

— 2007 年度日本海洋学会岡田賞受賞記念論文 —

## 海洋動物プランクトンの進化遺伝学的研究および今後の展望\*

町田 龍二†

### 要 旨

近年における DNA 研究法の飛躍的な発展により、さまざまな生命・生態現象を DNA レベルで明らかにすることが比較的容易に行えるようになってきた。このような状況のなか、海洋生態系を構成する全ての生物群は、その研究対象となっており、新たな知見が多数報告されている。本稿では、著者らがこれまでに進めてきたカイアシ類ミトコンドリア DNA の構造特性、ミトコンドリア偽遺伝子、*Neocalanus* 属カイアシ類の系統解析について紹介する。また、著者らが近年進める全動物プランクトンを対象としたミトコンドリア COI 遺伝子の網羅的解析についても紹介するとともに、本研究の今後の展望について言及する。一方、世界的な動向としては、著者も参加する国際プロジェクト Census of Marine Life や Barcode of Life と言った多数の研究者が参加する大型国際プロジェクトが進行している。これらプロジェクトはバクテリアからクジラまで全海洋生物の多様性を各種の識別が可能な DNA 塩基配列情報とともに把握し、そのデータベース化を目指している。このように、DNA 塩基配列情報にもとづく研究は海洋生態系の理解に非常に重要な研究ツールなることが容易に想像される。また、今後も DNA 分析機器や手法の改良はしばらく飛躍的に発展することが予想され、これらをどのように海洋学に適用するかが新たな研究への糸口になると思われる、この点についても本稿で論議を進めた。

キーワード：カイアシ類，ミトコンドリア DNA，遺伝子配置変動，偽遺伝子，系統解析

### 1. はじめに

PCR, クローニング, 自動塩基配列決定法といった DNA 研究法の飛躍的な発展により、さまざまな生命・生態現象を DNA レベルで明らかにすることが比較的容易に行えるようになってきた。このような状況のなか、DNA 情報を利用した海洋動物プランクトン研究も多数の報告があるものの、陸上動物や魚類と比較するとその進展は格段に遅れている。2007 年 5 月現在における

国際的 DNA データベース (NCBI Taxonomy Browser; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>) に登録されている DNA 塩基配列の件数を参照すると、魚類 (Teleostei), 鳥類 (Aves), 昆虫類 (Insecta) においては、それぞれ 5,363,664 件, 1,075,235 件, 4,002,076 件の塩基配列が登録されているが、動物プランクトンの代表的な動物群であるカイアシ類 (Copepoda), オキアミ類 (Euphausiacea), ヤムシ類 (Chaetognatha) では、その登録がそれぞれ、9,024 件, 41 件, 522 件であり、これはそれら動物群の出現種数を考慮しても非常に少ない。

このような状況のなか、私は動物プランクトンの進化遺伝学的研究に大学院博士課程在学中から取り組んできた。特に、大学院在学中はカイアシ類を研究対象とし、

\* 2007 年 9 月 25 日 受領; 2008 年 1 月 17 日 受理  
著作権: 日本海洋学会, 2008

† 東京大学海洋研究所  
〒164-8639 東京都中野区南台 1-15-1  
e-mail address: ryuji@ori.u-tokyo.ac.jp

そのミトコンドリア DNA 全塩基配列決定実験を試み、その過程で遺伝子の配置が保存的でないこと、進化速度が非常に速いこと。また、*Tigriopus japonicus* においてはミトコンドリア DNA の全長が非常に短く、全ての遺伝子が片側の鎖にコードされることなど、他の動物群にはあまり見られない特徴を明らかにした (Machida *et al.*, 2002; 2004)。また、カラヌス目カイアシ類では、ミトコンドリア偽遺伝子が多数存在することを明らかにし、このことは分子遺伝学的に興味深い現象であるものの、ミトコンドリア DNA を遺伝子指標として利用する際には、技術的な問題が生じる可能性を示した (Machida, 2003)。さらに、全塩基配列決定実験の情報をもとに汎用プライマーを作成し *Neocalanus* 属カイアシ類の系統解析を行い、*Neocalanus* 属カイアシ類の進化過程を推定した (Machida *et al.*, 2006)。

一方、著者は近年、採集した全動物プランクトンの多様性を DNA 塩基配列データから把握することを目標とした新たな実験を確立し現場に適用している。本手法は採集した全動物プランクトンを同定せず全てホモジナイズし、DNA もしくは RNA の抽出を行い、特定の遺伝子を PCR により増幅、クローニングにより増幅した DNA の単離を行い、網羅的にその塩基配列を決定する。この解析は自動化されたシステムを用いることにより大量の塩基配列情報を速やかに収集、また採集した全動物プランクトンの多様性を把握することを目標としており、最終的には決定した塩基配列データを全てデータベース化する。

本稿では著者がこれまで進めてきた研究以外にも、世界的な動向として関連するプロジェクトを紹介する。また、DNA 分析機器や手法の飛躍的な改良が進んでおり、これらの技術についても言及し海洋学への適用の可能性について論議する。

## 2. カイアシ類

### 2.1. カイアシ類のミトコンドリア DNA

近年、後生動物を対象として、系統および集団構造の解析、または種を識別するための遺伝子指標としてミトコンドリア DNA が広く利用されるようになってきた (Wilson *et al.*, 1985; Avise, 1994; Hebert *et al.*,

2003)。細胞内小器官であるミトコンドリアは、核とは別に独自の環状のゲノムをもっている。このミトコンドリアゲノムは一般的な後生動物でその全長が 14,000 ~ 20,000 塩基対と非常にコンパクトであり、また 13 個のタンパク質、2 個のリボゾーム RNA、22 個の転移 RNA がほとんど隙間なくコードされている。その遺伝様式は核 DNA とは異なり一般的に組換えを行わずに母系遺伝をする (Wolstenholme, 1992)。また、核遺伝子と比較すると、細胞内のコピー数が多く実験がしやすいといった操作上の理由も遺伝子指標として多用される理由の一つであろう。ミトコンドリア DNA に存在する DNA の損傷や複製のミス修復する機構は効率が悪く、その進化速度 (単位時間あたりの塩基置換の数) は核 DNA より数倍速いとされている (Wilson *et al.*, 1985)。このことから、ミトコンドリア DNA は後生動物のとくに低次分類群の系統および集団構造の解析に数多く利用されてきた (Avise, 2000)。しかしながら、近年ではミトコンドリア DNA 全長配列を解析対象とするなど、解析領域を増やすことにより、高次分類群の系統解析にも広く利用されるようになってきている (Sorenson *et al.*, 1999; Miya *et al.*, 2003)。

カイアシ類 (Copepoda) は、節足動物門・甲殻綱に属し、後生動物内の下綱 (infraclass) 生物群としては地球上で最も個体数の多い動物群の一つとして知られている (Mauchline, 1998)。Humes (1994) によれば、カイアシ類には 200 科、1,650 属に位置づけられる約 11,500 種の既知種がいるが、その数は実在する種数の 15% 程度にすぎないとされており、多く未記載種が存在すると推察されている。カイアシ類の生息場所はほぼ全ての水圏環境に及び、淡水や海水は言うまでもなく、塩湖、極域海や温泉などの極限環境からもその生息が確認されている。鉛直的にみると、水深 10,000 m を超すフィリピン海溝や、標高 5,540 m のヒマラヤ山麓からもその出現が報告されている (Huys and Boxshall, 1991)。また、生活様式も浮遊性、底生性、寄生性と多様性に富んでおり、水圏環境に幅広く適応している。生物学的多様性がこのように著しく高いカイアシ類の進化について議論するためには、客観的に評価できるデータに基づく系統仮説が不可欠である。

私が研究を始めた 1999 年当時、カイアシ類において

**Table 1.** Summary of phylogenetic and population genetic studies of copepods based on mitochondrial DNA sequence.

Taxa	Copepod † order	Region ‡	Sequence length (base pairs)	References
<i>Calanus</i>	C	lrRNA	430	Bucklin <i>et al.</i> (1992)
<i>Tigriopus californicus</i>	H	COI	500	Burton and Lee (1994)
<i>Calanus pacificus</i>	C	lrRNA	449	Bucklin and Lajeunesse (1994)
<i>Calanus and Metridia</i>	C	lrRNA	387	Bucklin <i>et al.</i> (1995)
<i>Calanus finmarchicus</i>	C	lrRNA	350	Bucklin and Kocher (1996)
<i>Nannocalanus minor</i>	C	lrRNA	440	Bucklin <i>et al.</i> (1996)
<i>Tigriopus californicus</i>	H	COI	177	Burton (1998)
<i>Calanus finmarchicus</i> and <i>Nannocalanus minor</i>	C	lrRNA	350	Bucklin and Wiebe (1998)
<i>Calanus, Neocalanus</i> and <i>Pseudocalanus</i>	C	COI	300	Bucklin <i>et al.</i> (1999)
<i>Euchaetidae</i>	C	lrRNA	313	Braga <i>et al.</i> (1999)
<i>Eurytemora affinis</i>	C	COI	652	Lee (1999)
<i>Neocalanus tonsus</i>	C	lrRNA	300	Miller <i>et al.</i> (1999)
<i>Calanus</i>	C	lrRNA	350	
<i>Acartia clausi</i>	C	lrRNA	220	Bucklin <i>et al.</i> (2000)
<i>Eurytemora affinis</i>	C	COI	652	
		lrRNA	450	Lee (2000)

