲザコ:  $2.2 \times 2.0$  mm・124 個)。トゲザコエビは日本海固有種であるが、クロザコエビは、オホーツク海や道東沖、ベーリング海やアラスカ湾にまで分布する

ことが知られている。そこで、本研究では、クロザコエビを、分布を網羅するように広域から採集し、mtDNA COI 遺伝子 (571 bp) により遺伝的組成を調査した。その結果、形態でクロザコエビと識別した個体は、概ね各海域と対応した3つの系統(系統A: 日本海、系統B: 太平洋西部海域、系統C: ベーリング海・アラスカ湾)に遺伝的に分かれることが明らかとなった。このうち、日本列島周辺海域においては、系統Aと系統Bの地理的組成が海流構造と対応しており(系統A-対馬海流と津軽海流、系統B-親潮)、日本列島周辺海域におけるクロザコエビの分布は海流の影響を受けることが示唆された。このことは、クロザコエビが、より海流の影響を受けやすい浅い水深帯に分布し、トゲザコエビと比べて卵サイズが小さく、個体発生初期における幼生期の分散性が高いという予測と一致する結果となった。

#### クロザコエビとトゲザコエビの生態特性と遺伝的多様性の比較

日本海の複数地点からクロザコエビとトゲザコエビを同所的に採集し、DNA 変異量の多い mtDNA Control Region (552 bp) をもとに海域間の分散性を評価したところ、クロザコエビは日本海内部では遺伝的分化が認められないのに対し、トゲザコエビは統計的に有意な遺伝的分化が検出された(クロザコ:  $\Phi_{ST} = 0.0016$  [ $P > 0.05$ ]、トゲザコ:  $\Phi_{ST} = 0.0743$  [ $P < 0.01$ ])。したがって、トゲザコエビは卵を大型にすることによって、より分散性の低い発生ステージの進んだ段階で稚仔を産出することが示唆された。トゲザコエビは、低温で太陽光が全く届かないために一次生産量がほとんど無く、沈降有機物に依存する深海性の底生無脊椎動物である。深海環境では餌生物が極端に少ないため、トゲザコエビは卵サイズを大型にすることで生活史初期の飢餓耐性を高める繁殖・生き残り戦略をとっていることが考えられる。一方、遺伝的多様度については、種間で明確な差がないことから(クロザコ:  $h = 0.28 \sim 0.76$ 、 $\pi = 0.072 \sim 0.214\%$ 、トゲザコ:  $h = 0.37 \sim 0.68$ 、 $\pi = 0.073 \sim 0.245\%$ )、海

産エビ類の遺伝的多様度の傾向は、ヌマエビ類ほど顕著な差にはならないことが示唆された。

## 総合考察

本研究により、エビ類の生息環境は、河川上流 - 下流 - 沿岸域 - 深海底と移行するにつれて、卵サイズ・卵数の関係は、大卵少産型 - 小卵多産型 - 大卵少産型と変化する傾向があり、それらは遺伝的集団構造の特徴と深く関係することが明らかとなった。今後は、エビ類の卵サイズ変異を生み出す遺伝子を特定し、遺伝子レベルで自然選択がどのように働くかを系統ごとに調べ、マクロな視点で遺伝的多様性を捉える研究をさらに押し進めて行く必要があると考える。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なるご指導と論文校閲の労を頂いた京都大学フィールド科学教育研究センター教授 山下洋博士ならびに同助教 甲斐嘉晃博士に深甚なる感謝の意を表します。また、本論文のご校閲をいただき、貴重なご意見を賜った同教授 朝倉彰博士ならびに荒井修亮博士に厚くお礼申し上げます。京都大学フィールド科学教育研究センター助教 中山耕至博士には、本研究の開始にあたり、研究に関する貴重なご意見を賜り、遺伝子解析の実験操作についてもご指導ご鞭撻をいただきました。厚くお礼申し上げます。

