

高等学校教育現場において利用可能な

日本産ワレカラ類の形態的・分子的分類指標の開発

谷良夫 阪口正樹 笠原恵

1 研究目的

ワレカラ類は、大阪湾をはじめ日本各地の漁港やヨットハーバーの浮き桟橋やロープに生育する海藻やコケムシ、ヒドロ虫から容易に採集できる。また、流れ藻にも見つか。大阪湾では 20 種類近くのワレカラが生息している (阪口 2009, 2012)。ワレカラはヨコエビなどとともに端脚目に属する。ワレカラの形態的特徴は、ヨコエビのように体が扁平ではなく、円筒状で腹部が退化していることである。日本には 105 種類生息し、その中で *Caprella* 属は 71 種を占める (Takeuchi 1999)。*Caprella* 属は、主に温帯および亜寒帯海域で生息しており、大阪湾の各所に生息し、海藻やロープなどから簡単に採集できる。またミトコンドリア DNA (mtDNA) の解析も行われている (谷・阪口 2013)。

高等学校「理科」「生物基礎」および「生物」では遺伝子に対する理解を深めるために DNA モデルを作成する実習が一般的に行われている (嶋田ほか 2013)。野外生態調査と遺伝子解析と DNA モデルの作成を融合させた多角的な遺伝実習の教材としてのワレカラ類の可能性を検討した。

2 研究方法

大阪湾各地の海域において、海藻 (草) からワレカラを採集した (表 2)。採集したワレカラを 70%エタノールで固定した。検索表 (表 1) をもとに実体顕微鏡の下で同定した。付属肢を外し、DNA 抽出材料とした。

国際塩基配列データベース (INSD International Nucleotide Sequence Database) よりトゲワレカラ *Caprella scaura* Templeton の mtDNA データ (アクセッション番号 NC_014687) をダウンロードし、Primer3 (v. 0.4.0) により mtDNA の cytochrome c oxidase subunit I (COI) 領域に対しプライマーセット (CSCO173F : 5'-ATT AAA CGA TGG CTA CTT TCG ACA AAC CAC-3', CSCO902R : 5'-AAA TAT AAA CTT CTG GGT GCC CGA AAA ATC-3') を設計し、北海道システムサイエンス社に DNA 合成を委託した。またトゲワレカラの 16S ribosomal RNA (16S) 領域に対するプライマーセット (16S424F : 5'-GGC TGC GGT ATA CTA ACT GTG CTA AGG T -3', 16S424R : 5'-AAT TAA GGG TTG AAC AAA CCC TCC TTT A -3', 谷・阪口 2013) および DNA バーコーディングに用いられる COI 領域に対する汎用プライマー (LCO1490/HCO2198, Folmer *et al.* 1994) についても北海道システムサイエンス社に DNA 合成

を委託した。採集したトゲワレカラから Qiagen 社製の DNeasy Blood & Tissue キットを使って DNA を抽出し、種特異的プライマーを作成し PCR 法により DNA 増幅を行った。

PCR 産物は 2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、DNA 増幅バンドを確認した。切り出したバンドを Roche High Pure PCR Product Purification Kit を用いて精製し、北海道システムサイエンス社に委託して上流と下流から塩基配列を解読した。解読データは MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS ANALYSIS 6 (MEGA6, Tamura *et al.* 2013) でアラインメントし、上流と下流から解読したデータが完全に一致する部分を解析に用いた。The National Center for Biotechnology Information (NCBI) の The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて相同性の高いデータを検索し、MEGA 6 を用いて系統樹の作成を行った。

DNA モデルはパーラービーズ (株式会社カワダ) を家庭用アイロン (TA-FV410, 東芝) で加熱して作成した。加熱後冷却する際に手でねじってらせん状に成形した。

3 結果

大阪湾各地の海域において、海藻 (草) から採集したワレカラ類の中から 8 種 20 個体を選び、PCR 法による DNA 増幅を行った結果、プライマーセット 16S424F/16S424R および LCO1490/HCO2198 を用いた DNA 増幅では良好な結果が得られた。しかしプライマーセット CSCO173F/CSCO902R を用いた場合は *Caprella scaura*, *Caprella decipiens* Mayer および *Caprella penantis* Leach の 3 種については良好な結果が得られたが、他の 5 種については良好な DNA 増幅結果は得られなかった。