† C: Calanoida, H: Harpacticoida

‡ COI: cytochrome c oxidase I, cyt b: cytochrome b, lrRNA: large ribosomal RNA

も他の多くの動物群と同様に、その系統や集団構造の解析にミトコンドリア DNA が利用されていた (Table 1)。しかしながら、ここで注目すべき点は、解析遺伝子領域と対象分類群である。解析領域は COI, lrRNA, または cyt b 遺伝子に限られており、また、解析に用いられた塩基対の長さも 700 塩基対以下である。通常、系統や集団構造の解析には、解析に適した領域をできるだけ長く利用することが理想的だが、なぜこのように解析領域に制約があるのだろうか。これには実験上の理由がある。Table 1 にあげた全ての研究は、ミトコンドリア DNA の増幅に PCR (Polymerase Chain Reaction; Saiki *et al.*, 1988) を利用している。この PCR で使用する DNA 増幅の開始点となるオリゴヌクレオチドをプライマーと呼ぶが、過去に設計されカイアシ類に適

合するプライマーが COI, lrRNA, または cyt b 遺伝子に限られていることが一つの大きな原因となっている (Folmer *et al.*, 1994; Braga *et al.*, 1999; Schizas *et al.*, 2002)。

そこで我々は全てのカイアシ類に適合可能な汎用プライマーの作成を目的に、カイアシ類ミトコンドリア DNA 全塩基配列決定実験を行った。この結果、これまでに 1 種 (*Tigriopus japonicus*) のミトコンドリア DNA 全塩基配列と、2 種 (*Eucalanus bungii*, *Neocalanus cristatus*) のミトコンドリア DNA 部分塩基配列の解析が終了している (Machida *et al.*, 2002; 2004)。なお、このミトコンドリア DNA 全塩基配列の決定はカイアシ類では世界で初の報告となった。以下に本実験の結果明らかにになったカイアシ類ミトコンドリア DNA の 4 つ

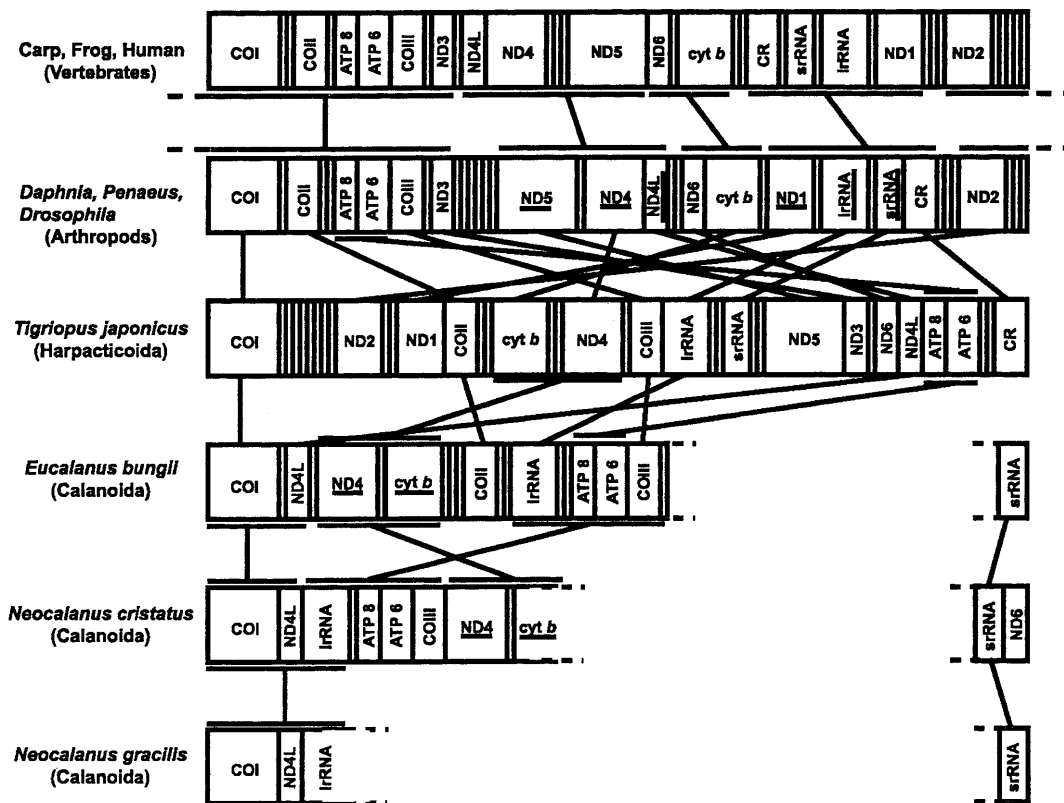


Fig. 1. Gene organization of typical vertebrates, typical arthropod, *Tigriopus japonicus*, *Eucalanus bungii*, and *Neocalanus cristatus* mitochondrial genome. All protein and rRNA genes are transcribed from left to right except those that are underlined. All transfer RNA genes are excluded from the comparison. ND1-6/4L indicates NADH dehydrogenase subunits 1-6/4L; COI-III, cytochrome c oxidase subunit I-III; cyt b, cytochrome b; ATPase 6 and ATPase 8, ATPase subunits 6 and 8. Homologous protein-coding and rRNA genes are connected by line.

の特徴を示す。

### 1) 遺伝子配置が他の節足動物と大きく異なる

通常、後生動物において、ミトコンドリアゲノムの遺伝子配置は非常に保存的である。Fig. 1 に示したとおり、コイ (*Cyprinus carpio*), アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*), ヒト (*Homo sapiens*) は脊椎動物内で比較的遠い類縁関係にあるものの、その遺伝子配置は等しい。ミジンコ (*Daphnia pulex*), クルマエビ (*Penaeus monodon*), ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) も節足動物内では比較的遠い類縁関係にあるが、等しい遺伝子配置を持つ。また、脊椎動物や節足動物といった動物門間でも多くの遺伝子配置は共有されており、いかに遺伝子配置が保存的であるかが理解できる。しか

しながら、今回その全塩基配列を決定したハルパクテクス目カイアシ類 *T. japonicus* の遺伝子配置は、他の一般的な節足動物と大きく異なっており、同様にカラヌス目カイアシ類 (*E. bungii*, *N. cristatus*) の遺伝子配置も保存的ではなく、同じ目内でも多数の配置変動が確認された (Fig. 1)。なお、*Neocalanus* 属の内部においても遺伝子配置変動は確認されており (Machida *et al.*, 2006), 単一の属内での遺伝子配置変動は軟体動物で確認されている事例 (Rawling *et al.*, 2001) に続いて 2 例目である。以上述べたように、遺伝子配置変動が保存的ではないという特徴は特異的ではあるものの、他の動物群でもいくつか報告がある [線虫類 (Okimoto *et al.*, 1991; 1992); イガイ (Hoffman *et al.*, 1992);

**Table 2.** Pairwise percentage similarities of the concatenated amino acid sequences from the 13 mitochondrial protein-coding genes<sup>†</sup> among representative arthropods and their outgroups<sup>‡</sup>.

	<i>Artemia franciscana</i>	<i>Daphnia pulex</i>	<i>Pagurus longicarpus</i>	<i>Penaeus monodon</i>	<i>Drosophila yakuba</i>	<i>Limulus polyphemus</i>	<i>Lumbricus terrestris</i>
<i>T. japonicus</i>	55.1	57.5	57.4	57.5	57.5	55.8	54.6
<i>A. franciscana</i>		66.4	66.0	67.4	66.9	64.2	57.6
<i>D. pulex</i>			71.9	73.8	74.5	69.6	62.5
<i>P. longicarpus</i>				84.7	76.5	71.6	61.8
<i>P. monodon</i>					79.3	73.1	63.3
<i>D. yakuba</i>						72.1	62.6
<i>L. polyphemus</i>							63.5

<sup>†</sup> Combined data from all 13 protein-coding genes (total 2,497 positions) were used for the calculations.

<sup>‡</sup> References (DDBJ/GenBank accession number): *Tigriopus japonicus* (AB060648), *Artemia franciscana* (X69067), *Daphnia pulex* (AF117817), *Pagurus longicarpus* (AF150756), *Penaeus monodon* (AF 217843), *Drosophila yakuba* (X03240), *Limulus polyphemus* (AF216203), *Lumbricus terrestris* (U24570).