元京都大学フィールド科学教育研究センター助教 上野正博博士、元京都大学大学院農学研究科大学院生 八谷三和博士（現東北区水産研究所）には、本研究の開始にあたり、ヌマエビ類の生態や分類についてご指導賜り、本論文をまとめるにあたり有益なご助言をいただきました。心よりお礼申し上げます。沖縄工業高等専門学校生物資源工学科助教 井口亮博士には、南西諸島でのヌマエビ類採集にご協力いただき、その後は論文執筆についてご指導を賜りました。ここに厚くお礼申し上げます。

元東京大学大気海洋研究所博士研究員 錢本慧博士には、黒潮の蛇行期と非蛇行期におけるヌマエビ類の採集地点間距離を計算していただきました。厚くお礼申し上げます。

元京都府立福知山高等学校教諭 小滝篤夫博士には、由良川を含む京都府北部地域の地史について、貴重なご意見を賜りました。厚くお礼申し上げます。

琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設教授 酒井一彦博士、同センター西表研究施設准教授 成瀬貫博士、沖縄県立芸術大学准教授 藤田喜久博士には、南西諸島におけるヌマエビ類採集において貴重なご意見を賜りました。岡山大学環境理工学部准教授 中田和義博士、元東京海洋大学博士研究員 故宇佐見葉博士、元帝京大学医療技術学部教授 益子計夫博士、京都大学フィールド科学教育研究センター助教 大和茂之博士、元奈良女子大学理学部教授 和田恵次博士には、ヌマエビ類の生態に関わる貴重な情報を賜りました。ここ

に厚くお礼申し上げます。

元京都大学大学院農学研究科大学院生 秋山諭博士、大畑亮輔博士、佐久間啓博士、鈴木健太郎博士、辻寛人氏、徳田光姿氏、鳥越賢氏、富士泰期博士、横田高士博士、渡辺謙太博士には、南西諸島から日本本土までのヌマエビ類の採集に、ご同行ご協力いただきました。深くお礼申し上げます。

元 National Oceanic Atmospheric Administration 博士研究員 David T Drumm 博士（現 EcoAnalysts, Inc.）、東北区水産研究所 伊藤正木博士、日本海区水産研究所 上田祐司博士、同研究所 藤原邦浩博士、北海道区水産研究所 山下夕帆博士には、クロザコエビ類の採集に多大なご協力をいただきました。福井県立大学海洋生物資源学部教授 富永修博士、京都大学大学院農学研究科助教 木下政人博士には、クロザコエビ類の遺伝子実験を手伝っていただきました。厚くお礼申し上げます。

京都大学フィールド科学教育研究センター准教授 益田玲爾博士、同助教 鈴木啓太博士、同特定助教 澤田英樹博士をはじめ、京都大学大学院農学研究科の皆様には、セミナーをはじめとした様々な場面で本論文をまとめるにあたり、有益なご助言を賜りました。厚くお礼申し上げます。

最後に、博士課程に進学する機会を与えてくださり、ありとあらゆる場面で私を温かく見守り続けてくれた両親、妻に心より感謝の意を記します。

## 引用文献

- Alberto F, Raimond PT, Reed DC, Watson JR, Siegel DA, Mitarai S, Coelho N, Serrao EA (2011) Isolation by oceanographic distance explains genetic structure for *Macrocystis pyrifera* in the Santa Barbara Channel. *Mol Ecol* 20: 2543–2554
- Amano K (1997) Biogeography of the genus *Neptunea* (Gastropoda: Buccinidae) from the Pliocene and the lower Pleistocene of the Japan Sea borderland. *Paleontol Res* 1: 274–284
- Amano K, Watanabe M (2001) Taxonomy and distribution of Plio-Pleistocene *Buccinum* (Gastropoda: Buccinidae) in northeast Japan. *Paleontol Res* 5: 215–226
- Asai T, Senou H, Hosoya K (2011) *Oryzias sakaizumi*, a new ricefish from northern Japan (Teleostei: Adrianichthyidae). *Ichthyol Explor Freshwaters* 22: 289–299
- Beebee TJC, Rowe G (2008) An introduction to molecular ecology, second edition. Oxford University Press, New York, NY
- Burridge CP, Craw D, Waters JM (2006) River capture, range expansion, and cladogenesis: the genetic signature of freshwater vicariance. *Evolution* 60: 1038–1049
- Cai Y, Ng PKL, Shokita S, Satake K (2006) On the species of Japanese atyid shrimps (Decapoda: Caridea) described by William Stimpson (1860). *J Crust Biol* 26: 392–419
- Clement M, Posada D, Crandall K (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1660
- Closs GP, Hicks AS, Jellyman PG (2013) Life histories of closely related amphidromous and non-migratory fish species: a trade-off between egg size and fecundity. *Freshw Biol* 58: 1162–1177

