

小笠原諸島に生息するヒメヌマエビ種群のDNAバーコーディング

DNA barcoding of the *Caridina serratirostris* species complex from the Ogasawara (Bonin) Islands福家悠介¹・佐々木哲朗²Yusuke Fuke¹ and Tetsuro Sasaki²

はじめに

本州から約1,000 km南に離れた小笠原諸島は、構成するすべての島が海洋島であり、陸域および陸水域には多くの固有種が生息する（佐々木，2022）。十脚甲殻類では、オガサワラヌマエビ *Paratya boninensis* Satake & Cai, 2005, オガサワラコテナガエビ *Palaemon ogasawaraensis* Kato & Takeda, 1981, オガサワラクロベンケイガニ *Orisarma magnum* (Komai & Ng, 2013), オガサワラモクズガニ *Eriocheir ogasawaraensis* Komai in Komai *et al.*, 2006, ヒライソモドキ *Ptychognathus glaber* Stimpson, 1858, オガサワラベニシオマネキ *Paraleptuca boninensis* (Shih, Komai & Liu, 2013) の6種の固有種が分布する (Satake *et al.*, 2019; 豊田, 2019; Komai *et al.*, 2021)。一方、本州や琉球列島との共通種も数多く見られ、そうした種はいずれも幼生期に海流に乗って分散する両側回遊性の生活史をもつ（吉郷, 2002; 諸喜田, 2019）。陸水性のコエビ類としては、コンジテナガエビ *Macrobrachium lar* (Fabricius, 1798), ヒラテナガエビ *M. japonicum* (De Haan, 1849), オガサワラコテナガエビ, オガサワラヌマエビ, トゲナシヌマエビ

Caridina typus H. Milne Edwards, 1837, ヤマトヌマエビ *C. multidentata* Stimpson, 1860, ヒメヌマエビ *C. serratirostris* De Man, 1892, コテラヒメヌマエビ *C. celebensis* De Man, 1892, ミナミオヌマエビ *Atyoida pilipes* (Newport, 1847), テッポウエビ属の一種 *Alpheus* sp., オハグロテッポウエビ属の一種 *Metabetaeus* sp. の3科11種がこれまで小笠原諸島から報告されている（吉郷, 2002; Satake *et al.*, 2019; 福家ら, 2025）。

ヒメヌマエビ種群に含まれるヒメヌマエビとコテラヒメヌマエビ（以下、2種を区別しない語としてヒメヌマエビ類を用いる）は形態形質に基づく同定が困難で、長らく混同されてきた歴史をもつ（林, 2007）。ただし、ミトコンドリアDNA (mtDNA) の配列は種間で明瞭に異なるため、DNA解析では両種は容易に区別できる（de Mazancourt *et al.*, 2024; Klotz *et al.*, 2024; 萩野・池田, 未発表データ）。小笠原諸島においては、両種が同時に報告された例はなく、それぞれ単独で報告されている（倉田ら, 1975; 佐竹・上野, 2001; 吉郷, 2002; Satake & Ueno, 2013; 吉成ら, 2014; 東京都小笠原支庁, 2017）。また、形態形質に基づく同定根拠が示された研究はない。そのため、実際に2種が分布しているのか、同一のタクソンが別種として認識されているのかは定かではない。そこで本研究では、小笠原諸島に生息するヒメヌマエビ類について、DNAバーコーディングによる同定を試みた。

材料と方法

小笠原諸島における調査は、小笠原諸島森林生態

¹ 摂南大学農学部応用生物科学科
〒573-0101 大阪府枚方市長尾峠町45-1
Department of Applied Biological Sciences, Faculty of
Agriculture, Setsunan University, 45-1 Nagaotoge, Hirakata, Osaka 573-0101, Japan
*E-mail: yfa73986@gmail.com

² 小笠原自然文化研究所
〒100-2101 東京都小笠原村父島字宮之浜道
Institute of Boninlogy, Miyahama-michi, Chichi-jima, Ogasawara, Tokyo 100-2101, Japan

系保護地域利用講習を受講した後に、国有林への入林手続きを行った上で実施した。2024年7月と2025年2月に小笠原諸島の父島と母島の4水系から16個体のヒメヌマエビ類を得た。遺伝的比較のために伊豆半島で得られたコテラヒメヌマエビと思われるヒメヌマエビ類1個体を以下の解析に加えた。標本は100%エタノールで保存し、DNA抽出後は70%エタノールに移して保管した。すべての標本は京都大学総合博物館（KUZ）に登録した。