腹足類 (Hatzoglou *et al.*, 1995; Terret *et al.*, 1996; Yamazaki *et al.*, 1997; Kurabayashi and Ueshima, 2000); ホヤ (Yokobori *et al.*, 1999); 腕足類 (Noguchi *et al.*, 2000); シラミ (Shao *et al.*, 2001)]. なぜこれら生物で特異的に遺伝子配置変動が頻繁に起こるのか興味を持たれるが、この点に関してはまだなにも明らかになっていない。遺伝子配置変動が頻繁に起こる生物のミトコンドリアゲノムを比較することにより、配置変動がなぜ頻繁に起こるのか、どのようにして配置変動が起こるのか、といった問いに、何らかの示唆が得られるものと思われる。

## 2) 進化速度が非常に速い

解析から得られたタンパク質コード領域をアミノ酸配列に変換し、他の甲殻類とショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*), 外群としてカブトガニ (*Limulus polyphemus*) とミミズ (*Lumbricus terrestris*) を含めその類似度を見積もった (Table 2; Machida *et al.*, 2002)。その結果、外群となるカブトガニ、ミミズと比較した場合、*T. japonicus* の類似度が特に低いことが明らかとなった。このことは、他の系統と比較すると *T. japonicus* の系統でより多くアミノ酸の置換が起こっており、進化速度が特に速くなっていることを示

している。同じく、決定した *E. bungii* と *N. cristatus* の COI 遺伝子を用い解析を行った結果、同様の結果が得られており、カラヌス目カイアシ類の系統でも進化速度が速くなっていることが推察されている (Machida *et al.*, 2004)。

## 3) 全長が短い

*T. japonicus* のミトコンドリア DNA 全塩基配列は 14,628 塩基対あり、すでに報告のある他の一般的な節足動物と比較すると非常に短く (Table 3), 遺伝子ごとにその長さを比較すると、srRNA, lrRNA, ATPase 8 遺伝子が特に短くなっていた (Machida *et al.*, 2002)。

## 4) 全ての遺伝子が片側の鎖にコードされている

ハルパクチクス目に属する *T. japonicus* では、全ての遺伝子が片側の鎖にコードされていた。一方、カラヌス目に属する、*E. bungii* と *N. cristatus* の遺伝子は両側の鎖にコードされていた (Machida *et al.*, 2002; 2004)。遺伝子配置変動のメカニズムについてはいくつかの仮説が提唱されている (Cantatore *et al.*, 1987; Levinson and Gutman, 1987; Moritz and Brown, 1987; Pääbo *et al.*, 1991; Poulton *et al.*, 1993; Thyagarajan *et al.*, 1996; Lunt and Hyman, 1997; Macey *et al.*, 1997; 1998; Kumazawa *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 2000; Dow-

**Table 3.** Comparisons of lengths (bp) of arthropod mitochondrial genomes<sup>†</sup>.

Gene	Tija	Arfr	Dapu	Palo	Pemo	Anga	Anqu	Apme	Ceca	Drya	Lomi	Rhsa	Ixhe	Lipo
tRNAs <sup>‡</sup>	1370	1387	1453	1471	1494	1478	1473	1507	1472	1465	1469	1347	1381	1468
srRNA	580	712	753	789	852	800	794	786	788	789	827	687	705	799
lrRNA	1034	1153	1314	1303	1365	1325	1321	1371	1335	1326	1314	1190	1287	1296
ATPase 6	687	660	675	675	675	681	681	681	678	675	678	666	663	675
ATPase 8	99	162	162	159	159	162	162	159	162	162	159	159	156	156
COI	1528	1539	1538	1543	1539	1537	1542	1566	1536	1536	1536	1539	1539	1536
COII	684	687	679	690	688	685	685	678	687	685	684	676	676	685
COIII	798	774	789	792	790	787	787	780	789	789	792	772	784	784
cyt b	1131	1146	1134	1137	1137	1137	1137	1152	1137	1137	1140	1077	1099	1132
ND1	921	897	936	933	939	945	945	918	1032	975	942	942	940	933
ND2	966	891	990	1011	1002	1026	1026	1002	1023	1026	1029	942	957	1017
ND3	379	336	354	354	352	354	354	354	354	354	348	345	336	345
ND4	1299	1161	1321	1389	1341	1342	1345	1344	1341	1339	1335	1302	1311	1338
ND4L	276	258	276	282	300	306	300	264	291	291	294	276	276	300
ND5	1743	1627	1708	1713	1723	1743	1731	1665	1719	1720	1717	1657	1663	1714
ND6	456	468	513	504	522	525	525	504	525	525	522	450	426	462
CR*	581	1770	689	300	991	518	625	827	1004	1077	785	303	359	348
Total	14628	15822	15333	15630	15984	15363	15455	16343	15980	16019	15722	14710	14539	14985

<sup>†</sup> References (DDBJ/GenBank accession number): Tija: *Tigriopus japonicus* (AB060648), Arfr: *Artemia franciscana* (X69067), Dapu: *Daphnia pulex* (AF117817), Palo: *Pagurus longicarpus* (AF150756), Pemo: *Penaeus monodon* (AF 217843), Anga: *Anopheles gambiae* (L20934), Anqu: *Anopheles quadrimaculatus* (L20934), Apme: *Apis mellifera* (L06178), Drya: *Drosophila yakuba* (X03240), Ceca: *Ceratitis capitata* (AJ242872), Lomi: *Locusta migratoria* (X80245), Rhsa: *Rhipicephalus sanguineus* (AF081829), Ixhe: *Ixodes hexagonus* (AF081828), Lipo: *Limulus polyphemus* (AF216203)

<sup>‡</sup> Total lengths of 22 tRNA genes.

\* CR: Control region.

ton and Campbell, 2001; Lavrov *et al.*, 2002)。最も一般的に受け入れられているメカニズムとしては、複製時のミスによる遺伝子重複と、続いて起こる重複した遺伝子の欠失によるものがある (Levinson and Gutman, 1987; Moritz and Brown, 1987)。しかしながら本メカニズムでは、カイアシ類で確認された、コードされる遺伝子領域が対合する DNA 鎖に転移する遺伝子配置変動は説明が付かない。また、興味深いことに、先に述べた頻繁な配置変動が確認されているいずれの生物に

においてもそのミトコンドリア DNA の進化速度が速くなっており、全長が短い (線虫類, イガイ, 腹足類, 腕足類, シラミ, ホヤ), 全ての遺伝子が片側の鎖にコードされる (線虫類, イガイ, 腕足類, ホヤ), といった特徴を合わせ持っていることが明らかとなってきている。今後これらの現象と、それら動物の生態・進化との関連性の解明が期待される。

一方、当初の目的としてのカイアシ類汎用プライマーは、現在までのところミトコンドリア COI 遺伝

子 [L1384-COI (GGT CAT GTA ATC ATA AAG ATA TTG G), H2612-COI (AGG CCT AGG AAA TGT ATM GGG AAA)] と, srRNA 遺伝子 [L13337-12S (YCT ACT WTG YTA CGA CTT ATC TC), H13845-12S (GTG CCA GCA GCT GCG GTT A)] について作成し, 4 目のカイアシ類において増幅が成功している (Machida *et al.*, 2004)。しかしながら, 実際にはこれら汎用プライマーを用いても遺伝子の増幅が困難な種も存在する。また, もう一つの問題点として, より長い塩基配列情報を得るために有効な異なった遺伝子間の PCR は次に示す *Neocalanus* 属以外ではほとんど成功していない。この原因は今のところ明らかにはなっていないが, 特定の塩基の繰り返し配列などがミトコンドリア DNA 内の遺伝子間に存在し PCR において酵素がうまく働かない可能性を著者は推察している。今後はこれらの問題点を解決し, 各種カイアシ類からより長い塩基配列データをスムーズに得ることができる新たな手法を開発したいと考える。

## 2.2. *Neocalanus* 属カイアシ類の系統解析

カイアシ類では, 形態に基づく古典的(あるいは直感的), 数量的(表形的), 分岐学的系統解析が数多く行われてきた (Nishida, 1985; Park, 1986; Ho, 1990; 1994; Huys and Boxshall, 1991; Huys and Böttger-Schnack, 1994; Ohtsuka *et al.*, 1994; 1997; Amado *et al.*, 1995; Humes and Boxshall, 1996)。しかしながら, 形態情報は定量化と客観的分析が難しく (Russell, 1916; Stevens, 1991; 三中, 1997), しかもカイアシ類のような単純な体制をもつ生物から多数の系統情報を得ることは, たとえ微細構造を観察できたとしても多くの困難を伴う。

著者らはこれまでに開発したプライマーを用い, *Neocalanus* 属の系統解析を試みた。本属カイアシ類は, 北太平洋と南半球亜寒帯域の動物プランクトン群集で優占し, 有用水産魚種の重要な餌料となっている大型のカイアシ類であり, 多くの研究によりさまざまな生態学的知見が明らかにされてきている。この解析の結果, 全 6 種から約 4 千塩基対のミトコンドリア DNA を増幅, 塩基配列の決定に成功した (Machida *et al.*, 2006)。解析から得られた COI, ND4L, ND6, srRNA, lrRNA 遺伝子の塩基配列情報をもとに系統解析を行なった結果,

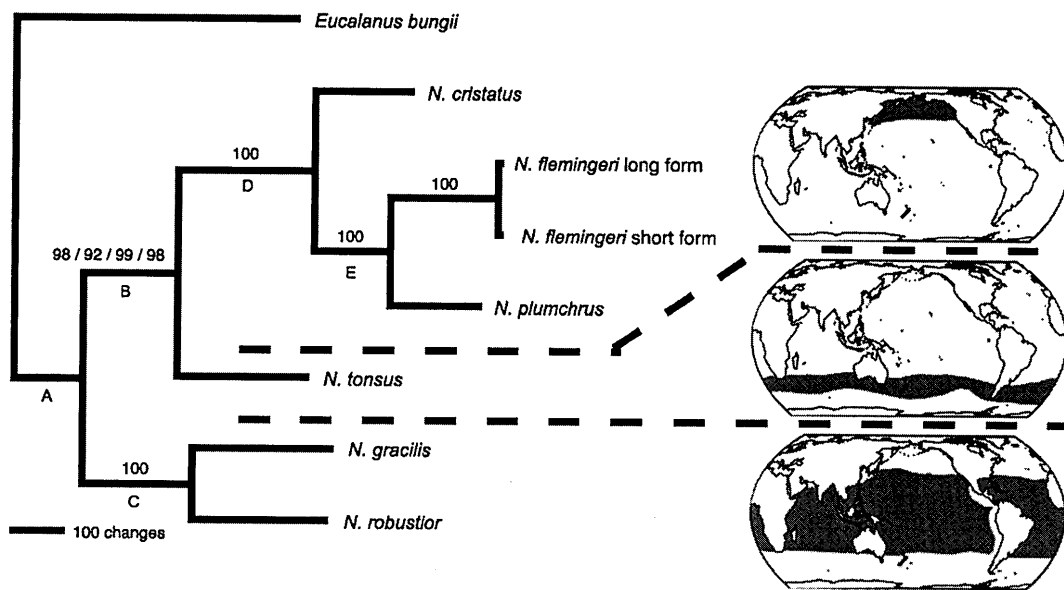
非常に統計的信頼度の高い系統樹が得られた (Fig. 2)。この系統関係と, 本属カイアシ類の分布を比較した結果, 以下の事柄が推定された。