- Covich AP, Palmer MA, Crowl TA (1999) The role of benthic invertebrate species in freshwater ecosystems. *BioScience* 49: 119–127
- Craw D, Burrige C, Anderson L, Waters JM (2007) Late Quaternary river drainage and fish evolution, Southland, New Zealand. *Geomorphology* 84: 98–110
- Crowl TA, McDowell WH, Covich AP, Johnson SL (2001) Freshwater shrimp effects on detrital processing and nutrients in a tropical headwater stream. *Ecology* 82: 775–783
- Dawson MN, Louie KD, Barlow M, Jacobs DK, Swift CC (2002) Comparative phylogeography of sympatric sister species, *Clevelandia ios* and *Eucyclogobius newberryi* (Teleostei, Gobiidae), across the California Transition Zone. *Mol Ecol* 11: 1065–1075
- Dawson MN, Hays CG, Grosberg RK, Raimondi PT (2014) Dispersal potential and population genetic structure in the marine intertidal of the eastern North Pacific. *Ecol Monogr* 84: 435–456
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 29: 1969–1973
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite version 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10: 564–567
- 後藤晃 (1981) 淡水カジカの生活史の適応と進化. *生物科学* 33: 129–136
- 藤倉克則, 奥谷喬司, 丸山正 (2008) 潜水調査船の観た深海生物 : 深海生物研究の現在. 東海大学出版会, 神奈川



- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz RA, Vrijenhoek CR (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3: 294–299
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2010) *Introduction to Conservation Genetics*, second edition. Cambridge University Press, UK, pp. 1–18
- 福島繁樹 (2007) 日本海深海底付近の平均流. (2007) *海洋情報部技報* 25: 122–126
- 福間敏夫, 佐野正人, 三田村宗樹, 戸田茂, 宇田英雄 (1996) 兵庫県氷上盆地における地下地質構造調査. *応用地質* 37: 48–56
- Gamo T, Nozaki Y, Sakai H, Nakai T, Tsubota H (1986) Spatial and temporal variations of water characteristics in the Japan Sea bottom layer. *J Mar Res* 44: 781–793
- Gamo T, Nakayama N, Takahata N, Sano Y, Zhang J, Yamazaki E, Taniyasu S, Yamashita N (2014) The Sea of Japan and its unique chemistry revealed by time-series observations over the Last 30 Years. *Monogr Environ Earth Planets* 2: 1–22
- 蒲生俊敬 (2016) *日本海 その深層で起こっていること*. 講談社, 東京
- Georghiou GP (1986) The magnitude of the resistance problem. In “Pesticide resistance: strategies and tactics for management” National Academy Press, Washington DC, pp. 14–43
- 浜野龍夫, 林健一 (1992) 徳島県志和岐川に遡上するヤマトヌマエビの生態. *Res Crust* 21: 1–13
- 浜野龍夫, 鎌田正幸, 田辺力 (2000) 徳島県における淡水産十脚甲殻類の分布と保全. *徳島県立博物館研究報告* 10: 1–47

