

博士論文

沖縄トラフ熱水噴出域における熱水性甲殻類
ゴエモンコシオリエビの集団構造と生活史および幼生分散

(Population structure, life cycle and larval dispersal of
a hydrothermal vent galatheid crab *Shinkaia crosnieri*
in the Okinawa Trough, Japan)

徐 美恵

目次

要旨.....	3
緒言.....	6
熱水噴出域周辺の環境.....	6
熱水噴出域周辺の生態系.....	7
熱水種の潜在的価値.....	8
熱水域の鉱物資源.....	10
海底資源開発へ向けての取り組み.....	13
熱水噴出域の十脚甲殻類ゴエモンコシオリエビ.....	14
本研究の目的.....	18
第1章 ゴエモンコシオリエビの集団構造と生活史.....	19
1-1 材料.....	19
1-2 方法	
1-2-1 遺伝的集団構造の解析.....	23
1-2-2 集団の組性の解析.....	24
1-3 結果	
1-3-1 遺伝的集団構造の解析.....	25
1-3-2 集団の組性.....	31
1-4 考察.....	35
第2章 新規加圧観察機器の開発とゴエモンコシオリエビの幼生生態の観察.....	38
2-1 材料と方法	
2-1-1 加圧観察機器の開発.....	39
2-1-2 新規加圧観察システムによる加圧観察実験.....	40
2-1-3 密度による浮力測定.....	41
2-2 結果	
2-2-1 加圧観察機器の開発.....	41

2-2-2	アルテミア幼生を用いた加圧システムの動作試験.....	43
2-2-3	ゴエモンコシオリエビ幼生の加圧観察.....	44
2-2-4	ゴエモンコシオリエビ幼生の浮力測定.....	44
2-3	考察	
2-3-1	加圧観察機器の開発と評価.....	53
2-3-2	ゴエモンコシオリエビ幼生の圧力応答.....	54
2-3-3	ゴエモンコシオリエビ幼生の浮力.....	56
第3章	海流モデリングによる幼生分散の推定.....	58
3-1	方法.....	59
3-1-1	環境パラメーターの鉛直プロファイル.....	60
3-1-2	幼生分散モデリング.....	60
3-2	結果	
3-2-1	海流の方向と流速の鉛直プロファイル.....	62
3-2-2	海水密度の鉛直プロファイル.....	64
3-2-3	各水深帯における幼生分散モデリング.....	66
3-3	考察	
3-3-1	沖縄トラフ内の海流の鉛直プロファイル.....	72
3-3-2	ゴエモンコシオリエビの卵と幼生の浮力.....	73
3-3-3	各水深帯における幼生分散の推定.....	74
総合考察.....		77
謝辞.....		83
引用文献.....		84

Appendix: A new species of Bopyrid Isopod infesting *Shinkaia crosnieri* (Decapoda: Galatheididae) from hydrothermal vents in the Okinawa Trough, Japan, with notes on its ecology

要旨

熱水噴出域（熱水域）は暗黒・高圧条件に加えて通常、生物に有害とされる重金属や硫化水素等にさらされた環境であるが、そこには多様な生物種（以下、熱水種とする）が生息していることが知られている。これまでに熱水種のおよそ 90%、550 種以上が熱水域固有種として報告されており、熱水種は海洋の生物多様性を考える上で無視できない構成要素と考えられている。また特殊な環境に生息する熱水種は、非熱水性の近縁種とは異なる生態や生存戦略を持つ事が予想され、進化生態学の優れた研究モデルであると言える。その一方で、近年熱水域周辺の資源開発が熱水域生態系に及ぼす影響が強く懸念されており、熱水種の遺伝・生態学的知見の収集が強く求められている。熱水種の生息域である熱水域は不連続かつ不安定な環境である。熱水種の多くは成体の移動能力が乏しいため、卵や幼生の時期に熱水域間の長距離分散が行われていると考えられるが、幼生形態や生態が知られている種は限られており、実際に海洋中を浮遊している熱水種幼生を採集することは極めて困難である。1970 年代後半に熱水域が発見されて以来、熱水種の集団形成や維持機構の理解に重要な幼生分散に関する数々の研究がおこなわれて来た。しかしながら、それらの研究の多くは遺伝学的手法を用いた間接的な幼生分散の推定であり、幼生生態に関する研究や海流等の海洋物理情報を考慮した複合的な研究の事例はまだ少ない。本研究では、資源開発の有力な候補地である沖縄トラフを代表する熱水種であるゴエモンコシオリエビを対象とし、1) 沖縄トラフ内の全生息域の集団を対象とした遺伝的集団構造と生活史の解析、2) 新たな加圧実験装置の開発による本種幼生の圧力応答の観察、3) 沖縄トラフの海流モデリングと幼生分散の推定を行い、熱水域のモデル種として幼生分散機構の解明を目指した。

ミトコンドリア DNA の COI 領域、16S rRNA 領域と核 DNA の ITS2 領域の塩基配列に基づき、沖縄トラフ内の本種の生息が確認されている全 7 ヶ所の地域集団の遺伝的集団構造を解析した。さらに、体長組成および雌雄比や抱卵個体の頻度により、繁殖の季節性の有無を判定した。地域集団間に遺伝的な偏りが見られなかったことから本種が高い幼生分散能力を持ち、生息する熱水域の分布水深や距離に関わらず、相互的に幼生が行き来していることが示唆された。沖縄トラフの熱水域の水深は 600m から 1650m と幅広く、この結果は幼生が海底付近ではなく、海底から離れた水深帯を分散している可能性が高い事を示唆している。また、採集時期に関わらず抱卵雌の存在が確認されたことから、本種が

1年を通して産卵を行うことが確認された。

次に、ゴエモンコシオリエビの幼生の加圧観察実験を行なった。水圧は水深に正比例して増加する唯一の環境パラメーターであるため、幼生の水圧に対する耐性を確認することは幼生分散の水深を探る上で重要である。しかし、これまで行われてきた加圧実験には観察手法や取り扱いに関する問題点が多く、加圧下で幼生を観察する手法は未だ確立されていない現状にある。そのため、本研究では対象種の幼生に適した加圧実験機器を開発し、幼生の水圧に対する応答を観察した。アルテミアを用いた試行の結果、新たに開発した加圧実験機器は簡単な操作で段階的な加圧観察が行えることが確認された。本装置は実験対象をリアルタイムで観察することが可能であり、圧力実験を行う上で効果的な実験機器であると言える。この加圧実験機器を用いた実験の結果、ゴエモンコシオリエビの幼生は10MPa以上の水圧がかけられた際に、不適切な環境における逃避行動と考えられる激しい腰折り運動を行うことが確認された。このことから本種幼生が1000m以浅の環境を好むと考えられた。また密度測定の結果、卵と幼生が海水より低い密度を持つ事が確認された。

最後に、沖縄トラフの海流をモデリングすることにより、幼生分散の推定を行なった。沖縄トラフ表層には北東へ流れる黒潮があることが知られているが、黒潮の下には南向きに流れる深層海流が存在することが報告されている。水深や場所によって海流の方向や流速が変化することが想定されるが、沖縄トラフ内の鉛直的な海流情報は係留計による局所的な情報に限られるため、ROMSデータを用いた海流モデリングにより本種の幼生分散を推定した。モデリングの結果、沖縄トラフ内には水深500mから800mの間に黒潮と深層海流の境界があることが示された。また水深帯ごとの2次元的な流体シミュレーションの結果、水深100mでは幼生の過半数が5日以内に、8割が15日以内に沖縄トラフから流出するのに対し、水深500mでは30日以上、水深750m以深では120日以上沖縄トラフ内に留まると推定された。先行研究から本種幼生は31日以上の幼生期を持つと考えられるので、幼生の大部分が沖縄トラフ内に留まる水深500m以深で分散する可能性が高いと考えられる。

以上の結果を総合的に考察すると、本種の幼生の分散は沖縄トラフに長期間留まる事のできる500m以深かつ、幼生の逃避行動の起こらない1000m以浅の水深帯で行われ、黒潮と深層海流の両方により輸送されることで、沖縄トラフの全ての分布域の地域集団間に双方向の遺伝的交流が実現していると考えられる。この水深範囲で正の浮力を持つことか

ら、幼生が能動的に定位していることが示唆される。本研究は沖縄トラフの熱水種で遺伝的集団構造・生態情報・海洋物理情報を総合的に検討した初めての例であり、熱水種の幼生分散を研究する上で非常に有用な知見となるとともに、沖縄トラフの熱水鉱床開発に伴う環境影響評価にも貢献するものと期待される。

緒言

地表や海洋の有光層で光合成が行なわれる一方で、光の届かない深海底では太陽光に頼らない一次生産である化学合成が行なわれている。この化学合成は熱水噴出域（以下、熱水域とする）や冷湧水（冷水湧出帯やメタン湧水とも呼ばれる）などの還元的な環境で硫化水素やメタンを利用する化学合成細菌やメタン酸化細菌（メタン酸化は厳密には化学合成と区別されるが、本論文では便宜的に化学合成に含める）によって行なわれており、こうした場所の生態系を構成する生物のほとんどが固有種であることが知られている（Desbruyères *et al.* 2006; Van Dover 2000; Watanabe *et al.* 2010）。こうした生物種は海洋の生物多様性を考える上で無視できない重要な構成要素の一つである。特に深海底に不連続に分布する不安定な環境である熱水噴出域に生息する種（以下熱水種）は、冷湧水域や通常の深海底に棲息する近縁種とは異なる生態や生存戦略を持つことが予想され、進化生態学の興味深い研究対象であるとともに、熱水種そのものが有用な生体物質を持つ可能性も否定出来ない。また生態系の一次生産者である化学合成細菌は多様な炭素固定方法を行い、海洋の炭素循環に貢献している（Minic *et al.* 2011）。一方で、近い将来本格化することが予想される熱水域近傍での海底熱水鉱床の開発が熱水域生態系に悪影響を及ぼすことが強く懸念されており、熱水種の分類学的、生態学的情報を収集し、開発の環境影響評価に資することが強く求められている。本研究では、熱水噴出域に生息する熱水種のうち、日本の熱水鉱床開発の有力な候補地である伊是名海穴を含む沖縄トラフの熱水域の優占種であるゴエモンコシオリエビに注目し、集団構造、生活史および幼生分散に関する解析をおこなった。

熱水噴出域周辺の環境

海洋プレートが大陸プレートに衝突し、その下に沈み込むことによって海溝が形成される。この時、大陸プレートのプレート境界面には島弧と呼ばれる火山列が形成される。島弧の活火山が海中にある場合、熱水域が形成される。また島弧の背面（海溝とは反対側）には背弧海盆と呼ばれるお盆状に窪んだ地形が形成される。プレート運動に伴って拡大して行く背弧海盆の拡大軸に沿っても、熱水噴出活動が生じることが知られている。4枚の

プレート（北米プレート、ユーラシアプレート、太平洋プレート、フィリピン海プレート）が衝突と沈み込みを行なっている日本列島周辺では現在、背弧海盆である沖縄トラフと島弧である伊豆・小笠原弧に熱水域が分布している。熱水域は深海底に形成される、海底から浸みこんだ海水がマグマで加熱され周囲の岩石と反応した高温の熱水が噴き出す場所であり、背弧海盆や島弧に加えて新たな海洋プレートが形成される中央海嶺や背弧海盆の拡大軸に沿って分布している。いずれの熱水域も不連続に分布する不安定な環境であり、熱水噴出活動が持続する期間は限られている。熱水域の寿命と分布範囲はマグマの供給や規模等によって決まる為、海底拡大速度に依存していると言われている（Juniper and Tunnicliffe 1997; MacDonald 1998; Van Dover 2000）。20mm/year から 40mm/year の比較的遅い拡大速度を持つ太平洋中央海嶺（MAR）の中では1つの熱水噴出孔の寿命は数百年から数千年とされており、50 mm/year から 80 mm/year の拡大速度を持つ東太平洋海嶺（NEP）の中では熱水噴出孔の寿命は数十年程度とされている（Vrijenhoek 2010）。沖縄トラフの海底拡大速度は北部で 10mm/year、中部で 25 mm/year から 30mm/year、南部で 35 mm/year から 50 mm/year（Oda 2007）と MAR の拡大速度に近い為、数百年から数千年に限られた寿命を持つと考えられる。熱水域の特殊な化学・物理環境は一般的な生物の棲息に適さないものである。深海底の一般的な特徴である高水圧や暗黒に加えて、熱水噴出域の噴出孔から噴き出す、最高で 407°Cにも達することが報告（Koschinsky *et al.* 2008）されている熱水中には硫化水素やメタン、重金属等の生物にとって有害な化学成分や含有物が高濃度で含まれている。これらの多くの要因によって、熱水域は周辺の深海底とは化学環境的にも物理環境的にも大きく異なる、特殊な環境となっている。

熱水噴出域周辺の生態系

熱水域は通常生物に有害とされている重金属や硫化水素等に常にさらされる環境であるが、それにもかかわらず現在までに多くの熱水域で多様な生物種が発見されている。こうした熱水種の多くは他の海洋環境では見られない熱水域の固有種であり、これまでに 550種以上が熱水噴出域の固有種として報告されている（Desbruyères *et al.* 2006）。これは熱水域全体に見られる生物種の90%以上に相当するとされている（Van Dover 2000; Watanabe *et al.* 2010）。熱水域やメタン湧水域の生物群集は化学合成生物群集と呼ばれ、

生産者である化学合成細菌やメタン酸化細菌が硫化水素やメタン等の還元物質を酸化することで、光合成によらずに合成する有機物に依存している。一次消費者である大型の多細胞生物は化学合成細菌を直接摂餌したり、共生菌として利用しており、例えば熱水域の代表的な動物群であるハオリムシ類は環形動物であるにもかかわらず消化器官を持たず、体内に持つトロフォソーム（栄養体）と呼ばれる器官に硫黄酸化細菌を共生させることで栄養を得ている（Fisher 1990）。これまでの研究から、トロフォソームはハオリムシ類の発生段階で共生細菌が体表から侵入することによって中胚葉から分化・形成されることが明らかになっている（Nussbaumer *et al.* 2006）。植物が持つ葉緑体が光合成細菌由来であることや動物が持つミトコンドリアが好気性細菌に由来することから分かるように、共生と言う生物間相互作用はこれまで生物の進化と適応の歴史の中で重要な役割を果たして来た。硫化水素等の有害な化学物質が存在し、かつ光合成による一次生産が見込めない深海の熱水域では、こうした共生関係が重要な役割を担っていると考えられる。実際に、熱水域から共生もしくは寄生といった生物間相互関係に強く依存する種が多数報告されている。

不安定な環境である熱水域の固有種には、他の熱水域へ分散する能力を持つことが不可欠であるが、その多くは成体が固着性で移動能力を持たない。大型の甲殻類は比較的高い移動能力を持っているが、餌とする化学合成細菌が熱水の化学成分に強く依存していることから、熱水域を離れての長距離移動は困難であると考えられる。従って、熱水種の長距離分散は浮遊卵や浮遊幼生の時期に行なわれていると考えられるが、実際に海洋中を浮遊している熱水種幼生を採集することは困難であり、幼生形態や生態が判明している熱水種は限られている。実際、これまでに採集されている熱水種の幼生のほとんどが親個体の生息域周辺で採集されており、親個体の生息域から離れた海洋表層では一例の採集例があるのみである（Arellano *et al.* 2014）。熱水域そのものも深海底に位置するため、現地でのサンプリングや実験が容易ではなく、分散メカニズムについての研究が進んでいない熱水種が多い。

熱水種の潜在的価値

熱水域の生物は化学合成生態系という特殊な生態系の構成種であり、その高い固有性と

生態の特殊性から多くの研究者の興味を集めている。その理由の一つとして、熱水種が生物の分散や進化の研究モデルとして理想的な特徴を持つことがあげられる。熱水域はプレート境界面に沿って不連続に分布する、周囲の通常の深海底と水温や海水の化学組成の面で大きく異なる環境である。さらに熱水生態系の食物連鎖が化学合成細菌を起点としていることから、個々の熱水域を1つの島の様な存在と考えることが出来る。ダーウィンの進化論の成立においてガラパゴス諸島のフィンチ類の事例が重要な役割を果たした様に、海洋中に存在しながらも島に類似した独立性を有している熱水域は、海洋における進化の過程を研究する上で最適な環境であると考えられる。熱水種の集団の形成過程や多様性の維持機構を明らかにすることは、熱水生態系の成立や同環境下での適応進化だけではなく、海洋生物全体における適応放散メカニズムの理解に大きく貢献することが期待される。

生物学的な研究対象としての価値に加えて、熱水種を持つ生体物質の商業的利用の可能性も指摘されている。生物は生息環境に適応進化する過程でしばしば独自の生体物質を獲得してきた。そのため、異なった生息環境の生物は、他種とは異なる生体物質をコードする遺伝子を持っていることが予測される。そうした生体物質が人間にとって有用である場合、遺伝子資源として活用できる可能性がある。例えば、DNAの塩基配列を決定する過程のPCR産物精製で使用されるExoSAPと呼ばれる試薬に含まれるSAP(シュリンプアルカリホスファターゼ)は、深海性のエビの持つ生体物質(酵素)に由来する。熱水環境を除く深海は約3°Cの安定した低温環境であり、分子実験に使用される深海生物由来のSAPは高温で容易に不活化出来る。この性質を利用すると、不完全なPCR産物や一本鎖DNAを簡便に除去することが出来る。このような性質を持つ深海生物由来のSAPをPCR産物の精製に利用することで、円滑に実験を行なうことが可能になった。より人の生活に密接な例として、近年栄養補助剤として注目されているグルコサミンも自然界でエビ・カニ類の甲殻に多く含まれることが知られている。この他にも、現在様々な生体物質が有用物質として利用されており、私たちの生活に密接に関係している。熱水噴出域に生息する生物種には研究の進んでいないものが多いが、生息域の環境特異性に高度に適応することで特殊化した生体物質の遺伝子を進化させている可能性があり、その潜在的な利用価値は大きいと考えられる。

熱水域の鉱物資源

近年、熱水種が生息する熱水域そのものの利用価値も注目されている。高温の熱水中に溶け出した重金属・貴金属等が周辺の海水によって冷却されて近傍の海底に沈殿することにより、海底熱水鉱床と呼ばれる金属鉱床が形成される。このような海底熱水鉱床は 1970 年代に発見されて以来、世界中で 350 カ所以上見つかっている（飯笹 2010）。鉱床としての商業的な価値は、噴出する熱水の組成を規定する海底岩盤の鉱物組成や含水率、相分離の有無、CO₂やSO₂のマグマへのインプットの有無等、様々な要因により変化するが、複数の陸上鉱山と海底熱水鉱床の金属資源の含有率を比較すると、海底熱水鉱床に含有される金属資源の品位が決して低くないことがわかる（表 1）。また日本の EEZ（排他的経済水域）内に存在する海底熱水鉱床は他国よりも浅い水深に存在している（図 1）。熱水鉱床に含まれる金属は日常生活の中で使用する電線や各種のケーブル、自動車、自宅、電気・電子機器、航空・宇宙関係、また専門性の高いところでは IT 関連や環境保全等のハイテク分野に用いられる等、現在の私たちの生活にとって無くてはならないものとなっている。2007 年 2 月にイギリスのベンチャー企業ネプチューン・ミネラルズが日本の EEZ 内の海底熱水鉱床の試掘権を申請したことからも分かるように、近年の科学技術の発展に伴って可能になった海底資源の開発が、世界的に注目されている。

表 1) 海底熱水鉱床の金属資源の例 (独立行政法人石油天然ガス・金属鉱物資源機構 2009
を改変)

種類	鉱床名	主な金属資源の品位					鉱床の規模	
		Cu (%)	Zn (%)	Pb (%)	Au (g/t)	Ag (g/t)	水平 (m)	垂直 (m)
陸上鉱山	松峰	2.39	3.6	1	0.5	57	600×400	100
	深沢角掛沢	1.13	15.4	3.3	0.6	93	500×300	5
	小坂内ノ岱	2.0	4.4	1.5	0.8	160	400×300	40
熱水鉱床	白嶺鉱床	1.25	43.3	3.9	30.6	1118	550×440	不明
	サンライズ	6.5	2.4	0.07	1.1	39.7	500×400	不明
	Hakurei Site	4.7	26.4	15.3	4.0	150	500×1000	不明
	Pika Site	1.04	0.88	0.08	0.13	59.2	150×500	> 5.6
	水曜海山	6.5	4.6	0.23	7.3	173.3	250×300	0~1

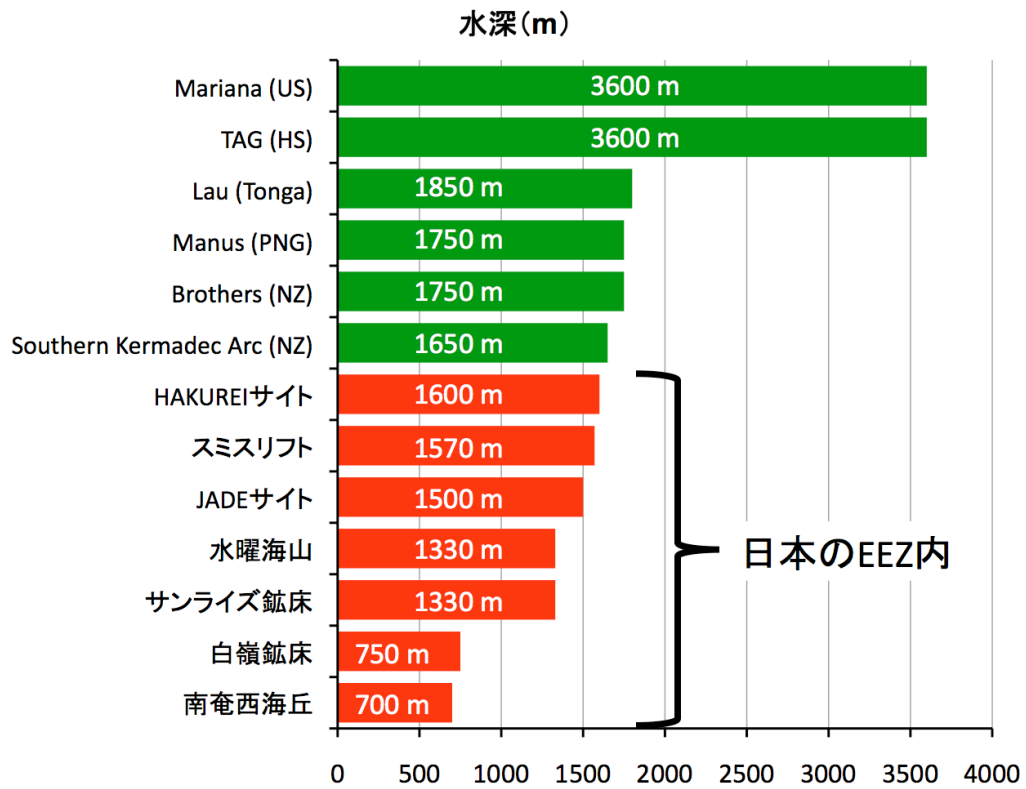


図1) 海底熱水鉱床の賦存水深(独立行政法人石油天然ガス・金属鉱物資源機構 2009 を改変)

海洋資源開発へ向けての取り組み

近年の科学技術の進歩に伴うハイテク産業の発展により、レアメタル等の金属資源の需要が今後ますます高まって行くと予想される。一方で国内の金属鉱山は最近40年間に次々と閉山し、現在では鹿児島県の菱刈金山を残すのみとなっている。その結果、日本は現在、金属資源のほぼ100%を輸入に頼っており、資源を安定して確保する為に鉱石産出国に絶えず技術・資金提供を行なっている。しかしながら現在採掘されている鉱石も将来的に枯渇する恐れがある。長期的に資源を確保するためには常に新たな金属資源の探鉱・開発を行なう必要がある。このように新たな金属資源を必要とする日本では、近年海底熱水鉱床への関心が高まっている。平成19年に施行された海洋基本法、平成20年に閣議決定され、平成25年に改訂された海洋基本計画、また平成21年3月に承認を受けた海洋エネルギー・鉱物資源開発計画の中にも、海底熱水鉱床の積極的な開発が盛り込まれている。海洋資源開発計画は平成20年度から実行に移され、5億円の年間予算をかけて開発へ向けての調査がなされる等、国を挙げての大規模かつ優先的な計画として扱われている（内閣官房総合海洋政策本部；<http://www.kantei.go.jp/jp/singi/kaiyou/>）。特に直近では、平成26年から内閣府の戦略的イノベーション創造プログラム（SIP）の一つに次世代海洋資源調査技術（通称、海のジパング計画）が選ばれ、海底熱水鉱床を始めとする海洋資源の調査や開発に関する技術・産業的進歩を目標とした研究調査活動が始動している。この様に、日本において海底熱水鉱床開発の重要性は非常に大きいと言えるが、その一方で資源開発が周辺の生態系に与える影響が懸念されている。深海底で行なわれる資源開発の影響調査の一例に、マンガン団塊の開発に先立って行なわれた Japan Deep-sea Impact Experiment（JET）と呼ばれる開発影響調査が挙げられる。マンガン団塊にはコバルト、ニッケル、銅、マンガン等が含有されており、深海熱水鉱床と同じく商業的な開発が検討されている海洋底の金属資源である。開発による周辺生態系への影響を調査する為、マンガン団塊の採掘を模して実験的に海底の攪乱を行なったところ、攪乱前は10属10種であった周辺の線虫群集が、攪乱の24ヶ月後に共通種1種のみを含む16属17種へと変化していたことが確認された（Shirayama and Fukushima 1997）。この結果から、海洋底の開発は周辺の生態系の多様性に2年以上にわたり影響を残すことが示された。より長期的な海底攪乱の影響が確認された例もある。1978年に水深5000mにあるフランスの開発予定鉱区で行われた環境調査では、試験的な海底ドレッジ後に線形動物の種組成が変化し、ドレッジを

行っていない海底と比較して多様性と生物量が著しく減少したことが報告されている (Miljutin *et al.* 2011)。この環境調査では海底攪乱から 26 年後も線形動物の群集は回復が見られず、資源開発が周辺生態系に長期的な影響を及ぼす可能性が慮られている。採掘によって海洋底の攪乱を引き起こす熱水鉱床の開発でも、マンガン団塊開発の場合と同じく周辺生態系への影響が表れることが予想されるが、実際にどのような影響が起りうるのかを実験的に検証する試みは未だ行われていない。そのため正に開始されようとしている開発に対して、生物多様性調査や生態情報に基づいて、その影響を予想し、より影響の少ない開発方法を提案することが要請されている (Arrieta *et al.* 2010; Van Dover 2011; Van Dover *et al.* 2011)。

熱水噴出域の十脚甲殻類ゴエモンコシオリエビ

ゴエモンコシオリエビ *Shinkaia crosnieri* (図 2) は現生 1 亜科 1 属 1 種の熱水域環境に特殊化した無脊椎動物種であり、現在までに沖縄トラフ内の熱水噴出域、パプアニューギニアのビスマルク諸島沖 (模式産地) (Baba and Williams 1998)、台湾の北東沖 (Chan *et al.* 2000) の 3 ヶ所でのみ生息が確認されている。パプアニューギニアと台湾沖の DNA の塩基配列データがなく、また台湾の個体は沖縄トラフとパプアニューギニアの個体よりも体サイズが大きい傾向があることが報告されている (Chan *et al.* 2000)。そのため、パプアニューギニアと台湾のゴエモンコシオリエビが本研究で扱う沖縄トラフのものと別種である可能性も考えられる。アメリカのワシントン州西部の始新世時代の冷湧水の堆積層から本種の絶滅した近縁種である *S. katapsyxis* の化石が発見されている (Schweitzer and Feldmann 2008) が、最近のミトコンドリアゲノムの塩基配列に基づく熱水性十脚類の系統解析研究により同亜科の熱水域に進出した年代は始新世以前だと考えられている (Yang *et al.* 2013)。

ゴエモンコシオリエビは甲殻長 1cm から 6cm 程の白色・大型の十脚甲殻類で、眼が著しく退化している。一般的に熱水噴出域にはイプシロンプロテオバクテリアとガンマプロテオバクテリアという二つの系統群の細菌が優占することが知られているが (Nakagawa and Takai 2008)、ゴエモンコシオリエビの腹側に密生した柔毛には 2 種のイプシロンプロテオバクテリアと 1 種のガンマプロテオバクテリアに属する化学合成細菌が付着して

おり、本種がそれら複数の化学合成細菌を摂餌していることが明らかになっている (Watsuji *et al.* 2010)。熱水噴出域の噴出口の周囲、20cmから2m程の範囲に分布する (Tsuchida *et al.* 2010)、活動している熱水噴出孔の最も近傍に生息している種の1つである (Tsuchida *et al.* 2003)。伊豆・小笠原弧内の熱水域では分布が確認されていない一方で、沖縄トラフ内の熱水噴出域では高いバイオマスを誇る優占種として知られている (土田ほか 2003; 藤倉ほか 2008; Watanabe *et al.* 2010; 図3)。

沖縄トラフの熱水域の多くは南部海域と中部海域に分布しており、動物群によってシロウリガイ類の様に一方(中部)のみに分布するものや、ツノナシオハラエビ類の様に南部と中部に別の種が生息しているものもある。ゴエモンコシオリエビは南部と中部の両方に分布しており、その生物量や高い熱水依存性から、日本の熱水噴出域を代表する熱水種であると言える。また、既往研究によりゴエモンコシオリエビの腹部の化学合成細菌が高い生産性を有していることが示唆されている (土田ほか 2007)。優占種であり化学合成細菌の着底基盤でもあるゴエモンコシオリエビが失われた場合、沖縄トラフの熱水域の生物量と生産性は共に大きく減少することが予想される。この様にゴエモンコシオリエビは沖縄トラフの熱水噴出域の生態系にとって大きな影響力を持つ、重要な種であると言える。

本研究の過程で、本種数個体の甲殻下部に瘤状の変形(以下、虫瘤)が見つかり、中から未記載種と思われる等脚類の寄生虫が発見された (Appendix)。寄生種も熱水生態系の生物多様性の重要な構成要素である。共生菌と寄生種の宿主であるゴエモンコシオリエビは、熱水種の相互関係や共進化過程を研究するのに適した材料であると言える。

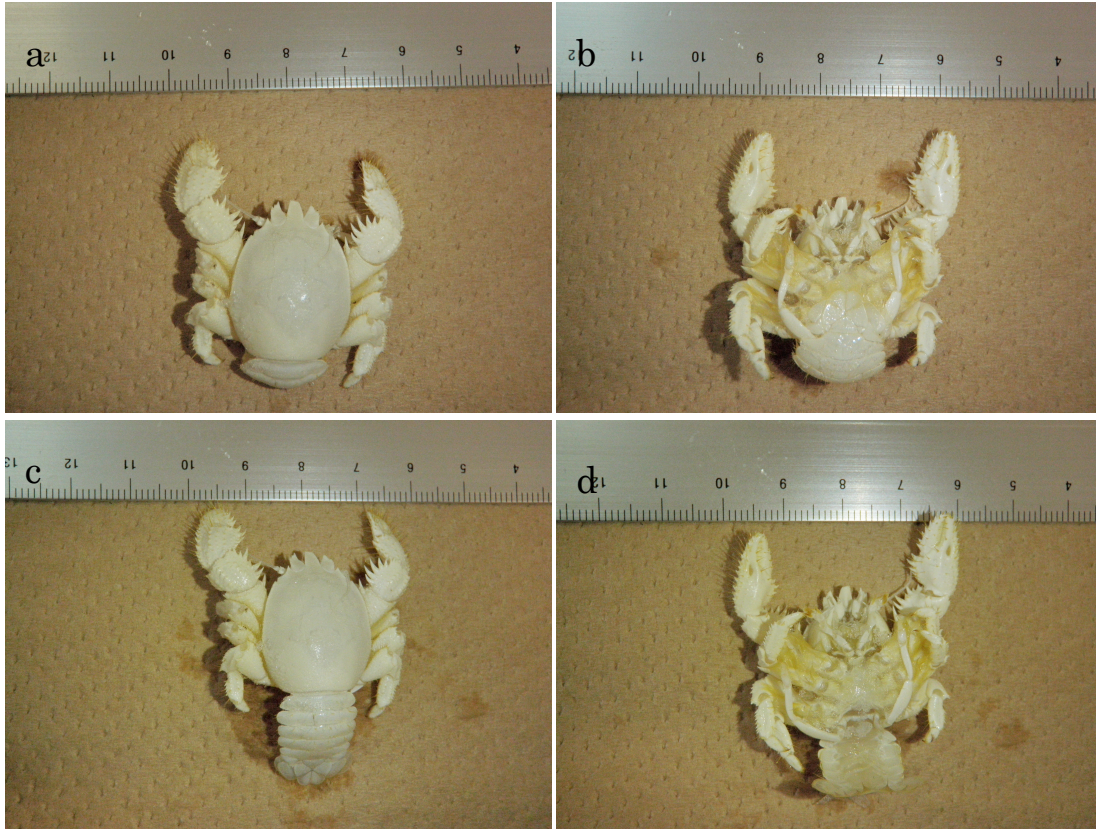


図2) ゴエモンコシオリエビ成体の標本。a) 背側、b) 腹側、c) 腹節を開いた状態の背側、d) 腹節を開いた状態の腹側。

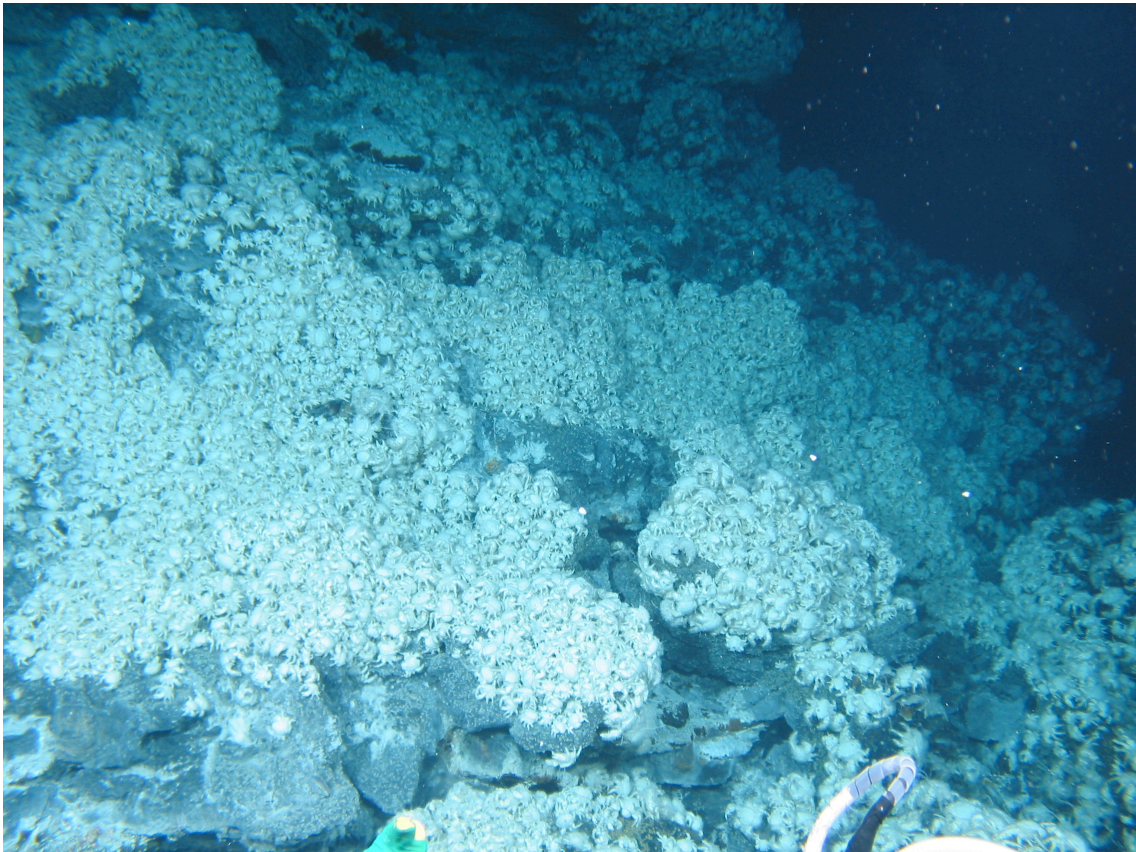


図 3) 沖縄トラフ北伊平屋のゴエモンコシオリエビコロニー。KY11-02 leg.3 航海、HD#1248 潜航で撮影。

本研究の目的

熱水域に生息する生物種の約 90%、550 種以上が熱水域固有種として報告されており (Desbruyères *et al.* 2006; Van Dover 2000; Watanabe *et al.* 2010)、海洋の生物多様性を考える上で決して無視することの出来ない構成要素である。また周囲の深海底と著しく異なる環境である熱水域に生息する熱水種は非熱水性の近縁種とは異なる生態や生存戦略を持つことが予想され、進化生態学の優れた研究モデルとなりうる生物学的に興味深い存在である。熱水種が生息する熱水域の周辺に形成される熱水鉱床は高い商業価値を持つが、その資源開発が熱水域生態系に及ぼす影響が強く懸念されている。本研究では日本の熱水鉱床開発の有力な候補地である沖縄トラフの熱水域の優占種であるゴエモンコシオリエビを対象とし、遺伝的多様性と幼生生態を研究することで集団の形成と多様性維持の主要因である幼生分散メカニズムの解明を目指して、1) 沖縄トラフ内の全生息域の集団を対象とした遺伝的構造と生活史の解析、2) 新たな加圧実験装置の開発による本種幼生の圧力応答の観察、3) 沖縄トラフの海流モデリングと幼生分散の推定をおこなった。本研究の結果より本種が高い分散能力を持ち、幼生が水深 500m から 1000m の水深帯で活発に分散を行っている事が示された。