十分な DNA 増幅結果が得られた PCR 産物について塩基配列の解読を試みた結果、プライマーセット 16S424F/16S424R による PCR 産物については良好な解読結果が得られた。しかしプライマーセット LCO1490/HCO2198 による PCR 産物については、ノイズが多く、良好な解読結果は得られなかった。

良好な解読結果が得られた 16S 領域について、MEGA6 を用いて、解析を行った。Maximum Composite Likelihood model を用いて 1000 回繰り返し計算した結果、それぞれの塩基配列データ間の遺伝距離の平均値 (Average Evolutionary Divergence over all Sequence Pairs) は、0.1869 (標準誤差 0.0175) であった。なお解析した塩基長は 289bp であった。今回作成した検索表 (表 1) に従って、今回分類・解析したワレカラ類 8 種は 0.1250 から 0.2421 のグループ間遺伝距離を示した (表 3)。また作成した分子系統樹では 8 種はそれぞれグループを形成した (分岐率 97%以上, 図 1)。

解析した塩基配列 (305bp) で 8 種それぞれが異なる領域 (84 番目から 93 番目, 図 2) について DNA モデルを設計し、制作した (図 3, 図 4)。2016 年 2 月 11 日 (木) にきしわだ自然資料館 (大阪府岸和田市堺町 6 番 5 号) において兵庫県立尼崎小田高等学校自然科学部生物班の小阪田悠生, 北浦大樹, 大塚輝人, 今村拓未ら 4 名が行ったミニ実習では来館者が同様のワレカラ DNA モデルを作成した。小学生からお年寄り

まで熱心に作成し、好評を博した。

4 考察

大阪湾各地の海域において、海藻（草）から採集したワレカラ類の中から 8 種について遺伝子解析を行う場合、今回用いた 3 つのプライマーセットの中では 16S424F/16S424R が解析に適していた。

ワレカラ類の標本から DNA を抽出する際には、体表に付着する各種生物の DNA が混入してしまう。ノイズを防ぐためには LCO1490/HCO2198 のような汎用プライマーではなく、特異的なプライマーを設計する必要があると思われる。しかし種特異的になりすぎると、プライマーセット CSCO173F/CSCO902R のように、増幅可能な種が限定されてしまうので今回のような種をまたいだ遺伝子解析には不向きである。プライマーセット 16S424F/16S424R（谷・阪口 2013）は広く *Caprella* 属に対して利用できる便利なプライマーセットであることが再確認された。

作成した検索表（表 1）によって形態的に分類された 8 種がそれぞれ遺伝的なグループを形成したことから（図 1）、今回作成した検索表の確からしさが裏付けられた。

高等学校「理科」「生物基礎」および「生物」では遺伝子に対する理解を深めるために DNA モデルを作成する実習が一般的に行われている（嶋田ほか 2013）。DNA モデルを作成することにより、遺伝情報が塩基配列で記録されており、遺伝子（DNA）は遺伝情報を載せているメディアであることが理解できると思われる。生徒が自ら野外実習で各種ワレカラ類を採集し、生物の多様性を実感した後に、ワレカラ各種の DNA を解析し、さらに DNA モデルを作成することにより、その生物の多様性を裏付けている遺伝子の多様性をよりはっきりと理解することができると思われる。日本（大阪湾）における *Caprella* 属各種が、生態系と遺伝子の関係を理解する、有効な教材となる可能性が示された。

5 参考文献

- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vriegenhoek 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.
- 阪口正樹. 2009. 大阪湾初記録のウミモワレカラ(端脚目, ワレカラ科). *南紀生物*, 51(2):163-164.
- 阪口正樹. 2012. 大阪湾産のワレカラ(甲殻綱・端脚目). *兵庫生物*, 14(3):201-212.
- 嶋田正和・久保田洋・坂井建雄・塩川光一郎・鈴木孝仁・鈴木誠・園池公毅・田村実・仲田崇史・湯本貴和・板山裕・大森茂樹・久保田一暁・中井一郎・中道貞子・中村厚彦・中村哲也・鍋田修身・早崎博之・林誉樹・矢嶋正博. 2013. 文部科学省検定済教科書 高等学校理科用 生物 数研出版（生物/303）学校-2013. 424pp. 数研

出版，東京．

Takeuchi I. 1999. Checklist and bibliography of the Caprellidea(Crustacea: Amphipoda) from Japanese waters. *Otsuchi Marine Science* 24:5-17.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

谷良夫・阪口正樹. 2013. mtDNA の遺伝子解析によるワレカラ（甲殻綱，端脚目）の同定. *兵庫生物*, 14(4):271-278.