### 1) 本属カイアシ類の系統関係は, 異所的な種分化により特徴づけられる

本属カイアシ類の種分化の過程を見ると (Fig. 2), まず始めに熱帯・亜熱帯域に生息する, *N. gracilis* と *N. robustior* の祖先種と, 他の亜寒帯性種 *N. cristatus*, *N. plumchrus*, と *N. flemingeri* の祖先種が分化していることがうかがえる (Fig. 2; 分岐 A)。続いて, 北太平洋亜寒帯域に生息する *N. cristatus*, *N. plumchrus* と *N. flemingeri* の祖先種が, 南半球亜寒帯域に生息する *N. tonsus* と分化している (Fig. 2; 分岐 B)。

特に後者のことがらに注目すると, これら二つの系統は, 系統的に姉妹関係にあるものの, その分布域は熱帯・亜熱帯海域を挟み大きく分断されている。このように, 系統的に近縁である生物群が, 熱帯域を挟み南北の高緯度域に分布する現象を反熱帯性分布 (antitropical distribution, もしくは anti tropic distribution) とよび, 動物プランクトン群集においてもその例が報告されている。生物種のこのような反熱帯性分布の獲得にはいくつかのメカニズムが提案されており, それらは大きく分けて分散 (dispersal) と分断 (vicariance) に分けられる (Burrige, 2002)。まず分散においては, 南北どちらかの半球に存在した集団の一部が赤道域をまたぎ移動し, もう一方の半球に侵入することにより説明づけられる。一方の分断は熱帯域に生息していた集団が種間競争や中新世中期の赤道周辺海域の海水温の上昇といった要因により, 赤道を境として南北にその集団が分断され, それぞれ独立した集団を構成するというものである。

本研究で著者らが解析対象とし, 反熱帯性分布を示した *N. tonsus*, *N. cristatus*, *N. plumchrus* と *N. flemingeri* の 4 種は, いずれも発育段階に伴う季節的鉛直移動を行うことが知られている (Miller, 1988)。このことはこれら 4 種の祖先種が, 季節性のある海域において進化したことを示しており, よって起源となる集団は‘熱帯に分布していたことを仮定しない分散’により反熱帯性分布を獲得した, と解釈することが妥当であると思われる。



**Fig. 2.** The 50% majority rule consensus tree from the Bayesian analyses of the combined data including ND6, ND4l, COI, srRNA, and lrRNA from six *Neocalanus* species plus one form and one outgroup species *Eucalanus bungii*. The GTR + I + G model of sequence evolution was used. Numbers beside internal branches indicate Bayesian posterior probabilities and bootstrap values for 100 (maximum-likelihood, ML), 1,000 (maximum-parsimony, MP), 10,000 (neighbor-joining, NJ) replicates. A single number indicates that value were the same for all analyses. Distribution pattern of the *Neocalanus* species were also indicated by map with shading, those estimated from literature (Vervoort 1946, 1957; Sewell 1947; Mullin and Evans 1976; Miller *et al.*, 1984; Miller and Clemons 1988; Miller *et al.*, 1999).

それではいかにして、亜寒帯性の *Neocalanus* 属は熱帯域をまたぎ分散することが可能であったのだろうか。これまでに動物プランクトン群集においては、二つの方法で赤道を超えての集団の移動の可能性が指摘されている。まず始めはヤムシ類 *Eukrohnia hamata* などで指摘されている、中・深層の低海水温域を経路とするもの (Dunbar, 1979)。もう一つは氷河期に熱帯域を含む高海水温域が狭まり、反熱帯性集団の分散が可能になった可能性が指摘されている (Burrige, 2002)。中・深層の低海水温域を経路とする分散はヤムシ類など肉食性もしくは雑食性の動物では可能かもしれない。しかしながら *Neocalanus* 属のように表層の一時生産に強く依存する生物が中・深層以深を長期間かけ移動し、もう一方の半球に移動するとは考えづらい。では氷河期に表層の高海水温域が狭まり、両極の低水温水塊が接近し分散を可能としたのだろうか。このときに二つの疑問が生じる。一つ目は氷河期に低緯度海域の表層海水温

が分散を可能にするほどに十分低下したのか (Dunbar, 1979)。もう一つは *Neocalanus* 属は熱帯・温帯海域に適応した *N. gracilis* と *N. robustior* が分布しており、仮定する氷河期に表層海水温が低下したのなら、それらの祖先種は絶滅してしまう可能性がある。ここで熱帯・温帯性の *N. gracilis* と *N. robustior* の分布をみてみると (Mullin and Evans, 1976)、これら2種はともに太平洋東部の熱帯・亜熱帯域の湧昇域に出現しない。このことは、氷河期に熱帯域を含む高水温海域が狭まりながらも、そこに生息する *N. gracilis* と *N. robustior* とともに高水温域が存在し続け、一方、現在は反熱帯性分布する *Neocalanus* 属カイアシ類の祖先種は湧昇域を橋渡しとして分散を可能にしたのではないだろうか。今後、これらのことがら分子時計の適用とともに詳細に検証する必要がある。

## 2) 北太平洋亜寒帯域に最多の3種が出現する

本属カイアシ類は南半球亜寒帯域には1種のみが出



現するものの、北太平洋亜寒帯域には最多の3種が出現する。このような分布を可能にする要因として本海域の特徴の一つである縁辺海の存在が考えられた(西村, 1981)。北太平洋亜寒帯域には、中規模の縁辺海(ベーリング海, オホーツク海, 日本海)が存在する。氷河期にこれらの海の水位が低下し、他の海との交流が分断され、新たな種を生み出す舞台になった可能性が推察される。現在これら3種は同所的に出現するものの、再生産の時期が異なっている(Miller *et al.*, 1984; Conover, 1988; Miller, 1988; Miller and Terazaki, 1989; Kobari and Ikeda, 1999, 2001a, b; Tsuda *et al.*, 1999, 2001)。氷河期以降、独立した種が再会し生態的に住み分けた結果であると推察され、このことも先に紹介した分散プロセスの検証とともに分子時計を適用し、分化時期を推定しその妥当性を検証する必要がある。

なお Bucklin *et al.*, (2003) は、ミトコンドリア COI 遺伝子領域、639 塩基対を用い *Neocalanus* 属の系統解析を行っているが、得られた樹形は統計的信頼度が低く、著者らの研究によって明らかにされた樹形と異なっていた。このことは、本研究で用いた程度の情報量がカイアシ類の属内の系統関係を明らかにするためには必要であることの目安になるものと思われる(適切な外群の選択, 適当な進化速度を持つ遺伝子の選択, それぞれの属が成立してから経過した時間など他の要因も考えられる)。

### 2.3. ミトコンドリア偽遺伝子の解析

偽遺伝子とはゲノム内に存在する機能していない遺伝子コピーのことである。ミトコンドリア DNA 配列分析がさまざまな動物を対象として進められるに従い、核ゲノムに存在するミトコンドリア DNA の偽遺伝子(nuclear mitochondrial pseudogene: Numt) が多数報告されてきている(Bensasson *et al.*, 2001)。誤って決定されたミトコンドリア偽遺伝子の配列は、系統解析または集団構造の解析に用いられると誤った関係を導き出すことがあるため、ミトコンドリア DNA の情報を扱う場合には注意が必要である。

著者らは *Neocalanus* 属カイアシ類の系統解析を進める過程において、偽遺伝子の存在を示唆するデータを得たため(エレクトロフェノグラムでのダブルピーク, 単一

個体内の多数塩基配列型)、偽遺伝子は mRNA には転写されないという特徴を利用し、mRNA の解析を進めた(Machida, 2003)。解析では *N. cristatus*, *N. flemingeri*, *N. plumchrus* それぞれの個体から、DNA と RNA を抽出し、得られた配列を比較した。DNA からは、まず始めに約 4 千塩基対をロング PCR により増幅した後、このロング PCR 産物を鋳型に再度 COI 領域内部を PCR により増幅し、この PCR 産物をクローニングの後、配列を決定した。RNA からは、まず cDNA を逆転写酵素により合成したのち、この cDNA を鋳型に COI 領域内部を PCR により増幅し、この PCR 産物をクローニングの後、配列を決定した。得られた結果を Table 4 に示す。DNA と RNA を鋳型に決定した配列を比較した場合、その塩基多様度( $\pi$ )が解析した全ての個体で DNA をもとに決定した配列で大きく、一方 RNA をもとに決定した配列では非常に小さい値が観察された。このことは、RNA からは一つの配列のみが得られたものの(わずかに観察された塩基置換は、PCR 時のミスコピーの範囲内であると推察される)、DNA からは多数の配列が得られていることを示しており、mRNA として転写されない多数の偽遺伝子の存在を示している。また、本研究の解析途中で *N. plumchrus* の DNA をもとに決定した塩基配列の一部が、*N. cristatus* の配列と組換えを起こしている例が見つかった(Fig. 3; クローン番号 PG4-5)。この配列は、*N. plumchrus* と *N. cristatus* で独立にミトコンドリア DNA 配列が核 DNA にコピーされ偽遺伝子になったあと、これらカイアシ類が交雑し偽遺伝子どうしが組換えしたものであると推察された。これらの結果は分子遺伝学的に興味深い現象であるとともに、フィールドでのカイアシ類の交雑を示す貴重な事例であると言える。