第1章 ゴエモンコシオリエビの集団構造と生活史

熱水域固有種であるゴエモンコシオリエビは沖縄トラフの熱水域に生息する高いバイオマスを持つ優占種であり、日本を代表する熱水種である。本種は腹部剛毛に付着する複数の化学合成細菌を増殖させ、摂餌している (Watsuji *et al.* 2014) ほか、甲殻表面が熱水性腹足類のキノミフネカサガイ *Lepetodrilus nux* Okutani, Fujikura and Sasaki, 1993 に着底基盤として利用されている (藤倉ほか 2008; 伊藤・山本 未発表)、また甲殻内部には新種と見られる等脚類の寄生が確認されている (Appendix) 等、同じ環境に生息する複数の熱水種と共生関係にある。こうした高いバイオマスと密接な他種との相互作用から本種が熱水生態系内で果たす役割が大きいことが予想されるが、本種の生態に関する知見は他の多くの熱水種と同様に限られている。熱水種の多くは熱水域に固有であり、地域集団間の遺伝的交流は幼生期に限定されている。したがって、幼生分散メカニズムを解明することが、不連続な分布と環境の不安定性を特徴とする熱水域における生物多様性の生成・維持機構を理解するために必要不可欠であると言える。著者は修士研究 (徐 2011) で本種の遺伝的集団構造の解析を行なったが、解析に使用されたデータがゴエモンコシオリエビの生息域の一部のものに限られていたため、沖縄トラフに生息する本種の集団の全体像を把握するに至らなかった。加えて、本種の繁殖における季節性の有無や幼生生態等の幼生分散を理解する上で重要な基礎的情報が不足していた。こうした状況をふまえて、本章では沖縄トラフ内の現在までにゴエモンコシオリエビが確認されている全熱水域の集団構造解析および繁殖の季節性についての解析結果を報告する。

1-1 材料

本研究には独立行政法人海洋研究開発機構 (JAMSTEC) の研究船「なつしま/ハイパードルフィン、しんかい2000」、「よこすか/しんかい6500」、「かいいいかいこう7000」及び独立行政法人石油天然ガス・金属鉱物資源機構 (JOGMEC) の研究船「第2白嶺丸」の研究航海で採集・保管されていたゴエモンコシオリエビ標本を使用した。標本の採集場所は沖縄周辺海域にある沖縄トラフ内の7つの熱水噴出域、南奄西海丘、北部伊平屋海嶺、伊平屋海嶺、伊是名海穴、八重山海丘、鳩間海丘、第四与那国海丘 (以下、南奄西、北伊

平屋、伊平屋、伊是名、八重山、鳩間、第四与那国と表記) である。サンプリング地点を
図 1-1 に、標本リストを表 1-1 にまとめた。分子系統学的解析には70%又は99.5%エ
タノールで固定されたもの、もしくは-80℃で凍結保存されたものを使用した。形態観察
にはそれらの標本に加え、10%海水ホルマリンで固定・保存されたものを使用した。

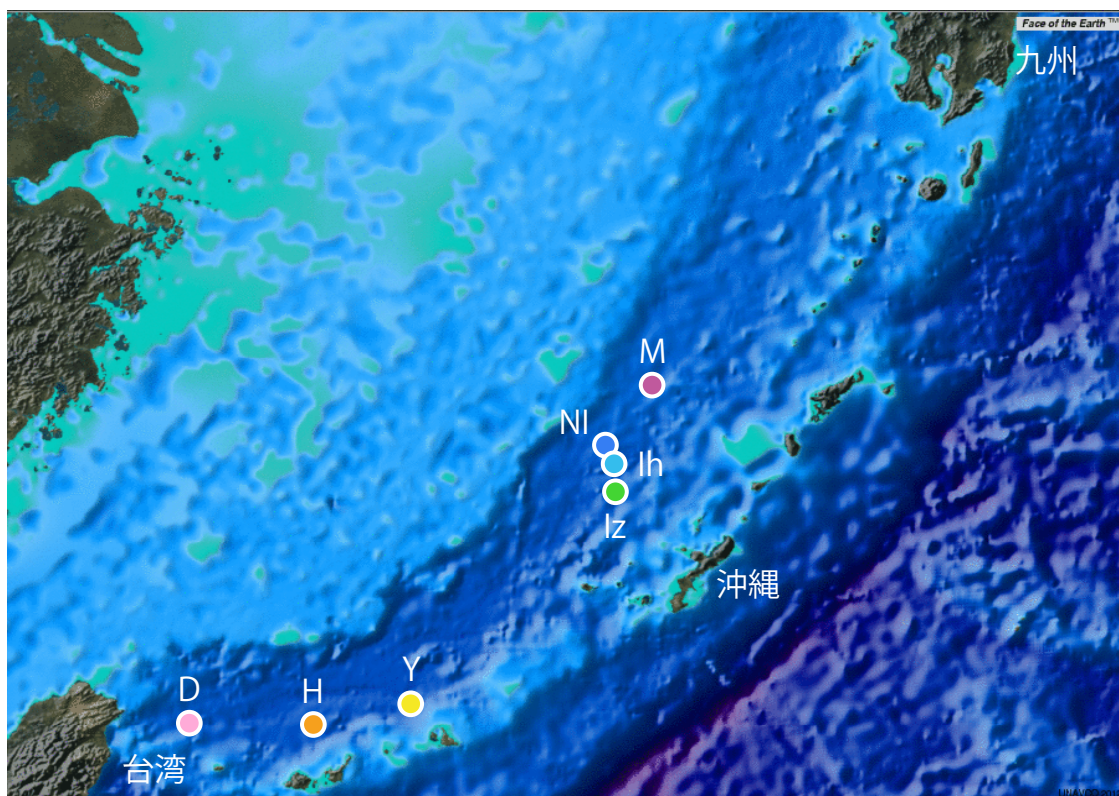


図 1-1) 本研究の対象海域と熱水域 (Jules Verne Voyager, UNAVCO: <http://jules.unavco.org>)。各熱水域の色は本章の結果の図と対応する。M:南奄西海丘、NI:北部伊平屋海嶺、Ih:伊平屋海嶺、Iz:伊是名海穴、Y:八重山地溝東端部、H:鳩間海丘、D:第四与那国海丘。

表 1-1) ゴエモンコシオリエビ標本のリスト。

熱水噴出域	Dive No.	緯度 / 経度	水深 (m)	保存法	COI	16S	ITS2	形態
南奄西	HD#1328	28° 23.N / 127° 38.E	700	-80℃	7	7	7	4
北伊平屋	2K#1093	27° 47.N / 126° 54.E	985	-80℃	4	8	10	0
	2K#1094	27° 47.N / 126° 54.E	1053	70% EtOH固定	10	7	6	0
	2K#979	27° 47.N / 126° 54.E	976	ホルマリン固定	0	0	0	17
	HD#392	27° 47.N / 126° 54.E	982	-80℃	0	1	2	0
	HD#392	27° 47.N / 126° 54.E	982	99.5% EtOH固定	0	4	4	0
	HD#393	27° 47.N / 126° 54.E	1034	-80℃	7	4	4	0
	HD#393	27° 47.N / 126° 54.E	1034	ホルマリン固定	0	0	0	1
	HD#1247	27° 47.N / 126° 54.E	982	-80℃	0	0	0	229
伊平屋	7KII#442	非公開	非公開	-80℃	19	18	18	27
伊是名	FPG-01	非公開	非公開	-80℃	21	27	27	41
	HD#396	27° 16.N / 127° 05.E	1300	ホルマリン固定	0	0	0	11
	HD#1184	27° 16.N / 127° 05.E	1305	-80℃	0	0	0	30
	HD#1329	27° 15.N / 127° 04.E	1617	-80℃	0	0	0	11
八重山	HD#1330	25° 14.N / 124° 52.E	1649	-80℃	8	8	9	4
	HD#1332	25° 14.N / 124° 52.E	1632	-80℃	12	12	14	12
鳩間	HD#399	24° 51.N / 123° 50.E	1480	ホルマリン固定	0	0	0	14
	HD#1035-39	24° 51.N / 123° 50.E	1475	-80℃	28	30	18	207
	HD#1331	24° 51.N / 123° 50.E	1477	-80℃	0	0	0	8
第四与那国	7K#511	非公開	非公開	-80℃	23	22	22	62

1-2 方法

1-2-1 遺伝的集団構造の解析

DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用い、ゴエモンコシオリエビの脚部の筋肉片から全 DNA を抽出した。抽出した全 DNA を鋳型にして、ミトコンドリアゲノム上にコードされている cytochrome c oxidase subunit I (COI) 遺伝子にはプライマー LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') 及びプライマー HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') (Folmer *et al.* 1994)、16S rRNA 遺伝子にはプライマー 16S-I (5'-GGCCTGTTTANCAAAAACAT-3') 及びプライマー 16S-IV (5'-CCGGTYTGAAGTCAAGTCA-3') (Palumbi *et al.* 1991; Kojima 2010)、核 DNA 上の ITS2 領域にはプライマー ScITS2-F (5'-GGTTGCTGCCACTCCTGGABG-3') 及びプライマー ScITS2-R (5'-GAAGTTGGACTGTGCTCAAAG-3') (渡部 私信) を用い、PCR 法により DNA 断片の増幅を行なった。COI と 16S では 94°C の初期変性ステップ (120 秒) の後、94°C の変性ステップ (40 秒)、52°C のアニーリングステップ (60 秒)、72°C の伸長ステップ (90 秒) のサイクルを 30 回繰り返し、最後に伸長ステップを 300 秒行い、ITS2 では 94°C の初期変性ステップ (120 秒) の後、94°C の変性ステップ (30 秒)、70°C のアニーリングステップ (30 秒)、72°C の伸長ステップ (60 秒) のサイクルを 30 回繰り返し、最後に伸長ステップを 120 秒行った。得られた PCR 産物を ExoSAP-IT Kit (United State Biochemical Corp.) を用いて精製した後、ダイレクトシーケンス法によって塩基配列を決定した。シーケンス反応には BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver. 3.0 (Applied Biosystems Inc.) を用い、塩基配列決定には ABI3130 オートシーケンサー (Applied Biosystems Inc.) を使用した。決定した塩基配列は ATSQ (Genetyx ver. 5.0.1) を用いて配列した後、共通の塩基配列を持つ個体をまとめて、それぞれ 1 つのハプロタイプとした。ハプロタイプ間の類縁関係を表す遺伝子ネットワークを、コンピュータープログラム TCS1.21 (Clement *et al.* 2000) を用い、95% の統計的信頼性が得られるように最大節約的に構築した。

Arlequin ver 3.000 (Schneider *et al.* 2000) を用い、各地域集団の遺伝的多様性を Gene diversity (h) と Nucleotide diversity (π) により評価した。Gene diversity (遺伝子多様度又はハプロタイプ多様度) は 1 つの集団から任意に抽出した 2 つの対立遺伝子の塩基配列が異なる確率、Nucleotide diversity (塩基多様度) は任意に抽出した 2 つの対立遺伝

子の任意の塩基座の塩基が異なる確率である。Gene diversity と Nucleotide diversity のいずれについても値が高い程、高い遺伝的多様性を持つことを表す。得られた多様度を同じ沖縄トラフの熱水噴出域に生息する熱水種であるネッスイハナカゴ *Neoverruca* sp. (Watanabe *et al.* 2005)、マリアナイトエラゴカイ *Paralvinella hessleri* Desbruyères and Laubier, 1989 (頼末 2009)、サツマハオリムシ属の未記載種 *Lamellibrachia* sp. L1 (Kojima *et al.* 2003)、エンセイシロウリガイ *Calyptogena solidissima* Okutani, Hashimoto and Fujikura, 1992 及びシマイシロウリガイ *Calyptogena okutanii* Okutani, Kojima and Ohta, 1997 (Kojima *et al.* 2005, 2006) と比較した。さらに、各熱水サイトの地域集団間の遺伝的差異を F 統計値 (F_{st}) 検定 (Rousset and Raymond 1995) と Exact test (Raymond and Rousset 1995; Goudet *et al.* 1996) により検定した。また、各海域の地域集団の履歴を推定するため、Mismatch distribution analysis (Rogers and Harpending 1992) を行った。この方法は、短期間に集団サイズ (個体数) が拡大した地域集団では、任意の遺伝子領域の塩基配列を個体総当たりで比較した場合、配列が異なる箇所の数 (ミスマッチ数) の分布が単一のピークを持ち、拡大から時間が経つにつれてピークがミスマッチ数の多い方へ移動する性質を利用している。集団拡大を仮定した sudden expansion model に基づく期待値と観察値に有意差があるかどうかを χ^2 検定で判定することで過去の集団拡大の有無を検証し、集団拡大が示された地域集団間でミスマッチ分布のミスマッチ数の最頻値 (τ 値) を比較した。

1-2-2 集団の組性の解析

各個体の甲殻長 (甲長) を測定し、各地域集団のサイズ組成を解析した。甲殻長はゴエモンコシオリエビの原記載論文に倣って、額角の先端から甲殻の後端までの長さとした (Baba and Williams 1998)。標本の雌雄を生殖孔および交接器の有無で判断し、腹節の破損や個体サイズが小さすぎて雌雄の確認が出来ない個体は雌雄不明とした。採集した季節間で雌個体の抱卵率を比較することで繁殖の季節性の有無を検証した。

1-3 結果

1-3-1 遺伝的集団構造の解析

139個体のゴエモンコシオリエビについてミトコンドリアDNAのCOI遺伝子の部分塩基配列（454bp）を決定した結果、61種類のハプロタイプが認識され、図1-2に示すハプロタイプネットワークが得られた。Exact testの結果、沖縄トラフ全体で有意な遺伝的分化は検出されなかった（ $p = 0.393 \pm 0.100$ ）。各地域集団間の遺伝的多様性を個別に F_{st} 検定によって比較した際にも有意な遺伝的分化は検出されず（ $p > 0.01$; 表1-2）、また同様にExact testによる比較でも地域集団間に有意な遺伝的分化は検出されなかった（ $p > 0.01$; 表1-2）。遺伝的多様性を沖縄トラフの熱水域に生息する他の優占種と比較した結果、ゴエモンコシオリエビが同海域の熱水優占種の中で特に高い遺伝的多様性を有することが示された（表1-4）。COI遺伝子と同様に16S rRNA遺伝子の500bpの塩基配列を決定した結果、12種類のハプロタイプが認識された（図1-3）。 F_{st} 検定の結果、沖縄トラフ全体で有意な遺伝的分化は検出されず（ $p = 0.551 \pm 0.015$ ）、各地域集団間の遺伝的多様性を個別に F_{st} 検定とExact testによって比較した際にも有意な遺伝的分化は検出されなかった（ $p > 0.01$; 表1-3）。また、ITS2領域の405bpの塩基配列を決定したところ、全ての個体の塩基配列が同一で遺伝的分化が見られなかったため、統計的解析は行わなかった。

各熱水サイトの地域集団のCOI遺伝子に基づくMismatch distribution analysisの結果を図1-4に示す。棒グラフで示されている各地域集団におけるミスマッチ数の実測値は、折れ線グラフで示されるsudden expansion model（Rogers and Harpending 1992）に基づく期待値と有意に整合していた（ $p < 0.05$ ）。ミスマッチ数分布のピーク（最頻値）を表す τ 値を地域集団間で比較すると、北伊平屋と伊是名の2地域集団が他集団より低い値を示した。

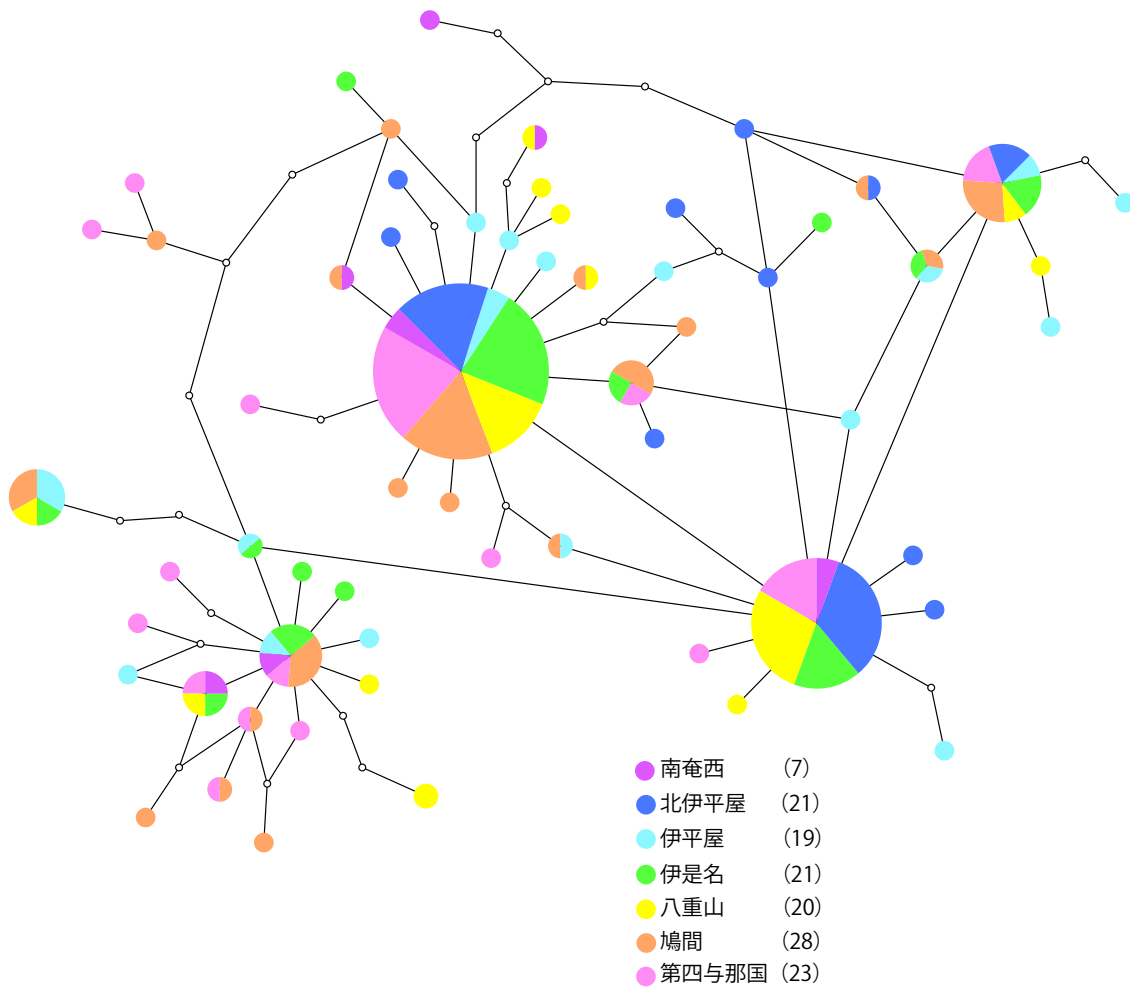


図 1-2) ゴエモンコシオリエビCOI領域のハプロタイプネットワーク。図中の円が1つの塩基配列、小さい白丸が見つからない塩基配列、直線が1塩基置換、円の面積は各ハプロタイプが得られた個体数に比例し、色が採集場所の割合を示す。採集場所の色は図 1-1 の熱水域と対応している。

表 1-2) 各地域集団間の COI 領域の F_{st} 値と P 値 ($\alpha = 0.01$)。左下が F_{st} の P 値を、右上が Exact test の P 値を表す。全ての地域集団間で有意な遺伝的分化は見られなかった。

	南奄西	北伊平屋	伊平屋	伊是名	八重山	鳩間	第四与那国
南奄西		0.303 ± 0.024	0.935 ± 0.011	0.762 ± 0.021	0.704 ± 0.033	0.551 ± 0.035	0.727 ± 0.029
北伊平屋	0.656 ± 0.014		0.021 ± 0.008	0.582 ± 0.024	0.727 ± 0.025	0.025 ± 0.008	0.870 ± 0.017
伊平屋	0.934 ± 0.007	0.020 ± 0.004		0.379 ± 0.020	0.078 ± 0.010	0.698 ± 0.017	0.096 ± 0.020
伊是名	0.941 ± 0.008	0.631 ± 0.012	0.262 ± 0.017		0.696 ± 0.015	0.882 ± 0.012	1.000 ± 0.000
八重山	0.837 ± 0.013	0.878 ± 0.011	0.049 ± 0.007	0.660 ± 0.012		0.056 ± 0.011	0.729 ± 0.022
鳩間	0.886 ± 0.011	0.028 ± 0.006	0.753 ± 0.012	0.733 ± 0.013	0.052 ± 0.007		0.669 ± 0.042
第四与那国	0.947 ± 0.006	0.634 ± 0.012	0.123 ± 0.010	0.991 ± 0.003	0.645 ± 0.015	0.632 ± 0.012	

表 1-3) 各地域集団間の 16S rRNA 領域の F_{st} 値と P 値 ($\alpha = 0.01$)。左下が F_{st} の P 値を、右上が Exact test の P 値を表す。全ての地域集団間で有意な遺伝的分化は見られなかった。

	南奄西	北伊平屋	伊平屋	伊是名	八重山	鳩間	第四与那国
南奄西		0.965 ± 0.003	0.048 ± 0.002	0.451 ± 0.013	0.534 ± 0.006	0.399 ± 0.003	0.430 ± 0.005
北伊平屋	0.869 ± 0.012		0.093 ± 0.004	0.359 ± 0.006	0.706 ± 0.008	0.657 ± 0.004	0.702 ± 0.004
伊平屋	0.264 ± 0.012	0.301 ± 0.017		0.311 ± 0.007	0.245 ± 0.005	0.096 ± 0.003	0.655 ± 0.005
伊是名	0.790 ± 0.011	0.626 ± 0.015	0.588 ± 0.016		0.794 ± 0.009	0.979 ± 0.003	0.915 ± 0.002
八重山	0.574 ± 0.012	0.519 ± 0.019	0.442 ± 0.017	0.999 ± 0.000		0.459 ± 0.004	0.462 ± 0.005
鳩間	0.395 ± 0.015	0.124 ± 0.010	0.154 ± 0.010	0.466 ± 0.013	0.218 ± 0.014		0.737 ± 0.003
第四与那国	0.679 ± 0.014	0.432 ± 0.016	0.690 ± 0.015	0.756 ± 0.016	0.643 ± 0.018	0.727 ± 0.015	

表 1-4) ゴエモンコシオリエビと沖縄トラフに分布する主な熱水種の遺伝的多様性 (ミトコンドリア COI 遺伝子) の比較。*1 Watanabe *et al.* 2005 (661 bp); *2 頼末 2009 (673 bp); *3 Kojima *et al.* 2002 (624 bp) のデータに基づく。

種	N	Gene diversity	Nucleotide diversity
ゴエモンコシオリエビ	139	0.9449 ± 0.0106	0.0068 ± 0.0039
ネッスイハナカゴ*1	58	0.7170 ± 0.0420	0.0017 ± 0.0013
マリアナイトエラゴカイ*2	94	0.8909 ± 0.0230	0.0034 ± 0.0021
サツマハオリムシの一種*3	12	0.5600 ± 0.1500	0.0010 ± 0.0010

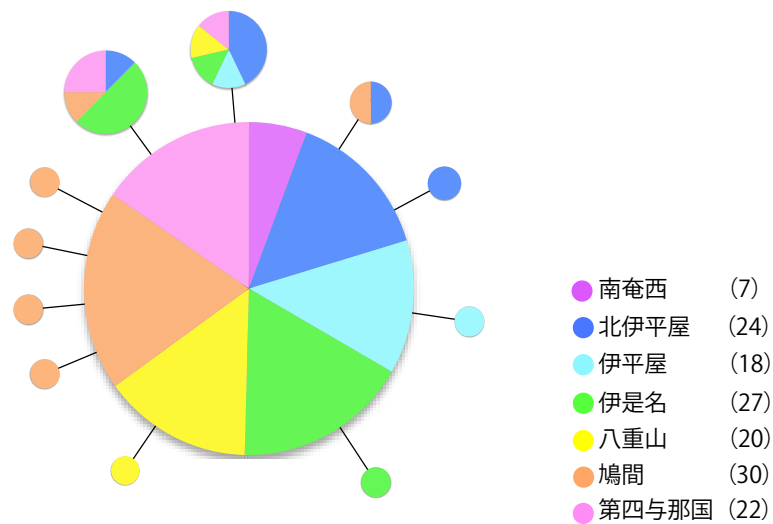


図 1-3) ゴエモンコシオリエビ 16S rRNA 領域のハプロタイプネットワーク。図中の丸が 1 つの塩基配列、直線が 1 塩基置換、円の面積は各ハプロタイプが得られた個体数に比例し、色が採集場所の割合を示す。採集場所の色は図 1-1 の熱水域と対応している。

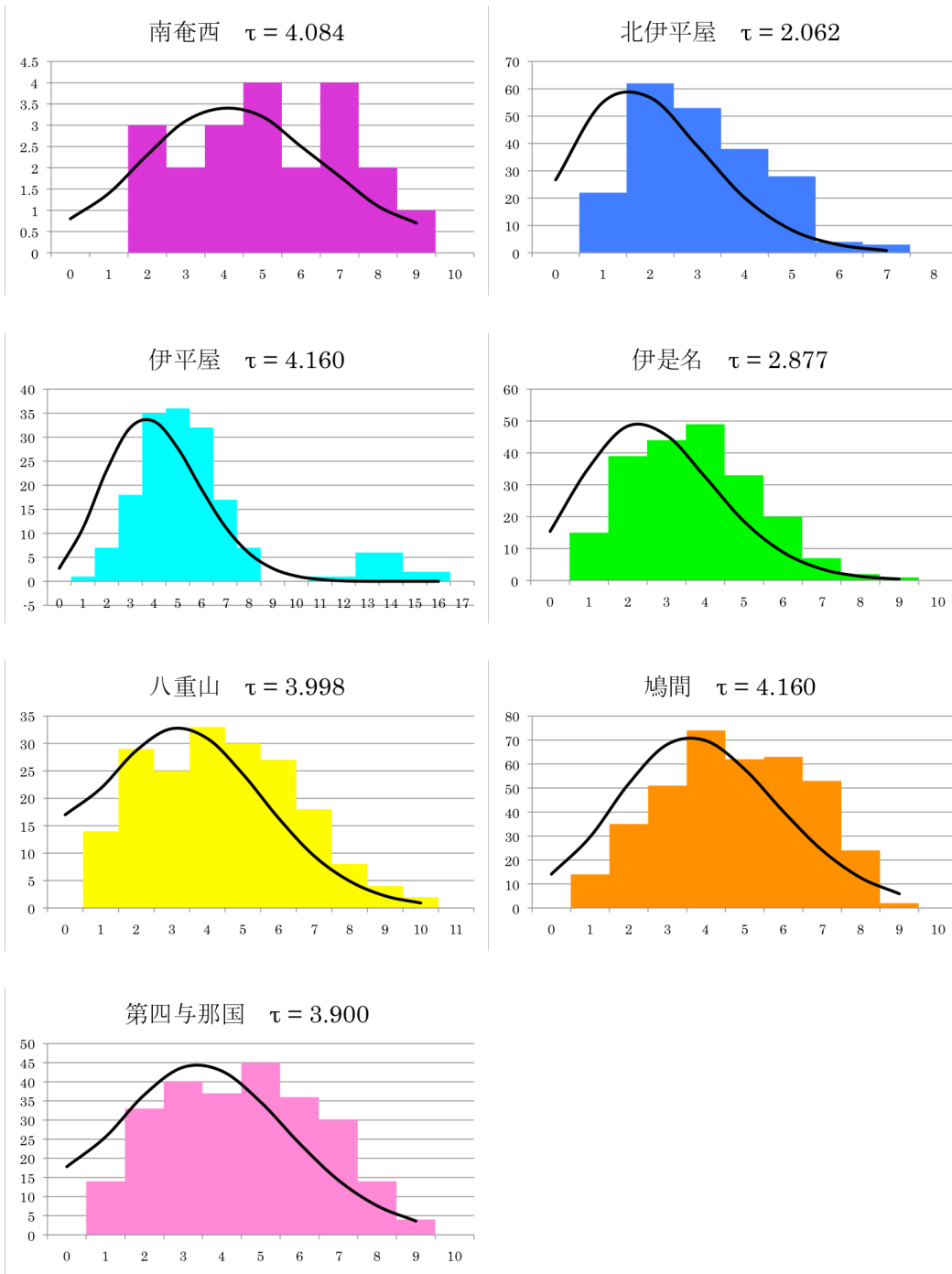


図 1-4) 各熱水域のゴエモンコシオリエビのミスマッチ分布。x 軸はミスマッチの数を、y 軸は頻度を表す。棒グラフがミスマッチ数の実測値を、折れ線グラフが sudden expansion model (Roger and Harpending 1992) に基づく期待値を表す。

1-3-2 集団の組成

全678個体のゴエモンコシオリエビ個体の甲殻長分布を図1-5に示した。腹節の破損により雌雄の判別が困難な個体は、雌雄不明とした。全標本のうち最小個体は5.06mmの甲殻長を持つ雌雄不明の個体で、最大個体は60.26mmの甲殻長を持つ雄個体だった。また、抱卵の見られる個体の最小サイズは甲殻長23.31mmであった。採集地点や季節が異なる複数回のサンプリング結果を合算したサイズ分布に各地域集団独自の特徴が反映されていない可能性があるため、一回のサンプリングで十分な数の標本が採集された北伊平屋（HPD#1247、n = 171）と鳩間（HPD#1035-1039、n = 221）の地域集団のサイズ組成を図1-6と図1-7にそれぞれ示す。両地域集団とも雌雄間に個体数の差がなく、雄個体は雌個体よりも有意に甲殻長が大きかった（t-test, $p < 0.05$ ）。全ての雌個体を対象に抱卵の有無を調べたところ、抱卵割合は1.7%から16.5%と大きく変化した。夏期から秋期にかけて特に抱卵雌の割合が高かった（表1-4）。その一方で冬期は116個体中2個体と特に抱卵雌の割合が低かったが、低いながらも抱卵雌が存在していることが確認された。

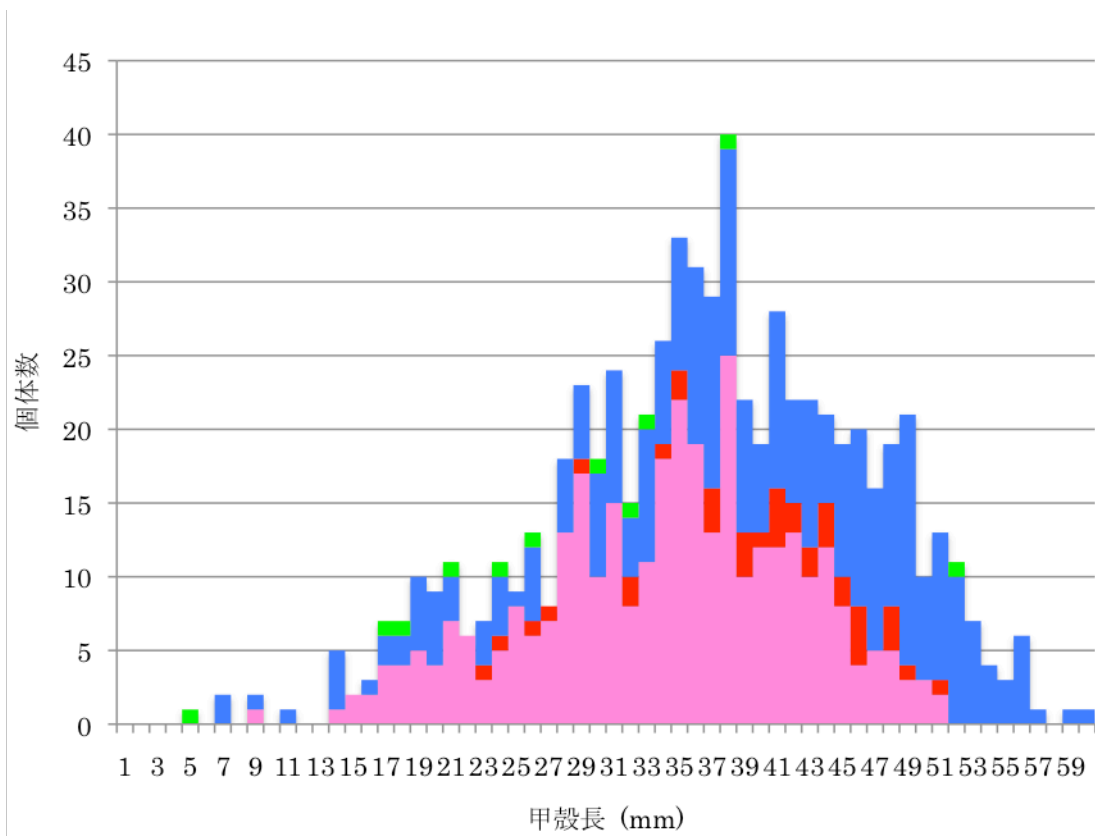


図 1-5) 7つの熱水域から採集されたゴエモンコシオリエビの甲殻長のヒストグラム (n = 678)。グラフ中のx軸は標本の甲殻長を、y軸は個体数を表す。雄個体を青、抱卵雌個体を赤、抱卵していない雌個体をピンクで示し、雌雄不明の個体を緑で示す。