- Hall TA (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95–98
- 服部保 (2002) 照葉樹林の植物地理から森林保全を考える. 保全と復元の生物学 野生生物を救う科学的思考. (矢原徹一, 川窪伸光 編) 文一総合出版, 東京, pp. 203–222
- Hayashi K, Hamano T (1984) The complete larval development of *Caridina japonica* De Man (Decapoda, Caridea, Atyidae) reared in the laboratory. *Zool Sci* 1: 571–589
- 林勇夫 (2006) 水産無脊椎動物学入門. 恒星社恒星閣, 東京, pp 1–3
- 林健一 (2007) 日本産エビ類の分類と生態Ⅱ. コエビ下目(1). 生物研究社, 東京, pp. 114–172
- 林健一 (2011) 世界の淡水甲殻十脚類. エビ・カニ・ザリガニ 淡水甲殻類の保全と生物学. (川井唯史, 中田和義 編) 生物研究者, 東京, pp. 8–38
- Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc B* 270: S96–S99
- Hirase S, Ikeda M, Kanno M, Kijima A (2012) Phylogeography of the intertidal goby *Chaenogobius annularis* associated with paleoenvironmental changes around the Japanese Archipelago. *Mar Ecol Prog Ser* 450: 167–179
- 星野昇, 西村欣也 (2001) 水圏生物種に共通の一般原則: モデルで考える. 水生動物の卵サイズ 生活史の変異・種分化の生物学. (後藤晃, 井口恵一郎 編) 回遊舎, 東京, pp. 103–128
- 堀公俊 (2000) 日本の分水嶺 地図で旅する列島縦断 6000 キロ. 山と溪谷社, 東京, pp. 181–183

- Hughes JM (2007) Constraints on recovery: using molecular methods to study connectivity of aquatic biota in rivers and streams. *Freshw Biol* 52: 616–631
- Hurwood DA, Hughes JM (2001) Nested clade analysis of the freshwater shrimp, *Caridina zebra* (Decapoda: Atyidae), from north-eastern Australia. *Mol Ecol* 10: 113–125
- Hutchison DW, Templeton AR (1999) Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* 53: 1898–1914
- Huybers P (2007) Glacial variability over the last two million years: an extended depth-derived age model, continuous obliquity pacing, and the Pleistocene progression. *Quaternary Sci Rev* 26: 37–55
- Ideguchi K, Shibata Y, Kikkawa T (2000) Larval distribution of amphidromous atyid shrimps (Decapoda: Caridea: Atyidae) in the estuary of the Yukinoura River, Japan. *Trans Nagasaki Biol Soc* 51: 5–13
- Iguchi A, Takai S, Ueno M, Maeda T, Minami T, Hayashi I (2007) Comparative analysis on the genetic population structures of the deep-sea whelks *Buccinum tsubai* and *Neptunea constricta* in the Sea of Japan. *Mar Biol* 151: 31–39
- 井口亮 (2008) 日本周辺に生息する深海性腹足類エゾバイ・エゾボラ属の遺伝的な種内分化と種間関係に関する研究 (日本海を中心に). *海洋と生物* 178: 676–684
- 井鷲裕司 (2012) 遺伝的変異と空間的遺伝構造. エコゲノミクス -遺伝子からみた適応-. (森長真一, 工藤洋 編) 共立出版, 東京, pp. 11–35
- 石川県水産試験場 (1991) 平成2年水産生物生態調査報告書 *Argis*属 (クロザコエビ属) 等深海性エビ類の漁業生物学的調査. 石川水試資料 174, pp. 1–18

