

博士論文

遺伝学的手法を用いた外来フジツボ、
アメリカフジツボおよびヨーロッパフジツボ
の分布拡大要因に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科
生圏システム学専攻 水域保全学研究室

藤木 宣成

2009

目次

第1章 序論	1-9
第2章 東京湾潮間帯におけるフジツボ類の分布	
2-1 緒言	10-11
2-2 方法	11-12
2-3 結果	13-14
2-4 考察	14-23
第3章 アメリカフジツボとヨーロッパフジツボの広域個体群間の遺伝的変異	
3-1 緒言	65-66
3-2 方法	66-72
3-3 結果	73-77
3-4 考察	77-83
第4章 アメリカフジツボとヨーロッパフジツボの狭域個体群間の遺伝的変異	
4-1 緒言	100-102
4-2 方法	102-112
4-3 結果	112-115
4-4 考察	115-117
第5章 総合考察	129-135
参考文献	136-148

第1章 序論

日本の海岸は1989年の時点において総延長は34,386kmである(磯辺, 1997)。

安全・防災面からすると、そのうち約半分の15,952kmが海岸侵食などに対する保全を必要とする海岸であり、9322kmには堤防や護岸などの海岸保全施設が設置されている(建設省, 1990; 磯辺, 1997)。都市部を中心とした海域の埋め立てが今後も続くと考えると、日本における自然海岸の割合は今後も減少していくものと考えられ、特に干潟や砂浜などの生物多様性が保持されている場所を人工海岸にすることで、日本における海岸生態系および沿岸部の水域環境が大きく変化する可能性が指摘されている(環境影響評価情報支援ネットワーク, 2001)。

東京湾を例にとると、戦後の高度成長期には大規模な埋め立て工事が湾全体で行われ、海岸の95%以上が人工海岸となり、神奈川県は海岸総延長が240kmに対して人工海岸は234km、東京都では海岸総延長が215kmに対して人工海岸は215km、千葉県では海岸総延長が232kmに対して人工海岸は214kmを占めている(一柳, 1989; 棚瀬, 1997)。そのほとんどが護岸や堤防、防波堤などのコンクリートを用いた傾斜および垂直な海岸である。そのため海岸生態系を構成する生物は、これらコンクリートなどの人工構造物を生息の場とする付着生物が主となっている(古瀬・風呂田, 1985)。

付着生物の中でも節足動物門甲殻綱蔓脚亜綱に属するフジツボ類は、沿岸生

態系を構成する代表的な付着生物であり(加戸, 1991)、海岸生態系の多様性保持の観点からも重要な役割を担っていることが報告されている(加戸, 2006b)。

フジツボの殻底構造はコンクリート護岸に用いられるセメントペーストの構造よりも緻密であることから、フジツボが付着をすることによって海中に含まれる塩化物イオンと酸素のコンクリート内部への拡散を抑制し、金属腐食速度が小さくなることで、海洋構造物の耐久性を向上される効果があることが報告されており(濱田ら, 2002)、フジツボ類の海洋構造物への付着は海洋構造物の耐久性向上技術の一つとして位置付けられている(坂井ら, 2002)。そのため、付着性二枚貝やゴカイ類、ヒモムシ類、小型甲殻類などの生息場として、付着基質の補強という点からも、海岸生態系を担う役割は大きいものと考えられている(加戸, 2006b)。

しかしながら、船体が付着をして船速や燃費の低下の原因となる(宮嶋, 1974)、発電所の冷却水取水管に付着をして換水効率を下げる(馬渡, 1974; 山下・神谷, 2006)、水産養殖施設に付着をして作業効率を低下させる(荒川, 1974)など、人間活動に対しても多大な悪影響を及ぼしているため「汚損生物」と位置付けられている(平野, 1974)。また、タテジマフジツボ (*Amphibalanus amphitrite*)、アメリカフジツボ (*Amphibalanus eburneus*)、ヨーロッパフジツボ (*Amphibalanus improvisus*)などの外来フジツボの日本への定着(山口, 1989;

山口, 2002; 岩崎ら, 2004)が在来生態系に影響を与えることが危惧されている(朝倉, 1992; 岩崎ら, 2004)。

外来生物は人間生活や在来の生態系に大きな影響を与えることが報告されており(鷲谷・森本, 1993)、海産付着生物についてはムラサキイガイ (*Mytilus galloprovincialis*)やミドリイガイ (*Perna viridis*)の発電所の排水管への付着被害(梶原, 1985; 有山, 1992; 坂口, 1996; 羽生・関口, 2000)やカワヒバリガイ (*Limnoperna fortunei*)の水路への付着被害が報告されている(Morton, 1975)。

アメリカフジツボ (*Amphibalanus eburneus*)およびヨーロッパフジツボ (*Amphibalanus improvisus*)はそれぞれ北アメリカ東岸とヨーロッパに起源を持つ外来フジツボである。これら2種の外来フジツボは、低塩分の環境下に生息する(Gordon, 1969; Bacon, 1971; Kennedy, 1983; Foster, 1987; Deneen and Hines, 1992; 山口, 2002)ため、在来付着生物の生息していない河口域を中心に分布しており、東京湾湾奥部では同じ外来種であるタテジマフジツボ (*Amphibalanus amphitrite*)や在来種のシロスジフジツボ (*Fistulobalanus albicostatus*)に次ぐ優占種となっている。また、佐渡の加茂湖ではタテジマフジツボ、シロスジフジツボに代わってアメリカフジツボとヨーロッパフジツボが付着生物群集中で優占した(新潟県観光課, 1969; 本間ら, 1974)との報告もある。東京湾(古瀬・風呂田, 1985; 東京都環境保全局, 1987; 朝倉, 1992; 梶原,

1994); 相模湾 (植田ら, 2008)、清水港 (小坂, 1979)、名古屋の藤前干潟 (西川, 1996)などで在来生態系への影響が指摘されている。

アメリカフジツボはアメリカ合衆国北部の東岸から南米北岸が原産地であり、ヨーロッパ沿岸、スエズ運河、黒海、カスピ海などに分布を拡大したとされている (山口, 2002)。日本への移入は 1950 年に神奈川県横須賀で採集された標本 (Henry and McLaughlin, 1975)が初記録であるとされている (岩崎ら, 2004)。1970 年代には太平洋側の港湾で広く分布が確認され (梶原, 1978)、1983 年までに北海道と沖縄を除く広い地域で確認された (小坂, 1985; 大谷, 2002; 山口, 2002)。現在の日本における分布の北限は青森県であり、南限は鹿児島県とされている (大谷, 2002; 岩崎ら, 2004)。

ヨーロッパフジツボはヨーロッパ大西洋岸の河口域が原産地とされる (山口, 1989)。19 世紀に北アメリカ東岸、北アメリカ西岸に分布を上げた後、地中海、黒海、カスピ海へも分布を拡大した。第二次世界大戦後には紅海やオーストラリア、ニュージーランドで確認された (小坂, 1985)。日本への移入は 1952 年に三重県英虞湾で馬渡らによって採集された標本が日本における最初の発見であったとされる (小坂, 1985; 山口, 1989)。現在では、太平洋側の広い範囲で分布が確認され、日本海側においても山形県、佐渡、若狭湾、宍道湖などで分布が確認されている (小坂, 1985; 山口, 1989; 大谷, 2002; 山口, 2002; 岩崎ら,

2004)。

2種の外来フジツボの日本への移入手段としては船体付着によるものと考えられているが(馬渡ら, 1968; 山口, 1989; 朝倉, 1992; 大谷, 2002)、カキ種苗の輸入に伴うものとする可能性も考えられており(内海, 1966)、移入手段は特定されていない。また、日本国内における分布拡大手段についても船体付着によるとされている(馬渡ら, 1968)が、フジツボ類は浮遊幼生期をもつことから、アメリカフジツボに関しては幼生分散を介した分布拡大も推測されている(内海, 1966)。

内湾をはじめ、海岸に生息する底生動物の多くの種は、その初期生活史において浮遊幼生期をもつことが知られており、その浮遊幼生期の期間は、種や水温・塩分などの要因によって多少異なるが、多くの種で数週間から1ヶ月におよぶとされている(風呂田, 2005)。この浮遊期間に幼生は生活基盤となっている海水の流れによって受動的に移送されやすく、結果的に誕生した場所から離れる(大垣, 2001)。幼生分散に関する研究は、北米カリフォルニア沿岸の海流と海岸生物の定着についての報告(Farrell, *et al.*, 1991; Wing, *et al.*, 1995)があり、カリフォルニアのモンレー湾周辺では、春から秋にかけて間欠的に強い北風が吹くことで沿岸表層の海水は沖に向かって移動する。そのため北風が吹く時には海岸生物の幼生が沖に分散して海岸に回帰できず、北風のない時に

は沿岸付近に留まることで着底が容易になると考えられる。カリフォルニアではフジツボ類 (*Balanus glandula*; Farrell, et al., 1991)やカニ類 (*Cancer magister*; Wing, et al., 1995)の幼生の回帰・着底が、北風が弱まる時期に活発になることが報告されている。また北米ロードアイランド州における幼生分散の研究では、湾内の海水交換が良好な時にはフジツボ (*Semibalanus balanoides*)幼生が湾外に流出してフジツボの底着が悪く、海水交換が悪いと、フジツボ幼生は湾内に留まり、着底密度が高くなると報告している (Graines and Bertness, 1992)。日本においても、岩手県で海水交換がチシマフジツボ (*Semibalanus cariosus*)幼生の分散に影響を与えることを示唆した報告が成されている (加戸, 2006b)ため、フジツボ幼生の分散には海水の移動が大きく影響してると考えられる。しかしながらヨーロッパフジツボに関しては、受動的な幼生分散をせずに孵化場所付近に留まるとする報告も成されている (Sheltema and Carlton, 1984)ため、2種の外来フジツボは受動的な幼生分散のみをの分布拡大の手段としているとは考え難い。

また、アメリカフジツボとヨーロッパフジツボは河口などの汽水域に生息場所が限定されている (山口, 2002)ため、個体群の維持機構や分布拡大の過程を解明するためには、幼生分散がどのようにおこなわれているかについて明らかにする必要があると考えられる。しかし現状では、幼生の発生段階の数が多く、

各発生段階の判定や種同定が困難であるなどの理由から、外来種の分布拡大を幼生分散の観点から検証することができない(加戸, 2006b)。そのため、近年では遺伝学的手法によって外来種の移入源の特定や、分布拡大パターンの推定や遺伝的交流の有無に関する研究が様々な種で行われている(向井, 2007)。

外来種の移入源や分布拡大経路を推定するために遺伝学的手法を用いた方法はいくつかの種で試みられている。アメリカ西岸に日本から移入したホソウミニナ(*Batillaria cumingi*)では集団遺伝構造を比較した結果、宮城県周辺から移植した養殖ガキに紛れ込んだホソウミニナが、現在アメリカ西岸に定着した個体群の源であると結論付けられている(三浦., 2007)。オセアニア原産で日本へ移入され、さらに日本から韓国、ヨーロッパへの二次拡散が示唆されているコウロエンカワヒバリガイ (*Xenostrobus securis*)の移入経路をアイソザイム分析によって推定した報告(木村, 2003)では、オーストラリアもしくはニュージーランドからの移入であると推定している。またオオクチバス (*Micropterus salmoides*)の移動分散経路の推定するために、各地域個体群のミトコンドリアDNAを比較した報告では、各地域ごとに構成ハプロタイプが異なり、各地域個体群は別の経路で移入されたことが推測されている(土田ら, 2007)。フジツボ類では在来個体群の遺伝的多様性を調べた研究があり、*Semibalanus balanoides*のマイクロサテライトマーカーを用いて地域個体群間の遺伝的構造を比較した

報告 (Dufresne, *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2007)、*Balanus glandura* のミトコンドリア DNA の COI 領域を用いて幼生分散と海流の関係について考察した報告 (Sotka *et al.*, 2004)、*Chthamalus montagui* 個体群の遺伝的構造を調べるためにマイクロサテライトマーカーを開発した報告 (Pannacciulli, *et al.*, 2005) などがある。

しかしながら日本におけるフジツボ類の集団遺伝構造に関する研究は少なく、アメリカフジツボとヨーロッパフジツボに関しては研究例がない。

本研究ではまず第 2 章で東京湾内のフジツボ類の分布を調べ、これら外来フジツボ 2 種の分布特性を明らかにすることを目的とした。次に第 3 章では日本における 2 種の外来フジツボの分布拡大、および地域個体群維持の実態を調べるために、各地域個体群のミトコンドリア DNA の塩基配列を比較し、各地域個体群が持つ遺伝子型の類似性から分布拡大経路の推定を行った。比較に用いた領域は、Gene bank (DDBJ) に登録されている配列とし、アメリカフジツボについてはミトコンドリア DNA の COI 領域の塩基配列を、ヨーロッパフジツボについてはミトコンドリア DNA の D-loop 領域の塩基配列を比較対象として、太平洋側から瀬戸内海にかけての広域での地域個体群の集団遺伝構造と遺伝的交流の実態を明らかにすることを目的とした。最後に第 4 章では、東京湾における 2 種の外来フジツボ種の遺伝構造を、ミトコンドリア DNA より感度の高

い遺伝子マーカーであるマイクロサテライトマーカーを用いて調べ、狭域での
個体群の遺伝子構造から、2種の外来フジツボの分布拡大の手段について検証
することを目的とした。

第2章 東京湾潮間帯におけるフジツボ類の分布

2-1 緒言

東京湾は南北約 50km 東西約 20km、面積約 960km²の長方形の湾であり（古川, 2004）、海域とそれに隣接する陸域を合わせた東京湾沿岸域は、海域や埋立地などの活用により、工業、漁業、陸上・海上交通、生活、海洋性レクリエーションなどの場として利用され、首都圏の経済活動の発展、国際交流の進展、市民生活の向上に寄与してきた（遠藤, 2004）。なかでも、明治時代以降に造成された埋立地は、1997年までに広さが 23,700ha におよび（沼田, 1997）、面積は首都圏の 0.7%、居住人口は 1.2%を占めるに過ぎないものの、物流機能などの拠点である港湾や貨物ターミナルなどの立地や、規模の大きい鉄鋼や石油化学などの工場が集積している（国土交通省, 2004）。また、電力やガスや石油などのエネルギーを供給する基地の役割も果たしており、首都圏における都市活動の源泉としての大きな役割を担っている（国土交通省, 2004）。近年ではホテル、アミューズメント施設、ショッピングセンターを含めた大規模商業施設、テーマパークや大規模な展示場が増加しており、今後は臨海工業地帯の工業機能のみならず、商業・業務などの多様な機能を持つ地域へと開発が進むものと考えられる（国土交通省, 2004）。

東京湾では、埋立地を含む海岸のほとんどが人工護岸や橋脚などの人工構造物で占められている。そのため、これらの基盤を生息の場としている付着生物が代表的な海岸生物群集となっている。特にフジツボ類はムラサキイガイ (*Mytilus galloprovincialis*)やマガキ (*Crassostrea gigas*)と並んで優占種とな

っている(梶原, 1977; 古瀬・風呂田, 1985; 山口, 1982, 1983; 横浜市環境創造局, 2004; 堀越・岡本, 2007a, b; 安田・川井, 2007)。また東京湾は大規模な国際港湾であるため、外来種の影響を受けやすい環境である(朝倉, 1992)。フジツボ類に関しては、アメリカフジツボ (*Amphibalanus eburneus*)やヨーロッパフジツボ (*A. improvisus*)が 20 世紀中頃に日本に移入した(大谷, 2002)後、船舶等により東京湾へ国内移入したと考えられている(馬渡ら, 1968)。これら移入フジツボは現在東京湾の湾奥で定着しているが、近年新たな移入フジツボも報告されており(堀越・岡本, 2005)、生態系への影響からも今後もモニタリングの必要性が指摘されている(岩崎, 2006)。

本章では東京湾潮間帯におけるフジツボ類の現状を詳細に記載するため、運河など過去に報告されていなかった地点を含めた東京湾全域を対象とした分布調査を行った。また、各場所のフジツボ類の種組成データをもとに、種組成の類似度による調査場所のクラスター解析を行い、フジツボ類の分布を決定する要因についても検討した。

2-2 方法

2-2-1 調査地点

東京湾は千葉県富津岬と神奈川県観音崎を結んだ線以北の内湾を指す場合が多いが、この線より南から房総半島州崎と三浦半島剣崎を結んだ線以北の海域を東京湾外湾として東京湾に含める場合もある(風呂田, 1997)。本研究では運河および河口を含む東京湾内湾および外湾の東京湾全域を対象とした。神奈川

県 26 ヶ所 (K-1~K-26)、東京都 16 ヶ所 (T-1~T-16)、千葉県 30 ヶ所 (C-1~C-30)を調査エリアとして設け、各エリア内の 2~19 ヶ所を調査地点とした (Table 2-1, Fig. 2-1)。調査地点が近接している K-1~K-8 は Fig. 2-2 に、K-9~K-16 は Fig. 2-3 に、K-17~K-24 は Fig. 2-4 に、K-25・K-26 は Fig. 2-5 に、T-1~T-8 は Fig. 2-6 に、T-9~T-16 は Fig. 2-7 に、C-1~C-8 は Fig. 2-8 に、C-9~C-16 は Fig. 2-9 に、C-17~C-24 は Fig. 2-10 に、C-25~C-30 は Fig. 2-11 に詳細な調査地点を示した。調査地点数は神奈川県 203 地点、東京都 151 地点、千葉県 204 地点の合計 558 地点であった。付着基質としては垂直または傾斜・石積み護岸の他、転石や橋脚、消波ブロック、木や金属製の杭などの構造物があったが、その全てを調査対象とした。K-26-8 については海岸から約 200m 離れた定置網の杭であるが、調査は杭を所有者が陸揚げした際に行った。

2-2-2 調査方法

調査は 2004 年 5 月から 10 月、2005 年 5 月から 9 月に行った。干潮時に各調査地点において、潮間帯上部から東京湾の潮位表基準面の標高 (-109.1cm) から 30~50cm 程度の深度までの範囲に 5 測点を設け、それぞれの測点において 10×10cm の方形枠内のフジツボ類の個体数を現場で種別に計数した。種の同定は山口 (1986b)に従ったが、死亡個体や、小型で外観では同定が不可能な個体は対象としなかった。また、調査時に表面海水の塩分を屈折計により測定した。

各調査地点におけるフジツボ種の種組成の類似度について、ユークリッド距

離による群平均法でクラスター解析を行った。変数としては調査が2年に渡ったため、個体数の季節変動、年変動があることを考慮し、各フジツボ種の出現の有無を多変量データとみなした。解析にはPC-ORD™ version4 (McCune and Mefford, 1999)を使用し、クラスター解析後に樹形図を作成した。

2-3 結果

出現種とそれらの分布状況

本研究で出現が確認されたフジツボ類の種と種ごとの出現地点数を Table 2-2 に、出現場所を Fig. 2-12 と Fig. 2-13 に示す。また、各調査地点の種ごとの出現個体数 (5 測点の平均、個体数/100cm²)を Table 2-3 から Table 2-21 に示した。

本研究において出現が確認されたフジツボ類は 10 種で、出現地点数が多い方からシロスジフジツボ (*Fistulobalanus albicostatus*)、タテジマフジツボ (*Amphibalanus amphitrite*)、イワフジツボ (*Chthamalus challengeri*)、アメリカフジツボ (*Amphibalanus eburneus*)、ドロフジツボ (*Fistulobalanus kondakovi*)、クロフジツボ (*Tetraclita japonica*)、ヨーロッパフジツボ (*Amphibalanus improvisus*)、サンカクフジツボ (*Balanus trigonus*)、オオアカフジツボ (*Megabalanus volcano*)、アカフジツボ (*Megabalanus rosa*)の順であった(Table 2-2)。

それぞれの種ごとの分布について着目すると、内湾から外湾にかけての広い範囲で出現したものはシロスジフジツボ、タテジマフジツボ、イワフジツボ、

サンカクフジツボであった。また、内湾にのみ出現した種はアメリカフジツボ、ドロフジツボ、ヨーロッパフジツボであり、外湾でのみ出現した種はクロフジツボ、アカフジツボ、オオアカフジツボであった。

それぞれの種が出現した場所の特徴を述べると、シロスジフジツボは外湾に比較して内湾で多く、特に運河内や河口、内湾の港湾の岸壁で多く出現したのに対し、タテジマフジツボは内湾の運河内や河口で多かったが、シロスジフジツボと比較して港湾の岸壁で相対的に少なかった。イワフジツボは外湾よりも内湾の方が多かったが、運河内や河口には確認されず、内湾でも C-1~C-9 などの比較的波当りが強い場所に多かった。アメリカフジツボは運河内や河口にのみ出現したのに対し、ドロフジツボはアメリカフジツボと比較した場合、運河内で少なく、河口で多かった。クロフジツボは外湾の岩礁域や消波ブロックでのみ確認された。

2-4 考察

2-4-1 外湾と内湾での出現種の違いの要因

フジツボをはじめとする付着生物相が東京湾の外湾と内湾で異なる事は過去にも報告されている（宮地ら, 1944; 梶原, 1977）。古瀬・風呂田（1985）は東京湾内湾の潮間帯付着動物の分布について調べ、分布に影響を与える要因として温度、塩分、波当りの強さを挙げ、東京湾内湾では波当りの強さは湾内の付着動物の生息を制限するほど強くないと考察している。さらに大型河川が集中する湾奥部では塩分の変化の大きさが付着動物の水平分布に影響を与える要因と

して重要であることを指摘している。また、水温と塩分はフジツボ幼生の生残率に影響を与えている事が報告されており (Anil *et al.*, 1995; Thiyagarajan *et al.*, 2003; 加戸, 2006 など)、幼生加入の段階で生残率が低くなる事によってフジツボの分布が制限されている可能性が考えられる。以下に水温、塩分、餌料濃度、波当りについて、フジツボの分布に与える影響について考察する。

水温： 東京湾の水温は、春季 (4月)は内湾で 13°C程度、外湾で 15°C程度、夏季 (7月)は内湾で 24°C程度、外湾で 22°C程度、秋季 (10月)は内湾、外湾ともに 22°C程度、冬季 (1月)は内湾で 9°C程度、外湾で 16°C程度と、春季と秋季の水温は内湾と外湾で水温差はほとんどない。夏季の水温は内湾が外湾と比べて若干高く、冬季の水温は外湾が内湾と比べて高い (千葉県水産総合研究センター, 2005; 管区海上保安本部海洋情報部; 神奈川県水産技術センター)。また、内湾における運河内の水温は、春季 (4月)では 19°C、夏季 (7月)では 25°C、秋季 (10月)では 23°C、冬季 (1月)では 16°Cと、春季と冬季の水温は他の内湾域よりも 6°C程度高い (川上, 2007)。東京湾において、アメリカフジツボとヨーロッパフジツボの幼生が海中に多く存在する時期は 6月から 9月の間であるとされているため (岩城, 1981; 山口, 1989)、アメリカフジツボとヨーロッパフジツボが海中に多く存在する夏季における外湾と内湾、内湾の運河における水温差は大きい時で 3°C程度である。

タテジマフジツボ幼生の塩分と水温に対する幼生の死亡率を調べた報告 (Anil *et al.*, 1995; Desai and Anil, 2000)では、各塩分 (10‰, 20‰, 30‰)条件

下での各水温 (15°C, 20°C, 23°C, 25°C, 27°C, 30°C)条件下における幼生の死亡率は、各塩分において水温が 15°Cと 20°C、30°Cの場合では 40%以上の死亡率を示し、水温が 23°C、25°C、27°Cにおける幼生の死亡率は 35%以下で水温による幼生の死亡率に大差は無かった。また、各塩分 (10‰, 20‰, 30‰)条件下での各水温 (15°C, 20°C, 25°C, 30°C)条件下における各発生段階の幼生が次の発生段階に至るまでの期間を比較した報告 (Anil, 1990)では、ノープリウス幼生 2 期から 5 期の期間は各塩分とも 15°Cの場合で長く、他の水温条件下ではほぼ同じ長さの期間だった。ノープリウス 6 期幼生では、塩分が 20‰、30‰の場合では他の発生段階での結果と同じ様に水温条件が 15°Cの場合に次の発生段階までの期間が他水温と比べて長かったが、塩分が 10‰の場合では水温条件が 30°Cの場合が 15°Cの場合と同じく長い期間だった。

アメリカフジツボ幼生の塩分と水温に対する幼生の死亡率を調べた報告 (Scheltema and Williams, 1982; Anil, 1990)では、各塩分 (10‰, 20‰, 30‰)条件下での各水温 (15°C, 20°C, 25°C, 30°C)条件下における幼生の死亡率は、塩分が 10‰において水温が 15°Cと 30°Cの場合で 80%程度であったが、他の条件下では 20%程度以下だった。また、各塩分 (10‰, 20‰, 30‰)条件下での各水温 (15°C, 20°C, 25°C, 30°C)条件下における各発生段階の幼生が次の発生段階に至るまでの期間を比較した報告 (Anil, 1990)では、ノープリウス幼生 2 期から 5 期の期間は各塩分とも 15°Cの場合で長く、他の水温条件下ではほぼ同じ長さの期間だった。ノープリウス 6 期幼生では、塩分が 20‰、30‰の場合では他の発生段階での結果と同じ様に水温条件が 15°Cの場合に次の発生段階までの期間が

他水温と比べて長かったが、塩分が 10‰の場合では水温条件が 30℃の場合に 15℃の場合と同じく長い期間だった。これらのことから、幼生が海中に多く存在する時期における外湾と内湾の 3℃程度の温度差では、幼生の生残率および次発生段階までの期間は大差がないと推測されることから、水温は東京湾におけるフジツボの分布を決定する要因ではないと考えられる。

塩分：小池ら (1998)や千葉県水産総合研究センターの報告によると、内湾の表層の塩分は外湾と比較して通年で 5~14 psu 低いことが示されている。さらに安藤ら (2005)は湾奥部の羽田沖や若洲沖で、3 日間の計 185 mm の降雨後に、塩分が 0~16 psu の範囲で大きく変化したことを示している。運河や河口の塩分に関しては、高浜運河(村瀬ら, 2007)や京浜運河 (東京湾岸自治体環境保全会議, 2003, 2004)、多摩川 (川崎市環境局, 2003)などの報告があり、運河や河口では他の内湾部と比較しても通年で 0 から 10 psu 程度塩分が低く、また通年の塩分変動幅は 10 psu 以上であることも示されている (川上, 2008)。幼生の塩分耐性に関する飼育実験では、内湾でのみ出現したアメリカフジツボの幼生の生残率は塩分が 6 psu で最も高いが、12, 24, 40 psu での生残率はほぼ一定であることが報告されている (Bacon, 1971)。一方、外湾でのみ出現したクロフジツボの幼生の生残率は塩分が 14 から 16 psu で 50%、9 psu ではほぼ 0%になることが報告されている (Chan *et al.*, 2001)。やはり外湾にのみ出現したアカフジツボの幼生の生残率は塩分が 10 および 20 psu では、30 psu に比較して極端に低くなると報告されている (Anil, 1990)。これらのことから内湾に出現した種の幼生は外湾に出現した種の幼生よりも好適塩分が低く、また好適塩分の幅

が大きいため、塩分の変動が大きい内湾で生息出来ると考えられる。これらのことから、塩分とその変動の大きさが東京湾のフジツボ類の分布を決める要因となっているものと考えられる。

餌料濃度： フジツボ幼生の生残率に餌料濃度が関係している事が報告されている (Anil and Kurian, 1996; Qiu and Qian, 1997; Qiu *et al.*, 1997; 山口, 1989; 加戸, 2006)。東京湾における表層のクロロフィル *a* 濃度は、夏季の濃度が外湾では 20~30 μ g/L 程度、内湾では 40 μ g/L 程度と差は無く、冬季の濃度が外湾では 2.5 μ g/L 程度、内湾で 30 μ g/L 程度と内湾が高濃度なのに対して外湾では低濃度であることが示されている (松村ら, 2000)。しかしながら本研究で出現した種の抱卵時期は多くの種で春季から秋季である(岩城, 1981; 岩城, 1992; El-Komi and Kajihawa, 1990)ため、幼生期における植物プランクトン量は外湾と内湾で差はなく、餌料濃度の違いはフジツボの分布を決める要因ではないと考えられる。

波当り： 房総半島の先端部と三浦半島は外海に面しているため、湾奥とくらべて波当りが強い。波当りの強弱と潮間帯生物の分布および生態の関係については、フジツボ類ではイワフジツボ属の *Chthamalus montagui* と *Chthamalus stellatus* (Delany *et al.*, 2003)やミナミクロフジツボ (*Tetraclita squamosa*) とクロフジツボ (*T. japonica*; Chan and Hung, 2005)、他の生物種では腹足類の1種であるヨーロッパチヂミボラ (*Nucella lapillus*; Dalby *et al.*, 1978)や付着性二枚貝のペルナイガイ (*Perna perna*; McQuaid and Lindsay, 2000)など、多くの報告がある。また、本調査で外湾でのみ生息が確認されたクロフジツボ

は、波当りの強い場所に生息する（山口, 1986a）。

本調査の結果のうち、外湾の K-26、内湾湾奥の T-16、内湾で河口がある K-11 の各エリアについて、種毎の出現状況と塩分を Fig. 2-14 と Fig. 2-15 に示した。外湾の調査エリアである K-26（三浦市小網代湾，三戸海岸；Fig. 2-5）では、塩分は K-26-7 をのぞき 31.6 から 32.6 psu の範囲であまり差はなく、K-26-8 以外は波当りが強い地点である。特に波当りの強い K-26-1 にはクロフジツボのみが出現したのに対し、波当りが弱い沖合いの K-26-8 ではクロフジツボは出現せず、シロスジフジツボのみが出現した（Fig. 2-14）。イワフジツボは K-26-8 を除く全ての場所で出現した。内湾でも T-16（江戸川区葛西臨海公園；Fig. 2-7）では、塩分は各調査地点で 23.3 から 23.6 psu の範囲で差はないのにも関わらず、波当りの弱い T-16-1～T-16-6 ではタテジマフジツボとシロスジフジツボが出現したのに対し、近接しているが湾に直接面している T-16-7 ではイワフジツボのみが出現した（Fig. 2-14）。また K-11（横浜市；Fig. 2-3）では、塩分は 18.3 から 20.2 psu の範囲であったが、アメリカフジツボとドロフジツボが K-11-4 や K-11-5 などの河口にのみ出現したのに対し、イワフジツボは K-11-1, K-11-2, K-11-12～K-11-14 などの波当りが強いと考えられる直接湾に面した場所に出現し、K-11-3～K-11-7 の河口には出現しなかった（Fig. 2-15）。この他にも水温や塩分などの環境要因が同程度と考えられるが波当りの強弱が異なる地点間で、出現種が異なった結果が多く見られた。したがって波当りは外湾部だけでなく湾奥部でもフジツボの分布を決める要因になっていると考えられる。

以上より、東京湾のフジツボ類の分布を決める要因として、東京湾内湾と外

湾というマクロなスケールでは塩分および塩分変動の大きさが重要であり、本研究の調査エリアレベル（数 km 以内）では波当たりが重要であると考えられる。

2-4-2 各調査場所の特徴

本研究の結果では塩分が同程度と考えられる近接した調査地点間で種組成が異なった場合も多かった（Fig. 2-14, 2-15）。海岸生物の種組成に影響する塩分以外の要因としては、外湾と内湾での出現種の違いの要因についての考察で挙げた水温、餌量濃度、波当たりが考えられ、この要因の他にはフジツボの生息基盤となる基質の性質が挙げられる。しかしながらこれら要因のうち、近接地点の塩分が同程度であったことから（Fig. 2-14, 2-15）、水温と餌量濃度についても出現種が異なった近接した各地点による差異はほとんど無いものと考えられる。基質の影響については、Moore & Kitching (1939)が *Chthamalus stellatus* の分布を決定する要因として基質の影響を挙げており、*Chthamalus* 属は石灰岩やチャートのような硬く、表面が粗い質感の基質に嗜好性があり、軟質で表面の平滑な基質に嗜好性はないと報告している。Crisp & Barnes (1954)は、フジツボのキプリス幼生は基質に付着をする際、溝などの基質表面が凹んだ場所を好んで付着すると報告している。これらのことから、フジツボの分布を決定する要因として、付着基質の性質が影響を与えている可能性が考えられるが、本調査において各調査地点の基質の性質は、外湾部の一部が岩礁である他は、ほとんどの基質がコンクリート護岸で構成されている。そのため本調査において近接した調査地点におけるフジツボの種組成が異なったことに

ついて、付着基質となる海岸構造物の表面の性質は影響していないものと考えられる。

そこでフジツボの種組成が類似する地点間に共通な要因を推測するために、クラスター解析を行った。その結果、東京湾のフジツボ群集は大きく2つのクラスター (Cluster 1 と Cluster 2) に分けられた (Fig. 2-16)。それぞれのクラスターに属する種は、Cluster 1 がシロスジフジツボ、タテジマフジツボ、アメリカフジツボ、ヨーロッパフジツボ、ドロフジツボ、イワフジツボであり、Cluster 2 はイワフジツボ、クロフジツボ、オオアカフジツボ、アカフジツボであった。さらに Cluster 1 は Cluster1-1、Cluster1-2、Cluster1-3 の3つに分けられ (Fig. 2-16)、それぞれのクラスターに属する種は Cluster1-1 がシロスジフジツボ、タテジマフジツボ、アメリカフジツボ、ヨーロッパフジツボ、ドロフジツボ、Cluster1-2 に属する種がシロスジフジツボ、タテジマフジツボ、アメリカフジツボ、Cluster1-3 に属する種がシロスジフジツボ、タテジマフジツボ、イワフジツボであった。

分けられたクラスターにはそれぞれに外湾・内湾の地点が含まれていた。それぞれの地点の特徴を挙げると、Cluster 1 は運河内や河口、漁港内や防波堤の内側などの波浪への露出が比較的少ないと考えられる「遮蔽海岸」(酒井ら, 2003; 大垣, 2004; 藤田ら, 2006; 大垣, 2008) に存在する調査地点で構成されたが (Fig. 2-17~Fig. 2-19)、Cluster 2 は外海に面した岩礁域や湾奥でも湾に直接面している場所など、波浪への露出が多いと考えられる「開放海岸」(近藤・グレナス, 1995; McLay and McQueen, 1995; 須田ら, 2008) に存在する調査地

点で構成された (Fig. 2-20)。ただし Cluster 1 には K-26-8 や C-8-2 の「開放海岸」に属する地点も一部含まれた。この K-26-8 と C-8-2 は地形的には「開放海岸」に属すが、K-26-8 が沖合いの調査地点であり、C-8-2 が砂浜の潮溜りの調査地点だったことから波当たりが弱く、他の「開放海岸」より「遮蔽海岸」の環境特性に似ているためと考えられる。そのためこの 2 地点に関しては「遮蔽海岸」であると考え、分かれた 2 つのクラスターは「遮蔽海岸」と「開放海岸」に存在する調査地点に大きく分けられた。

本調査地点 558 地点の内、Cluster 1 を構成するのは 414 地点であり、Cluster 2 は 144 地点であった。また、Cluster 1 から分けられた 3 つのクラスターの内、Cluster1-1 は 128 地点、Cluster1-2 は 169 地点、Cluster1-3 は 117 地点であった。Cluster1-1 を構成する 128 地点は、「遮蔽海岸」の中でも運河・河口などに存在する場所 (以下「運河・河口」) が多く、「運河・河口」が 126 地点、その他の「遮蔽海岸」(以下「その他の遮蔽海岸」) は 2 地点であった (Fig. 2-17)。Cluster1-2 (Fig. 2-18) および Cluster1-3 (Fig. 2-19) も同様に「運河・河口」と「その他の遮蔽海岸」で構成された。Cluster1-2 と Cluster1-3 の違いは、各クラスター内での「運河と河口」が占める割合の違いである。Cluster1-2 は「運河・河口」が 154 地点、「その他の遮蔽海岸」が 16 地点であるのに対し、Cluster1-3 は「運河・河口」が 15 地点、「その他の遮蔽海岸」が 103 地点であった。

クラスター解析の結果から Cluster 1、Cluster 2 は共に外湾部、湾奥の地点を含んでいるため、両クラスターを分ける要因は水温や塩分などの水質要因ではなく、波浪への露出、すなわち波当たりであると考えられる。次に Cluster 1

を構成する 3 つのクラスターについてみると、Cluster1-1、Cluster1-2、Cluster1-3 の順に「運河・河口」の割合が減少し、「その他の遮蔽海岸」の割合が増加している。この事から 3 つのクラスターを分ける要因は、「運河・河口」と「その他の遮蔽海岸」との環境の違いという事になる。湾奥の「運河・河口」では「その他の遮蔽海岸」と比較して通年で塩分が低く（川崎市環境局, 2003; 東京湾岸自治体環境保全会議, 2003, 2004; 村瀬ら, 2007）、変動が大きいことが報告されているため(川上, 2008)、Cluster 1 を 3 つのクラスターに分ける要因としては塩分および塩分変動が考えられる。

これまでの東京湾におけるフジツボ類を含めた付着生物群集の分布を調べた研究で、その分布を決定する要因は塩分と塩分変動の大きさ（古瀬・風呂田, 1985）、塩分と波当り（山口, 1982, 1983）などが挙げられていた。外湾も含めた東京湾のフジツボ類の分布を詳細に調べ、各調査地点におけるフジツボ類の組成をクラスター解析した本研究の結果でも、フジツボ類の分布を決める要因は塩分と波当りがフジツボ類の分布を決定する重要な要因であることが示唆できる結果となった。

Table 2-1 Place names and the number of survey sites in the Tokyo Bay. The shoreline of the bay was largely divided into three depending on the prefecture, K: Kanagawa, T: Tokyo, C: Chiba. On each prefecture shoreline, 26 (Kanagawa), 16 (Tokyo), 30 (Chiba) survey areas were located. In each survey area, 2 to 19 survey sites were set.

Kanagawa Prefecture			Tokyo Metropolis			Chiba Prefecture		
area	area name	number of survey sites	area	area name	number of survey sites	area	area name	number of survey sites
K-1	Ukishima, Kawasaki	8	T-1	Konan, Minatoku	8	C-1	Maihama, Urayasu	13
K-2	Tama-river estuary	13	T-2	Tennōzu, Shinagawaku	11	C-2	Sakai-river estuary, Urayasu	9
K-3	Kawaracyo, Kawasaki	6	T-3	Ōi, Shinagawaku	15	C-3	Chidoricyo, Ichikawa	6
K-4	Chidoricyo, Mizuecyo, Kawasaki	14	T-4	Odaibakaih-in-Park	10	C-4	Edo-river sluice	7
K-5	Higashi-Ōgishima Kawasaki	6	T-5	Museum of Maritime Science	7	C-5	Minatocyo, Funabashi	8
K-6	Ōgimachi, Kawasaki	17	T-6	Ōmori, Ōtaku	11	C-6	Sanbanzekaih-in-Park	9
K-7	Ōgishima, Kawasaki	5	T-7	Ebitori-river, Ōtaku	10	C-7	Akanehama, Narashino	8
K-8	Tsurumi, Yokohama	13	T-8	South of Shibaura, Minatoku	10	C-8	Kaih-inmakuhari, Chiba	11
K-9	Daikokucyo, Takaracyo, Yokohama	8	T-9	North of Shibaura, Minatoku	7	C-9	Mihama, Chiba	6
K-10	Chiwakacyo, Yokohama	3	T-10	Kachidoki, Chuōku	6	C-10	Chiba port-Park	5
K-11	Yamauchicyo, Oonocyo, Yokohama	14	T-11	Sumida-river estuary	6	C-11	Yōro-river estuary	9
K-12	Minatomirai, Yokohama	11	T-12	Ariake, Kōtōku	12	C-12	Yawatajyuku, Ichihara	6
K-13	Honmoku, Yokohama	7	T-13	Shiomi, Tatsumi, Kōtōku	19	C-13	Sodegaura, Sodegaura	4
K-14	Chidoricyo, Yokohama	8	T-14	Minamisuna, Kōtō-ku	8	C-14	Ushigomefunadome, Horifunadome, Kisaradu	17
K-15	Isogo, Yokohama	8	T-15	Wakasu, Kōtōku	3	C-15	Mitachifunadome, Kisaradu	5
K-16	Hakkeijima, Yokohama	5	T-16	Kasairinkai-Park, Kōtōku	8	C-16	Kisarazu-Port	6
K-17	Nojima, Yokohama	6				C-17	Shiohama, Kisaradu	4
K-18	Yokosuka, Yokosuka	7				C-18	Fureai-Park, Futtu	5
K-19	Ōtsu, Yokosuka	4				C-19	Shintomi-Cannal, Futtu	3
K-20	Kannonzaki, Yokosuka	10				C-20	Futtu, Futtu	3
K-21	Kurihama, Yokosuka	7				C-21	Kawana, Futtu	6
K-22	Kaneda, Miura	2				C-22	Ōnuki, Futtu	4
K-23	Ena, Miura	6				C-23	Kazusakōkaih-in-Park	5
K-24	Miyagawa, Miura	2				C-24	Takeoka, Futtu	4
K-25	Jogashima, Miura	5				C-25	Hamakanaya, Kyonancho	5
K-26	Koajiro. Santo, Miura	8				C-26	Katsuyama, Kyonancho	8
						C-27	Tomiura	6
						C-28	Nako, Tateyama	5
						C-29	Tateyama, Tateyama	8
						C-30	Suzaki, Tateyama	9

Table 2-2 Barnacle species found in this study and the number of survey sites where the species were found.

species name	number of sites
<i>Fistulobalanus albicostatus</i>	367
<i>Amphibalanus amphitrite</i>	339
<i>Chthamalus challenger</i>	256
<i>Amphibalanus eburneus</i>	118
<i>Fistulobalanus kondakovi</i>	117
<i>Tetraclita japonica</i>	32
<i>Amphibalanus improvisus</i>	13
<i>Balanus trigonus</i>	11
<i>Megabalanus volcano</i>	5
<i>Megabalanus rosa</i>	4

Table 2-3 Number of individuals (individuals/100cm²) of each barnacle species appeared on each survey site.