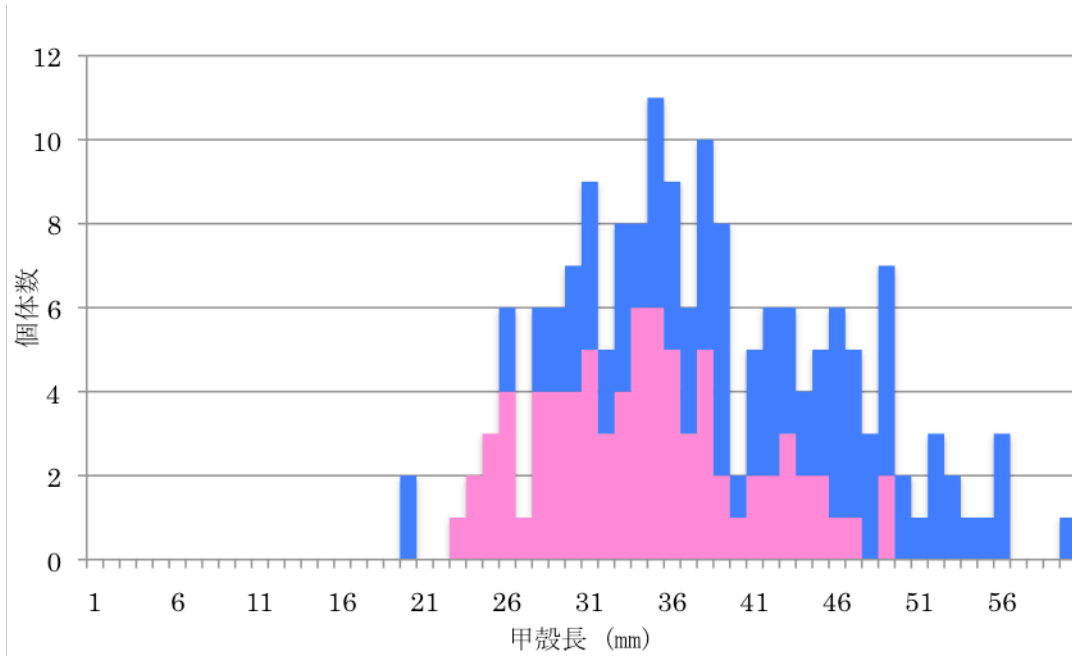


図 1-6) 北伊平屋で一回の潜航調査で採集されたゴエモンコシオリエビの甲殻長のヒストグラム (n = 171)。グラフ中のx軸は標本の甲殻長を、y軸は個体数を表す。雄個体を青、雌個体をピンクで示す。

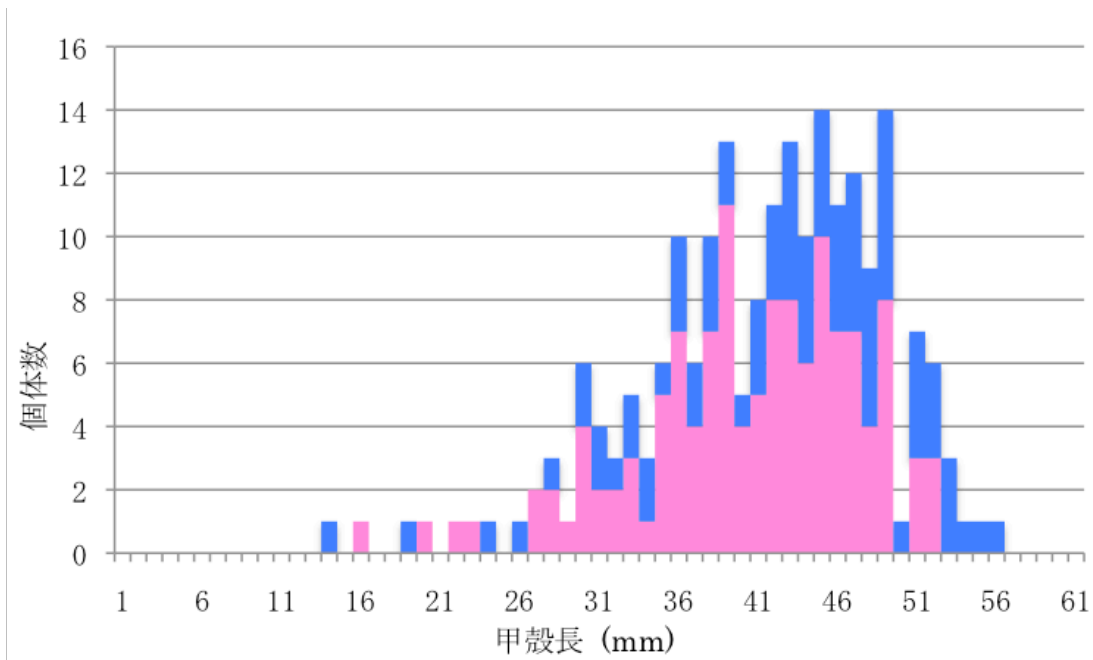


図 1-7) 鳩間で一回の潜航調査で採集されたゴエモンコシオリエビの甲殻長ヒストグラム (n = 221)。グラフ中のx軸は標本の甲殻長を、y軸は個体数を表す。雄個体を青、雌個体をピンクで示す。

表 1-5) 各季節に採集されたゴエモンコシオリエビの抱卵雌の割合。

採集時期	春 (3～5月)	夏 (6～8月)	秋 (9～11月)	冬 (12～2月)
採集場所と採集年	伊是名 2005, 鳩間 2005, 伊是名 2009	第四与那国 2012, 鳩間 2009	北伊平屋 1997, 伊是名 2010, 南奄西 2011, 伊是名 2011, 八重山 2011, 鳩間 2011	伊平屋 2009, 北伊平屋 2011
非抱卵メス (個体数)	40	137	36	114
抱卵メス (個体数)	4	27	6	2
抱卵割合	9.1%	16.5%	14.3%	1.7%

1-4 考察

ミトコンドリアDNA COI領域の塩基配列に基づいて遺伝的多様性を他の熱水種と比較した結果、ゴエモンコシオリエビは沖縄トラフと伊豆・小笠原弧の両海域に生息するネッスイハナカゴやマリアナイトエラゴカイと比較しても、より高い遺伝的多様性を持つことが示された(表1-4)。幼生分散能力が低い種では地域集団や海域ごとに出現するハプロタイプが系統樹やネットワーク上でクラスターを形成することが多い(e.g. Watanabe *et al.* 2012; Yorisue 2013)。これに対して、本種では各地域集団が遺伝的に多様なハプロタイプで構成されていたが、各熱水域から得られたハプロタイプがネットワーク上でまとまらなかった(図1-2)。このことから、本種の高い分散能力が示唆される。実際、集団ごとの遺伝的多様性を統計解析したところ、沖縄トラフ全地域集団を対象とした F_{st} 検定および下位検定(pairwise F_{st} 検定およびExact test)の結果から遺伝的な分化は検出されなかった(表1-2、表1-3)。ゴエモンコシオリエビが非常に高い遺伝的多様性を持ちながらも遺伝的に分化していないことは、本種が高い分散能力を持ち、沖縄トラフの7つの生息域全ての地域集団間に活発な遺伝的交流があることを示している。一方、ミスマッチ分布の τ 値(図1-5)からは北伊平屋と伊是名の地域集団のサイズの拡大年代が他の熱水域と比較して新しいことが示唆された。熱水種集団のサイズの変化は熱水活動の消長と関連していると考えられるので、他の熱水域に比べてより最近になって活動が開始または活発化したこれら2つの熱水域の地域集団では、他の地域集団から分散した幼生を受け入れながらも、ある程度の独自性が保たれている可能性が示唆される。

一般的に底生生物の幼生分散を制限する可能性のある環境要因として水平距離、水深、海底地形、海流等が挙げられる。沖縄トラフの地理を考えてみると、7つの熱水域のうち最も離れている南奄西と第四与那国の間には646.5kmの水平距離があり、7つの熱水域は水深600mから1650m(各熱水域のおおよその水深は南奄西が600m、北伊平屋が900mから1000m、伊平屋が1300mから1500m、伊是名が1300mから1600m、八重山が1650m、鳩間が1400mから1530m、第四与那国が1320m)に位置している(藤倉ほか 2008)。また地形的特性として、以下の特徴が挙げられる。7つの熱水域の中で北端に位置する南奄西は長さ4km、幅5km程度の海丘状の地形で、比高50mから200m程度の高まりが南西方向に開いたC字型に並んでいる。北伊平屋は沖縄本島の北西160km沖に位置する円錐状の海丘の南東側斜面にあり、北伊平屋の南東に位置する伊平屋との間には比高500m以上の

海丘が存在する。伊平屋は水深約1400mの比較的平坦な場所である。伊是名は北北西から南南東の方向に伸びる長さ6km、幅3km程度の凹地で周囲の海底から約300m陥没しており、熱水噴出孔がその斜面上に広く分布している。八重山は水深2000m前後のトラフ底に存在する比高600m程度の海山の中腹に位置し、およそ1600mの水深にある。鳩間は沖縄トラフ底からの比高が約500m、底面の直径が約4kmの海丘で、山頂部には直径約800m、比高約150mの南に大きく開いたカルデラがあり、このカルデラ内に熱水噴出孔が存在する。第四与那国は水深1320m付近の平坦な海底に位置しており、そのすぐ近傍には真東に比高400m程度、北北東の方向に比高600m程度の円錐型の海山が存在する。各熱水域の本種地域集団間に有意な遺伝的分化が見られないことから、こうした650km前後の水平距離や600mから1650mの水深差、さらに熱水域周辺に存在する最大で600m程度の比高の海底地形は、本種の幼生分散にとって決定的な妨げにはならないと考えられる。このことから本種の幼生が海底沿いに分散する可能性は低く、海洋表層または中層を分散経路として利用していることが予想される。その場合、海流が幼生分散の原動力であり、分散の有無だけでなく分散経路や方向性を決める上で大きな影響力を持っていると考えられる。したがって沖縄トラフ内の海流を理解することは本種の幼生分散メカニズムを理解する為に有用であると考えられるが、表層以外の水深帯の海流情報は限られており、沖縄トラフ内を流れる海流の全容を知ることがこれまで困難であった。そこで本研究では沖縄トラフの海流の実態と幼生分散への影響を理解するため、第3章でモデリングによる海流の推定を行う。

ゴエモンコシオリエビの生息域は日本周辺では沖縄トラフのみであり、沖縄トラフと伊豆-小笠原弧の両方に分布しているネッスイハナカゴやマリアナイトエラゴカイと比べると限定的である。その一方でこれらの種と比較しても遺伝的多様性が高く、南奄西と第四与那国の地域集団間でも活発な分散が起こっていることから、沖縄トラフの中ではより高い分散能力を有していると考えられる。沖縄トラフから伊豆-小笠原弧へ分散するには海底からおおよそ1000mの比高のある琉球弧を超え、さらにおおよそ4000mもの比高のある伊豆-小笠原弧を乗り越える必要がある。本研究ではゴエモンコシオリエビに水深や海底地形による幼生分散の制限は見られなかったが、沖縄トラフ内の熱水域周辺の海底地形は高くても比高600m程度である。伊豆-小笠原弧へ分散するには更に何倍も大きな比高を超える必要があり、この琉球弧および伊豆-小笠原弧の水深と海底地形が本種の幼生分散を阻害している可能性は十分に考えられる。またこうした島弧を越える際に必然的にさらされる高水

温に幼生が耐えられない可能性もある。ネッスイハナカゴでも現在の気候条件下では、沖縄トラフと伊豆小笠原弧の間の幼生分散が琉球弧上の高水温により阻まれていることが示唆されており (Watanabe *et al.* 2006)、ゴエモンコシオリエビの幼生の高温耐性がネッスイハナカゴよりも低く、氷期においても琉球弧を越えることができなかつた可能性も十分考えられる。

世界の熱水噴出域は熱水種の組成に基づいて6つの地理区に分けることができるとされているが、一つの海域の中でもゴエモンコシオリエビを含む複数の熱水種で生息域がさらに限定されることが知られている (Ramirez-Llodra *et al.* 2007)。例えば同じ東太平洋海嶺の生物地理区に分類されている東太平洋海膨 (EPR) とガラパゴスリフト (GAR) に生息する複数の熱水性多毛類の生息範囲と集団構造が幼生期の生活史によって異なること (Hurtado *et al.* 2004)、熱水性のヨコエビでもEPRとGARの集団間に遺伝的構造が見られること (France *et al.* 1992) 等、幾つかの種でその原因が推定されているが、ゴエモンコシオリエビについてはこれまでほとんど知見が無かつた。著者の修士研究 (徐 2011) で本種の集団構造の形成要因についての考察が試みられたが、解析が沖縄トラフの4つの地域集団のみに基づいて行われていたため、結果の信頼性に疑問が残された。現在沖縄トラフ内では7つの熱水域からゴエモンコシオリエビが見つかり、さらに未だ発見されていない熱水域に生息している可能性も考えられる。そのため7つ全ての地域集団に基づいた解析を行なうことで本種の集団の全体像、もしくはより全体像に近い知見を得ることが期待されていたが、本研究で初めて現在沖縄トラフ内で確認されている全生息域の地域集団が解析され、本種の高い分散能力と集団構造の特性が示された。今後はマイクロサテライト等のより進化速度が速い遺伝子マーカーの解析によって時間分解能を向上させる、沖縄トラフ内の広域でプランクトン採集を行う、または海流や幼生生態等の異なる方向からのアプローチを合わせて行う等の方法で本種の分散メカニズムを明らかにすることが望まれる。本論文では、そのうち第3のアプローチによる成果を第2章、第3章で報告する。

第2章 新規加圧観察機器の開発とゴエモンコシオリエビの幼生生態の観察

水圧は水深に正比例して増加する唯一の環境パラメーターであり、海洋中の全ての水深帯に生息する生物と密接に関係している。水圧の変化が生物の酵素反応や細胞膜の流動性を含む数々の生理現象に影響することが知られている (Somero 1990; Macdonald 1992)。また深海性の棘皮動物 *Gracilechinus affinis* Mortensen, 1903 の受精卵が正常な発生に 10MPa 以上の水圧を必要とする (Tyler and Young 1998) ことや、浅海性のエビ *Palaemon varians* Leach, 1813 の運動が生息環境の水圧を超える圧力条件下で全く見られなくなる (Oliphant *et al.* 2011) などの研究事例から、水圧が水生生物の分布水深を規定し、個体群動態に影響していることが示唆されている。しかしながらこのような加圧研究の例はまだ少なく、特に地域集団間の遺伝的交流を通じて種の遺伝的構造形成の主要因となるプランクトン幼生を対象とした加圧研究は非常に限られている (Anger 2006)。そのため、熱水域の幼生分散に関する研究では地域集団間の遺伝的差異に基づく移動率推定等の間接的な手法が頻繁に用いられてきた。遺伝的集団構造解析を行なうことで地域集団間の隔離と遺伝的分化や種の進化の歴史を紐解くことが出来るが、幼生分散やそれに伴う地域集団間の遺伝的交流パターンの変化が遺伝的集団構造に反映されるまでに時間がかかるため時間スケールの短い生態学的な事象を捉えるのには向いていない。例えば、集団解析に最もよく使用されている変異速度が比較的速いミトコンドリア DNA の COI 領域でも統計学的な検証に耐える時間分解能は数千年から数万年程度であり、比較的長期間に渡って継続している時空間スケールの現象について平均的な像を捉えることは可能であるが、幼生分散の短期的な変動を研究する為には十分とは言えない。そのため直近の幼生分散のデータを得る為には、費用と時間をかけてマイクロサテライト等のより変異速度の速い遺伝子マーカーを開発するか、幼生の水圧耐性や浮力等の直接幼生分散に関わる性質を併せて研究することが必要である。

幼生の加圧研究が他の研究分野と比べて遅れている原因の一部は、研究機器や手法が確立していない点にある。これまでに行なわれて来た多くの加圧実験はバクテリア (Welch *et al.* 1993; Ishii *et al.* 2004; Vass *et al.* 2010) や動物細胞 (Landau 1961; Koyama *et al.* 2001, 2007; Marsh *et al.* 2001) を対象としており、多細胞の水生生物を扱った実験のほとんどは成体を対象としている (Wilcock *et al.* 1978; George 1984; Tyler and Young

1998; Yoshiki *et al.* 2006; Robinson *et al.* 2009; Thatje *et al.* 2010)。そのため、これまで使用されて来た加圧機器は幼生を対象とする実験に適さないサイズのものが多い。例えば水生生物の加圧実験で使用されることの最も多い IPOCAMP™ システムは加圧水槽(加圧チャンバー)が 19L の容積を持ち (Shillito *et al.* 2001)、加圧条件下での幼生の観察が出来ない。サイズの問題以外にも、ハンドポンプの使用による急激な水圧の変化、非循環系のシステムによる化学環境の変化や給餌ができないこと、直接顕微鏡観察が出来ないチャンバー構造、大きく複雑な実験システムによる操作の煩雑さ等、IPOCAMP™ を含む従来の研究機器を幼生の研究に使用するためには、改善すべき点が多い。

本章では熱水噴出域での集団形成に主要因である幼生分散の実態を幼生の水圧耐性から解明することを目的にして、幼生の加圧研究に適した新しい加圧観察機器の開発と加圧下でのゴエモンコシオリエビ幼生の行動観察を行なった。実験に用いたチャンバーは JAMSTEC の小山純弘博士らが動物細胞の加圧研究に用いた 100 μ l の加圧チャンバー (Koyama *et al.* 2005) を改良したもので、体長 2mm 程度のゴエモンコシオリエビ幼生の観察が可能となる様に設計した。甲殻類幼生に適したチャンバーおよび付随する実験システムを構築することで従来の実験機器の問題点の解決をはかった。具体的には、加圧したまま肉眼や顕微鏡で観察を行うことを目的に、チャンバーの上下に顕微鏡観察用の窓を設けた。また、実験システム全体を小型にして簡便な取り扱いを実現し、実験中に任意の速度でチャンバー内の水圧を操作することや外部サーモサーキュレーター等の使用により水温の操作を可能にした。

2-1 材料と方法

2-1-1 加圧観察機器の開発

加圧チャンバーは小山純弘博士と共同で設計し、エイブル株式会社に作成を依頼した。従来の 100 μ l 加圧チャンバー (Koyama *et al.* 2005) を参考にしながら設計することで、目的とした 2mm 前後の甲殻類幼生に適切なサイズで顕微鏡観察用の窓を持ち、温度管理の可能な加圧チャンバーを開発することに成功した。また、島津製作所の液体クロマトグラフィー用高圧ポンプ (HPLC ポンプ) と GL Science 社、Swagelok 社および SITEC 社製の高圧機器用部品を使用し、その配置を工夫することで、扱いやすく段階的な圧力の推

移が可能な加圧システムを構築した。

2-1-2 新規加圧観察システムによる加圧観察実験

加圧観察実験は、33.0%に調整されたレイシーマリン（株式会社イワキ）を 0.22 μ m のフィルター（Merck Millipore, Germany）で濾過した人工海水を用いて行なった。実験中は加圧・減圧時も含めて常に海水を循環させることで、塩濃度や溶存酸素等の環境を一定に保った。加圧観察機器の試験は、アルテミア *Artemia franciscana* Kellog, 1906 の第 1 ノープリウス期幼生（A&A Marine LLC, Utah, USA）を用いておこなった。アルテミア幼生を用いた試験では使用実績のある 100 μ l チャンバーを用い、実験システム全体の耐圧性能を確認する為に最大 60MPa の加圧を行なった。実験中の水温は深海水温の 4 $^{\circ}$ C またはアルテミアの原産地である Great Salt Lake の平均表面水温の 24 $^{\circ}$ C とした。実験は各水温で 1 回ずつおこない、それぞれ 8~15 個体の幼生をチャンバー内で加圧した。本試実験は実験システムの操作性および動作の確認を目的としていたため、加圧および減圧の速度は実験時間の短縮と操作性を重視して毎分 5MPa とした。

アルテミア幼生をチャンバーに封入し、大気圧下で 20 分間のインキュベートを行った。その後、2 分間かけて 10MPa まで加圧し、20 分間のインキュベートを行った。同様の過程を繰り返して 60MPa までの加圧とインキュベートを行った後、12 分かけてチャンバーを大気圧まで減圧し、その後 30 分間のインキュベート期間を設けた。加圧実験中の行動観察は実体顕微鏡を使用して、各圧力段階でインキュベーションの前後に行い、無作為に選択した 3 個体について水かき行動の回数を 10 秒間計数した。また同様のタイミングで 2 分間のビデオ撮影を行い、加圧および減圧時にもビデオ撮影を行うことで、各環境下でのアルテミア幼生の挙動を記録した。水温条件による運動回数の有意差の検定は R ver. 2. 15. 1 (R Core Team, 2012) を用いて行った。時系列で行われた運動回数の計測はお互いに独立していないため、各水温環境における圧力の影響の有無を反復測定一元配置分散分析 (one-way repeated measures ANOVA, $\alpha = 0.001$) により、圧力条件による影響の差異を Bonferroni 法および Holm 法を用いた多重比較検定 ($\alpha = 0.05$) により、それぞれ検定した。

ゴエモンコシオリエビ幼生の加圧観察および浮力測定には、沖縄トラフ北伊平屋で採集

された抱卵メスの卵を 4℃の人工海水（33.0‰）で孵化させた第 I ゴエア期の幼生を用いた。ゴエモンコシオリエビ幼生は 2mm 前後の体長を持つため、本研究で開発された 1.5ml チャンバーを用い、抱卵メスの採集地である北伊部屋の熱水噴出域を模して最大 20MPa までの加圧を行なった。また、同地の水温を模して水温を 4℃とし、幼生 1 個体をチャンバー内で加圧した。加圧・減圧時には 1 分間に 2MPa の速度でチャンバー内の水圧を操作した。アルテミア幼生の場合と同様に 20 分間のインキュベートと 5MPa の加圧を 20MPa まで繰り返し、最大圧力から大気圧への減圧後に 30 分間のインキュベート期間を設けた。実験中の行動観察はアルテミア幼生の場合と同様のタイミングで行い、実態顕微鏡とビデオ撮影を通して、幼生の付属肢による水かき行動の回数および体全体を用いた腰折り運動の回数を計数した。アルテミア幼生の場合と同様の統計解析を行った。

2-1-3 密度による浮力測定

人工海水レイシーマリンと milliQ 水を混合し、 1.032g/cm^3 と 1.012g/cm^3 の密度の海水を調整し、北伊平屋で採集されたゴエモンコシオリエビ幼生の卵と孵出した第 I ゴエア期幼生が中性浮力となるか観察した。中性浮力が得られない場合は卵と幼生よりも密度が高い海水と低い海水を混合することで中間密度の海水を調整し、同作業を繰り返すことで卵と幼生が中間浮力となる海水を特定した。各海水は氷上で 4℃に保ち、5 秒間以上中性浮力を保った濃度の調整海水の密度を卵及び幼生の密度とした。海水の密度は、良く攪拌した後、マイクロピペット Nichipet EXII（容量範囲 $100\mu\text{l}$ から $1000\mu\text{l}$ ）を用いて $500\mu\text{l}$ とり、小数点以下 5 桁（g）まで計測する精密秤を使用して 5 回計測した重量から計算した。

2-2 結果

2-2-1 加圧観察機器の開発

従来の $100\mu\text{l}$ チャンバーを改良し、図 2-1 a および図 2-3 に示す加圧チャンバーを開発した。このチャンバーは 1.5ml の容量（直径 20mm、高さ 6mm）を持ち、体長 2mm

程度のゴエモンコシオリエビ幼生をはじめとして、5mm 程度までの水棲動物の加圧観察を効果的に行うことが出来る。さらに従来のもより大きい直径 15mm の上部観察窓を設けることで観察時の死角を減らし、動物プランクトンの様な移動性を持つ対象の観察を容易にした。従来の 100 μ l チャンバー（図 2-1 a、図 2-2）は上部観察窓を備えたスクリー式の蓋を締めることで高い耐圧性を維持していたが、スクリー式の蓋を閉める動作による気泡の侵入や、チャンバーから海水が溢れ出ることによる実験対象の流出という問題点が存在していた。この問題は実験対象が動物細胞からプランクトン幼生になることでより深刻化したが、今回開発した 1.5ml チャンバーでは上部観察窓をスクリー式の蓋から取り外せる仕様にするすることで、問題の解決を図った。具体的には、まずチャンバーに海水を注ぐ際に容量より多い量の海水を入れて、表面張力で海水面を膨らませる。次に、膨らんだ海水の上に蓋から取り外した上部観察窓を静かに乗せることで気泡の封入や実験対象の流出を防いだ。さらにその上からスクリー式の蓋を閉めることで耐圧性を確保した。本チャンバーは 20MPa までの内圧に耐える様に設計されており、本研究の対象海域である沖縄トラフのほとんどの水深帯の水圧環境を再現することが出来る。さらに、実験対象のサイズや実験条件等によって 100 μ l チャンバーと 1.5ml チャンバーの使い分けが出来る様に、外部規格の統一を行った。いずれのチャンバーも直径 50mm 高さ 29mm の外寸を持ち、3カ所の接続部（1/16 インチオスナットチューブ継手）を備えている。このうちの 2カ所の接続部は加圧および海水循環用に常時使用し、残りの 1カ所は将来的な圧力計等の設置の余地を残して、現時点ではメクラネジで閉鎖している。これらの接続部に加えて、閉鎖された接続部の対角線上に直径 2mm の貫通していない孔があり、水温計の挿入が可能となっている。また、100 μ l チャンバーに倣いチャンバー本体をステンレスの一層構造とすることで、外部サーモサーキュレーター等の使用による水温の操作が容易におこなえる。

加圧システムは加圧チャンバーを中心とし、液体クロマトグラフィー用液体ポンプ、ニードルバルブ、背圧弁、1/16 インチステンレス配管の四種類の高圧パーツを組み合わせることで構成した（図 2-4）。液体ポンプは SHIMADZU 製の HPLC ポンプ LC-20AD XR を採用し、ニードルバルブは小型で高圧条件下でも作動する GL Science 製の 2-Way Valve 02-0120 を採用した。実験中の加圧減圧を任意のタイミングおよび速度で行えるようにするため、リーク側のバルブとして SITEC 製の Release Valve（背圧弁）729.4003-1-Vi を採用した。また、それらを繋ぐ配管として GL Science 製のステンレスチューブ 316（外

径 1/16 インチ、内径 1mm) を使用した。加圧システムの中心部である加圧チャンバーと前後のバルブのユニットは、配管の長さを調節することで 30cm × 20cm × 5cm 程度まで小型化することが出来る。今回の実験では行っていないが、水圧を維持したままユニットをシステムから取り外すことが可能である。

2-2-2 アルテミア幼生を用いた加圧システムの動作試験

本研究で開発した加圧システムの有効性を検証するため、入手の容易な水棲甲殻類アルテミアの幼生を用いて加圧観察を行い、高圧時のシステムの動作や観察状況の確認を行った。加圧システム全体の耐圧性の確認のため、最大圧力は沖縄トラフの最大水圧のほぼ 3 倍である 60MPa とし、100MPa までの水圧耐性を持つ 100 μ l チャンバーを使用した。試験の結果、60MPa の内圧環境下でもチャンバー内の海水循環が維持されており、加圧システムに機能的な障害はみられなかった。またチャンバー上部の観察窓からアルテミア幼生の挙動を観察したところ、海水温や水圧環境による運動量の変化が観察され、実験時の加圧減圧の影響のリアルタイム観察が可能であることが示された。全体的な傾向としてアルテミア幼生の運動量は加圧とともに減少し、30MPa 以上の水圧下でほとんど運動がみられなくなった。最大水圧である 60MPa から大気圧へ減圧したところ、運動能力に部分的な回復がみられた (図 2-5)。検定の結果、いずれの水温条件でも、アルテミア幼生の運動量が水圧により有意に変化することが示された (反復測定一元配置分散分析、 $p < 0.01$)。Bonferroni 法および Holm 法を用いた多重比較検定の結果、4 $^{\circ}$ C では加圧時のすべての水圧環境下で、運動量が加圧前より有意に低いことが示された (表 2-1)。10MPa と 20MPa の間には運動量の有意な違いは見られなかったが、30MPa 以上の水圧下では運動量が 10MPa の水圧下より有意に低下し、さらに大気圧まで減圧後には直前の 60MPa の水圧下よりも有意に運動量が増加していた。また、加圧前と実験後 (減圧後) では、同じ大気圧下でも後者のアルテミア幼生の運動量が有意に低かった。一方、24 $^{\circ}$ C では 10MPa と 20MPa の水圧環境下で、加圧前との運動量に有意な変化は見られなかった (表 2-2) が、30MPa 以上の水圧下では加圧前および 10MPa の水圧下よりも運動量が有意に低下した。実験後に回復した運動量は個体によるばらつきが大きく、他の全ての水圧下と比較しても有意差はみられなかった。

2-2-3 ゴエモンコシオリエビ幼生の加圧観察

開発した加圧システムを用いたゴエモンコシオリエビ幼生の加圧実験では、幼生の大きさに合わせて開発した 1.5ml チャンバーを使用した。加圧条件下で、ゴエモンコシオリエビ幼生の附属肢の運動頻度は一定ではなく、アルテミア幼生で見られた様な加圧による運動量の規則的な変化は確認されなかった。一方で、特定の状況下でゴエモンコシオリエビ幼生の腰折り運動が頻発することが観察された（表 2-3）。腰折り運動は 5MPa までの水圧下では見られなかったが、10MPa へ加圧時から頻繁に観察される様になり、20MPa への加圧時までの静圧時、加圧時のいずれでも観察された。20MPa の水圧下では目視およびビデオ観察時に腰折り運動は見られず、減圧中と減圧後にも確認されなかった。

2-2-4 ゴエモンコシオリエビ幼生の浮力測定

ゴエモンコシオリエビの 10 個の受精卵と 5 個体の第 I ゾエア期幼生の密度を計測したところ、卵の密度は $1.0158 \pm 0.0034 \text{ g/cm}^3$ 、幼生の密度は $1.0133 \pm 0.0018 \text{ g/cm}^3$ であった。

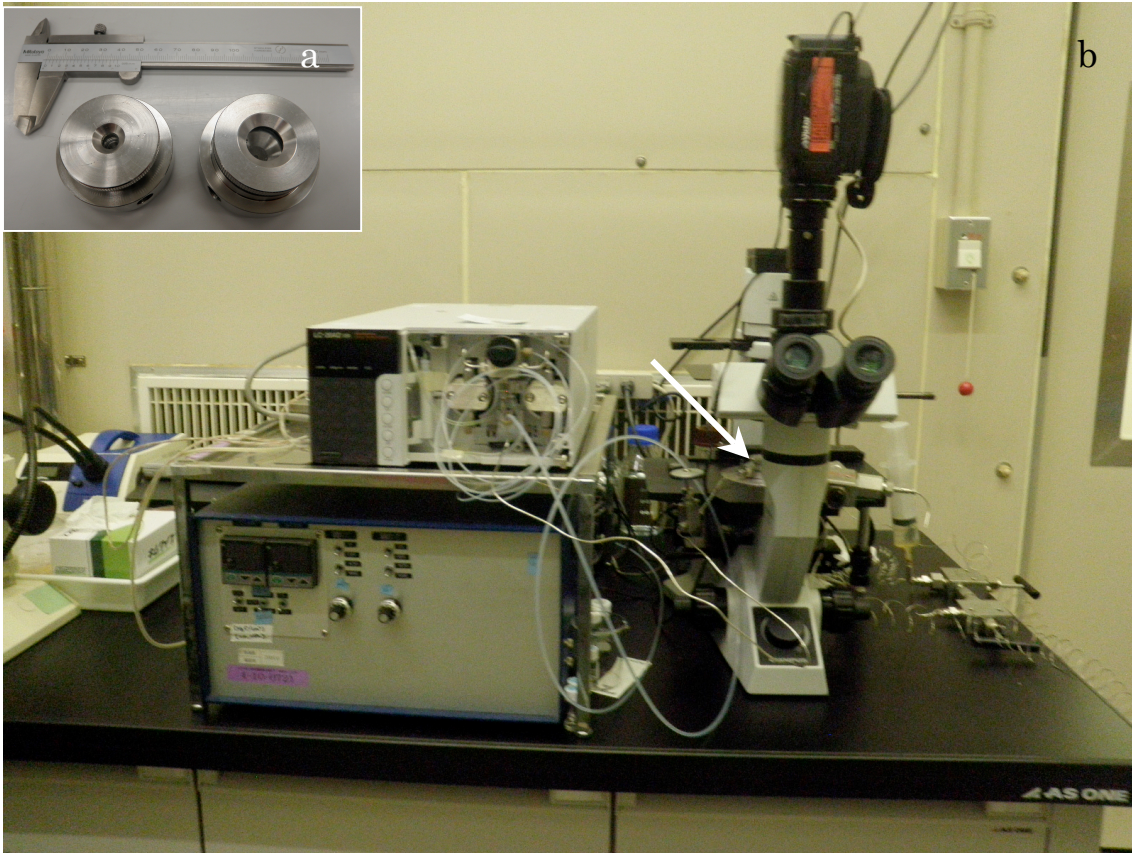


図 2-1) 本研究で開発した加圧システム。(a) 加圧チャンバー本体。左が 100 μ l チャンバー、右が 1.5ml チャンバー。(b) 実験中の加圧システムの様子。顕微鏡裏、矢印で示されている加圧チャンバーがステンレス配管によって HPLC ポンプと 2 種バルブに接続されている。