表 1 ワレカラ属 8 種の検索表

1	頭部に突起あり		2
1	頭部に突起なし		7
2	頭部背側に鋭い突起あり		3
2	頭部前方に突起あり		4
3	第 5 胸節背側に突起なく，胸肢前節の把握棘は中位にある		
		カマテワレカラ	<i>Caprella simia</i>
3	第 5 胸節背側に突起あり，胸肢前節の把握棘は近位にある		
		トゲワレカラ	<i>Caprella scaura</i>
4	頭部前方の突起はしっかりと突出している		
		マルエラワレカラ	<i>Caprella penantis</i>
4	頭部前方の突起はわずかである		5
5	第 2 胸節の胸脚間に突起あり	クビナガワレカラ	<i>Caprella equilibra</i>
5	第 2 胸節の胸脚間に突起なし		6
6	エラは細長く体に平行につく	ツガルワレカラ	<i>Caprella tsugarensis</i>
6	エラは丸い	セムシワレカラ	<i>Caprella brevirostris</i>
7	頭部前部が少し角張っている		2
7	頭部前部が丸い		8
8	胸脚前節に把握棘あり	モノワレカラ	<i>Caprella monoceros</i>
8	胸脚前節に把握棘なし	マギレワレカラ	<i>Caprella decipiens</i>

表 2 解析個体

	標本番号	採集年月日	採集場所	採集者名	種名
1	20154087	2015. 7. 3	兵庫県神戸市垂水区平磯A地点	阪口正樹	<i>C. brevirostris</i>
2	20154088	2015. 7. 3	兵庫県神戸市垂水区平磯D地点	阪口正樹	<i>C. brevirostris</i>
3	20154103	2015. 7. 26	兵庫県洲本市由良町由良	阪口正樹	<i>C. decipiens</i>
4	20154104	2015. 7. 26	兵庫県洲本市由良町由良	阪口正樹	<i>C. decipiens</i>
5	20154077	2015. 3. 25	兵庫県神戸市須磨区海釣り公園	阪口正樹	<i>C. equilibra</i>
6	20154078	2015. 3. 25	兵庫県神戸市須磨区海釣り公園	阪口正樹	<i>C. equilibra</i>
7	20154079	2015. 3. 25	兵庫県神戸市須磨区海釣り公園	阪口正樹	<i>C. equilibra</i>
8	20154101	2014. 7. 25	兵庫県洲本市由良町由良	阪口正樹	<i>C. monoceros</i>
9	20154102	2014. 7. 25	兵庫県洲本市由良町由良	阪口正樹	<i>C. monoceros</i>
10	20154073	2015. 3. 25	兵庫県神戸市須磨区海釣り公園	阪口正樹	<i>C. penantis</i>
11	20154074	2015. 3. 25	兵庫県神戸市須磨区海釣り公園	阪口正樹	<i>C. penantis</i>
12	20154075	2015. 3. 25	兵庫県神戸市須磨区海釣り公園	阪口正樹	<i>C. penantis</i>
13	20154116	2015. 2. 27	大阪府岸和田市港緑町	阪口正樹	<i>C. penantis</i>
14	20154118	2015. 6. 25	兵庫県洲本市由良町由良	阪口正樹	<i>C. penantis</i>
15	20154003	2014. 2. 23	大阪府泉南郡岬町淡輪 漁港	阪口正樹	<i>C. scaura</i>
16	20154006	2014. 2. 7	大阪府泉南郡田尻町りんくうポート	阪口正樹	<i>C. scaura</i>
17	20144014	2014. 7. 3	兵庫県神戸市垂水区福田川尻	阪口正樹	<i>C. simia</i>
18	20144015	2014. 7. 3	兵庫県神戸市垂水区福田川尻	阪口正樹	<i>C. simia</i>
19	20154083	2015. 7. 2	兵庫県神戸市垂水区平磯C地点	阪口正樹	<i>C. tsugarensis</i>
20	20154093	2015. 7. 3	兵庫県神戸市垂水区平磯A地点	阪口正樹	<i>C. tsugarensis</i>