また、著者らは上記の偽遺伝子の影響により誤った *Neocalanus* 属の系統関係を推察した可能性を検証するために、偽遺伝子の可能性がある DNA を鋳型として決定した配列と偽遺伝子は含まれない RNA を鋳型として決定した配列をともに解析に含め、再度本属の系統解析を行った。その結果、同一個体から得られた DNA と RNA をもとに決定された二つの配列は 100% の高い統計学的信頼度でクレードを形成したことから、偽遺伝子の影響により誤った本属カイアシ類の系統関係が

**Table 4.** Characteristics of multiple COI sequences in the three *Neocalanus* species.

<i>Neocalanus</i> species	Individual number	DNA				RNA			
		No. of clones sequenced	Ka/Ks <sup>†</sup>	$\pi \times 10^3$	No of Indels <sup>‡</sup> (mean length)	No. of clones sequenced	Ka/Ks <sup>†</sup>	$\pi \times 10^3$	No of Indels <sup>‡</sup> (mean length)
<i>N. cristatus</i>	381	5	3/3	4.14	1 (1)	7	5/1	3.44	1 (1)
	382	8	7/8	5.56	1 (1)	5	0/0	0.80	1 (1)
	385	7	4/2	2.54	0 (0)	7	1/3	2.29	0 (0)
	386	4	8/27	22.96	1 (1)	7	2/1	1.72	1 (1)
<i>N. flemingeri</i>	387	8	8/28	12.05	1 (3)	6	0/1	1.00	0 (0)
	388	8	6/4	3.70	1 (1)	8	3/2	1.87	0 (0)
	389	4	1/6	4.94	1 (1)	4	1/0	0.75	0 (0)
<i>N. plumchrus</i>	407	6	28/61	36.28	3 (1)	6	6/0	3.18	2 (1)
	408	8	14/96	34.56	3 (13)	6	3/3	3.55	0 (0)
	409	8	29/149	41.81	0 (0)	7	6/1	3.55	0 (0)
	168	6	7/180	78.54	1 (1)				

<sup>†</sup> Ka; number of non-synonymous substitution, Ks; number of synonymous substitution

<sup>‡</sup> Indels; insertions and deletions

推察された可能性は少ないことが示された。しかし、依然として *Neocalanus* 属以外のカイアシ類を対象とした場合に、偽遺伝子が解析結果に与える影響は予測できず、場合によっては誤った系統関係を導き出すことが想像される。これらの事から、今後カイアシ類のミトコンドリア DNA を利用した研究では、少なくともクローニングを行い多数の配列が存在しないか検証を行い、場合によっては RNA の解析を行う必要があると思われる。

### 3. 動物プランクトンの網羅的解析

近年の DNA 分析法の進展は、本手法を生物多様性研究の必須ツールとした。このような状況のなか、これまで動物プランクトンにおける DNA 分析を用いた研究では、特定の分類群を対象とした集団遺伝学、または系統解析が中心に行われており、海洋環境にて高い多様性を示す動物プランクトンのほとんどは解析対象となっていない。このため、著者らは採集された試料を分類せず‘動物プランクトン・マス (多種の動物プランクトンの塊)’のまま分析に供し、自動化されたシステムを用い網羅的に塩基配列を決定し、迅速なデー

タの収集を目指すとともに、ネット中に出現する全ての動物プランクトンを解析対象とすることにより、その多様性を把握することを目的とし、研究を進めている (Fig. 4)。また、本研究では、鋳型 DNA に一般的に利用されている DNA の代わりに、mRNA から逆転写した cDNA を利用する。このことにより、先に示したカラノイダ目カイアシ類でその存在が指摘されてきたミトコンドリア偽遺伝子を解析から除外できるようになるほか、転写された mRNA に特有の 3' 末端のポリ (A) 構造をプライマー領域とすることにより、ミトコンドリア COI 遺伝子の解析領域をこれまで一般的であった 700 塩基から約 1,500 塩基対に伸ばすことが可能となった。

試料は、ポンペイ沖 [東京大学海洋研究所白鳳丸 (KH-04-05); St. SX-31] にて ORI ネット (目合 690  $\mu\text{m}$ ) を用い水深 721 m からの傾斜曳きにより採集した。試料は船上で直ちに半分に分割したのち、一方を 100% エタノールで保存、もう一方を TRIzol (Invitrogen) とともにホモジナイズし  $-80^\circ\text{C}$  で保存し、研究室に持ち帰った。研究室にてホモジナイズされたサンプルから Total RNA を抽出したのち、mRNA を選択し、cDNA ライブ

Variable sites		
Clone number	[000000000000000011111111111111]	[Acc.num.]
(Ind.num.)	[001224466778899900225667788999]	
	[450256947462524706147392317369]	
CG1-1 (C1)	TTTTCGTTGCCGGTACTCAATATTATCGA	[AB099151]
CG1-2 (C1)	.....	[AB099152]
CG1-3 (C1)	.....	[AB099153]
PG4-5 (P4)	C.CGT.....A...T.....	[AB099265]
PG4-1 (P4)	C.CG.CACCTAATCTTGTTGCTACCTCTAT	[AB099261]
PG4-2 (P4)	CCCGTTACCTAATCTTGTTGCTACCTCTAC	[AB099262]
PG4-3 (P4)	CCCGTTACCTAATCTTGTTGCTACCCCTAT	[AB099263]

Fig. 3. Extracted variable sites of *Neocalanus plumchrus* clone sequences in which more than two variations in single site with the alignment of *Neocalanus cristatus* was observed. Numbers between lines refer to the site where the multiple variations were observed. Line box indicate the region where the recombination was indicated. Gray box is the putative source segment of recombination.

ラリーを作成した(この段階のライブラリーには、ネット採集された全ての動物プランクトンの全ての発現遺伝子が含まれていることになる)。続いて、このcDNAを鋳型にミトコンドリアCOI遺伝子をPCRにより選択・増幅し、ミトコンドリアCOIライブラリーを作成した(この段階のライブラリーにはほぼ全ての動物プランクトンのミトコンドリアCOI遺伝子配列が含まれていることになる)。作成されたミトコンドリアCOIライブラリーをもとにその塩基配列を網羅的に決定した(Fig. 4)。

解析の結果、作成されたライブラリーから1,336のミトコンドリアCOI遺伝子の配列を決定した。得られた配列の遺伝距離を全ての配列間で比較し、その値の頻度分布を見ると、11%において極小値が観察された。このことから11%以下を同種内の変異、11%より大きな値を別種として解析を進めた。この指標に従い、これまで読み進めた1,336の塩基配列から、192種の出現が予想

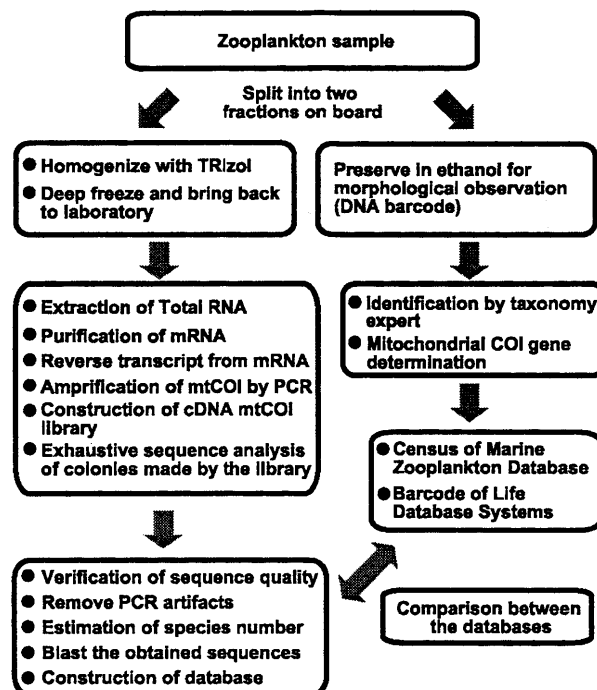


Fig. 4. Experimental flowchart of exhaustive zooplankton community genomic analysis.