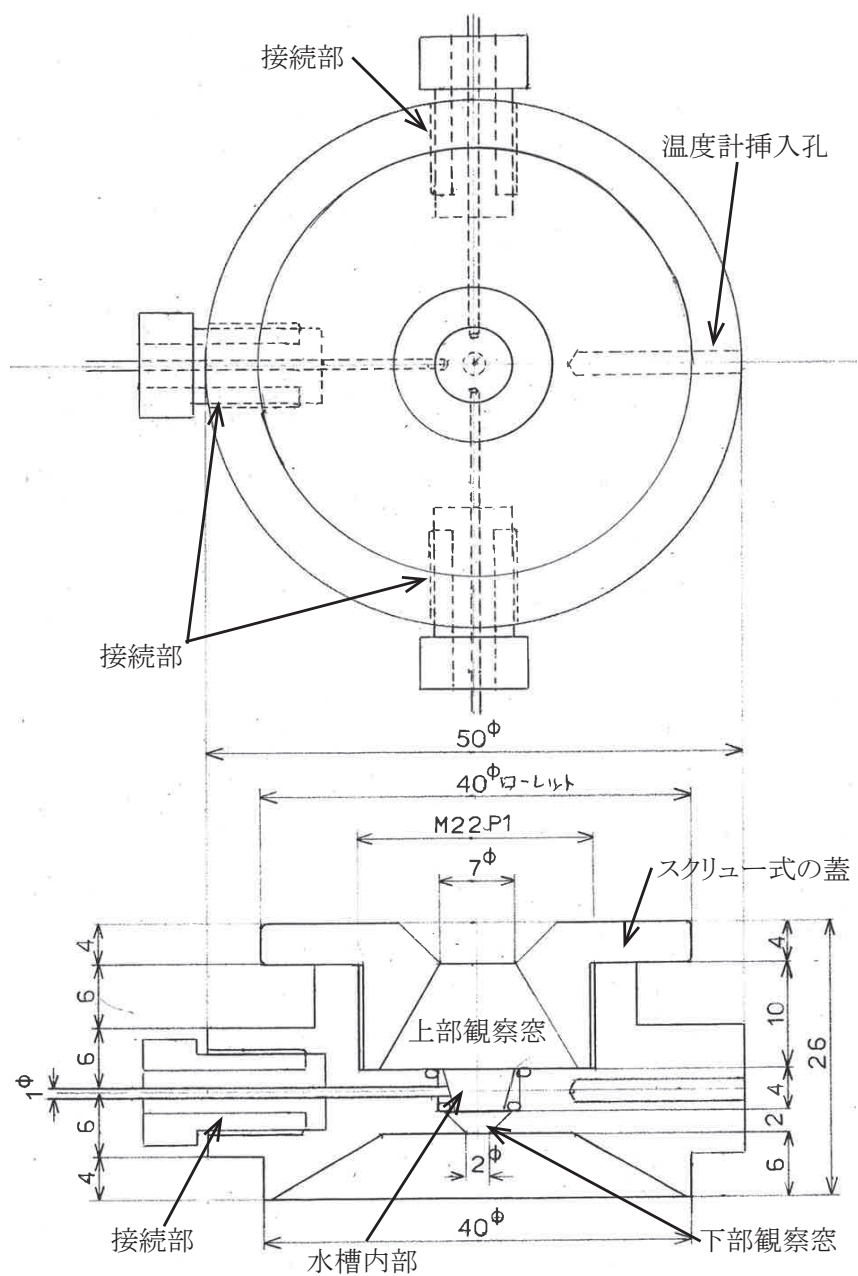


図 2-2) 100µl チャンバーの構造 (Seo *et al.* 2013 を改変)。上からの見取り図 (上) と側面からの断面図 (下)。

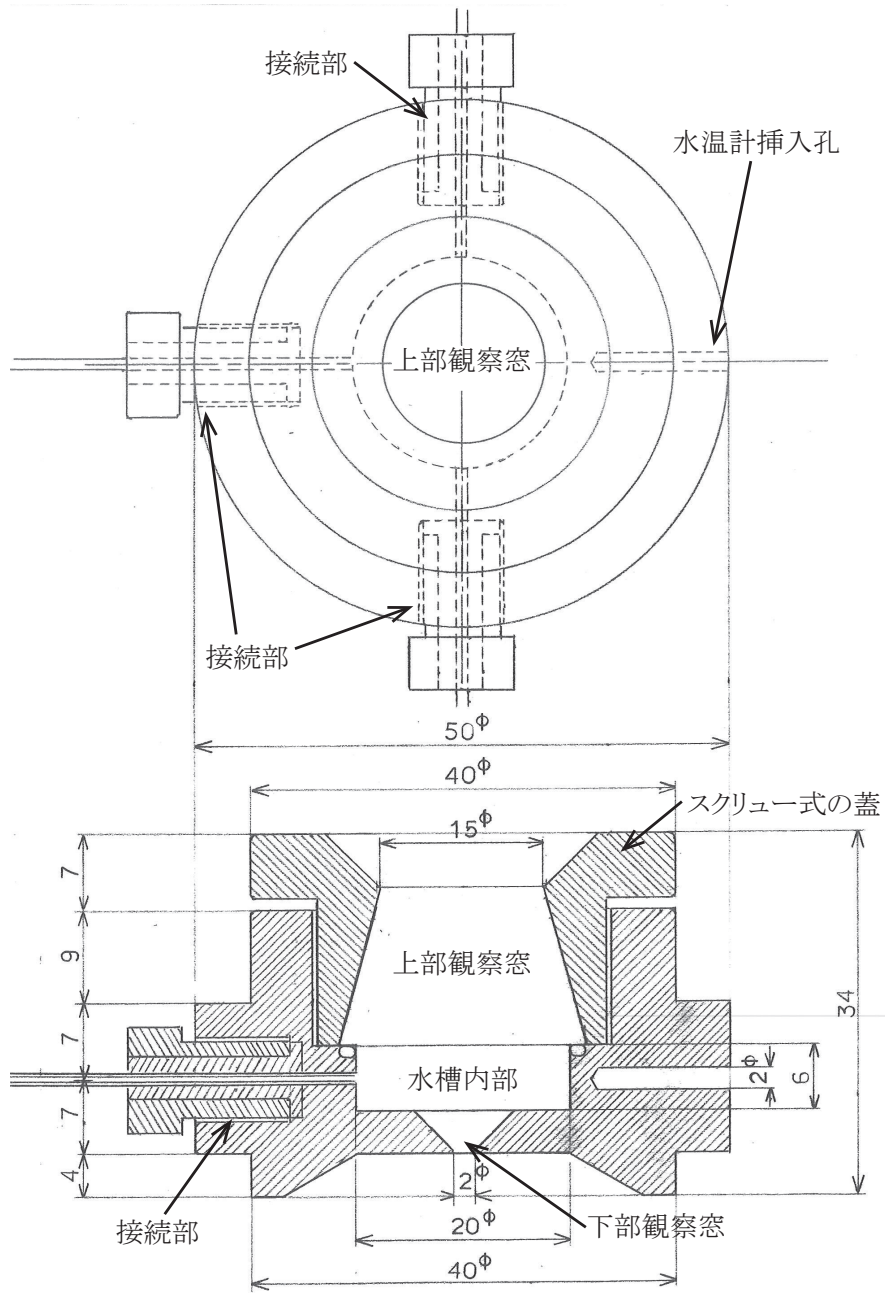


図 2-3) 1.5ml チャンバーの構造。上からの見取り図 (上) と側面からの断面図 (下)。

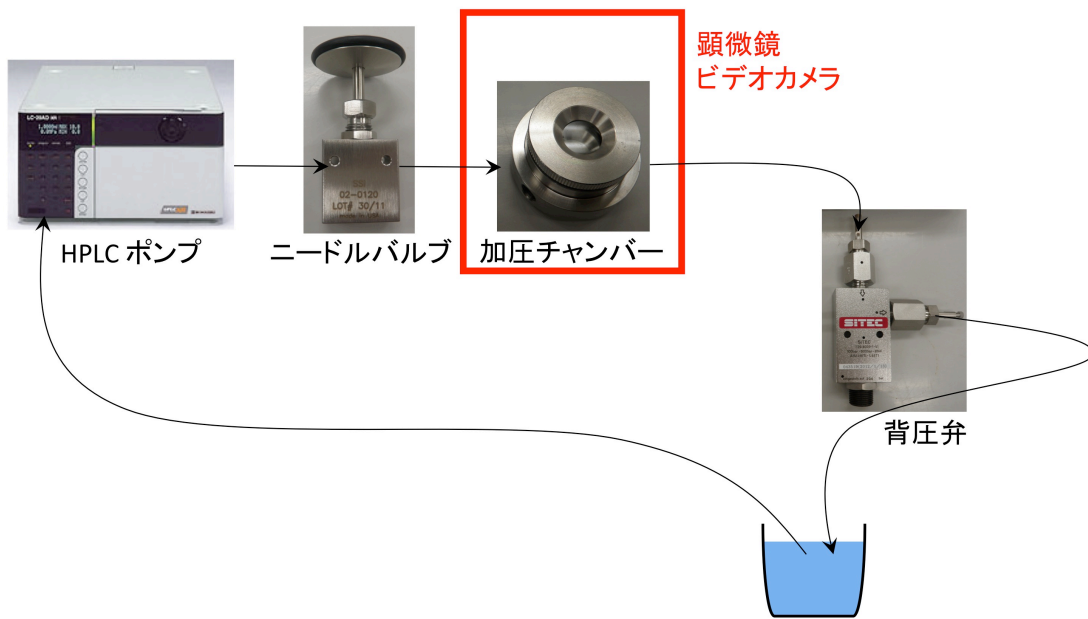


図 2-4) 加圧システムの模式図。HPLC ポンプ、ニードルバルブ、加圧チャンバー、背圧弁から構成される。加圧チャンバーの上下に備えられた観察窓から、顕微鏡による観察やビデオ録画が可能。

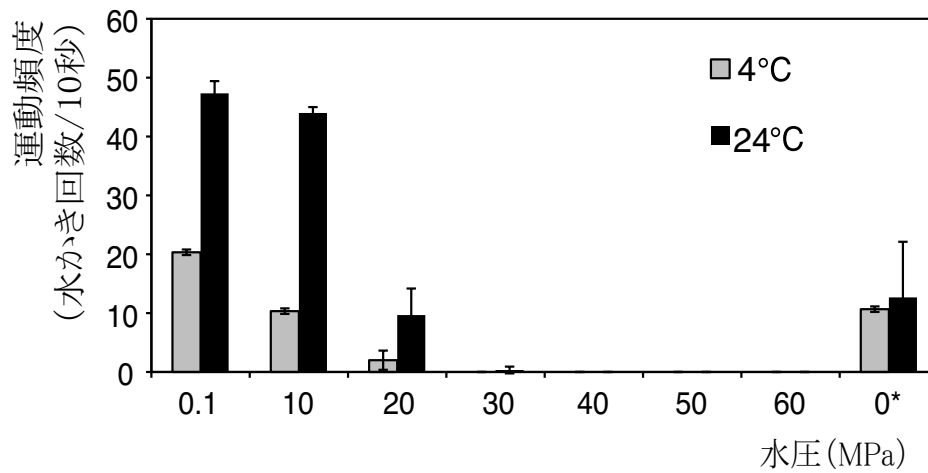


図 2-5) 各圧力・温度条件下におけるアルテミア第 I ゾエア期幼生の運動頻度。0*は大気圧まで減圧後の運動頻度。各水圧環境で 3 回計測を行なった。error bar は標準偏差を示す。

表 2-1) 多重比較検定による 4℃実験条件下におけるアルテミア幼生の水かき行動回数の圧力条件間の差異の *P* 値 (右側: Bonferroni 法; 左側: Holm 法)。但し、運動頻度に差がなく検定できないデータは n/a で示す。有為さが見られるものを*で表す ($\alpha = 0.05$)。

	0.1 MPa	10 MPa	20 MPa	30 MPa	40 MPa	50 MPa	60 MPa	減圧後
0.1 MPa		0.0730	0.1369	0.0059*	0.0059*	0.0059*	0.0059*	0.0261*
10 MPa	0.0299*		1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
20 MPa	0.0498*	0.1412		n/a	n/a	n/a	n/a	0.5934
30 MPa	0.0059*	0.0176*	1.0000		n/a	n/a	n/a	0.0215*
40 MPa	0.0059*	0.0176*	1.0000	n/a		n/a	n/a	0.0215*
50 MPa	0.0059*	0.0176*	1.0000	n/a	n/a		n/a	0.0215*
60 MPa	0.0059*	0.0176*	1.0000	n/a	n/a	n/a		0.0215*
減圧後	0.0176*	1.0000	0.1618	0.0176*	0.0176*	0.0176*	0.0176*	

表 2-2) 多重比較検定による 24°C 実験条件下におけるアルテミア幼生の水かき行動回数の圧力条件間の差異の *P* 値 (右側: Bonferroni 法; 左側: Holm 法)。但し、運動頻度に差がなく検定できないデータは n/a で示す。

	0.1 MPa	10 MPa	20 MPa	30 MPa	40 MPa	50 MPa	60 MPa	減圧後
0.1 MPa		1.0000	0.2450	0.0151	0.0161	0.0161	0.0161	0.7443
10 MPa	1.0000		0.1147	0.0015	0.0043	0.0043	0.0043	0.8411
20 MPa	0.1568	0.0780		1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
30 MPa	0.0127	0.0015	0.8513		1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
40 MPa	0.0129	0.0041	0.8513	1.0000		n/a	n/a	1.0000
50 MPa	0.0129	0.0041	0.8513	1.0000	n/a		n/a	1.0000
60 MPa	0.0129	0.0041	0.8513	1.0000	n/a	n/a		1.0000
減圧後	0.4466	0.4710	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	

表 2-3) 各水圧下および加圧・減圧時における腰折り運動の頻度。

水圧 (MPa)	観察時間 (秒)	腰折り行動が 観察された時間 (秒)	腰折り行動の頻度 (%)
0	120	0	0
0-5 (加圧)	160	0	0
5	120	0	0
0-10 (加圧)	210	50	24
10	120	7	6
10-15 (加圧)	180	56	31
15	120	17	14
15-20 (加圧)	240	58	24
20	120	0	0
20-0 (減圧)	780	0	0
0	120	0	0

2-3 考察

2-3-1 加圧観察機器の開発と評価

本研究において底生生物のプランクトン幼生の加圧研究に適した新しい加圧観察機器の開発に成功した。開発した加圧観察機器は 5mm 前後までの水棲動物に適した水槽容量を持ち、肉眼と顕微鏡を通して対象の行動のリアルタイム観察ができる。アルテミア幼生による試験により、大気圧から 60MPa までの圧力環境下で本システムの操作性や動作に問題が無いことを確認した。実体顕微鏡によるリアルタイム観察とビデオ撮影にも支障は見られなかった。アルテミア幼生では水圧の増加と共に運動量の低下が見られ、4°C と 24°C のいずれの水温でも 30MPa 以上の水圧で、ほとんど運動が見られなかった。類似した結果は過去の研究事例でも報告されており、例えばマウス、アナゴおよび深海性魚類の一種の細胞で 30MPa の水圧下で変形が見られ、細胞の成長が阻害されることが報告されている (Koyama *et al.* 2005)。また、動物細胞では一般的に 20MPa から 60MPa の圧力環境下で細胞の円形化が引き起こされたり、細胞質分裂、細胞の移動運動、細胞小器官の輸送や細胞質流動、染色体移動等の阻害が起こるとされている (Zimmerman 1970; Bourns *et al.* 1988)。アルテミア幼生の加圧実験でもこれらの多様な現象が生じたと予想されるが、最大水圧から大気圧まで減圧をした後に運動量の回復が見られたこと、さらに減圧後の運動量が加圧実験前よりも低かったことから、加圧時に見られたアルテミア幼生の運動量の低下は水圧に対する可逆的な運動応答と不可逆的な機能障害の複合的な結果であったと考えられる。この結果から観察されたアルテミア幼生の挙動は本種の水圧に対する応答として妥当なものと考えられる。その一方で、アルテミアの生息場所が常圧環境にあることを考えると、本実験でアルテミアが最大 60MPa の非常に高圧な環境下で生存したことは驚異的である。アルテミアはアメリカ合衆国ユタ州のグレートソルトレイクを始めとする陸封性塩湖に生息しており、環境中の塩濃度が海洋を遥かにしのぐこともある。また、本研究で用いられた *A. franciscana* の近縁種である *A. salina* Linnaeus, 1758 が高い浸透圧調節機能を持つ事も報告されている (Croghan 1958)。既往研究より、*N*-trimethylamine oxide (TMAO) を含む一部の浸透圧調節物質は複数の海洋生物の生息水深と強い相関性を持つことが指摘されている (Yancey 2005; Yancey *et al.* 2004)。TMAO は甲殻類にも見られる浸透圧調節物質であり、コエビ下目に属するエビ類や短尾下目に属するカニ類で筋肉中の TMAO の含有量が種ごとの生息水深によって大きく異なる

ることが報告されている (Kelly and Yancey 1999)。アルテミアの持つ高い浸透圧調節能力が幅広い水深への適応を可能にしている可能性が考えられる。これは生物が深海に進出する過程の一端を示しているのかもしれない。本研究で新たに開発した加圧システムが最大 5mm 程度までの水棲動物の加圧研究のツールとして必要十分な性能を備えているだけでなく、進化生態学的研究を行なう上で強力な研究手段となりうることを示すものである。さらに本システムでは、加圧チャンバーを内部の水圧を維持したままシステムから取り外してインキュベーターに保管し、定期的に HPLC ポンプに繋いで換水を行うことで、1 台の HPLC ポンプで複数の加圧飼育を並行して行うことも可能である。これにより、異なる水圧や水温条件下で幼生を長期間飼育し、成長過程を比較することが可能になった。以上の特性により、本研究で開発した加圧観察機器が熱水種に限らず、深海産無脊椎動物のプランクトン幼生の生態研究に画期的な発展をもたらすものと期待される。

2-3-2 ゴエモンコシオリエビ幼生の圧力応答

ゴエモンコシオリエビの幼生は体長 2mm 前後とサイズが大きく、従来の 100 μ l チャンバーや IPOCAMP™ では加圧下の行動観察を行なうことが困難であったが、今回開発した 1.5ml チャンバーを用いることで始めて水圧に対する応答を観察することが可能となった。本種幼生で恒常的に観察される附属肢の水かき運動の回数を運動性の指標としたが、加圧観察の結果、アルテミア幼生の水かき運動の様に規則的ではなく、同一個体でも運動量が大きく変動することが明らかになった。このことから、本種幼生の圧力応答を正確に評価する為には附属肢の運動以外の指標が必要であると考えられるが、これに変わる指標は見つかっていない。一方、10MPa への加圧の開始以降、痙攣から始まる激しい腰折り運動が観察された。この腰折り運動は加圧時に特に頻繁に見られたが、10MPa および 15MPa でのインキュベート期間にも頻繁に観察されており、全く腰折り運動が見られなかった 5MPa 以下の水圧下の挙動とはっきり区別することが出来る。浅海性のコエビ下目のエビ幼生を対象とした加圧実験でも、不適切な高圧環境下で逃避行動と見られる腰折り運動を行なうことが報告されている (Wilcock *et al.* 1978)。ゴエモンコシオリエビ幼生で大気圧から 5MPa までの水圧下では異常が見られず、10MPa への加圧時から逃避行動と見られる腰折り運動を行なうことから、本種幼生が 10MPa 以上の水圧環境からより低水圧の環

境へ逃避する性質を持つ可能性が考えられる。一方で、20MPaでのインキュベーション期間、大気圧への減圧時、および減圧後には腰折り運動は確認されなかった。減圧後に腰折り運動が見られないことは実験開始直後の加圧前の状態と同様であり、5MPa以下の水圧下が好適な環境であるとする推測と矛盾しない。減圧時に腰折り運動が見られなかったことは、より好適な環境に変化している為であると考えることが出来るが、10MPaより高圧である20MPaの水圧下で腰折り運動が見られなかった原因について、2つの可能性が考えられる。第一に、高水圧な環境下で幼生の運動が抑制されていた可能性が考えられる。一般的に20MPaから60MPaの圧力環境下で動物細胞の円形化が引き起こされたり、細胞質分裂、細胞の移動運動、細胞小器官の輸送や細胞質流動、染色体移動等の障害が起こるとされており (Zimmerman 1970; Bourns *et al.* 1988)、開発した加圧機器の評価の為に用いたアルテミア幼生の加圧実験でも20 MPa以上の水圧で運動能力の顕著な減衰が見られた。ゴエモンコシオリエビ幼生にも同様に高水圧による運動能力の抑制が起こっている可能性があり、その結果、幼生の生育環境により不適切と思われる20MPaの環境下で腰折り運動が見られなかったと考えることが出来る。次に、腰折り運動を行わないことによって幼生が運動により消費するエネルギーを節約している可能性が挙げられる。ゴエモンコシオリエビは卵黄栄養性の種に特徴的な大きなサイズの卵を持ち (Miyake *et al.* 2006; Baba *et al.* 2011)、本研究でも卵黄で満たされた卵と幼生が確認されている (徐 未発表データ) ことから、卵黄栄養タイプの幼生を持つと予想される。外部からエネルギーを摂取するプランクトン食性の幼生とは異なり、卵黄栄養性の幼生は体内に蓄えた卵黄に依存するため、使用出来るエネルギー量が限られている。幼生が20MPaの水深帯から表層へ脱出しようとする時、10MPaの水深帯から脱出するよりも長い距離を移動する必要があり、長く運動を行なうことでより多くのエネルギーが消費される。そのため、腰折り運動を行なうことで早く不適な環境から脱出する、もしくは腰折り運動を行わずに浮力による浮上に頼ることでエネルギーを節約する、という2つの選択肢を水圧 (水深) に応じて使い分けている可能性が考えられる。両者の原因は観察実験による判別が難しく、本研究では20MPaの水圧下で腰折り運動が見られなかった原因について明らかにできなかった。今後、高圧下でより解像度の高い研究を行なうことで、20MPa環境下での本種の生理状態が明らかになることが期待される。

今回の加圧観察実験は、これまで観察することの難しかった熱水種幼生の水圧に対する運動応答を実験的に示した萌芽的研究であり、実験計画やデータ量が十分とは言えないが、

これまで遺伝的集団構造解析等の間接的手法に頼ることの多かった幼生分散を、幼生の行動生態と言う直接的観点から研究することを可能にしたと評価できる。さらに、本研究で用いた加圧システムは小型で取り扱いが容易であり、多くのプランクトンに転用することが出来るため、将来的な発展性が高い。一方で、今後改善すべき点として、ゴエモンコシオリエビ幼生の附属肢の運動が圧力応答を正確に評価する指標として不適切であったことが挙げられる。現在までのところ、新たな指標を検討中であるが、これに変わる指標は見つかっていない。ハイパードルフィン HPD#1332 潜航で採集された本種と同じ熱水域に生息するエンセイオハラエビ *Shinkaicaris leurokolos* Kikuchi and Hashimoto, 2000 の卵から孵化した幼生を観察したところ、甲殻の透明度が高く、本加圧システムで加圧観察を行なった際に心臓の脈拍数が計数出来ることが確認された（徐 未発表データ）。ゴエモンコシオリエビ幼生でも試みたが、甲殻の透明性の低さと水中での姿勢から観察は困難であった。ゴエモンコシオリエビの幼生は飼育方法が確立されておらず、これまでの先行研究でも孵化直後の第 I ゾエア期までしか飼育が成功していない (Miyake *et al.* 2007)。今後本種幼生の飼育方法が確立され、より多くの幼生研究が行なわれることで、適切な運動指標が解明されることが期待される。また、本種幼生を水平方向から観察することで、心拍の観察が可能になる可能性が考えられる。そのため上からだけではなく水平方向からの観察を可能とすることが、今後の加圧チャンバーの改良を行う上での 1 つの指針となる。その他の改善すべき点として、本来高圧環境にある卵を大気圧下で孵化させて実験に用いていること、発生段階によって圧力応答が異なる可能性を考慮していないこと等が挙げられる。どちらも解決のためには技術的な課題が多いが、採集現場の水圧を保持したまま採集から飼育および加圧実験が行なえるチャンバーの開発や、幼生の長期飼育方法の確立等によって改善されることが期待される。

2-3-3 ゴエモンコシオリエビ幼生の浮力

海水の密度は温度・塩分・圧力によって決定されるため、同じ海域中でも海流の温度や水深によって密度は異なり、海洋の海水密度はおおよそ $1.02\sim 1.035\text{ g/cm}^3$ の範囲で変化する。したがって卵で $1.0158 \pm 0.0034\text{ g/cm}^3$ 、幼生で $1.0133 \pm 0.0018\text{ g/cm}^3$ の密度しかないゴエモンコシオリエビは、卵・幼生共に海水より比重が小さく、何もしなければ海面

に浮かぶことになる。ゴエモンコシオリエビ成体の眼柄には角膜の名残があるのみで眼は退化してしまっているが、第 I ゾエア期の幼生は眼を持つことが報告されている (Miyake *et al.* 2007)。このことはゴエモンコシオリエビ幼生が強い正の浮力を持つことと整合的であり、ゴエモンコシオリエビ幼生が卵から孵出後に、太陽光を感受できる有光層下から水深 1000m までのトワイライトゾーン付近まで浮上する可能性を示唆している。

海洋生物幼生の浮力は、一般的に現場海水中や飼育水槽中での浮上・沈降速度から推定されることが多い (e.g. Cary *et al.* 1989; Marsh *et al.* 2001; Pradillon *et al.* 2004; Bailly-Bechet *et al.* 2008)。しかし、現場観察が困難な深海生物では同じ海域中でも海流の温度や水深によって海水の密度は異なることから、自然状態における真の浮力の推定は難しい。本章の研究では、対象とするゴエモンコシオリエビの卵と幼生の密度を測定し、その密度を海水の密度と比較することで相対的に対象の浮力を推定した。この手法は手順が単純で短時間で測定が可能であり、ゴエモンコシオリエビ以外の多様な深海の熱水種で汎用的に用いることが出来る。例えば同海域に生息するエンセイオハラエビの幼生は $1.0283 \pm 0.0018 \text{ g/cm}^3$ の密度を持ち ($n = 5$)、シンカイフネアマガイ *Shinkailepas kaikatensis* Okutani, Saito and Hashimoto, 1989 の幼生は、他の貝類ベリジャー幼生と同様に (e.g. Fuchs *et al.* 2004)、 1.178 g/cm^3 の飽和した人工海水よりも高い密度を持つ事が確認された ($n = 2$; 徐 未発表データ)。本手法は、中性浮力を測定する静的な方法のため計測中の水槽内の乱流や初速を考慮する必要がなく、また、対象海域の海水密度と比較することで実際の環境下での浮力を推定できるため、異なる水深帯における浮力の変化について考察をすることも可能である (第 3 章を参照)。

第3章 海流モデリングによる幼生分散の推定

ゴエモンコシオリエビは代表的な熱水域固有種であり、餌を熱水域の化学合成細菌に強く依存している (Watsuji *et al.* 2014) ため、成体が長期間熱水域を離れて移動することは不可能である。そのため、地域集団間の移動は主にプランクトン幼生が海流によって輸送される幼生分散によって行なわれると考えられている。幼生分散による個体の移動方向は海流の方向によって規定されると考えられるが (Vrijenhoek 2010)、海流の方向は同じ海域でも水深により異なる場合がある。例えば本研究の対象海域である沖縄トラフ周辺では表層を北西方向に流れる黒潮の存在が知られているが、水深が深くなるに連れて南向きに流れる深層海流が卓越する (Andres *et al.* 2008; Nakamura 2008)。したがって、成体が深海底に生息するゴエモンコシオリエビの幼生分散を推測するためには、表層だけでなく中深層における海流の方向や流路の知見が必要不可欠である。しかし深層流の実測には多大な時間と費用がかかるため、海面から深海底までの連続的な海流データは係留計観測によって、ごく限られた点について測定されたものしかなく、沖縄トラフ全体の幼生分散を推測する情報としては不十分である。研究船の船底に設置された Acoustic Doppler Current Profiler (ADCP) で、超音波のドップラー効果を利用して船の下方の水の動きを定量的に捉えることができるが、広い空間の流速データが容易に得られる一方で海面や海底付近の計測が出来ず、研究船が長期間停止しない限り流速の時間的変動が捉えられない。そのため、これまでに公表されている実測データによる深層流の情報は季節や場所が限定されている。例えば沖縄トラフ内での ADCP による詳細な海流の鉛直的なプロファイルを計測した結果を報告した論文では、C-line と名づけられた北緯 28.343 度・東経 127.006 度と北緯 27.540 度・東経 128.197 度を結ぶ直線上の 4 日間 (2004 年 3 月 8 日、4 月 28 日、6 月 5 日、9 月 9 日) のスナップショットのみである (Andres *et al.* 2008)。この様に現状では、過去の文献情報から任意の海域、任意の時期の鉛直的な海流情報を得ることは困難である。

観測によらず水深ごとの海流の情報を取得する方法として、アメリカ合衆国の Rutgers University、University of California Los Angeles (UCLA)、および協賛研究者が協同で運用する領域海洋モデルである Regional Ocean Modeling System (ROMS; The ROMS/TOMS Group; <http://www.myroms.org>) や、JAMSTEC が運用する日本近海の海洋変動予測システム Japan Coastal Ocean Predictability Experiment 2 (JCOPE2;

Miyazawa *et al.* 2009) に代表される海洋物理情報を用いた海流モデリングがある。海流モデリングとは表層および局所的な海流方向や天候、海水温等の数多くの海洋物理情報を累積することで三次元的に海流の挙動を再現する方法であり、精度の高いモデルを使用することで研究対象海域全体の海流の方向や速度、流路を水深や時間、季節ごとに推定することが可能になる。この手法は海洋学や海洋物理学、気象学等で頻繁に利用されており、新たな環境情報や漂流ブイによるデータを用いて補正を行なうことで年々改良されている。最近では、海流モデリングと幼生の生態情報を合わせて幼生分散の推定を行なう手法も用いられ始めており (Marsh *et al.* 2001; Dupont *et al.* 2007; Young *et al.* 2012; Coscia *et al.* 2013)、幼生分散を理解する上で有効な手法の一つとなっている。沖縄トラフ周辺については、沖縄科学技術大学院大学 (OIST) 海洋生態物理学ユニットの御手洗哲司博士が、精密な海流モデルを構築しており (御手洗 未発表)、シミュレーションにより水深ごとに海流や物理環境を推定することが可能となっている。第1章で高い分散能力を持つことが示されたゴエモンコシオリエビは、幼生分散に沖縄トラフを北東に流れる黒潮に加えて逆方向に流れる深層海流を利用している可能性がある。本章ではまず、沖縄トラフ内の海流方向の鉛直プロファイルを作成することで、黒潮と深層海流の鉛直的な水深分布を推定した。第2章でゴエモンコシオリエビの卵と幼生の密度が一般的な海水密度と比較して非常に軽いことが示されたが、海水密度は一律ではなく、水深によって変化することが知られている。実際の沖縄トラフの海水密度よりも本種の卵と幼生の浮力が高いのかを検証するため、沖縄トラフ内の海水密度の鉛直プロファイルを作成した。さらに水深・海底地形・海流・幼生期間等が複合的に作用して実現する幼生分散の実態を解明するため、様々な水深帯での幼生の挙動をモデリングした。

3-1 方法

従来の海洋モデルに気候情報・衛星情報・水温情報・観測漂流ブイ等の情報を加えることで改良された海洋モデル (御手洗 未発表) を用いて、海流シミュレーションをおこなった。MATLAB student version R2012a (The MathWorks, Inc., www.mathworks.com) を用いて Network Common Data Form (netCDF) 形式のシミュレーション結果を展開・

再構築し、環境パラメーターの鉛直プロファイルの作成と幼生分散に見立てた粒子追跡シミュレーションを行った。

3-1-1 環境パラメーターの鉛直プロファイル

沖縄トラフを横断する様に設定した北緯 26 度断面における海流の方向および流速の鉛直プロファイルを作成し、南北方向に流れる海流の鉛直分布を表示した。海流の方向や速度は季節や月齢によっても異なるので 2011 年 4 月 1 日から 2012 年 3 月 31 日にかけて毎日深夜 12 時の海流シミュレーションの結果を用い、1 年間の平均的な流方向・流速鉛直プロファイルおよび季節ごとの平均鉛直プロファイルを作成した。

海水密度の鉛直プロファイルは 2010 年 3 月 1 日のシミュレーション結果を用い、沖縄トラフ内の海水密度を水深 1 m ごとに平均して作成した。水深ごとの計算面積を一定にするため、ここでは北緯 24°から 33°、東経 122°から 130°に含まれる海域のうち 3 本の測線 (24° 04.N / 123° 16.E と 25° 05.N / 121° 35.E を結ぶ測線、24° 04.N / 123° 16.E と 26° 16.N / 127° 46.E を結ぶ測線、26° 16.N / 127° 46.E と 30° 20.N / 130° 30.E を結ぶ測線) よりも北に位置する水深 1500m 以上の海域に計算範囲を限定した (図 3-1)。海水密度の単位は kg/m^3 を用いた。

3-1-2 幼生分散モデリング

ゴエモンコシオリエビの幼生分散過程を推定するため、沖縄トラフ内の各熱水域からそれぞれ仮想的に 1053 個の質量・サイズ共にゼロの粒子を流し、粒子の位置の経時変化を追跡した。本種の幼生分散期間は明らかになっていないが、第 I ゾエア幼生を 31 日間飼育した記録がある (玉田 未発表データ) ことから、少なくとも 31 日以上あると予想される。一方で、本種に近縁なコシオリエビの中でも特に長い幼生期間を持つ *Munida gregaria* Fabricius, 1793 は孵化後 83 日でメガロパ幼生に変態することが知られている (Pérez-Barros *et al.* 2007) ことから、本研究ではシミュレーション期間を 4 ヶ月 (120 日間) とし、表層から深層までの 5 つの水深 (100m、500m、750m、1000m、1500m)

における水平的な粒子の移動をプロットした。

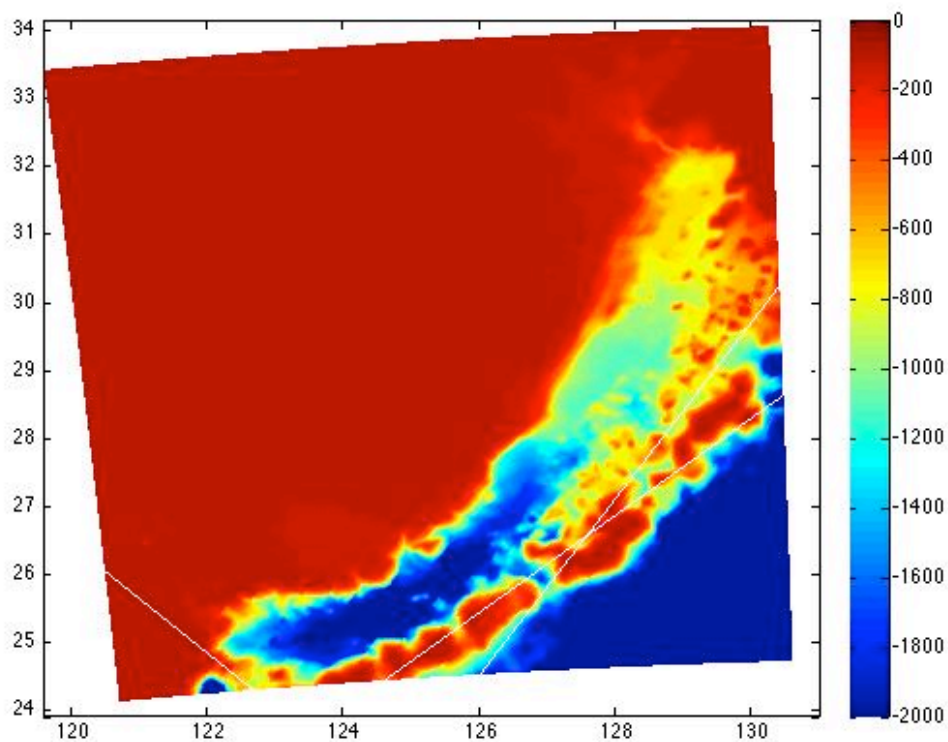


図 3-1) 沖縄トラフ周辺の海底地形図。沖縄トラフは図右下に位置する黄から青のグラデーションで示された弓なりの窪地。琉球諸島上と台湾の北東に引かれた三本の測線（白色の直線）よりも北の海域を海水密度の鉛直プロファイルの計算に用いた。