表 3 16S ribosomal RNA 領域におけるワレカラ属 8 種のグループ間遺伝距離 (Divergence over Sequence Pairs between Groups)

		1	2	3	4	5	6	7	8
1	<i>C. simia</i>		<u>0.0305</u>	<u>0.0279</u>	<u>0.0341</u>	<u>0.0249</u>	<u>0.0226</u>	<u>0.0294</u>	<u>0.0275</u>
2	<i>C. scaura</i>	0.2107		<u>0.0261</u>	<u>0.0319</u>	<u>0.0271</u>	<u>0.0302</u>	<u>0.0266</u>	<u>0.0284</u>
3	<i>C. penantis</i>	0.1753	0.1709		<u>0.0280</u>	<u>0.0251</u>	<u>0.0301</u>	<u>0.0296</u>	<u>0.0266</u>
4	<i>C. equilibra</i>	0.2353	0.2328	0.1895		<u>0.0295</u>	<u>0.0311</u>	<u>0.0334</u>	<u>0.0316</u>
5	<i>C. tsugarensis</i>	0.1546	0.1823	0.1541	0.2063		<u>0.0231</u>	<u>0.0266</u>	<u>0.0231</u>
6	<i>C. brevirostris</i>	0.1250	0.2174	0.1980	0.2156	0.1340		<u>0.0276</u>	<u>0.0268</u>
7	<i>C. monoceros</i>	0.1822	0.1776	0.1966	0.2421	0.1766	0.1867		<u>0.0252</u>
8	<i>C. decipiens</i>	0.1786	0.2067	0.1685	0.2197	0.1428	0.1788	0.1663	

表の右斜め下部分の数値はグループ間遺伝距離、表の右斜め上部分のアンダーラインの数値は標準誤差を示す。Maximum Composite Likelihood model を用いて、1000