Sampling point	Species name									
	<i>A. amphitrite</i>	<i>F. albicostatus</i>	<i>A. eburneus</i>	<i>A. improvisus</i>	<i>F. kondakovi</i>	<i>C. challengerii</i>	<i>B. trigonus</i>	<i>T. japonica</i>	<i>M. rosa</i>	<i>M. volcano</i>
K-1-1	0	0	0	0	0	212.4	0	0	0	0
K-1-2	0	0	0	0	0	175.6	0	0	0	0
K-1-3	0	0	0	0	0	285.2	0	0	0	0
K-1-4	0	0	0	0	0	245.4	0	0	0	0
K-1-5	0	24	0	0	0	142	0	0	0	0
K-1-6	0	14.2	0	0	0	0	0	0	0	0
K-1-7	38.8	31.8	0	0	0	0	0	0	0	0
K-1-8	38.4	31.6	0	0	0	0	0	0	0	0
K-2-1	51	37.4	0	3.8	10.8	0	0	0	0	0
K-2-2	50.6	26.6	0	0	8.2	0	0	0	0	0
K-2-3	51	44.2	0	0	9.2	0	0	0	0	0
K-2-4	48.4	37.4	0	0	3.8	0	0	0	0	0
K-2-5	7.4	43	0	0	0	0	0	0	0	0
K-2-6	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0
K-2-7	35.4	34.4	11.6	0	0	0	0	0	0	0
K-2-8	0	13.2	0	0	0.4	0	0	0	0	0
K-2-9	13.6	0	12.2	0	15	0	0	0	0	0
K-2-10	0	0	14	0	14.2	0	0	0	0	0
K-2-11	31.2	16.6	3	0	0	0	0	0	0	0
K-2-12	8.6	0	13	0	10	0	0	0	0	0
K-2-13	0	0	10.4	0	12.6	0	0	0	0	0
K-3-1	0.4	0	4.8	0	7	0	0	0	0	0
K-3-2	0	0	4.4	0	0	0	0	0	0	0
K-3-3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
K-3-4	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0
K-3-5	7.4	0	3.8	0	0	0	0	0	0	0
K-3-6	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0

※*A. amphitrite*: *Amphibalanus amphitrite*, *F. albicostatus*: *Fistulobalanus albicostatus*, *A. eburneus*: *Amphibalanus eburneus*
A. improvisus: *Amphibalanus improvisus*, *F. kondakovi*: *Fistulobalanus kondakovi*, *C. challengerii*: *Chthamalus challengerii*
B. trigonus: *Balanus trigonus*, *T. japonica*: *Tetraclita japonica*, *M. rosa*: *Megabalanus rosa*, *M. volcano*: *Megabalanus volcano*.

Table 2-4 Number of individuals (individuals/100cm²) of each barnacle species appeared on each survey site.

Sampling point	Species name										
	<i>A. amphitrite</i>	<i>F. albicostatus</i>	<i>A. eburneus</i>	<i>A. improvisus</i>	<i>F. kondakovi</i>	<i>C. challenger</i>	<i>B. trigonus</i>	<i>T. japonica</i>	<i>M. rosa</i>	<i>M. volcano</i>	
K-4-1	36.8	26	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-4-2	28.4	20.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-4-3	50.8	42.2	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-4-4	44.8	29.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-4-5	55.4	35.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-4-6	40.4	29.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-4-7	39.8	32.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-4-8	35.6	21.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
k-4-9	13.6	24	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-4-10	44.4	18.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-4-11	57.8	18	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-4-12	39.2	20.4	7	0	0	0	0	0	0	0	
K-4-13	24	14.4	4.4	0	0	0	0	0	0	0	
K-4-14	2.2	9.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-5-1	13.2	8.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-5-2	6.4	17.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-5-3	9.6	18.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-5-4	18.4	0	0	0	0	542.8	0	0	0	0	
K-5-5	0	0	0	0	0	636.6	0.2	0	0	0	
K-6-1	35.8	13.6	3.2	0	0	0	0	0	0	0	
K-6-2	52.2	25.6	8.8	0	0	0	0	0	0	0	
K-6-3	40.6	23.8	4.6	0	0	0	0	0	0	0	
K-6-4	34.4	18.8	12.8	0	0	0	0	0	0	0	
K-6-5	62.2	33.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-6-6	58.2	63.4	12.6	0	4.4	0	0	0	0	0	
K-6-7	45.4	54.6	11	0	8.8	0	0	0	0	0	
K-6-8	32.8	41	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-6-9	17.6	19.2	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-6-10	35	50.8	11	0	0	0	0	0	0	0	
K-6-11	0	14.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-6-12	0	14.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-6-13	37.8	27.8	6.8	0	0	0	0	0	0	0	
K-6-14	53	38.4	6.4	0	0	0	0	0	0	0	
K-6-15	27.4	24.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
k-6-16	8.4	14.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-6-17	4	22	0	0	0	0	0	0	0	0	

※*A. amphitrite*: *Amphibalanus amphitrite*, *F. albicostatus*: *Fistulobalanus albicostatus*, *A. eburneus*: *Amphibalanus eburneus*
A. improvisus: *Amphibalanus improvisus*, *F. kondakovi*: *Fistulobalanus kondakovi*, *C. challenger*: *Chthamalus challenger*
B. trigonus: *Balanus trigonus*, *T. japonica*: *Tetraclita japonica*, *M. rosa*: *Megabalanus rosa*, *M. volcano*: *Megabalanus volcano*.

Table 2-5 Number of individuals (individuals/100cm²) of each barnacle species appeared on each survey site.

Sampling point	Species name										
	<i>A. amphitrite</i>	<i>F. albicostatus</i>	<i>A. eburneus</i>	<i>A. improvisus</i>	<i>F. kondakovi</i>	<i>C. challengerii</i>	<i>B. trigonus</i>	<i>T. japonica</i>	<i>M. rosa</i>	<i>M. volcano</i>	
K-7-1	22.4	9.2	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-7-2	19	10	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-7-3	0	14	0	0	0	586.4	0	0	0	0	
K-7-4	0	0	0	0	0	689.2	0	0	0	0	
K-7-5	0	0	0	0	0	604.4	0	0	0	0	
K-8-1	47.6	41.6	11.4	0	3.8	0	0	0	0	0	
K-8-2	42.8	31	9.8	0	9.8	0	0	0	0	0	
K-8-3	31.6	26	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-8-4	0	17.2	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-8-5	0	8.2	0	0	0	614	0	0	0	0	
K-8-6	37	38.2	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-8-7	45.4	44	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-8-8	39.2	34.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-8-9	45	25.6	6.2	0	0	0	0	0	0	0	
K-8-10	0	0	0	0	0	323.6	0	0	0	0	
K-8-11	30	26.2	0	0	12.2	0	0	0	0	0	
K-8-12	24.6	19.4	14.7	0	1.7	0	0	0	0	0	
K-8-13	13.6	0	14.4	2.8	0	0	0	0	0	0	
K-9-1	52.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-9-2	51	41.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-9-3	49.6	50.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-9-4	57	31	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-9-5	14.2	11.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-9-6	30.2	0	0	0	0	162	0	0	0	0	
K-9-7	65	26	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-9-8	0	7.8	0	0	0	466.4	0	0	0	0	
K-10-1	0	12.4	0	0	0	232.8	0	0	0	0	
K-10-2	0	0	0	0	0	748	0	0	0	0	
K-10-3	0	0	0	0	0	750	0	0	0	0	

※*A. amphitrite*: *Amphibalanus amphitrite*, *F. albicostatus*: *Fistulobalanus albicostatus*, *A. eburneus*: *Amphibalanus eburneus*
A. improvisus: *Amphibalanus improvisus*, *F. kondakovi*: *Fistulobalanus kondakovi*, *C. challengerii*: *Chthamalus challengerii*
B. trigonus: *Balanus trigonus*, *T. japonica*: *Tetraclita japonica*, *M. rosa*: *Megabalanus rosa*, *M. volcano*: *Megabalanus volcano*.

Table 2-6 Number of individuals (individuals/100cm²) of each barnacle species appeared on each survey site.

Sampling point	Species name									
	<i>A. amphitrite</i>	<i>F. albicostatus</i>	<i>A. eburneus</i>	<i>A. improvisus</i>	<i>F. kondakovi</i>	<i>C. challengerii</i>	<i>B. trigonus</i>	<i>T. japonica</i>	<i>M. rosa</i>	<i>M. volcano</i>
K-11-1	5.6	31.6	0	0	0	122	0	0	0	0
K-11-2	2.2	16.4	0	0	0	127.6	0	0	0	0
K-11-3	0	7.6	0	0	0	0	0	0	0	0
K-11-4	14	13.8	17.8	0	0	0	0	0	0	0
K-11-5	12	20.8	7	0	0	0	0	0	0	0
K-11-6	16.6	27.8	6	0	6.4	0	0	0	0	0
K-11-7	8.6	8.6	14.6	0	0.6	0	0	0	0	0
K-11-8	2.2	0	0	0	0	201.2	0	0	0	0
K-11-9	7	0	0	0	0	368.8	0	0	0	0
K-11-10	8.2	12.2	0	2	0	39.8	0	0	0	0
K-11-11	2	10.4	9.2	3.6	0	0	0	0	0	0
K-11-12	1.6	8.8	0	0	0	200.4	0	0	0	0
K-11-13	3.6	3.2	0	0	0	130.4	0	0	0	0
K-11-14	3.6	0	0	0	0	126.4	0	0	0	0
K-12-1	33.2	44	0	0	4.4	0	0	0	0	0
K-12-2	41.4	35	0	0	0	0	0	0	0	0
K-12-3	42.4	17.4	3.2	0	2.2	0	0	0	0	0
K-12-4	46.8	48.8	2.2	0	0	0	0	0	0	0
K-12-5	33.8	39.2	3	0	1.8	0	0	0	0	0
K-12-6	46	20	1.8	0	2.2	0	0	0	0	0
K-12-7	14.4	98.8	2	0	1.8	0	0	0	0	0
K-12-8	16.2	47.2	1.8	0	3.2	0	0	0	0	0
K-12-9	89.2	49.2	1	0	1.4	0	0	0	0	0
K-12-10	45.2	34.6	3.2	0	0.8	0	0	0	0	0
K-12-11	43.6	33	0	0	0	106.4	0	0	0	0
K-13-1	36	38	0	0	0	0	0	0	0	0
K-13-2	12.6	0	0	0	0	320.4	0	0	0	0
K-13-3	0	0	0	0	0	677.2	0	0	0	0
K-13-4	0	0	0	0	0	893.6	0	0	0	0
K-13-5	13.6	22.4	0	0	0	254	0	0	0	0
K-13-6	0	0	0	0	0	693.2	0	0	0	0
K-13-7	0	8.6	0	0	0	510.8	0	0	0	0

※*A. amphitrite*: *Amphibalanus amphitrite*, *F. albicostatus*: *Fistulobalanus albicostatus*, *A. eburneus*: *Amphibalanus eburneus*
A. improvisus: *Amphibalanus improvisus*, *F. kondakovi*: *Fistulobalanus kondakovi*, *C. challengerii*: *Chthamalus challengerii*
B. trigonus: *Balanus trigonus*, *T. japonica*: *Tetraclita japonica*, *M. rosa*: *Megabalanus rosa*, *M. volcano*: *Megabalanus volcano*.

Table 2-7 Number of individuals (individuals/100cm²) of each barnacle species appeared on each survey site.

Sampling point	Species name										
	<i>A. amphitrite</i>	<i>F. albicostatus</i>	<i>A. eburneus</i>	<i>A. improvisus</i>	<i>F. kondakovi</i>	<i>C. challengerii</i>	<i>B. trigonus</i>	<i>T. japonica</i>	<i>M. rosa</i>	<i>M. volcano</i>	
K-14-1	0	17.2	0	0	0	509.2	0	0	0	0	
K-14-2	11.4	23.2	0	0	0	227.2	0	0	0	0	
K-14-3	0	8.2	0	0	0	125.6	0	0	0	0	
K-14-4	7.2	12.2	0	0	0	425.6	0	0	0	0	
K-14-5	29	24.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-14-6	22.6	18.2	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-14-7	0	0	0	0	0	520.8	0	0	0	0	
K-14-8	0	0	0	0	0	550	0	0	0	0	
K-15-1	41	29	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-15-2	30	21	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-15-3	35.6	16.2	0	0	0	54.8	0	0	0	0	
K-15-4	31.6	12.2	0	0	0	58.4	0	0	0	0	
K-15-5	33.2	19.6	2	0	0	57.2	0	0	0	0	
K-15-6	34	23	0	0	0	86.8	0	0	0	0	
K-15-7	36	34.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-15-8	31.6	23.6	0	0	0	174.4	0	0	0	0	
K-16-1	32.8	20	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-16-2	29	15	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-16-3	3.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-16-4	33	26.8	0	0	0	88	0	0	0	0	
K-16-5	23.8	14	0	0	0	92.8	0	0	0	0	
K-17-1	10	14.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-17-2	17.6	8.2	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-17-3	0	7.2	0	0	0	374.8	0	0	0	0	
K-17-4	15.4	8.4	0	0	0	239.2	0	0	0	0	
K-17-5	30.4	14.4	0	0	0	322.4	0	0	0	0	
K-17-6	3.2	7.8	0	0	0	356.4	0	0	0	0	
K-18-1	22.8	15.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-18-2	4.6	11.6	0	0	0	526.8	0	0	0	0	
K-18-3	8.2	22.6	0	0	0	136.2	0	0	0	0	
K-18-4	8.4	14.2	0	0	0	541.2	0	0	0	0	
K-18-5	4	22.4	0	0	0	376.2	0	0	0	0	
K-18-6	0	12.8	0	0	0	420.8	0	0	0	0	
K-18-7	0	9.4	0	0	0	459.6	0	0	0	0	

※*A. amphitrite*: *Amphibalanus amphitrite*, *F. albicostatus*: *Fistulobalanus albicostatus*, *A. eburneus*: *Amphibalanus eburneus*
A. improvisus: *Amphibalanus improvisus*, *F. kondakovi*: *Fistulobalanus kondakovi*, *C. challengerii*: *Chthamalus challengerii*
B. trigonus: *Balanus trigonus*, *T. japonica*: *Tetraclita japonica*, *M. rosa*: *Megabalanus rosa*, *M. volcano*: *Megabalanus volcano*.

Table 2-8 Number of individuals (individuals/100cm²) of each barnacle species appeared on each survey site.

Sampling point	Species name										
	<i>A. amphitrite</i>	<i>F. albicostatus</i>	<i>A. eburneus</i>	<i>A. improvisus</i>	<i>F. kondakovi</i>	<i>C. challengerii</i>	<i>B. trigonus</i>	<i>T. japonica</i>	<i>M. rosa</i>	<i>M. volcano</i>	
K-19-1	10.4	20.6	0	0	0	134	0	0	0	0	
K-19-2	0	0	0	0	0	221.2	0	0	0	0	
K-19-3	0	0	0	0	0	451.6	0	0	0	0	
K-19-4	0	0	0	0	0	368.8	0	0	0	0	
K-20-1	0	0	0	0	0	552	0	0	0	0	
K-20-2	0	0	0	0	0	346.4	0	1.8	0	0	
K-20-3	0	0	0	0	0	271.2	0	0	0	0	
K-20-4	0	0	0	0	0	219.2	0	0	0	0	
K-20-5	0	0	0	0	0	328	0	2	0	0	
K-20-6	0	0	0	0	0	300.8	0	2.2	0	0	
K-20-7	0	0	0	0	0	215.2	0.6	1	0	0	
K-20-8	0	0	0	0	0	404.4	0	0	0	0	
K-20-9	0	0	0	0	0	494.4	0	0	0	0	
K-20-10	21	0	0	0	0	175.6	0	0	0.6	0	
K-21-1	13.2	22.2	0	0	0	192	0	0	0	0	
K-21-2	0	0	0	0	0	91.6	0	0	0	0	
K-21-3	0	0	0	0	0	115.6	0	0	0	0	
K-21-4	0	0	0	0	0	222	0	0	0	0	
K-21-5	8	20.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-21-6	10.4	27.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
K-21-7	13.8	22.4	0	0	0	76	0	0	0	0	
K-22-1	23.4	33.2	0	0	0	34	0	0	0	0	
K-22-2	0	0	0	0	0	86	0	0	0	0	
K-23-1	0	0	0	0	0	136.8	0	1.8	0	0	
K-23-2	0	0	0	0	0	247.6	0	1	0	0	
K-23-3	0	0	0	0	0	177.2	0	1.8	0	0	
K-23-4	0	8.2	0	0	0	117.6	0	0	0.2	0	
K-23-5	0	0	0	0	0	140.4	0	0	0	0	
K-23-6	0	5.4	0	0	0	140.4	0	0	0.4	0	
K-24-1	0	0	0	0	0	171.2	0	0	0	0	
K-24-2	0	0	0	0	0	150.8	0	0	0	0	
K-25-1	0	8	0	0	0	100.4	0	0	0	0	
K-25-2	0	8.2	0	0	0	184.8	0	0	0	0	
K-25-3	0	0	0	0	0	100.4	0	2.6	0	0	
K-25-4	0	0	0	0	0	80	0	4	0	0	
K-25-5	0	0	0	0	0	63.4	0	3	0	0	

※*A. amphitrite*: *Amphibalanus amphitrite*, *F. albicostatus*: *Fistulobalanus albicostatus*, *A. eburneus*: *Amphibalanus eburneus*
A. improvisus: *Amphibalanus improvisus*, *F. kondakovi*: *Fistulobalanus kondakovi*, *C. challengerii*: *Chthamalus challengerii*
B. trigonus: *Balanus trigonus*, *T. japonica*: *Tetraclita japonica*, *M. rosa*: *Megabalanus rosa*, *M. volcano*: *Megabalanus volcano*.

Table 2-9 Number of individuals (individuals/100cm²) of each barnacle species appeared on each survey site.

Sampling point	Species name									
	<i>A. amphitrite</i>	<i>F. albicostatus</i>	<i>A. eburneus</i>	<i>A. improvisus</i>	<i>F. kondakovi</i>	<i>C. challengerii</i>	<i>B. trigonus</i>	<i>T. japonica</i>	<i>M. rosa</i>	<i>M. volcano</i>
K-26-1	0	0	0	0	0	114.4	0	1.8	0	0
K-26-2	0	0	0	0	0	80.8	0	3.6	0	0
K-26-3	0	0	0	0	0	136.8	0	0	0	0
K-26-4	0	0	0	0	0	98.4	0	0	0	0
K-26-5	0	0	0	0	0	69.2	0	2.6	0	0
K-26-6	0	7.4	0	0	0	20	0	0	0	0
K-26-7	0	0	0	0	0	139.2	0	0	0	0
K-26-8	0	20.2	0	0	0	0	0	0	0	0

※*A. amphitrite*: *Amphibalanus amphitrite*, *F. albicostatus*: *Fistulobalanus albicostatus*, *A. eburneus*: *Amphibalanus eburneus*
A. improvisus: *Amphibalanus improvisus*, *F. kondakovi*: *Fistulobalanus kondakovi*, *C. challengerii*: *Chthamalus challengerii*
B. trigonus: *Balanus trigonus*, *T. japonica*: *Tetraclita japonica*, *M. rosa*: *Megabalanus rosa*, *M. volcano*: *Megabalanus volcano*.

Table 2-10 Number of individuals (individuals/100cm²) of each barnacle species appeared on each survey site.

Sampling point	Species name										
	<i>A. amphitrite</i>	<i>F. albicostatus</i>	<i>A. eburneus</i>	<i>A. improvisus</i>	<i>F. kondakovi</i>	<i>C. challengerii</i>	<i>B. trigonus</i>	<i>T. japonica</i>	<i>M. rosa</i>	<i>M. volcano</i>	
T-1-1	12.6	3	0	0	0.6	0	0	0	0	0	
T-1-2	23.2	16	0	0	1.6	0	0	0	0	0	
T-1-3	25	27.2	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-1-4	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-1-5	29.4	0	0.8	0	0	0	0	0	0	0	
T-1-6	18.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-1-7	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-1-8	21.6	15.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-2-1	19.8	0	8	0	3.4	0	0	0	0	0	
T-2-2	20.6	12.2	8.6	0	1	0	0	0	0	0	
T-2-3	20.6	12.2	8.6	0	1	0	0	0	0	0	
T-2-4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-2-5	11	0.4	2	0	0	0	0	0	0	0	
T-2-6	29.2	2.2	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-2-7	13.4	26.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-2-8	35.4	7	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-2-9	28.6	23.4	1.4	0	0	0	0	0	0	0	
T-2-10	33.8	23.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-2-11	33	25.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-3-1	26.8	34.4	0	0	6.6	0	0	0	0	0	
T-3-2	17.6	37.2	3.6	0	3.8	0	0	0	0	0	
T-3-3	16.6	37.2	6.6	0	6.4	0	0	0	0	0	
T-3-4	79.6	51.6	6	0	3.6	0	0	0	0	0	
T-3-5	17.6	26.6	4	0	1.2	0	0	0	0	0	
T-3-6	19	25.6	4.4	0	4.4	0	0	0	0	0	
T-3-7	72	4	1.8	0	8.8	0	0	0	0	0	
T-3-8	15.8	64.4	0	0	4.4	0	0	0	0	0	
T-3-9	68	40.8	2	0	5	0	0	0	0	0	
T-3-10	46.6	93.8	3.8	0	3.6	0	0	0	0	0	
T-3-11	35.4	63	1.2	0	2.8	0	0	0	0	0	
T-3-12	68	62.5	8.5	0	4.5	0	0	0	0	0	
T-3-13	67.8	81.2	2.6	0	0.8	0	0	0	0	0	
T-3-14	1.8	0	12.4	0	0.2	0	0	0	0	0	
T-3-15	4.6	0	8.4	0	0.4	0	0	0	0	0	

※*A. amphitrite*: *Amphibalanus amphitrite*, *F. albicostatus*: *Fistulobalanus albicostatus*, *A. eburneus*: *Amphibalanus eburneus*
A. improvisus: *Amphibalanus improvisus*, *F. kondakovi*: *Fistulobalanus kondakovi*, *C. challengerii*: *Chthamalus challengerii*
B. trigonus: *Balanus trigonus*, *T. japonica*: *Tetraclita japonica*, *M. rosa*: *Megabalanus rosa*, *M. volcano*: *Megabalanus volcano*.

Table 2-11 Number of individuals (individuals/100cm²) of each barnacle species appeared on each survey site.

Sampling point	Species name									
	<i>A. amphitrite</i>	<i>F. albicostatus</i>	<i>A. eburneus</i>	<i>A. improvisus</i>	<i>F. kondakovi</i>	<i>C. challenger</i>	<i>B. trigonus</i>	<i>T. japonica</i>	<i>M. rosa</i>	<i>M. volcano</i>
T-4-1	27.4	32	2.2	0	4	0	0	0	0	0
T-4-2	37.6	41	1.6	0	1	0	0	0	0	0
T-4-3	21	10.2	2.2	0	0	61.8	0	0	0	0
T-4-4	40.2	40.4	1.4	0	0	0	0	0	0	0
T-4-5	42	28.2	1.4	0	0	80.6	0	0	0	0
T-4-6	24	33.2	3.2	0	0	47.4	0	0	0	0
T-4-7	24.2	13.2	0	0	0	53.4	0	0	0	0
T-4-8	40.8	43.6	0	0	0	108	0	0	0	0
T-4-9	20.4	27.4	0	0	0	273	0	0	0	0
T-4-10	0	55	0	0	0	242.8	0	0	0	0
T-5-1	29.2	20.2	0	0	0	200	0	0	0	0
T-5-2	34.6	34.2	0	0	0	282.4	0	0	0	0
T-5-3	11	44	0	0	0	0	0	0	0	0
T-5-4	28.8	6.2	0	0	0	266	0	0	0	0
T-5-5	27.4	17.4	0	0	0	208.4	0	0	0	0
T-5-6	29.6	22.8	0	0	0	209.4	0	0	0	0
T-5-7	26.6	24	0	0	0	247.2	0	0	0	0
T-6-1	56	16.4	0	0	8.8	0	0	0	0	0
T-6-2	82.2	21.2	0	0	7.6	0	0	0	0	0
T-6-3	74.6	14.6	28.2	0	8.4	0	0	0	0	0
T-6-4	53.2	39.6	14.6	0	3.4	0	0	0	0	0
T-6-5	77.8	31.2	9	0	8.6	0	0	0	0	0
T-6-6	70	34.8	32.6	0	5.6	0	0	0	0	0
T-6-7	75.2	56	25.8	2	6.2	0	0	0	0	0
T-6-8	81	62	29.2	0	12.6	0	0	0	0	0
T-6-9	103.2	77.2	13.8	0	14.6	0	0	0	0	0
T-6-10	68.6	48.6	18.4	0	7	0	0	0	0	0
T-6-11	142.2	10	14	0	0	0	0	0	0	0

※*A. amphitrite*: *Amphibalanus amphitrite*, *F. albicostatus*: *Fistulobalanus albicostatus*, *A. eburneus*: *Amphibalanus eburneus*
A. improvisus: *Amphibalanus improvisus*, *F. kondakovi*: *Fistulobalanus kondakovi*, *C. challenger*: *Chthamalus challenger*
B. trigonus: *Balanus trigonus*, *T. japonica*: *Tetraclita japonica*, *M. rosa*: *Megabalanus rosa*, *M. volcano*: *Megabalanus volcano*.

Table 2-12 Number of individuals (individuals/100cm²) of each barnacle species appeared on each survey site.

Sampling point	Species name										
	<i>A. amphitrite</i>	<i>F. albicostatus</i>	<i>A. eburneus</i>	<i>A. improvisus</i>	<i>F. kondakovi</i>	<i>C. challengerii</i>	<i>B. trigonus</i>	<i>T. japonica</i>	<i>M. rosa</i>	<i>M. volcano</i>	
T-7-1	52.6	28.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-7-2	47.2	32.2	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-7-3	45.4	35.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-7-4	30.2	27.6	16.2	0	3.6	0	0	0	0	0	
T-7-5	25.2	32.6	19.8	0	2.6	0	0	0	0	0	
T-7-6	23.2	36.2	11.4	0	5	0	0	0	0	0	
T-7-7	37.4	40	0	0	4.8	0	0	0	0	0	
T-7-8	43.4	28.2	11.6	0	1.8	0	0	0	0	0	
T-7-9	47.6	40.6	0	0	8.4	0	0	0	0	0	
T-7-10	53.2	44.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-8-1	25.8	15.6	0	0	2.8	0	0	0	0	0	
T-8-2	15.6	11.8	4	0	1.6	0	0	0	0	0	
T-8-3	22.2	16.4	0	0	1.8	0	0	0	0	0	
T-8-4	15.2	7.2	3	0	2.4	0	0	0	0	0	
T-8-5	15.2	7.2	3	0	2.4	0	0	0	0	0	
T-8-6	6.2	0	5.2	0	0.4	0	0	0	0	0	
T-8-7	15	0	0	0	4.8	0	0	0	0	0	
T-8-8	17.6	11.4	0	0	4.8	0	0	0	0	0	
T-8-9	5.6	0	0	0	0.2	0	0	0	0	0	
T-8-10	8.6	0	2.4	0	1.6	0	0	0	0	0	
T-9-1	17.2	11.2	0	0	3.4	0	0	0	0	0	
T-9-2	14.8	10.2	2.6	0	3.2	0	0	0	0	0	
T-9-3	18.2	11.6	4.8	0	4	0	0	0	0	0	
T-9-4	23.8	9.4	0	0	3.2	0	0	0	0	0	
T-9-5	26.6	8.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-9-6	34.8	33.2	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-9-7	28	17	0	0	2.8	0	0	0	0	0	
T-10-1	37.2	19.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-10-2	45	16.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-10-3	34.4	21.2	0	0	0	314.4	0	0	0	0	
T-10-4	29	19.4	0	0	0	216.8	0	0	0	0	
T-10-5	8.6	42.2	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-10-6	7.6	33	0	0	0	0	0	0	0	0	

※*A. amphitrite*: *Amphibalanus amphitrite*, *F. albicostatus*: *Fistulobalanus albicostatus*, *A. eburneus*: *Amphibalanus eburneus*
A. improvisus: *Amphibalanus improvisus*, *F. kondakovi*: *Fistulobalanus kondakovi*, *C. challengerii*: *Chthamalus challengerii*
B. trigonus: *Balanus trigonus*, *T. japonica*: *Tetraclita japonica*, *M. rosa*: *Megabalanus rosa*, *M. volcano*: *Megabalanus volcano*.

Table 2-13 Number of individuals (individuals/100cm²) of each barnacle species appeared on each survey site.

Sampling point	Species name										
	<i>A. amphitrite</i>	<i>F. albicostatus</i>	<i>A. eburneus</i>	<i>A. improvisus</i>	<i>F. kondakovi</i>	<i>C. challengerii</i>	<i>B. trigonus</i>	<i>T. japonica</i>	<i>M. rosa</i>	<i>M. volcano</i>	
T-11-1	15.8	6	0	0	3.8	0	0	0	0	0	
T-11-2	4.8	9	0	0	0.4	0	0	0	0	0	
T-11-3	15	1.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-11-4	4.4	6.2	0	0	0.4	0	0	0	0	0	
T-11-5	23.8	18.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-11-6	3.4	38.4	0	0	0	341.6	0	0	0	0	
T-12-1	0	12	2.6	0	0	0	0	0	0	0	
T-12-2	0	35	15	0	0	0	0	0	0	0	
T-12-3	0	11.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-12-4	18.4	35.2	6.8	0	1.6	0	0	0	0	0	
T-12-5	17.4	28	3.6	0	2.2	0	0	0	0	0	
T-12-6	0	9.6	4	0	0	0	0	0	0	0	
T-12-7	0	16.8	5.2	0	0	0	0	0	0	0	
T-12-8	0	0	0	0	0	214	0	0	0	0	
T-12-9	13.8	19.6	3	0	0	34.4	0	0	0	0	
T-12-10	6.4	17.8	3	0	0	36.4	0	0	0	0	
T-12-11	6.4	24	7.2	0	0	0	0	0	0	0	
T-12-12	7.2	25	3.4	0	0	0	0	0	0	0	
T-13-1	40.8	21.6	0	0	3.8	0	0	0	0	0	
T-13-2	15.6	8	0	0	3.2	0	0	0	0	0	
T-13-3	22	15.4	0	0	3.8	0	0	0	0	0	
T-13-4	33.4	38.4	0	0	6.2	0	0	0	0	0	
T-13-5	14.6	0	0	0	2.6	0	0	0	0	0	
T-13-6	21	9.4	0	0	8	0	0	0	0	0	
T-13-7	17.6	7.4	0	0	3	0	0	0	0	0	
T-13-8	20.4	12	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-13-9	23.2	15.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-13-10	19.2	18.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-13-11	14.4	10	0	0	0	0	0	0	0	0	
T-13-12	21.4	9	0	0	4.8	0	0	0	0	0	
T-13-13	15.2	8.8	6.5	0	8	0	0	0	0	0	
T-13-14	17.4	11.6	8.5	0	5.6	0	0	0	0	0	
T-13-15	45.2	14	0	0	4.4	0	0	0	0	0	
T-13-16	49.4	28.6	0	0	3.8	0	0	0	0	0	
T-13-17	36.2	29.8	0	0	6.2	0	0	0	0	0	
T-13-18	25.6	18.5	0	0	4.5	0	0	0	0	0	
T-13-19	32	27	0	0	5.8	0	0	0	0	0	

※*A. amphitrite*: *Amphibalanus amphitrite*, *F. albicostatus*: *Fistulobalanus albicostatus*, *A. eburneus*: *Amphibalanus eburneus*, *A. improvisus*: *Amphibalanus improvisus*, *M. volcano*: *Megabalanus volcano*, *F. kondakovi*: *Fistulobalanus kondakovi*, *C. challengerii*: *Chthamalus challengerii*, *B. trigonus*: *Balanus trigonus*, *T. japonica*: *Tetraclita japonica*, *M. rosa*: *Megabalanus rosa*, .

Table 2-14 Number of individuals (individuals/100cm²) of each barnacle species appeared on each survey site.

Sampling point	Species name									
	<i>A. amphitrite</i>	<i>F. albicostatus</i>	<i>A. eburneus</i>	<i>A. improvisus</i>	<i>F. kondakovi</i>	<i>C. challengerii</i>	<i>B. trigonus</i>	<i>T. japonica</i>	<i>M. rosa</i>	<i>M. volcano</i>
T-14-1	0	10.6	0	0	0	44.8	0	0	0	0
T-14-2	2	14	0	0	0	28	0	0	0	0
T-14-3	23.6	13.2	4.6	0	0	0	0	0	0	0
T-14-4	42	25.2	0	0	6	0	0	0	0	0
T-14-5	11.2	70.8	16	0	0	0	0	0	0	0
T-14-6	8	42	0	0	0	0	0	0	0	0
T-14-7	13.2	24.2	0	0	0	0	0	0	0	0
T-14-8	9	0	0	0	10	0	0	0	0	0
T-15-1	0	0	0	0	0	955.6	0.4	0	0	0
T-15-2	0	0	0	0	0	821	0.2	0	0	0
T-15-3	0	0	0	0	0	698.4	0	0	0	0
T-16-1	24.8	20.7	0	0	0	0	0	0	0	0
T-16-2	14.6	12	0	0	0	0	0	0	0	0
T-16-3	19.8	12.4	0	0	0	0	0	0	0	0
T-16-4	22	15.2	0	0	0	0	0	0	0	0
T-16-5	17.4	12	0	0	0	0	0	0	0	0
T-16-6	13.2	15.2	0	0	0	0	0	0	0	0
T-16-7	0	0	0	0	0	296.2	0	0	0	0
T-16-8	22.6	26.2	0	0	0	0	0	0	0	0

A. amphitrite: *Amphibalanus amphitrite*, *F. albicostatus*: *Fistulobalanus albicostatus*, *A. eburneus*: *Amphibalanus eburneus*

A. improvisus: *Amphibalanus improvisus*, *F. kondakovi*: *Fistulobalanus kondakovi*, *C. challengerii*: *Chthamalus challengerii*

B. trigonus: *Balanus trigonus*, *T. japonica*: *Tetraclita japonica*, *M. rosa*: *Megabalanus rosa*, *M. volcano*: *Megabalanus volcano*.

Table 2-15 Number of individuals (individuals/100cm²) of each barnacle species appeared on each survey site.

Sampling point	Species name										
	<i>A. amphitrite</i>	<i>F. albicostatus</i>	<i>A. eburneus</i>	<i>A. improvisus</i>	<i>F. kondakovi</i>	<i>C. challenger</i>	<i>B. trigonus</i>	<i>T. japonica</i>	<i>M. rosa</i>	<i>M. volcano</i>	
C-1-1	0	0	0	0	0	994.4	0	0	0	0	
C-1-2	0	0	0	0	0	1163.6	0	0	0	0	
C-1-3	0	0	0	0	0	980	0	0	0	0	
C-1-4	0	0	0	0	0	634.8	0	0	0	0	
C-1-5	0	0	0	0	0	702.4	0	0	0	0	
C-1-6	0	0	0	0	0	751.2	0	0	0	0	
C-1-7	0	0	0	0	0	578.4	0	0	0	0	
C-1-8	0	0	0	0	0	750	0	0	0	0	
C-1-9	0	0	0	0	0	367.2	0	0	0	0	
C-1-10	0	0	0	0	0	357.6	0	0	0	0	
C-1-11	0	0	0	0	0	552.8	0	0	0	0	
C-1-12	0	0	0	0	0	423.2	0	0	0	0	
C-1-13	0	0	0	0	0	331.6	0	0	0	0	
C-1-14	0	0	0	0	0	672.8	0	0	0	0	
C-2-1	0	0	0	0	0	349.8	0	0	0	0	
C-2-2	0	0	0	0	0	438	0	0	0	0	
C-2-3	0	0	0	0	0	569.6	0	0	0	0	
C-2-4	0	0	0	0	0	626.8	0	0	0	0	
C-2-5	0	0	0	0	0	585.2	0	0	0	0	
C-2-6	0	0	0	0	0	546.8	0	0	0	0	
C-2-7	33.8	28.2	0	0	0	0	0.2	0	0	0	
C-2-8	36.6	26.8	0	0	0	0	1.6	0	0	0	
C-2-9	15.2	10	0	0	2	0	0.6	0	0	0	
C-3-1	0	0	0	0	0	847.2	0	0	0	0	
C-3-2	0	0	0	0	0	813.2	0	0	0	0	
C-3-3	0	0	0	0	0	781.6	0	0	0	0	
C-3-4	0	0	0	0	0	685.6	0	0	0	0	
C-3-5	0	0	0	0	0	716.4	0	0	0	0	
C-3-6	10.4	16.6	0	0	0	441.6	0	0	0	0	
C-4-1	11.4	28.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-4-2	24.6	18	0	0	11.4	0	0	0	0	0	
C-4-3	18.2	53	0	0	5	0	0	0	0	0	
C-4-4	9.6	40.2	0	0	3.2	0	0	0	0	0	
C-4-5	8	14.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-4-6	1.6	81.8	0	0	6.6	0	0	0	0	0	
C-4-7	1.6	21.2	0	0	4.6	0	0	0	0	0	

※*A. amphitrite*: *Amphibalanus amphitrite*, *F. albicostatus*: *Fistulobalanus albicostatus*, *A. eburneus*: *Amphibalanus eburneus*
A. improvisus: *Amphibalanus improvisus*, *F. kondakovi*: *Fistulobalanus kondakovi*, *C. challenger*: *Chthamalus challenger*
B. trigonus: *Balanus trigonus*, *T. japonica*: *Tetraclita japonica*, *M. rosa*: *Megabalanus rosa*, *M. volcano*: *Megabalanus volcano*.

Table 2-16 Number of individuals (individuals/100cm²) of each barnacle species appeared on each survey site.

Sampling point	Species name										
	<i>A. amphitrite</i>	<i>F. albicostatus</i>	<i>A. eburneus</i>	<i>A. improvisus</i>	<i>F. kondakovi</i>	<i>C. challengerii</i>	<i>B. trigonus</i>	<i>T. japonica</i>	<i>M. rosa</i>	<i>M. volcano</i>	
C-5-1	7.8	31.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-5-2	8	38.2	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-5-3	4.2	42.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-5-4	7	36.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-5-5	3.8	42.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-5-6	4.8	48.2	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-5-7	0	0	0	0	0	338.4	0	0	0	0	
C-5-8	0	0	0	0	0	245.2	0	0	0	0	
C-6-1	0	16.8	0	0	0	224.2	0	0	0	0	
C-6-2	0	15.2	0	0	0	274	0	0	0	0	
C-6-3	0	9.6	0	0	0	313.2	0	0	0	0	
C-6-4	0	15.2	0	0	0	42.4	0	0	0	0	
C-6-5	0	15.6	0	0	0	202.6	0	0	0	0	
C-6-6	0	28.4	0	0	0	168.4	0	0	0	0	
C-6-7	0	10.8	0	0	0	326.4	0	0	0	0	
C-6-8	0	9.4	0	0	0	248.2	0	0	0	0	
C-6-9	0	14.2	0	0	0	257	0	0	0	0	
C-6-10	0	8.6	0	0	0	312.6	0	0	0	0	
C-7-1	0	0	0	0	0	440.8	0	0	0	0	
C-7-2	0	0	0	1.6	0	346.4	0	0	0	0	
C-7-3	10.6	31	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-7-4	0	0	0	0	0	447.2	0	0	0	0	
C-7-5	0	0	0	0	0	526.8	0	0	0	0	
C-7-6	0	0	0	0	0	418	0	0	0	0	
C-7-7	0	0	0	0	0	474.4	0	0	0	0	
C-7-8	0	0	0	0	0	549.6	0	0	0	0	
C-8-1	0	0	0	5.8	0	0	0	0	0	0	
C-8-2	3.8	6.6	1.4	0	0	0	0	0	0	0	
C-8-3	0	0	0	0	0	494.8	0	0	0	0	
C-8-4	16.4	22.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-8-5	0	0	0	0	0	459.2	0	0	0	0	
C-8-6	0	0	0	0	0	157.2	0	0	0	0	
C-8-7	16.4	30.6	0	0	0	89.4	0	0	0	0	
C-8-8	0	0	0	0	0	160.4	0	0	0	0	
C-8-9	5.4	10.8	2.2	0	0	0	0	0	0	0	
C-8-10	6.6	8	1.2	0	0	0	0	0	0	0	
C-8-11	2.8	4	0	0	0	0	0	0	0	0	

※*A. amphitrite*: *Amphibalanus amphitrite*, *F. albicostatus*: *Fistulobalanus albicostatus*, *A. eburneus*: *Amphibalanus eburneus*, *A. improvisus*: *Amphibalanus improvisus*, *M. volcano*: *Megabalanus volcano*, *F. kondakovi*: *Fistulobalanus kondakovi*, *C. challengerii*: *Chthamalus challengerii*, *B. trigonus*: *Balanus trigonus*, *T. japonica*: *Tetraclita japonica*, *M. rosa*: *Megabalanus rosa*, .

Table 2-17 Number of individuals (individuals/100cm²) of each barnacle species appeared on each survey site.