3-2 結果

3-2-1 海流の方向と流速の鉛直プロファイル

中部沖縄トラフを横断する北緯 26 度断面における 1 年間の平均的な流方向・流速鉛直プロファイル (図 3-2) と季節ごとの平均鉛直プロファイル (図 3-3) を作成した。図では南北方向に流れがない状態をゼロ (図中の白色部分)、北向きの流れが卓越している状態を正の値 (図中の赤色部分)、南向きの流れが卓越している状態を負の値 (図中の青色部分) で示している。いずれの結果でも、沖縄トラフ表層を強い北向きの海流である黒潮が流れ、水深が深くなるに連れて南向きに流れる深層海流が卓越していることが再現された。年間を平均すると黒潮と深層海流の境界はおおよそ水深 500m から 800m の間にあり、深層海流は黒潮より流速が遅く、沖縄トラフの西側で特に発達していた (図 3-2)。同じデータを使用して季節ごとの平均流速の鉛直プロファイルを作成したところ、季節によって海流の分布や流速に違いが見られた (図 3-3)。春期には黒潮と深層海流が発達し、両海流の境界が 500m から 1100m の間に確認された。逆に夏期には両海流の勢いが弱くなり、おおよそ水深 500m から海底面までの間に境界が形成されたが、沖縄トラフ西側で深層海流が卓越していた。秋期から冬期にも春期と同様に黒潮の発達が見られた。両海流の境界は夏期の様に広い水深に広がっており、秋期は水深 500m から海底まで、冬期は水深 600m から海底までの間に境界が形成された。また、沖縄トラフ西側と沖縄トラフ東側の一部で深層海流が卓越しており、同じ水深でも場所によって海流の方向が異なることが確認された。

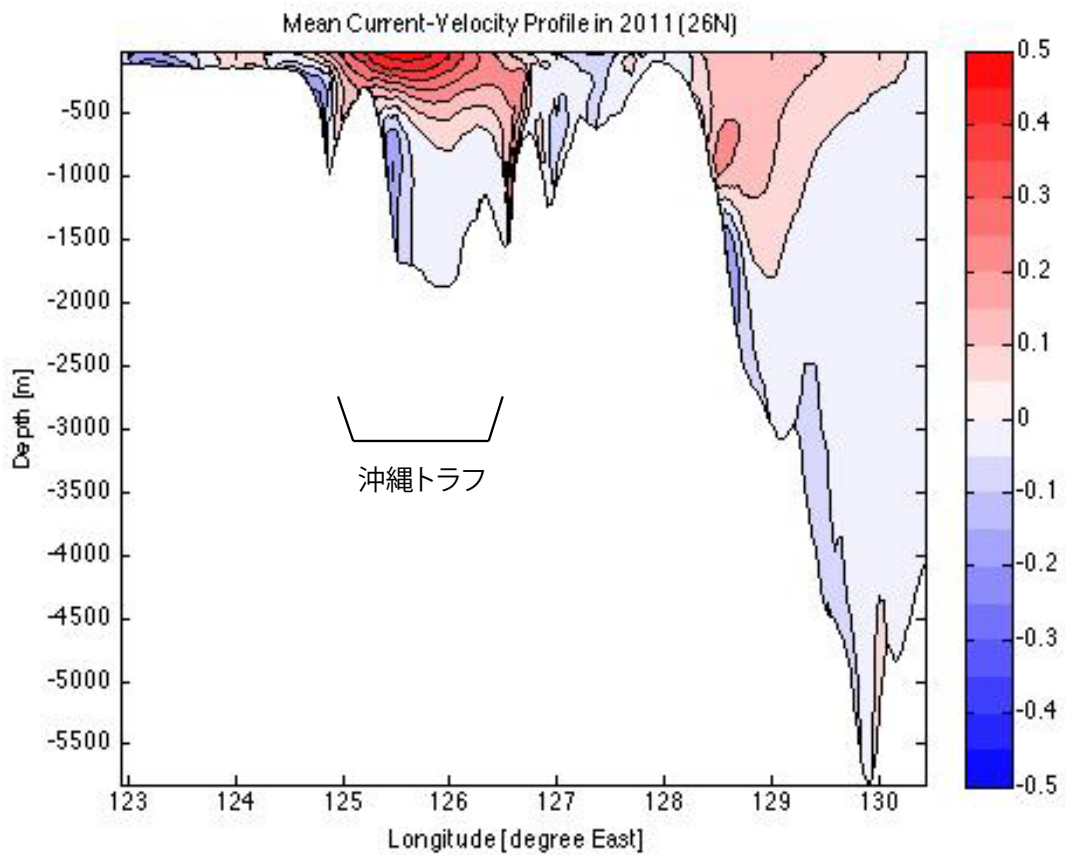


図 3-2) 年間の平均流速鉛直プロファイル。図中の赤は北向きの海流、青は南向きの海流をそれぞれ表す。流速の単位は m/s。沖縄トラフ表層に強い北向きの流れ（黒潮）が発達し、水深 500m から 800m にある海流の境界より深い層で南向きの深層海流が発達している。

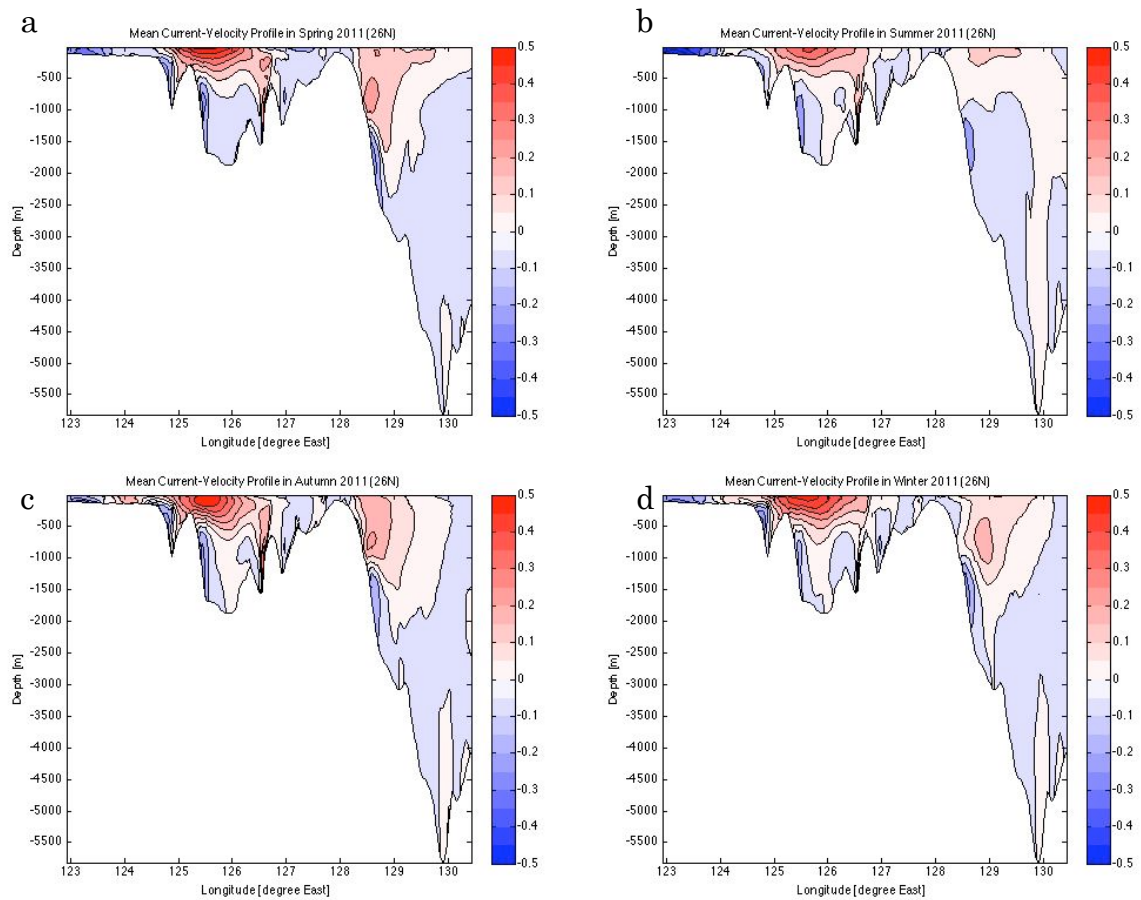


図 3-3) 季節ごとの平均流速鉛直プロファイル。図中の赤は北向きの海流、青は南向きの海流をそれぞれ表す。流速の単位は m/s。全てに季節において、沖縄トラフ表層に強い北向きの流れ（黒潮）が発達している。(a) 春期の平均流速。水深 500m から 1100m の間に両海流の境界が確認された。(b) 夏期の平均流速。水深 500m から海底面までの間に両海流の境界が形成された。沖縄トラフ西側で深層海流が卓越している。(c) 秋期の平均流速。水深 500m から海底までの間に両海流の境界が形成された。海山や海底斜面の西側で深層海流が卓越している。(d) 冬期の平均流速。水深 600m から海底までの間に両海流の境界が形成された。秋期と同じく海山や海底斜面の西側で深層海流が卓越している。

3-2-2 海水密度の鉛直プロファイル

沖縄トラフ内の 1500m 以深の海域における表層から水深 1500m までの海水密度の平均と標準偏差の鉛直プロファイルを作成したところ、 23kg/m^3 から 27.5kg/m^3 の範囲で水深の増加に伴い加速度的に密度が増加することが示された (図 3-4)。特に表層から水深 500m の間の層で海水密度の顕著な増加が見られ、水深 1000m より深い深度では海水

密度の大きな増加は見られなかった。

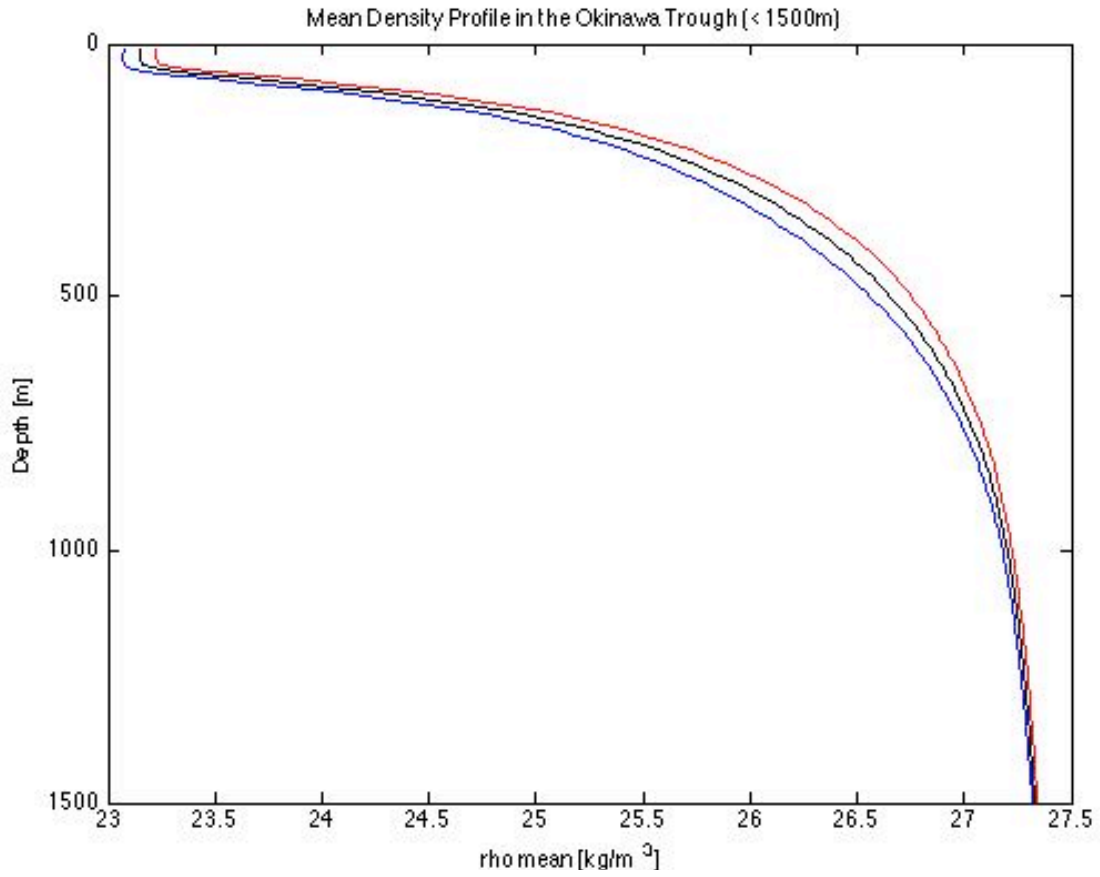


図 3-4) 海水密度の鉛直プロファイル。沖縄トラフ内で 1500m 以上の水深を持つ海域を対象に、水深ごとの海水密度の平均と標準偏差を表す。図中の黒い曲線が平均値を、赤と青が全データの 95%信頼区間をそれぞれ示す。

3-2-3 各水深帯における幼生分散モデリング

表層から深層までの5つの水深(100m、500m、750m、1000m、1500m)で各熱水域からリリースされた幼生に見立てた粒子の移動を120日間に渡ってシミュレーションにより追跡したところ、水深帯によって移動距離が異なり、沖縄トラフから流出するまでにかかる時間に大きな違いが見られることが示された(図3-5、図3-6、図3-7、図3-8、図3-9)。図を見やすくするために、代表的な粒子の軌跡を示している。表層の水深100mでは黒潮の影響を強く受け、各熱水域からリリースされた幼生が北東方向に流されて短期間で沖縄トラフから流出した。流出した幼生は屋久島と奄美大島の間に位置するトカラ海峡(鹿児島県)を通過後、時計回りと反時計回りに渦を巻く集団に分かれ、徐々に放散されていった。沖縄トラフ内の熱水域からリリースされた幼生のうち、3日以内に全体の20%、5日以内に全体の50%、15日以内に全体の80%が沖縄トラフ外に流出した。水深500mで行われた幼生分散のシミュレーションでは、100mでのシミュレーション結果に類似した幼生の北東方向への移動が見られたが、移動速度は100m水深の幼生と比較して遅かった。それに加えて、中部沖縄トラフと南部沖縄トラフの東側の熱水域周辺では、リリースされた幼生の一部がトラフ東側境界に沿って南下した後、南下と北上を繰り返して反時計回りに渦を巻くような移動が見られた。幼生はシミュレーションを開始してから18日以内に全体の20%が沖縄トラフから流出するが、その後は120日目まで50%以上がトラフ内に留まっていることが確認された。水深750mでは水深500mのシミュレーションと同様に北東へ流れる流路とトラフ東側の境界面に沿って南下する流路の両方が確認されたが、120日目まで幼生の沖縄トラフ外への流出は確認されなかった。また、水深1000mおよび水深1500mのシミュレーションでも、期間内の沖縄トラフ外への流出は確認されなかった。

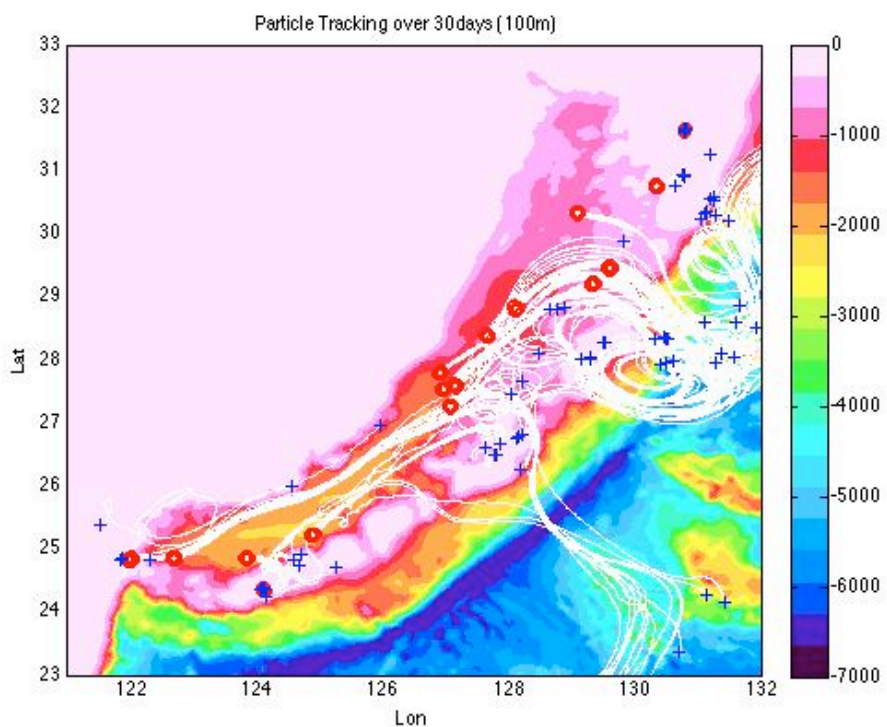
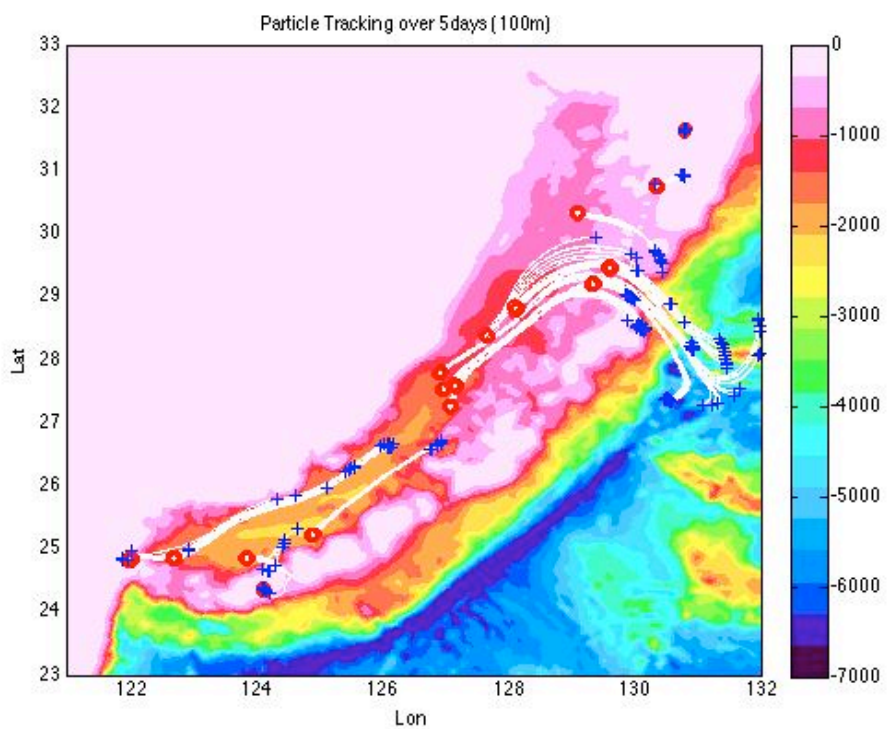


図 3-5) 水深 100m における幼生の挙動。始点を赤丸、5 日後（上）または 30 日後（下）の位置を青い十字、移動経路を白線で示す。放出された幼生は北東方向に流され、30 日以内にトカラ海峡から大部分が流出した。

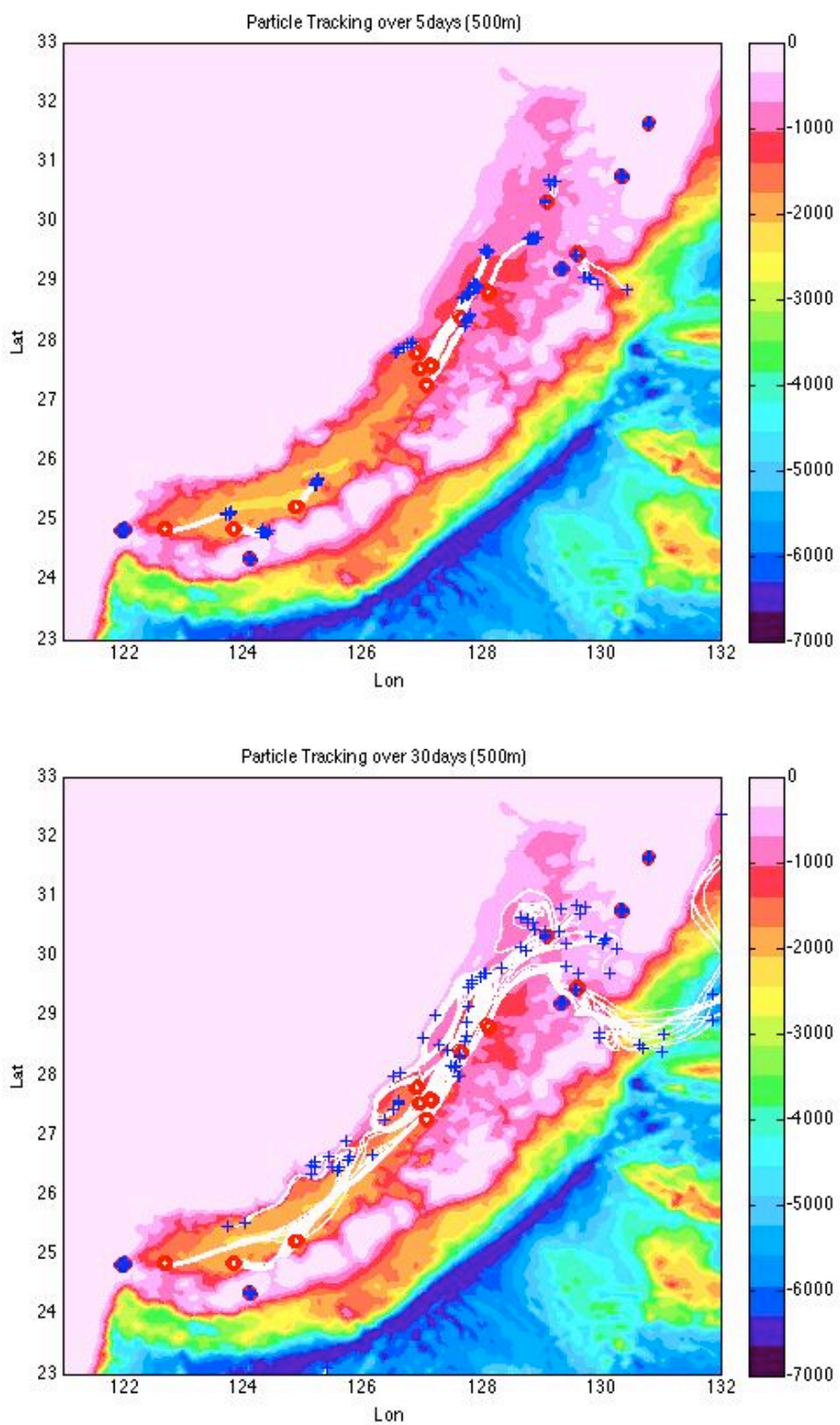


図 3-6) 水深 500m における幼生の挙動。始点を赤丸、5 日後（上）または 30 日後（下）の位置を青い十字、移動経路を白線で示す。放出された幼生は水深 100m の場合よりもゆっくりと北東方向に流され、一部が 30 日目までにトカラ海峡から流出した。

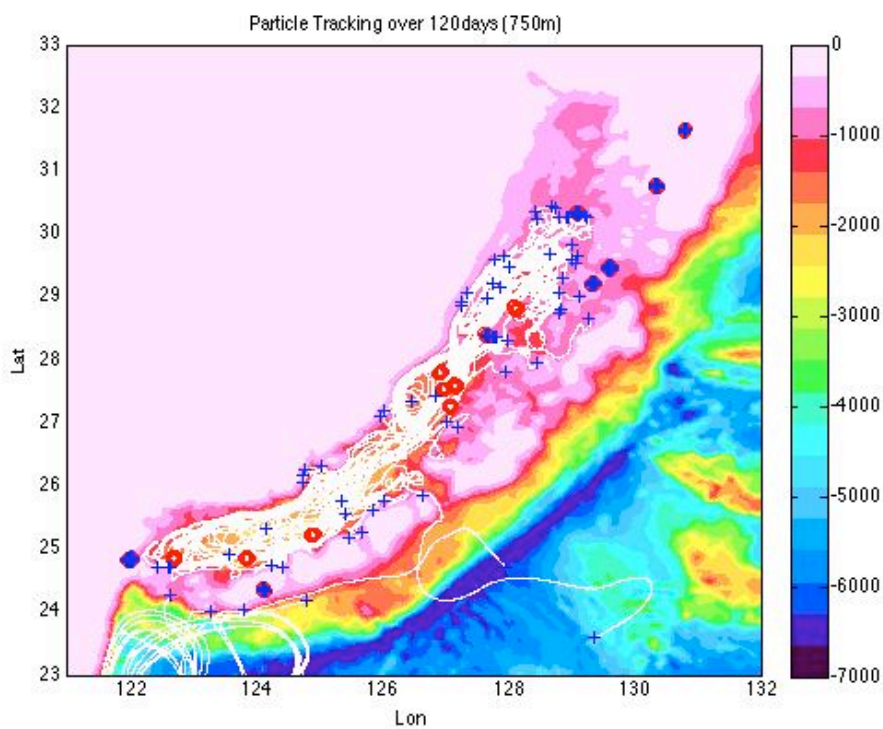
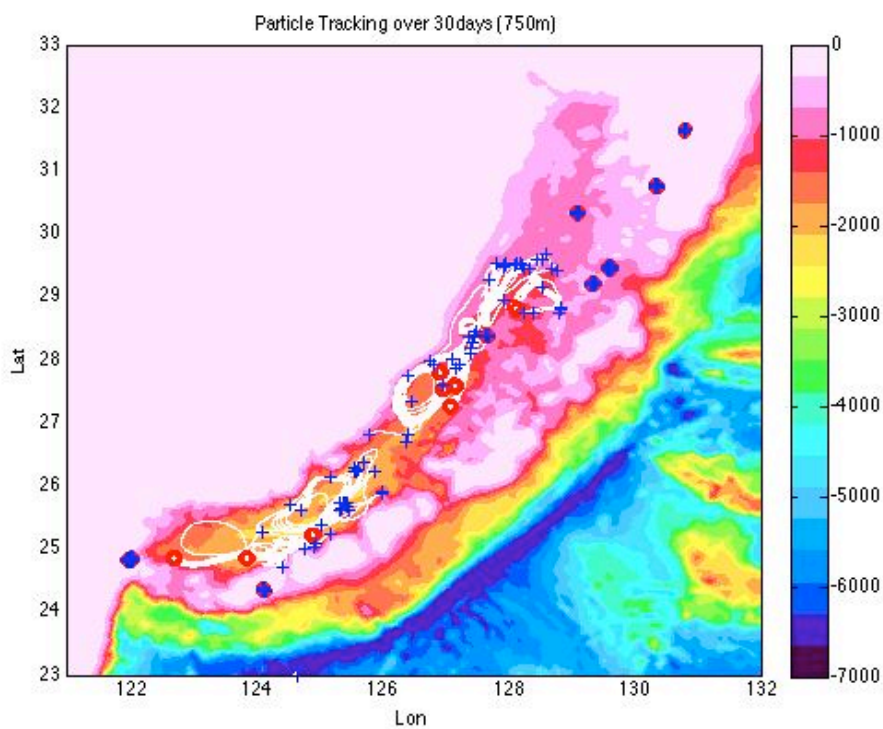


図 3-7) 水深 750m における幼生の挙動。始点を赤丸、30 日後 (上) または 120 日後 (下) の位置を青い十字、移動経路を白線で示す。放出された幼生はゆっくりと北東方向に流される。幼生の一部は放出後に沖縄トラフ西側を南下して、大きく渦を描くように南北に移動した。120 日後もほぼ全ての幼生が沖縄トラフ内に留まった。

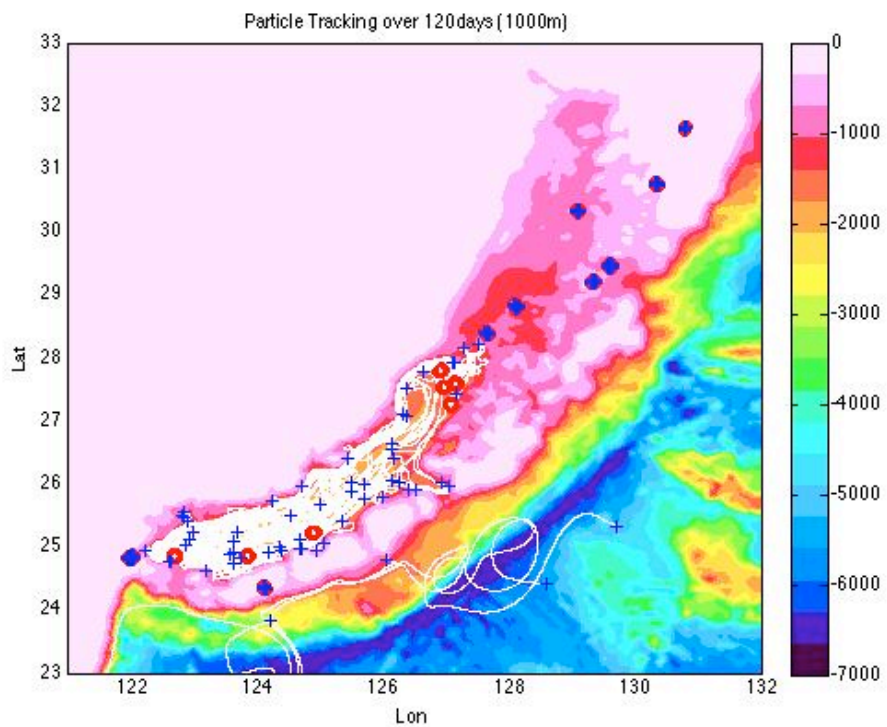
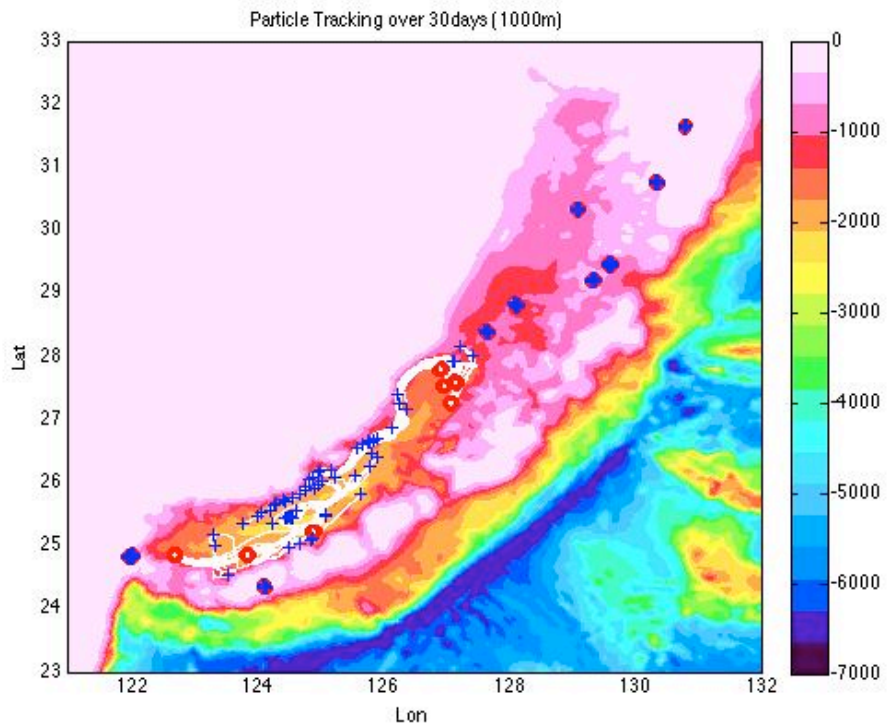


図 3-8) 水深 1000m における幼生の挙動。始点を赤丸、30 日後（上）または 120 日後（下）の位置を青い十字、移動経路を白線で示す。放出された幼生はゆっくりと北東方向に流された後に沖縄トラフ西側の流れに乗って南下し、渦を描くように 1000m 以深の沖縄トラフ内を広範に移動した。120 日後も全ての幼生が沖縄トラフ内に留まった。

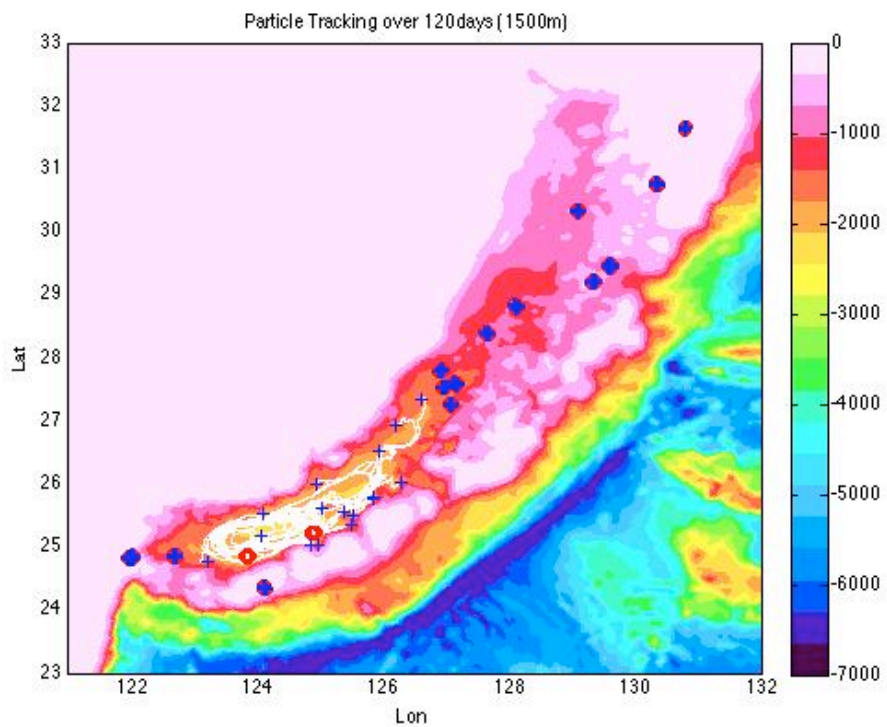
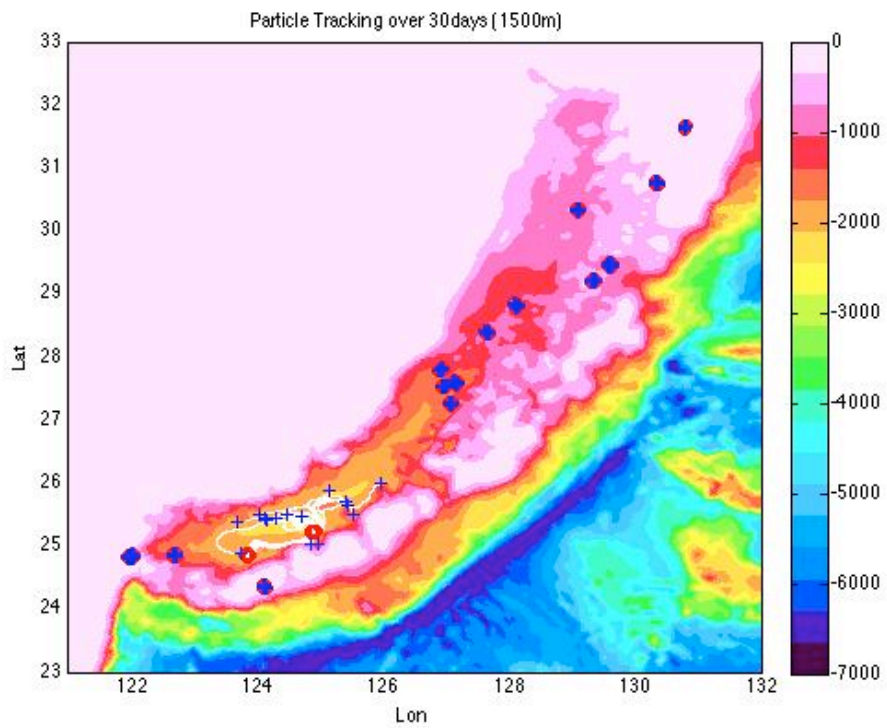