DNA抽出は片側の第4-5腹肢または第5胸脚を用いて Monarch Genomic DNA Purification Kit（New England Biolabs）によって行った。mtDNA の16S rRNA 領域を増幅させるために、プライマーセット16S-F1（5'-GTA CCT TTT GTA TCA GGG-3'）と16S-R1（5'-CGG TYT GAA CTC AAA TCA TG-3'）（Fuke & Maruyama, 2023）によるPCRを実施した。PCR反応は12.5 μ L系で行い、反応液の構成は以下の通りとした：PrimeSTAR GXL DNA Polymerase（TaKaRa）

0.25 μ L, 5 \times PrimeSTAR GXL Buffer 2.5 μ L, dNTP Mixture 1.0 μ L, 5 μ M PCR プライマー各0.75 μ L, DNA 溶液0.8 μ L, 超純水（Thermo Fisher Scientific）6.45 μ L。PCR反応は予熱を98 $^{\circ}$ Cで30秒、増幅反応を98 $^{\circ}$ C 10秒、55 $^{\circ}$ C 15秒、68 $^{\circ}$ C 45秒の30サイクル、最終伸長を68 $^{\circ}$ Cで30秒で行った。PCR産物はExoSAP-IT Express（Thermo Fisher Scientific）を用いて精製した後に、ユーロフィンジェノミクス株式会社に委託してサンガー法による配列決定を行った。得られた配列はUnipro UGENE 52.0（Okonechnikov *et al.*, 2012）を用いて波形のチェックおよび編集を行った後、DDBJを通じて国際塩基配列データベース（INSD）に登録した（アクセッション番号：LC871499-LC871515）。

小笠原諸島のヒメヌマエビ類の同定のため、すべての検討標本についてBLAST検索を用いたDNAバーコーディングを行った。併せて、検討標本の系統的位置を確認するためにmtDNA 16S rRNA 領域を用いた系統推定を行った。解析のために、INSDに



Fig. 1. *Caridina serratirostris* collected from the Obana River, Chichi Island, Ogasawara Islands, Japan (KUZ Z6023). A, Side view in fresh conditions. B, Dorsal view. Scale bars: 10 mm.

登録のあるヒメヌマエビ種群および外群としてヤマトヌマエビの配列を加えた計46個体のデータセットを作成した。これをMAFFT (Kato & Standley, 2013)を用いたアライメント後にギャップが4割を超えるサイトをトリミングし、最終的なデータセットとした。このデータセットをインプットとして、IQ-TREE 2.2.2.6 (Minh *et al.*, 2020)を用いた最尤法による系統樹推定を行った。塩基置換モデルには、ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017)によってベイズ情報量基準 (BIC) に基づいて選択されたHKY+F+G4モデルを適用した。各枝の信頼度は1,000回のUltrafast ブートストラップ法 (Hoang *et al.*, 2018) によって評価した。得られた結果はFigtree 1.4.4 (<https://github.com/rambaut/figtree>) を用いて可視化した。

結 果

ヒメヌマエビ

Caridina serratiostris De Man, 1892

(Fig. 1)

検討標本. KUZ Z6019, 3個体, 2024年4月4日, 東京都小笠原村父島清瀬清瀬川上流, LC871500–LC871502, 福家悠介採集. KUZ Z6020, 5個体, 2024年7月4日, 東京都小笠原村母島衣館川上流, LC871503–LC871507, 福家悠介・佐々木哲朗採集. KUZ Z6021, 1個体, 2024年7月5日, 東京都小笠原村母島大谷川支流 (砂防ダム下流), LC871508, 福家悠介採集. KUZ Z6022, 2個体, 2024年7月7日, 東京都小笠原村父島清瀬清瀬川上流, LC871509–LC871510, 福家悠介採集. KUZ Z6023, 5個体, 2025年2月12日, 東京都小笠原村父島扇浦小花川 (連珠