Sampling point	Species name									
	<i>A. amphitrite</i>	<i>F. albicostatus</i>	<i>A. eburneus</i>	<i>A. improvisus</i>	<i>F. kondakovi</i>	<i>C. challengerii</i>	<i>B. trigonus</i>	<i>T. japonica</i>	<i>M. rosa</i>	<i>M. volcano</i>
C-9-1	0	21	0	0	0	416.4	0	0	0	0
C-9-2	0	0	0	0	0	382.8	0	0	0	0
C-9-3	0	0	0	0	0	544.4	0	0	0	0
C-9-4	9	18.8	9	0	0	0	0	0	0	0
C-9-5	8.6	23.2	0	0	0	0	0	0	0	0
C-9-6	0	0	0	0	0	257.2	0	0	0	0
C-10-1	3.8	7.6	0	0	0	471.4	0	0	0	0
C-10-2	4	9.8	0	0	0	456	0	0	0	0
C-10-3	0	10.2	0	0	0	412	0	0	0	0
C-10-4	0	0	0	0	0	106.8	0	0	0	0
C-10-5	7.4	13.4	0	0	0	314.4	0	0	0	0
C-11-1	18.2	10	0	0	6.8	0	0	0	0	0
C-11-2	17.6	19.6	0	0	8	0	0	0	0	0
C-11-3	10	0	0	0	3.8	0	0	0	0	0
C-11-4	8.6	0	0	2.2	0	379.2	0	0	0	0
C-11-5	0	0	0	0	0	443.6	0	0	0	0
C-11-6	0	0	0	0	0	821.2	0	0	0	0
C-11-7	0	0	0	0	0	913.8	0	0	0	0
C-11-8	35.4	26.4	0	0	0	0	0	0	0	0
C-11-9	25.2	37.2	11	0	0	0	0	0	0	0
C-12-1	28	14.4	0	0	0	0	0	0	0	0
C-12-2	22.6	32.4	0	0	0	0	0	0	0	0
C-12-3	18.8	12	3.6	0	0	0	0	0	0	0
C-12-4	10.8	0	4	0	0	0	0	0	0	0
C-12-5	15.2	19.4	0	0	0	0	0	0	0	0
C-12-6	21.8	33.2	0	0	12.4	0	0	0	0	0
C-13-1	30	38.8	0	0	0	0	0	0	0	0
C-13-2	26.8	26	0	0	0	0	0	0	0	0
C-13-3	0	0	0	0	0	398.8	0	0	0	0
C-13-4	0	0	0	0	0	479.2	0	0	0	0

※*A. amphitrite*: *Amphibalanus amphitrite*, *F. albicostatus*: *Fistulobalanus albicostatus*, *A. eburneus*: *Amphibalanus eburneus*
A. improvisus: *Amphibalanus improvisus*, *F. kondakovi*: *Fistulobalanus kondakovi*, *C. challengerii*: *Chthamalus challengerii*
B. trigonus: *Balanus trigonus*, *T. japonica*: *Tetraclita japonica*, *M. rosa*: *Megabalanus rosa*, *M. volcano*: *Megabalanus volcano*.

Table 2-18 Number of individuals (individuals/100cm²) of each barnacle species appeared on each survey site.

Sampling point	Species name									
	<i>A. amphitrite</i>	<i>F. albicostatus</i>	<i>A. eburneus</i>	<i>A. improvisus</i>	<i>F. kondakovi</i>	<i>C. challenger</i>	<i>B. trigonus</i>	<i>T. japonica</i>	<i>M. rosa</i>	<i>M. volcano</i>
C-14-1	0	0	0	0	0	512.8	0	0	0	0
C-14-2	0	0	0	0	0	462.8	0	0	0	0
C-14-3	0	0	0	1.6	0	240	0	0	0	0
C-14-4	0	11.2	0	0	0	220.8	0	0	0	0
C-14-5	0	5.8	0	0	0	157.8	0	0	0	0
C-14-6	0	0	0	1.2	0	327.2	0	0	0	0
C-14-7	0	0	0	0	0	433.2	0	0	0	0
C-14-8	0	0	0	0	0	208.8	0	0	0	0
C-14-9	0	0	0	0	0	141.6	0	0	0	0
C-14-10	0	0	0	0	0	141.6	0	0	0	0
C-14-11	0	0	0	0	0	477.2	0	0	0	0
C-14-12	0	0	0	0	0	252	0	0	0	0
C-14-13	0	0	0	0	0	409.2	0	0	0	0
C-14-14	0	0	0	0	0	272.8	0	0	0	0
C-14-15	0	0	0	0	0	326.4	0	0	0	0
C-14-16	0	5	0	0	0	155.6	0	0	0	0
C-14-17	0	0	0	0	0	308	0	0	0	0
C-15-1	0	0	0	0	0	397.6	0	0	0	0
C-15-2	12.6	19.6	0	0	0	0	0	0	0	0
C-15-3	14.8	26.6	0	0	0	0	0	0	0	0
C-15-4	0	0	0	0	0	194.4	0	0	0	0
C-15-5	0	0	0	0	0	183.6	0	0	0	0
C-16-1	10.8	17.2	0	0	2.6	42.4	0	0	0	0
C-16-2	5	6.8	0	0	0	98.8	0	0	0	0
C-16-3	0	7.6	0	0	0	206.8	0	0	0	0
C-16-4	0	14.4	0	0	0	352.8	0	0	0	0
C-16-5	16.2	20.8	0	0	5.6	0	0	0	0	0
C-16-6	0	15.6	0	0	3	0	0	0	0	0
C-17-1	18.2	38	0	0	8.4	0	0	0	0	0
C-17-2	39	22.4	0	1.8	8.2	0	0	0	0	0
C-17-3	22.6	10.4	2.2	6.2	0	0	0	0	0	0
C-17-4	30.4	26.8	0	0	0	0	0	0	0	0

※*A. amphitrite*: *Amphibalanus amphitrite*, *F. albicostatus*: *Fistulobalanus albicostatus*, *A. eburneus*: *Amphibalanus eburneus*
A. improvisus: *Amphibalanus improvisus*, *F. kondakovi*: *Fistulobalanus kondakovi*, *C. challenger*: *Chthamalus challenger*
B. trigonus: *Balanus trigonus*, *T. japonica*: *Tetraclita japonica*, *M. rosa*: *Megabalanus rosa*, *M. volcano*: *Megabalanus volcano*.

Table 2-19 Number of individuals (individuals/100cm²) of each barnacle species appeared on each survey site.

Sampling point	Species name										
	<i>A. amphitrite</i>	<i>F. albicostatus</i>	<i>A. eburneus</i>	<i>A. improvisus</i>	<i>F. kondakovi</i>	<i>C. challengerii</i>	<i>B. trigonus</i>	<i>T. japonica</i>	<i>M. rosa</i>	<i>M. volcano</i>	
C-18-1	27	22.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-18-2	24.6	27	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-18-3	29	23.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-18-4	6.8	31	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-18-5	22.6	23	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-19-1	10.8	5.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-19-2	7.2	17.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-19-3	19.2	27.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-20-1	0	0	0	0	0	186.4	0	0	0	0	
C-20-2	0	0	0	0	0	168.4	0	0	0	0	
C-20-3	0	0	0	0	0	395.2	0	0	0	0	
C-21-1	0	0	0	0	0	446	0	0	0	0	
C-21-2	0	7.8	0	0	0	420.4	0	0	0	0	
C-21-3	0	13.6	0	0	0	446.8	0	0	0	0	
C-21-4	0	0	0	0	0	322.8	0	0	0	0	
C-21-5	0	7.4	0	0	0	518	0	0	0	0	
C-21-6	0	8.2	0	0	0	513.6	0	0	0	0	
C-22-1	0	12	0	0	0	126.8	0	0	0	0	
C-22-2	0	14.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-22-3	0	2.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-22-4	0	0	0	0	0	288.4	0	0	0	0	
C-23-1	0	0	0	0	0	182.8	0	3.2	0	0	
C-23-2	0	7	0	0	0	198.4	0	0	0	0	
C-23-3	6	11.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-23-4	7.2	16.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-23-5	0	0	0	0	0	172.4	0	3.8	0	0	
C-24-1	7.2	13.8	0	0	0	125.6	0	0	0.6	0	
C-24-2	0	11.6	0	0	0	166	0	0	0	0	
C-24-3	0	0	0	0	0	258.8	0	3.4	0	0	
C-24-4	0	0	0	0	0	127.2	0	3.6	0	0	

※*A. amphitrite*: *Amphibalanus amphitrite*, *F. albicostatus*: *Fistulobalanus albicostatus*, *A. eburneus*: *Amphibalanus eburneus*
A. improvisus: *Amphibalanus improvisus*, *F. kondakovi*: *Fistulobalanus kondakovi*, *C. challengerii*: *Chthamalus challengerii*
B. trigonus: *Balanus trigonus*, *T. japonica*: *Tetraclita japonica*, *M. rosa*: *Megabalanus rosa*, *M. volcano*: *Megabalanus volcano*.

Table 2-20 Number of individuals (individuals/100cm²) of each barnacle species appeared on each survey site.

Sampling point	Species name										
	<i>A. amphitrite</i>	<i>F. albicostatus</i>	<i>A. eburneus</i>	<i>A. improvisus</i>	<i>F. kondakovi</i>	<i>C. challengerii</i>	<i>B. trigonus</i>	<i>T. japonica</i>	<i>M. rosa</i>	<i>M. volcano</i>	
C-25-1	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-25-2	0	0	0	0	0	212	0	0	0	0	
C-25-3	0	0	0	0	0	314	0	0	0	0	
C-25-4	0	0	0	0	0	246	0	0	0	0	
C-25-5	0	0	0	0	0	118	0	4.4	0	0	
C-26-1	1.4	8.2	0	0	0	74	0	0	0	0	
C-26-2	1.8	6.4	0	0	0	108	0	0	0	0	
C-26-3	0	0	0	0	0	146.4	0	5.8	0	0	
C-26-4	0	0	0	0	0	154	0	5.2	0	0	
C-26-5	0	0	0	0	0	128.8	4.4	0	0	0	
C-26-6	3.2	15.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-26-7	0	0	0	0	0	365.2	0	0	0	0	
C-26-8	0	0	0	0	0	380.4	0	0	0	0	
C-27-1	0	0	0	0	0	148	0	2.4	0	0	
C-27-2	0	0	0	0	0	101.6	0	2.4	0	0	
C-27-3	0	0	0	0	0	251.2	0	0	0	0.4	
C-27-4	0	0	0	0	0	160.6	0	4.2	0	0	
C-27-5	0	0	0	0	0	246.4	0	0	0	0	
C-27-6	0	0	0	0	0	206	0	0	0	0	
C-28-1	0	0	0	0	0	205.8	0	2	0	0	
C-28-2	0	0	0	0	0	138.4	0	0	0	0.2	
C-28-3	0	0	0	0	0	233.6	0	0	0	0	
C-28-4	11.8	11.4	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-28-5	5.6	10.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-29-1	24	30.2	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-29-2	10	15.6	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-29-3	11.2	17.8	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-29-4	15.8	30.2	0	0	0	0	0	0	0	0	
C-29-5	0	0	0	0	0	112.4	0	2	0	0	
C-29-6	0	0	0	0	0	72.4	0	1	0	0	
C-29-7	0	0	0	0	0	77.6	0	0	0	0.6	
C-29-8	0	0	0	0	0	68.8	0	0	0	0	

※*A. amphitrite*: *Amphibalanus amphitrite*, *F. albicostatus*: *Fistulobalanus albicostatus*, *A. eburneus*: *Amphibalanus eburneus*
A. improvisus: *Amphibalanus improvisus*, *F. kondakovi*: *Fistulobalanus kondakovi*, *C. challengerii*: *Chthamalus challengerii*
B. trigonus: *Balanus trigonus*, *T. japonica*: *Tetraclita japonica*, *M. rosa*: *Megabalanus rosa*, *M. volcano*: *Megabalanus volcano*.

Table 2-21 Number of individuals (individuals/100cm²) of each barnacle species appeared on each survey site.

Sampling point	Species name									
	<i>A. amphitrite</i>	<i>F. albicostatus</i>	<i>A. eburneus</i>	<i>A. improvisus</i>	<i>F. kondakovi</i>	<i>C. challenger</i>	<i>B. trigonus</i>	<i>T. japonica</i>	<i>M. rosa</i>	<i>M. volcano</i>
C-30-1	0	0	0	0	0	64	0	0.4	0	0.2
C-30-2	0	0	0	0	0	128.6	0	4	0	0
C-30-3	0	0	0	0	0	128.8	0	3	0	0
C-30-4	0	0	0	0	0	99.6	0	0	0	0.8
C-30-5	0	0	0	0	0	126	0	1	0	0
C-30-6	0	0	0	0	0	108	0	2	0	0
C-30-7	0	0	0	0	0	142	0	1.4	0	0
C-30-8	0	0	0	0	0	106	0	0	0	0
C-30-9	0	0	0	0	0	152	0	0	0	0

※*A. amphitrite*: *Amphibalanus amphitrite*, *F. albicostatus*: *Fistulobalanus albicostatus*, *A. eburneus*: *Amphibalanus eburneus*
A. improvisus: *Amphibalanus improvisus*, *F. kondakovi*: *Fistulobalanus kondakovi*, *C. challenger*: *Chthamalus challenger*
B. trigonus: *Balanus trigonus*, *T. japonica*: *Tetraclita japonica*, *M. rosa*: *Megabalanus rosa*, *M. volcano*: *Megabalanus volcano*.

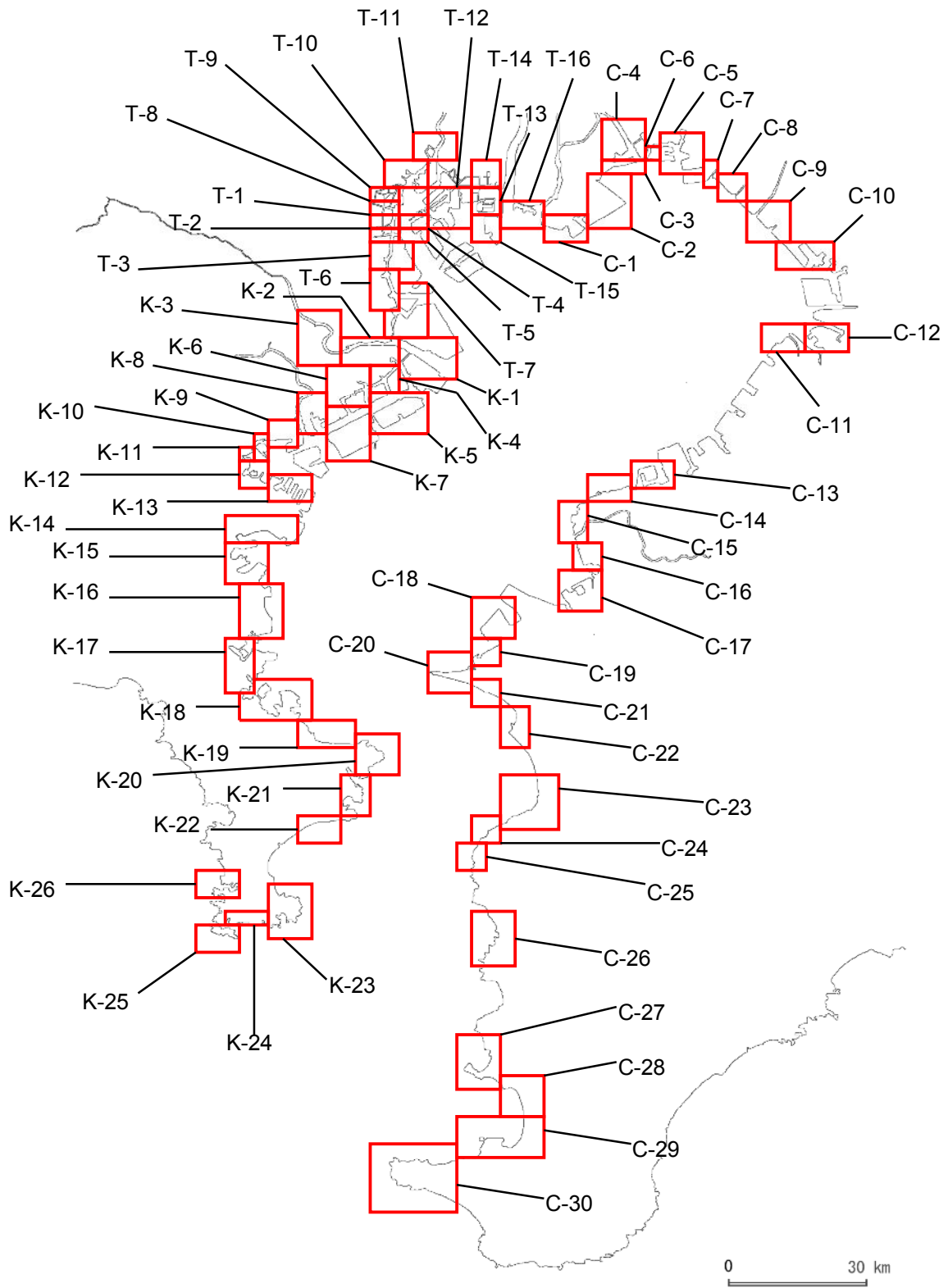


Fig. 2-1 Map showing the survey areas in Tokyo Bay. The survey sites in the area indicated by the letters are shown in Fig. 2-1 ~ Fig. 2-11.

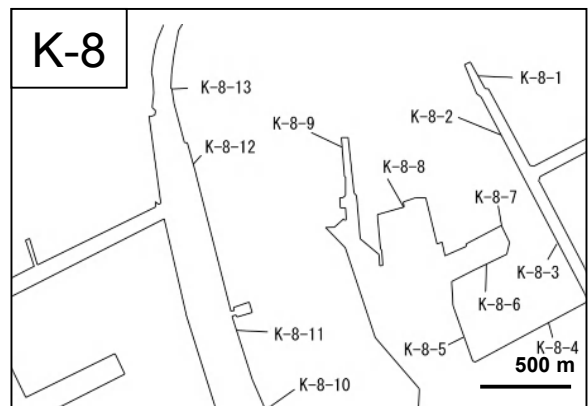
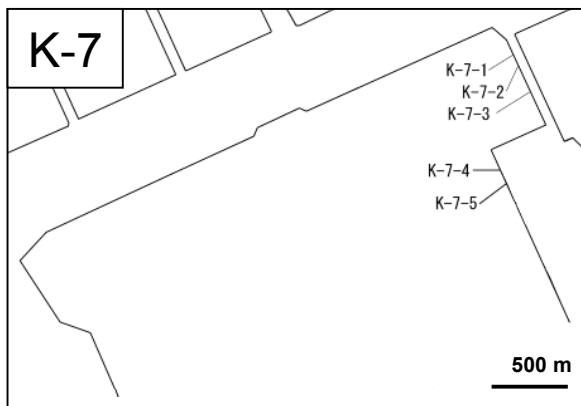
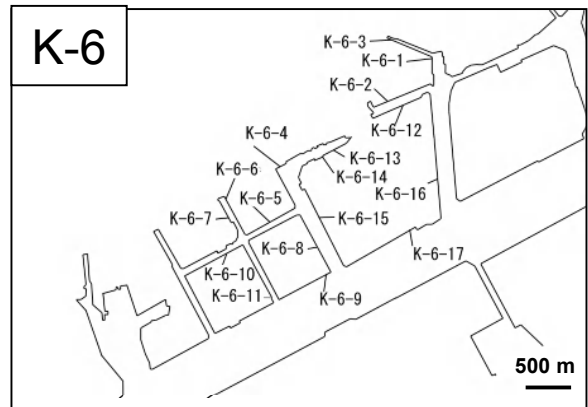
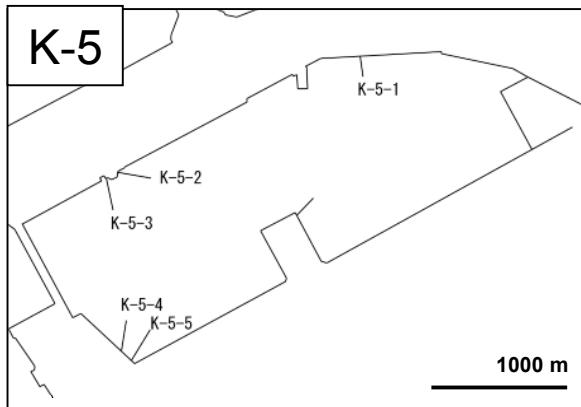
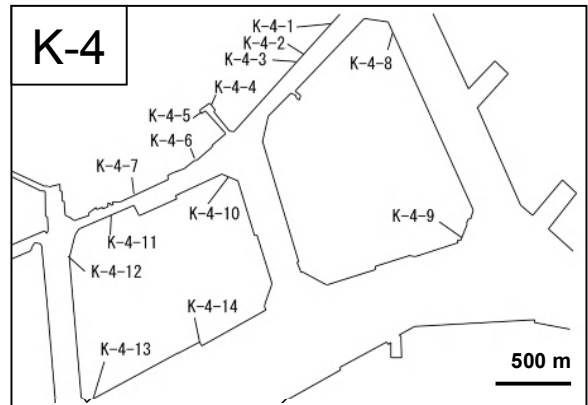
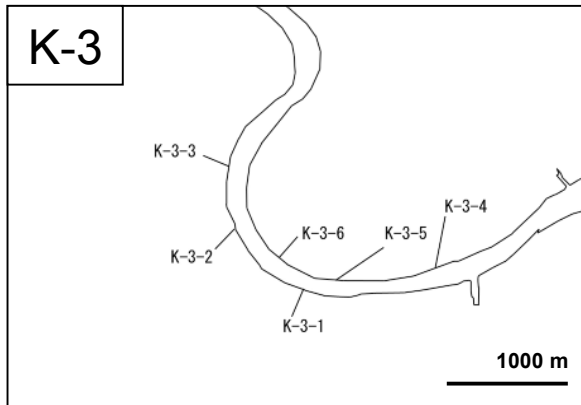
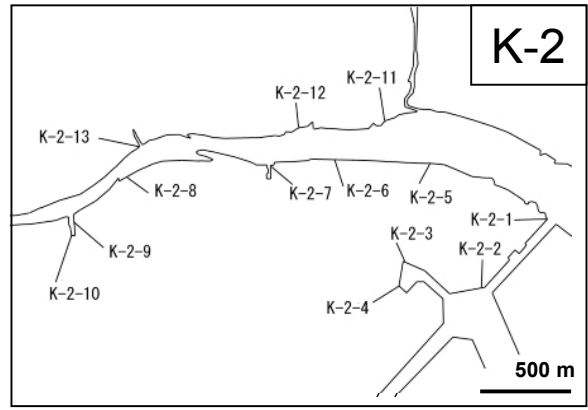
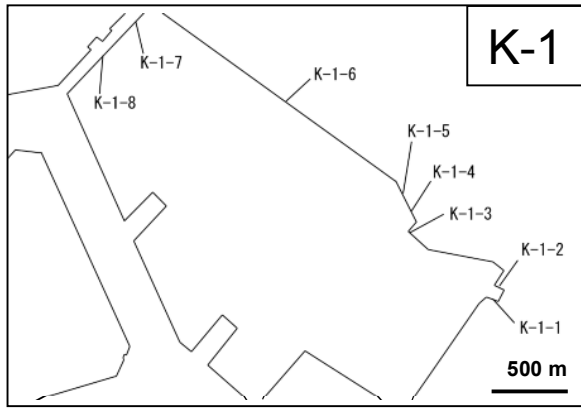


Fig. 2-2 Detailed maps showing the survey sites in the area K-1 to K-8.

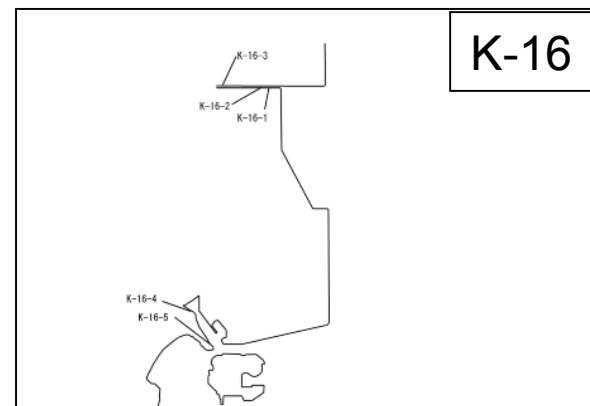
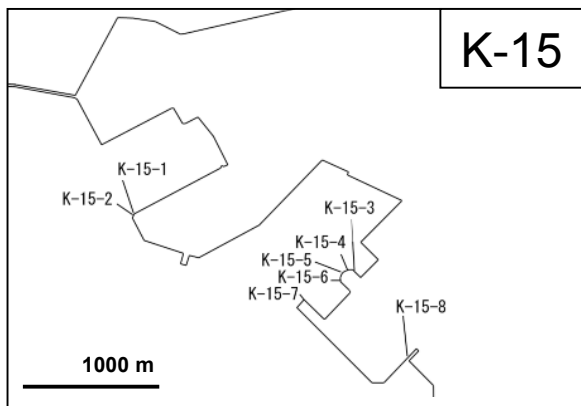
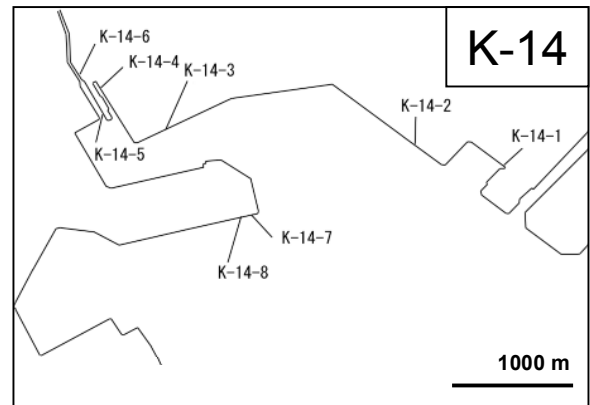
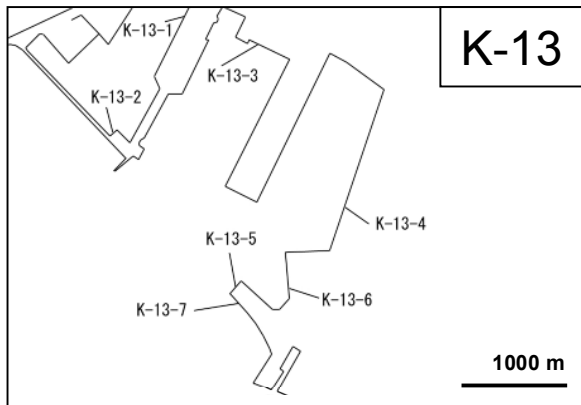
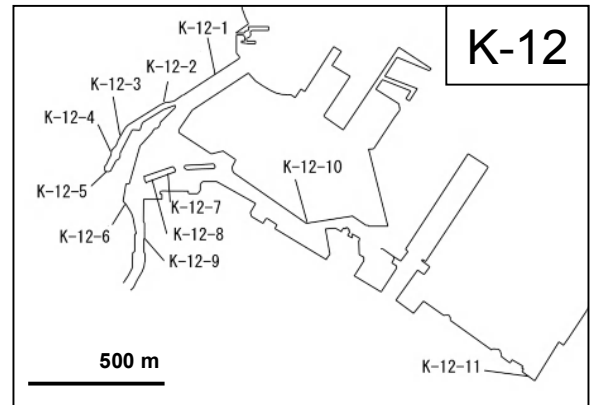
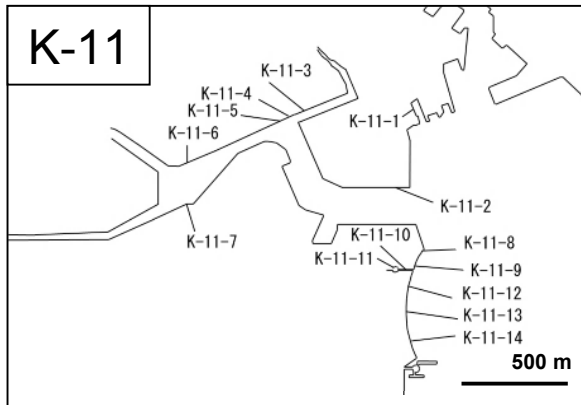
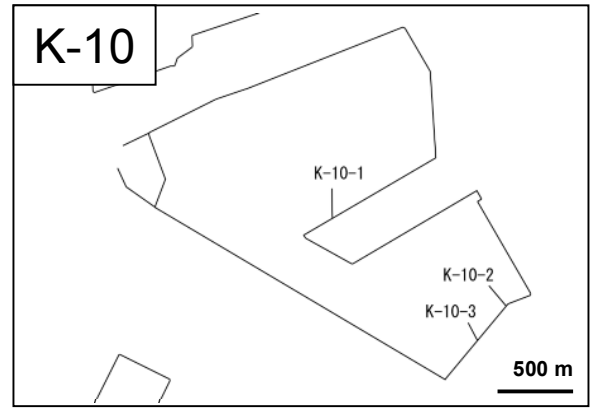
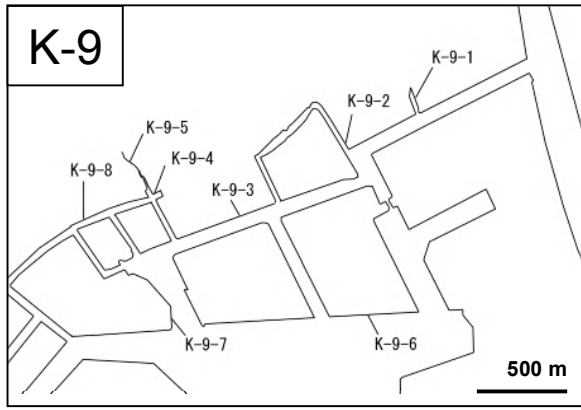


Fig. 2-3 Detailed maps showing the survey sites in the area K-9 to K-16.

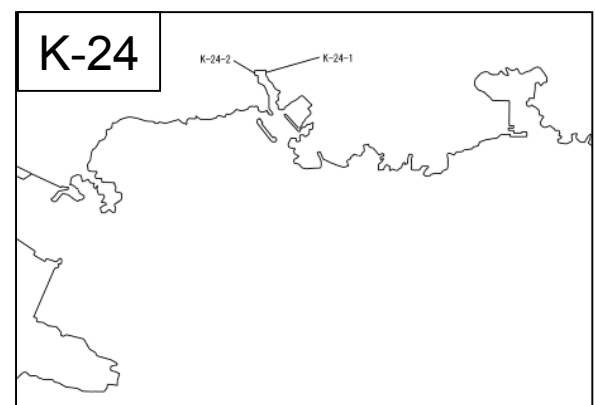
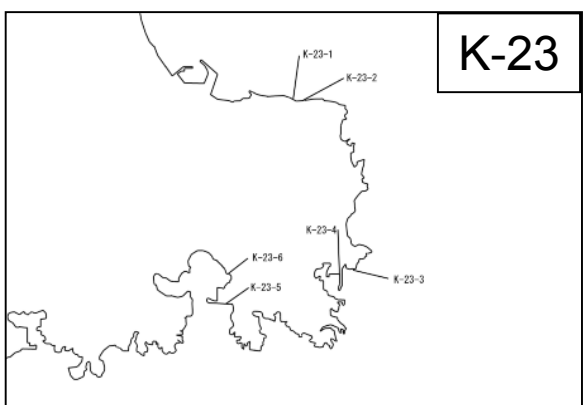
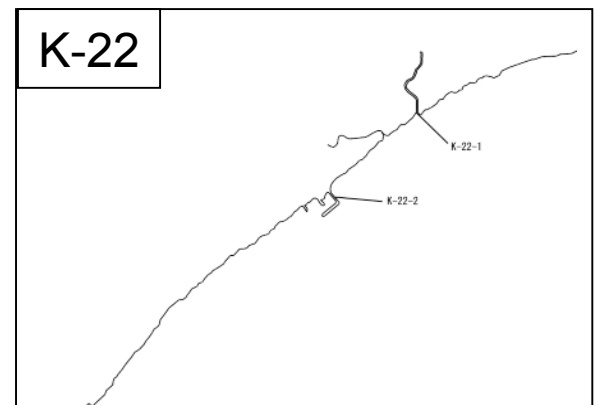
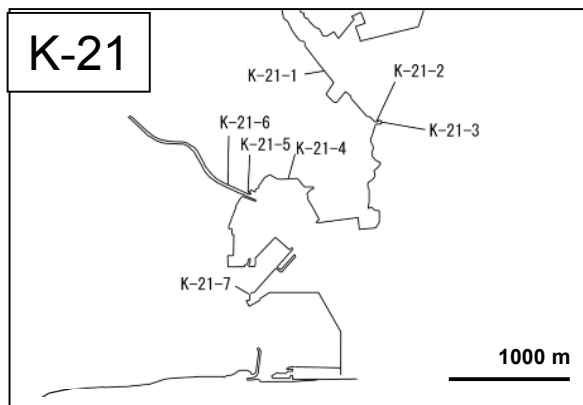
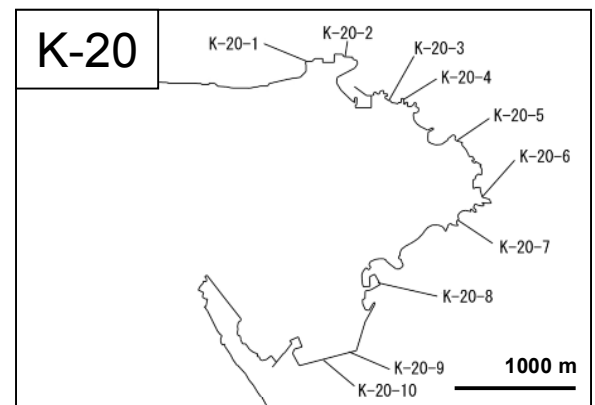
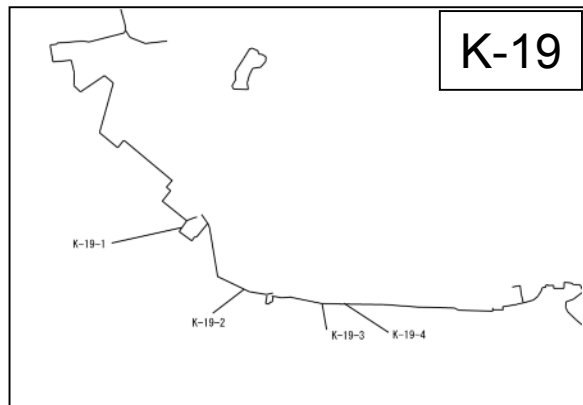
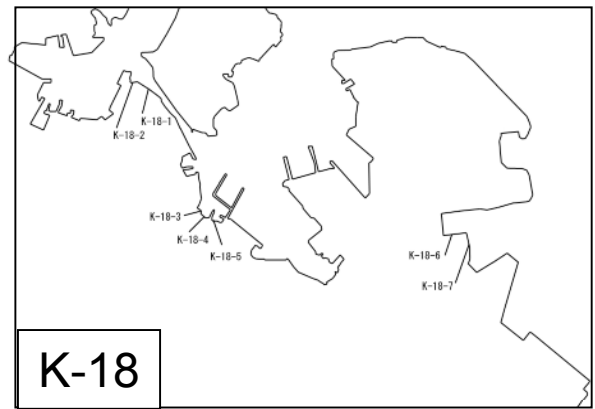
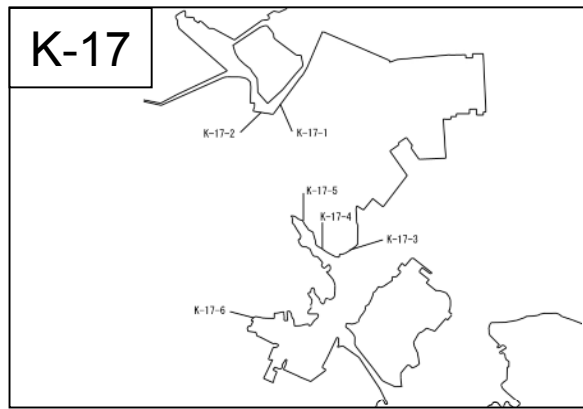


Fig. 2-4 Detailed maps showing the survey sites in the area K-17 to K-24.

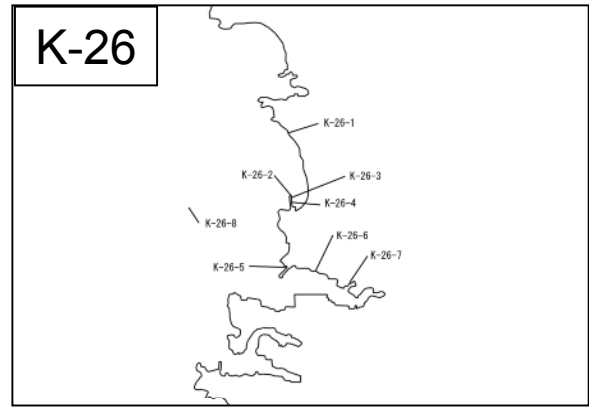
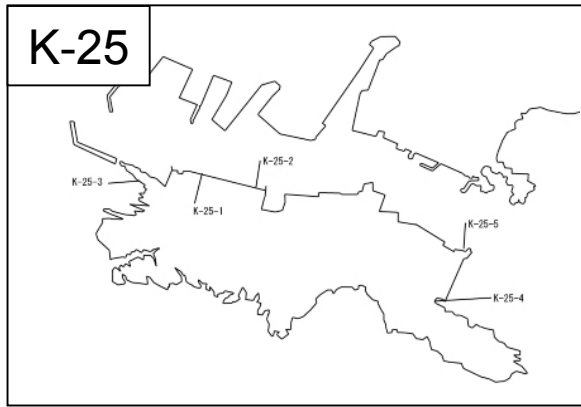


Fig. 2-5 Detailed maps showing the survey sites in the area K-25 to K-26.

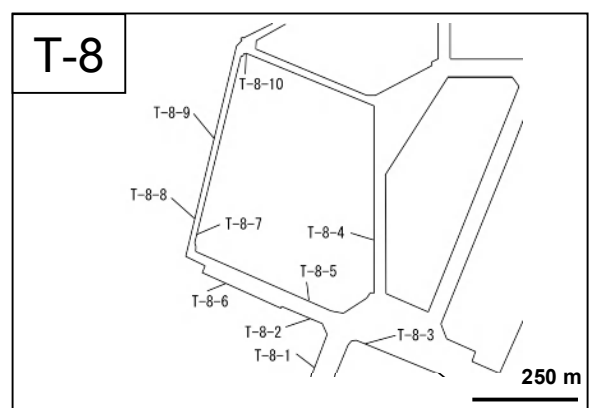
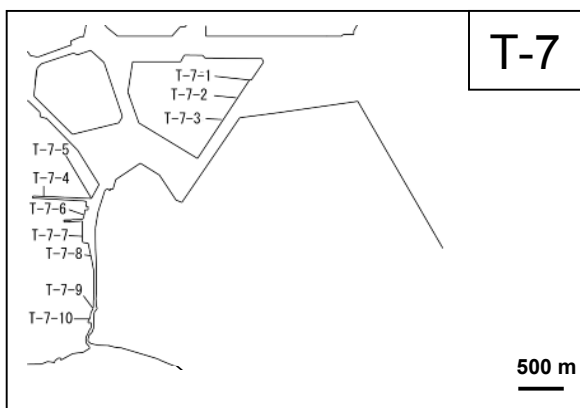
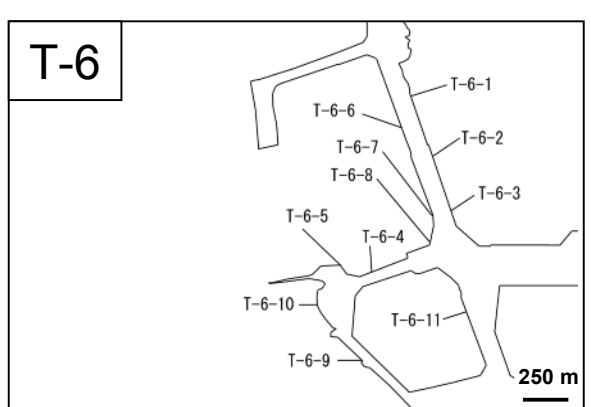
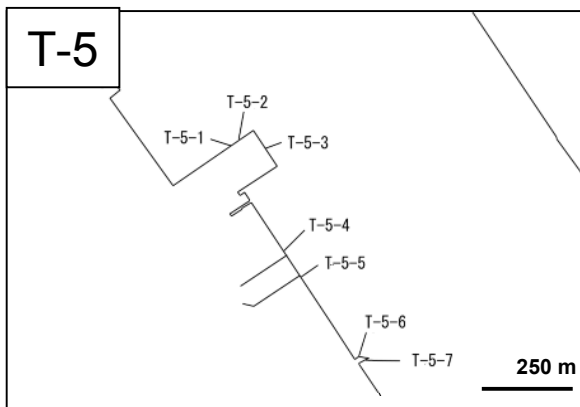
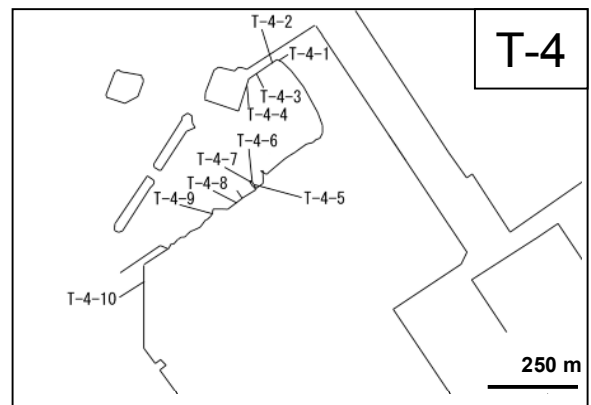
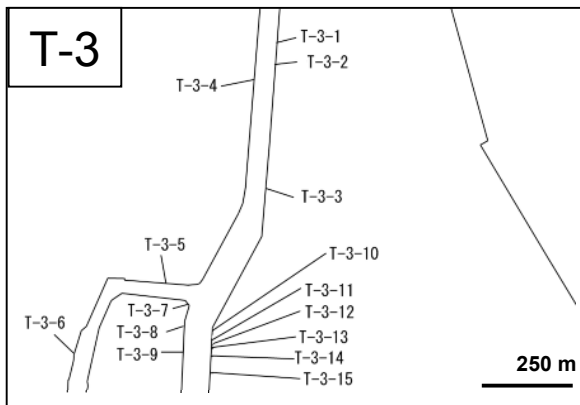
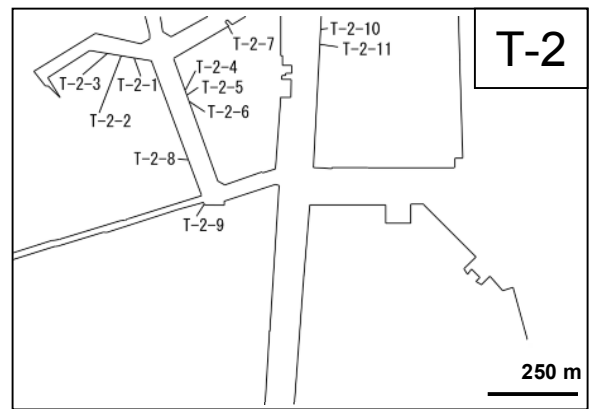


Fig. 2-6 Detailed maps showing the survey sites in the area T-1 to T-8.