- 石川県水産試験場 (1992) 平成 3 年水産生物生態調査報告書 Argis 属 (クロザコエビ属) 等  
深海性エビ類の漁業生物学的調査. 石川水試資料 180, pp. 1-37
- 石川県水産試験場 (1993) 平成 4 年水産生物生態調査報告書 Argis 属 (クロザコエビ属) 等  
深海性エビ類の漁業生物学的調査. 石川水試資料 187, pp. 1-42
- Itaki T, Ikehara K, Motoyama I, Hasegawa S (2004) Abrupt ventilation changes in the  
Japan Sea over the last 30 ky: evidence from deep-dwelling radiolarians.  
*Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 208: 263-278
- Itaki T (2016) Transitional changes in microfossil assemblages in the Japan Sea from  
the Late Pliocene to Early Pleistocene related to global climatic and local tectonic  
events. *Prog Earth Planet Sci* 3: 1-21
- 伊藤靖, 松本卓也, 押谷美由紀 (2008) 対馬および日本海西部における水質・流況の現地観  
測. 調査研究論文集 (漁業魚場漁村技術研究所) 20: 77-82
- 岩田明久 (2006) 亀岡の淡水魚 —魚類層の特徴とその成り立ち—. 亀岡の自然 2: 12-19
- Ivey JL, Santos SR (2007) The complete mitochondrial genome of the Hawaiian  
anchialine shrimp *Halocaridina rubra* Holthuis, 1963 (Crustacea: Decapoda:  
Atyidae). *Gene* 394: 35-44
- 加藤茂弘, 山下透, 檀原徹 (2006) 近畿地方北部の中部更新統・福知山層のテフラの対比.  
人と自然 16: 35-42
- 加藤茂弘, 田中義文, 大嶋秀明, 林成多 (2007) 近畿地方北部、福知山盆地における中部更  
新統・福知山層上部層堆積期の古環境. 人と自然 17: 19-34
- 上治寅次郎 (1927) 丹波胡麻郷附近分水界の地貌. 地理教育 5: 435-439
- Kettlewell HBD (1973) The evolution of melanism. Clarendon Press, Oxford, UK
- 河原信之 (2006) 胡麻高原の谷中分水界と大堰川流域. 丹波 8: 86-98

- Kim HS (1977) *Macrura*. Illustrated flora and fauna of Korea 19. Samhwa Publishing Company, Seoul. (In Korean with English species catalogue)
- 君塚芳輝 (1987) シマドジョウ類 –核学的種族の動物地理. 日本の淡水魚類 その分布、変異、種分化をめぐって. (水野信彦・後藤晃 編) 東海大学出版会, 東京, pp. 61–70
- 金慶烈, 金丘, 姜東鎮, Yuri Nikolaevich Volkov, 尹宗煥, 竹松正樹 (2002) CREAMS で見た変化する東海/日本海. 海の研究 11: 419–429
- King MG, Butler (1985) Relationship of life-history patterns to depth in deep-water caridean shrimps (Crustacea: Natantia). *Mar Biol* 86: 129–138
- Kitanishi S, Hayakawa A, Takamura K, Nakajima J, Kawaguchi Y, Onikura N, Mukai T (2016) Phylogeography of *Opsariichthys platypus* in Japan based on mitochondrial DNA sequences. *Ichthyol Res* 63: 506–518
- Kitazima J, Matsuda M, Mori S, Kokita T, Watanabe K (2015) Population structure and cryptic replacement of local populations in the endangered bitterling *Acheilognathus cyanostigma*. *Ichthyol Res* 62: 122–130
- Knowlton N, Weigt LA (1998) New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proc R Soc B* 265: 2257–2263
- 小橋拓司 (1985) 由良川中・下流域低地の古地理と地形環境. 立命館文學 483,484: 855–879
- 小池裕子, 松井正文 (2003) 保全遺伝学. 東京大学出版会, 東京, pp. 3–14
- Kojima S, Segawa R, Hayashi I, Okiyama M (2001) Phylogeography of a deep-sea demersal fish, *Bothrocara hollandi*, in the Japan Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 217: 135–143
- Kojima S, Maeda R, Sakuma K, Kokubu Y, Hagihara S, Itoh M (2011) Genetic

characterization of the northwestern Pacific population of a deep-sea demersal fish, *Bothrocara hollandi*. *Plankton Benthos Res* 6: 108–114