された。一方、本解析の欠点は実験の初期段階にて、全ての動物プランクトン試料をホモジナイズするために、決定された塩基配列がどの動物プランクトンに起源するのかわからないことである。このため得られた全ての塩基配列は国際的DNAデータベースに登録されている塩基配列と相同性を比較し(BLAST検索)、起源種の特定を試みた。その結果、配列の起源の特定された種は少ないものの、カイアシ類の*Neocalanus robustior*や魚類のシイラ(*Coryphaena hippurus*)、頭足類のトビイカ(*Sthenoteuthis oualaniensis*)と言ったさまざまな動物が採集されていることが明らかとなった。今後、後述するBarcode of Lifeプロジェクトなどにより動物プランクトンDNA塩基配列のデータベース化が進むと、本解析から得られた塩基配列もその起源種の特定を精度よく行うことが可能となることが予想される。さらに、本解析で得られた全てのミトコンドリアCOI遺伝子の塩基配列情報は全てデータベース化する(CMarZ Asia-Database; <http://www.cmarz-asia.org/db/>)。このデータベースを利用することにより、さまざまな海洋動物の研究者は対象とする動物のミトコンドリアCOI

遺伝子が本データベース内に存在するのか、検索することが可能となり、データベース内に同種と思われるミトコンドリア COI 遺伝子が存在した場合は、本解析を行った地点にその種が出現することを示すものとなる。

今後、本研究はよりさまざまな海域で試料を採集し分析を進めるとともに、解析遺伝子領域を増やすことなどにより、解析の精度を上げていきたいと考える。

#### 4. 国際プロジェクト

DNA 塩基配列情報を用いた海洋動物プランクトン研究を進めるうえで、特に関連性の高い国際プロジェクト二つ (Census of Marine Life, Barcode of Life) について紹介する。Census of Marine Life (<http://www.coml.org/>) は 80 を超える国の研究者からなるネットワークで、過去から現在にわたり全海洋生物の多様性、分布、個体数を 2010 年までに把握することを目標とした壮大なプロジェクトである。本プロジェクトには 14 の個別テーマが与えられたフィールドプロジェクトが含まれ、著者が参加する海洋動物プランクトンをテーマとした Census of Marine Zooplankton (<http://www.cmarz.org/>) はその一つであり、全海洋規模での動物プランクトンの多様性に関する調査、研究、および知見の総括を目的とする。一方、Barcode of Life (<http://www.barcoding.si.edu/>) は地球上の全生物を短い特定の遺伝子領域の塩基配列で識別を可能とするためのデータベース構築を目的とした基盤的研究である。これらのプロジェクトは互いに協力関係にあり、Census of Marine Zooplankton で決定されたミトコンドリア COI 遺伝子の塩基配列は、Barcode of Life のデータとしてデータベース化される。

今後これら各種の DNA 塩基配列情報のデータベース化が進むと、これまでは技術的に難しかったさまざまな海洋でおこる生命現象、生態学的現象がより効率的に解明されることが期待される。

#### 5. 今後の展開

DNA 分析法はその技術や手法が近年飛躍的に改良されており、塩基配列情報は系統解析や、集団遺伝学と

言った特定生物の進化過程を推察するために利用されるのみならず、さまざまな利用法が示されている。この中で著者が最近特に注目する手法として、バクテリアや単細胞生物を対象として進んでいるメタゲノム解析がある (Committee on Metagenomics, 2007)。メタゲノム解析は海水や土壌、大気などの環境中から、直接 DNA もしくは RNA を抽出し、そこに存在する生物を塩基配列情報から推察する手法である。環境中に存在する微生物はそのほとんど (99%以上) が難培養性であり、このためメタゲノムなどの塩基配列情報に基づく解析法が適用されるまで、微生物群集のほとんどは出現すらも明らかにされてこなかったわけである。メタゲノム解析は例えば人間の腸内細菌、下水処理施設などさまざまな研究分野で適用されており、飛躍的にその有用性が認識されつつある新規な研究分野である。また、著者が進める動物プランクトンの網羅的解析はとりもなおさずメタゲノム解析を後生動物に適用した例であり、このことはメタゲノム解析が単細胞生物のみならず、後生動物にも適用が可能であることを示している。著者の壮大な希望としては、このメタゲノム解析を用い海洋生態系の全コミュニティの多様性を把握し、多様性の機能検証を進めていきたいと考える。

また、このメタゲノム解析のように、大量の DNA 塩基配列データを扱う研究が比較的頻繁に行われるようになってきている (Venter *et al.*, 2004; DeLong *et al.*, 2006)。このような状況の中、Margulies *et al.*, (2005) はこれまでにない全く新しい DNA 塩基配列決定法を開発した。詳しい技術的な説明は割愛するが、この方法によると、約 7.5 時間で一億塩基対以上の DNA 塩基配列の決定が可能となり、これまでの一般的な手法と比較すると約 100 倍以上の解析能力となっている (現在この技術を利用したシーケンサー、Genome Sequencer FLX がロシュ・ダイアグノスティクス株式会社から販売されている。また、上記以外にもさまざまな DNA 塩基配列決定法が開発されており、いずれもこれまで一般的に利用されてきた DNA シーケンサーと比較すると単位塩基の決定にかかる費用は安価に押さえられている。このような技術革新は今後も続くことが予想され、先に述べた海洋生態系の全コミュニティの多様性の把握とその機能検証と云った壮大な計画も夢

ではなく、現実的な研究計画であることを理解していただけたと思う。

## 6. おわりに

1999年4月、私は東京大学海洋研究所浮遊生物分野に博士課程として入学するとともに、それまでに修士課程で進めた研究分野とは大きく異なるカイアシ類の分子進化学的研究を進めることとなりました。生物の進化に興味を持っていたため、本研究テーマを進められることを非常に喜んだことを覚えています。その後の私の研究は決して順調に進んだとは言いがたいものでした。私がカイアシ類の分子進化学的研究を始めた当時、この研究分野は現アメリカ・コネチカット大学教授の Ann Bucklin 博士らのグループにより精力的に進められていました。私自身も Bucklin 博士らの論文を参考に試行錯誤に実験を進めましたが、分子生物学的実験を初めて経験する私はなかなかデータを出すことができなかつたことを覚えています。今となればカイアシ類ミトコンドリア DNA の特異性が明らかになり、なぜ実験がうまく行かなかつたかは明白となったわけですが、分子生物学的研究を初めて経験する私は結局博士課程1年目はPCRすら成功せず、全くデータが得られませんでした。翌年の博士課程2年目からは白鳳丸の航海で一緒に乗船した千葉県立中央博物館の宮正樹博士、また現東京大学海洋研究所所長の西田睦博士、西田研究室(東京大学海洋研究所分子生命科学分野)のメンバーとの議論、指導を仰ぐ機会を得て、ひとまずではありますがデータが出始めました。今そのときを思い出し考えることは、コミュニケーションが私の研究を進めるに当たっていかに重要であったかを認識するとともに、東京大学海洋研究所の教育機関としての環境に感謝する次第です。

## 謝辞

このたび、名誉ある日本海洋学会岡田賞を戴いたことは、大変うれしく思うとともに、その責任から身の引き締まる思いがいたします。このような成果を残せたのはひとえに、これまでお世話になった多くの方々のおかげであると感謝しています。指導教官としてご指導いただいた東京大学海洋研究所浮遊生物分野教授

の西田周平博士、研究施設の使用を快諾いただいただけでなく、研究の節目節目で適切なアドバイスをいただいた東京大学海洋研究所所長の西田睦教授、ミトコンドリア DNA 全塩基配列決定実験を進める上で指導いただくとともに、論文の校閲をいただいた千葉県立中央博物館の宮正樹博士に心から感謝いたします。また、共に研究を進めてきた東京大学海洋研究所浮遊生物分野、同じく分子生命科学分野西田研究室の先生方、先輩方、同窓のみなさまのご意見、ご指導、ご協力に深く感謝いたします。また、最後にご推薦およびご選考いただいた先生方、学会員のみなさまに厚く御礼申し上げます。

## References

- Amado, M. A. P., J. S. Ho, and C. E. F. Rocha (1995): Phylogeny and biogeography of the Ergasilidae (Copepoda, Poecilostomatoida), with reconsideration of the taxonomic status of the Vaigamidae. *Contributions to Zool.*, **65**, 233-243.
- Avise, J. C. (1994): *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York, 511 pp.
- Avise, J. C. (2000): *Phylogeography*. Harvard University Press, London, 447 pp.
- Bensasson, D., D.-X. Zhang, D. L. Hartl, and G. M. Hewitt (2001): Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecol. Evol.*, **16**, 314-321.
- Braga, E., R. Zardoya, A. Meyer, and J. Yen (1999): Mitochondrial and nuclear rRNA based copepod phylogeny with emphasis on the Euchaetidae (Calanoida). *Mar. Biol.*, **133**, 79-90.
- Bucklin, A., B. W. Frost, and T. D. Kocher (1992): DNA sequence variation of the mitochondrial 16S rRNA in *Calanus* (Copepoda; Calanoida): intraspecific and interspecific patterns. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, **1**, 397-407.
- Bucklin, A., and T. C. Lajeunesse (1994): Molecular genetic variation of *Calanus pacificus* (Copepoda: Calanoida): preliminary evaluation of genetic structure and subspecific differentiation based on mtDNA sequences. *CalCOFI. Rep.*, **35**, 45-51.
- Bucklin, A., B. W. Frost, and T. D. Kocher (1995): Molecular systematics of six *Calanus* and three *Metridia* species (Calanoida: Copepoda). *Mar. Biol.*, **121**, 655-664.