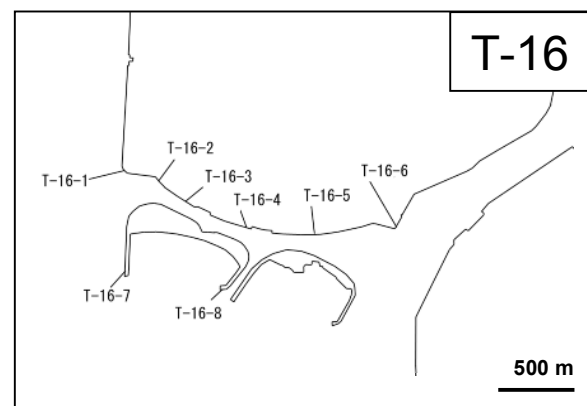
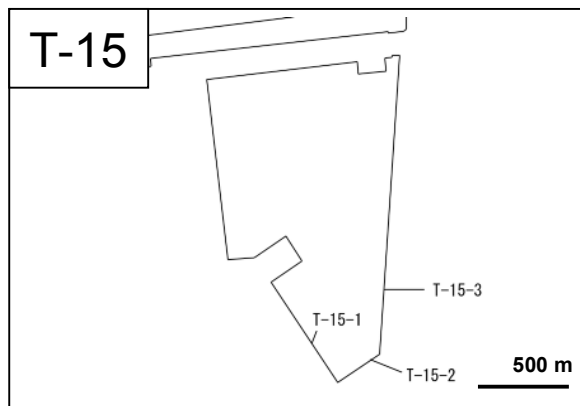
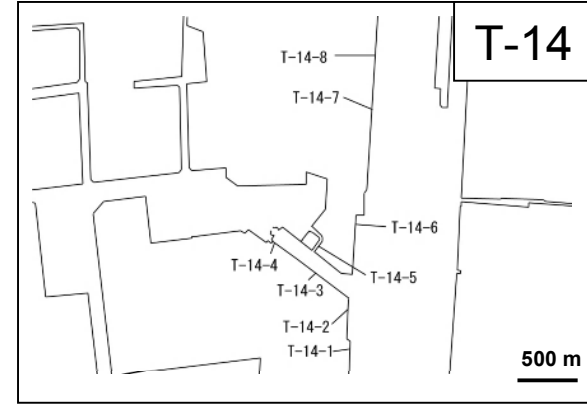
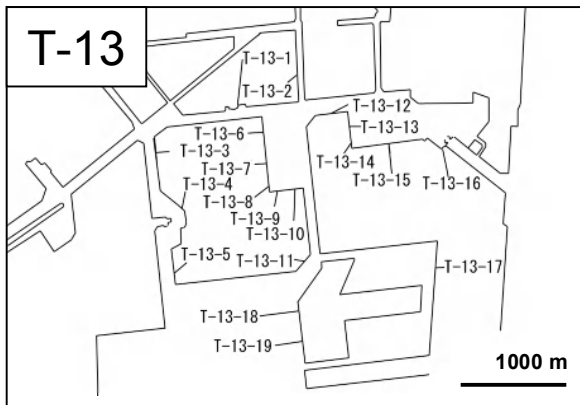
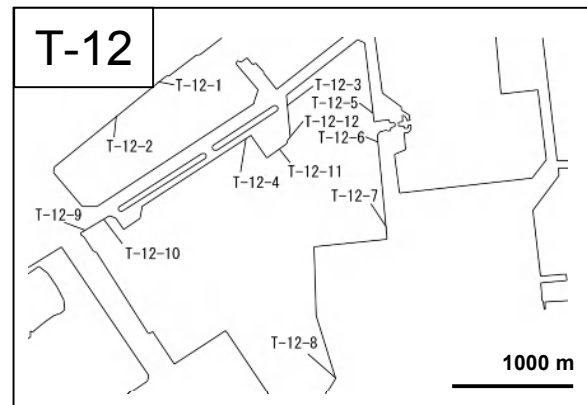
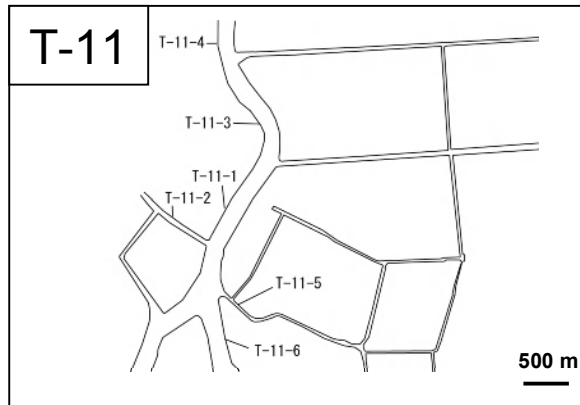
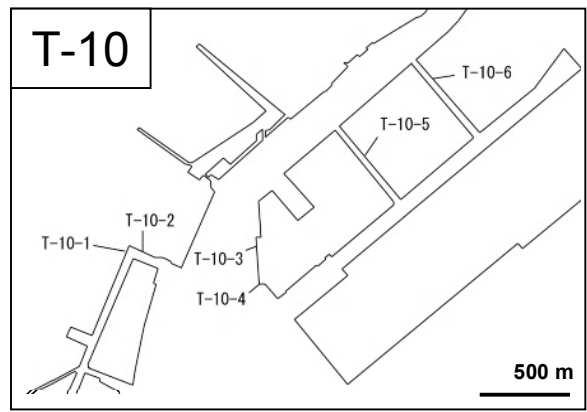
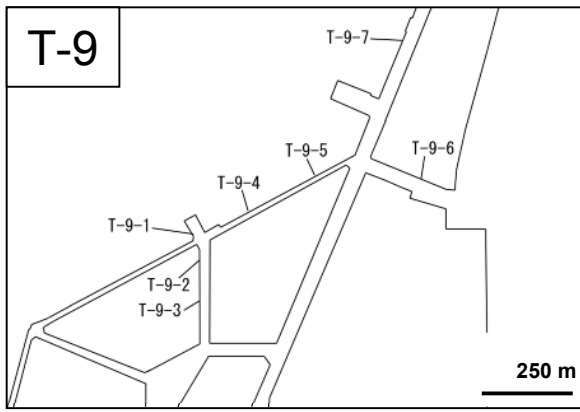


Fig. 2-7 Detailed maps showing the survey sites in the area T-9 to T-16.

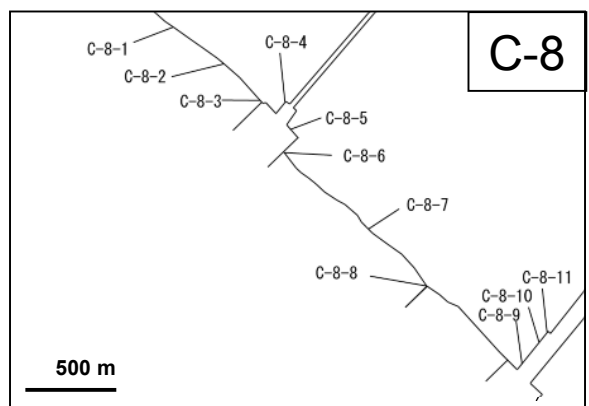
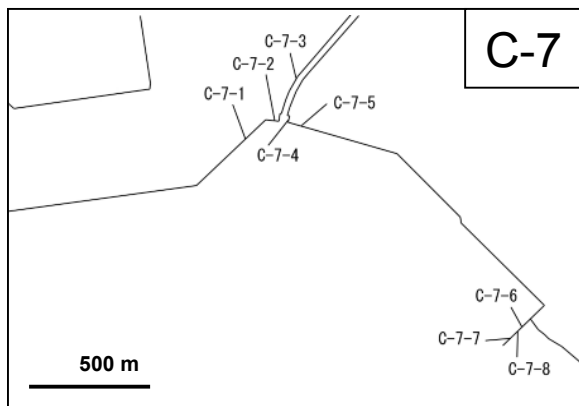
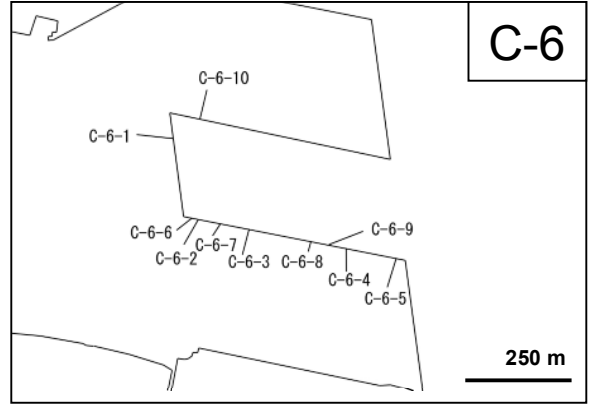
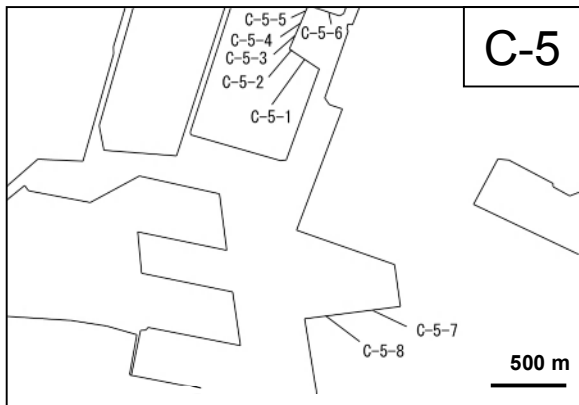
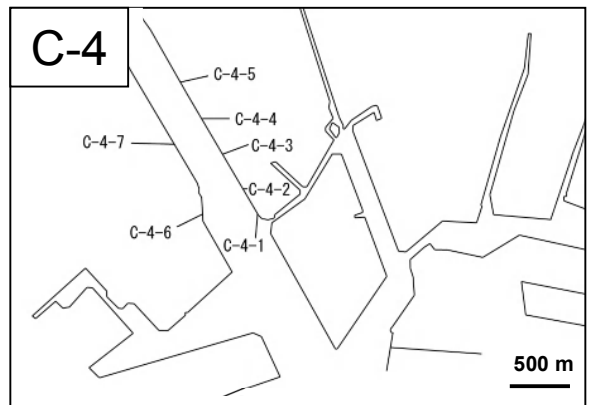
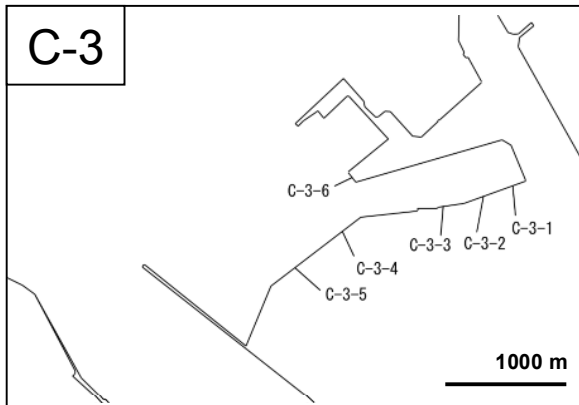
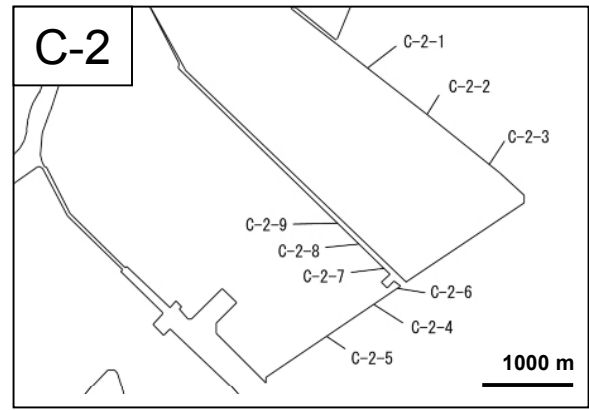
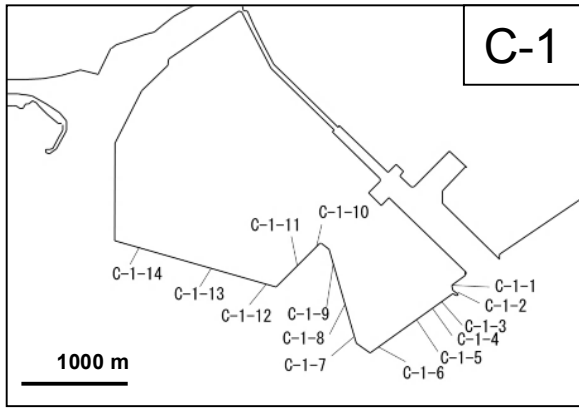


Fig. 2-8 Detailed maps showing the survey sites in the area C-1 to C-8.

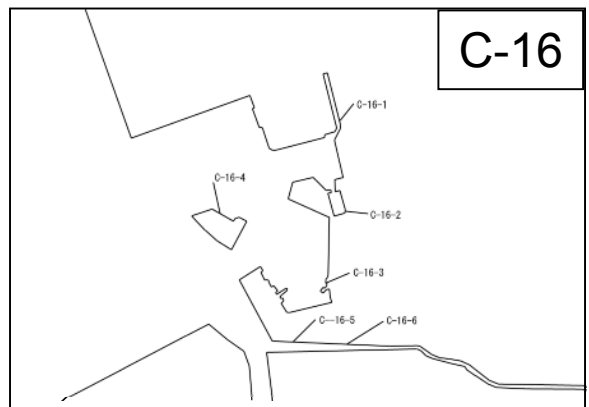
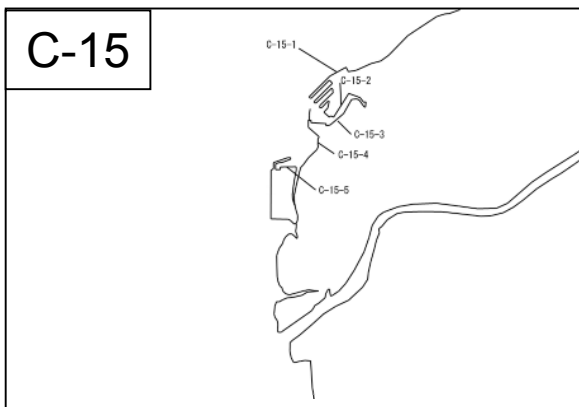
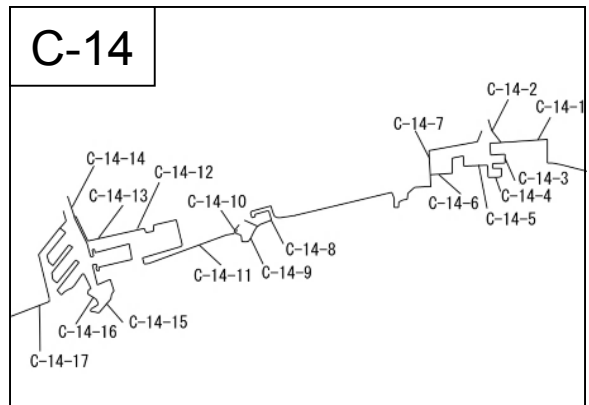
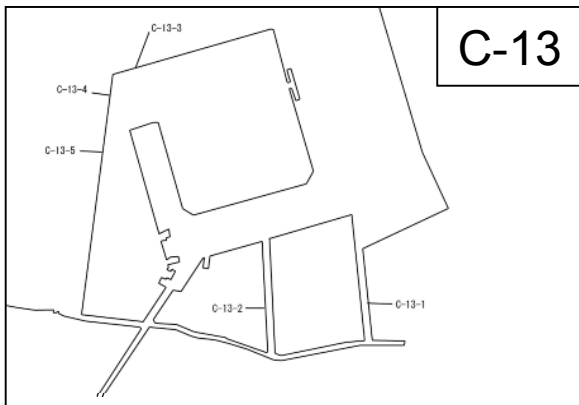
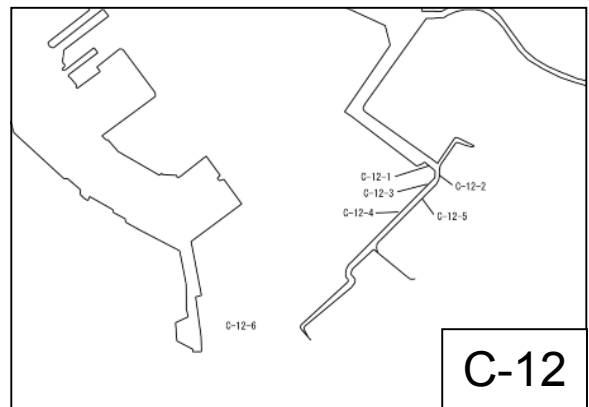
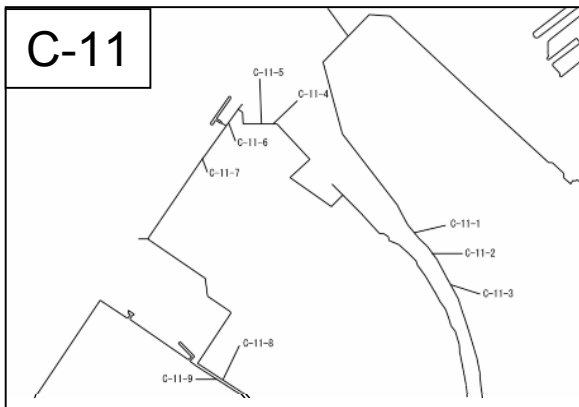
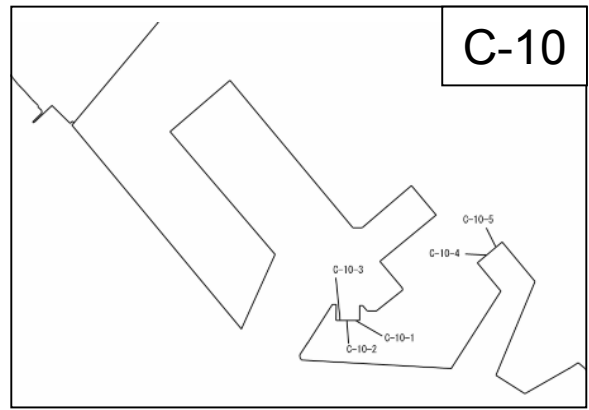
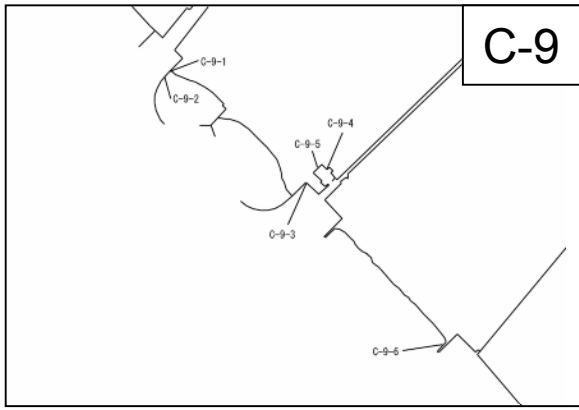


Fig. 2-9 Detailed maps showing the survey sites in the area C-9 to C-16.

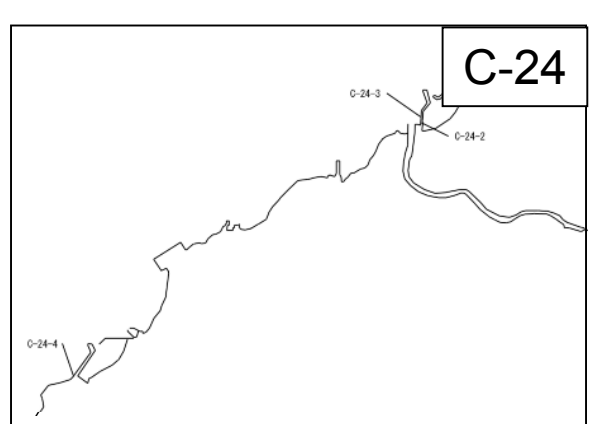
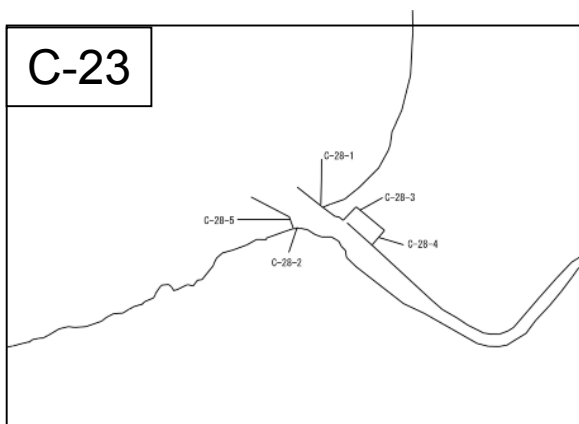
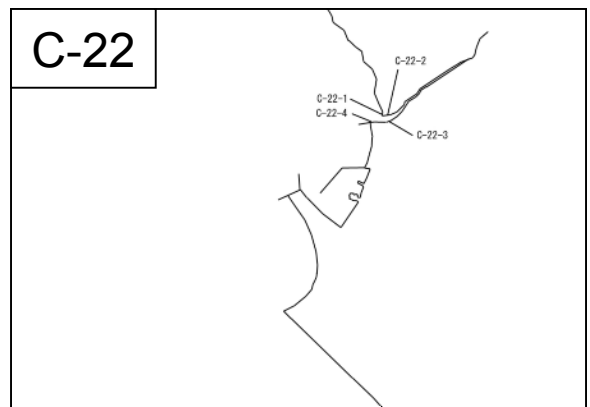
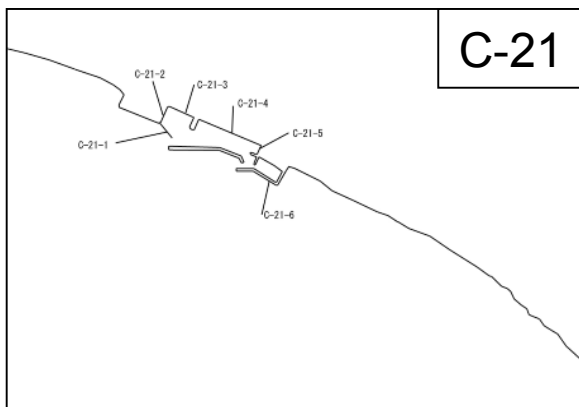
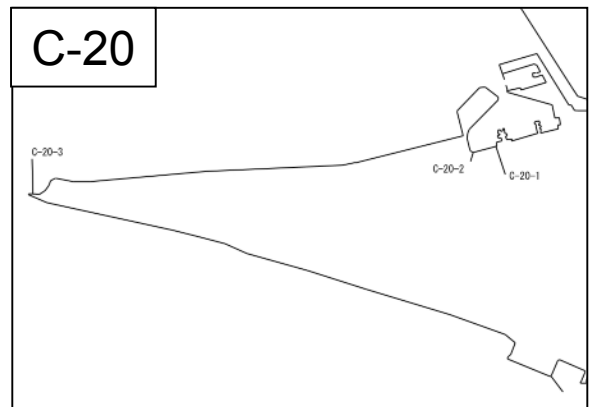
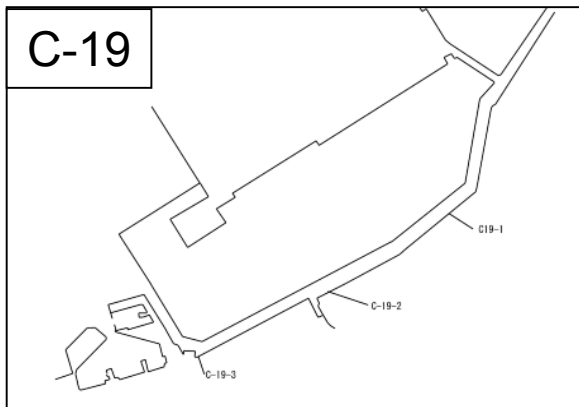
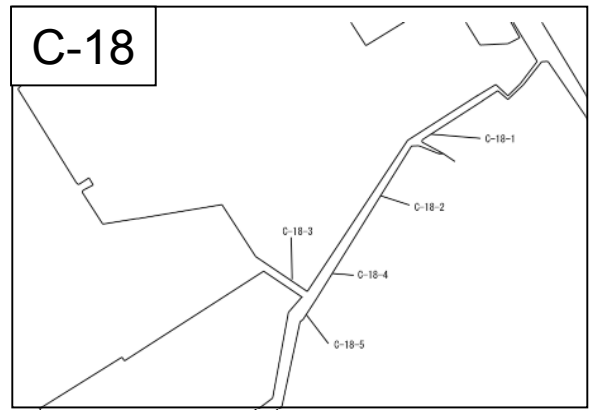
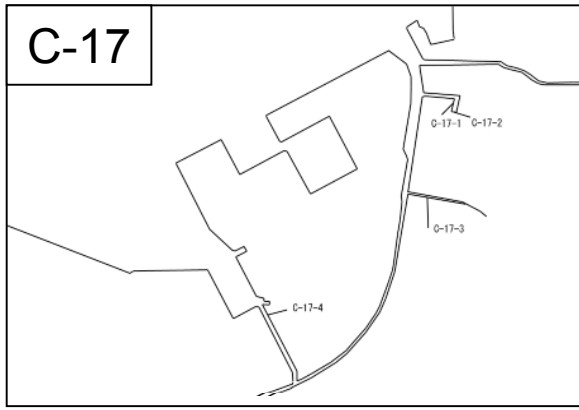


Fig. 2-10 Detailed maps showing the survey sites in the area C-17 to C-24.

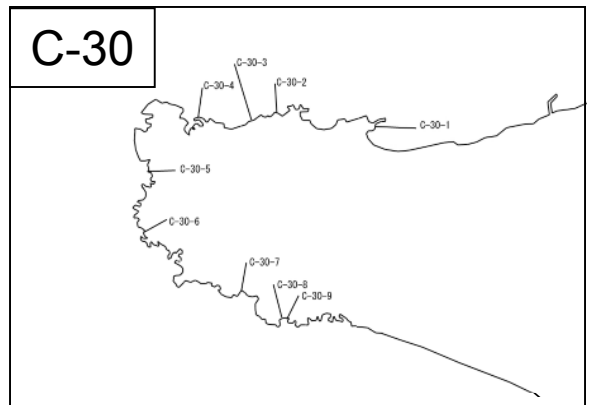
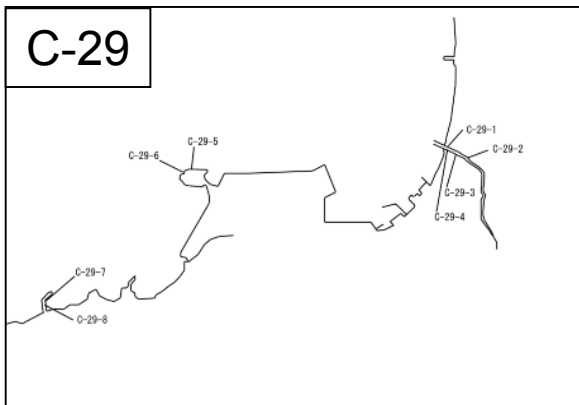
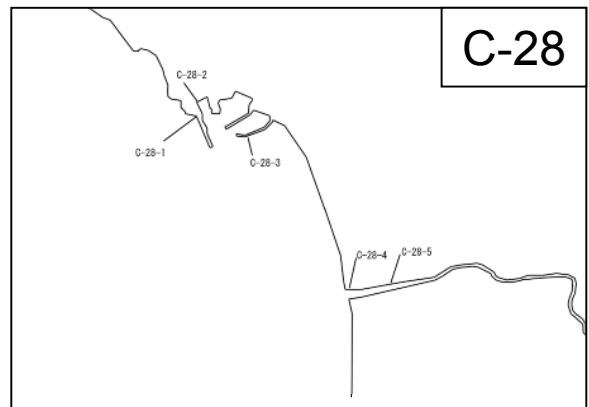
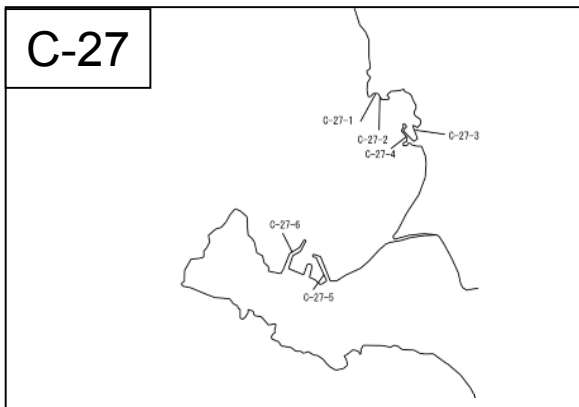
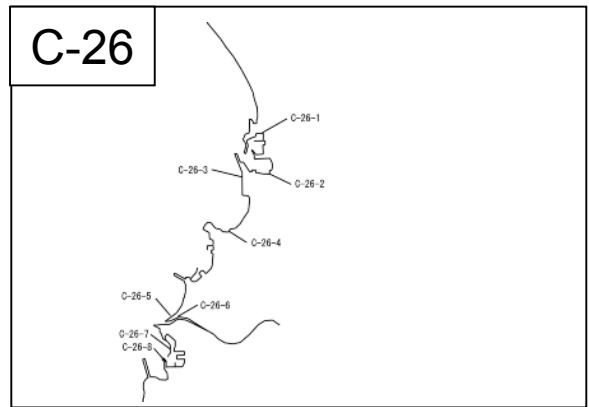
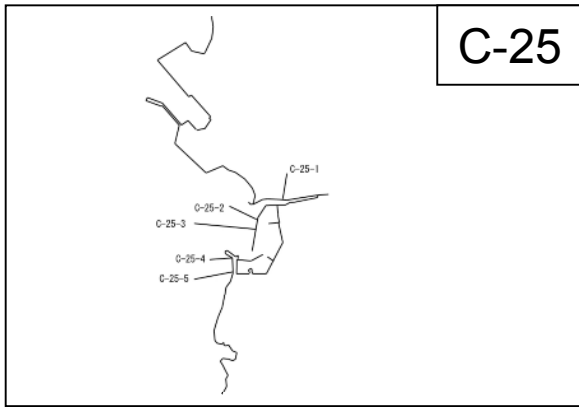
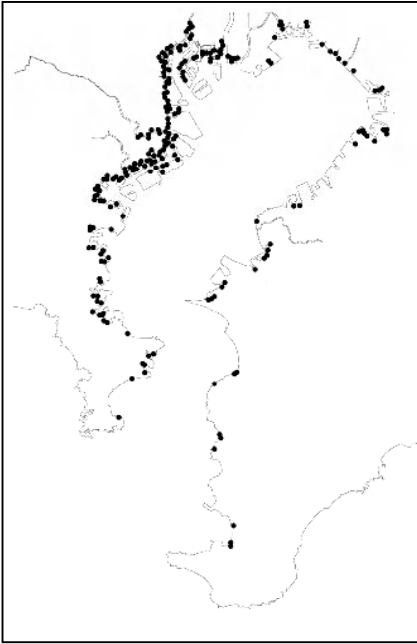
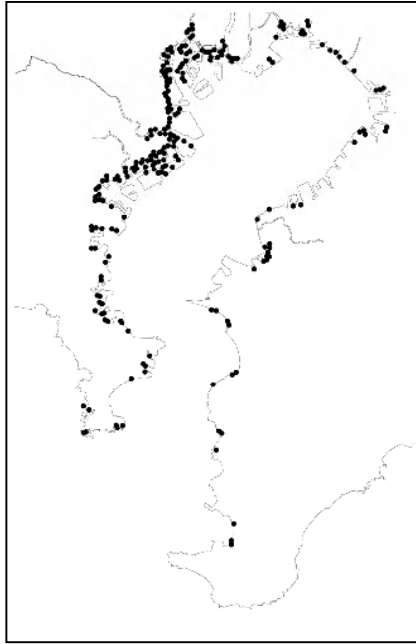


Fig. 2-11 Detailed maps showing the survey sites in the area C-25 to C-30.

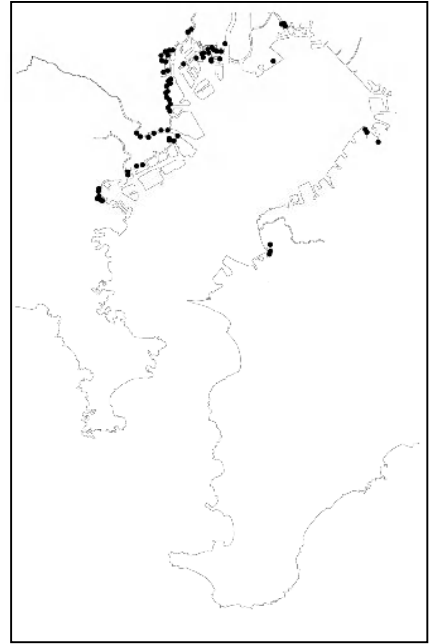
Amphibalanus amphitrate



Fistulobalanus albicostatus



Fistulobalanus kondakovi



Amphibalanus eburneus



Amphibalanus improvisus



Chthamalus challengerii

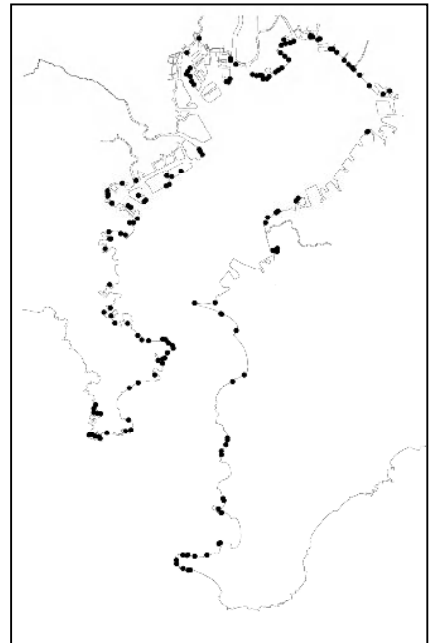
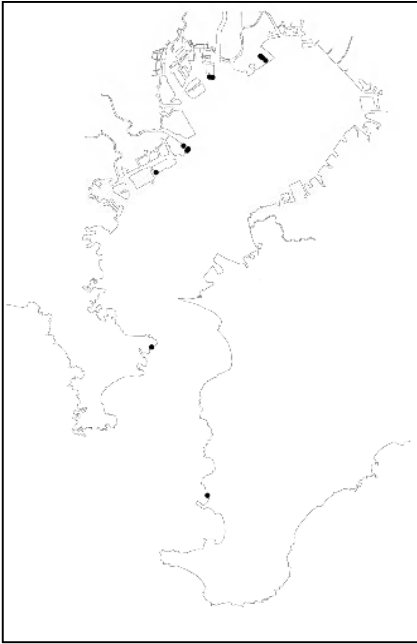
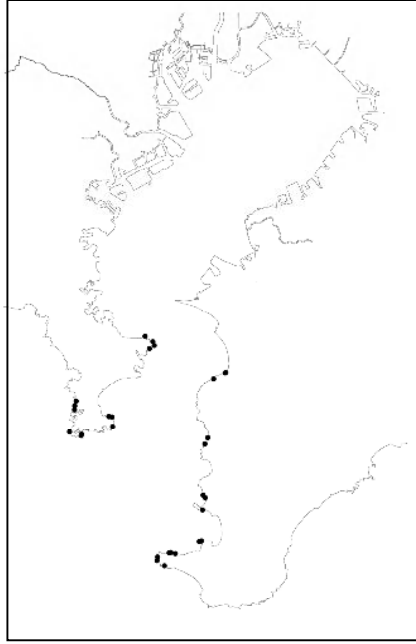


Fig. 2-12 Distributions of barnacles in Tokyo Bay. Closed circle indicated that the species was found in the survey sites.

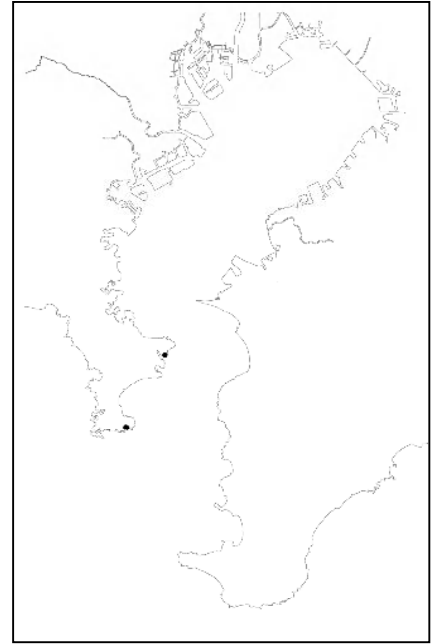
Balanus trigonus



Tetraclita japonica



Megabalanus rosa



Megabalanus volcano



Fig. 2-13 Distributions of barnacles in Tokyo Bay. Closed circle indicated that the species was found in the survey sites.

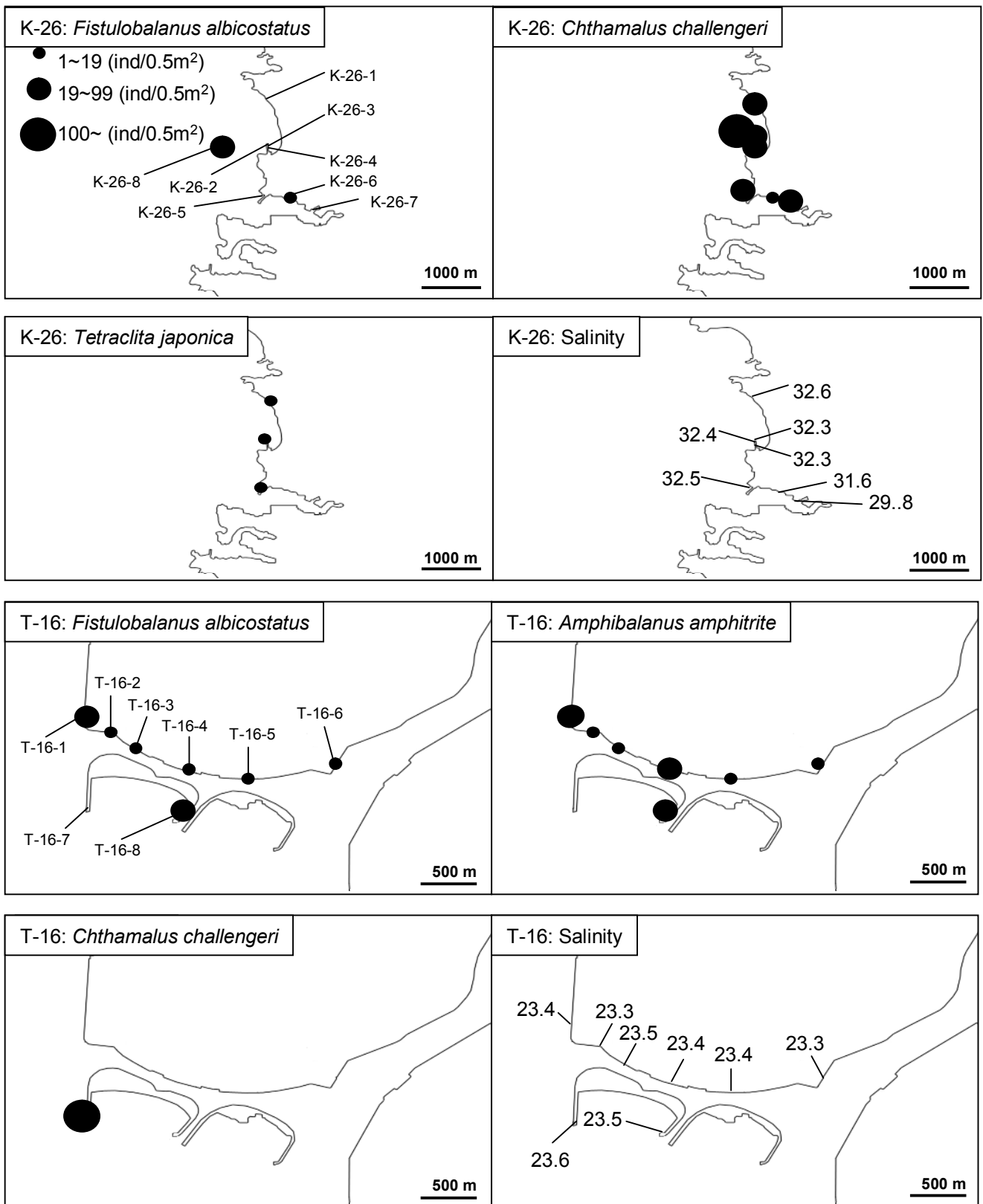


Fig. 2-14 Number of individuals of barnacles that appeared and salinity of each observation sites in K-26 and T-16.