小島茂明 (2009) 日本沿岸における底生動物の分散と遺伝的分化. 海と生命 「海の生命観」を求めて. (塚本勝巳 編) 海洋生命系のダイナミクス⑤, 東海大学出版会, 神奈川, pp. 141–154

Komai T, Amaoka K (1992) Redescription of *Argis hozawai* (Yokoya, 1939) from Northern Japan (Crustacea, Decapoda, Crangonidae). *Proc Japan Soc Syst Zool* 48: 24–35

Komai T (1997) Revision of *Argis dentata* and related species (Decapoda: Caridea: Crangonidae), with description of a new species from the Okhotsk Sea. *J Crust Biol* 17: 135–161

小滝篤夫, 古山勝彦, 井上陽一 (2002) 京都府北部、福知山・綾部盆地の高位段丘層中の含カミングトン閃石火山灰層と大山最下部火山灰層との対比. *地球科学* 56: 35–48

久保三郎 (2007) 分水嶺の最低点. 日本列島中央分水嶺踏査報告書, 財団法人日本山岳会, 東京, pp. 119–121

Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452

Mashiko K (1982) Differences in both the egg size and the clutch size of the freshwater prawn *Palaemon paucidens* De Hann in the Sagami river. *Jpn J Ecol* 32: 445–451

益子計夫 (2001) 種多様性の起源: 淡水エビ類. 水生動物の卵サイズ 生活史の変異・種分化の生物学. (後藤晃, 井口恵一郎 編) 回遊舎, 東京, pp. 130–148

松浦啓一 (2012) 黒潮の魚たち. 東海大学出版会, 東京

McKenzie JA (1996) Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance.

Academic Press and R G Lands Co Austin TX

水野信彦 (1977) 兵庫県氷上郡の魚類調査報告. ひかみ 9: 87-104

水島敏博 (2008) 北海道近海におけるタラバエビ類の繁殖生態の特性 (総説). 北水試研報  
73: 1-8

水山高幸 (1961) 造盆地過程の研究 -上林川流域の地形-. 史想 11: 1-20

宮正樹, 西田睦 (2009) 魚類の大系統: ミトコンドリアゲノミクスによるアプローチ. 海洋生命系のダイナミクス① 海洋の生命史 生命は海でどう進化したか. (西田睦 編), 東海大学出版会, 神奈川, pp. 82-101

Moritz C (1995) Uses of molecular phylogenies for conservation. Phil Trans R Soc Lond B 349: 113-118

Morley SA, Belchier M, Dickson J, Mulvey T (2006) Reproductive strategies of sub-Antarctic lithodid crabs vary with habitat depth. Polar Biol 29: 581-584

向井貴彦 (2010) 比較系統地理学からみた琉球列島の淡水魚類相の成立. 淡水魚類地理の自然史. (渡辺勝敏, 高橋洋 編) 北海道大学出版会, 札幌, pp. 169-1183

中原泰彦, 荻原篤志, 三矢泰彦, 平山和次 (2005) ヌマエビ科両側回遊性エビ類 3種の幼生飼育に対する飼育餌料および塩分の影響. 水産増殖 53: 305-310

中原泰彦, 荻原篤志, 三矢泰彦, 平山和次 (2007) 両側回遊性ヒメヌマエビ属 3種のゾエア期幼生の発達. 長崎大学水産学部研究報告 88: 43-59

中野昌次 (1993) クロザコエビの抱卵親エビの養成とふ出、飼育結果について. 日本海ブロック試験研究集録 29: 77-91

Nishimura S (1965a) The zoological aspects of the Japan Sea Part I. Publ Seto Mar Biol Lab 13: 35-79

Nishimura S (1965b) The zoological aspects of the Japan Sea Part II. Publ Seto Mar Biol

Lab 13: 81–101

Nishimura S (1966) The zoological aspects of the Japan Sea Part III. Publ Seto Mar Biol

Lab 13: 365–384

Nishimura S (1968) The zoological aspects of the Japan Sea Part IV. Publ Seto Mar Biol