- Bucklin, A., and T. D. Kocher (1996): Source regions for recruitment of *Calanus finmarchicus* to Georges Bank: evidence from molecular population genetic analysis of mtDNA. *Deep-Sea Res. Part II*, **43**, 1,665–1,681.
- Bucklin, A., T. C. LaJeunesse, E. Curry, J. Wallinga, and K. Garrison (1996): Molecular diversity of the copepod, *Nannocalanus minor*: genetic evidence of species and population structure in the North Atlantic Ocean. *J. Mar. Res.*, **54**, 285–310.
- Bucklin, A., and P. H. Wiebe (1998): Low mitochondrial diversity and small effective population sizes of the copepods *Calanus finmarchicus* and *Nannocalanus minor*: Possible impact of climatic variation during recent glaciation. *J. Heredity*, **89**, 383–392.
- Bucklin, A., M. Guarnieri, R. S. Hill, A. M. Bentley, and S. Kaartvedt (1999): Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive, species-specific PCR. *Hydrobiologia*, **401**, 239–254.
- Bucklin, A., S. Kaartvedt, M. Guarnieri, and U. Goswami (2000): Population genetics of drifting (*Calanus spp.*) and resident (*Acartia clausi*) plankton in Norwegian fjords. *J. Plankton Res.*, **22**, 1,237–1,251.
- Bucklin, A., B. W. Frost, J. Bradford-Grieve, L. D. Allen, and N. J. Copley (2003): Molecular systematic and phylogenetic assessment of 34 calanoid copepod species of the Calanidae and Clausocalanidae. *Mar. Biol.*, **142**, 333–343.
- Burridge, C. P. (2002): Antitropicality of Pacific fishes: molecular insights. *Environ. Biol. Fish.*, **65**, 151–164.
- Burton, R. S., and B.-N. Lee (1994): Nuclear and mitochondrial gene genealogies and allozyme polymorphism across a major phylogeographic break in the copepod *Tigriopus californicus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5,197–5,201.
- Burton, R. S. (1998): Intraspecific phylogeography across the Point Conception biogeographic boundary. *Evolution*, **52**, 734–745.
- Cantatore, P., M. N. Gadaleta, M. Roberti, C. Saccone, and A. C. Wilson (1987): Duplication and remoulding of tRNA genes during the evolutionary rearrangement of mitochondrial genomes. *Nature*, **329**, 853–855.
- Committee on Metagenomics (2007): *New Science of Our Microbial Planet*. The National Academies Press, Washington, DC., 158 pp.
- Conover, R. J. (1988): Comparative life histories in the genera *Calanus* and *Neocalanus* in high latitudes of the northern hemisphere. *Hydrobiologia*, **167/168**, 127–142.
- DeLong, E. F., C. M. Preston, T. Mincer, V. Rich, S. J. Hallam, N. U. Frigaard, A. Martinez, M. B. Sullivan, R. Edwards, B. R. Brito, S. W. Chisholm, and D. M. Karl (2006): Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. *Science*, **311**, 496–503.
- Dowton, M., and N. J. H. Campbell (2001): Intramitochondrial recombination: is it why some mitochondrial genes sleep around? *Trends in Ecol. Evol.*, **16**, 269–271.
- Dunbar, M. J. (1979): The relation between the oceans, 112–125. In: *Zoogeography and Diversity of Plankton*, edited by S. van der Spoel and A. C. Pierrot-Bults, Halsted Press, New York.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek (1994): DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **3**, 294–299.
- Hatzoglou, E., G. C. Rodakis, and R. Lecanidou (1995): Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the land snail *Albinaria coerulea*. *Genetics*, **140**, 1,353–1,366.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. Dewaard (2003): Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Royal Soc. London Series B*, **270**, 313–321.
- Ho, J. S. (1990): Phylogenetic analysis of copepod orders. *J. Crustacean Biol.*, **10**, 528–536.
- Ho, J. S. (1994): Copepod phylogeny: a reconsideration of Huys and Boxshall's 'parsimony versus homology'. *Hydrobiologia*, **292/293**, 31–39.
- Hoffmann, R. J., J. L. Boore, and W. M. Brown (1992): A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Genetics*, **131**, 397–412.
- Humes, A. G. (1994): How many copepods? *Hydrobiologia*, **292/293**, 1–7.
- Humes, A. G., and G. A. Boxshall. (1996): A revision of the lichomolgoid complex (Copepoda: Poecilostomatoida), with the reconstruction of six new families. *J. Natural History*, **30**, 175–227.
- Huys, R., and G. A. Boxshall (1991): *Copepod Evolution*. The Ray Society, London, 468.
- Huys, R., and R. Bottger-Schnack (1994): Taxonomy, biology and phylogeny of Miraciidae (Copepoda: Harpacticoida). *Sarsia*, **79**, 207–283.
- Kobari, T., and T. Ikeda (1999): Vertical distribution, population structure and life cycle of *Neocalanus cristatus* (Crustacea: Copepoda) in the Oyashio region, with notes on its regional variations. *Mar. Biol.*, **134**, 683–696.
- Kobari, T., and T. Ikeda (2001a): Ontogenetic vertical migration and life cycle of *Neocalanus plumchrus* (Crustacea: Copepoda) in the Oyashio region, with notes

- on regional variations in body sizes. *J. Plankton Res.*, **23**, 287–302.
- Kobari, T., and T. Ikeda (2001b): Life cycle of *Neocalanus flemingeri* (Crustacea : Copepoda) in the Oyashio region, western subarctic Pacific, with notes on its regional variations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **209**, 243–255.
- Kumazawa, Y., H. Ota, M. Nishida, and T. Ozawa (1998): The complete nucleotide sequence of a snake (*Dinodon semicarinatus*) mitochondrial genome with two identical control regions. *Genetics*, **150**, 313–329.
- Kurabayashi, A., and R. Ueshima (2000): Complete sequence of the mitochondrial DNA of the primitive opisthobranch gastropod *Pupa strigosa*: systematic implication of the genome organization. *Mol. Biol. Evol.*, **17**, 266–277.
- Lavrov, D. V., J. L. Boore, and W. M. Brown (2002): Complete mtDNA sequences of two millipedes suggest a new model for mitochondrial gene rearrangements: duplication and nonrandom loss. *Mol. Biol. Evol.*, **19**, 163–169.
- Lee, C. E. (1999): Rapid and repeated invasions of fresh water by the copepod *Eurytemora affinis*. *Evolution*, **53**, 1,423–1,434.
- Lee, C. E. (2000): Global phylogeography of a cryptic copepod species complex and reproductive isolation between genetically proximate “populations”. *Evolution*, **54**, 2,014–2,027.
- Levinson, G., and G. A. Gutman (1987): Slipped strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 203–221.
- Lunt, D. H., and B. C. Hyman. (1997): Animal mitochondrial DNA recombination. *Nature*, **387**, 247–247.
- Macey, J. R., A. Larson, N. B. Ananjeva, Z. L. Fang, and T. J. Papenfuss (1997): Two novel gene orders and the role of light strand replication in rearrangement of the vertebrate mitochondrial genome. *Mol. Biol. Evol.*, **14**, 91–104.
- Macey, J. R., J. A. Schulte, A. Larson, and T. J. Papenfuss (1998): Tandem duplication via light strand synthesis may provide a precursor for mitochondrial genomic rearrangement. *Mol. Biol. Evol.*, **15**, 71–75.
- Machida, R. J., M. U. Miya, M. Nishida, and S. Nishida (2002): Complete mitochondrial DNA sequence of *Tigriopus japonicus* (Crustacea: Copepoda). *Mar. Biotechnol.*, **4**, 406–417.
- Machida, R. (2003): Ph. D. Thesis; *Structural characteristics of copepods mitochondrial DNA and its application for phylogenetic studies*. University of Tokyo, Tokyo. 83 pp.
- Machida, R. J., M. U. Miya, M. Nishida, and S. Nishida (2004): Large-scale gene rearrangements in the mitochondrial genomes of two calanoid copepods *Eucalanus bungii* and *Neocalanus cristatus* (Crustacea), with notes on new versatile primers for the srRNA and COI genes. *Gene*, **332**, 71–78.
- Machida, R. J., M. U. Miya, M. Nishida, and S. Nishida (2006): Molecular phylogeny and evolution of the pelagic copepod genus *Neocalanus* (Crustacea: Copepoda). *Mar. Biol.*, **148**, 1,071–1,079.
- Margulies, M., M. Egholm, W. E. Altman, S. Attiya, J. S. Bader, L. A. Bemben, J. Berka, M. S. Braverman, Y. J. Chen, Z. T. Chen, S. B. Dewell, L. Du, J. M. Fierro, X. V. Gomes, B. C. Godwin, W. He, S. Helgesen, C. H. Ho, G. P. Irzyk, S. C. Jando, M. L. I. Alenquer, T. P. Jarvie, K. B. Jirage, J. B. Kim, J. R. Knight, J. R. Lanza, J. H. Leamon, S. M. Lefkowitz, M. Lei, J. Li, K. L. Lohman, H. Lu, V. B. Makhijani, K. E. McDade, M. P. McKenna, E. W. Myers, E. Nickerson, J. R. Nobile, R. Plant, B. P. Puc, M. T. Ronan, G. T. Roth, G. J. Sarkis, J. F. Simons, J. W. Simpson, M. Srinivasan, K. R. Tartaro, A. Tomasz, K. A. Vogt, G. A. Volkmer, S. H. Wang, Y. Wang, M. P. Weiner, P. G. Yu, R. F. Begley, and J. M. Rothberg (2005): Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, **437**, 376–380.
- Mauchline, J. (1998): *The Biology of Calanoid Copepods*. Academic press, San Diego, 710.
- Miller, C. B., B. W. Frost, H. P. Batchelder, M. J. Clemons, and R. E. Conway (1984): Life histories of large, grazing copepods in a subarctic ocean gyre: *Neocalanus plumchrus*, *Neocalanus cristatus*, and *Eucalanus bungii* in the Northeast Pacific. *Prog. Oceanog.*, **13**, 201–243.
- Miller, C. B. (1988): *Neocalanus flemingeri*, a new species of calanidae (copepoda: calanoida) from the subarctic Pacific Ocean, with a comparative redescription of *Neocalanus plumchrus* (Marukawa) 1921. *Prog. Oceanog.*, **20**, 223–273.
- Miller, C. B., and M. J. Clemons (1988): Revised life history analysis for large grazing copepods in the subarctic Pacific Ocean. *Prog. Oceanogra.*, **20**, 293–313.
- Miller, C. B., and M. Terazaki (1989): The life histories of *Neocalanus flemingeri* and *Neocalanus plumchrus* in the Sea of Japan. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **36**, 27–41.
- Miller, K. J., J. M. Bradford-Grieve, and J. B. Jillett (1999): Genetic relationship between winter deep-dwelling and spring surface-dwelling female *Neocalanus tonsus* in the Southern Ocean. *Mar. Biol.*, **134**, 99–106.
- 三中 信宏 (1997): 生物系統学. 東京大学出版会, 東京, 458 pp.