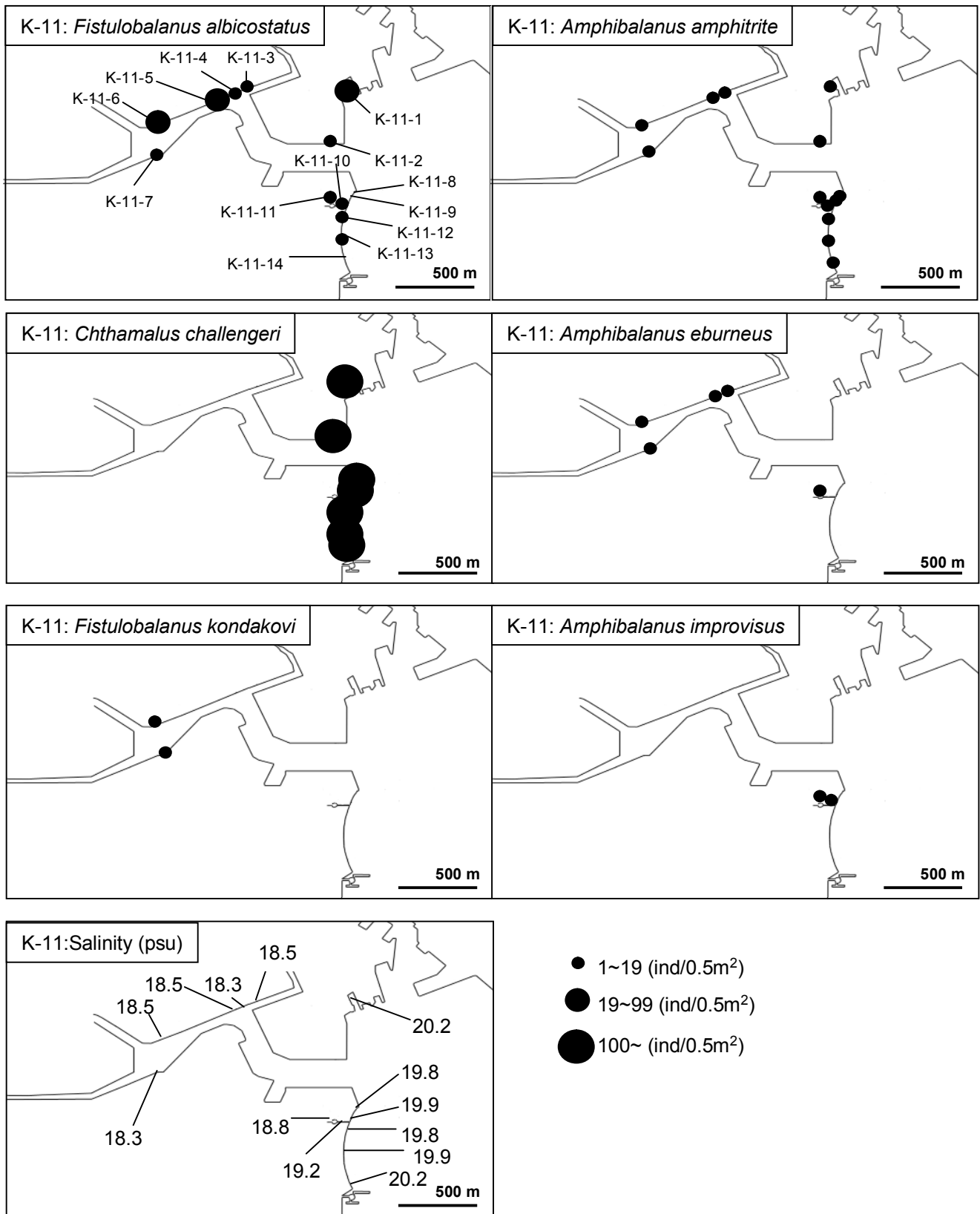


Fig. 2-15 Number of individuals of barnacles that appeared and salinity of each observation sites in K-11.

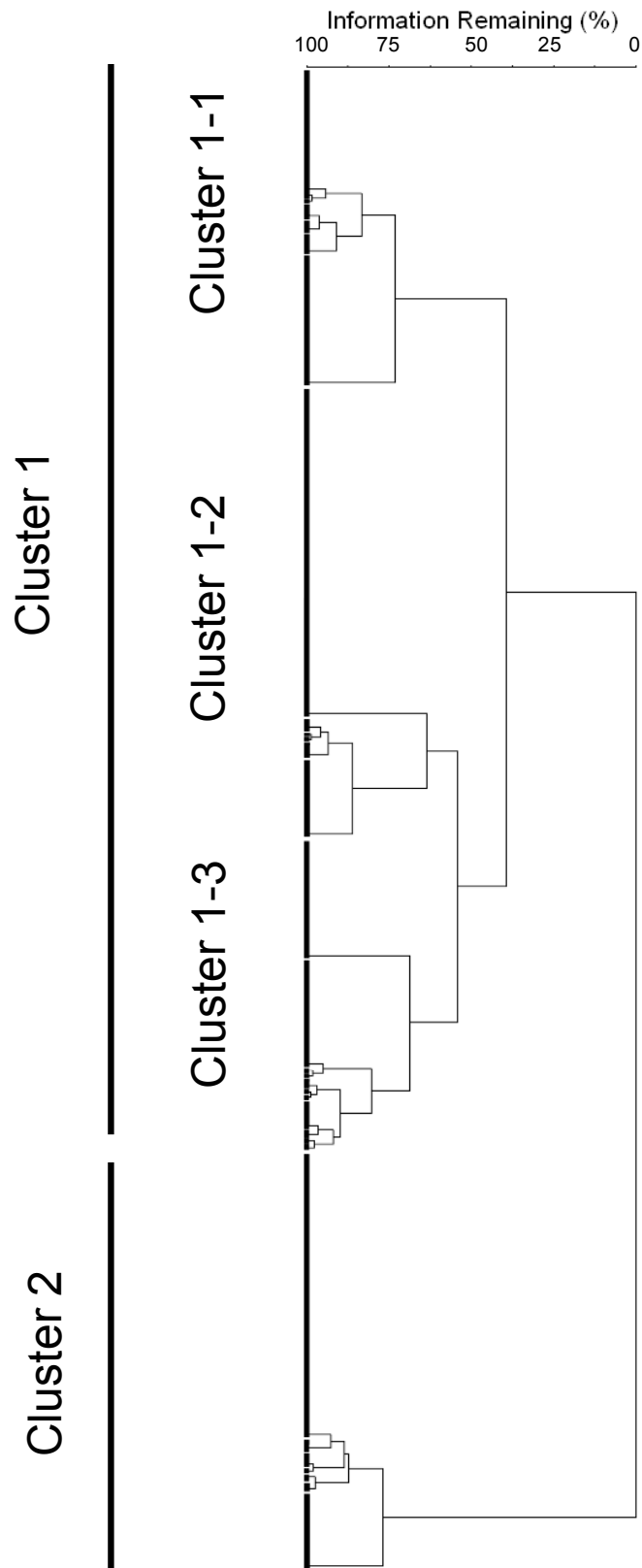


Fig. 2-16 Barnacle community cluster dendrogram of the total of 558 survey sites, based on the Pythagorean similarity matrix and using Ward's method. Because the survey points are too many, only the main clusters are shown.

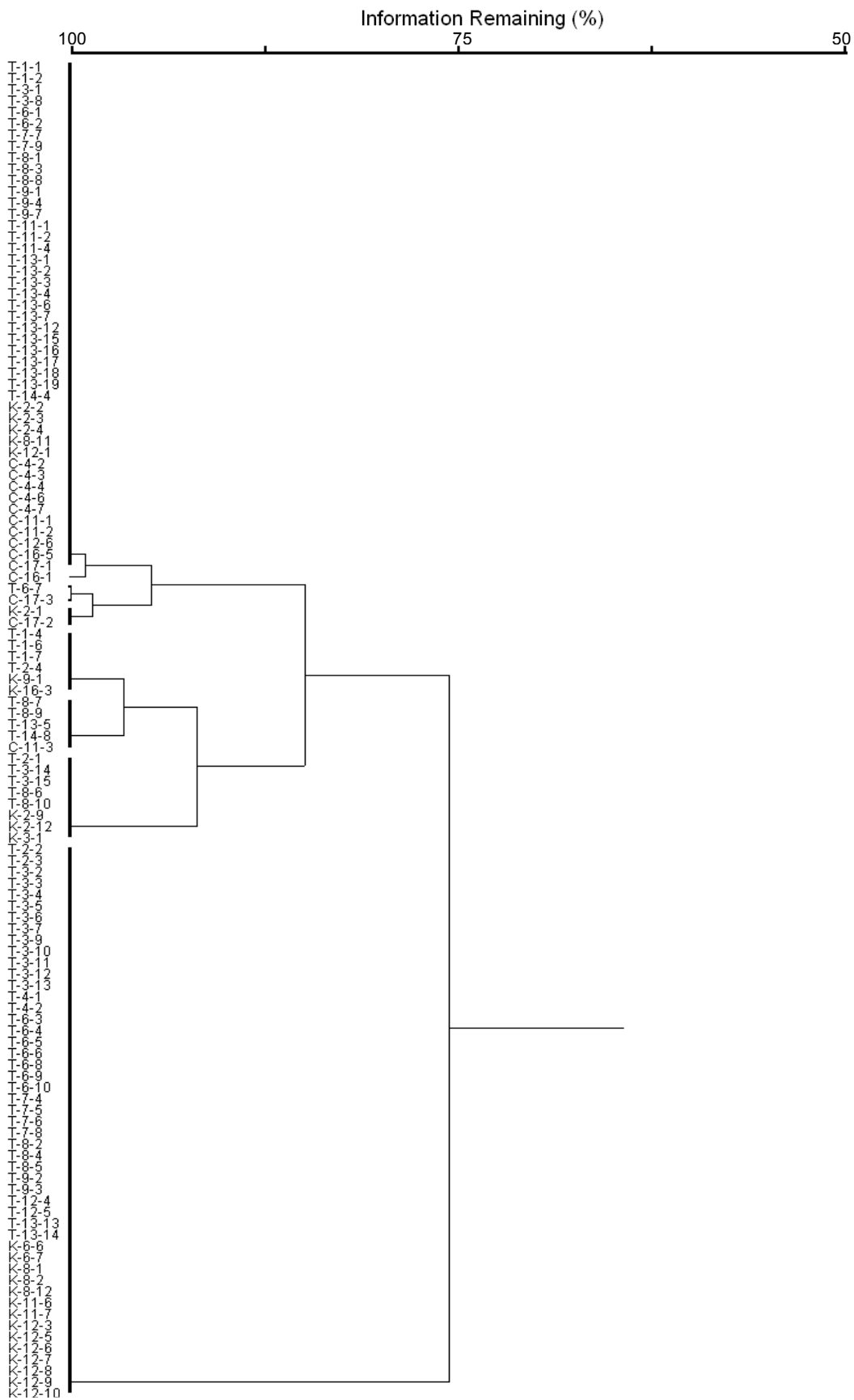


Fig. 2-17 Detailed dendrogram of Cluster 1-1, shown in Fig. 2-16.

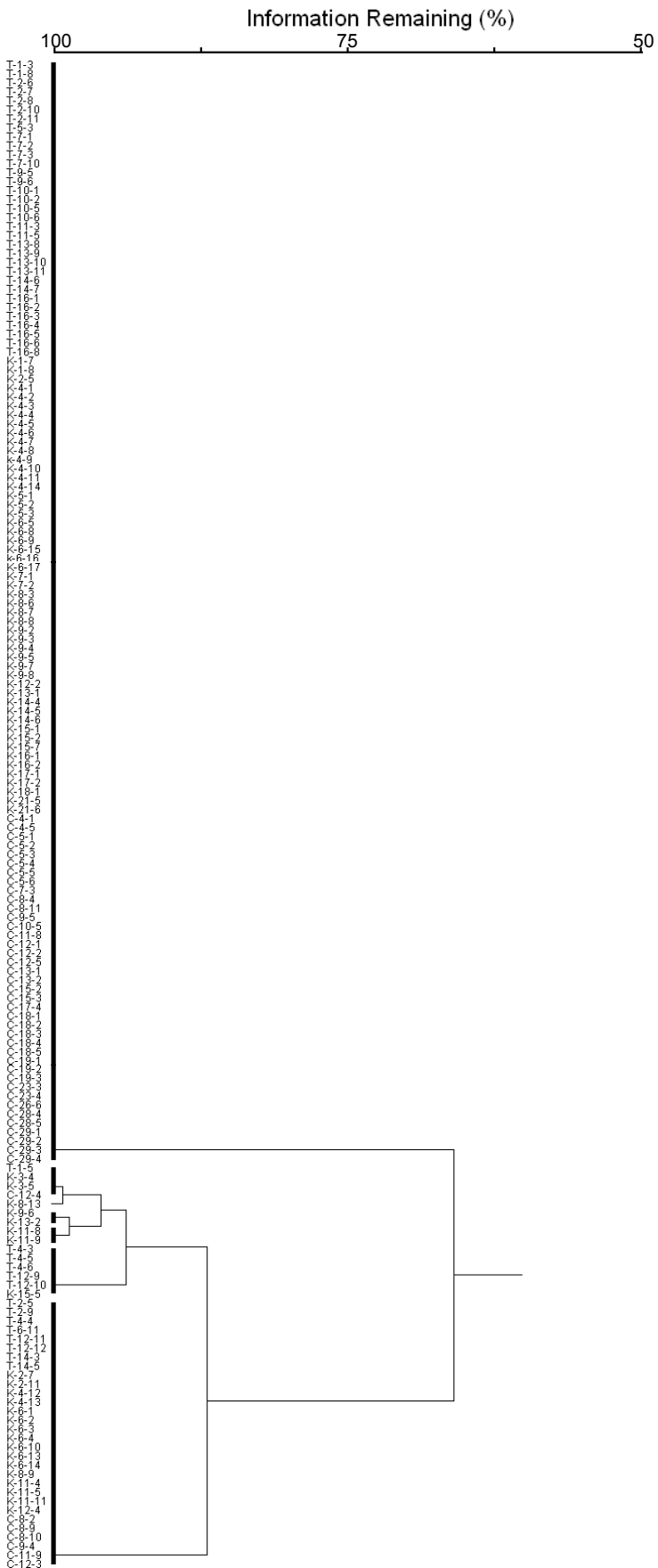


Fig. 2-18 Detailed dendrogram of Cluster 1-2, shown in Fig. 2-16.

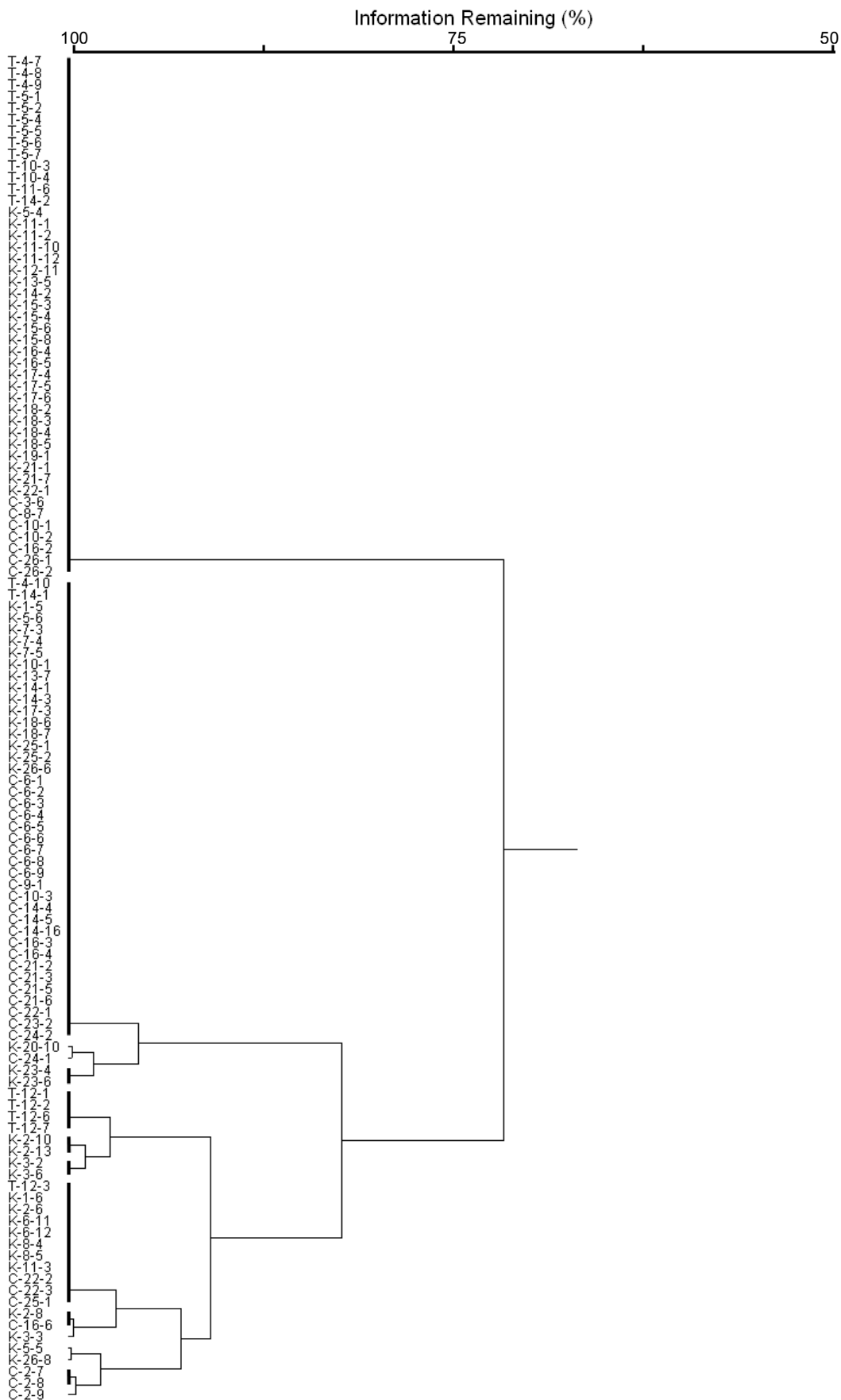


Fig. 2-19 Detailed dendrogram of Cluster 1-3, shown in Fig. 2-16.

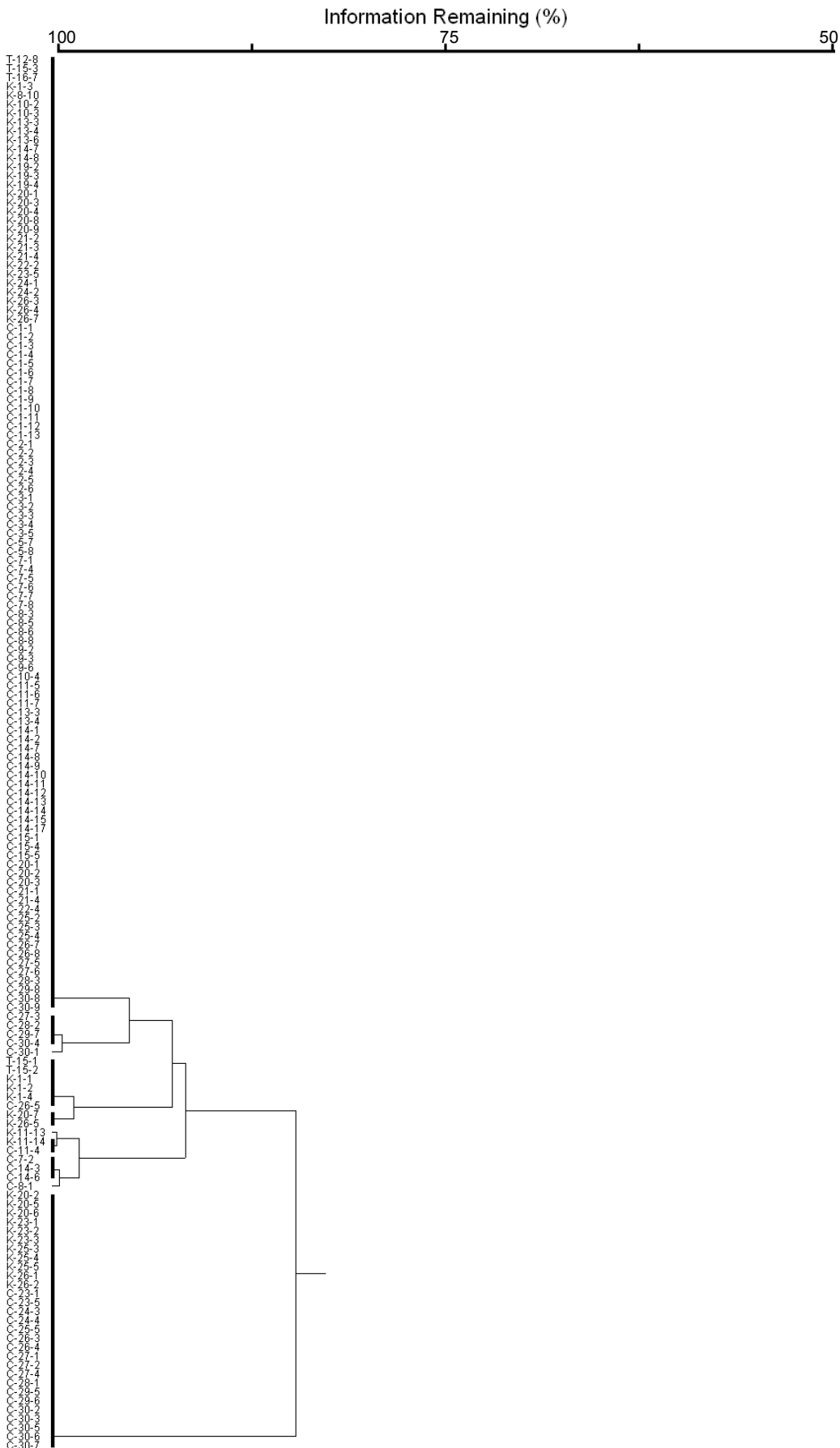


Fig. 2-20 Detailed dendrogram of Cluster 2, shown in Fig. 2-16.

第3章 アメリカフジツボとヨーロッパフジツボの広域個体群間の遺伝的変異

3-1 序論

第2章で行った東京湾潮間帯のフジツボ類の分布調査で、アメリカフジツボ (*Amphibalanus eburneus*) とヨーロッパフジツボ (*Amphibalanus improvisus*) は湾奥部の汽水域にのみ出現した。2種の外来フジツボの分布拡大手段を解明するためには、個体群の維持機構や個体群間の交流の頻度を解明することが重要であると考えられるが、これらに関する報告は少ない。

近年では成体の遺伝的変異から分布拡大や個体群間の交流について解析する手法がとられている場合がある。集団遺伝学では同種内の地理的集団間の遺伝的な差異は対立遺伝子の頻度の違いによって捉えられ、その程度は集団の隔離後の経過時間に比例すると考えられている(秋元ら, 2003)。一般的にミトコンドリア DNA は核ゲノムにコードされている DNA と比較して小型であり、進化速度が速いため多くの変異を蓄積していることが多くの種で報告されている (Brown, 1983; Moritz *et al*, 1987; 味岡ら, 2007)。その中でも CO I 領域および D-loop 領域は進化速度が速いことから、種内多型を比較する際に適した領域であるとされており(小池・松井, 2003)、集団遺伝構造解析で頻繁に分析対象とされている(西田ら, 1998)。

本章では外来種アメリカフジツボとヨーロッパフジツボの国内における分布

拡大、および地域個体群維持の実態を調べるために、アメリカフジツボについてはミトコンドリア DNA の CO I 領域の塩基配列を、ヨーロッパフジツボについてはミトコンドリア DNA の D-loop 領域の塩基配列を比較対象として、地域個体群の集団遺伝構造と遺伝的交流の実態を明らかにすることを目的とした。

3-2 材料と方法

3-2-1 アメリカフジツボのミトコンドリア DNA CO I 領域の解析

試料

解析に用いたアメリカフジツボの成体個体は 2006 年 4 月から 2008 年 8 月にかけて、夢の島 (YM; 東京都)、越中島 (EC; 東京都)、お台場 (OD; 東京都)、芝浦 (SU; 東京都)、多摩川河口 (TG; 神奈川県)、横浜 (YH; 神奈川県)、佐渡 (SD; 新潟県)、清水 (SM; 静岡県)、浜名湖 (HN; 静岡県)、名古屋 (NG; 愛知県)、新淀川河口 (SY; 大阪府)、住吉川河口 (SR; 兵庫県)、本川河口 (HK; 広島県) の 13 地域で採集し (Fig. 3-1)、その場で 80% エタノールで固定して研究室に持ち帰った。

DNA 抽出および PCR

持ち帰った試料から筋組織を約 30 mg 取り出し 2 mL チューブに入れ、500

μL の 8 M TENS-U バッファーと $10\ \mu\text{L}$ のプロテナーゼ K (TAKARA 社) を加えて 37°C で一晩インキュベートした。十分に溶解したことを確認し、 $10\ \text{mg/mL}$ のリボヌクレアーゼ(WAKO 純薬) を $1\ \mu\text{L}$ 加え、 37°C のウォーターバス中で 1 時間インキュベートし、RNA を分解した。フェノール/クロロホルム法によって粗 DNA の抽出し、エタノール沈殿法により DNA を精製した。精製した粗 DNA は $20\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ になるよう TE 緩衝液で調整した。

目的とするミトコンドリア DNA の CO I 領域を含む配列は Gene Bank (DDBJ) で検索し、 $323\ \text{bp}$ の大きさの配列を実験の対象とした。プライマー作製ソフト (Primer3) を用いてプライマーを作製し、

EB-F 5'-CACAAACGACCAACAATTTTCA-3' と

EB-R 5'-GCACGGTTAAACACCAACAA-3' を PCR で使用するプライマーとした。

PCR 反応条件は、Template DNA を $2.0\ \mu\text{L}$ 、 $10\times\text{PCR buffer}$ を $1.5\ \mu\text{L}$ 、 $2\ \text{mM}$ の dNTP を $1.5\ \mu\text{L}$ 、 $25\ \text{mM}$ の MgCl_2 を $0.9\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \text{mM}$ プライマーを各 $0.75\ \mu\text{L}$ 、Taq Polymerase (TOYOBO 社) を $0.1\ \mu\text{L}$ 加え、滅菌超純水で $15\ \mu\text{L}$ になるようにメスアップした。DNA Thermal Cycler (TAKARA 社) を用いて、 94°C 3 分の熱変性後、 94°C 45 秒、 63°C 45 秒、 72°C 1 分を 35 サイクル行い、最後に 72°C 7 分の伸長反応を行い、 4°C で保存した。得られた PCR 産物

を電気泳動し、目的の領域が増幅されているか確認した。

塩基配列決定

PCR 産物 $8\ \mu\text{L}$ に対し、 $4\ \mu\text{L}$ の ExoSapIT (Amersham Biosciences 社) を加え、 37°C 30 分、 80°C 20 分の反応条件で PCR 産物の精製を行った。

シーケンス反応には BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI PRISM) を使用した。精製した PCR 産物を $3.0\ \mu\text{L}$ 、 $10\times$ Buffer を $1.0\ \mu\text{L}$ 、 $25\ \text{mM}$ の MgCl_2 を $1.0\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \text{mM}$ の Primer を $1.0\ \mu\text{L}$ 、BigDye を $0.5\ \mu\text{L}$ 加え、滅菌超純水で $10\ \mu\text{L}$ になるように調整した。反応条件は 96°C 3 分の熱変性後、 96°C 10 秒、 50°C 5 秒、 60°C 4 分を 25 サイクル行い、 4°C で保存した。

シーケンス反応液 $10\ \mu\text{L}$ に $3\ \text{M}$ NaOAc を $1.5\ \mu\text{L}$ 、 95% エタノールを $31.2\ \mu\text{L}$ 、滅菌超純水 を $14.5\ \mu\text{L}$ を加え、緩やかに攪拌し、 20°C で 15 分間静置した。 20°C 、 $4,000\ \text{rpm}$ の条件で 30 分の遠心分離を行い、上清を除いた。 70% エタノールを $75\ \mu\text{L}$ 加え、緩やかに攪拌した後、 20°C 、 $4,000\ \text{rpm}$ の条件で 15 分間の遠心分離を行った。上清を除き、完全に乾燥させた後、 $10\ \mu\text{L}$ の Hidi を加え、ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いて電気泳動を行い、塩基配列を決定した。

データ解析

決定した塩基配列は Clustal W (Thompson, 1994)によるアライメントを行った後、DnaSP ver.4.0 (Rozas, 2003)を用いてハプロタイプ頻度を求めた。Roff and Bentzen(1989)によるモンテカルロシミュレーション法により、個体群間のハプロタイプ頻度の有意差検定を行った。また、遺伝子解析ソフト Arlequin ver. 2000 (Schneider *et al.*, 2000)を用いてハプロタイプ多様度(hd)、塩基多様度(Pi)を求め、個体群間がどの程度遺伝的に分化をしているのかを調べるために遺伝的分化計数(F_{st})を、個体群間がどの程度遺伝的に離れているのかを調べるためにの遺伝距離(D_{xy})を求めた。また Mega4 (Tamura *et al.*, 2007)を用いて、個体群間のハプロタイプの類似性を求めるために近接結合法および UPGMA 法によってデンドログラムを作成し、地域個体群間の遺伝的類似性を求めるために遺伝距離 (D_{xy})を用いて UPGMA 法によってデンドログラムを作成した。

3-2-2 ヨーロッパフジツボのミトコンドリア DNA D-loop 領域の解析

試料

解析に用いたヨーロッパフジツボの成体個体は 2006 年 4 月から 2008 年 8 月にかけて、葛西臨海公園 (KS; 東京都)、多摩川河口 (TG; 東京都)、清水 (SM; 静岡県)、名古屋 (NG; 愛知県)、新淀川河口 (SY; 大阪府)、住吉川河口 (SR; 兵

庫県) の 6 地域で採集した (Fig. 3-2) し、その場で 80%エタノールで固定して研究室に持ち帰った。

DNA 抽出および PCR

持ち帰った試料から筋組織を約 30 mg 取り出し 2 mL チューブに入れ、500 μ L の 8M TENS-U バッファーと 10 μ L のプロテナーゼ K (TAKARA 社) を加えて 37°C で一晩インキュベートした。十分に溶解したことを確認し、10 mg/mL のリボヌクレアーゼ (WAKO 純薬) を 1 μ L 加え、37°C のウォーターバス中で 1 時間インキュベートし、RNA を分解した。フェノール/クロロホルム法によって粗 DNA の抽出し、エタノール沈殿法により DNA を精製した。精製した粗 DNA は 20 μ g/ μ L になるよう TE 緩衝液で調整した。

Gene Bank (NCBI) でミトコンドリア DNA の D-loop 領域を含む配列を検索し、208 bp の大きさの塩基配列を実験の対象とした。プライマー作製ソフト (Primer3) を用いてプライマーを作製し、

IM-F 5'-AAAAACTTCCTCTCACAAGGATG-3' と

IM-R 5'-TTTGAAGACAATACCTCACAAATTC-3' を PCR で使用するプライマーとした。

PCR 反応条件は Template DNA を 2.0 μ L、10 \times PCR buffer を 1.5 μ L、2 mM

の dNTP を $1.5 \mu\text{L}$ 、 MgCl_2 を $0.9 \mu\text{L}$ 、 10 mM プライマーを各 $0.75 \mu\text{L}$ 、Taq Polymerase (TAKATA 社) を $0.1 \mu\text{L}$ 加え、滅菌超純水で $15 \mu\text{L}$ になるようにメスアップした。DNA Thermal Cycler (TAKARA 社) を用いて、 94°C 3 分の熱変性後、 94°C 45 秒、 62°C 45 秒、 72°C 1 分を 35 サイクル行い、最後に 72°C 7 分の伸長反応を行い、 4°C で保存した。得られた PCR 産物を電気泳動し、目的の領域が増幅されているか確認した。その後、PCR 産物 $8 \mu\text{L}$ に対し、 $4 \mu\text{L}$ の ExoSapIT (Amersham Biosciences 社) を加え、 37°C 30 分、 80°C 20 分の反応条件で PCR 産物の精製を行った。

塩基配列決定

シーケンス反応には BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI PRISM) を使用した。精製した PCR 産物を $3.0 \mu\text{L}$ 、 $10\times$ Buffer を $1.0 \mu\text{L}$ 、 25 mM の MgCl_2 を $1.0 \mu\text{L}$ 、 10 mM の Primer を $1.0 \mu\text{L}$ 、BigDye を $0.5 \mu\text{L}$ を加え、滅菌超純水で $10 \mu\text{L}$ になるように調整した。反応条件は 96°C 3 分の熱変性後、 96°C 10 秒、 50°C 5 秒、 60°C 4 分を 25 サイクル行い、 4°C で保存した。反応液 $10 \mu\text{L}$ に 3M NaOAc を $1.5 \mu\text{L}$ 、 95% エタノールを $31.2 \mu\text{L}$ 、滅菌超純水を $14.5 \mu\text{L}$ を加え、緩やかに攪拌し、 20°C で 15 分間静置した。 20°C 、 $4,000 \text{ rpm}$ の条件で 30 分の遠心分離を行い、上清を除いた。 70% エタノールを $75 \mu\text{L}$ 加

え、緩やかに攪拌した後、20°C、4,000 rpm の条件で 15 分間の遠心分離を行った。上清を除き完全に乾燥させた後、10 μ L の Hidi を加え、ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いて電気泳動を行い、塩基配列を決定した。

データ解析

決定した塩基配列は Clustal W (Thompson, 1994) によるアライメントを行った後、DnaSP ver.4.0 (Rozas, 2003) を用いてハプロタイプ頻度を求めた。Roff and Bentzen (1989) によるモンテカルロシミュレーション法により、個体群間のハプロタイプ頻度の有意差検定を行った。また、遺伝子解析ソフト Arlequin ver. 2000 (Schneider *et al.*, 2000) を用いてハプロタイプ多様度 (h_d)、塩基多様度 (P_i) を求め、個体群間がどの程度遺伝的に分化をしているのかを調べるために遺伝的分化計数 (F_{st}) を、個体群間がどの程度遺伝的に離れているのかを調べるためにの遺伝距離 (D_{xy}) を求めた。また Mega4 (Tamura *et al.*, 2007) を用いて、個体群間のハプロタイプの類似性を求めるために近接結合法および UPGMA 法によってデンドログラムを作成し、地域個体群間の遺伝的類似性を求めるために遺伝距離 (D_{xy}) を用いて UPGMA 法によってデンドログラムを作成した。

3-3 結果

3-3-1 アメリカフジツボのミトコンドリア DNA CO I 領域

13 の調査地域から採集した合計 646 個体のアメリカフジツボについて、ミトコンドリア DNA の CO I 領域およそ 320 bp の塩基配列を決定した。塩基配列を比較したところ、26 の部位で変異が確認された。検出されたハプロタイプは 20 種類で (Table 3-1)、各地域で検出されたハプロタイプは、夢の島 (YM) では 1, 2, 3, 9, 10, 11, 12, 13, 14、越中島 (EC) では 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11、芝浦 (SU) では 1, 2, 3, 6, 8, 9, 10, 11、お台場 (OD) では 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11、多摩川河口 (TG) では 1, 2, 3, 5, 9, 13, 14, 15、横浜 (YH) では 1, 2, 3, 4, 9、清水港 (SM) では 1, 2, 3, 9, 10, 11、浜名湖 (HN) では 1, 3, 9, 10, 11, 12、名古屋 (NG) では 1, 8, 9, 10, 11, 12、新淀川河口 (SY) では 9, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 20、住吉川河口 (SR) では 9, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 20、本川河口 (HK) では 9, 10, 13, 17, 18, 19、佐渡 (SD) では 9, 10, 11, 20 だった。各採集場所で検出された各ハプロタイプの頻度 (Fig3-3) では、ハプロタイプ 9 が全地域で検出され、全地域におけるハプロタイプの 39.94% を占めた。また、名古屋 (NG) と新淀川河口 (SY) の間を境に西と東で出現ハプロタイプの頻度が異なり、西ではハプロタイプ 9 の頻度が 34.18% と最も高く、次いでハプロタイプ 10 の頻度が 25.64% だったのに対し、東ではハプロタイプ 9 の頻度が 37.63% と最も高く、次いでハプロタイプ

1, 2 の頻度がそれぞれ 17.59%と 15.34%だった (Fig. 3-3)。検出されたハプロタイプ
の塩基配列を、1000 回のブートストラップによる近隣結合法および
UPGMA 法によって作成したデンドログラムで類似性を比較した結果、近接結
合法では検出された 20 のハプロタイプは (1・4・5・6・8・9・10)、(2・3・11・
12)、(13・15・16・17・19・20)、14、(7・18)にクラスターが分かれ(Fig. 3-4)、
UPGMA 法では検出された 20 のハプロタイプは (1・4・5・6・8・10)、9、(2・
3・7・11・12・14)、(13・15・16・17・19・20)、18 にクラスターが分かれた (Fig.
3-5)。各地域個体群のハプロタイプ多様度 (hd)は 0.2731 から 0.8130 の範囲で
高くなく、塩基多様度 (Pi)は 0.0048 から 0.0165 の範囲で低かった (Table 3-2)。

遺伝的多様性が個体群間で均一なものか、あるいは特定の個体群で分化が起
こっているかを評価するために、各地域個体群間の遺伝的分化係数(F_{st})を求め
た結果、遺伝的分化係数 (F_{st})は越中島 (EC)と佐渡 (SD)の間で最大で 0.3506
の値を示し、芝浦 (SU)と清水港 (SM)の間で最小で-0.01439 の値を示した
(Table 3-3)。個体群間の遺伝的分化係数 (F_{st})の P 値を求めたところ、新淀川河
口 (SY)、住吉川河口 (SR)、本川河口 (HK)の個体群と夢の島 (YM)、越中島
(EC)、芝浦 (SU)、お台場 (OD)、多摩川河口 (TG)、横浜 (YH)、清水港 (SM)、
浜名湖 (HN)、名古屋 (NG)の個体群と佐渡 (SD)の個体群の多くで有意差が認
められたが、東京湾内の地域個体群間(夢の島; YM, 越中島; EC, 芝浦; SU, お台

場; OD, 多摩川河口; TG, 横浜; YH)では有意な差は認められず、大阪湾内(新淀川河口; SY, 住吉川河口; SR)と本川河口(HK)の各地域個体群間でも有意な差は認められなかった($p > 0.01$, Table 3-3)。また、個体群間の遺伝距離(d_{xy})を用いてUPGMA法によって個体群間の遺伝的類似性を比較した結果、多摩川河口(TG)、横浜(YH)、夢の島(YM)、名古屋(NG)、佐渡(SD)、お台場(OD)、越中島(EC)、住吉川河口(SR)、芝浦(SU)が同一のクラスターを形成し類似性が高いことが認められ、浜名湖(HN)、本川河口(HK)、住吉川河口(SR)、新淀川河口(SY)との類似性は低かった(Fig. 3-6)。

3-3-2 ヨーロッパフジツボのミトコンドリア DNA D-loop 領域

6の調査地域から採集した合計321個体のヨーロッパフジツボについて、ミトコンドリアDNAのD-loop領域およそ210bpの塩基配列を決定した。塩基配列を比較したところ、24の部位で変異が確認され、検出されたハプロタイプは19種類で(Table 3-4)、各地域で検出されたハプロタイプは、葛西臨海公園(KS)では1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11、多摩川河口(TG)では1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11、清水港(SM)では1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11、名古屋(NG)では1, 2, 3, 4, 7, 9, 10, 12, 13, 16、新淀川河口(SY)では9, 10, 13, 15, 16, 17, 18、住吉川河口(SR)では9, 11, 12, 14, 15, 17, 19だった。各地域におけるハプロタイプの頻度をみると(Fig.