Lab 15: 329–352

Nishimura S (1969) The zoological aspects of the Japan Sea Part V. Publ Seto Mar Biol

Lab 17: 67–142

西村三郎 (1974) 日本海の成立 生物地理学からのアプローチ. 築地書館, 東京

丹羽信彰, 横山達也 (1997) トリパンプルーおよびトリパンレッド標識法によるミナミヌマエビの遡上生態の観察. 水産増殖 45: 437–443

丹羽信彰 (2001) ミナミヌマエビの個体群生態. 月刊海洋号外 26: 125–130

Niwa N, Ohtomi J, Ohtaka A, Gelder SR (2005) The first record of the ectosymbiotic branchiobdellidan *Holtodrilus truncatus* (Annelida, Clitellata) and on the freshwater shrimp *Neocaridina denticulata denticulata* (Caridea, Atyidae) in Japan.

Fish Sci 71: 685–687

大島正満 (1957) 櫻鱒と琵琶鱒. 楡書房, 札幌

大手桂二, 竹岡政治, 本城尚正, 妹尾俊夫, 水原邦夫, 日浦啓全 (1986) 由良川流域の森林を構成する植生の植物目録. 京都府立大学農学部演習林報告 30: 48–88

岡田篤正, 高橋健一 (1969) 由良川の大規模な流路変更. 地学雑誌 78: 19–37

Okiyama M (2004) Deepest demersal fish community in the Sea of Japan: A review.

Contr biol Lab Kyoto Univ 29: 409–429

Ortmann AE (1895) A study of the systematic and geographic distribution of the decapod family Crangonidae Bate. Acad Nat Sci 47: 173–197



- Page TJ, Hughes JM (2007a) Phylogeographic structure in an Australian freshwater shrimp largely pre-dates the geological origins of its landscape. *Heredity* 98: 222–231
- Page TJ, Hughes JM (2007b) Radically different scales of phylogeographic structuring within cryptic species of freshwater shrimp (Atyidae: *Caridina*). *Limnol Oceanogr* 52: 1055–1066
- Page TJ, Rintelen KV, Hughes JM (2007) Phylogenetic and biogeographic relationships of subterranean and surface genera of Australian Atyidae (Crustacea: Decapoda: Caridea) inferred with mitochondrial DNA. *Invert Systematics* 21: 137–145
- Page TJ, Cook BD, von Rintelen T, von Rintelen K, Hughes JM (2008) Evolutionary relationships of atyid shrimps imply both ancient Caribbean radiations and common marine dispersals. *J N Am Benthol Soc* 27: 68–83
- Posoda D, Crandall K (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Pringle CM, Blake GA, Covich AP, Buzby KM, Finley A (1993) Effects of omnivorous shrimp in a montane tropical stream: sediment removal, disturbance of sessile invertebrates and enhancement of understory algal biomass. *Oecologia* 93: 1–11
- Pullin AS (2002) *Conservation Biology*. Cambridge University Press, UK, pp. 3–18
- Qiu B, Imasato N (1990) A numerical study on the formation of the Kuroshio Counter Current and the Kuroshio Branchi Current in the East China Sea. *Cont Shelf Res* 2: 165–184
- 酒泉満 (1987) メダカの分子生物地理学. 日本の淡水魚類 その分布、変異、種分化をめぐって. (水野信彦・後藤晃 編) 東海大学出版会, 東京, pp. 81–90
- Sakuma K, Ueda Y, Hamatsu T, Kojima S (2014) Contrasting population histories of the

deep-sea demersal fish, *Lycodes matsubarai*, in the Sea of Japan and the Sea of Okhotsk. Zool Sci 31: 375–382

Salzburger W, Mack T, Verheyen E, Meyer A (2005) Out of Tanganyika: Genesis explosive speciation, key-innovations and phylogeography of the haplochromine cichlid fishes. BMC Evol Biol 5: 1–15