図 3-9) 水深 1500m における幼生の挙動。始点を赤丸、30 日後（上）または 120 日後（下）の位置を青い十字、移動経路を白線で示す。放出された幼生はゆっくりと北東方向に流された後に沖縄トラフ西側の流れに乗って南下し、渦を描くように 1500m 以深の沖縄トラフ内を広範に移動した。120 日後も全ての幼生が沖縄トラフ内に留まった。

3-3 考察

3-3-1 沖縄トラフ内の海流の鉛直プロファイル

沖縄トラフでは、年間を平均すると水深 500m から 800m の間に黒潮と深層海流の境界が存在していることが 2011 年度の海流のモデリング結果から推定された。その一方で、海流モデリングの結果を比較したところ両海流の境界の位置が季節ごとに大きく異なり、年間平均との隔たりが見られた。黒潮と深層海流は海流方向が逆であるため、境界水深が季節ごとに異なることは幼生分散に海流が与える影響が季節ごとに異なることを意味している。したがって、幼生分散の経路を理解するためには対象とする生物種の分散時期を考慮に入れ、対応する季節についてシミュレーションをおこなうことが必要である。これまでの既往研究ではゴエモンコシオリエビの分散時期は特定されていなかったが、本研究の第 1 章で本種が年間を通して抱卵していることが確認された。本種と近縁なコシオリエビが 1 ヶ月未満の抱卵期間を持つ (Dellatorre and González-Pisani 2011) ことから本種も 1 ヶ月前後の抱卵期間を持つことが予想されるが、このことから本種は 1 年中幼生分散を行なっている可能性が高いと考えられる。そのため、本章では年間を平均した海流モデリングの結果に基づき、500m から 800m の間の水深に海流の境界がある条件でシミュレーションをおこなった。

第 1 章の集団遺伝学的解析の結果より、ゴエモンコシオリエビの分散能力が高く地域集団で遺伝的な分化が見られないことが示された。そのような集団構造を持つことから、各熱水域間に双方向の幼生分散が維持されていると推測される。しかし沖縄トラフの表層は流れの速い黒潮に支配されており、表層海流のみに依存した幼生分散では一方向の分散しか実現しないため、逆方向に流れる深層海流も合わせて利用されていると考えられる。二つの海流の境界を含む水深帯で分散を行うことによって、南北両方向に流れる海流を利用することが可能となる。そう考えると、水深 500m から 800m の間にある黒潮と深層海流の境界を含む水深帯でゴエモンコシオリエビ幼生の分散が行われている可能性が高いと結論づけることができる。以上の考察は年間の平均値のシミュレーション結果に基づくものだが、季節ごとのシミュレーション結果でも境界水深は水深 500m (もしくは水深 600m) 以深の水深帯と推定されたため、結論に大きな齟齬は無いと考えられる。

3-3-2 ゴエモンコシオリエビの卵と幼生の浮力

海水密度の鉛直プロファイルから、沖縄トラフ内の 1500m より深い水深を持つ海域の全ての水深帯で海水が 23 kg/m^3 以上の密度を持つことが示された (図 3-4)。第 2 章の浮力測定の結果からゴエモンコシオリエビの幼生が $1.0133 \pm 0.0018 \text{ g/cm}^3$ の密度を持つことが明らかになっているが、これは $13.3 \pm 0.18 \text{ kg/m}^3$ に相当し、沖縄トラフで最も海水密度が低い表層海水よりも遥かに低い。卵の密度は $1.58 \pm 0.34 \text{ kg/m}^3$ であるため、幼生と同様に表層海水よりも密度が低い。このことは卵や幼生が海水中で正の浮力を持ち、何もしなければ海面に浮かぶことを意味する。本研究の第 2 章の浮力測定と本章の鉛直的な海水密度分布プロファイリングの結果を合わせることによって、各水深におけるゴエモンコシオリエビの卵や幼生の浮力を計算することが可能となる。本種では密度が極めて小さいため、分布水深に関して新たな情報を得ることは出来ないが、幼生が浮力に逆らって沈降する場合の移動速度や必要なエネルギーの見積もりに利用できるものと期待される。また密度が表層海水より大きい種については、本章で作成した海水密度の鉛直分布と比較することで中性浮力となる水深を推定することが可能となる。実際に、筆者らが中性浮力を測定したエンセイオハラエビの幼生は表層海水よりも大きい $1.0283 \pm 0.0018 \text{ g/cm}^3$ の密度を持ち、本章で作成した海水密度の鉛直分布と比較すると沖縄トラフの水深およそ 450m から海底までの間で中性浮力を取ると推定された (徐 未発表データ)。生息環境下で中性浮力となる水深を特定することが難しい深海生物について、今回の研究手法が今後の基礎研究に役立つものと期待される。

本研究ではゴエモンコシオリエビの卵と第 I ゴエア期幼生の密度を測定したが、一般に特定の時期の幼生の密度のみから分散水深を推測することは困難である。甲殻類幼生は一般的に脱皮を繰り返して成長し、体サイズの増加や形態の変化が起こる。例えばゴエモンコシオリエビに近縁なコシオリエビ属の一種である *Galathea amboinensis* De Man, 1888 は 4 期の幼生期を経てメガロパ幼生に成長することが知られている (Fujita *et al.* 2003)。成長にしたがって幼生の密度が変化する可能性は否定できない。本研究で対象としたゴエモンコシオリエビは成体の飼育方法が確立されておらず、健全な状態の幼生を陸上で継続的に得ることができない。さらに親個体が深海に生息しており長期的な観察が困難なため、幼生の自然環境下での行動生態を観察することも難しい。また、幼生の飼育方法が確立していないため、第 I ゴエア期以外の幼生の生態が未解明である。このため各成

長段階における密度を測定することが出来ず、幼生の分散過程の全容を推測することは難しい。これに加えて、幼生が自然環境下で能動的に分布水深を選択する可能性が考えられる。その場合、実際の分布水深は幼生の浮力と運動能力との兼ね合いによって調節され、密度のみから分散水深を予測することが出来なくなる。さらに海流の鉛直成分によって幼生の分布が影響されることも予想される。これらの問題点を解決する為に、本種の飼育・繁殖方法が確立され、健全な幼生が安定して入手可能になることが期待される。また、より精度の高いモデリングにより幼生の浮力と能動的な鉛直移動、海流の鉛直成分を考慮に入れたシミュレーション解析により幼生分散の全容が解明されることが期待される。

3-3-3 各水深帯における幼生分散の推定

ゴエモンコシオリエビは分布が日本周辺の生息域が沖縄トラフと台湾周辺に限定されており (Baba and Williams 1998; Chan *et al.* 2000)、南海トラフや伊豆小笠原弧等の他の化学合成環境からは見つかっていない。一方で、第1章の解析結果から、本種が高い分散能力を持ち、沖縄トラフ内の熱水域間で双方向の遺伝的交流が起こっていることが示されている。もし本種の幼生の大半が分散期間中に沖縄トラフから流出してしまう場合、沖縄トラフのゴエモンコシオリエビの集団を維持することが困難であると考えられる。このことから、本種の幼生分散は沖縄トラフから外洋への流出が少ない水深もしくは期間に行われていると予想される。本章において120日間に渡ってシミュレーションを行った結果、水深100mでは幼生の過半数が5日以内に、8割が15日以内に沖縄トラフから流出することが示された。一方、水深500mでは幼生の約2割が18日以内に沖縄トラフ外に流出するものの、過半数の幼生は120日間以上沖縄トラフ内に留まること、水深750m以深では120日の間に沖縄トラフ外への流出は見られないことが確認された。幼生の飼育記録 (玉田 未発表データ) に基づき幼生期が31日以上あると仮定すると、水深100mでは幼生のほとんどが期間内に沖縄トラフから流出してしまうことになるため、幼生分散水深として現実的であるとは言えない。水深500m以深では120日後も過半数以上の幼生が沖縄トラフ内に留まっている。このことから、本種の幼生分散は水深500m以深で行われている可能性が高いと考えられる。

海産無脊椎動物の浮遊幼生はプランクトン食幼生と卵黄栄養性の幼生に分類される。浅

海性の種では一般的に前者が数週間以上の浮遊期を持つのに対し、後者は数時間から数日の短い幼生期を持つとされる (e.g. Vance 1973)。浅海種の幼生は比較的水温の高い表層付近の水塊を利用することが考えられ、プランクトン食幼生期を持つコシオリエビ上科浅海種では、水温 15–27.5°C 下で最大 54 日のゾエア期を有する事が分かっている (Baba *et al.* 2011)。その一方で、卵黄栄養性の幼生を持つコシオリエビ上科の浅海種 *Chirostylus stellaris* (生息水深数十 m) は、26.5°C の水温下において 48 時間のゾエア期しかないことが明らかになっている (Baba *et al.* 2011)。一般的に、海洋ベントスにおいて幼生期の長さや種の地理的分布の広さや地域集団間の遺伝的均質性の高さには、正の相関があることが分かっている (e.g. Paulay and Meyer 2006)。また、深海性の種では、低水温の水深帯を利用する場合には代謝が下がり、卵黄栄養性の幼生においても数週間以上の浮遊期を持つことが知られている (e.g. Stuart and Rex 1994)。実際、ゴエモンコシオリエビに近縁なシンカイコシオリエビ科の深海性種 *Munidopsis serricornis* (生息水深 100–2165 m) は卵黄栄養性の発生様式であるにも関わらず、水温 6.5°C 下では最大 56 日以上長いゾエア幼生期を持ち (Macpherson and Segonzac 2005; Baba *et al.* 2011)、東大西洋 (ノルウェー、アイスランド～カーボベルデ) および西大西洋 (アメリカ南東部～メキシコ湾北西部) に広く分布することが知られている (Osawa *et al.* 2008; Ahyong 2014)。本章の結果から沖縄トラフのゴエモンコシオリエビは水深 500m 以深を分散する可能性が高いことが示された。この水深帯はおよそ 4.0°C から 8.0°C の水深帯にあり、本種が卵黄栄養性の発生様式を持ちながらも長いゾエア幼生期を持つことが示唆される。これは沖縄トラフにおける本種の集団が高い遺伝的多様性を持つ (第 1 章) ことと整合的であり、本種の分散水深が高い幼生分散能力を持ちながらも分布域が限定されている一因である可能性を示している。

以上の考察はゴエモンコシオリエビ幼生の限られた生態情報に基づいているため、本種の飼育研究が進むことで、より現実的なものとなることが期待される。特に解明が求められる生態情報の一つに、幼生期の長さが挙げられる。過去の飼育観察 (玉田 未発表) と本章の結果から推定された分散水深の水温から、本種の幼生は 31 日以上長いゾエア幼生期を持つ事が推測されるが、その具体的な期間は明らかになっていない。正確な幼生期間が判明すれば幼生の分散水深の上限をより絞り込むことが可能になるため、今後の飼育研究によって本種の幼生生態の理解が深まる事が期待される。また先に述べたように、成長段階による浮力や行動の変化に対応して分布水深が変化する可能性がある。特に本種は

卵と幼生の浮力が高く、全く運動のない状態で本種の幼生は秒速 0.47cm の浮上速度を持つ事が報告されている (1 atm, 4°C; 玉田 未発表)。これは海流の無い条件下で、水深 1500m で孵出した幼生が 4 日間未満で表層まで到達する速度に相当する。このように高い浮力を持つ本種では幼生の鉛直移動の重要性は高いと予想されるが、本章の幼生分散のシミュレーションは水深ごとに行なわれているため、幼生や海流の水平成分のみに結果が限定されている。実際の幼生分散では幼生の鉛直移動や海流により鉛直方向に輸送されることが想定されるため、今後より精度の高いモデリングにより幼生の 3 次元的な分散が再現されることが期待される。このような複雑な幼生分散のシミュレーションを行う為には前述の分散期間や幼生の行動等の幼生生態をより正確に把握することが必要である。このことはゴエモンコシオリエビだけではなく他の全ての熱水生物の分散研究に共通する課題であり、熱水種の飼育研究を強力に推進することが求められる。上記に加えて、本章の幼生分散モデリングでは年や季節ごとの海流の変化が考慮に入っていないという改善点が挙げられるため、今後複数の年や季節のシミュレーション結果を用いて幼生分散経路の時期的変動や再現性を確認する必要がある。また、本章では結果の議論がモデリングの結果のみに基づいて行われているため、今後の研究で環境データの観測地との比較を行い、本章で用いたモデリング結果を検証する必要があると言える。

総合考察

本研究では、日本の代表的な熱水噴出域である沖縄トラフの優占種であるゴエモンコシオリエビを対象として、本種の基礎生態と幼生分散機構の解明を目指した。従来の集団遺伝学的手法による解析（第1章）に加えて、新たに開発した加圧観察システムによる疑似現場環境下での幼生の行動観察（第2章）および海流モデルを用いた幼生分散のシミュレーション（第3章）を行った。ここでは、これらの結果を基にゴエモンコシオリエビの幼生分散メカニズムと各熱水域の集団の形成、およびその保全について議論する。

ゴエモンコシオリエビの幼生分散と地域集団の形成

熱水種の多くは、浮遊性卵または幼生を海洋へと放出し、その生活史初期をプランクトンとして過ごす (Van Dover *et al.* 2002)。一方で、熱水種の成体は餌を熱水域の化学合成細菌に強く依存しており (e.g. Watsuji *et al.* 2014)、長期間熱水域を離れて移動することはなく、集団の維持や地域集団間の移動には幼生期の分散が最も重要と考えられる。したがって、幼生分散メカニズムを解明することが、不連続な分布と環境の不安定性を特徴とする熱水域における生物多様性の生成・維持機構を理解するために必要不可欠である。

過去の熱水種の幼生分散に関する研究では、分布域間の水深の差や海嶺などの海底地形が分散障壁として働くことが報告されている (Vrijenhoek 2010 およびその引用文献)。第1章における沖縄トラフの熱水域におけるゴエモンコシオリエビのミトコンドリアDNA・COI 遺伝子の塩基配列に基づく集団遺伝学的解析により、本種では最大 646.5km 離れた7つの各地域集団の間にも活発な遺伝的交流があることが示された。この結果は、沖縄トラフ内の各熱水域の水深が 600m から 1600m と大きく異なるにも関わらず、本種の幼生が熱水域間を比較的自由に分散していることを示す。沖縄トラフの表層では北向きの黒潮が卓越するが、本種の幼生はこの海流に加え、南向きに流れる深層海流 (Andres *et al.* 2008; Nakamura 2008) を分散に利用しているものと推察された。しかし、集団遺伝学的解析のみでは幼生の分散がおこなわれている水深を特定するには至らなかった。

第2章の加圧実験では、10MPa (およそ 1000m 水深に相当) を越えた水圧下で本種の幼生に逃避行動と見られる腰折り運動が頻繁に観察された。この結果は、本種幼生が表層

から水深 1000m までの水圧環境を好むことを示唆しており、幼生分散もこの幼生にとって好適な水深帯で行われていると予想される。さらに、第 3 章の幼生分散モデリングでは、幼生の分散水深を水深 100m に設定した場合、放出された幼生 80%以上が 15 日以内に沖縄トラフ外に流出した。一方、水深 500m 以深に設定した場合には、放出された幼生の過半数が 30 日後も沖縄トラフ内に留まることが推定された。さらに、沖縄トラフには水深 500m から 800m の間に黒潮と深層海流という逆向きに流れる海流の境界があることが示された。この境界を含む水深帯の中では、幼生が水深や季節により異なる方向に流れる海流に輸送されることで、沖縄トラフの全ての分布域の地域集団間において双方向の遺伝的交流が実現すると考えられる。上記のゴエモンコシオリエビの集団遺伝学的・幼生生態学的な結果と日本周辺でのゴエモンコシオリエビの分布が沖縄トラフのみに限定されることを重ね合わせると、本種の幼生は水深 500m から 1000m の間の水深体を分散していると考えられる。日本周辺の深海化学合成群集の別の代表種であるオハラエビ *Alvinocaris longirostris* Kikuchi and Ohta, 1995 は沖縄トラフの熱水域に加えて相模湾初島沖の冷湧水域にも分布しているが、分子系統解析から幼生が表層の黒潮に乗り、沖縄トラフから相模湾まで分散すると推定されている (Tokuda *et al.* 2006)。同じく沖縄トラフに生息するエンセイオハラエビは遺伝的多様性が高く、高い分散能力を持つ事が示唆されている (Yahagi 2013)。エンセイオハラエビの生息域は沖縄トラフに限定されており、地理的に一番近い熱水域である伊豆・小笠原弧では見つかっていない。エンセイオハラエビの幼生は $1.0283 \pm 0.0018 \text{ g/cm}^3$ の密度を持ち、本章で作成した海水密度の鉛直分布と比較すると沖縄トラフの水深 450m から海底までの間 (平均的な密度を持つ幼生は 1500m 以深の水深) で中性浮力を取ると推定された (徐 未発表データ)。以上のことから、エンセイオハラエビは深層流に乗り、深い水深帯で分散すると考えられる。本研究の結果は、熱水種の幼生が表層海流と深層海流の両方を利用し分散することを初めて具体的なデータに基づいて示したものであり、また熱水域の生物群集が多様な幼生分散様式を持つ種から構成されている事を示唆するものである。

第 2 章の幼生の密度測定結果および第 3 章で示された沖縄トラフの海水密度の鉛直分布の比較から本種の幼生が海面に浮かぶ様な浮力を持つことが明らかになった。しかしながら、本種の幼生が孵出後に海面まで上昇し、完全に表層の黒潮に依存した分散を行うとすると、上で述べた様に大部分の幼生が沖縄トラフから流出し無効分散となることから、幼生は能動的な運動により分散する水深を選択していると考えられる。ゴエモンコシオリ

エビの卵と幼生が本研究で推定した幼生分散水深で中性浮力にならなかった原因として、以下の2つの可能性が考えられる。第一の可能性として、本研究では幼生段階による浮力の変化が挙げられる。卵や第Iゾエア幼生が表層付近に分布するとしても卵黄の消費により密度が増加し、トラフからの流出前に黒潮の輸送から脱する可能性も否定できない。第二に上述した様に、幼生が運動によって能動的に分布水深を選択する可能性が考えられる。能動的な運動によって幼生の分布水深が左右される一例として、本研究中に沖縄県恩納村沿岸の海岸から採取した浅海性巻貝類であるアマオブネ科貝類の一種が挙げられる。この種の幼生の密度測定を行ったところ、他の巻貝類幼生と同様に (e.g. Fuchs *et al.* 2004)、飽和した人工海水よりも重いことが確認された (徐 未発表データ)。このプランクトン幼生は重い貝殻を持つため全ての水深帯で負の浮力を持つが、飼育観察中は常に能動的な游泳運動によって海面付近に留まっていた。甲殻類幼生やプランクトン性カイアシ類では、多くの種で適した水深帯に留まることが知られており、集団での日周鉛直行動も確認されている (e.g. Shanks 1986; Neill 1990)。ゴエモンコシオリエビ幼生でも同様に能動的な運動による水深選択が行われていると考えられる。幼生の成長段階における浮力と行動の変化を明らかにするためには、本種の成体の飼育方法を確立し、健全な状態の幼生を陸上で継続的に得ることを可能にするとともに、幼生の飼育方法を確立して全成長段階の幼生の行動観察と密度測定を行うことが必要である。

日本周辺に分布する他の熱水種を対象とした過去の遺伝的集団解析結果と比較したところ (表 1-4)、本種の遺伝的多様性が、他の沖縄トラフの代表的な種に比べて高い値をとることが明らかとなった。Vrijenhoek (2010) の定義では、地域的な遺伝的偏りが少なく集団内の遺伝的多様性が高い熱水種は、新しくできたばかりの熱水域に初期段階から移入することができるパイオニア種 (先駆種) であるとされている。沖縄トラフは、約 200 万年前に大陸地殻が分裂して、海底に形成された大きな裂け目 (トラフ軸) の両側で新しい海底が生成されている背弧海盆であり (Kimura 1985; 藤倉ほか 2008)、現在まで海底拡大に伴う熱水活動が続いている。新たな熱水域が誕生すると、まず化学合成細菌やパイオニア種の幼生が定着する事で生物群集が成立し、これらが海底環境を改変する事で、次々と新しい種が加入して成熟した生物群集へと遷移していく (Mullineaux *et al.* 2012)。熱水鉱床開発による海底掘削の結果、一時的に海底が無生物化したり、新しい場所に熱水が噴出する可能性もあり、そうした場所における生物群集の再生・誕生過程の調査研究でゴエモンコシオリエビに着目したモニタリングが重要となるかもしれない。さらに、ゴエ

モンコシオリエビの抱卵メスが通年見られること、そして沖縄トラフの各熱水域における巨大なバイオマス(土田ほか 2003; 藤倉ほか 2008; Watanabe *et al.* 2010)を考えると、大量の本種幼生の海洋への供給が一年中行われていると考えられる。沖縄トラフ内において、ゴエモンコシオリエビの集団は単一のメタ個体群として存続してきたと考えられ、その圧倒的かつ持続的な幼生供給が熱水鉱床開発後の環境回復の原動力となる事が期待される。

沖縄トラフにおける熱水種の保全

一般的な深海底とは化学的・物理的環境が著しく異なる熱水域およびその周辺域には、多様な熱水種からなる化学合成生物群集が構築され、1970年代の発見以降、多くの研究者を魅了し続けて来た。熱水種の多くは熱水域の固有種であり、また化学合成細菌と細胞内あるいは細胞外共生して栄養を得るため、成体の生存には熱水環境が不可欠である。一方、各熱水域は不連続に存在し、環境の安定性が低く、生息地としての寿命が比較的短い(Vrijenhoek 2010)。このことから、卵や幼生の時に行なう分散が、成体の移動能力がほとんどない熱水種の集団形成や維持の主要因として注目され、これまでに数々の研究がおこなわれて来た(Vrijenhoek 2010)。しかし、熱水種の中には幼生形態や生態が知られていない種が多く、実際に熱水域から遠く離れた海洋中を浮遊している熱水種幼生が採集された例はほとんどない(Arellano *et al.* 2014)。そのため、各種の保全にとって必要不可欠な情報である幼生分散に関する過去の研究の多くは集団遺伝学的手法を用いた間接的な幼生分散量の推定であり、幼生生態に関する直接的な研究や海流等の海洋物理情報を考慮した複合的な幼生分散研究の事例は、まだ限られている(e.g. Marsh *et al.* 2001; Young *et al.* 2012)。本研究で示した様に、遺伝的・生理的・生態的手法を統合的に用い、主要な幼生分散を明らかにすることで、熱水鉱床に開発による環境影響を精度よく予測し、適切な保全指針をより効果的に作成できると期待される。

自然環境や生態系の保全を円滑に勧めるためには、研究者だけでなく一般の人々の理解と協力が必要不可欠であり、特定の種や集団という具体的な対象を決める事で、社会全体で円滑に保全活動に取り組む事が容易になる。海洋中には多様な生物が棲息しており、中でもマグロ等の食材として利用される魚介類やクジラやイルカ等の水棲哺乳類の存在は

広く知られている。また、陸上から遠く離れた深海底では一般に認知されている生物は多くないが、近年では鳥羽水族館のダイオウグソクムシが人気を集めるなど、深海生物の注目度が上がっている。その一方で、本研究の対象域である熱水噴出域に生息する熱水種はその存在が確認されたのが 1970 年代と歴史が浅いこともあり、一般の人々の認知度は高くない。その様な現状の中で、ゴエモンコシオリエビは沖縄トラフ内熱水域で卓越した生物量を持つ優占種であり、大型・白色で眼に付きやすい事に加えて近年水族館の展示やテレビ番組で特集が組まれる等、一般社会での露出の機会が増加している。熱水鉱床は人間の居住区から離れた深海に位置しており、開発目的の金属資源が食物の様に人々の生活に直接的に関係するものではないため、開発に対する関心が必ずしも高くないのが現状である。そのため、環境や生物の保全に十分に配慮されずに開発が進んでしまった場合、手遅れになるまでその影響に気づかない可能性も考えられる。その危険を回避するためには、熱水鉱床の開発が常に社会の眼にさらされる事が効果的であり、ゴエモンコシオリエビの様に社会的認知度が高く、親しみ易い種をアウトリーチ活動に活用する事が、沖縄トラフの生物多様性を保全する社会的推進力になるものと期待される。

本研究の意義

沖縄トラフの熱水噴出域の優占種の 1 つであり熱水噴出孔の最も近傍に生息するゴエモンコシオリエビは、日本を代表する熱水種である。それにも関わらず、他の多くの熱水種と同様に本種の生態や分散に関する知見は少なく、ひとつの熱水噴出域での自然条件下のあるいは人為的な環境変化が種全体の遺伝的多様性にどの程度影響してくるのかを予想することが困難な状況にある。本研究では、沖縄トラフ内の全生息域のゴエモンコシオリエビの遺伝的集団構造を解析することで本種の地域集団が幼生の高い分散能力によって密接に結びついていることを明らかにした。同時に、幼生生態と海洋物理情報を総合的に考察することで、本種の幼生の分散水深を絞り込むことができた。得られた知見は、沖縄トラフで近い将来予定されている海底熱水鉱床開発の環境アセスメントの際に有益な情報となるだけでなく、短いサイクルで誕生と衰退、消滅を繰り返す熱水噴出域に固有な種の個体群維持機構を解明する上でも重要な知見である。熱水域には数多くの固有種が生息しており、熱水種全体の保全を考えるにはより多くの熱水種の知見を蓄積するとともに、

得られたデータを統合して保全策を策定する方法論を確立する必要がある。自然環境下での熱水種幼生の採集や観察には困難が多いが、本研究で用いられた研究手法は他の熱水種に適用することが容易であり、今後の熱水種の幼生分散を研究する上で本研究の持つ意義は高い。熱水種の保全に関する研究は未だ途上にあるのが現状であるが、本研究を含めたこれまでの研究や、今後行なわれる研究が熱水種の遺伝的集団構造と幼生分散に対する理解を更に深め、将来的な開発や環境変動から熱水種を保全するのに役立つものと期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたって、終止に渡ってご指導ご鞭撻頂いた東京大学大学院新領域創成科学研究科／東京大学大気海洋研究所海洋生態系動態部門底生生物分野の小島茂明教授に深く感謝の意を表します。独立行政法人海洋研究開発機構（JAMSTEC）海洋・極限環境生物圏領域海洋生物多様性研究プログラムに所属する渡部裕美博士には、標本の扱いから部分塩基配列の決定までを丁寧にご指導頂きました。心より謝意を表します。北九州市立いのちのたび博物館に所属する下村通誉博士には、ゴエモンコシオリエビに寄生する等脚類の分類に関して丁寧にご指導頂いたことに感謝します。JAMSTEC 海洋・極限環境生物圏領域海洋生物多様性研究プログラムに所属する小山純弘博士と豊福高志博士には、加圧観察機器の開発に関して丁寧にご指導頂いたことに感謝します。同じく JAMSTEC 基幹研究領域深海・地殻内生物圏研究分野に所属する和辻智郎博士には、標本の提供や貴重な助言を頂き、浮力測定に関して丁寧にご指導頂いたことに感謝します。沖縄科学技術大学院大学（OIST）海洋生態物理学ユニットに所属する御手洗哲司博士には、海流モデリングの使用と MATLAB によるシミュレーション結果の再現に関して丁寧にご指導頂いたことに感謝します。東京大学大気海洋研究所海洋生態系動態部門底生生物分野に所属した学生の皆さま、そして底生ゼミに参加していた皆さまには、数多くの知識と助言を頂いただけでなく、日々の生活を共にする事で学生生活を魅力的なものにして頂きました。この場を借りて深く感謝の意を表します。最後に、いつも私の事を理解し、最後まで見守ってしてくれた両親と家族に感謝します。

なお、本論文中第 2 章の中の加圧観察機器の開発と試運転に関する部分は *Zoological Science* 誌 (Seo *et al.* 2013) に掲載済みの内容です。博士論文の一部として使用するに当たり許可を頂いた小山純弘博士、豊福高志博士、小島茂明教授および渡部裕美博士には、格別の感謝を申し上げます。

引用文献

- Ahyong, S. T. (2014): Deep-sea squat lobsters of the *Munidopsis serricornis* complex in the Indo-West Pacific, with descriptions of six new species (Crustacea: Decapoda: Munidopsidae). *Records of the Australian Museum* 66, 197–216.
- Andres, M., Park, J. H., Wimbush, M., Zhu, X. H., Chang, K. I. and Ichikawa, H. (2008): Study of the Kuroshio/ Ryukyu Current System based on satellite altimeter and *in situ* measurements. *Journal of Oceanography* 64, 937–950.
- Anger, K. (2006): Contributions of larval biology to crustacean research: a review. *Invertebrate Reproduction & Development* 49, 175–205.
- Arellano, S. M., Van Gaest, A. L., Johnson, S. B., Vrijenhoek, R. C. and Young, C. M. (2014): Larvae from deep-sea methane seeps disperse in surface waters. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281, 20133276. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.3276>.
- Arrieta, J. M., Arnaud-Haond, S., and Duarte, C. M. (2010): What lies underneath: conserving the oceans' genetic resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 18318–18324.
- Baba, K., Fujita, Y., Wehrmann, I. S., and Scholtz G. (2011): Developmental biology of squat lobsters. *In*: Poore, G., Ahyong, S., and Taylor, J. ed. *The biology of squat lobsters*. CRC Press, Florida, pp.105–148.
- Baba, K. and Williams, A. B. (1998): New Galatheoidea (Crustacea, Decapoda, Anomura) from hydrothermal systems in the West Pacific Ocean: Bismark Archipelago and Okinawa Trough. *Zoosystema* 20, 143–156.
- Bourns, B., Franklin, S., Cassimeris, L., Salmon, E. D. (1988): High hydrostatic pressure effects *in vivo*: changes in cell morphology, microtubule assembly, and actin organization. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 10, 380–390.
- Chan, T. Y., Lee, D. A. and Lee, C. S. (2000): The first deep-sea hydrothermal animal reported from Taiwan: *Shinkaia crosnieri* Baba and Williams, 1998 (Crustacea: Decapoda: Galatheoidea). *Bulletin of Marine Science* 67, 799–804.
- Clement, M., Posada, D. and Crandall, K. A. (2000): TCS: A computer program to

- estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657–1659.
- Coscia, I., Robins, P. E., Porter, J. S., Malham, S. K. and Ironside J. E. (2013): Modelled larval dispersal and measured gene flow: seascape genetics of the common cockle *Cerastoderma edule* in the southern Irish Sea. *Conservation Genetics* 14, 451–466.
- Croghan, P. C. (1958): The mechanism of osmotic regulation in *Artemia salina* (L.): the physiology of the branchiae. *Experimental Biology* 35, 234–242.
- Desbruyères, D., Segonzac, M. and Bright, M. (2006): Handbook of deep-sea hydrothermal vent fauna, second edition. State Museum of Upper Austria. Linz. 544 pp.
- 独立行政法人石油天然ガス・金属鉱物資源機構 (2009) : 海底熱水鉱床の賦存状況及び鉱物特性について 資料 3. 独立行政法人石油天然ガス・金属鉱物資源機構, 8 pp.
- Dupont, S., Wilson, K., Obst, M., Sköld, H., Nakano, H. and Thorndyke M. C. (2007): Marine ecological genomics: when genomics meets marine ecology. *Marine Ecology Progress Series* 332, 257–273.
- Fisher, C. R. (1990): Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates. *Reviews in Aquatic Sciences* 2, 399–436.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R. (1994): DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, 294–299.
- France, S. C., Hessler, R. R. and Vrijenhoek, R. C. (1992): Genetic differentiation between spatially-disjunct populations of the deep-sea, hydrothermal vent-endemic amphipod *Ventiella sulfuris*. *Marine Biology* 114, 551–559.
- Fuchs, H. L., Mullineaux, L. S. and Solow, A. R. (2004): Sinking behavior of gastropod larvae (*Ilyanassa obsoleta*) in turbulence. *Limnology and Oceanography* 49, 1937–1948.
- 藤倉克則, 奥谷喬司, 丸山正 (2008) : 潜水調査船が観た深海生物 : 深海生物研究の現在. 東海大学出版会, 512 pp.
- Fujita, Y., Baba, K. and Shokita, S. (2003) Larval development of *Galathea amboinensis* (Decapoda: Anomura: Galatheidae) under laboratory conditions.

Crustacean Research 32, 79–97.