3-7)、最も高い頻度で出現したハプロタイプは全ての採集地点で検出された 9 で、52.64%を占めた。また名古屋 (NG)と新淀川河口 (SY)の個体群を境に西と東で出現ハプロタイプの頻度が異なり、西ではハプロタイプ 9 の頻度が 56%と最も高く、次いでハプロタイプ 15 の頻度が 30%で高かったのに対し、東ではハプロタイプ 9 の頻度が 51%と最も高く、次いでハプロタイプ 1 の頻度が 22%と高かった。

検出されたハプロタイプの塩基配列を、1000 回のブートストラップによる近接結合法および UPGMA 法によって作成したデンドログラムで類似性を比較した結果、近接結合法では検出された 19 のハプロタイプは (1・2・3・7・8・9・10・16)、18、(5・6)、4、(12・19)、11、13、17、(14・15)に分かれ(Fig. 3-8)、UPGMA 法では(1・2・3・7・8・16)、(9・10)、(4・5・6・11・13・17)、(12・19)、(14・15)にクラスターが分かれた (Fig. 3-9)。ハプロタイプ多様度 (hd)は 0.5758 から 0.7 の範囲で高くなく、塩基多様度 (Pi)は 0.0062 から 0.0127 の範囲で低かった (Table 3-5)。各地域個体群間の遺伝的分化係数(Fst)を求めた結果、多摩川河口 (TG)と新淀川河口 (SY)での間で最大 0.2852 の値を示し、最も小さく新淀川河口 (SY)と住吉川河口 (SR)での間で最小 -0.0082 の値を示した (Table 3-6)。個体群間の遺伝的分化計数 (Fst)の P 値を求めたところ、葛西臨海公園 (KS)、多摩川河口 (TG)、清水港 (SM)、名古屋 (NG)の個体群と新淀川河口

(SY), 住吉川河口 (SR)の個体群で有意差が認められたが、東京湾内 (葛西臨海公園; KS, 多摩川河口; TG)の地域個体群間では有意な差は認められず、大阪湾内 (新淀川河口; SY, 住吉川河口; SR) の地域個体群間でも有意な差は認められなかった($p>0.01$, Table 3-6)。また、個体群間の遺伝距離 (d_{xy})を用いてUPGMA法によって個体群間の遺伝的類似性を比較した結果、新淀川河口 (SY)、住吉川河口 (SR)が他地域の個体群と比較して類似性が低かった (Fig. 3-10)。

3-4 考察

3-4-1 アメリカフジツボの COI 領域

日本におけるアメリカフジツボの各地域個体群のミトコンドリア DNA の COI 領域から検出されたハプロタイプの多様度 (hd)は、佐渡 (SD)以外の地域個体群で 0.6897 から 0.8130 の値を示し、塩基多様度 (Pi)についても佐渡 (SD)以外の地域個体群は 0.0085 から 0.0165 の値を示したため (Table 3-4)、佐渡 (SD)以外の地域個体群はある程度の遺伝的多様性を保持していることが確認できた。

各個体群間で遺伝的な分化の程度を調べるために遺伝的分化係数(F_{st})を求めた結果では、東京湾 (夢の島 (YM)、越中島 (EC)、芝浦 (SU)、お台場 (OD)、多摩川河口 (TG)、横浜 (YH))、静岡 (清水港 (SM)、浜名湖 (HN))、名古屋 (NG)

と、大阪湾（新淀川河口（SY）、住吉川河口（SR））、広島湾（本川河口（HK））の個体群間の多くで遺伝的分化計数（ F_{st} ）の値が 0.050 以上の高い値を示し、遺伝的分化係数（ F_{st} ）の P 値に関しても多くの個体群間で有意な差が認められた。佐渡の個体群に関しては他の全ての地域の個体群との間で有意な差が認められた（ $p > 0.01$, Table 3-3）。東京湾、静岡、名古屋を関東個体群、大阪湾、広島湾を関西個体群とすると、関東個体群と関西個体群の間の遺伝的分化係数（ F_{st} ）の値は 0.0572、遺伝的分化係数（ F_{st} ）の P 値は 0.0000 となり有意な差が認められた（ $p > 0.01$ ）ため、関東個体群と関西個体群、佐渡の個体群は遺伝的にそれぞれ独立していると考えられる。また各個体群間の遺伝的距離（ d_{xy} ）によって UPGMA 法でデンドログラムを作成した結果（Fig. 3-6）でも同様に、関東個体群と関西個体群に大きく分かれた。これらの結果から、関東と関西、佐渡の個体群間では遺伝的交流の頻度が少ないことを示している。

次に検出されたハプロタイプをみると、関東個体群にのみ検出されたハプロタイプは 1～8、関西個体群のみに検出されたハプロタイプは 16～20 であり、関東・関西の両方の個体群から検出されたハプロタイプは 9～15 であった（Table 3-1）。

これらのハプロタイプの類似性を調べるために近接結合法および UPGMA 法によってデンドログラムを作成した結果、近接結合法では関西と関東に特有の

ハプロタイプの多くは異なるクラスターを形成し、UPGMA 法についても同様に関東と関西に特有のハプロタイプは異なるクラスターを形成したことから (Fig. 3-4, 3-5)、両地域で特有なハプロタイプは遺伝的に類似していないと考えられる。これらのことから、両地域で特有のハプロタイプを持つ個体群は、別の場所からの移入である可能性があると考えられる。関東個体群と関西個体群それぞれに特有なハプロタイプについては、近接結合法と UPGMA 法で同様のクラスターを形成したが、各クラスターを形成するハプロタイプ間の類似性については、近接結合法、UPGMA 法を用いて作成したデンドログラムともにブートストラップ値が低かったことから、関東個体群と関西個体群に特有なハプロタイプの間には系統的な意味は見出せないと考えられる。

日本におけるアメリカフジツボの確認の場所と時期を以上の考察と合わせて考えてみる。1950年に横須賀で確認されたのが、日本におけるアメリカフジツボの初記録である (Henry and McLaughlin, 1975)。その後、1963年から1964年に行われた調査で佐世保、長崎、舞鶴、敦賀、玉野で確認されている (馬渡, 1967)。1964年には山形県の加茂港で確認され、1966年には佐渡の加茂湖で確認されている (内海, 1966)。すなわち関東では1950年、関西では1964年、佐渡では1966年に各地域に最初に確認された。本研究におけるハプロタイプ9は全採集場所から検出され、各地域での構成率も高いことから (Fig. 3-3)、ハプロ

タイプ 9 に関しては 1960 年代以前に同一地域から移入し、日本各地に分布を広げたものと考えられる。その後 1970 年代に入るとアメリカフジツボは太平洋側の多くの場所で確認されたことから (山口, 1989)、この時期以降に様々な地域からの複数回の移入が起こったと推測される。しかしながら佐渡 (SD) の個体群に関しては、ハプロタイプ 9 の頻度が 85% と他の地域個体群と比較して卓越しており、いわゆるボトルネック効果によるものと考えられる。このことは、佐渡の加茂湖では移入後にハプロタイプ 9 の遺伝子型を持つ個体群が優占し、他のハプロタイプをもつ個体群の新たな移入がほとんどなかったため、個体群の遺伝構造が単純化したものと考えられる。

3-4-2 ヨーロッパフジツボの D-loop 領域

日本におけるヨーロッパフジツボの各地域個体群のミトコンドリア DNA の D-loop 領域から検出されたハプロタイプの多様度 (hd) は、0.5758 から 0.7000 の値を示し、塩基多様度 (Pi) については 0.0062 から 0.0127 の値を示したため (Table 3-5)、日本におけるヨーロッパフジツボの地域個体群はある程度の遺伝的多様性を保持していることが確認できた。各個体群間で遺伝的な分化の程度を調べるために遺伝的分化係数 (Fst) を求めた結果では、東京湾 (葛西臨海公園; KS、多摩川河口; TG)、静岡 (清水; SM) と大阪湾 (新淀川河口; SY、住吉川河口; SR)

の個体群間の全てで有意な差が認められた($p>0.01$, Table 3-6)。東京湾、静岡の個体群を関東個体群、大阪湾の個体群を関西個体群とすると、関東個体群と関西個体群の間の遺伝的分化係数(F_{st})は 0.2651 で有意な差が認められたことから ($p>0.05$)、関東個体群と関西個体群は遺伝的に独立していると考えられる。また各個体群間の遺伝的距離(d_{xy})を用いて UPGMA 法によってデンドログラムを作成した結果 (Fig. 3-10)についても同様に、関東個体群と関西個体群で大きくわかれた。これらの結果から関東と関西の個体群間では遺伝的交流の頻度は少ないと考えられる。

次に、検出されたハプロタイプをみると、関東個体群のみで検出されたハプロタイプは 1~8、関西個体群のみで検出されたハプロタイプは 17~19、関東と関西の両方の個体群で検出されたハプロタイプは 9~16 であった(Table 3-4)。またハプロタイプの類似性を調べるために作成したデンドログラムでは、近接結合法と UPGMA 法ともに関東個体群と関西個体群に特有のハプロタイプは異なるクラスターを形成した (Fig. 3-8, 3-9)。これらのことから、関東と関西で特有のハプロタイプを持つ個体群に関しては、それぞれ別の場所からの移入である可能性がある。関東個体群と関西個体群それぞれに特有なハプロタイプについては、近接結合法と UPGMA 法でほぼ類似したクラスターを形成したが、デンドログラムの信頼性を示すブートストラップ値が小さかったことから、関東個体群と関西個体群のそれぞれに特有なハプロタイプ間には系統的な意味は見出せなかった。

アメリカフジツボと同様に、日本におけるヨーロッパフジツボの確認の場所と時期を以上の考察と合わせて考えてみる。ヨーロッパフジツボは 1952 年に三重県の英虞湾で確認されたのが初確認である (Kawahara, 1963)。それ以降は 1959 年に名古屋と四日市で確認され、1960 年代以降は日本各地で分布が確認されている。このことから、ヨーロッパフジツボが日本に最初に移入したのは伊勢湾周辺であり、この時に移入した個体群は、本研究で全ての採集地域から検出されたハプロタイプ 9 をもつ個体群だったと推測される。それ以降に様々な地域からの複数回の移入が起こり、現在の各地域の遺伝的構造のようになると考えられる。

日本沿岸の外来種コウロエンカワヒバリガイ (*Xenostrobus securis*)の移入源を推定するために、PCR-RFLP 法によってミトコンドリア DNA の COI 領域を分析した研究では (川井ら, 2006)、移入源のオセアニアでは 6 種類のハプロタイプが検出されたのに対して、日本 (東京湾、浜名湖、大阪湾、中海、浦戸湾)の地域個体群では 3 種類のみが検出され、そのうち単一のハプロタイプが 95% 以上で、遺伝的多様性が乏しいことが報告されている (川井ら, 2006)。

本研究によって解明したアメリカフジツボとヨーロッパフジツボのミトコンドリア DNA のハプロタイプはそれぞれ 20 種類と 19 種類で、コウロエンカワヒバリガイと比較してはるかに多くのハプロタイプが検出された。そのため、

現在のアメリカフジツボとヨーロッパフジツボの遺伝子構造をみると、2種の外来フジツボは単一の地域からの移入ではなく、様々な地域からの移入が複数回行われたと考えるのが妥当と思われる。

本研究では関東個体群と関西個体群間で遺伝子構造に違いが認められたが、関東個体群内、関西個体群内の各地域個体群間で遺伝子構造の違いは認められなかった。その理由としては、1) 関東内・関西内という比較的狭い範囲では遺伝的交流が頻繁に行われている、2) 比較的狭い範囲内の個体群を比較する遺伝子マーカーとしてミトコンドリア DNA は適切ではない、という二点が考えられる。

狭域での遺伝的交流の手段としては船体付着や幼生分散などが考えられるが、個体の追跡が困難などの理由から、これら手段について検証することは難しいと考えられる。そのため狭域個体群の遺伝子構造を調べるためには、より感度の高い遺伝子マーカーを用いて比較を行う必要があると考えられる。

Table 3-1 The variable sites and haplotype frequencies of CO I region of the *Amphibalanus eburneus* .

Haplo -type	Variable site																		Sampling sites																																	
	37	43	47	55	59	69	89	114	119	125	150	159	164	174	188	196	197	221	226	239	241	259	267	272	273	274	YM	EC	SU	OD	TG	YH	SM	HN	NG	SY	SR	HK	SD													
1	A	A	C	T	C	A	C	A	A	T	C	T	A	C	A	G	G	C	T	T	C	C	C	C	C	G	14	8	8	6	14	15	5	3	13																	
2	T	12	14	10	9	4	12	14																			
3	.	C	T	2	6	5	2	7	3	4	9																			
4	A		1				2																					
5	C					2																						
6	A	.			1	1																							
7	.	.	A					1																						
8	A		1	2	2					3																		
9	G	A	.	.	A	22	15	22	21	20	16	20	19	29	13	15	12	34														
10	A	.	.	.	A	.	4	4	7	3			7	6	5	7	11	12	4														
11	T	G	C	5	3	6	4			4	10	2		3		1															
12	T	A	.	1							8	6		3																	
13	A	1				1						2	3																
14	G	1				1					1	1																	
15	A	A	C					1						2																	
16	G	.	.	.	A	A	C										1	1																	
17	A	A	C	.	.	A	.	.	.										7		1																
18	.	A	.	T	.	.	.	C	G	.	.										6	8	2																
19	A	C										2		3																
20	A	C	.	.	.	A										1			1															
Total														62	52	61	49	50	48	54	55	58	38	46	33	40																										

※ YM: Yumenoshima, EC: Eccyuujima, SU: Shibaura, OD: Odaiba, TG: Tamagawa, YH: Yokohama, SM: Shimizu, HN: Hamanako, NG: Nagoya
 SY: Shinyodogawa, SR: Sumiyoshi-River, HK: Honkawa, SD: Sado.

Table 3-2 Value of haplotype diversity (hd), nucleotide diversity (Pi) in the *Amphibalanus eburneus*.

Sampling site	n	Number of Haplotypes	Haplotype diversity (hd)	Nucleotide diversity (Pi)
YM	62	9	0.7858	0.0093 ± 0.0055
EC	46	8	0.8130	0.0095 ± 0.0056
SU	49	8	0.8082	0.0103 ± 0.0060
OD	53	9	0.7687	0.0098 ± 0.0057
TG	50	8	0.7478	0.0085 ± 0.0051
YH	48	5	0.7385	0.0076 ± 0.0046
SM	52	6	0.7736	0.0102 ± 0.0059
HN	61	6	0.7993	0.0122 ± 0.0069
NG	54	6	0.6897	0.0085 ± 0.0051
SY	43	8	0.8065	0.0165 ± 0.0090
SR	48	9	0.8106	0.0152 ± 0.0084
HK	38	6	0.7367	0.0129 ± 0.0073
SD	42	4	0.2731	0.0048 ± 0.0033

※ YM: Yumenoshima, EC: Eccyuujima, SU: Shibaura, OD: Odaiba, TG: Tamagawa, YH: Yokohama, SM: Shimizu, HN: Hamanako, NG: Nagoya, SY: Shinyodogawa, SR: Sumiyoshi-River, HK: Honkawa, SD: Sado.

Table 3-3 Pairwise F_{st} value of mitochondrial DNA CO I region among the thirteen sampling sites in the *Amphibalanus eburneus*.

	YM	EC	SU	OD	TG	YH	SM	HN	NG	SY	SR	HK	SD
YM													
EC	-0.0028												
SU	-0.0012	-0.0040											
OD	-0.0012	0.0119	-0.0112										
TG	0.0022	0.0269	0.0091	-0.0026									
YH	-0.0080	0.0026	0.0015	-0.0008	-0.0069								
SM	-0.0011	-0.0091	-0.0143	-0.0079	0.0161	0.0044							
HN	0.0131	0.0018	0.0065	0.0208	0.0509	0.0380	0.0008						
NG	0.0378	*0.0716	0.0382	0.0137	0.0214	0.0381	*0.0524	*0.0615					
SY	**0.0819	**0.0996	**0.0821	**0.0847	**0.0825	**0.0968	**0.0867	**0.1105	**0.1026				
SR	*0.0415	**0.0551	*0.03742	*0.04627	**0.0604	**0.0624	*0.0411	**0.0599	**0.0719	0.0061			
HK	**0.0549	**0.0789	*0.04337	*0.0524	**0.0685	**0.0789	*0.0507	**0.0847	*0.0516	0.0299	0.0043		
SD	**0.2794	**0.3506	**0.2649	**0.2164	**0.2445	**0.3193	**0.2772	**0.3077	**0.1435	**0.2548	**0.2531	**0.2311	

※ Significant differentiation is indicated by * when $P < 0.05$, and ** when $P < 0.01$.

YM: Yumenoshima, EC: Ecyujima, SU: Shibaura, OD: Odaiba, TG: Tamagawa, YH: Yokohama, SM: Shimizu, HN: Hamanako
 NG: Nagoya, SY: Shinyodogawa, SR: Sumiyoshi-River, HK: Honkawa, SD: Sado.

Table 3-4 The variable sites and haplotype frequencies of D-loop region of the *Amphibalanus improvisus*.

Haplo -type	Variable site																			Sampling sites																	
	27	33	45	49	54	78	86	88	95	107	108	110	127	135	139	140	142	144	146	167	170	176	178	181	KS	TG	SM	NG	SY	SR							
1	A	C	A	A	A	A	T	G	A	C	T	G	G	A	A	A	A	C	A	A	A	T	T	A	12	16	14	7									
2	G	5	3	4	4									
3	T	.	G	3	5	1	2									
4	C	.	.	.	A	.	.	A	1		1	1									
5	C	.	.	T	A	.	.	A	1		1										
6	.	.	G	.	C	.	.	T	A	.	.	A		1	1										
7	T	1	1		1									
8	C	.	.	T	.	.	.	G	G	1	1											
9	C	32	27	21	33	35	21							
10	C	T	.	4	2		2	5								
11	C	C	A	A	.	2	1	3				1						
12	.	G	.	.	C	A	A				4			1						
13	.	.	.	T	C	A	G				1	1								
14	C	.	.	.	C	A	T	.	.	G	.	.	.							1							
15	C	.	.	.	C	C	A	T	.	.	G	.	.	.					22	8								
16	T	.	G	G				1	1								
17	C	A					1	1							
18	.	.	.	C	C	A	G					1								
19	C	A	A	.	G	G							1						
Total																											62	57	46	56	66	34					

※ KS: Kasai, TG: Tamagawa, SM: Shimizu, NG: Nagoya, SY: Shinyodogawa, SR: Sumiyoshi-River.

Table 3-5 Value for haplotype diversity (hd), nucleotide diversity (Pi) in the *Amphibalanus improvisus*.

Sampling	n	Number of Haplotypes	Haplotype diversity (hd)	Nucleotide diversity (Pi)
KS	62	10	0.6922	0.0062 ± 0.0044
TG	57	9	0.6961	0.0062 ± 0.0044
SM	46	8	0.7000	0.0065 ± 0.0046
NG	55	10	0.6344	0.0066 ± 0.0046
SY	67	7	0.6103	0.0127 ± 0.0076
SR	36	7	0.5758	0.0119 ± 0.0073

※ KS: Kasai, TG: Tamagawa, SM: Shimizu, NG: Nagoya, SY: Shinyodogawa, SR: Sumiyoshi-River.

Table 3-6 Pairwise F_{st} value of mitochondrial DNA D-loop region among the six sampling sites in the *Amphibalanus improvisus*.

	KS	TG	SM	NG	SY	SR
KS						
TG	-0.0057					
SM	-0.0067	-0.0002				
NG	0.0014	0.0244	0.0111			
SY	**0.2556	**0.2852	**0.2504	**0.2285		
SR	**0.2031	**0.2375	**0.1938	**0.1686	-0.0082	

※ Significant differentiation is indicated by * when $P < 0.05$, and ** when $P < 0.01$.

KS: Kasai, TG: Tamagawa, SM: Shimizu, NG: Nagoya, SY: Shinyodogawa

SR: Sumiyoshi-River.

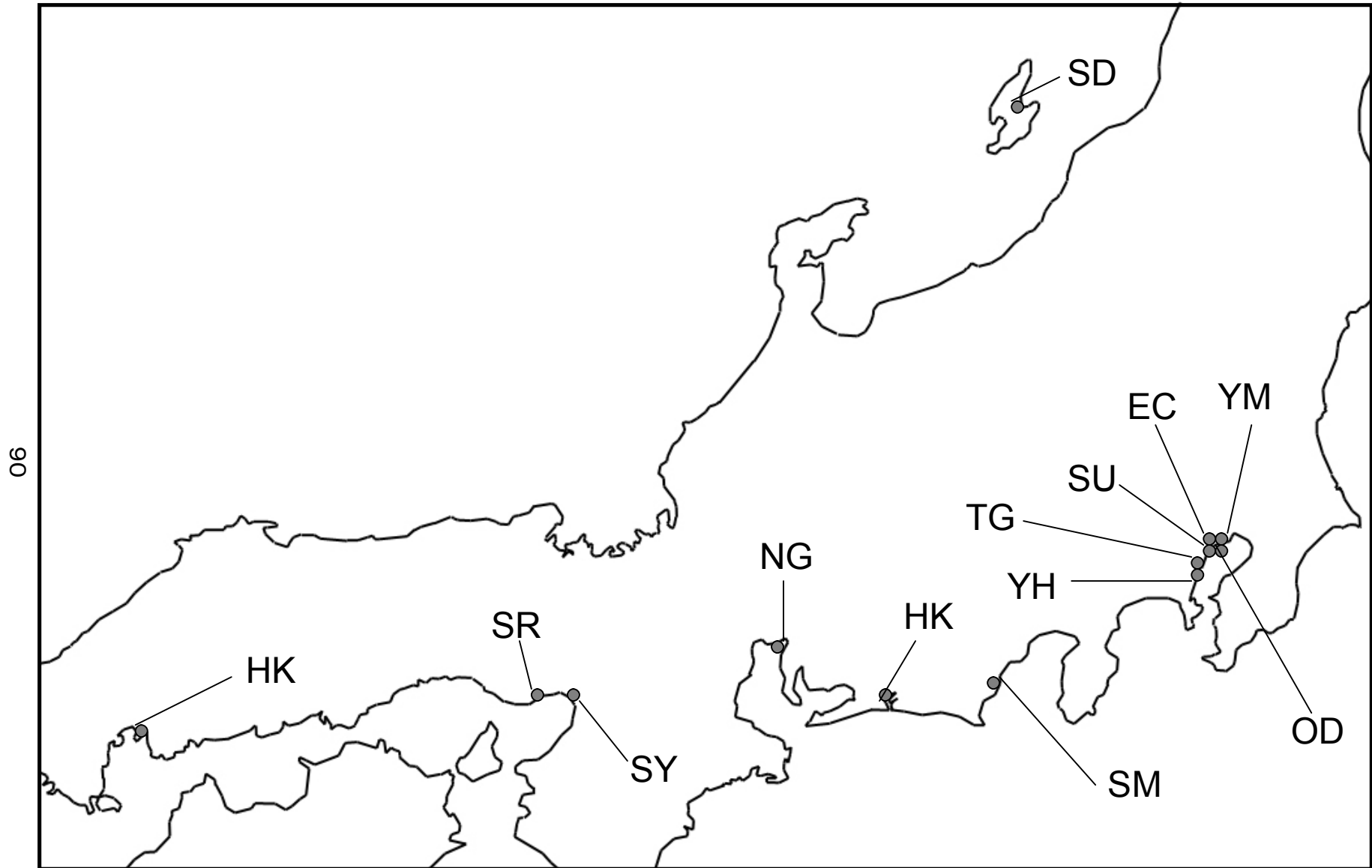


Fig. 3-1 Sampling sites of *Amphibalanus eburneus*. YM: Yumenoshima, EC: Eccyujima, OD: Odaiba, SU: Shibaura, TG: Tamagawa, YH: Yokohama, SM: Shimizu, HK: Hamanako, NG: Nagoya, SY: Shinyodogawa, SR: Sumiyoshi-River, SD: Sado.

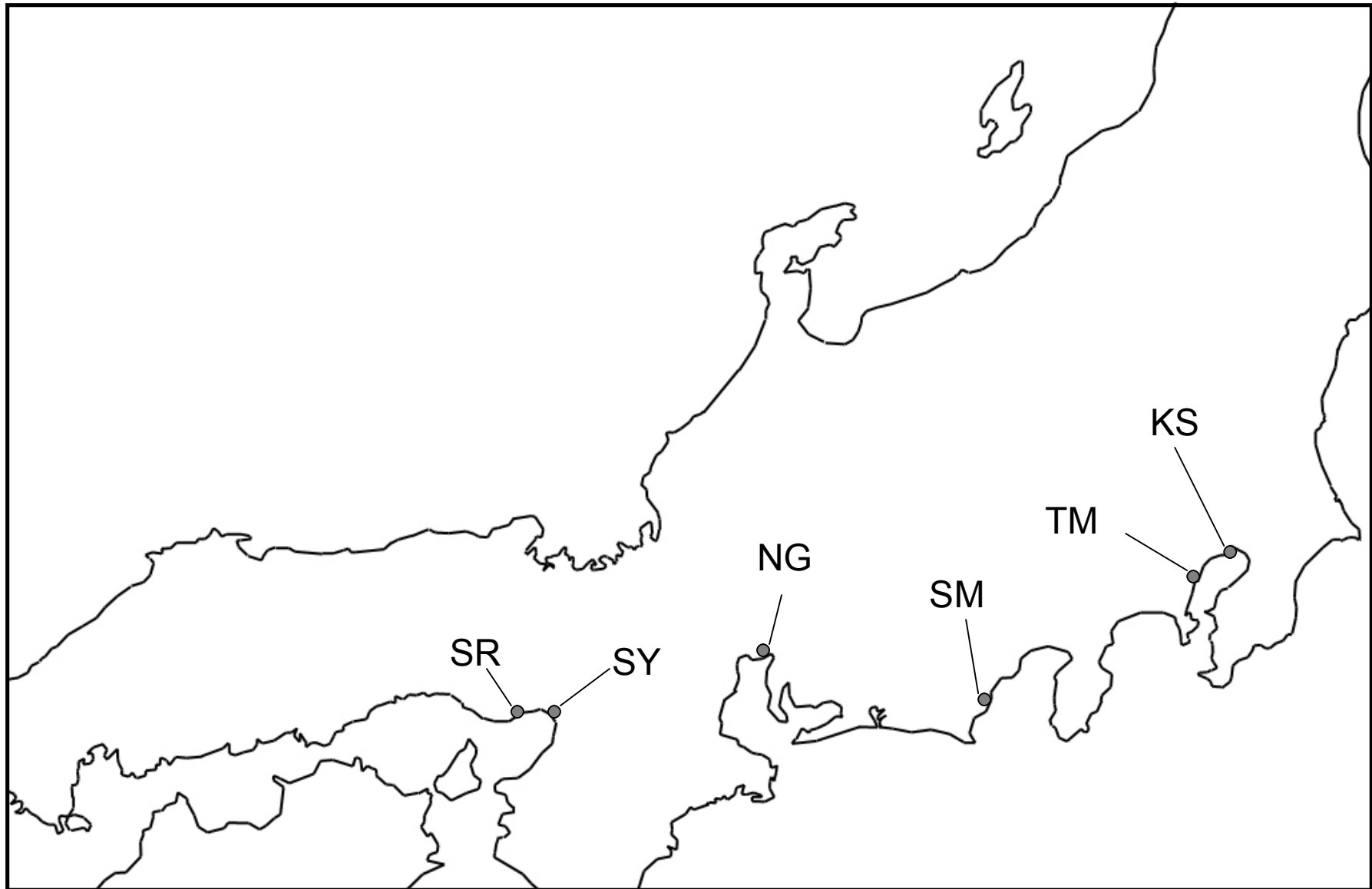


Fig. 3-2 Sampling sites of *Amphibalanus improvisus*. KS: Kasai, TG: Tamagawa, SM: Shimizu, NG: Nagoya, SY: Shinyodogawa, SR: Sumiyoshi-River.

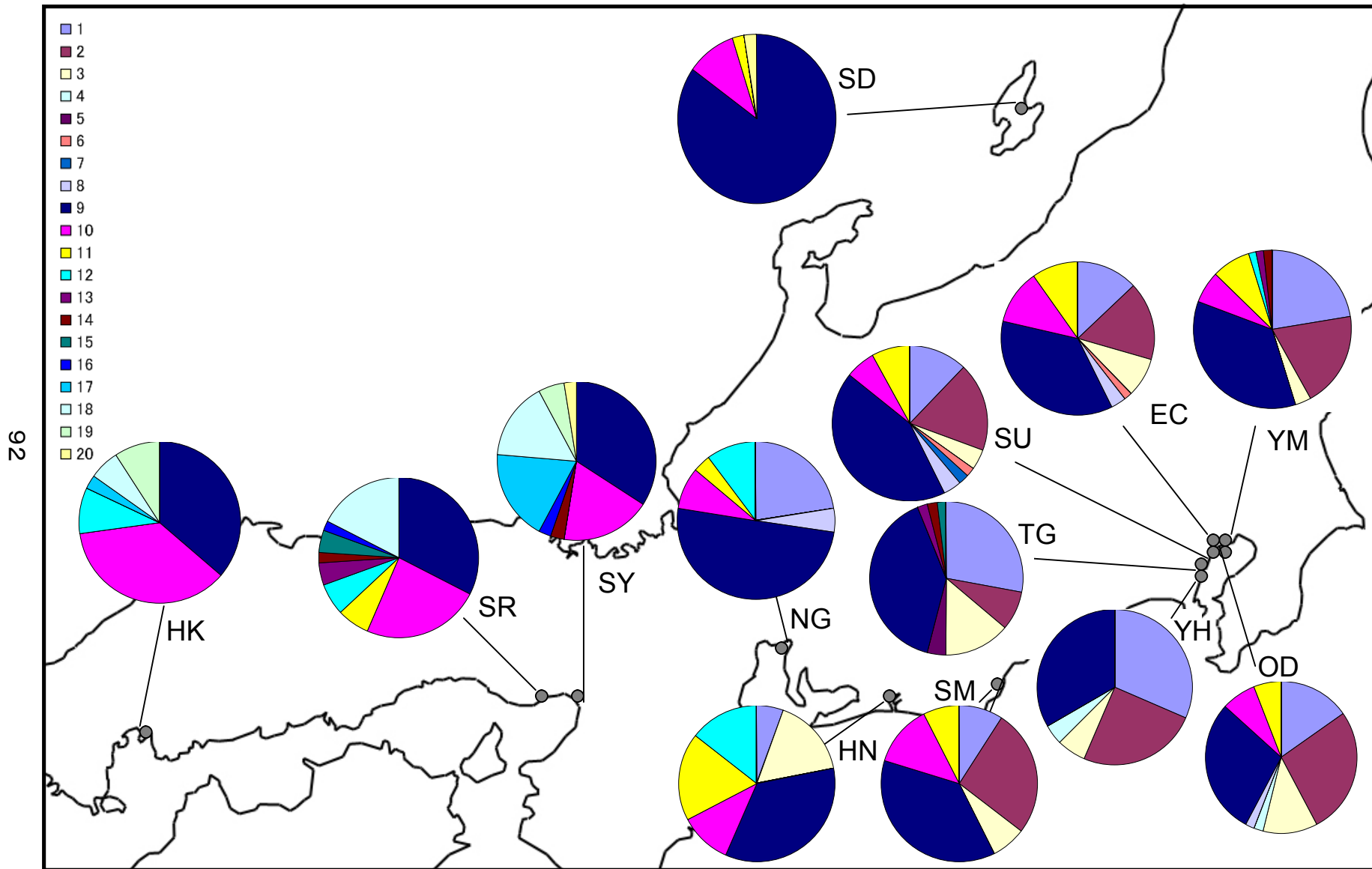


Fig. 3-3 Frequencies of haplotype of mitochondrial DNA CO I regions of *Amphibalanus eburneus* at study sites. Haplotype groups were shown in Table 3-1. YM: Yumenoshima, EC: Ecyuujima, SU: Shibaura, OD: Odaiba, TG: Tamagawa, YH: Yokohama, SM: Shimizu, HN: Hamanako, NG: Nagoya, SY: Shinyodogawa, SR: Sumiyoshi-River, HK: Honkawa, SD: Sado.

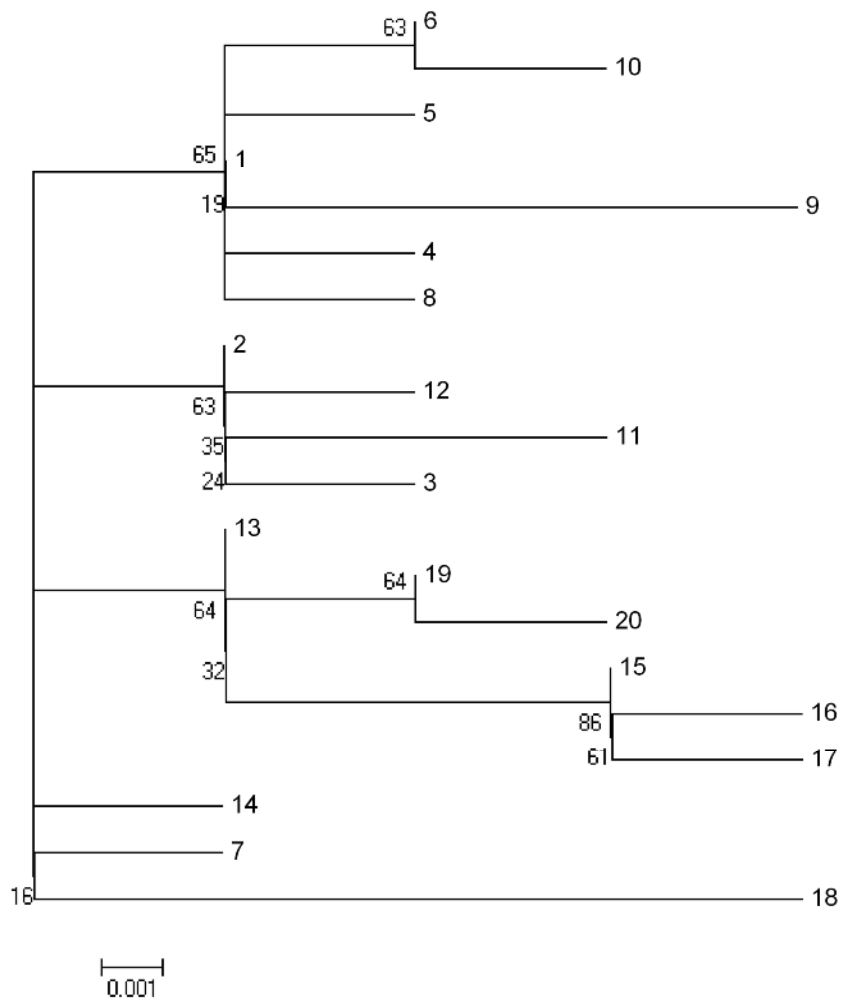


Fig. 3-4 Phylogenetic tree of haplotypes of mitochondrial DNA CO I region in *Amphibalanus eburneus* using Neighbor-joining method. Each haplotypes were clustered together in the bootstrap test (1000 replicates).

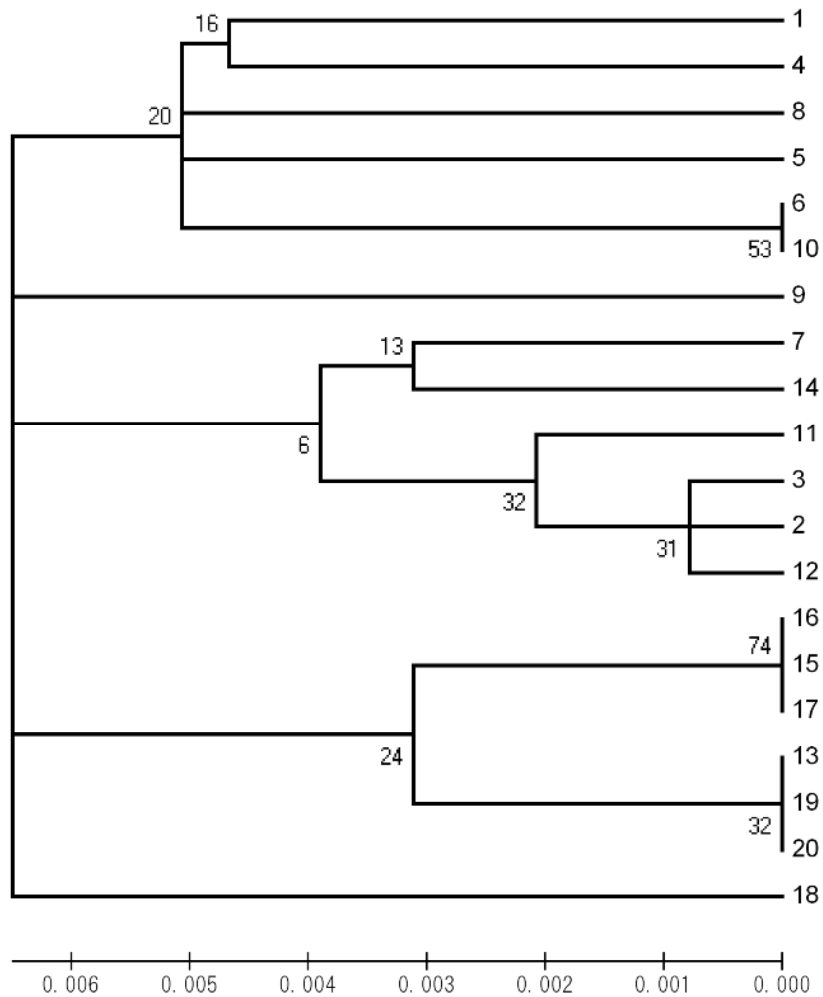


Fig. 3-5 Phylogenetic tree of haplotypes of mitochondrial DNA CO I region in *Amphibalanus eburneus* using UPGMA method. Each haplotypes were clustered together in the bootstrap test (1000 replicates).

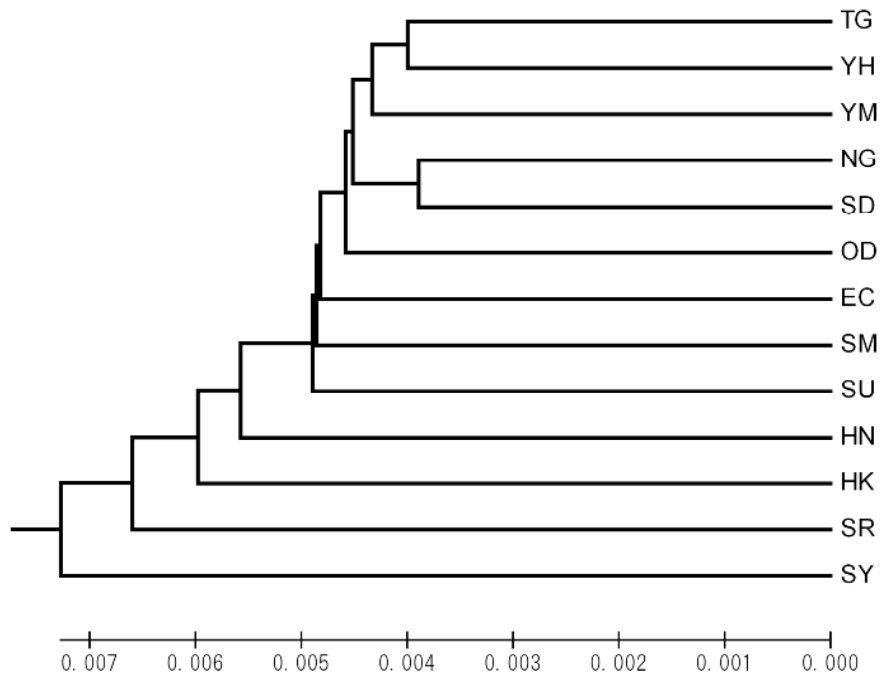


Fig. 3-6 Phylogenetic tree of genetic distance (D_{xy}) of local populations of *Amphibalanus eburneus* using UPGMA method.
 TG: Tamagawa, YH: Yokohama, YM: Yumenoshima, NG: Nagoya, SD: Sado, OD: Odaiba, EC: Ecyuujima, SM: Shimizu, SU: Shibaura, HN: Hamanako, HK: Honkawa, SR: Sumiyoshi-river, SY: Shinyodogawa.

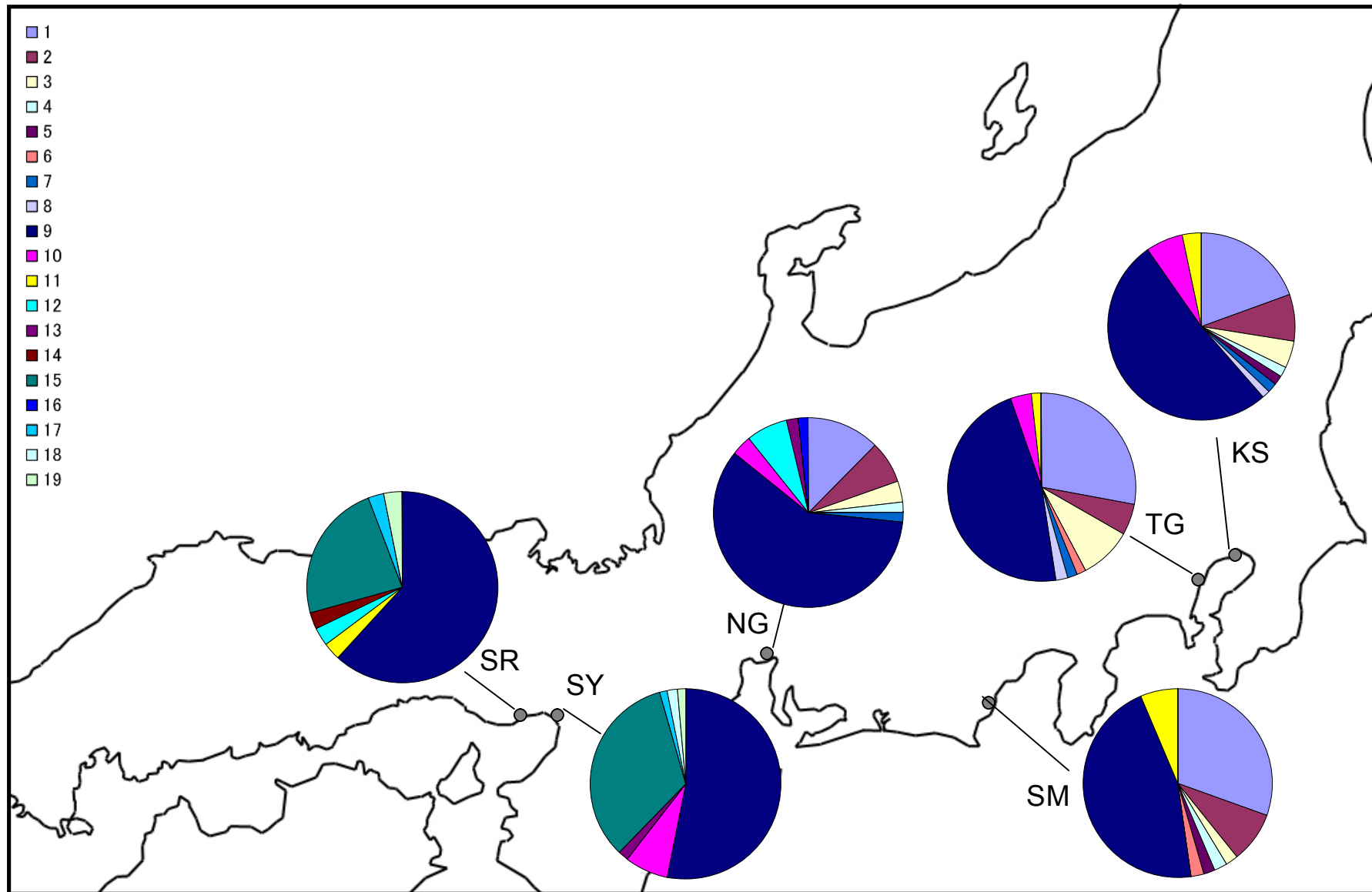


Fig. 3-7 Frequencies of haplotype of mitochondrial DNA D-loop regions of *Amphibalanus improvisus* at study sites. Haplotype groups were showed in Table 3-1. KS: Kasai, TG: Tamagawa, SM: Simizu, NG: Nagoya, SY: Shinyodogawa, SR: Sumiyoshi-River.

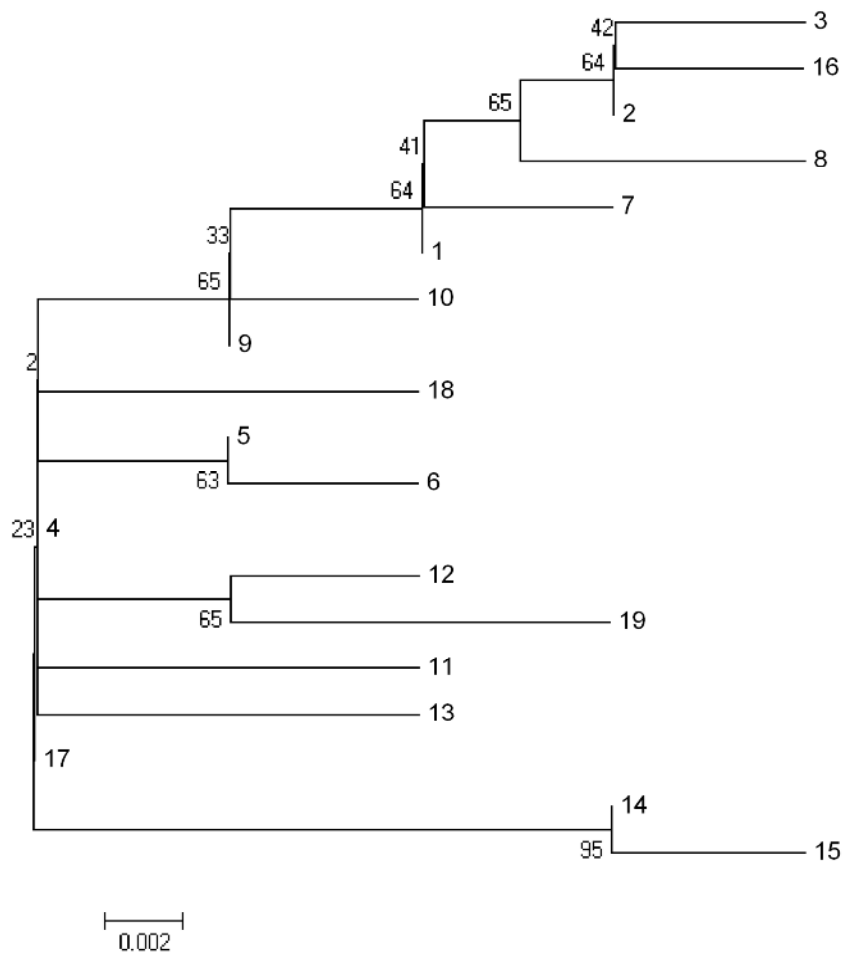


Fig. 3-8 Phylogenetic tree of haplotypes of mitochondrial DNA D-loop region in *Amphibalanus improvisus* using Neighbor-joining method. Each haplotypes were clustered together in the bootstrap test (1000 replicates).