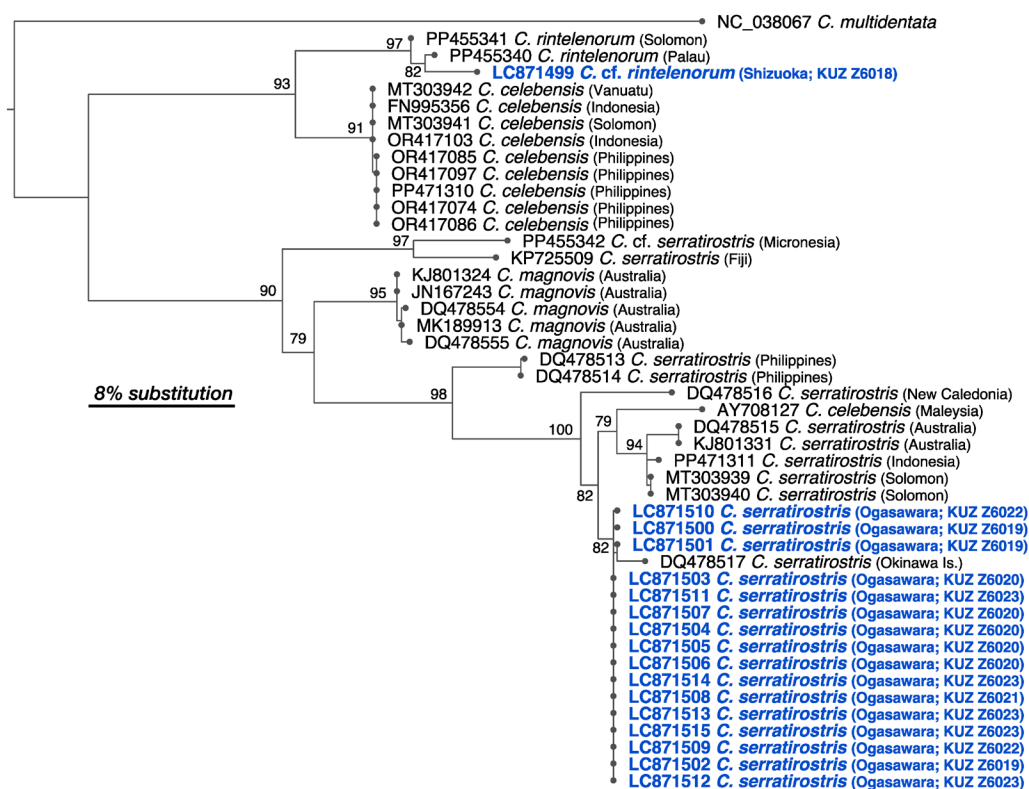


Fig. 2. Maximum likelihood phylogenetic tree of the *Caridina serratiostris* species complex based on the mitochondrial 16S rRNA region (500 bp). Samples newly sequenced in this study are shown in blue and bold. Numbers on the branches indicate Ultrafast bootstrap values, representing branch support.

ダム上流), LC871511–LC871515, 福家悠介採集。

同定. mtDNA 16S rRNA 部分配列 (823 bp) を用いた BLAST による相同性検索の結果, 小笠原諸島から得られたヒメヌマエビ類は沖縄島から得られたヒメヌマエビ (DQ478517.1; Page *et al.*, 2007) に最も類似していた (相同性 98.0%–98.4%)。同部分配列 (500 bp) を用いた最尤法に基づく系統解析の結果, 小笠原諸島の集団は上記の沖縄島の個体を含んだ単系統群を形成し, マレーシア, インドネシア, ソロモン諸島, オーストラリアのヒメヌマエビから構成される単系統群が小笠原・沖縄系統群と姉妹群を形成した (Fig. 2)。マレーシアの個体 (AY708127) は, *C. celebensis* とラベル付けされているが, 系統的位置から考えてヒメヌマエビであると考えられた。小笠原諸島のヒメヌマエビと *C. celebensis* の相同性は約 85%, 伊豆半島のヒメヌマエビ類との相同性は約 78% であった。伊豆半島のヒメヌマエビ類は近年記載された *C. rintelenorum* de Mazancourt, Marquet & Keith, 2024 と単系統群を形成した (de Mazancourt *et al.*, 2024)。

生息環境. 本種は河口から 100 m ほど地点 (清瀬川) からダム上流部 (小花川) までの隔離度の異なる様々な地点から確認された。いずれの地点でも, 流れのほとんどない淀みや小規模な滝の浅い滝壺において, 抽水植物やアカギの浸水した根や浸水した落ち葉の中から採集された。

比較標本. *Caridina* cf. *rintelenorum*. KUZ Z6018, 1 個体, 2024 年 11 月 23 日, 静岡県河津町谷津河津谷津川中流, LC871499, 福家悠介採集。

考 察

記録があるとされる種の非分布を証明することは, 不在を確認するだけでは証拠として不十分のため, 極めて困難である。しかしながら, 地域の生物相を正確に把握することは, 生物地理の理解や地域生態系の保全のために重要である。したがって, 過去の記録や現在の在不在情報を再検討し, 種の分布について一定の示唆を得ることは有意義である。本研究では, 歴史的に混同されているヒメヌマエビ種群について mtDNA を用いた DNA バーコーディングを行い, 小笠原諸島父島と母島の様々な環境から得