- George, R. Y. (1984): Ontogenetic adaptations in growth and respiration of *Euphausia superba* in relation to temperature and pressure. *Journal of Crustacean Biology* 4, 252–262.
- Goudet, J., Raymond, M., de Meeus, T. and Rousset, F. (1996): Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 144, 1933–1940.
- Holm, N. G. and Hanneb, R. J. G (1992): Hydrothermal systems: their varieties, dynamics, and suitability for prebiotic chemistry. *In*: Holm, N. G. ed. *Marine Hydrothermal Systems and the Origin of Life*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.15–32.
- Hurtado, L. A., Lutz, R. A. and Vrijenhoek, R. C. (2004): Distinct patterns of genetic differentiation among annelids of eastern Pacific hydrothermal vent. *Molecular Ecology* 13, 2603–2615.
- 飯笹幸吉 (2010) : 日本近海に大鉱床が眠る. 技術評論社, 214 pp.
- Ishii, A., Sato, T., Wachi, M., Nagai, K., Kato, C. (2004): Effects of high hydrostatic pressure on bacterial cytoskeleton FtsZ polymers in vivo and in vitro. *Microbiology* 150, 1965–1972.
- Juniper, S. K. and Tunnicliffe, V. (1997): Crustal accretion and the hot vent ecosystem. *Philosophical Transactions: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 255, 459–474.
- Kelly, R. H. and Yancey, P. H. (1999): High contents of trimethylamine oxide correlating with depth in deep-sea teleost fishes, skates, and decapod crustaceans. *The Biological Bulletin* 196, 18-25.
- Kimura, M. (1985): Back-arc rifting in the Okinawa Trough. *Marine and Petroleum Geology* 2, 222–240.
- Kojima, S. (2010): Extensive mitochondrial genome rearrangements between *Cerithioidea* and *Hypsogastropoda* (Mollusca; Caenogastropoda) as determined from the partial nucleotide sequences of the mitochondrial DNA of *Cerithidea djadjariensis* and *Batillaria cumingi*. *Zoological Science* 27, 494–498.
- Kojima, S., Ohta, S., Yamamoto, T., Miura, T., Fujiwara, Y., Fujikura, K. and

- Hashimoto, J. (2002): Molecular taxonomy of vestimentiferans of the Western Pacific and their phylogenetic relationship to species of the Eastern Pacific. II. Families Escarpiidae and Arcovestiidae. *Marine Biology* 141, 57–64.
- Kojima, S., Ohta, S., Yamamoto, T., Yamaguchi, T., Miura, T., Fujiwara, Y., Fujikura, K. and Hashimoto, J. (2003): Molecular taxonomy of vestimentiferans of the western Pacific, and their phylogenetic relationship to species of the eastern Pacific III. *Alaysia*-like vestimentiferans and relationships among families. *Marine Biology* 142, 625–635.
- Kojima, S., Fujikura, K. and Okutani, T. (2005): Genetic differentiation of *Calyptogena* bivalves between seep areas off central Honshu and hydrothermal vent fields in the Okinawa Trough. *Venus* 64, 45–53.
- Kojima, S., Tsuchida E., Numanami, H., Fujikura, K. and Okutani, T. (2006): Synonymy of *Calyptogena solidissima* with *Calyptogena kawamurai* (Bivalvia: Vesicomysidae) and its population structure revealed by mitochondrial DNA sequences. *Zoological Science* 23, 835–842.
- Koschinsky, A., Garbe-Schönberg, D., Sander, S., Schmidt, K., Gennerich, H. and Strauss, H. (2008): Hydrothermal venting at pressure-temperature conditions above the critical point of seawater, 5°S on the Mid-Atlantic Ridge. *Geology* 36, 615–618.
- Koyama, S. (2007): Cell biology of deep-sea multicellular organisms. *Cytotechnology* 55, 125–133.
- Koyama, S., Miwa, T., Sato, T. and Aizawa, M. (2001): Optical chamber system designed for microscopic observation of living cells under extremely high hydrostatic pressure. *Extremophiles* 5, 409–415.
- Koyama, S., Kobayashi, H., Inoue, A., Miwa, T. and Aizawa, M. (2005): Effects of the piezo-tolerance of cultured deep-sea eel cells on survival rates, cell proliferation, and cytoskeletal structures. *Extremophiles* 9, 449–460.
- Landau, J. V. (1961): The effects of high hydrostatic pressure on human cells in primary and continuous culture. *Experimental Cell Research* 23, 538–548.
- MacDonald, A. G. (1992): Effects of high hydrostatic pressure on natural and artificial

- membranes. *In*: Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, P. eds. High Pressure and Biotechnology. John Libbey Eurotext, London, pp.65–75.
- MacDonald, K. C. (1998) Linkages between faulting, volcanism, hydrothermal activity and segmentation on fast spreading centers. *In*: Buck, W., Delaney, P., Karson, J. and Lagabriele, Y. eds. Faulting and Magmatism at Mid-Ocean Ridge. American Geophysical Union, Washington D.C., pp.27–58.
- Macpherson, E. and Segonzac, M. (2005): Species of the genus *Munidopsis* (Crustacea, Decapoda, Galatheidae) from the deep Atlantic Ocean, including cold-seep and hydrothermal vent areas. *Zootaxa* 1095, 1–60.
- Marsh, A. G., Mullineaux, L. S., Young, C. M. and Manahan, D. T. (2001): Larval dispersal potential of the tubeworm *Riftia pachyptila* at deepsea hydrothermal vents. *Nature* 411, 77–80.
- Miljutin, D. M., Miljutina, M. A., Arbizu, P. M. and Galéron, J. (2011): Deep-sea nematode assemblage has not recovered 26 years after experimental mining of polymetallic nodules (Clarion-Clipperton Fracture Zone, Tropical Eastern Pacific). *Deep-Sea Research I* 58, 885–897.
- Minic, Z. and Thongbam, P. D. (2011): The biological deep sea hydrothermal vent as a model to study carbon dioxide capturing enzyme. *Marine Drugs* 9, 719–738.
- Miyake, H., Tsukahara, J., Hashimoto, J., Uematsu, K. and Maruyama, T. (2006): Rearing and observation methods of vestimentiferan tubeworm and its early development at atmospheric pressure. *Cahiers de Biologie Marine* 47, 471–475.
- Miyake, H., Kitada, M., Tsuchida, S., Okuyama, Y. and Nakamura, K. (2007): Ecological aspects of hydrothermal vent animals in captivity at atmospheric pressure. *Marine Ecology* 28, 86–92.
- Miyazawa, Y., Zhang, R., Guo, X., Tamura, H., Ambe, D., Lee, J. S., Okuno, A., Yoshinari, H., Setou, T. and Komatsu K. (2009): Water mass variability in the western North Pacific detected in a 15-year eddy resolving ocean reanalysis. *Journal of Oceanography* 65, 737–756.
- Mullineaux, L. S., Bris, N. L., Mills, S. W., Henri, P., Bayer, E. R., Secrist, R. G. and Siu, N. (2012): Detecting the influence of initial pioneers on succession at deep-sea

- vents. PLoS ONE 7, e50015.
- Nakagawa, S. and Takai, K. (2008): Deep-sea vent chemoautotrophs: diversity, biochemistry, and ecological significance. *FEMS Microbiology Ecology* 65, 1–14.
- Neill, W. E. (1990): Population variation in the ontogeny of predator-induced vertical migration of copepods. *Nature* 356, 54–57.
- Nussbaumer, A. D., Fisher, C. R. and Broght, M. (2006): Horizontal endosymbiont transmission in hydrothermal vent tubeworms. *Nature*, 441: 345–348.
- Oda, H. (2007): Tectonics of Okinawa Trough and Ryukyu Arc in terms of GPS and paleomagnetism. *Chishitsu News* 633, 31–36.
- Oliphant, A., Thatje, S., Brown, A., Morini, M., Ravaux, J. and Shillito, B. (2011): Pressure tolerance of the shallow-water caridean shrimp *Palaemonetes varians* across its thermal tolerance window. *Journal of Experimental Biology* 214, 1109–1117.
- Osawa, M., Lin, C. W. and Chan, T. Y (2008): Species of *Galacantha* and *Munidopsis* (Crustacea: Decapoda: Anomura: Galatheididae) from the deep-waters off Taiwan, with the description of two new species. *Scientia Marina* 72, 37–57.
- Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., Stice, L. and Grabowski, G. (1991): The simple fool's guide to PCR, version 2.0. Department of Zoology and Kowalo Marine Laboratory, University of Hawaii, Honolulu. 44 pp.
- Paulay, G. and Meyer, C. (2006): Dispersal and divergence across the greatest ocean region: Do larvae matter? *Integrative and Comparative Biology* 46, 269–281.
- Pérez-Barros, P., Thatje, S., Calcagno, J. A., and Lovrich, G. A. (2007): Larval development of the subantarctic squat lobster *Munida subrugosa* (White, 1847) (Anomura: Galatheididae), reared in the laboratory. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 352, 35–41.
- Raymond, M. and Rousset, F. (1995): An exact test for population differentiation. *Evolution* 49, 1280–1283.
- Ramirez-Llodra, E., Shank, T. M. and German, C. R. (2007): Biodiversity and biogeography of hydrothermal vent species. *Oceanography* 20, 30–41.
- R Core Team (2012): R: A language and environment for statistical computing. R

- Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.R-project.org/>
- Robinson, N. J., Thatje, S., Osseforth, C. (2009): Heartbeat sensors under pressure: a new method for assessing hyperbaric physiology. *High Pressure Research* 29, 422–430.
- Rogers, A. R. and Harpending, H. (1992): Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9, 552–569.
- Schneider, S., Roessli, D. and Excoffier, L. (2000): ARLEQUIN, a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva.
- Schweitzer, C. E., Feldmann, R. M. (2008): New Eocene hydrocarbon seep decapod crustacean (Anomura: Galatheidae: Shinkaiinae) and its paleobiology. *Journal of Paleontology* 82, 1021–1029.
- 徐美恵 (2011) : 沖縄トラフ熱水噴出域の生物多様性保全に関する研究 ～ゴエモンコシオリエビを指標として～. 東京大学大学院新領域創成科学研究科修士論文. 30 pp.
- Seo, M., Koyama, S., Toyofuku, T., Kojima, S. and Watanabe, H. (2013): Determination of extremely high pressure tolerance of brine shrimp larvae by using a new pressure chamber system. *Zoological Science* 30, 919–923.
- Shanks, A. L. (1986): Tidal periodicity in the daily settlement of intertidal barnacle larvae and an hypothesized mechanism for the cross-shelf transport of cyprids. *Biological Bulletin* 170, 429–440.
- Shillito, B., Jpllivet, D., Sarradin, P. M., Rodier, P., Lallier, F., Desbruyères, D. and Gaill, F. (2001): Temperature resistance of *Hesiolyra bergi*, a polychaetous annelid living on deep-sea vent smoker walls. *Marine Ecology Progress Series* 216, 141–149.
- Shirayama, Y. and Fukushima, T. (1997): Responses of a meiobenthos community to rapid resedimentation. *In*: Metal Mining Agency of Japan ed. *Proceedings of International Symposium on Environmental Studies for Deep-Sea Mining*, pp.187–196.
- Somero, G. N. (1990): Life at low volume change: Hydrostatic pressure as a selective

- factor in the aquatic environment. *American Zoologist* 30, 123–135.
- Stuart, C. T. and Rex, M. A. (1994): The relationship between developmental pattern and species diversity in deep-sea prosobranch snails. *In*: Young, C. M. and Eckelbarger, K. J. eds. *Reproduction, Larval Biology and Recruitment in the Deep-Sea Benthos*. Columbia University Press, New York, 118–136.
- Thatje, S., Casburn, L. and Calcagno, J. A. (2010): Behavioural and respiratory response of the shallow-water hermit crab *Pagurus cuanensis* to hydrostatic pressure and temperature. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology* 390, 22–30.
- Tokuda, G., Yamada, A., Nakano, K., Arita, N. and Yamasaki, H. (2006): Occurrence and recent long-distance dispersal of deep-sea hydrothermal vent shrimps. *Biology Letters* 2, 257–260.
- 土田真二, 藤原義弘, 藤倉克則 (2003): 南部沖縄トラフに生息するゴエモンコシオリエビ *Shinkaia crosnieri* (十脚目: 異尾下目: コシオリエビ科) の分布と個体群構造. *日本ベントス学会誌* 58, 84–88.
- Tsuchida, S., Fujiwara, Y. and Fujikura, K. (2003): Distribution and population structure of the galatheid crab, *Shinkaia crosnieri*, in the southern Okinawa Trough. *Japanese Journal of Benthology* 58, 69–76.
- Tsuchida, S., Suzuki, Y., Fujiwara, Y., Kawato, M., Uematsu, K., Yamanaka, T., Mizota, C. and Yamamoto, H. (2010): Epibiotic association between filamentous bacteria and the vent-associated galatheid crab, *Shinkaia crosnieri* (Decapoda: Anomura). *Journal of the Marine Biology Association of the United Kingdom*, 1–10.
- 土田真二, 鈴木康平, 藤原義弘, 山本啓之, 河戸勝, 植松勝之, 三宅裕志 (2007): ゴエモンコシオリエビの腹部剛毛に付着するバクテリアの特異性について. 第 23 回しんかいシンポジウム予稿集, 117.
- Tyler, P. A. and Young, C. M. (1998): Temperature and pressure tolerances in dispersal stages of the genus *Echinus* (Echinodermata: Echinoidea): prerequisites for deep-sea invasion and speciation. *Deep-Sea Research Part II* 45, 253–277.
- Van Dover, C. L. (2000) *The Ecology of Deep-Sea Hydrothermal Vents*. Princeton

- University Press. Princeton, New Jersey. pp. 424.
- Van Dover, C. L. (2011): Mining seafloor massive sulphides and biodiversity: what is at risk? *ICES Journal of Marine Science* 68, 341–348.
- Van Dover, C. L., German, C. R., Speer, K. G., Parson, L. M. and Vrijenhoek, R. C. (2002): Evolution and Biogeography of Deep-Sea Vent and Seep Invertebrates. *Science* 295, 1253.
- Van Dover, C. L., Smith, C. R., Ardron, J., Arnaud, S., Beaudoin, Y., Bezaury, J., Boland, G., Billett, D., Carr, M., Cherkashov, G., Cook, A., DeLeo, F., Dunn, D., Fisher, C. R., Godet, L., Gjerde, K., Halpin, P., Levin, L., Lodge, M., Menot, L., Miller, K., Milton, D., Naudts, L., Nugent, C., Pendleton, L., Plouviez, S., Rowden, A., Santos, R., Shank, T., Smith, S., Tao, C., Tawake, A., Thurnherr, A., Treude, T. (2011): Environmental management of deep-sea chemosynthetic ecosystems: justification of and considerations for a spatially-based approach. ISA Technical study; no. 9. International Seabed Authority, Kingston, Jamaica, 90 pp.
- Vance, R. R. (1973): More on reproductive strategies in marine benthic invertebrates. *American Naturalist* 107: 353-361.
- Vass, H., Black, S. L., Herzig, E. M., Ward, F. B., Clegg, P. S., Allen, R. J. (2010): A multipurpose modular system for high-resolution microscopy at high hydrostatic pressure. *Review of Scientific Instruments* 81, 053710.
- Vrijenhoek, R. C. (2010): Genetic diversity and connectivity of deep-sea hydrothermal vent metapopulations. *Molecular Ecology* 19, 4391–4411.
- Watanabe, H., Tsuchida, S., Fujikura, K., Yamamoto, H., Inagaki, F., Kyo, M. and Kojima, S. (2005): Population history associated with hydrothermal vent activity inferred from genetic structure of neoverrucid barnacles around Japan. *Marine Ecology Progress Series* 288, 233–240.
- Watanabe, H., Kado, R., Kaida, M., Tsuchida, S. and Kojima, S. (2006): Dispersal of vent-barnacle (genus *Neoverruca*) in the Western Pacific. *Cahiers de Biologie Marine* 47, 353–357.
- Watanabe, H., Fujikura, K., Kojima, S., Miyazaki, J. and Fujiwara Y. (2010): Japan: vents and seeps in close proximity. *In*: Kiel, S. ed. *The vent and seep biota: Aspects*

- from microbes to ecosystems. Springer, Heidelberg, pp.379–402.
- Watanabe, H., Seo, E., Takahashi, Y., Yoshida, T., Kojima, S., Fujikura, K. and Miyake, H. (2012): Spatial distribution of sister species of vesicomid bivalves *Calyptogena okutanii* and *Calyptogena soyoae* along an environmental gradient in chemosynthetic biological communities in Japan. *Journal of Oceanography* 69, 129–134.
- Watsuji, T., Nakagawa, S., Tsuchida, S., Toki, T., Hirota, A., Tsunogai, U. and Takai, K. (2010): Diversity and function of epibiotic microbial communities on the galatheid crab, *Shinkaia crosnieri*. *Microbes and Environment* 25, 288–294.
- Watsuji, T., Yamamoto, A., Motoki, K., Ueda, K., Hada, E., Takaki, Y., Kawagucci, S. and Takai, K. (2014): Molecular evidence of digestion and absorption of epibiotic bacterial community by deep-sea crab *Shinkaia crosnieri*. *The ISME Journal*, doi:10.1038/ismej.2014.178.
- Welch, T. J., Farewell, A., Neidhardt, F. C. and Bartlett, D. H. (1993): Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure. *Journal of bacteriology* 175, 7170–7177.
- Wilcock, S. E., Wann, K. T. and MacDonald, A. G. (1978): The motor activity of *Crangon crangon* subjected to high hydrostatic pressure. *Marine Biology* 45, 1–7.
- 矢萩拓也(2013): 北大西洋深海熱水噴出域に生息するオハラエビ類の生物地理学および集団遺伝学的研究. 東京大学大学院新領域創成科学研究科修士論文. 42 pp.
- Yancey, P. H. (2005): Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *The Journal of Experimental Biology* 208, 2819–2830.
- Yancey, P. H., Rhea, M. D., Kemp, K. M. and Bailey, D. M. (2004): Trimethylamine oxide, betaine and other osmolytes in deep-sea animals: depth trends and effects on enzymes under hydrostatic pressure. *Cellular and Molecular Biology* 50, 371–376.
- Yang, J. S., Lu, B., Chen, D.F., Yu, Y.Q., Yang, F., Nagasawa, H., Tsuchida, S., Fujiwara, Y. and Yang, W.J. (2013): When did decapods invade hydrothermal vents? Clues from the western Pacific and Indian Oceans. *Molecular Biology and*

Evolution 30, 305–309.

頼末武史 (2009) :日本周辺の熱水噴出域に生息するマリアナイトエラゴカイの分散と沖縄トラフにおけるイトエラゴカイの未記載種の報告. 東京大学大学院新領域創成科学研究科修士論文. 44 pp.

Yorisue, T. (2013): Morphological, ecological, and molecular studies on the larval settlement of thoracican barnacles. A dissertation for degree of doctor of philosophy in environment. Graduate School of Frontier Sciences, the University of Tokyo. 97 pp.

Yoshiki, T., Toda, T., Yoshida, T. and Shimizu, A. (2006): A new hydrostatic pressure apparatus for studies of marine zooplankton. *Journal of Plankton Research* 28, 563–570.

Young, C. M., He, R., Emlet, R. B., Li, Y., Qian, H., Arellano, S. M., Van Gaest, A., Bennett, K. C., Wolf, M., Smart, T. I. and Rice, M. E. (2012): Dispersal of deep-sea larvae from the intra-American seas: simulations of trajectories using ocean models. *Integrative & Comparative Biology* 52,483–496.

Zimmerman, A. M. (1970): High pressure effects on cellular processes. Academic Press, New York–London, pp. 324.

Appendix

**A NEW SPECIES OF BOPYRID ISOPOD INFESTING *SHINKAIA CROSNIERI*
(DECAPODA: GALATHEIDAE) FROM HYDROTHERMAL VENTS IN THE
OKINAWA TROUGH, JAPAN, WITH NOTES ON ITS ECOLOGY**

Abstract

A new species of parasitic bopyrid isopod, *Pseudione goemonicola* n. sp., has been found on the galatheid crab *Shinkaia crosnieri*, collected at a depth of 982 m in the Okinawa Trough, Japan. This is the first bopyrid parasite found at a hydrothermal vent. The new species resembles other species of the genus *Pseudione*, based on morphological details and host selection. Females and males of the new species are compared with 51 species and 2 subspecies of genus *Pseudione*; the female differs from the most similar species, *P. intermedia*, by its broad frontal lamina, distinct coxal plate, and shorter fusiform uropods. Of 555 specimens of *S. crosnieri* collected from 6 regions in the Okinawa Trough, the rate of parasitism ranged from 0.00% to 6.06% with an average rate of parasitism of 1.62%, which is within the typical infestation rate of bopyrid parasites. The difference in infestation rate is most remarkable when hydrothermal vents are grouped into 2 areas, the Mid-Okinawa Trough and the South-Okinawa Trough; the rate of infestation was significantly greater in the former than the latter (Fisher's exact test, $P < 0.05$). Moreover, a disproportionately greater number of infestations in female hosts was observed, although the difference was not significant (Fisher's exact test, $P = 0.195$). The uneven tendencies in infestation locality and host sex are potentially attributable to the disproportionate distribution and host selection of *P. goemonicola*.

Keywords:

Bopyridae, deep-sea, hydrothermal vent, parasite ecology, *Pseudione*, *Shinkaia crosnieri*

Introduction

Parasitism is one of most abundant forms of living organisms. Parasites affect host populations by causing unwilling symptoms and death, limiting fecundity (Shields and Gómez-Gutierrez, 1996; Calado et al., 2005; Hernáez et al., 2009; McDermott et al., 2010), and sometimes promoting co-evolution through interactions with hosts' defense mechanisms. As a result of their ecological importance, many studies have investigated parasitic organisms and their mechanisms in every environment, including on land, in oceans and lakes, and inside human bodies. However, the study of parasitism is not well developed in one of the most extreme environments: the oceans' deep-sea hydrothermal vents. Hydrothermal vents are environments in which chemical-containing hydrothermal fluid gushes from the sea floor, controlled by magmatic activities and geochemical interactions between heated seawater and surrounding rocks. Although many chemicals contained in the hydrothermal fluid, such as hydrogen sulfide and heavy metals, are thought to be toxic to aquatic organisms, high biomasses of chemosynthetic communities have been found around many vents since their discovery in the 1970s. Despite the fact that the unique environment and biological diversity of communities at hydrothermal vents are highly interesting to many fields of science, few parasitic species have been reported in hydrothermal environments, to date. It has been pointed out that this relatively low parasite richness is due to the lack of study effort itself (Buron and Morand, 2004).

The Bopyridae is a parasitic family that is known to have the highest diversity among all parasitic isopods in the North West Pacific, the East Asian Sea, and the Central Indian Ocean (Williams and Boyko, 2012). The family includes 601 described species, which fall into 161 genera, primarily based on their morphological features (Boyko and Schotte, 2012). Despite the worldwide diversity of the Bopyridae, a very limited number of bopyrid species have been found in the deep sea, and no species has been located in a hydrothermal vent

environment (Buron and Morand, 2004). In this study, we describe a new species of parasitic isopod found from a hydrothermal vent endemic squat lobster, *Shinkaia crosnieri* Baba and Williams, 1998.

Material and Methods

A total of 555 specimens of *Shinkaia crosnieri* were collected from 6 hydrothermal vent sites in the Okinawa Trough, Japan, using the submersible ‘Shinkai 2000 (2K)’ and the remotely operated vehicle (ROV) ‘HyperDolphin (HPD)’ during cruises of research vessels *Natsushima* and *Kaiyo* operated by the Japanese Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC). Dive numbers, sampling localities, numbers of examined specimens, and fixation methods are given in Table 1. Symptoms of parasitism were carefully noted by testing carapace deformation of each collected specimen. If symptoms were found, the carapace was removed carefully, and infesting parasites were removed for morphological observations. Nine specimens bore bopyrid parasites. Length, sex, size of parasite lump (carapace deformation caused by infestation), and rate of parasitism of each population were recorded for the host, while length, width, morphology, and shapes of major appendages were recorded for male and female parasitic isopods. Morphological and anatomical observations were made under a dissecting microscope. The length of the host is given as carapace length, from tip of rostrum to the posterior margin of the carapace, following the definition of Baba and Williams (1998), and the length of the parasitic isopod is given as the distance from the anterior margin to the posterior margin of the body outline.

Systematics

Bopyridae Rafinesque-Schmaltz, 1815

Pseudioninae R. Codreanu, 1967

Pseudione Kossmann, 1881

Pseudione goemonicola Seo, Shimomura, Kojima, n. sp.

Figs. 1–3

Materials Examined.—Holotype female and allotype male were obtained from the branchial chamber of female *Shinkaia crosnieri* collected by Tomoo Watsuji, on February 15, 2011, on board the R/V *Kaiyo*, HPD#1247, at North Knoll of the Iheya Ridge in the Okinawa Trough. The type specimens of the new species were deposited in the National Museum of Nature and Science (NMNS) under NSMT-X-XXXXX. Paratypes were deposited under NSMT-X-XXXXX.

Description of the female.—Body length 7.83 mm; maximal width at third pereiomere; outline riziform, only slightly distorted to right; all body margins separated and slightly curved. Head (Fig. 1a) 1.36 times as broad as long, with large frontal lamina; frontal margin of lamina rounded; anterolateral border of cephalon rounded. Antennula (Fig. 2a) tri-segmented; basal segment large, sub-quadrate; second segment small, sub-cylindrical, short setae on distal end; third segment small, sub-pyramidal, a tuft of obscure short setae on tip. Antenna (Fig. 2a) 5-segmented, basal segment large; segments 2–4 sub-cylindrical; terminal segment with a tuft of obscure short setae on tip. Maxilliped (Fig. 2b, 2c) upside-down pyriform shape, lateral margin smooth and curved, lining of short setae along anterolateral border; pulp 2-segmented, first segment sub-quadrate, second segment small, setose. Barbula (Fig. 2b) with a pair of big fleshy lamellae and two pairs of short triangular projections in middle region. Eyes and pigmentation absent.

Pereiomerites (Fig. 1a, 1b) dorsally, ventrally and laterally distinct; pereiomeres 1–4 produced into distinct dorsolateral bosses; coxal plates on pereiomeres 1–4 distinct; tergal projections on pereiomeres 1–5 obscure, separated with incomplete groove. Oostegites (Fig. 2e, 2f) different in shape, almost enclosing entire brood pouch on the right side, loosely covering the brood pouch on the left side with gaps between oostegites 3–5; first oostegite 2-segmented, relatively small, partly covering front of cephalon and barbula; anterior segment rounded; posterior segment paddle-shape, both segments curved inward; oostegites 2–5 different in size, increasing in size posteriorly, loosely overlapping opposite ones; fifth oostegite extending across posterior border of brood pouch. Pereiopods (Fig. 2g, 2h) almost isomorphic, increasing only slightly in size posteriorly.

Pleon (Fig. 2i) of six distinct pleomeres; lateral plates on both side simple and rounded, pointed backward; sixth segment small, spherical; uropods on posterolateral side of pleotelson, uniramous, spherical. Five pairs of biramous foliaceous pleopods (Fig. 2j), decreasing in size posteriorly (Fig. 2i), exopods protruding only slightly from edges on both sides.

Description of the male.—Body length 4.7 mm; maximal width at fourth pereiomere; front head (Fig. 1c) semi-circular; body (Fig. 1c, d) elongated, clearly segmented dorsally, ventrally, and laterally. Antennula (Fig. 2k) 3-segmented; basal segment spherical; second segment sub-cylindrical; distal segment small, with a tuft of obscure short setae on tip. Antenna (Fig. 2k) 4-segmented; first segment sub-spherical, second and third segments semi-cylindrical, with a fringe of obscure short setae on border of fourth segment; terminal segment finger shape, with a tuft of obscure short setae on tip. Thin and long pulp of maxilliped with a tuft of short setae on tip (Fig. 2l). Eyes and pigmentation absent. Pereiopods 1–7 (Fig. 2m, 2n) uncarinated, nearly isomorphic except size of dactyli; basis

slightly larger than ischium; merus small; carpus small; propodus semi-oval; dactylus pointy. Dactyli on pereopods 1–2 larger than ones on pereopods 3–7. Pleomeres (Fig. 1c, 1d, 2o) decreasing in width posteriorly, with a pair of cone-shape pleopods on pleomere 1–5; simple uropods at ventrolateral end of sixth pleomere (Fig. 2o), semi-spherical; midventral portions protrude ventrally in triangle, but without distinct midventral tubercles; without anal cone.

Variation of the paratypes.—For one of the female paratypes (Fig. 3a, 3b; sampleID XXXXXX), body length 11.4 mm. Unlike holotype, female outline sub-ovoid, slightly distorted to left; pereiomeres 1–2 produced into distinct dorsolateral bosses; coxal plates on pereiomeres 1–6 distinct; barbula (Fig. 3e) with a pair of big fleshy lamellae with irregular blunt projections in middle region. The female paratype holding epicaridean larvae under oostegites, hatched eggshells attached on last segments, approximately 410 μ m in length. For male paratype (Fig. 3c, 3d; sampleID XXXXXX), body length 5.7 mm. Unlike allotype, pleopods sub-spherical on pleomere 1–4, pleopod obscure on pleomere 5.

Etymology.—From the Japanese common name of host species *Goemon-koshioriebi* (*Shinkaia crosnieri*), and the Latin suffix *-cola* meaning “to inhabit, to live in,” in reference to the endoparasite.

Common name.—Goemon-no-tankobu (new Japanese name).

Host.—Hydrothermal vent galatheid crab, *Shinkaia crosnieri*.

Type Locality.—North Knoll of the Iheya Ridge, the Okinawa Trough.

Discussion

Among morphological variations between the holotype and paratype, a few variations are mostly attributed to unfavorable handling. For example, the body outline of the holotype female is riziform in the line diagram (Fig. 1a, 1b) while the outline of the paratype female is sub-ovoid (Fig. 3a, 3b). The riziform outline of the holotype was a result of lateral compression with tweezers during handling, and the original body shape was sub-ovoid like the paratype female (Fig. 4b, 4d). In addition, variations in the barbula are a result of damage to the paratype female when the maxilliped was removed, as indicated by the dashed line in the line diagram (Fig. 3e). Although irregular blunt projections were observed in the middle region of the paratype female, it is difficult to state there was no damage during handling in the middle region of the barbula. On the other hand, the barbula of the holotype was intact and reliable as the original morphology.

According to the classification key by Markham (1985), mature females of this parasite were classified into the subfamily Pseudioninae R. Codreanu, 1967. As one of the classification key morphologies, the subfamily Pseudioninae has oostegites completely enclosing the brood pouch in mature females (Markham, 1985). Although the oostegites of examined females were partly open, with gaps between oostegites 3–5, the degree of gap width varied, from a narrow slit to halfway open, depending on the developmental stage of their embryos. For example, the embryos of some brooding paratypes were in just-hatched larval form with hatched eggshell attached to the last segment (Fig. 4g), while the embryos of the holotype and other paratypes were in the egg form (Fig. 4f), and the oostegite gaps of the former females were wider due to the increased volume of embryo mass. Therefore, it is believed that the tightness of oostegites is a rather flexible morphological feature, and for the paratypes, the shape resulted from the late ovigerous state of the examined females. The

subfamily Pseudioninae includes 48 described genera distributed worldwide (Boyko, 2013). During careful examination of the described specimens, major key morphological characters of the genus *Pseudione* Kossmann, 1881 under the subfamily Pseudioninae were detected. This genus is one of most heterogeneous assemblages of different forms with several similar morphological features on the pleon. As typical characters of the genus *Pseudione*, the examined holotype female possessed a sub-ovoid body, distinct segments, developed frontal lamina, and narrow coxal plates. It also possessed first oostegites with small triangular posterolateral points as well as 6 pleomeres with moderately developed lateral plates, biramous pleopods, and uniramous uropods. In addition to the homologous characters of the female, the allotype male possessed a smoothly tapered body from the midpoint, distinct body regions, and isomorphic pereopods. The pleon of the male was about one-third of its total body length, and its 6 pleomeres possessed tubular uniramous pleopods and semi-spherical simple uropods. Although the genus *Pseudione* is characterized by the absence of both uropods and a terminal pleomere forming into posterolateral points in the mature female (Markham, 1985), the definition of uropods differs greatly from one author to the other. In order to specify ambiguous terminology, we unify “posterolateral points of terminal pleomere” as “simple uropods.” Therefore, we consider the bopyrid herein described as a member of the genus *Pseudione*.

The genus *Pseudione* contains 51 valid species and 2 subspecies. Among them, 11 species were reported from Japan (Saito, 2002; Schotte et al., 1995). In the present work, the host taxa and major morphological characters of *P. goemonicola* were compared with all species and subspecies of the genus *Pseudione* (Table 2). Although classification of bopyrid genera and species are generally based on host taxa and female morphology, the importance of male morphology has been indicated because the external morphology of female is influenced by the structure and respiratory physiology of branchial cavity of the host (Shiino,

1965). We included several key morphological characters of both male and female individuals for the comparison.

According to the host selection and morphological characters in Table 2, *P. goemonicola* generally resembles *P. intermedia* Nierstrasz and Brender á Brandis, 1932, *P. japonensis* Nierstrasz and Brender á Brandis, 1931, *P. biacuta* Bourdon, 1979, *P. brandaoi* Brian and Darteville, 1941, *P. incerta* Richardson, 1910, *P. kossmanni* Nierstrasz and Brender á Brandis, 1923, *P. nobilli* Nierstrasz and Brender á Brandis, 1923, *P. panopei* Pearse, 1947, and *P. subcrenulata* Nierstrasz and Brender á Brandis, 1923. Although *P. intermedia* represents no difference in key features of the female specimen of *P. goemonicola* (Table 2), morphological information of the male counterpart is missing. Detailed comparison shows the female of *P. goemonicola* differs from that of *P. intermedia* by its broad frontal lamina, distinct coxal plate, and shorter fusiform uropods. On the other hand, *P. japonensis*, *P. biacuta*, *P. brandaoi*, *P. incerta*, *P. kossmanni*, *P. nobilli*, *P. panopei*, and *P. subcrenulata* can be distinguished from *P. goemonicola* by one difference in key features. Specifically, the female specimen of *P. goemonicola* differs from that of *P. japonensis* by its broad frontal lamina, distinct coxal plate, biramous foliaceous pleopods, and shorter fusiform uropods; the male of *P. goemonicola* differs from that of *P. japonensis* by the presence of uropods. The female of *P. goemonicola* differs from that of *P. biacuta* by its smooth semi-oval outline, broad frontal lamina, distinct coxal plate, and shorter fusiform uropods; the male of *P. goemonicola* differs from that of *P. biacuta* by its cephalon, largely welded with the first pereiomere, and the presence of uropods. The female of *P. goemonicola* differs from that of *P. brandaoi* by its broad frontal lamina, rounded anterolateral border of cephalon, introrse endopodite of biramous foliaceous pleopods, and shorter fusiform uropods; morphological information of the male *P. brandaoi* is missing. The female of *P. goemonicola* differs from that of *P. incerta* by its smooth semi-oval outline, broad rounded frontal lamina,

presence of broad coxal plates, short lateral lobes with rounded ends, foliaceous pleopods which extend within the outer edge of lateral plates, and shorter fusiform uropods; the morphological information of the male *P. incerta* is missing. The female of *P. goemonicola* differs from that of *P. kossmanni* by its broad frontal lamina, the presence of maxilliped pulps and posterolateral projections, longer endopodite of biramous foliaceous pleopods, and shorter fusiform uropods; the morphological information of the male *P. kossmanni* is missing. The female of *P. goemonicola* differs from that of *P. nobilli* by its broad frontal lamina, reduced posterolateral points on the first pair of oostegites, introrse endopodite and short exopodite of biramous foliaceous pleopods, small spherical pleotelson, and shorter fusiform uropods; the male of *P. goemonicola* differs from that of *P. nobilli* by its 4-segmented antenna, rounded shape of pleon, lateral plates of pleon rounded, and presence of semi-spherical uropods. The female of *P. goemonicola* differs from that of *P. panopei* by its 5 segmented antenna, reduced posterolateral points on first pair of oostegites, small spherical pleotelson, and shorter fusiform uropods; the male of *P. goemonicola* differs from that of *P. panopei* by its smooth lateral margin of thoracic segments and semi-spherical uropods without setae. The female of *P. goemonicola* differs from that of *P. subcrenulata* by its smooth outline without vertical cuts around frontal lamina and first 2 pereomeres, only one pair of barbula, and shorter fusiform uropods, distinguishable from exopod of pleopod in terms of shape.

Although *P. goemonicola* was classified in the genus *Pseudione* based on the host selection and morphological characteristics of the mature female, all described species of the genus *Pseudione* can be distinguished from *P. goemonicola* based on the key characteristics of both or at least a single sex, depending on the availability of specimens. For this reason, we consider *P. goemonicola* a new species of genus *Pseudione*.

Ecological Remarks

Similar to other bopyrid parasites, a conspicuous symptom of parasitism is the semi-spherical parasite lump on either side of host branchial chamber. The ovigerous female *P. goemonicola* fit perfectly in the space inside the parasite lump, with its ventral side against the host carapace, and the coupled male attached on the dorsal surface of the female (Fig. 4a, 4b). The ovigerous female nursed a great number of eggs or epicaridean larvae; the average diameter of the eggs of holotype was close to 210 μ m, and the average body length of the larvae was close to 410 μ m without eggshells. The distortion of the female *P. goemonicola* was determined by the choice of branchial chamber side (Fig. 1a, 3a). Of 555 specimens of *S. crosnieri*, 9 individuals were infested by *P. goemonicola*, and 1 host possessed a parasite lump on both left and right branchial chambers. Rates of parasitism differed from 0.00% to 6.06% among 6 regions in the Okinawa Trough (Table 3), with an average rate of parasitism of 1.62%, which is within the typical infestation rates of bopyrid parasites of 0.1–3.8% (for review, see McDermott et al., 2010). The difference in infestation rate is remarkable when hydrothermal vents are grouped into 2 separate areas, the Mid-Okinawa Trough and the South-Okinawa Trough (Table 3); the rate of infestation was significantly greater in the former than the latter (Fisher's exact test, $P < 0.05$). Anomuran crabs are known to be definitive hosts of bopyrid parasites, and they are known to live over years. When a significant positive correlation between parasite lump and host sizes is found, it is assumed that the two species have been engaged in a long-term parasitic relationship (Cash and Bauer, 1993). A similar positive correlation of parasite lump and host sizes was observed in this study (Fig. 5). Together, they indicate that the host and parasite relationship lasts many years after infestation. Therefore, sampling season is unlikely responsible for the uneven rate of parasitism between the regions. However, if so, the uneven rate of parasitism is attributable to the disproportional distribution of *P. goemonicola*.