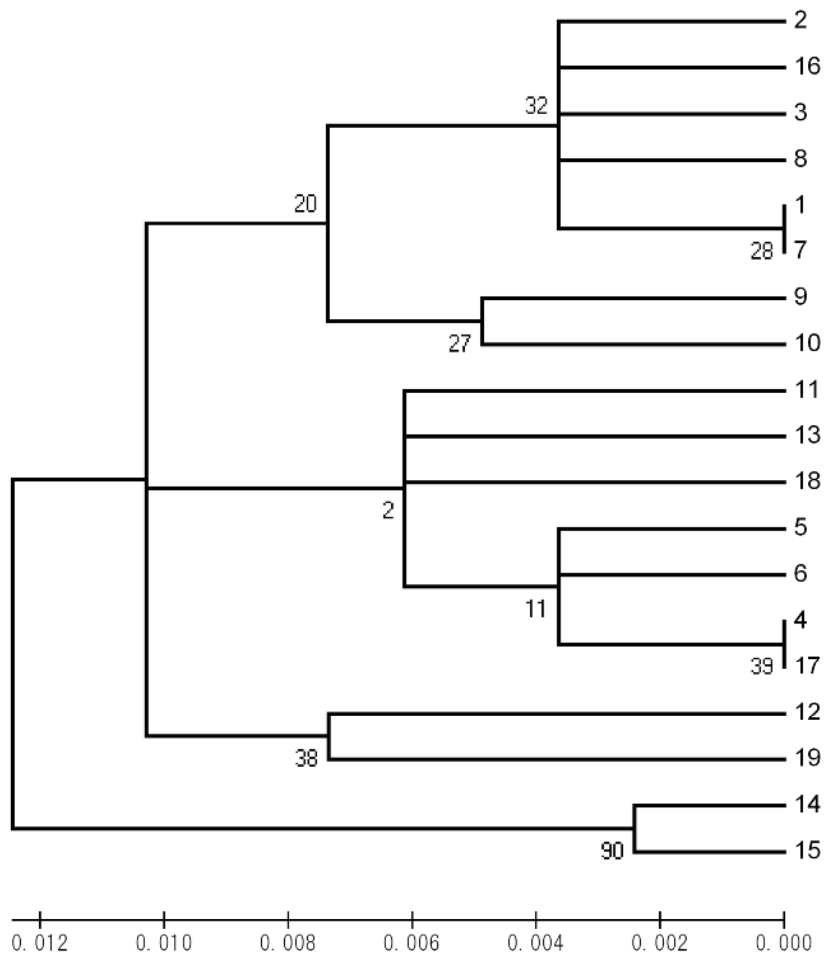


Fig. 3-9 Phylogenetic tree of haplotypes of mitochondrial DNA CO I region in *Amphibalanus improvisus* using UPGMA method. Each haplotypes were clustered together in the bootstrap test (1000 replicates).

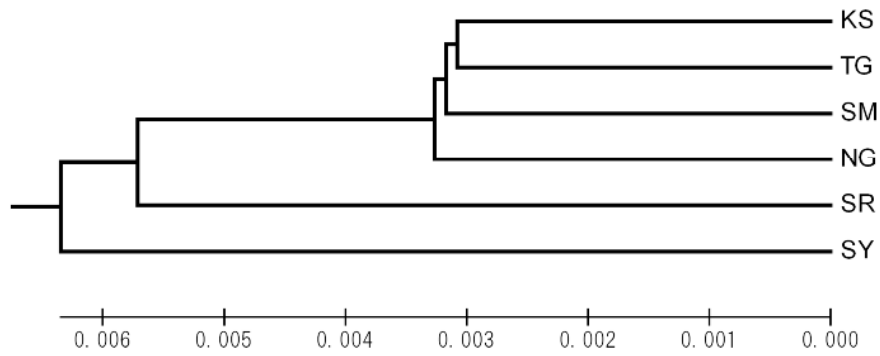


Fig. 3-10 Phylogenetic tree of genetic distance (D_{xy}) of local populations of *Amphibalanus improvisus* using UPGMA method.
 KS: Kasai, TG: Tamagawa, SM: Shimizu, NG: Nagoya, SR: Sumiyoshi-river,
 SY: Shinyodogawa.

第4章 アメリカフジツボとヨーロッパフジツボの狭域個体群間の遺伝的変異

4-1 緒言

第3章のミトコンドリア DNA を比較した結果から、日本におけるアメリカフジツボとヨーロッパフジツボの個体群の集団遺伝構造は関東と関西の個体群に大別することができ、関東と関西それぞれに特有なハプロタイプを持つ個体が存在し、そのハプロタイプの類似性が低いことが明らかになった。このことから、関東と関西の個体群は異なった地域から移入した可能性が示唆され、関東と関西の個体群間で幼生分散を介した遺伝的交流の頻度は低いと推定された。しかしながら関東と関西のそれぞれの個体群内の遺伝的構造に有意な差が認められなかったことから、関東と関西それぞれの個体群間での遺伝的交流が存在する可能性があると考えられるが、その一方、関東内、関西内といった地域個体群内の遺伝子交流の頻度までは判明できなかった。その理由として、第3章で用いたミトコンドリア DNA の各領域が狭範囲の個体群の集団遺伝構造の比較に適していなかったことが考えられる。狭範囲の個体群の遺伝的構造を調べるためには、より進化速度の速いマーカールを使用する必要があると考えられる(松井・小池, 2003)。

高変異性領域を含む DNA の塩基配列多型を利用した遺伝マーカーとして、近年マイクロサテライト領域 (simple sequence repeat, SSR) が利用されることが

多い。マイクロサテライトは、真核生物のイントロンや遺伝子間領域などの非遺伝領域に存在する数塩基程度を基本単位とする繰り返し配列の領域であり、様々な型の配列が知られているが、動物・植物ともに A の繰り返しが多く、AT、CT がそれに続くとされている (Lagercrants, *et al.*, 1993)。これらのマイクロサテライト配列は、ゲノム中に高い頻度で広く分布していることが確認されている (練・宝月, 2004)。また、マイクロサテライトを含む領域を増幅するように設計されたマーカーの多くは多型性が高く、ヘテロ接合体をホモ接合体と識別できる共優性であることから、精密な遺伝子解析に適しているとされている (野口ら, 2003; 谷口, 2007)。マイクロサテライト DNA は PCR 法によって多型が検出されるため、DNA サンプルは少量で良く、再現性にも優れているとされている。そのため、生態学 (松井・小池, 2003) や育種学 (野口ら, 2003; 齋藤・森, 2005) の分野で、個体群構造に関する研究の手法としてマイクロサテライトマーカーが利用されている。

フジツボ類では *Semibalanus balanoides* (Dufresne, *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2007) と *Chthamalus montagui* (Pannacciulli, *et al.*, 2005) でマイクロサテライトマーカーを利用した個体群構造に関する研究が成されているが、アメリカフジツボとヨーロッパフジツボに関しては過去に知見がない。本研究では、アメリカフジツボとヨーロッパフジツボのマイクロサテライト DNA マーカーを

開発し、地域個体群のマーカー座の変異性を比較することで、ミトコンドリア DNA では検出できなかった個体群構造を明らかにし、地域個体群間の遺伝的交流の頻度を解明することを目的とした。両種とも東京湾奥の 3 地域個体群を対象とした。

4-2 方法

4-2-1 マイクロサテライトマーカーの開発

試料および粗全 DNA の抽出

マイクロサテライトマーカーを作製するための試料として、アメリカフジツボは 2007 年 7 月に越中島 (EC; 東京都) で採集した成体個体を、ヨーロッパフジツボは 2007 年 8 月に葛西臨海公園 (KS; 東京都) で採集した成体個体を用いた (Fig. 4-1, 4-2)。採集した個体はその場で 80%エタノール中に固定し、研究室に持ち帰った。持ち帰った個体から筋組織を約 30 mg 取り出し 2 mL チューブに入れ、500 μ L の 8 M TENS-U バッファーと 10 μ L のプロテナーゼ K (TAKARA 社) を加えて 37°C で一晩インキュベートした。十分に溶解したことを確認し、10 mg/mL のリボヌクレアーゼ (WAKO 純薬) を 1 μ L 加え、37°C のウォーターバス中で 1 時間インキュベートし、RNA を分解した。フェノール/クロロホルム法によって粗 DNA を抽出し、エタノール沈殿法により、DNA を精製した。精製した

粗 DNA は $20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ になるよう TE 緩衝液で調整した。

不等長アダプター付き制限断片の作製

$7 \mu\text{g}$ の DNA に、 $10 \mu\text{L}$ の $10\times$ buffer と $2 \mu\text{L}$ の制限酵素 (*AluI*、*HaeIII*: TAKARA) を加え、滅菌蒸留水で全液量を $100 \mu\text{L}$ とし、 37°C で 3 時間加温した。

反応液に $100 \mu\text{L}$ の TE と $200 \mu\text{L}$ のクロロホルム:イソアミルアルコール (24:1) 混液を添加し、混和してから遠心分離 ($15,000 \text{ rpm}$ 、 5 min 、 4°C) して上清を回収した。上清に 1/10 倍量の 3 M の NaOAc と 3 倍量の 99.5% エタノールを加え、よく混和した後、10 分間氷上に静置した。遠心分離 ($15,000 \text{ rpm}$ 、 10 min 、 4°C) して得られたペレットに 80% エタノールを加えて、遠心 ($15,000 \text{ rpm}$ 、 10 min 、 4°C) し、上清を捨てた。得られたペレットに $36 \mu\text{L}$ の TE 緩衝液を加えて溶解した。制限断片に付加させる不等長アダプターを作製するために、 $12 \mu\text{g}$ の長鎖:

5' -GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGT-3' と $2 \mu\text{g}$ の短鎖:

5' -ACCAGCCC-NH₂-3' (3' 末端にアミノ基を付加) の 2 種のオリゴ DNA を混合し、サーマルサイクラーを用いて 70°C で 10 分の加熱後、 37°C で 10 分の条件下でアニリングして不等長アダプターを作製した。制限酵素処理した DNA 液 $5 \mu\text{L}$ ($0.5 \mu\text{g}$) に、アダプターライゲーションキット (TAKARA) の Ligation Solution A

を $40\ \mu\text{L}$ 、Ligation Solution B を $10\ \mu\text{L}$ 、Adaptor Solution を $1.61\ \mu\text{L}$ ($1.4\ \mu\text{g}$ の DNA を含む)、不等長アダプターを $1.4\ \mu\text{g}$ 加え、滅菌蒸留水で全液量を $60\ \mu\text{L}$ として、反応液を 16°C で 1 時間置いた。次に $140\ \mu\text{L}$ の TE 緩衝液および $200\ \mu\text{L}$ のクロロホルム:イソアミルアルコール (24:1) 混液を添加して混和し、遠心分離 ($15,000\ \text{rpm}$ 、 $5\ \text{min}$ 、 4°C) し、上清を回収した。上清に 1/10 倍量の $3\ \text{M}$ の NaOAc と 3 倍量の 99.5%エタノールを加え、よく混和した後、10 分間氷上に静置した。遠心分離 ($15,000\ \text{rpm}$ 、 $10\ \text{min}$ 、 4°C) して得られたペレットに 80%エタノールを加えて、遠心分離 ($15,000\ \text{rpm}$ 、 $10\ \text{min}$ 、 4°C) し、上清を捨てた。得られたペレットに $100\ \mu\text{L}$ の TE 緩衝液を加え溶解した。PCR における DNA 伸長反応を防ぐため、不等長アダプター短鎖 3' 末端を完全にブロックする目的で GeneAmp AmpliTaq Gold PCR Reagent kit (Applied Biosystems) を用いて反応を行った。 $50\ \mu\text{L}$ の $5\ \text{ng}/\mu\text{L}$ DNA 溶液に、 $10\times$ buffer を $10\ \mu\text{L}$ 、 $25\ \text{mM}$ の MgCl_2 を $6\ \mu\text{L}$ 、 $2\ \text{mM}$ の ddGTP を $1\ \mu\text{L}$ 、AmpliTaq Gold DNA Polymerase ($5\ \text{U}/\mu\text{L}$) を $0.5\ \mu\text{L}$ 加え、滅菌蒸留水で全液量を $100\ \mu\text{L}$ として、反応液を 94°C で 9 分間、続いて 50°C で 10 分間加温した。次に $140\ \mu\text{L}$ の TE 緩衝液および $200\ \mu\text{L}$ のクロロホルム:イソアミルアルコール (24:1) 混液を添加して混和し、遠心分離 ($15,000\ \text{rpm}$ 、 $5\ \text{min}$ 、 4°C) し、上清を回収した。上清に 1/10 倍量の $3\ \text{M}$ NaOAc と 3 倍量の 99.5%エタノールを加え、よく混

和した後、10 分間氷上に静置した。遠心分離 (15,000 rpm、10 min、4°C) し
て得られたペレットに 80% エタノールを加えて、遠心分離 (15,000 rpm、10
min、4°C) し、上清を捨てた。得られたペレットに 50 μ L の TE 緩衝液を加え
溶解した。

マイクロサテライト領域の一端に隣接する塩基配列の決定

2 μ L の 5 ng/ μ L DNA 溶液に、10 \times buffer を 10 μ L、25 mM の MgCl₂ を 6 μ L、
10 mM の dNTP を 10 μ L、0.4 μ M に調整した プライマー (AC)₁₀ :

5'-ACACACACACACACACACAC-3' とプライマー AP2: 5'-CTATAGGGCACGCGTGGT-3'

を各 2 μ L ずつ、AmpliAq Gold DNA Polymerase (Applied biosystem: 5U/ μ L)

を 0.5 μ L を加え、滅菌蒸留水で全液量を 100 μ L とした。PCR 条件は、以下

の通りとした。

ステップ 1 : 94°C · 9 分 → 62°C · 30 秒 → 72°C · 1 分 1 サイクル

ステップ 2 : 94°C · 30 秒 → 62°C · 30 秒 → 72°C · 1 分 5 サイクル

ステップ 3 : 94°C · 30 秒 → 60°C · 30 秒 → 72°C · 1 分 35 サイクル

ステップ 3 : 94°C 30 秒 → 60°C 30 秒 → 72°C 5 分 1 サイクル

エンドコンバージョンのために 2 μ L の PCR 産物に、3 μ L の滅菌超純水と
5 μ L の End Conversion Mix を加えてゆっくり混和し、22°C で 15 分間静置し

た。次に 75°C で 5 分間加温した後、氷上に 2 分間静置した。氷冷した反応物に、pT7 Blue perfectly blunt cloning kit (Novagen) の Blunt Vector を 1 μ L、T4 DNA Ligase を 1 μ L 加え、22°C で 15 分間静置した後、氷上に 15 分間静置してライゲーションした。ライゲーション反応物 2 μ L を氷上に置いた 50 μ L の NovaBlue Singles Competent Cell に加え、5 分間静置してすばやく 42°C で 30 秒間加温した後、氷上で 2 分間冷やした。クリーンベンチ内で SOC Medium を 300 μ L 加え、37°C で 30 分間、200 rpm で振とうした。LB 寒天プレート (X-gal と IPTG を含む) に 30 μ L の菌液をまき、37°C で 15 時間培養した。培養して形成されたコロニーのうち、白いポジティブコロニーを滅菌した爪楊枝で取り、10 μ L の PCR 反応液を含むチューブに懸濁した。反応液は TaKaRa LA Taq (TAKARA) を用いて、10 \times buffer を 1 μ L、25 mM の MgCl₂ を 1.6 μ L、2.5 mM の dNTP mixture を 1.6 μ L、0.2 μ M の Primer U-19 (5' -CAGGAAACAGCTATGAC-3') および 0.2 μ M の Primer M13-RV (5' -GGTTTCCCAGTCACGACG-3') を各 0.1 μ L、TaKaRa LA Taq (5U/ μ L) を 0.1 μ L を加え、滅菌蒸留水で全液量を 10 μ L とした。PCR 条件は、以下の通りとした。

ステップ 1 : 94°C 5 分 1 サイクル

ステップ 2 : 94°C \cdot 30 秒 \rightarrow 54°C \cdot 30 秒 \rightarrow 72°C \cdot 45 秒 29 サイクル

ステップ 3 : 94°C \cdot 30 秒 \rightarrow 54°C \cdot 30 秒 \rightarrow 72°C \cdot 5 分 1 サイクル

PCR産物のサイズを確認するために、PCR産物 2 μ L をアガロースゲル (1.5%) で電気泳動し、インサート部位のサイズを確認し、増幅が確認されたアメリカフジツボ、ヨーロッパフジツボそれぞれ2つの産物についてシーケンスを行った。

シーケンスには Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences Inc.) を用いた。2 μ L の PCR 産物に 1 μ L の 0.08 μ M の Texas Red-T7 primer と 10 μ L の滅菌蒸留水を加え、2 μ L ずつ 4 つに分注した。dNTP mix 2 μ L をそれぞれ加え、以下の条件で PCR 反応を行った。

ステップ 1 : 95 $^{\circ}$ C \cdot 5 分 1 サイクル

ステップ 2 : 95 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒 \rightarrow 51 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C \cdot 1 分 25 サイクル

反応産物は、DNA シークエンサーABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。アメリカフジツボでは2つ、ヨーロッパフジツボでも2つの決定した塩基配列を元に、それぞれ AP2 と マイクロサテライト領域の間の AP2 側に IP1、マイクロサテライト側に IP2 の 2 つのプライマーを設計し、いずれか一方をそれぞれプライマーセットの左側とした。プライマーを設計するにあたり、IP1 は長さ 24~27 塩基で、GC 含量が 35~60%になるようにし、IP2 は長さ 19~24 塩基で、GC 含量が 35~60%になるようにした。

マイクロサテライト領域のもう一端に隣接する塩基配列の決定

0.5 μ L の DNA 溶液に、10 \times buffer を 2 μ L、25 mM の MgCl₂ を 2 μ L、10 mM の dNTP を 2 μ L、0.5 μ M のプライマー (AP1: 5'-CCATCGTAATACGACTCACTATAGGGC-3', IP1) を各 0.5 μ L ずつ、AmpliTaq Gold DNA Polymerase (GeneAmp AmpliTaq Gold PCR Reagent kit; Applied Biosystem; 5U/ μ L) を 0.6 μ L を加え、滅菌蒸留水で全液量を 20 μ L とした。PCR 条件は、以下の通りとした。

ステップ 1 : 94°C · 9 分 → Tann. 30 秒 → 72°C · 1 分 1 サイクル

ステップ 2 : 94°C · 30 秒 → Tann. 30 秒 → 72°C · 1 分 38 サイクル

ステップ 3 : 94°C · 30 秒 → Tann. 30 秒 → 72°C · 5 分 1 サイクル

PCR 産物 4 μ L をアガロースゲル (1.5 %) で電気泳動し、増幅産物を確認した。得られた PCR 産物のうち、クリアで十分な長さのある 1 つだけについて、前述の方法でシーケンスを行った。シーケンスの結果より、SSR と AP2 の間に IP3 を設計し、それぞれプライマーセットの右側とした。

得られた 2 つのプライマーセットの性質の解析

越中島で採集したアメリカフジツボ 16 個体、葛西臨海公園で採集したヨーロッパフジツボ 16 個体から筋組織を約 30 mg 取り出し 2 mL のチューブに入れ、

500 μ L の 8 M の TENS-U バッファーと 10 μ L のプロテナーゼ K (TAKARA) を加えて 37°C で一晩インキュベートした。十分に溶解したことを確認し、10 mg/mL のリボヌクレアーゼ (WAKO 純薬) を 1 μ L 加え、37°C のウォーターバス中で 1 時間インキュベートし、RNA を分解した。フェノール/クロロホルム法によって粗 DNA の抽出し、エタノール沈殿法により、DNA を精製した。精製した粗 DNA は 20 μ g/ μ L になるよう TE 緩衝液で調整した。抽出した DNA を鋳型として、0.5 μ L の DNA 溶液に、10 \times buffer を 1 μ L、25 mM の MgCl₂ を 0.8 μ L、10 mM の dNTP を 1 μ L、20 μ M の各プライマーを 0.3 μ L、5 U/ μ L の Taq DNA Polymerase を 0.06 μ L 加え、滅菌蒸留水で全液量を 10 μ L とした。これを以下の条件で反応させた。

ステップ 1 : 94°C ・ 3 分を 1 サイクル

ステップ 2 : 94°C ・ 30 秒→55°C ・ 30 秒→72°C ・ 30 秒を 30 サイクル

ステップ 3 : 72°C ・ 5 分を 1 サイクル

PCR 産物は、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いてフラグメント長を求めた。これらの方法は鎌・宝月 (2004) を参考にした。

4-2-2 東京湾におけるアメリカフジツボとヨーロッパフジツボの地域個体群の比較

アメリカフジツボは2007年6月から2007年8月に江戸川放水路 (EH; 東京都)、越中島 (EC; 東京都)、海老取川 (ET; 東京都) で、ヨーロッパフジツボは2007年6月から2007年8月に葛西臨海公園 (KS; 東京都)、豊洲 (TY; 東京都)、多摩川河口 (TG; 東京都) で成体を採集し、それぞれ24個体を個体群解析の試料とした (Fig. 4-1, 4-2)。

採集した個体はその場で80%エタノール中に固定し、研究室に持ち帰った。研究室に持ち帰った個体から筋組織を約30 mg 取り出し2 mL チューブに入れ、500 μ L の8 M の TENS-U バッファーと10 μ L のプロテナーゼ K (TAKARA 社) を加えて37°Cで一晩インキュベートした。十分に溶解したことを確認し、10 mg/mL のリボヌクレアーゼ (WAKO 純薬) を1 μ L 加え、37°Cのウォーターバス中で1時間インキュベートし、RNA を分解した。フェノール/クロロホルム法によって粗 DNA の抽出し、エタノール沈殿法により、DNA を精製した。精製した粗 DNA は20 μ g/ μ L になるよう TE 緩衝液で調整した。

得られた DNA 溶液を Template DNA とし、PCR 反応に用いるプライマーは本研究で開発したアメリカフジツボで1対、ヨーロッパフジツボで2対を用いてマイクロサテライト領域の増幅を行った。PCR 反応条件は、Template DNA を 2.0

μ L、10×PCR buffer を 1.5 μ L、2 mM の dNTP を 1.5 μ L、25m M の MgCl₂ を 0.9 μ L、10 mM プライマーを各 0.75 μ L、Taq Polymerase (TOYOBO 社) を 0.1 μ L 加え、滅菌超純水で 15 μ L になるようにメスアップした。DNA Thermal Cycler (TAKARA 社) を用いて、94°C・3 分の熱変性後、94°C・30 秒、55°C・30 秒、72°C・30 分を 35 サイクル行い、最後に 72°C5 分の伸長反応を行い、4°C で保存した。得られた PCR 産物を電気泳動し、目的の領域が増幅されているか確認した。増幅断片の検出とアレルサイズの決定には ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いた。

開発したマイクロサテライトマーカー座の変異量を調べるため、各地域個体群ごとにアレル数、アレルサイズの範囲、ヘテロ接合体率の観察値 (H_o) と期待値 (H_e)、ハーディー・ワインベルグ平衡からの逸脱の有無を Mega 4 (Tamura *et al.*, 2007) および Arlequin ver. 2000 (Schneider *et al.*, 2000)を用いて調べた。ハーディー・ワインベルグ平衡からの逸脱についての検討については、マルコフ連鎖によるパーミュテーションの数を 1000 回に設定して行った。また Arlequin ver. 2000 (Schneider *et al.*, 2000)を使用して、個体群全体の遺伝的変異性のうち、個体群間の差異によってもたらされる変異性の割合を AMOVA 分析によって求め、各個体群間の遺伝的分化の度合を評価するために、各個体群間のペアワイズの遺伝的分化係数 (F_{st})を求めた。各個体群の類似性については、

Arlequin ver. 2000 (Schneider *et al.*, 2000)で遺伝距離 (D_{xy})を算出した後、近接結合法とUPGMA法によってデンドログラムを作成し、評価した。

4-3 結果

4-3-1 マイクロサテライトマーカの開発

設計した2セットのプライマーについてPCRによって増幅を試みたところ、設計した全てのプライマーのうち、アメリカフジツボでは1セット、ヨーロッパフジツボでは2セットにおいて増幅が確認できた。増幅が確認されたマイクロサテライト領域は、アメリカフジツボ、ヨーロッパフジツボともに変異が検出され、遺伝子型の識別が可能であった。識別が可能であったアメリカフジツボのマイクロサテライト座を *AE 1*、ヨーロッパフジツボのマイクロサテライト座については *AI 1*、*AI 2* と名付けた。以上の3つのマーカ座のプロフィールを Table 4-1 に示す。

4-3-2 東京湾におけるアメリカフジツボとヨーロッパフジツボの個体群の比較

アメリカフジツボ

開発したマイクロサテライトマーカの変異性について、江戸川放水路(EH;

東京都)、越中島 (EC; 東京都)、海老取川 (ET; 東京都) の3つの個体群で調べた結果を Table 4-2 に示す。各採集地点の個体群から 152 から 196 bp の範囲で7から9のアリルが検出された。また検出された遺伝子型の分布のハーディ-ワインベルグ平衡からの逸脱について検定したところ、全ての個体群で有意な差はみられなかった ($p < 0.05$)。個体群の遺伝的多様性を示すヘテロ接合度の観測値 (h_o) は江戸川放水路 (EH) が 0.897、越中島 (EC) が 0.905、海老取川 (ET) が 0.859 で、期待値 (h_e) は江戸川放水路 (EH) が 0.818、越中島 (EC) が 0.886、海老取川 (ET) が 0.841 と高く、どの地域個体群の遺伝子構造も多様性に富んでいた。またヘテロ接合度の観測値 (h_o) と期待値 (h_e) から導かれる個体群の近親交配の度合を示す近交係数 (F) の値は、江戸川放水路 (EH) が 0.088、越中島 (EC) が 0.021、海老取川 (ET) が 0.021 で、各個体群はランダムに交配していることが確認された。各個体群間の遺伝的分化の度合を評価するために遺伝的分化係数 (F_{st}) を求めたところ、越中島 (EC) と海老取川 (ET) の間で 0.074 と最も高く、江戸川放水路 (EH) と越中島 (EC) の間で 0.052 と最も低かった。また遺伝的分化計数 (F_{st}) の P 値を求めたところ、全ての地域個体群間で有意に差が認められた (Table 4-3, $p < 0.05$) ことから、各地域個体群で遺伝的に分化していると判断された。各地域個体群間の遺伝的類似性を調べるために遺伝距離 (d_{xy}) を求め、近接結合法 (Fig. 4-3) および UPGMA 法 (Fig. 4-4) によってデンドログ

ラムを作成したところ、それぞれの地域個体群は近接結合法およびUPGMA法によってクラスターが分けられた。

ヨーロッパフジツボ

開発できた2つのマイクロサテライトマーカーの変異性について、葛西臨海公園 (KS; 東京都)、豊洲 (TS; 東京都)、多摩川河口 (TG; 東京都) の3つの個体群で調べた結果を Table 4-4 に示す。検出された遺伝子型の分布のハーディ・ワインベルグ平衡からの逸脱について検定したところ、2つの座位とも各地域個体群で有意な差はみられなかった ($p < 0.05$)。各採集場所の個体群から検出された2つの座位のうち、AI 1 では121 から145 bp の範囲で7 から10 のアリルが検出され、AI 2 では142 から171 bp の範囲で5 から11 のアリルが検出された。個体群の遺伝的多様性を示すヘテロ接合度の観測値 (h_o) は、AI 1 の座位で葛西臨海公園 (KS) が0.774、豊洲 (TS) が0.636、多摩川河口 (TG) が0.894、AI 2 の座位で葛西臨海公園 (KS) が0.867、豊洲 (TS) が0.864、多摩川河口 (TG) が0.819 だった。またヘテロ接合度の期待値 (h_e) は、AI 1 の座位で葛西臨海公園 (KS) が0.627、豊洲 (TS) が0.627、多摩川河口 (TG) が0.713、AI 2 の座位で葛西臨海公園 (KS) が0.705、豊洲 (TS) が0.698、多摩川河口 (TG) が0.801 だった。またヘテロ接合度の観測値 (h_o) と期待値 (h_e) から導かれる個体群の

近親交配の度合を示す近交係数 (F) の値は、座位が $A11$ において葛西臨海公園 (KS) が 0.19、豊洲 (TS) が 0.014、多摩川河口 (TG) が 0.202、座位が $A12$ において葛西臨海公園 (KS) が 0.187、豊洲 (TS) が 0.192、多摩川河口 (TG) が 0.022 で、各座位各個体群ともランダムに交配していることが確認された。また各地域個体群間の遺伝的分化の度合を評価するために遺伝的分化係数 (F_{st}) を求めたところ、葛西臨海公園 (KS) の個体群と多摩川河口 (TG) の個体群の間で 0.072 と最も高くなり、葛西臨海公園 (KS) と豊洲の間で 0.058 と最も低い値を示した (Table 4-5)。遺伝的分化係数 (F_{st}) の P 値は全ての地域間で有意に差が認められた (Table 4-5, $p < 0.05$) ことから、各地域個体群で遺伝的分化が認められた。各地域個体群間の遺伝的類似性を評価するために遺伝距離 (d_{xy}) を求め、近接結合法 (Fig. 4-5) および UPGMA 法 (Fig. 4-6) によってデンドログラムを作成したところ、それぞれの地域個体群は近接結合法および UPGMA 法によってクラスターが分かれた。

4-4 考察

マイクロサテライトマーカーを用いて東京湾内の地域個体群間の遺伝的多様性について調べた結果、各地域個体群のヘテロ接合度の観測値 (h_o) と期待値 (h_e) は高い値を示し、各地域個体群は遺伝的多様性に富んでいることが認めら

れた。また、各地域個体群の近交計数 (F) の値が低かったことから、各地域個体群はランダムな交配を行っていると考えられる。

各地域個体群の遺伝的多様性保持の手段としては、船体付着による海外からの移入と国内移入、幼生分散が考えられる。まず船体付着を介した遺伝子交流について、日本の外来付着生物はほとんど船体付着によって移入したと考えられている (大谷, 2004)。東京湾には平成 11 年から平成 15 年までの過去 5 年間、平均年間約 15 万 5000 隻の船舶が往来し、その内外国からのものは 2 万 2000 隻である (東京湾海難防止協会, 2005)。そのため年間を通じて多くの場所から移入が起こっているものと推測できる。次に、キタアメリカフジツボ (*Balanus glandula*) の場合では、国内における分布拡大が護岸壁構築や改修工事のための大型台船やタグボートを媒体としている可能性が示唆されている (加戸, 2006)。東京湾においても 2 種の外来フジツボが船舶を介して分布拡大や地域個体群との交流している可能性が考えられる。第三に、幼生分散を介した他地域個体群との交流の可能性について、多くの海産無脊椎動物は浮遊幼生期に分散することで分布を拡大していると考えられている (Day and McEdward, 2000)。フジツボ類においても、チシマフジツボ (*Semibalanus cariosus*) で幼生分散が確認されている (加戸, 2003)。しかしながらヨーロッパフジツボでは、幼生は河口域に滞留し、広範囲に分散する可能性は少ないことが報告されている

(Sheltema and Carlton, 1984)。本研究において、各地域個体群間の遺伝的分化計数 (F_{st})は、アメリカフジツボでは各地域個体群間で0.052から0.074の値を示し、遺伝的分化係数 (F_{st})の P 値はそれぞれの個体群間で有意な差が認められた。またヨーロッパフジツボでも遺伝的分化係数 (F_{st})の値は各地域個体群間で0.058から0.072の値を示し、遺伝的分化係数 (F_{st})の P 値はそれぞれの個体群間で有意な差が認められた。また各地域個体群間の遺伝距離 (D_{xy})をもとにして近接結合法とUPGMA法でデンドログラムを作成した結果でも、両種ともに各地域個体群の類似性が低いことが認められた (Fig. 4-3, 4-4, 4-5, 4-6)。すなわち東京湾内に生息するアメリカフジツボとヨーロッパフジツボは狭範囲の個体群間でも遺伝的交流の頻度が低い、すなわち幼生分散を通じた分布拡大の頻度は少ないものと考えられた。各地域個体群の遺伝的多様性が保持されている機構としては、東京湾外からの、および湾内での船体付着による成体の移入・移動と、移入・移動先での幼生の供給の可能性が考えられる。

Table 4-1 Profiles of microsatellite primer sets of one loci in *Amphibalanus eburneus* and two locus in *Amphibalanus improvisus* developed in this study.

Locus	Repeat motif	Primer sequence (5'→3')
<i>AE 1</i>	(CA) _n	F: 5'-GTTACCTTAGCTAAGCCAC-3' R: 5'-ACCGTAGGGCTTCTGGATTGAA-3'
<i>AI 1</i>	(CA) _n	F: 5'-AACGTTTCATTGTCAACGGCAGC-3' R: 5'-GCCTATTACGCTACCTGCTCG-3'
<i>AI 2</i>	(CA) _n	F: 5'-ATTGGCTAACGTGGTTACCTCAG-3' R: 5'-CCGTAAGTACGTGGCAATT-3'

Table 4-2 Number of alleles (NA), alleles size range (bp), observed heterozygosity(*ho*), expected heterozygosity (*he*) and *P*-value of H-W exact test at microsatellite loci in three local populations of *Amphibalanus eburneus* in Tokyo bay.

		EH (N=20)	EC (N=22)	ET (N=16)
<i>AE</i> 1	NA	7	9	7
	Range(bp)	162-173	159-196	152-175
	<i>ho</i>	0.897	0.905	0.859
	<i>he</i>	0.818	0.886	0.841
	<i>P</i> -value	0.159	0.763	0.382

EH: Edogawa-Housuiro, EC: Ecyuujima, ET: Ebitorigawa.

Table 4-3 Pairwise comparison of F_{st} values between three local population of *Amphibalanus eburneus* in Tokyo bay.

	EH	EC	ET
EH			
EC	*0.052		
ET	*0.057	*0.074	

✕ Significant differentiation is indicated by * when $P < 0.05$.

EH: Edogawa-Housuiro, EC: Ecyuujima, ET: Ebitorigawa.

Table 4-4 Number of alleles (NA), alleles size range (bp), observed heterozygosity(*ho*), expected heterozygosity (*he*) and *P*-value of H-W exact test at microsatellite loci in three local populations of *Amphibalanus improvisus* in Tokyo bay.

		KS (N=18)	TS (N=19)	TG (N=21)
<i>AI1</i>	NA	10	7	9
	Range(bp)	121-145	123-137	126-144
	<i>ho</i>	0.774	0.636	0.894
	<i>he</i>	0.627	0.627	0.713
	<i>P</i> -value	0.138	0.944	0.198
<i>AI2</i>	NA	8	11	5
	Range(bp)	151-173	148-169	142-171
	<i>ho</i>	0.867	0.864	0.819
	<i>he</i>	0.705	0.698	0.801
	<i>P</i> -value	0.194	0.226	0.364

KS: Kasai, TS: Toyosu, TG: Tamagawa.

Table 4-5 Pairwise comparison of F_{st} values between three local populations of *Amphibalanus improvisus* in Tokyo bay.

	KS	TS	TG
KS			
TS	*0.058		
TG	*0.072	*0.061	

※ Significant differentiation is indicated by * when $P < 0.05$.

KS: Kasai, TS: Toyosu, TG: Tamagawa

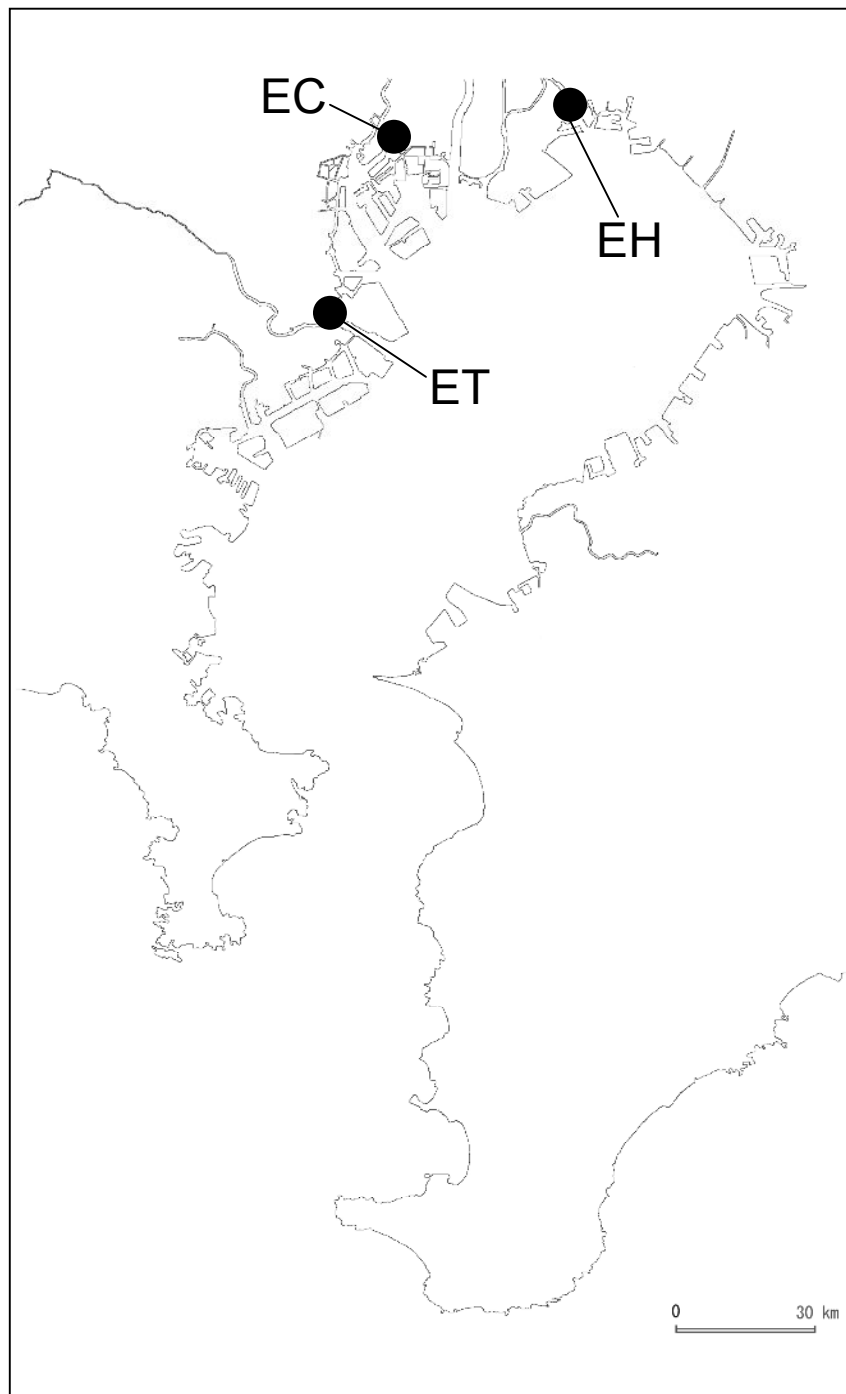


Fig. 4-1 Sampling sites of *Amphibalanus eburneus* in Tokyo bay.
EH: Edogawa-Hōsuiro, EC: Ecyujima, ET: Ebitorigawa.

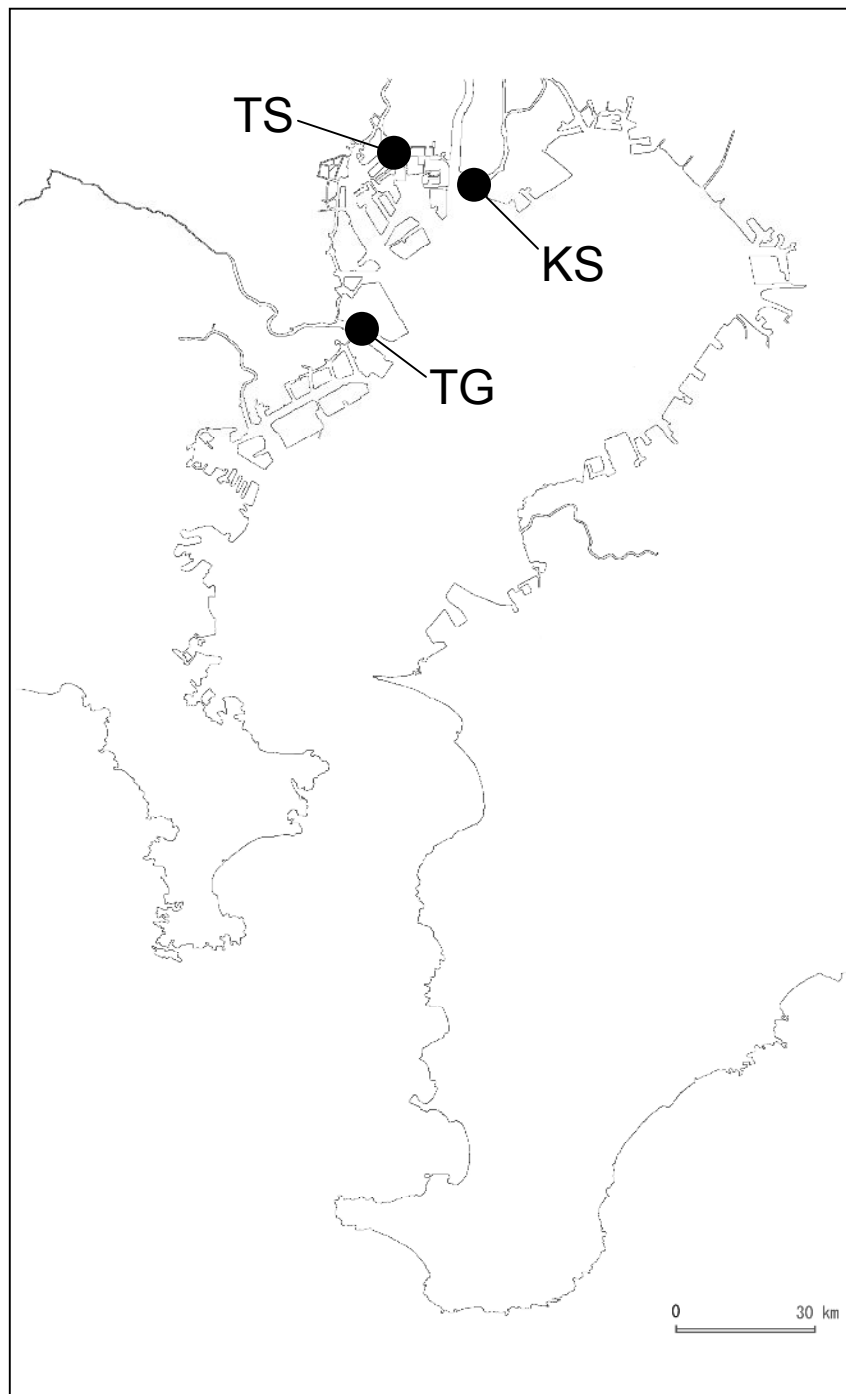


Fig. 4-2 Sampling sites of *Amphibalanus improvisus* in Tokyo bay.
KS: Kasai, TS: Toyosu, TG: Tamagawa.

