

## 論文の内容の要旨

水圏生物学 専攻  
平成 23 年度博士課程 入学  
氏名 平井 惇也  
指導教員名 津田 敦

論文題目 The diversity and biogeography of planktonic copepods in the tropical and subtropical Pacific

(太平洋熱帯・亜熱帯における浮遊性カイアシ類の多様性と生物地理)

浮遊性カイアシ類は海洋で卓越する動物プランクトンであり、食物網や物質循環において重要な役割を果たしている。また、浮遊性カイアシ類は既知種だけで 2,500 種を超える多様性に富んだ生物群であり、生物多様性や環境評価を示す指標生物としてしばしば扱われる。しかし、従来の研究は限られた地域や分類群で行われることが多かったため、広範囲に及ぶ網羅的なカイアシ類の群集構造の把握は十分に成されておらず、「構成種数」「種毎の分布様態」「分布の決定要因」といった項目さえ十分に明らかにされていない。その律速要因の一つは、高度な専門知識や経験を必要とする形態分類であり、従来の形態分類によるカイアシ類の群集構造の把握は、膨大な時間を要する作業である。そこで、形態情報に依存しない手法を導入し、カイアシ類の群集構造を容易に解析する技術の開発は、本生物群及び海洋の生態系を理解する上できわめて重要である。

本研究では、分子生物学的な手法を用い、カイアシ類の群集構造の解析手法を確立し、知見が少なく形態分類も困難である太平洋熱帯・亜熱帯におけるカイアシ類の多様性や生物地理を明らかにすることを目的とした。はじめに、カイアシ

類の種判別のために有用な遺伝子マーカーを探索し、超並列シーケンサーを用いたカイアシ類群集の網羅的な解明手法を開発した。確立された新たな方法により、太平洋熱帯・亜熱帯で得られた試料を解析し、カイアシ類の群集構造を明らかにした。さらに、種内の分子系統地理を調べることにより、種分化や地理分布の決定要因について考察した。得られた研究結果の概要は以下の通りである。

## 1. カイアシ類の種判別のための遺伝子マーカーの探索

カイアシ類の種判別のための遺伝子マーカーの条件として、遺伝子増幅の過程である PCR で成功率の高い共通プライマーを設計できること、ならびに種間で十分な配列の差があることが挙げられる。そこで、244 個体の亜熱帯性カラヌス目カイアシ類を形態により分類し、候補となる遺伝子マーカーを調査した。

カイアシ類で一般的に利用されているミトコンドリア DNA の COI 領域は変異速度が速く、共通プライマーによる PCR 成功率は 244 個体中 77 個体(31.6%)と低かった。一方、核 DNA の 28S 領域とそれに隣接する ITS2 領域は、保存的領域に挟まれており、共通プライマーの設計が容易で、232 個体(95.1%)で ITS2-28S 領域の遺伝子増幅が確認できた。

形態分類された 53 種の ITS2-28S 領域の種間、種内の塩基配列を調べたところ、全ての種間で塩基配列に差がみられた(Kimura two parameter distance  $\geq 0.005$ )。また、4 種(*Lucicutia flavicornis*, *Nannocalanus minor*, *Pleuromamma abdominalis*, *Spinocalanus spinosus*)から隠蔽種を示唆する比較的大きな種内の差が見られたが、その他の種内の塩基配列の差は小さかった(0-0.001)。これらの結果から、ITS2-28S 領域はカイアシ類の種同定に有用であると考えられた。ITS2-28S 領域の中でも、ITS2 は種間で挿入や欠失が頻繁に起き、カイアシ類の系統関係を把握することは困難であった。一方、28S 領域には系統関係が正確に反映されており、多様な分類群のカイアシ類を含んだ遺伝子解析にも適することが示された。

## 2. 超並列シーケンサーを用いたカイアシ類群集の解析手法の確立

大量の遺伝子データの解読が可能な超並列シーケンサーを用いたメタゲノム解析による環境中の群集構造解析は、微生物群集を対象とした研究分野で近年一般化しつつある。このメタゲノム解析技術をプランクトンネットで採取された試料に応用し、カイアシ類の群集構造を明らかにする手法の開発を行った。メタゲノム解析の目的領域は、「種間で差がある」、「系統関係を反映している」、「成功率の高い共通プライマーが設計できる」、「約 400 bp と超並列シーケンサーで解読できる長さである」という特徴から 28S の D2 領域が最適であると判断した。

はじめに、大量の遺伝子配列のデータ処理方法を確立するため、33 種の既知の

カイアシ類を入れた試料のメタゲノム解析を行った。PCRにより増幅した 28S-D2 領域を超並列シーケンサーにより網羅的に解読し、遺伝子配列の差による便宜上の種である Molecular Operational Taxonomic Unit (MOTU)に分類した。既知のカイアシ類試料のメタゲノム解析の結果から、97%の相同性で MOTU への分類を行うと、形態分類と同レベルの分解能を維持しつつ、解析エラーを除去できることがわかった。また、MOTU 数で種数を、各 MOTU の遺伝子配列数で生物量が反映されることが示された。