We observed the preferences of infestation through uneven ratios of host sex and the side of infesting branchial chamber. A total of 287 females, 258 males, and 10 undetermined individuals were examined for parasites. Of these, we found 9 infested hosts. Six of these individuals were females, 2 individuals were males, and the sex of 1 individual could not be determined because of the small body size. Although more infestations were observed in female hosts, the difference due to host sex was not significant after the exclusion of infested and uninfested hosts of undetermined individuals (Fisher's exact test, $P = 0.195$).

Some bopyrid parasites are known to be partial castrators of female hosts (Calado et al., 2005; Hernandez et al., 2009; McDermott et al., 2010). The most convincing explanation for castration is that reducing the fecundity of female host is the secondary consequence of energy uptake by bopyrid parasites; castration of the female host is not likely achieved through chemical means by bopyrid parasites. Despite this limited mischief and overall infestation rate, *P. goemonicola* seems to have little impact on the host in terms of population maintenance, even if they have a slight preference for female hosts over male hosts. Of the infested hosts, 7 parasite lumps were found on the right branchial chamber while 3 were found on the left. In terms of the female parasite, no other difference was observed between the right and left infesting parasites, other than the direction of distortion. Furthermore, male parasites in left branchial chambers show no particular influence on the outline from those in the right branchial chambers (Fig. 1c, 3c).

The described features are essential pieces of parasite biology, not only for newly proposed *P. goemonicola*, but also for the greater taxa of this parasite. Despite the fact that Bopyridae is a diverse family distributed among the world's oceans, the biology of those parasitic members is not well understood due to their cryptic nature. The discovery of *P. goemonicola* revealed few but valuable aspects of their biology, and more studies are required to understand the fundamental features of bopyrid parasites.

Acknowledgments

We would like to thank the captains and crews of R/V *Kaiyo*, R/V *Natsushima*, ROV Hyper-Dolphin for sampling specimens.

Table 1. Dive number and sampling locality of collected specimens of *Shinkaia crosnieri*.

Vent field	Dive No.	Lat. / Lon.	No.	Fixation method
Minami-Ensei Knoll	HPD#1328	28° 23.N / 127° 38.E	4	Frozen
North Iheya Ridge	2K#979	27° 47.N / 126° 53.E	17	10% formalin
	HPD#393	27° 47.N / 126° 53.E	1	10% formalin
	HPD#1247	27° 47.N / 126° 53.E	233	Frozen
Izena Hole	HPD#395	27° 16.N / 127° 04.E	11	10% formalin
	HPD#1329	27° 14.N / 127° 04.E	11	Frozen
Izena JADE Site	HPD#1184	27° 16.N / 127° 04.E	33	Frozen
Irabu Knoll	HPD#1330	25° 13.N / 124° 52.E	4	Frozen
	HPD#1332	25° 13.N / 124° 52.E	12	Frozen
				(only a part of body available)
Hatoma Knoll	HPD#1035–39	24° 51.N / 123° 50.E	207	Frozen
	HPD#399	24° 51.N / 123° 50.E	14	10% formalin
	HPD#1331	24° 51.N / 123° 50.E	8	Frozen

Table 2. Comparative characters of *Pseudione* species.

Species	Host	Female					Male				
		Eyes	Mxp palp	Barbula	Coxal plates	Uropods	Eyes	Mxp palp	Pleopods	Uropods	Midventral tubercles
<i>P. affinis</i> (Sars, 1882)	Caridea	Absent	Present	1 pair	Present	Uniramous	Absent	—	Present	Bilobed	Absent
<i>P. ampla</i> Markham, 1988	Caridea	Absent	Present	3 pairs	Present	Uniramous	Present	—	Present	Absent	Absent
<i>P. andamanicae</i> Bourdon, 1976	Anomura	Present	Absent	2 pairs	Present	Uniramous	Present	—	Present	Absent	Absent
<i>P. atlantica</i> Bourdon, 1971	Astacidea	Absent	Present	1 pair	Present	Uniramous	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
<i>P. biacuta</i> Bourdon, 1979	Anomura	Absent	Present	1 pair	Present	Uniramous	Absent	—	Present	Absent	Absent
<i>P. borealis</i> Caspers, 1939	Axiidea	Present	Present	1 pair	Absent	—	Present	—	Present	Uniramous	Absent
<i>P. brandaoi</i> Brian & Dartevelle, 1941	Gebiidea	Absent	Present	—	Present	Uniramous	—	—	—	—	—
<i>P. brattstroemi</i> Stuardo, Vega & Cespedes, 1986	Axiidea	Absent	Present	1 pair	Present	Biramous	Present	—	Absent	Uniramous	Absent
<i>P. calcinii</i> Shiino, 1958	Anomura	Present	Present	—	Absent	Uniramous	—	—	—	—	—
<i>P. callianassae</i> Kossmann, 1881	Axiidea	—	—	—	—	—	Present	Present	—	—	—
<i>P. chiloensis</i> Román-Contreras & Wehrtmann, 1997	Caridea	Present	Present	—	Present	Uniramous	Absent	—	Present	Absent	Absent
<i>P. clevai</i> Boyko, 2004	Caridea	Absent	Present	—	Present	Uniramous	Absent	—	Present	Absent	Absent

Table 2. Continued.

Species	Host	Female					Male				
		Eyes	Mxp palp	Barbula	Coxal plates	Uropods	Eyes	Mxp palp	Pleopods	Uropods	Midventral tubercules
<i>P. clibanaricola</i> Shiino, 1933	Anomura	Absent	Absent	2 pairs	Present	Uniramous	Absent	Absent	Present	Absent	Absent
<i>P. cognata</i> Markham, 1985	Caridea	Present	Present	Absent	Absent	Uniramous	Present	—	Present	Bilobed	Absent
<i>P. compressa</i> Shiino, 1964	Axiidea	Absent	—	—	Present	Uniramous	Present	—	Present	—	Absent
<i>P. confusa</i> <i>confusa</i> (Norman, 1886)	Anomura	Present	Absent	2 pairs	Present	—	Present	—	Present	Uniramous	Absent
<i>P. confusa</i> <i>maxillipedis</i> Bourdon, 1972	Anomura	Present	Present	2 pairs	Present	—	Present	—	Present	Uniramous	Absent
<i>P. crenulata</i> Sars, 1898	Anomura	Present	Present	—	Present	Uniramous	Present	—	Present	Bilobed	Absent
<i>P. dohrni</i> Bonnier, 1900	Axiidea	Absent	Present	1 pair	Present	Biramous	—	—	Present	Absent	Absent
<i>P. elongata</i> <i>africana</i> Kensley, 1968	Caridea	Absent	Present	2 pairs	Present	—	Present	—	Present	Uniramous	Present
<i>P. elongata</i> <i>elongata</i> (Hansen, 1897)	Caridea	—	Present	2 pairs	Present	Uniramous	Present	—	Present	Uniramous	Present
<i>P. fibriata</i> Richardson, 1910	Anomura	Absent	—	—	Present	Uniramous	Absent	—	Absent	Absent	Absent
<i>P. galacanthae</i> Hansen, 1897	Anomura	—	Present	—	Absent	Uniramous	Absent	—	Present	Absent	—
<i>P. giardi</i> Calman, 1898	Anomura	Absent	Present	1 pair	Absent	Uniramous	Present	Present	Present	Uniramous	Absent

Table 2. Continued.

Species	Host	Female					Male				
		Eyes	Mxp palp	Barbula	Coxal plates	Uropods	Eyes	Mxp palp	Pleopods	Uropods	Midventral tubercules
<i>P. hanseni</i> Nierstrasz & Brender à Brandis, 1923	Axiidea	Present	—	—	Present	Uniramous	—	—	—	—	—
<i>P. hayi</i> Nierstrasz & Brender à Brandis, 1931	Anomura	Absent	Present	Absent	Present	Uniramous	Present	—	Absent	Uniramous	—
<i>P. hyndmanni</i> (Bate & Westwood, 1868)	Anomura	Present	Present	—	Absent	Uniramous	Present	—	Present	Absent	Absent
<i>P. incerta</i> Richardson, 1910	—	Absent	—	—	Absent	Uniramous	—	—	—	—	—
<i>P. indica</i> Chopra, 1930	Caridea	Present	Present	—	Present	Uniramous	—	—	—	—	—
<i>P. intermedia</i> Nierstrasz & Brender á Brandis, 1932	Anomura	Absent	—	—	Present	Uniramous	—	—	—	—	—
<i>P. itsindrae</i> Bourdon, 1976	Anomura	Indistinct	Present	2 pairs	Present	Uniramous	Absent	—	Absent	Absent	Absent
<i>P. japonensis</i> Nierstrasz & Brender á Brandis, 1931	Anomura	Absent	—	—	Present	Uniramous	Absent	—	Present	Absent	—
<i>P. kensleyi</i> Williams & Schuerlein, 2005	Anomura	Absent	Absent	1 pair & 2 pairs of rounded lobes	Present	Uniramous	Absent	—	Present	Absent	Absent

Table 2. Continued.

Species	Host	Female					Male				
		Eyes	Mxp palp	Barbula	Coxal plates	Uropods	Eyes	Mxp palp	Pleopods	Uropods	Midventral tubercles
<i>P. kossmanni</i> Nierstrasz & Brender à Brandis, 1923	Anomura	Absent	Absent	—	Present	Uniramous	—	—	—	—	—
<i>P. longicauda</i> Shiino, 1937	Axiidea	Absent	Present	1 pair	Present	Uniramous or biramous	Present	—	Absent	Absent	Absent
<i>P. magna</i> Shiino, 1951	Caridea	Absent	Present	2 pairs	Present	Uniramous	Present	—	Present	Absent	Present
<i>P. minimocrenulata</i> Nierstrasz & Brender à Brandis, 1931	Anomura	Absent	Absent	3 pairs	Present	Uniramous	Present	—	Present	Bilobed	Absent
<i>P. munidae</i> Barnard, 1920	Anomura	Absent	Absent	—	Present	Uniramous	Absent	—	Present	Absent	Absent
<i>P. murawaiensis</i> Page, 1985	Axiidea	Absent	Present	Absent	Present	Uniramous	Absent	—	Present	Bilobed	Absent
<i>P. nephropsi</i> Shiino, 1951	Astacidea	Absent	Present	1 pair	Present	—	Absent	—	Present	Absent	Absent
<i>P. nobilii</i> Nierstrasz & Brender à Brandis, 1923	Anomura	Absent	—	1 pair	Present	Uniramous	Absent	—	Present	Absent	Absent
<i>P. novaeguineensis</i> Danforth, 1971	Anomura	Present	—	—	Present	Uniramous	Present	—	Absent	Uniramous	Absent
<i>P. overstreeti</i> Adkison & Heard, 1995	Axiidea	Absent	Present	1 pair	Present	Uniramous	Present	Absent	Present	Absent	—

Table 2. Continued.

Species	Host	Female					Male				
		Eyes	Mxp palp	Barbula	Coxal plates	Uropods	Eyes	Mxp palp	Pleopods	Uropods	Midventral tubercules
<i>P. panopei</i> Pearse, 1947	Brachyura	Absent	—	—	Present	Uniramous	—	—	Present	—	Absent
<i>P. parviramus</i> Adkison, 1988	Caridea	Present	Present	2 pairs	Present	Uniramous	Present	—	Present	Absent	—
<i>P. pontocari</i> Page, 1985	Caridea	Absent	Present	1 pair	Present	Uniramous	Absent	—	Present	Bilobed	Absent
<i>P. quasimodo</i> Boyko & Williams, 2004	Anomura	Present	Present	—	—	Uniramous	Present	—	Present	Absent	Absent
<i>P. sagamiensis</i> Nierstrasz & Brender à Brandis, 1932	Anomura	Present	—	—	Absent	Uniramous	Absent	—	—	Absent	—
<i>P. stylopoda</i> Boyko, 2004	Caridea	Present	Present	—	Present	Uniramous	Present	—	Present	Absent	Absent
<i>P. subcrenulata</i> Nierstrasz & Brender à Brandis, 1923	Anomura	Absent	—	2 pairs	Present	Uniramous	—	—	—	—	—
<i>P. tanimbarensis</i> Markham, 1999	Astacidea	Absent	Present	1 pair	Present	Uniramous	Absent	—	Absent	—	Absent
<i>P. tattersalli</i> Nierstrasz & Brender à Brandis, 1923	Caridea	Absent	Present	2 pairs	Present	Uniramous	Present	—	Present	Absent	Absent
<i>P. tuberculata</i> Richardson, 1904	Anomura	—	Present	—	Absent	—	Absent	—	—	Absent	—
<i>P. goemonicola</i> n. sp.	Anomura	Absent	Present	1 pairs	Present	Uniramous	Absent	Present	Present	Uniramous	Absent

Table 3. Number of parasitism and percent of infestation among the vents and between local areas.

Area	Hydrothermal vent	Individual vent		Within area	
		No. parasit.	% infest.	No. parasit.	% infest.
Mid-Trough	Minami-Ensei Knoll	0/4	0%		
	North Iheya Ridge	6/251	2.39%		
	Izena Hole	0/22	0%		
	Izena JADE Site	2/33	6.06%	8/310	2.58%
South-Trough	Irabu Knoll	0/16	0%		
	Hatoma Knoll	1/229	0.44%	1/245	0.41%
Total		9/555	1.62%		

Fig. 1. Holotype female and allotype male of *Pseudione goemonicola*. A) female, dorsal view; B) female, ventral view; C) male, dorsal view; D) male, ventral view.

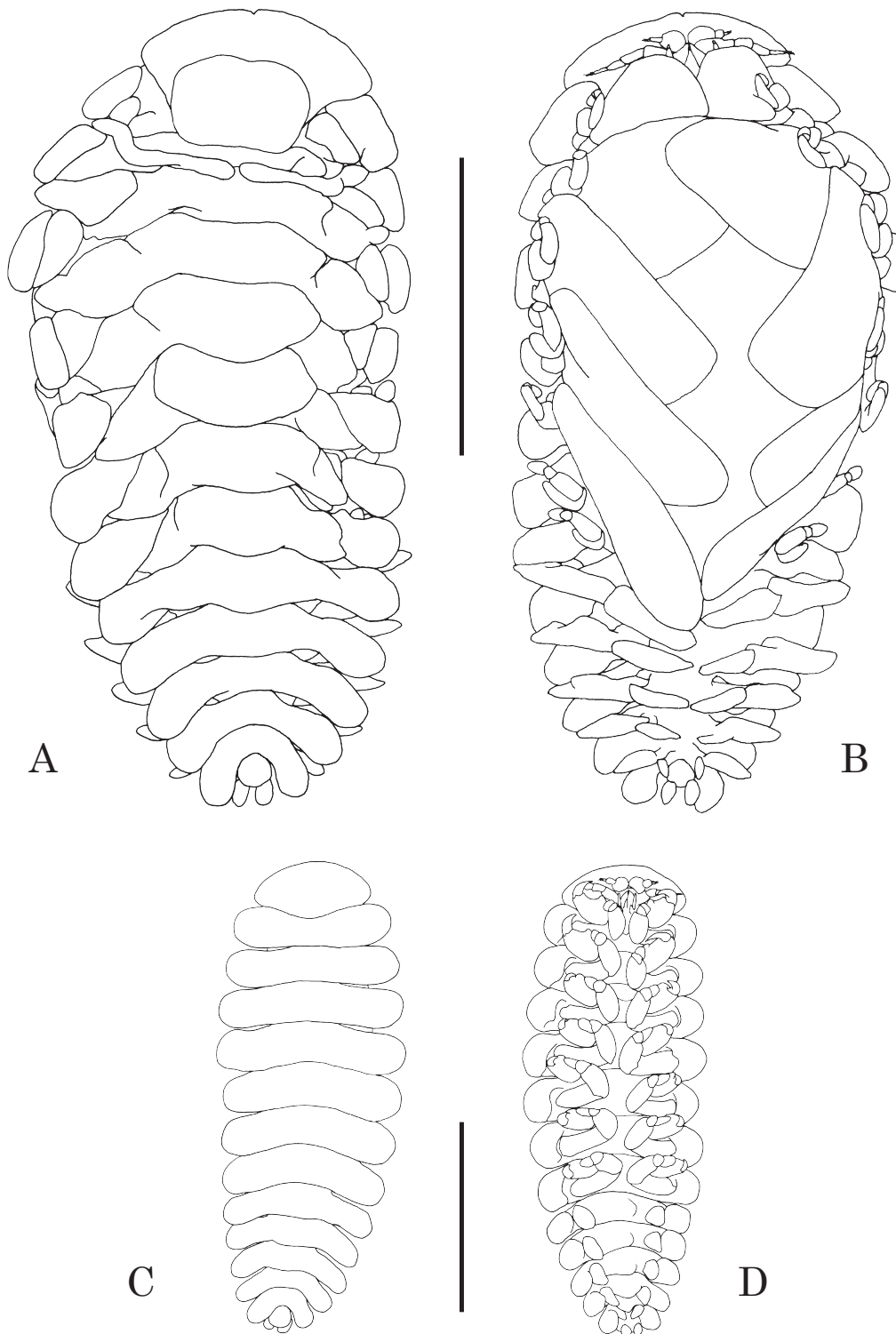


Fig. 2. Body parts of holotype female and allotype male of *Pseudione goemonicola*. a–j = female; k–m = male. a) left antennula and antenna; b) right maxilliped, ventral view, c) and dorsal view; d) barbula; e) 1st right oostegite, ventral view, f) and dorsal view; g) 1st right pereopod; h) 7th right pereopod; i) ventral aspect of pleon, exo. = exopodite, endo. = endopodite, l.p. = lateral plate; j) 1st right pleopod, ventral view; k) right antennula and antenna; l) maxilliped and mouth part; m) 1st right pereopod; n) 7th right pereopod; o) ventral aspect of pleon. Scale bars: a–f, i, j = 1 mm; g, h, l, m = 500 μ m; k = 300 μ m.

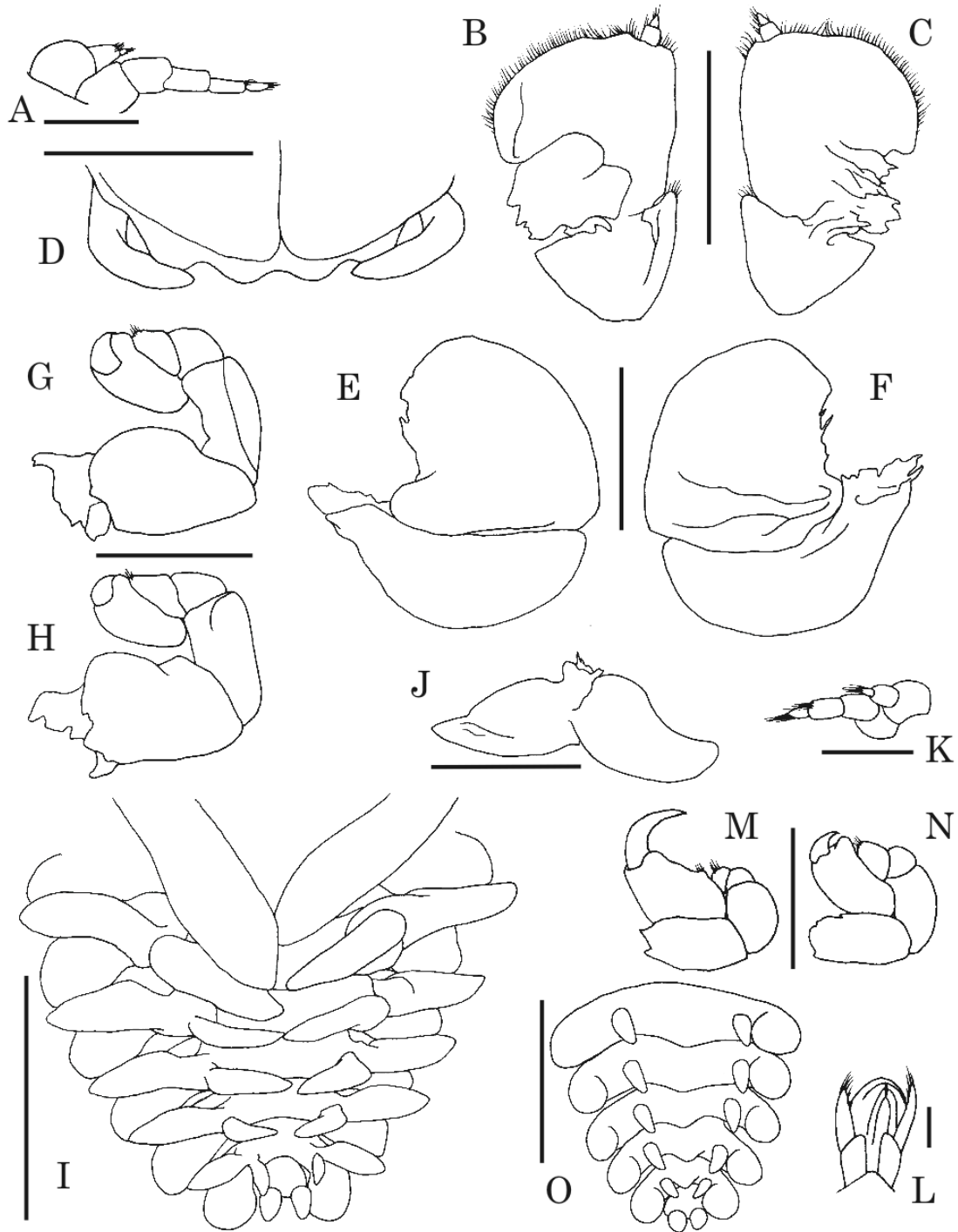


Fig. 3. Paratype morphology (Sample ID XXXX). a) female in dorsal view; b) female in ventral view; c) male in dorsal view, d) and ventral view; e) barbula. Scale bars: XXXX.

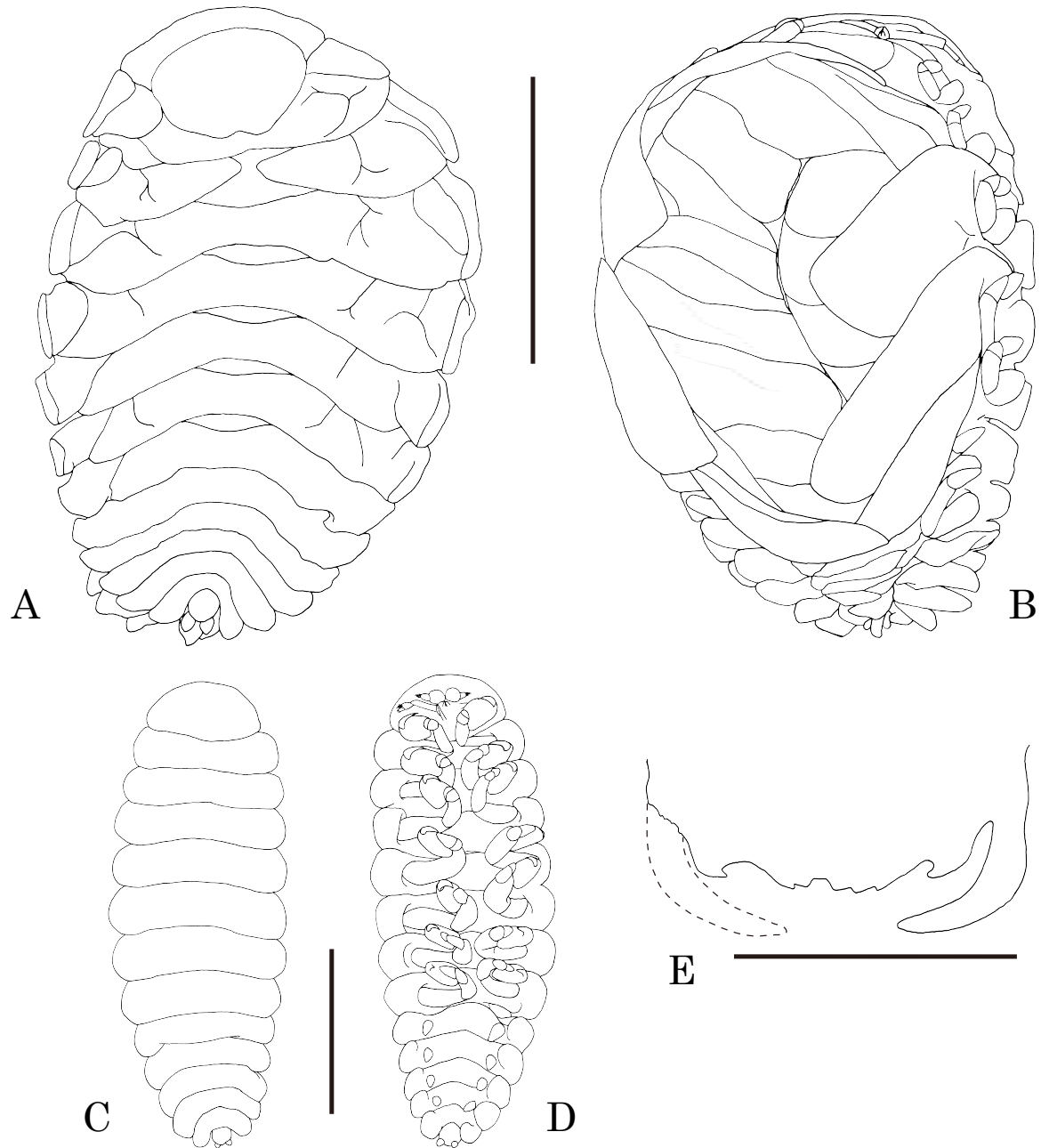


Fig. 4. Pictures of *Pseudione goemonicola*. a) orientation of hollotype and allotype inside host carapace lump; b) dorsal view of hollotype and allotype; c) side view of holotype; d) ventral view of holotype; e) ventral view of allotype; f) embryos of holotype; g) embryos of paratype (Sample ID XXXX). Scale bars: XXXX.

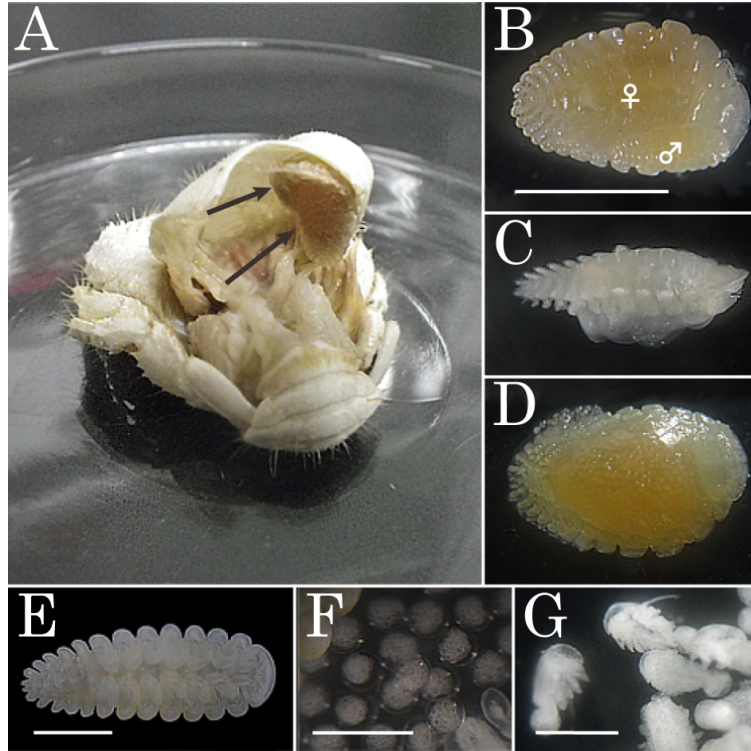
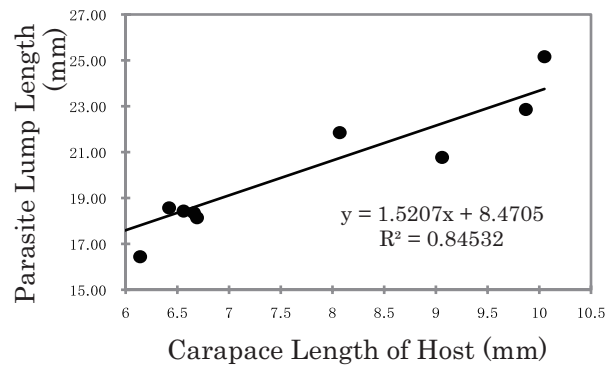


Fig. 5. Relationship between parasite lump size and host carapace length.



References

- An, J., J. C. Markham, H. Yu. 2010. Distribution of two new species and a new genus of bopyrid parasites (Bopyridae: Pseudioninae) of hermit crabs from China. *Journal of Natural History* 44: 33–34, 2065–2073.
- Baba, K. and A. B. Williams. 1998. New Galatheaidea (Crustacea, Decapoda, Anomura) from hydrothermal systems in the west Pacific Ocean: Bismarck Archipelago and Okinawa Trough. *Zoosystema* 20: 143–156.
- Boyko, C. B. 2013. Pseudioninae. In: M. Schotte, C. B. Boyko, N. L. Bruce, G. C. B. Poore, S. Taiti, and G. D. F. Wilson (eds.), *World Marine, Freshwater and Terrestrial Isopod Crustaceans database*. Accessed through: World Register of Marine Species at <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=589334> on 2013-06-04.
- . and S. Morand. 2003. Deep-sea hydrothermal vent parasites: why do we not find more? *Parasitology* 128: 1–6.
- . and M. Schotte. 2012. Bopyridae. In: M. Schotte, C. B. Boyko, N. L. Bruce, G. C. B. Poore, S. Taiti, and G. D. F. Wilson (eds.), *World Marine, Freshwater and Terrestrial Isopod Crustaceans database*. Accessed through: World Register of Marine Species at <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=1195> on 2013-04-22.
- . and J. D. Williams. 2010. A new genus and species of primitive bopyrid (Isopoda, Bopyridae) parasitizing hermit crabs (Anomura) from deep waters in the Eastern Atlantic and Japan, pp. 145–157. In, C. Fransen, S. Grave, and P. Ng (eds.), *Studies on Malacostraca: Lipke Bijdeley Holthuis Memorial Volume, Crustaceana Monographs vol. 14*. Koninklijke Brill NV, Leiden.
- Hernández, P., B. Martínez-Guerrero, A. Anker, and I. S. Wehrmann. 2009. Fecundity and effects of bopyrid infestation on egg production in the Caribbean sponge-dwelling

- snapping shrimp *Synalpheus yano* (Decapoda: Alpheidae). Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom 90: 691–698.
- Markham, J. C. 1985. A review of the bopyrid isopods infesting caridean shrimps in the Northwestern Atlantic Ocean, with special reference to those collected during the Hourglass Cruises in the Gulf of Mexico. Memoirs of the Hourglass Cruises 7: 1–156.
- . 2004. New species and records of Bopyridae (Crustacea: Isopoda) infesting species of the genus *Upogebia* (Crustacea: Decapoda: Upogebiidae): the genera *Orthione* Markham, 1988, and *Gyge* Cornalia & Panceri, 1861. Proceedings of the Biological Society of Washington 117: 186–198.
- . and C. B. Boyko. 1999. A new genus for *Ione indecora* Markham, 1988, a second record for that species, and a new congeneric species from Australia (Crustacea: Isopoda: Bopyridae: Ioninae). American Museum Novitates 3258: 7 pp.
- McDermott, J., J. D. Williams, and C. B. Boyko. 2010. The unwanted guests of hermits: A global review of the diversity and natural history of hermit crab parasites. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 394: 2–44.
- Nierstrasz, H. F. and G. A. Brender à Brandis. 1931. Papers from Dr. Th. Mortensen's Pacific Expedition 1914–16. LVII. Epicaridea II. Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Forening i København 91: 147–226.
- . and ————. 1932. Alte und neue Epicaridea. Zoologischer Anzeiger 101: 90–100.
- Román-Contreras, R. 2008. A new genus of bopyrid isopod infesting *Munidopsis beringana* (Decapoda: Galatheidae) from deep water. Journal of Crustacean Biology 282: 378–384.
- . and C. B. Boyko. 2007. A new genus and species of bopyrid isopod infesting the crab *Munidopsis depressa* (Anomura: Galatheidae) from the Gulf of California, with notes on its ecology. Journal of Crustacean Biology 27: 370–379.

- . and L. A. Soto. 2002. A new deep-water genus and species of a branchial bopyrid infesting the galatheid crab *Munidopsis erinaceus* from the Southwestern Gulf of Mexico. *Journal of Crustacean Biology* 22: 279–286.
- Saito, N. 2002. A list of crustacean hosts of the Epicaridean isopods (Crustacea: Peracarida) in the Japanese waters. *Takusa* 13: 18–31.
- Shields, J. D. and J. Gómez-Gutierrez. 1996. *Oculophyxus bicaulis*, a new genus and species of Dajid isopod parasitic on the Euphausiid *Stylocheiron affine* Hansen. *International Journal for Parasitology* 26: 261–268.
- Shiino, S. 1933. Bopyrids from Tanabe Bay. *Memoirs of the College of Science, Kyoto Imperial University (B)* 8: 249–330.
- . 1936. Bopyrids from Misaki. *Records of Oceanographic Works in Japan* 8: 177–190.
- . 1937. Bopyrids from Tanabe Bay IV. *Memoirs of the College of Science, Kyoto Imperial University (B)* 12: 479–493.
- . 1949. On two genera of Bopyridae found in Japan. *Bulletin of the Biogeographical Society of Japan* 14: 57–63.
- . 1950. Some bopyrid parasites found on the decapod crustaceans from the waters along Mie prefecture. *Report of Faculty of Fisheries, Prefectural University of Mie* 1: 26–40.
- . 1958. Note on the bopyrid fauna of Japan. *Report of Faculty of Fisheries, Prefectural University of Mie* 3:29–73.
- . 1964. Results of Amami expedition 5. Bopyridae. *Report of Faculty of Fisheries, Prefectural University of Mie* 5: 237–242.
- . 1965. Phylogeny of the genera within the family Bopyridae. *Bulletin du Muséum National D'histoire Naturelle 2nd Série* 37: 462–465.

Schotte, M., B. F. Kensley, and S. Shilling. 1995. World list of Marine, Freshwater and Terrestrial Crustacea Isopoda, National Museum of Natural History Smithsonian Institution: Washington D.C., USA. <http://invertebrates.si.edu/isopod/> on 2014-03-14.

Williams, J. D. and C. B. Boyko. 2012. The global diversity of parasitic isopods associated with Crustacean hosts (Isopoda: Bopyridea and Cryptoniscoidea). PLoS ONE 7: e35350.