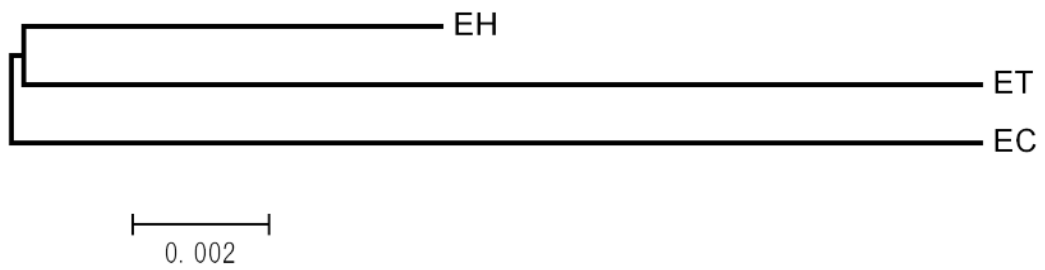


Fig. 4-3 Phylogenetic tree of genetic distance (D_{xy}) of local population of *Amphibalanus eburneus* using the Neighbor-Joining method .
EH: Edogawa-housuiro, EC: Ecyujima, ET: Ebitorigawa.

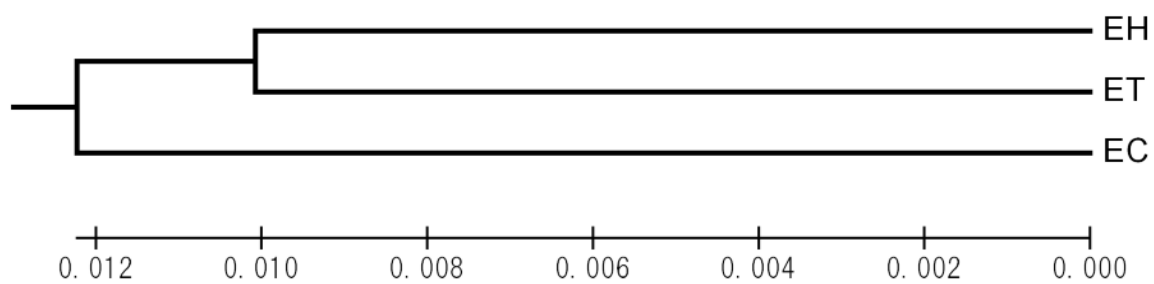


Fig. 4-4 Phylogenetic tree of genetic distance (D_{xy}) of local population of *Amphibalanus eburneus* using the UPGMA method .
EH: Edogawa-housuiro, EC: Ecyuujima, ET: Ebitorigawa.

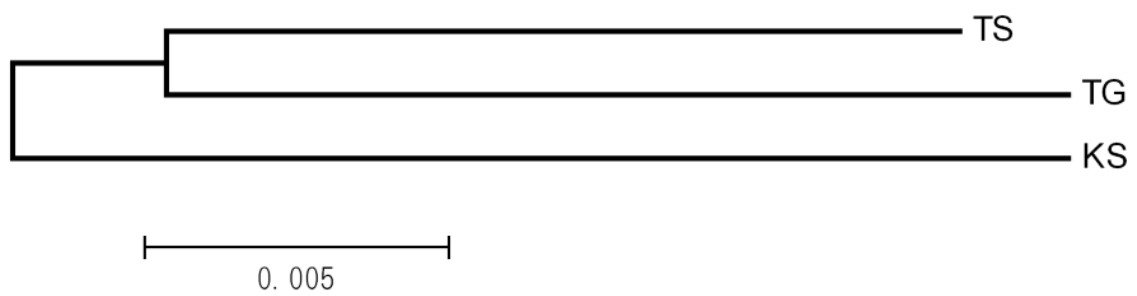


Fig. 4-5 Phylogenetic tree of genetic distance (D_{xy}) of local population of *Amphibalanus improvisus* using the Neighbor-Joining method .
KS: Kasai, TS: Toyosu, TG: Tamagawa.

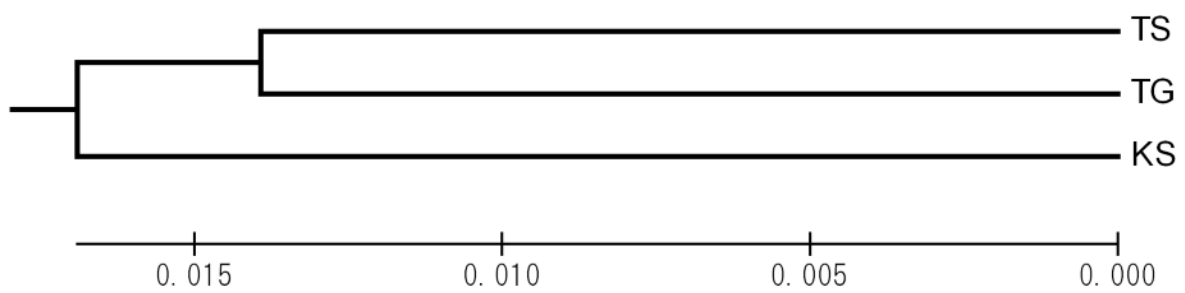


Fig. 4-6 Phylogenetic tree of genetic distance (D_{xy}) of local population of *Amphibalanus improvisus* using the UPGMA method .
EH: Edogawa-housuiro, EC: Ecyuujima, ET: Ebitorigawa.

第5章 総合考察

第2章の結果から、東京湾の潮間帯には、シロスジフジツボ(*Fistulobalanus albicostatus*)、タテジマフジツボ(*Amphibalanus amphitrite*)、イワフジツボ(*Chthamalus challenger*)、アメリカフジツボ(*Amphibalanus eburneus*)、ドロフジツボ(*Fistulobalanus kondakovi*)、クロフジツボ(*Tetraclita japonica*)、ヨーロッパフジツボ(*Amphibalanus improvisus*)、サンカクフジツボ(*Balanus trigonus*)、オオアカフジツボ(*Megabalanus volcano*)、アカフジツボ(*Megabalanus rosa*)の10種のフジツボが出現した。このうちアメリカフジツボとヨーロッパフジツボは塩分が低く波当りの弱い河口や運河でのみ生息していた。これは過去の報告(梶原, 1977; 古瀬・風呂田, 1985; 山口, 1982, 1983; 横浜市環境創造局, 2004; 堀越・岡本, 2007a, b; 安田・川井, 2007)とも一致した。また、各調査地点におけるフジツボ種の種組成の類似性に基づくクラスター解析の結果から、調査地点は外海に面した岩礁域や湾奥でも湾に直接面している場所など、波浪への露出が多いと考えられる「開放海岸」(近藤・グレナス, 1995; McLay and McQueen, 1995; 須田ら, 2008)と運河内や河口、漁港内や防波堤の内側などの波浪への露出が比較的少ないと考えられる「遮蔽海岸」(酒井ら, 2003; 大垣, 2004; 藤田ら, 2006; 大垣, 2008)に大別され、「遮蔽海岸」はさらに「運河・河口」と「その他の遮蔽海岸」に分類でき、アメリカフジツボとヨー

ロッパフジツボは「運河・河口」でのみ出現した。

2種の外来フジツボが河口や運河などの湾奥部でのみ生息しているということから、2種の外来フジツボは幼生分散によって分布を拡大しているとは考え難い。このことはヨーロッパフジツボを対象とした研究 (Sheltema and Carlton, 1984)でも指摘されている。

しかしながら海産動物はその生活史の初期に浮遊幼生期をもつものが多く、浮遊期間が10から15日間の場合、その間に20から30kmを移動・分散しうると考えられている。そのため幼生分散によってメタ個体群が成立し、各地域個体群間で遺伝子流動が成立する (Day and McEdward, 1984)。魚類では、スズメダイ科の *Acanthochromis polycanthus*、ウミタナゴ科の *Embiotocidae jacksoni*、ヘビギンポ科の *Axoclinus nigricaudus* など、仔稚魚段階での浮遊期間が全く見られないか、浮遊期間が短い種については、地域個体群間で遺伝的分化が明確にみられることが報告されている (Riginos and Nachman, 2001)。それに対し、仔稚魚での浮遊期間が長い魚類では、分散による遺伝子流動が起こりやすく、その結果遺伝的分化が起こりにくく、地域個体群間の遺伝的差異が認められないことが報告されている (Kitaura, et al., 1998)。在来種の遺伝子流動を調べた報告では、河川降下型の浮遊幼生期をもつ淡水産甲殻類のモクズガニ *Eriocheir japonicus* の地理的多様性を調べるためにミトコンドリア DNA の CO I 領域を

比較した研究で、本州の個体群間では明確な遺伝的分化は認められないことが報告されている(Yamazaki *et al.*, 2006)。フジツボ類に関しては、キタアメリカフジツボ (*Balanus glandula*)の北アメリカにおける集団遺伝構造を、ミトコンドリア DNA の CO I 領域と核 DNA の EF I α 領域を用いて明らかにした報告(Sotka, *et al.*, 2004)で、ワシントン・オレゴン州の個体群と比較して、カリフォルニア州南部の個体群のハプロタイプの頻度が異なることが報告され、その理由として海流による幼生分散の阻害が示唆されている。

一方、外来種の移入経路、分布拡大経路を推定した報告のうち、陸封型の生活史を持つ北アメリカ原産のアメリカザリガニ (*Procambarus clarkii*) のミトコンドリア DNA の CO I 領域を比較対象領域として遺伝的変異と分散様式を調べた研究(西川ら, 2008)では、日本国内の各地域個体群には遺伝的変異が認められなかったが、原産地ルイジアナ州では、日本と同じハプロタイプを含む9種のハプロタイプが認められたことから、日本に移入されたアメリカザリガニは創始者効果の影響を受けたか、現存のハプロタイプに強い選択圧がかかったことが示唆されたと報告されている。また、タテジマフジツボ *Amphibalanus amphitrite* は 1935 年に相模湾で初確認された外来フジツボで、現在はほぼ日本全国に分布している(岩崎ら, 2004; 大谷, 2004)が、移入分散経路の推定を行った報告(北村ら, 2006)でも地域個体群間で明確な違いは認められていない。こ

これらのことから、一般的に浮遊幼生期を持つ多くの海産生物は、幼生分散により他海域の個体群と遺伝的交流が成立していると考えられる。しかし、アメリカフジツボとヨーロッパフジツボの場合、10日程度の浮遊幼生期を持つ (Costrow *et al.*, 1957; Nasrolahi *et al.*, 2006)ものの、東京湾での成体の分布が湾奥の河口や運河に限られていることから、幼生分散によって他海域に分布を拡大しているとは考えにくい。そのため、第3章と第4章では成体の遺伝情報を比較することによって、2種の外来フジツボの幼生分散の可能性について検証した。

第3章では日本の太平洋側の地域個体群で幼生分散を通じた遺伝的交流が成立しているかを調べるために、アメリカフジツボではミトコンドリア DNA の COI 領域を比較領域とし、東京都(夢の島、越中島、芝浦、お台場、多摩川河口)、神奈川県(横浜)、静岡県(清水港、浜名湖)、愛知県(藤前干潟)、大阪府(新淀川河口)、兵庫県(住吉川河口)、広島県(本川河口)、佐渡島の合計 13 地域の個体群の遺伝的構造を比較した。ヨーロッパフジツボではミトコンドリア DNA の D-loop 領域を比較領域とし、東京都(葛西臨海公園、多摩川河口)、静岡県(清水港)、愛知県(藤前干潟)、大阪府(新淀川河口)、兵庫県(住吉川河口)の合計 6 地域の個体群の遺伝的構造を比較した。その結果、アメリカフジツボではミトコンドリア DNA の COI 領域のハプロタイプが合計 20 ハプロタイプ検出された。

各地域間の遺伝的距離(d_{xy})は「東京、神奈川、静岡、愛知」と「大阪、兵庫、広島」で大きくわけられ、遺伝的分化係数(F_{st})もこの2つの地域間では有意な差が認められたことから、「東京、神奈川、静岡、愛知」の個体群を関東個体群、「大阪、兵庫、広島」の個体群を関西個体群とすると、日本におけるアメリカフジツボは、関東と関西で遺伝的構造が異なることがわかった。

ヨーロッパフジツボではミトコンドリア DNA の D-loop 領域のハプロタイプが合計 19 ハプロタイプ検出された。各地域間の遺伝的距離(d_{xy})は「東京、静岡、愛知」と「大阪、兵庫」で大きくわけられ、遺伝的分化係数(F_{st})もこの2つの地域間では有意な差が認められたことから、「東京、静岡、愛知」の個体群を関東個体群、「大阪、兵庫」の個体群を関西個体群とすると、日本におけるヨーロッパフジツボは、関東と関西で遺伝的構造が異なることがわかった。

すなわち、アメリカフジツボとヨーロッパフジツボでは、関東と関西の個体群間で幼生分散を通じた遺伝的交流の頻度は低いことが示唆された。この結果から、日本国内における2種の分布拡大は幼生分散以外の方法、すなわち船体付着などの人為的な影響によるものが大きいと考えられる。また過去の分布調査(内海, 1966; 馬渡, 1967; Henry and McLaughlin, 1975; 山口, 1989; 朝倉, 1992; 梶原, 1994; 大谷, 2002; 山口, 2002; 岩崎ら, 2004)におけるアメリカフジツボとヨーロッパフジツボの確認年代と各地点のハプロタイプを比較すると、

船舶による交易が今より盛んでなかった 1950 年代に移入したと考えられるハプロタイプが全地域で卓越しており、地域に特有なハプロタイプは出現頻度が低かった。このことから、1950 年代以降に新たに分布を拡大した個体群に関しては、異なる移入源からの複数回の移入があったものと考えられる。しかしながら関東内、関西内の個体群間には遺伝的構造に明確な違いが認められなかったことから、比較的狭い範囲では幼生分散による交流が存在する可能性が考えられた。

そのため第 4 章では第 3 章では検出されなかった狭域の地域個体群間の比較を行うために、マイクロサテライトマーカーを用いた比較を行った。アメリカフジツボでは江戸川放水路 (EH)、越中島 (EC)、海老取川 (ET) の 3 つの地域個体群の遺伝子構造を比較した結果、東京湾内のアメリカフジツボの地域個体群間の遺伝的分化係数 (F_{st}) は、どの地域個体群間でも有意な差が認められ、遺伝距離 (D_{xy}) を用いて作成したデンドログラムでも、3 つの地域個体群はクラスターが分かれた。ヨーロッパフジツボでは葛西臨海公園 (KS)、豊洲 (TS)、多摩川 (TG) の 3 つの地域個体群の遺伝子構造を比較した結果、アメリカフジツボと同様に東京湾内のヨーロッパフジツボの地域個体群間の遺伝的分化係数 (F_{st}) は、どの地域個体群間でも有意な差が認められ、遺伝距離 (D_{xy}) を用いて作成したデンドログラムでも、3 つの地域個体群はクラスターが分かれた。これ

らのことから狭範囲の個体群間でも遺伝的交流の頻度が低い、すなわち幼生分散を通じた分布拡大の頻度は少ないものと考えられた。各地域個体群の遺伝的多様性が保持されている機構としては、東京湾外から、および湾内での船体付着による成体の移入・移動と、移入・移動先での幼生の供給の可能性が考えられた。

本研究で行った東京湾内の分布調査から、アメリカフジツボとヨーロッパフジツボの分布は湾奥部の遮蔽海岸に限られることが明らかとなった。またマイクロサテライトマーカーを用いた解析から、これらの外来フジツボ2種の東京湾内地域個体群は、幼生分散を通じた遺伝的交流が頻繁ではないことが示唆された。さらにミトコンドリアDNAに基づく解析結果からは、関東と関西の個体群間で頻繁な遺伝的交流は認められなかった。これらのことは外来種であるアメリカフジツボとヨーロッパフジツボの日本国内での分布拡大は、幼生分散による可能性は低く、むしろ船体付着などによる人為的移動によるものの方が重要であったことを示唆している。したがって今後の両種の分布拡大を防止するための対策を考える際には、国内での分布のモニタリングだけでなく、船体付着についても考慮する必要があると考えられる。

参考文献

- 味岡ゆい・市橋泰範・久島広晃・小萱香代・堀川大介・南 基泰 (2007). DNA多型を用いた遺伝的多様性解析と鑑定法. 生物機能開発研究所紀要, 7, 49-74.
- 秋元清治・瀬崎啓次郎・三谷勇・渡部終五 (2003). ミトコンドリア制御領域の塩基配列分析による日本周辺漁場におけるキンメダイの集団遺伝構造の解析. 神水研研報, 8, 89-97.
- 安藤晴夫・川井利雄・牧秀明・木幡邦男・越川海 (2005). 洪水時の流入汚濁による東京湾水質への影響について. 東京都環境科学研究所年報, 252-256.
- Anil, A.C. (1990). Studies on macrofouling ecology of cirripedes in Hamana Bay (Japan). 東京大学学位論文, 東京, pp. 96-144.
- Anil, C.A., Chiba, K., Okamoto, K. and Kurokura, H. (1995). Influence of temperature and salinity on larval development of *Balanus amphitrite*: implications in fouling ecology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 118, 159-166.
- Anil, A.C. and Kurian, J. (1996). Influence of food concentration, temperature and salinity on the larval development of *Balanus amphitrite*. *Mar. Biol.*, 127, 115-124.
- 有山啓之 (1992). 大阪湾のミドリイガイ. *Nature Study*, 38, 9-10.
- 朝倉彰 (1992). 東京湾の帰化動物—都市生態系における侵入の過程と定着成功の要因に関する考察—. 千葉中央博自然誌研究報告, 2(1), 1-14.
- 荒川好満 (1974). 付着生物による水産業の被害. 海洋科学, 6(4), 42-47.
- Bacon, P.R. (1971). The maintenance of a resident population of *Balanus eburneus* (Gould) in relation to salinity fluctuations in a Trinidad mangrove swamp. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 6, 187-198.

Brown, A.F., Kann, L.M. and Rand, D.M. (2007). Gene flow versus local adaptation in the northern acorn barnacle, *Semibalanus balanoides* insights from mitochondrial DNA variation. *Evolution*, 55(10), 1972-1979.

Chan, B.K.K. and Morritt, D. (2001). The effect of salinity and recruitment on the distribution of *Tetraclita squamosa* and *Tetraclita japonica* (Cirripedia: Balanomorpha) in Hong Kong. *Marine Biology*, 138, 999-1009.

Chan, B.K.K. and Hung, O.S. (2005). Cirral length of the acorn barnacle *Tetraclita japonica* (Cirripedia: Balanomorpha) in Hong Kong: effect of wave exposure and tidal height. *J. Crustacean Biol.*, 25(3), 329-332.

千葉県水産総合研究センター (2005). 東京湾海況情報. 17(01-10), 1-3.

Costlow, J.D.Jr. and Bookhout, C.G. (1957). Larval development of *Balanus eburneus* in the laboratory. *Biol. Bull.*, 112, 313-324.

Crisp, D.J. and Barnes, H. (1954). The orientation and distribution of barnacles at settlement with particular reference to surface contour. *J. Anim. Ecol.*, 23, 142-162.

第三管区海上保安本部海洋情報部. http://www1.kaiho.milt.go.jp/KAN3/kaisyo/tokyo_kankyo/tokyo_menu.htm

Dalby, D.H., Cowell, E.B., Syratt, W.J. and Crothers, J.H. (1978). An exposure scale for marine shores in western Norway. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 58, 975-996.

Day, R. and McEdward, L. (2000). Aspects of the physiology and ecology of pelagic larvae of marine benthic invertebrates. In: "Marine plankton life cycle strategies" (Steidinger, K.A. and Walker, L.M. ed.), CRC Press, Florida, 93-113

Delany, J., Myers, A.A., McGrath, D., O’Riordan, R.M. and Powere, A.M. (2003). Role of post-settlement mortality and supply-side ecology in setting patterns of intertidal distribution in the chthamalid barnacles *Chthamalus montagui* and *C. stellatus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 249, 207-214.

Desai, D.V. and Anil, A.C. (2000). Influence of temperature on the starvation threshold of nauplii of barnacle *Balanus amphitrite* (Cirripedia: Thoracica). *Indian J. Mar. Sci.*, 29, 69-72.

Deneen, J.F.Jr, and Hines, A.H. (1992). Interactive effects of salinity and adult extract upon settlement of the estuarine barnacle *Balanus improvisus* (Darwin, 1854). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 156, 239-252.

Dufresne, F., Bourget, E. and Bernatchez, L. (2002). Differential patterns of spatial divergence in microsatellite and allozyme alleles: further evidence for locus-specific selection in the acorn barnacles, *Semibalanus balanoides*?. *Mol. Ecol.*, 11, 113-123.

El-Komi, M.M. and Kajihara T.(1990). Observation on the settlement and growth of barnacles in Tokyo Bay, Japan. 付着生物研究, 8(1), 1-8.

遠藤毅 (2004). 東京都臨海域における埋立地造成の歴史. 地学雑誌, 113, 785-801.

Farrell, T.M., Bracher, D. and Roughgarden, J. (1991). Cross-shelf transport causes recruitment to intertidal populations in central California. *Limnol. Oceanogr.*, 36, 279-288.

Foster, B.A. (1987). Barnacle ecology and adaptation. In: “Crustacean issues 5, Barnacle Biology” (A.J. Southward ed.), A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 113-133.

藤田大介・新井章吾・村瀬昇・東出幸真 (2006). 舢倉島の露出海岸と遮蔽海岸における海藻の垂直分布と帯状構造. 藻類, 54, 165-171.

- 風呂田利夫 (1997). 東京湾の生態系と環境の現状. 「東京湾の生物誌」(沼田眞・風呂田利夫編), 築地書館, 東京, pp. 2-23.
- 風呂田利夫 (2005). 内湾ベントスにおける地域個体群間ネットワークの重要性. 水産総合研究センター研究報告別冊, 3, 35-46.
- 古川恵太 (2004). 東京湾内における水の循環、そのおもしろい特徴. 国総研アニュアルレポート 2004, 国土交通省国土技術政策総合研究所, pp. 54-57.
- 古瀬浩史・風呂田利夫 (1985). 東京湾奥部における潮間帯付着動物の分布生態. 付着生物研究, 5(2), 1-6.
- Gaines, S.D. and Bertness, M.D. (1992). Dispersal of juveniles and variable recruitment in sessile marine species. *Nature*, 360, 579-580.
- Gordon, C.M. (1969). The influence of salinity on the distribution of barnacle species in Chesapeake Bay (Cirripedia). *Crustaceana*, 16, 139-142.
- 濱田秀則・岩波光保・丸屋剛・横田弘 (2002). 海生生物付着による海洋構造物の耐久性向上について. コンクリート工学年次論文集, 24, 1, 675-680.
- 羽生和弘・関口秀夫 (2000). 伊勢湾と三河湾に出現したミドリイガイ. *Sessile Organisms*, 17, 1-11.
- Henry, D.P. and McLaughlin, P.A. (1975). The barnacles of the *Balanus amphitrite* complex (Cirripedia, Thoracica). *Zoologische Verhandelingen*, 141, 1-254.
- 平野礼次郎 (1974). フジツボの生活史と付着生態. 海洋科学, 6(4), 32-36.
- 本間義治・北見健彦・伊藤正一 (1974). 加茂湖(佐渡島)の動物相—予報. *Proc. Jap. Soc. Syst. Zool.*, 10, 63-73.
- 堀越彩香・岡本研 (2005). アミメフジツボ、東京湾で初確認. *Sessile Organisms*, 22, 47-50.

堀越彩香・岡本研 (2007a). 東京湾海岸部における潮間帯付着生物群集の現状. *Sessile Organisms*, 24, 9-19.

堀越彩香・岡本研 (2007b). 東京湾における灯浮標上の付着生物群集の現状. *Sessile Organisms*, 24, 21-32.

一柳洋 (1989). 誰も知らない東京湾. 農文協, 東京, pp. 194.

岩城俊昭 (1981). 本邦で一般的なフジツボ数種の繁殖生態. 付着生物研究, 3(1), 61-69.

岩崎敬二 (2002). 海産・汽水産生物. 「外来種ハンドブック」(日本生態学会編), 地人書館, 東京, p. 177.

岩崎敬二・木村妙子・木下今日子・山口寿之・西川輝昭・西栄二郎・山西良平・林育夫・大越健嗣・小菅丈治・鈴木孝男・逸見泰久・風呂田利夫・向井宏 (2004). 日本における海産生物の人為的移入と分散: 日本ベントス学会自然環境保全委員会によるアンケート調査の結果から. 日本ベントス学会誌, 59, 22-44.

岩崎敬二 (2006). 外来付着動物と特定外来生物被害防止法. *Sessile Organisms*, 23(2), 13-24.

加戸隆介 (1991). フジツボ. 「海洋生物の付着機構」(水産無脊椎動物研究所編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 85-96.

加戸隆介 (2003). チシマフジツボ幼生の回帰と環境要因. *Sessile Organisms*, 23, 63-68.

加戸隆介 (2006a). キタアメリカフジツボ-北米からきて北日本の潮間帯を席卷した新しい移入種-. 「フジツボ類の最新学」(日本付着生物学会編)、恒星社厚生閣、東京、 pp. 80-92.

加戸隆介 (2006b). フジツボの生活史と初期生態. 「フジツボ類の最新学」(日本付着生物学会編)、恒星社厚生閣、東京、 pp. 93-111.

海上保安庁 (2008). 海潮流推算情報.

梶原武 (1977). 東京湾における付着動物群集. 海洋科学, 9, 346-350.

梶原武 (1978). 海産付着動物の生態と防除に関する研究—研究成果報告書. 文部省科学研究費補助金総合研究(A), 3-7.

梶原武 (1985). ムラサキイガイ-浅海域における侵入者の雄. 日本の海洋生物-侵略と攪乱の生態学 (沖山宗雄・鈴木克美編), 東海大学出版, pp. 49-54.

梶原武 (1994). 横浜港における潮間帯付着生物の種類組成と現存量. 付着生物研究, 11(1), 1-9.

神奈川県水産技術センター. <http://www.agri.pref.kanagawa.jp/suisoken/Kaikyozo/TokyoWanko.asp>

環境影響評価情報支援ネットワーク (2001). 生物の多様性分野の環境影響評価技術検討会報告書. 生物の多様性分野の環境影響評価技術 (Ⅲ), 生態系アセスメントの進め方について, 海域生態系—公有水面埋め立て事業を例として—.

川上啓介 (2008). 東京海洋大学品川キャンパス係船場の環境特性と貧酸素状態改善の試み. 東京海洋大学修士論文, 東京, pp. 8.

川井浩史・上井進也・木村妙子 (2006). バラスト水・船体付着により越境移動した生物群集の起源、拡散経路および動態の解析に関する研究. 大型船舶のバラスト水・船体付着により越境移動する海洋生物がもたらす生態系攪乱の動態把握とリスク管理に関する研究, 環境省地球環境研究総合推進費修了研究成果報告書, pp. 15-45.

川崎市環境局 (2003). 水質年報, 平成 15 年度版.

Kennedy, V.S. (1983). Subtidal distribution of barnacles (Cirripedia: Balanidae) in Chesapeake bay, Maryland. *Estuaries*, 6(2), 95-101.

建設省 (1990). 海岸統計. 平成 2 年度版, pp. 185-255.

北村徹・小林聖治・勝山一郎・木島明博・サトイト シリル グレン・北村等・大谷道夫 (2006). タテジマフジツボの移入分散経路に関する遺伝学的考察. 日本付着生物学会 2006 年研究集会講演要旨集.

Kitaura, J., Yamamoto, G. and Nishida, M. (1998). Genetic variation in populations of the diamond-shaped squid *Thysanoteuthis rhombus* as examined by mitochondrial DNA sequence analysis. *Fish. Sci.*, 64, 538-542.

小池義夫・喜多澤彰・林敏史・宮崎唯史・野村英明 (1998). 東京湾における表層水温・塩分・クロロフィル濃度の季節変動. 東京海洋大学航海調査報告, 7, 158-161.

小池裕子・松井正文 (2003). 生物進化と保全遺伝学. 「保全遺伝学」(小池裕子・松井正文編). 東京大学出版会, 東京, pp. 19-39.

国土交通省 (2004). 首都圏整備に関する年次報告. 東京湾沿岸域の現状と今後の展望. 平成 15 年度版首都圏白書, pp. 37-43.

近藤康生・ステースグレナス (1995). ニュージーランドの開放海岸に生息する大型深潜没二枚貝トヘロア(チドリマスオガイ科)の底質にもぐる速さと位置・方位. *Venus*, 54, 67-76.

小坂昌也 (1985). フジツボ類一岸壁面をめぐる争い. 「日本の海洋生物」(沖山宗雄・鈴木克美編), 東海大学出版会, 東京, pp. 61-68.

小坂昌也・石橋公 (1979). 清水港における移入種アメリカフジツボ *Balanus eburneus* の生態分布. 付着生物研究, 1(1), 3-10.

Lagercrantz, U., Ellegren, H., and Andersson, L. (1993). The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nuc. Aci. Res.*, 21, 1111-1115.

McCune, B. and Mefford, N.J. (1999). Multivariate analysis of ecological data. Version 4.14. MjM Software, Gleneden Beach, Oregon, U.S.A.

McQuaid, C.D. and Lindsay, T.L. (2000). Effect of wave exposure on growth and mortality rates of the mussel *Perna perna*: bottom-up regulation of intertidal populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 206, 147-154.

松村剛・石丸隆・浜田浩明・野田明・峰雄二 (2000). 東京湾における 1998 年度のクロロフィルの周年変動. 東京海洋大学航海調査報告, 9, 153-160.

馬渡静夫 (1967). わが国港湾汚損の生物学的研究 I. 研究概要. 資源科学研究所彙報, 69, 87-122.

馬渡静夫・北村晴男・川島康代 (1968). 移入フジツボの船による分布拡大—淡青丸の場合—. 動物分類学会誌, 4, 24-30.

馬渡静夫 (1974). 汚損生物による電力被害と対策の問題点. 海洋科学, 6(4), 23-27.

Mclay, C.L. and McQueen, D.J. (1995). Intertidal zonation of *Cyclograpsus lavauxi* H.Milne Edwards, 1853 (Brachyura: Grapsidae) along the coast of the South Island of New Zealand. *Crustacean research*, 24, 49-64.

三浦収 (2007). 太平洋を渡った巻貝, ホソウミニナの移入経路の推定. 生物科学, 58(4), 202-206.

宮地伝三郎・波部忠重・今泉正・天野宏・山根謹爾 (1944). 浦内湾における内湾度と潮間帯並びに底生群集との関係. 日本海洋学会誌, 3, 207-216.

宮嶋時三 (1974). 付着生物が船速に及ぼす影響. 海洋科学, 6(4), 37-41.

Moore, H.B. and Kitching, J. A. (1939). The biology of *Chthamalus stellatus*. *J. Mar. Biol. Ass. UK.*, 23, 521-541.

Moritz, C., Dowling, T.E. and Brown, W.M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Eco. Sys.*, 18, 269-292.

向井貴彦 (2007). DNA から見た外来種研究: どこまで“犯人”を追えるのか?. 生物科学, 58(4), 192-201.

村瀬敦宣・根元雄太・前田玄 (2007). 東京湾の浜離宮恩賜庭園潮入の池と高浜運河に出現するハゼ科魚類. 神奈川自然誌資料, 28, 75-83.

Nasrolahi, A., Farahani, F. and Saifabadi, S.J. (2006). Effect of salinity on larval development and survival of the Caspian sea barnacle, *Balanus improvisus* Darwin (1854). *Jour. Biol. Sci.*, 6(6), 1103-1107.

新潟県観光課 (1969). 佐渡海域の無脊椎動物. 佐渡海中公園調査報告書, 新潟県, pp. 35-46.

西田睦・大河俊之・磐田祐士 (1998). ミトコンドリア DNA 分析による集団構造解析法. 水産育種, 26, 81-100.

西川輝昭 (1996). 藤前干潟. 「日本における干潟海岸とそこに生息する底生生物の現状」. WWF Japan サイエンスレポート, 3, 94-95.

西川潮・東典子・高村典子・高村健二 (2008). ミトコンドリア DNA 解析に基づく外来ザリガニ類の遺伝的変異と分散様式. 第 55 回日本生態学会大会講演要旨集, 163.

野口大毅・池田実・中嶋正道・谷口順彦 (2003). サクラマス集団解析のためのマイクロサテライト DNA マーカーの開発とその特性について. 水産育種, 33(1), 61-66.

沼田眞 (1997). 都市生態系と沿岸の問題. 東京湾の生物史(沼田眞・風呂田利夫編), 築地書館, 東京, pp. 220-229.

大垣俊一 (2001). 紀伊半島南部沿岸の海況. *Argonauta*, 5, 9-21.

大垣俊一 (2001). 環境の内湾度と海洋生物. *Argonauta*, 10, 19-41.

大垣俊一 (2008). 海岸生物と岩礁基盤. *Argonauta*, 15, 23-30.

大谷道夫 (2002). 日本における移入付着動物の出現状況、最近の動向. *Sessile organisms*, 19(2), 69-92.

Pannacciulli, F. G., Piyapattanakorn, S., Bishop J. D. D., Hawkins, S. J. and Maclean, N. (2005). Isolation of highly polymorphic microsatellite markers from the intertidal barnacle *Chthamalus montagui* Southward. *Mol. Ecol. Not.*, 5, 641-643.

Qiu, J.W. and Qian, P.Y. (1997). Effects of food availability, larval source and culture method on larval development of *Balanus amphitrite amphitrite* Darwin: implications for experimental design. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 217, 47-61.

Qiu, J.W., Gosselin, L.A. and Qian, P.Y. (1997). Effect of short-term variation in food availability on larval development in the barnacle *Balanus amphitrite amphitrite*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 161, 83-91.

鍊春蘭・宝月岱造 (2004). 効率的マイクロサテライト(SSR)マーカー作製のためのプロトコル. 日林誌, 86(2), 191-198.

Riginos, C. and Nachman, M.W. (2001). Population subdivision in marine environments: the contributions of biogeography, geographical distance and discontinuous of habitat to genetic differentiation in a blennioid fish, *Axoclinus nigricaudus*. *Mol. Ecol.*, 10, 1439-1453.

Roff, D.A. and Benzen, P. (1989). The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms and the problem of small sample sizes. *Mol. Biol. Evol.*, 6, 539-545.

Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. and Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19, 2497-2497.

齋藤節雄・森立成 (2005). クローンヒラメのクローン性の証明と系統判別 第2報 マイクロサテライト DNA 多型による証明と判別. 北水試験報, 68-70.

坂井悦郎・吉田夏樹・真下昌章・渡邊弘子 (2002). 各種セメントを用いたコンクリートの生物付着性状と塩化物イオンの固定. コンクリート工学年次論文集, 24, 1, 681-686.

酒井和也・小林昭男・宇多高明・芹沢真澄・熊田貴之 (2003). 波の遮蔽構造物を有する海岸における 3次元静的安定海浜形状の簡易予測モデル. 海洋工学論文集, 50, 496-500.

Schneider, L., Roessli, D. and Excoffier, L. (2000). A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

Sheltema, R.S. and Williams, I.P. (1982). Significance of temperature to larval survival and length of development in *Balanus eburneus* (Crustacea: Cirripedia). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 9, 43-49.

Sheltema, R.S. and Carlton, J.T. (1984). Methods of dispersal among fouling organisms and possible consequence for range extension and geographical variation. Marine Biodeterioration: An interdescriplinary study (Costlow, J.D. and Tipper, R.C. ed). Naval Institute Press, Annapolis, Maryland, pp. 127-133.

Sotka, E., Wares, J.P., Barth, J.A., Grosberg, R.K. and Palumbi, S.R. (2004). Strong genetic clines and geographical variation in gene flow in the rocky intertidal barnacle *Balanus glandula*. *Mol. Ecol.*, 13(8), 2143-2156.

Southward, A.J. (1958). Note on the temperature tolerances of some intertidal animals in relation to environmental temperatures and geographical distribution. *J. Mar. Biol. Ass., U.K.*, 37, 49-66.

須田有輔・大富潤・早川康博 (2008). 開放的な砂浜海岸における水産生物と環境 -吹上浜をモデルとした生態研究-. 日本水産学会誌, 74, 919.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S., (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24, 1596-1599.

棚瀬信夫 (1997). 干潟の造成. 海岸の環境創造—ウォーターフロント学入門 (磯部雅彦編), 朝倉書店, 東京, pp. 58-73.

谷口順彦 (2007). 魚類集団の遺伝的多様性の保全と利用に関する研究. 日本水産学会誌, 73, 408-420.

Thiyagarajan, V., Harder, T. and Qian, P.Y. (2003). Combined effects of temperature and salinity on larval development and attachment of the subtidal barnacle *Balanus trigonus* Darwin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 287, 223-236.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W. improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weighting matrix choice, *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673-4680.

東京都環境保全局 (1987). 水生生物調査報告書. 昭和60年度版, 324-325.

東京湾海難防止協会 (2005). 東京湾における NO-Pilot 外国船の実態. 東京湾における船舶の航行安全, 海と安全, 524, 18-23.

東京湾岸自治体環境保全会議 (2003). 平成15年度 東京湾水質調査報告書, 1-55.

東京湾岸自治体環境保全会議 (2004). 平成16年度 東京湾水質調査報告書, 1-54.

土田陽介・佐藤千夏・向井貴彦 (2007). 岐阜県周辺地域におけるオオクチバスの侵入と分布拡大パターン. 生物科学, 58 (4), 213-220.

内海富士夫 (1966). 外国産フジツボの最近における日本への移入. 動物分類学会誌, 2, 36-39.

植田育男 (2001). ミドリイガイの日本定着. 黒装束の侵入者—外来付着性二枚貝の最新学 (日本付着生物学会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 27-40.

植田育男・萩原清司・櫻井徹 (2008). 江の島の潮間帯動物相—V. 神奈川自然誌資料, 29, 163-169.

鷺谷いずみ・森本信生 (1993). 日本の帰化生物. 保育社, 大阪, pp. 191.

Wing, S.R., Bostford, L.W., Largier, J.L. and Morgan, L.E. (1995). Spatial structure of relaxation events and crab settlement in the northern California upwelling system. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 128, 199-211.

山口寿之 (1982). 神奈川県の高間帯フジツボ類群集、その1. 東京湾西岸. 神奈川自然誌資料, 3, 63-64.

山口寿之 (1983). 神奈川県の高間帯フジツボ類群集、その2. 神奈川自然誌資料, 4, 51-55.

山口寿之 (1986a). 日本のクロフジツボ類の地理的分布および種間関係. 日本ベントス研究会誌, 29, 25-36.

山口寿之 (1986b). フジツボ類. 「付着生物研究法」(付着生物研究会編)、恒星社厚生閣、東京、pp. 107-122.

山口寿之 (1989). 外国から日本に移住したフジツボ類、特に地理的分布および生態の変化. 神奈川県自然誌資料, 10, 17-32.

山口寿之 (2002). ヨーロッパフジツボとアメリカフジツボ. 「外来種ハンドブック」(日本生態学会編)、地人書館、東京、pp. 182.

山下桂司・神谷享子 (2006). 発電所とフジツボ. 「フジツボ類の最新学」(日本付着生物学会編)、恒星社厚生閣、東京、pp. 209-224.

Yamazaki, I., Yoshizaki, G., Yokota, M., Strüssmann, C.A. and Watanabe, S. (2006). Mitochondrial DNA variation and population structure of the Japanese mitten crab *Eriocheir japonica*. *Fish. Sci.*, 72(2). 299-309.

安田晴夫・川井利夫 (2007). 東京都内湾における底生生物生息状況の解析結果について. 東京都環境科学研究所年報, 2007年度版, 77-84.

横浜市環境創造局 (2004). 横浜港の付着動物. 「横浜の川と海の生物(海域編)10」(環境創造局環境活動事業課編)、横浜市、pp. 125-139.

謝辞

本研究の遂行にあたり、遺伝学的手法をご教授いただいた東京大学大学院農学生命科学研究科森圏管理学研究室の井出雄二教授、齊藤陽子助教、内山憲太郎特任助教、他森圏管理学研究室の皆様には厚く御礼申し上げます。また本研究を行うに当り、東京大学大学院農学生命科学研究科水域保全学研究室の日野明德教授、青木茂助教、水域保全学研究室の皆様には研究全般のみならず私事でもお世話になりました。また岡本研准教授には、研究の進行から論文の添削まで、多岐に渡って大変お世話になりました。この場を借りて水域保全学研究室の皆様には感謝を申し上げたいと思います。ありがとうございました。