沢田浩二 (1994) 石川県沖合海域に生息するクロザコエビ属の生態について. 日本海ブロック試験研究集録 31: 57–67

柴田穰 (1976) 京都五億年の旅 地学団体研究会京都支部編. 法律文化社, 京都, pp. 120–126

柴田穰 (1990) 新京都五億年の旅 地学団体研究会京都支部編. 法律文化社, 京都, pp. 94–98

諸喜田茂充 (1979) 琉球列島の陸水エビ類の分布と種分化について -II-. 琉球大学理工学部 紀要 (理学篇) 28: 193–278

諸喜田茂充 (1981) ヌマエビ類の生活史. 海洋と生物 12: 15–23

諸喜田茂充 (2003) ヌマエビ科. 琉球列島の陸水生物. (西島信昇 監修, 西田睦, 鹿谷法一, 諸喜田茂充 編) 東海大学出版会, 神奈川, pp. 249–254

Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123: 585–595

武島弘彦 (2010) アユの遺伝的集団構造に残された謎. 淡水魚類地理の自然史. (渡辺勝敏, 高橋洋 編) 北海道大学出版会, 札幌, pp. 123–133

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 24: 1596–1599

- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725–2729
- Thorson G (1950) Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biol Rev* 25: 1–45
- Tominaga K, Nakajima J, Watanabe K (2016) Cryptic divergence and phylogeography of the pike gudgeon *Pseudogobio esocinus* (Teleostei: Cyprinidae): a comprehensive case of freshwater phylogeography in Japan. *Ichthyol Res* 63: 79–93
- Tyler PA (2002) Deep-sea eukaryote ecology of the semi-isolated basins off Japan. *J Oceanogr* 58: 333–341
- 氏良介 (1994) 山陰沖のクロザコエビ属の分布と生態について. 日本海ブロック試験研究集録 31: 75–79
- 山平寿智, 井上亜希子, 大石俊介, 井手口佳子 (2007) 両側回遊種ミズレヌマエビにおけるデモグラフィーの河川流程間変異. 日本ベントス学会誌 62: 9–16
- 安田徳一 (2007) 初歩からの集団遺伝学. 裳華房, 東京
- Yatsuya M, Ueno M, Yamashita Y (2012) Occurrence and distribution of freshwater shrimp in the Isazu and Yura Rivers, Kyoto, western Japan. *Plankton Benthos Res* 7: 175–187
- Yatsuya M, Ueno M, Yamashita Y (2013) Life history of the amphidromous shrimp *Caridina leucosticta* (Decapoda: Caridea: Atyidae) in the Isazu River, Japan. *J Crust Biol* 33: 488–502
- 山内一彦 (2002) 丹波高地西部、大堰川・由良川上流部における河川争奪とその原因. 立命館地理学 14: 17–35
- Yang CH, Sha Z, Chan TY, Liu R (2014) Molecular phylogeny of the deep-sea penaeid

shrimp genus *Parapenaeus* (Crustacea: Decapoda: Dendrobranchiata). *Zool Scr* 44: 312–323

Yu JN, Azuma N, Yoon M, Brykov, Urawa S, Nagata M, Jin DH, Abe S (2010) Population genetic structure and phylogeography of masu salmon (*Oncorhynchus masou masou*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Zool Sci* 27: 375–385

Vincenty T (1975) Direct and inverse solutions of geodesics on the ellipsoid with application of nested equations. *Surv Rev* 23: 88–93

鷲谷いづみ, 矢原徹一 (1996) 保全生態学入門 遺伝子から景観まで. 文一総合出版, 東京, pp. 129–194

White C, Selkoe KA, Watson J, Siegel DA, Zacherl DC, Toonen RJ (2010) Ocean currents help explain population genetic structure. *Proc R Soc B* 277: 1685–1694

Wowor D, Muthu V, Meier R, Balke M, Cai Y, Ng PKL (2009) Evolution of life history traits in Asian freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) based on multilocus molecular phylogenetic analysis. *Mol Phylogenet Evol* 52: 340–350