回繰り返し計算した。解析した塩基長は 289bp であった。

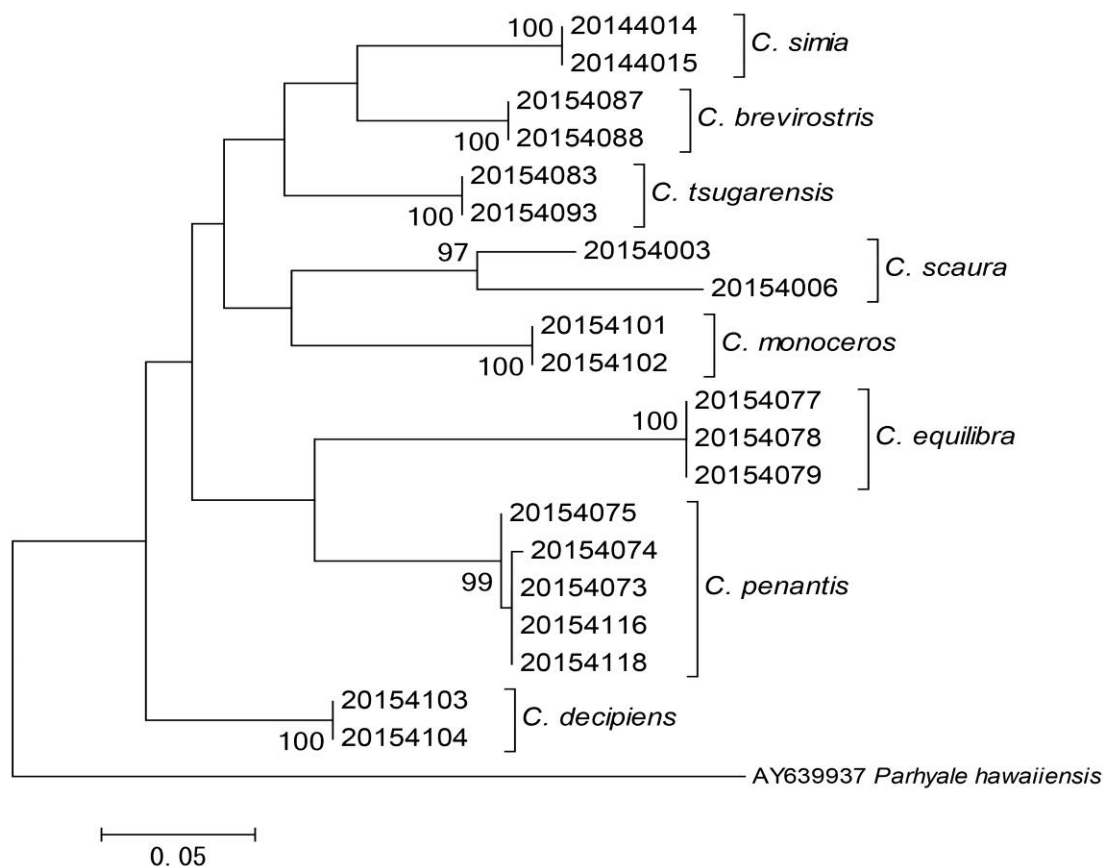


図 1 16S ribosomal RNA 領域におけるワレカラ属 8 種 20 個体の分子系統樹
Maximum Likelihood method により，1000 回繰り返し計算した。解析した塩基長は 289bp であった。外群として *Parhyale hawaiiensis* Dana (アクセッション番号 AY639937) を用いた。分岐率 95%以上数値のみ示した。

標本番号 学名	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93
20144014 <i>Caprella simia</i>	T	A	C	A	C	T	A	A	A	A
20154003 <i>Caprella scaura</i>	T	T	T	T	C	T	A	G	A	G
20154073 <i>Caprella penantis</i>	T	A	A	A	C	T	A	A	A	A
20154077 <i>Caprella equilibra</i>	T	G	A	G	T	T	G	G	C	T
20154083 <i>Caprella tsugarensis</i>	T	G	C	A	C	T	A	G	A	A
20154087 <i>Caprella brevisrostris</i>	T	A	G	A	C	T	A	A	A	A
20154102 <i>Caprella monoceros</i>	T	A	C	A	C	T	A	A	A	T
20154103 <i>Caprella decipiens</i>	T	A	C	A	T	T	G	G	A	T

図 2 16S ribosomal RNA 領域におけるワレカラ属 8 種の塩基配列

解析した塩基配列 (305bp) で 8 種それぞれが異なる領域 (85 番目から 93 番目) を含む塩基配列を示す。A はアデニン，T はチミン，C はシトシン，G はグアニンを示す。

	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93										
<i>20144014 Caprella simia</i> カマテワレカラ	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D
	T		A		C		A		C		T		A		A		A		A	
	A		T		G		T		G		A		T		T		T		T	
	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P
<i>20154003 Caprella scaura</i> トゲワレカラ	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D
	T		T		T		T		C		T		A		G		A		G	
	A		A		A		A		G		A		T		C		T		C	
	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P
<i>20154073 Caprella penantis</i> マルエラワレカラ	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D
	T		A		A		A		C		T		A		A		A		A	
	A		T		T		T		G		A		T		T		T		T	
	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P
<i>20154077 Caprella equilibra</i> クビナガワレカラ	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D
	T		G		A		G		T		T		G		G		C		T	
	A		C		T		C		A		A		C		C		G		A	
	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P
<i>20154083 Caprella tsugarensis</i> ツガルワレカラ	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D
	T		G		C		A		C		T		A		G		A		A	
	A		C		G		T		G		A		T		C		T		T	
	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P
<i>20154087 Caprella brevirostris</i> セムシワレカラ	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D
	T		A		G		A		C		T		A		A		A		A	
	A		T		C		T		G		A		T		T		T		T	
	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P
<i>20154102 Caprella monoceros</i> モノワレカラ	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D
	T		A		C		A		C		T		A		A		A		T	
	A		T		G		T		G		A		T		T		T		A	
	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P
<i>20154103 Caprella decipiens</i> マギレワレカラ	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D
	T		A		C		A		T		T		G		G		A		T	
	A		T		G		T		A		A		C		C		T		A	
	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P

図3 ワレカラ属8種のDNAモデル(16S ribosomal RNA領域)図案

Aはアデニン, Tはチミン, Cはシトシン, Gはグアニン, Pはリン酸, Dはデオキシリボースを示す。



図4 20154077 *Caprella equilibra* クビナガワレカラのDNAモデル