- Miya, M., H. Takeshima, H. Endo, N. B. Ishiguro, J. G. Inoue, T. Mukai, T. P. Satoh, M. Yamaguchi, A. Kawaguchi, K. Mabuchi, S. M. Shirai, and M. Nishida (2003): Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **26**, 121–138.
- Moritz, C., and W. M. Brown (1987): Tandem duplications in animal mitochondrial DNAs: variation in incidence and gene content among lizards. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **84**, 7,183–7,187.
- Mullin, M. M., and P. M. Evans (1976): Distribution, morphometry, and seasonal biology of the planktonic copepods *Neocalanus robstior* and *Neocalanus gracilis* in the Pacific Ocean. *Pacific Sci.*, **30**, 119–130.
- Nishida, S. (1985): Taxonomy and distribution of the family Oithonidae (Copepoda, Cyclopoida) in the Pacific and Indian Oceans. *Bull. Ocean Res. Inst., Univ. Tokyo*, **20**, 1–167.
- 西村 三郎 (1981): 地球の海と生命: 海洋生物地理学序説. 海鳴社, 東京, 284 pp.
- Noguchi, Y., K. Endo, F. Tajima, and R. Ueshima (2000): The mitochondrial genome of the brachiopod *Laqueus rubellus*. *Genetics*, **155**, 245–259.
- Ohtsuka, S., G. A. Boxshall, and H. S. J. Roe (1994): Phylogenetic relationships between arietellid genera (Copepoda: Calanoida), with the establishment of three new genera. *Bull. Natural History Museum, London (zoology series)*, **60**, 105–172.
- Ohtsuka, S., H. Y. Soh, and S. Nishida (1997): Evolutionary switching from suspension feeding to carnivory in the calanoid family Heterorhabdidae (Copepoda). *J. Crustacean Biol.*, **17**, 577–595.
- Okimoto, R., H. M. Chamberlin, J. L. Macfarlane, and D. R. Wolstenholme (1991): Repeated sequence sets in mitochondrial DNA molecules of root knot Nematodes (Meloidogyne): nucleotide sequences, genome location and potential for host race identification. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1,619–1,626.
- Okimoto, R., J. L. Macfarlane, D. O. Clary, and D. R. Wolstenholme (1992): The mitochondrial genomes of 2 nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Genetics*, **130**, 471–498.
- Pääbo, S., W. K. Thomas, K. M. Whitfield, Y. Kumazawa, and A. C. Wilson (1991): Rearrangements of mitochondrial transfer RNA genes in marsupials. *J. Mol. Evol.*, **33**, 426–430.
- Park, T. (1986): Phylogeny of calanoid copepods. *Sylogus*, **58**, 191–196.
- Poulton, J., M. E. Deadman, L. Bindoff, K. Morten, J. Land, and G. Brown (1993): Families of mtDNA rearrangements can be detected in patients with mtDNA deletions: duplications may be a transient intermediate form. *Human Mol. Genet.*, **2**, 23–30.
- Rawlings, T. A., T. M. Collins, and R. Bieler (2001): A major mitochondrial gene rearrangement among closely related species. *Mol. Biol. Evol.*, **18**, 1,604–1,609.
- Russell, E. S. (1916): *Form and Function: a Contribution to the History of Animal Morphology*. The University of Chicago Press, Chicago, 383 pp.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487–491.
- Schizas, N. V., B. C. Coull, G. T. Chandler, and J. M. Quattro (2002): Sympatry of distinct mitochondrial DNA lineages in a copepod inhabiting estuarine creeks in the southeastern USA. *Mar. Biol.*, **140**, 585–594.
- Sewell, R. B. S. (1947): The free-swimming planktonic Copepoda. Systematic account. *Scientific reports of the John Murray Expedition 1933–1934*, **8**, 303 pp.
- Shao, R., N. J. H. Campbell, and S. C. Barker (2001): Numerous gene rearrangements in the mitochondrial genome of the Wallaby Louse, *Heterodoxus macropus* (Phthiraptera). *Mol. Biol. Evol.*, **18**, 858–865.
- Sorenson, M. D., J. C. Ast, D. E. Dimcheff, T. Yuri, and D. P. Mindell (1999): Primers for a PCR based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **12**, 105–114.
- Stevens, P. F. (1991): Character states, continuous variation and phylogenetic analysis: a review. *Syst. Biol.*, **16**, 553–583.
- Tang, Y., G. Manfredi, M. Hirano, and E. A. Schon (2000): Maintenance of human rearranged mitochondrial DNAs in long term cultured transmitochondrial cell lines. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 2,349–2,358.
- Terrett, J. A., S. Miles, and R. H. Thomas (1996): Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Cepaea nemoralis* (Gastropoda: Pulmonata). *J. Mol. Evol.*, **42**, 160–168.
- Thyagarajan, B., R. A. Padua, and C. Campbell (1996): Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity. *J. Biol. Chem.*, **271**, 27,536–27,543.
- Tsuda, A., H. Saito, and H. Kasai (1999): Life histories of *Neocalanus flemingeri* and *Neocalanus plumchrus* (Calanoida : Copepoda) in the western subarctic Pacific. *Mar. Biol.*, **135**, 533–544.
- Tsuda, A., H. Saito, and H. Kasai (2001): Geographical variation of body size of *Neocalanus cristatus*, *N. plumchrus* and *N. flemingeri* in the subarctic Pacific and its



- marginal seas: Implications for the origin of large form of *N. flemingeri* in the Oyashio area. *J. Oceanogra.*, **57**, 341–352.
- Venter, J. C., K. Remington, J. F. Heidelberg, A. L. Halpern, D. Rusch, J. A. Eisen, D. Y. Wu, I. Paulsen, K. E. Nelson, W. Nelson, D. E. Fouts, S. Levy, A. H. Knap, M. W. Lomas, K. Neelson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y. H. Rogers, and H. O. Smith (2004): Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, **304**, 66–74.
- Vervoort, W. (1946) Biological results of the Snellius Expedition. The bathypelagic Copepoda Calanoida of the Snellius Expedition. I. Families Calanidae, Eucalanidae, Paracalanidae, and Pseudocalanidae. *Temminckia*, **8**, 1–181.
- Vervoort, W. (1957) Copepods from Antarctic and Subantarctic plankton samples. *Rep. BANZ Antarct. Res. Exped.*, **B3**, 1–160.
- Wilson, A. C., R. L. Cann, S. M. Carr, M. George, U. B. Gyllensten, K. M. Helm-Bychowski, R. G. Higuchi, S. R. Palumbi, E. M. Prager, R. D. Sage, and M. Stoneking (1985): Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.*, **26**, 375–400.
- Wolstenholme, D. R. (1992): Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.*, **141**, 173–216.
- Yamazaki, N., R. Ueshima, J. A. Terrett, S. Yokobori, M. Kaifu, R. Segawa, T. Kobayashi, K. Numachi, T. Ueda, K. Nishikawa, K. Watanabe, and R. H. Thomas (1997): Evolution of pulmonate gastropod mitochondrial genomes: comparisons of gene organizations of *Euhadra*, *Cepaea* and *Albinaria* and implications of unusual tRNA secondary structures. *Genetics*, **145**, 749–758.
- Yokobori, S., T. Ueda, G. Feldmaier-Fuchs, S. Paabo, R. Ueshima, A. Kondow, K. Nishikawa, and K. Watanabe (1999): Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the ascidian *Halocynthia roretzi* (Chordata, Urochordata). *Genetics*, **153**, 1,851–1,862.

## Evolutionary Genetic Studies of Marine Zooplankton with Future Perspective

Ryuji J. Machida<sup>†</sup>

### Abstract

Recent advancement of molecular biological techniques enables us to analyze various kinds of biological and ecological phenomena based on variations of DNA sequence. Without exception, all life forms in the ocean ecosystem have been studied using molecular biological techniques in these days. And many novel discoveries have been reported from those analyses. In this review, the author's hitherto progress on marine zooplankton studies using molecular biological technique has been summarized, including those on the structural characteristics of copepod mitochondrial genomes, mitochondrial pseudogenes, and *Neocalanus* phylogeny. The exhaustive mitochondrial COI gene analysis of whole zooplankton community, which the author currently focuses on, is also discussed. Also introduced are the two major international projects, Census of Marine Life and Barcode of Life, which try to estimate biodiversity of all life forms in the ocean ecosystem with short DNA sequences specific to each biological species. In the future, DNA sequencer and molecular biological techniques will be improved rapidly, and application of those techniques to oceanographic studies will have a strong potential.

**Key words:** Copepoda, mitochondrial DNA, gene rearrangement, pseudogene, phylogeny

(Corresponding author's e-mail address: ryuji@ori.u-tokyo.ac.jp)

(Received 25 September 2007; accepted 17 January 2008)

(Copyright by the Oceanographic Society of Japan, 2008)

---

<sup>†</sup> Ocean Research Institute, University of Tokyo, 1-15-1 Minamidai, Nakano-ku, Tokyo, 164-8639, Japan