られた 16 個体はすべてヒメヌマエビに同定されることを示した。これは, 小笠原諸島に本種以外のヒメヌマエビ種群が分布していない証拠にはなり得ない。しかし, コテラヒメヌマエビを報告した先行研究において同定の根拠が示されていないこと, そして本種の検討可能な標本記録がないことから, 現状では本種が小笠原諸島に分布している確かな証拠はないと言える。今後, ヒメヌマエビ類の分布を再検討するためには, 継続的な生息調査や環境 DNA 分析を用いたアプローチが有用であろう。

謝 辞

東北大学の池田実氏には, ヒメヌマエビ類の判別について情報提供をいただいた。環境省の佐藤千佳氏には小笠原諸島での調査実施にご協力いただいた。丸山智朗氏には伊豆半島での調査にご協力いただいた。この場を借りて御礼申し上げる。本研究は JSPS 科研費 JP23KJ2156 の助成を受けて実施した。

文 献

- de Mazancourt, V., Marquet, G., & Keith, P., 2024. An integrative taxonomic revision of the freshwater atyid shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea) of Micronesia. *Diversity*, 16: 200.
- Fuke, Y., & Maruyama, T., 2023. First record of *Macrobrachium mammillodactylus* (Thallwitz, 1891) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) from Japan. *Check List*, 19: 821–826.
- 福家悠介・竹下文雄・小松浩典, 2025. ミナミテナガエビは小笠原諸島に分布するのか?. *Cancer*, 34: 73–77.
- 林 健一, 2007. 日本産エビ類の分類と生態 II. コエビ下目. 生物研究社, 東京, 292 pp.
- Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S., 2018. UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35: 518–522.
- Kalyanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A., & Jermini, L. S., 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14: 587–589.
- Katoh, K., & Standley, D. M., 2013. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 772–780.
- Klotz, W., Von Rintelen, T., & Von Rintelen, K., 2024. Three

- new species of the freshwater shrimp genus *Caridina* from Australia. *Arthropoda*, 2: 99–118.
- Komai, T., Maenosono, T., Sacki, T., & Naruse, T., 2021. Redescription of the brackish water crab *Ptychognathus glaber* Stimpson, 1858 based on the topotypic material from the Ogasawara Islands and new record of *P. lipkei* N.K. Ng, 2010 from Japan (Decapoda: Brachyura: Varunidae). *Zootaxa*, 5048: 58–76.
- 倉田洋二・北條英雄・田島文司・堤 清樹・小泉正行, 1975. 父島八瀬川の生物相. 昭和48年度小笠原諸島水産開発基礎調査報告 (東京都小笠原水産センター編). 東京都小笠原支庁産業課, 東京, pp. 81–92.
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., & Lanfear, R., 2020. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution*, 37: 1530–1534.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., & The UGENE Team, 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28: 1166–1167.
- Page, T. J., Von Rintelen, K., & Hughes, J. M., 2007. An island in the stream: Australia's place in the cosmopolitan world of Indo-West Pacific freshwater shrimp (Decapoda: Atyidae: Caridina). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43: 645–659.
- 佐々木哲朗, 2022. 小笠原諸島の陸水生物とその保全. *水環境学会誌*, 45: 238–241.
- 佐竹 潔・上野隆平, 2001. 亜熱帯島嶼の底生動物相, 特に淡水エビについて. 国立環境研究所研究報告第158号亜熱帯域島嶼生態系の保全—亜熱帯域島嶼の生態系保全手法の開発に関する基礎研究— (平成9年～11年度) 報告書 (野原精一編). 環境省国立環境研究所, 東京, pp. 52–56.
- Satake, K., & Ueno, R., 2013. Distribution of freshwater macroinvertebrates in streams with dams and associated reservoirs on a subtropical oceanic island off southern Japan. *Limnology*, 14: 211–221.
- Satake, K., Ueno, R., & Sasaki, T., 2019. Freshwater and brackish-water macroinvertebrates in the Ogasawara Islands. *Global Environmental Research*, 23: 73–75.
- 諸喜田茂充, 2019. 淡水産エビ類の生活史: エビの川のぼり. 諸喜田茂充出版記念会, 東京, 216 pp.
- 東京都小笠原支庁, 2017. 平成28年度小笠原諸島海域生態調査委託報告書. 東京都小笠原支庁, 東京, 506 pp.
- 豊田幸詞 (著)・関慎太郎 (写真)・駒井智幸 (監修), 2019. 日本産淡水性・汽水性エビ・カニ図鑑. 緑書房, 東京, 339 pp.
- 吉郷英範, 2002. 小笠原諸島父島および母島で確認された陸水性魚類, エビ・カニ類. 比和科学博物館研究報告, 41: 1–30, 5 pls.
- 吉成 暁・佐竹 潔・佐々木哲朗, 2014. 小笠原諸島父島・母島における河川底生動物調査. *兵庫陸水生物*, 65: 23–33.