次に、黒潮域 3 点の表層(0-200 m)で採取した試料をそれぞれ等分割し、メタゲノム解析及び形態分類を行った。メタゲノム解析で得たプランクトンネット試料の種多様性の高い地域、各分類群組成、優占分類群等の結果は、形態分類の結果とおおむね一致した。この結果、メタゲノム解析が実際の試料の解析に適することを確認され、迅速かつ網羅的なカイアシ類群集の把握方法が確立された。

### 3. 太平洋熱帯・亜熱帯におけるカイアシ類の群集構造解析

確立された新たな手法を用い、太平洋熱帯・亜熱帯におけるカイアシ類の群集構造解析を行った。試料は黒潮域 3 点、北太平洋亜熱帯循環域 8 点、南太平洋亜熱帯循環域 5 点、赤道域 3 点の計 19 点の表層(0-200 m)にて採取した。上記方法により、434,304 のカイアシ類由来の 28S-D2 配列が得られ、97%の相同性から 404 MOTU に分類された。

Bray-Curtis の類似度指数を用いたクラスター解析により、黒潮内側域は特有の群集構造を示し、沿岸性の生態系であることが示唆された。その他の測点は赤道・黒潮グループ、南北亜熱帯循環域を含む亜熱帯循環グループに大別された。この結果は、黒潮・赤道域、南北亜熱帯循環域に分布の中心を持つ MOTU が多く見られたことと一致した。冗長分析による環境要因との比較により、これらの分布パターンにはクロロフィル *a* 濃度が強く影響していることが示された。赤道・黒潮域は南北亜熱帯循環に比べてクロロフィル *a* 濃度が高く、生産性の高い環境に適した分類群が赤道・黒潮域で優占していると考えられた。

MOTU 数、多様度指数は亜熱帯循環域で高く、多様な分類群が観察されたことから、多種の棲み分けにより多様性が維持されていると考えられた。また、黒潮・赤道域の多くの MOTU は、北太平洋亜熱帯循環内にも見られ、MOTU 数は北太平洋亜熱帯循環で最大の値が示された。黒潮による輸送、南太平洋亜熱帯循環に比べ高いクロロフィル *a* 濃度等の要因により、黒潮・赤道種の多くは北太平洋亜熱帯循環内に分布を広げていると考えられた。

#### 4. 太平洋熱帯・亜熱帯における *Pleuromamma abdominalis* の分子系統地理

種内の集団構造も解析が可能なミトコンドリア DNA COI 領域により，太平洋熱帯・亜熱帯域 25 点で採取された *Pleuromamma abdominalis* の分子系統地理を調べた。471 個体の系統解析の結果，*P. abdominalis* は 2 つのグループ (*P. abdominalis* 1 及び *P. abdominalis* 2) に分かれた。核 DNA 28S 領域の結果も一致し，この 2 つのグループは生殖隔離のある隠蔽種であることが示唆された。*P. abdominalis* 1 の割合は黒潮・赤道域で高く，南太平洋亜熱帯域ではほとんど分布が見られなかった。一方，*P. abdominalis* 2 は南北亜熱帯循環内で割合が高く，湧昇域である東部赤道域では分布が確認されなかった。遺伝的距離による推定から，種分化は約 11.6–16.0 百万年前の中新世中期に起こったと推定された。これは，当該海域での寒冷化や一次生産量の増大の開始時期と一致し，*P. abdominalis* 1 が餌料環境の豊富な低水温域へ適応することで種分化が起こったと考えられた。

また，各隠蔽種内の分子系統地理により，北太平洋亜熱帯域，赤道域，南太平洋亜熱帯域で大きく異なる集団構造が見られた。南太平洋亜熱帯の集団は，赤道域との間に顕著な遺伝的交流は見られなかった。一方，北太平洋亜熱帯では過去に集団の隔離や二次的接触が赤道域との間で起こったことが示唆され，二次的接触は黒潮域で特に顕著であった。これらの結果から，赤道域の集団が黒潮域に輸送され，赤道・黒潮種の地理分布が形成されたと考えられた。

以上，本研究により，カイアシ類の群集構造の迅速かつ網羅的な把握方法が確立され，太平洋熱帯・亜熱帯におけるカイアシ類の多様性や生物地理に関する知見が得られた。また，分子系統地理の結果と合わせることで，現在の環境条件のみならず，集団の隔離や交流が種の分布や多様性に影響を与えていることが示唆された。これらの成果は，カイアシ類の多様性や生物地理の一端を明らかにしたものであり，今後さらに広域の試料を解析することで，全球規模のカイアシ類の多様性の創造・維持機構や地理分布を決定する要因の解明を促進すると考えられる。