

# 立正大学熊谷キャンパス水路に生息する 外来生物カワリヌマエビ *Neocaridina* spp. —遺伝的2系統の生息とHRM解析法による簡易同定—

関根 一希\* 小林 拳大\* 山口 力丸\*

キーワード：甲殻類、DNA、High Resolution Melt 解析、外来生物、リアルタイムPCR

## 1. はじめに

国外外来のヌマエビ科カワリヌマエビ属 *Neocaridina* spp.は、国内各地へ侵入し、分布を拡大させている(豊田・関, 2014)。日本在来のカワリヌマエビ属は、西日本に分布するミナミヌマエビ *Neocaridina denticulata denticulata*と南西諸島に生息するイリオモテヌマエビ *N. iriomotensis*、イシガキヌマエビ *N. ishigakiensis*、コツノエビ *Neocaridina* sp. の3種、壱岐島の *N. ikiensis*のみ認められている(豊田・関, 2014; Shih et al., 2017)。しかし、1990年代から年によっては20トンにもおよぶ大量のブツエビと呼ばれる *Neocaridina* spp. が中国や韓国から釣り餌や観賞用として生きて輸入された(西野・丹羽, 2004; 丹羽, 2010)ため、ブツエビの産地である中国や韓国のカワリヌマエビ属の複数種が国内に入り込んだとされる(丹羽, 2010)。これらは形態的に在来のミナミヌマエビと酷似している他、交雑の可能性もあり、分類学的問題を引き起こしている(西野, 2017)。

このような中、カワリヌマエビ属の自然分布域ではない関東や宮城県、北海道において *Neocaridina* spp. が2000年代から認められるようになってきた(金澤, 2015a, b; 長谷川ら, 2015, 片山ら, 2017)。埼玉県内では、2003年からミナミヌマエビおよび国外からの *Neocaridina* spp. が認められはじめ、2014年には埼玉県内広域での生息が認められている(金澤, 2015a, b)。遺伝子解析や形態比較から、*Neocaridina* spp. の一部は中国に分布する *Neocaridina davidi* である可能性が挙げられており(Mitsugi et al., 2017; 西野, 2017)、島根県や広島県といった在来のミナミヌマエビが分布する西日本からの標本が *N. davidi*として扱われて分子系統解析された先行研究もある(Shih et al., 2017)。また、埼玉県内サンプルを用いた遺伝子解析研究からは、西日本のミ

ナミヌマエビや国外外来生物を含めた *Neocaridina* spp. が複数系統認められることが報告されている(Ishiguro et al., 2018)。

本研究では、立正大学熊谷キャンパスおよびその周辺において形態的にミナミヌマエビに類似した個体が多数採集されており、西日本在来のミナミヌマエビ、あるいは国外からのカワリヌマエビ属 *Neocaridina* spp. といった外来生物が生息しているのかを明らかにするため、形態比較および遺伝子解析を行なった。また、今後の新たな系統の侵入や変遷に対するモニタリングができるように、得られたサンプルの遺伝的特徴から、シーケンスを経なくても、簡易かつ安価にスクリーニングできるリアルタイムPCRを用いたHigh Resolution Melt (HRM) 解析の実験系を開発した。

## 2. 調査方法

### (1) カワリヌマエビ属の採集と形態比較

2016年12月20、23日、2017年11月28日、12月8日および2019年11月20日の生物学実験にて、履修生が手網を用いて立正大学熊谷キャンパス内の水路にて、カワリヌマエビ属のエビ類を採集し、高濃度のエタノールで固定した(図1)。また、2019年12月5日に埼玉県熊谷市熊谷大橋より約500m下流の荒川左岸および熊谷市万吉の和田吉野川左岸からカワリヌマエビ属のエビ類を採集し、同様に固定した。

カワリヌマエビ属のエビ類には、眼窩上棘はなく、眼窩より後部の頭胸甲上に歯がある特徴が認められ、額角の頭胸甲上歯数、額角上縁歯数、および額角下縁歯数といった額角歯相が形態比較に用いられる(金澤, 2015b)。2019年に採集された標本については、先行研究の金澤(2015b)にならって、額角の頭胸甲上歯数、額角上縁

\* 立正大学地球環境科学部

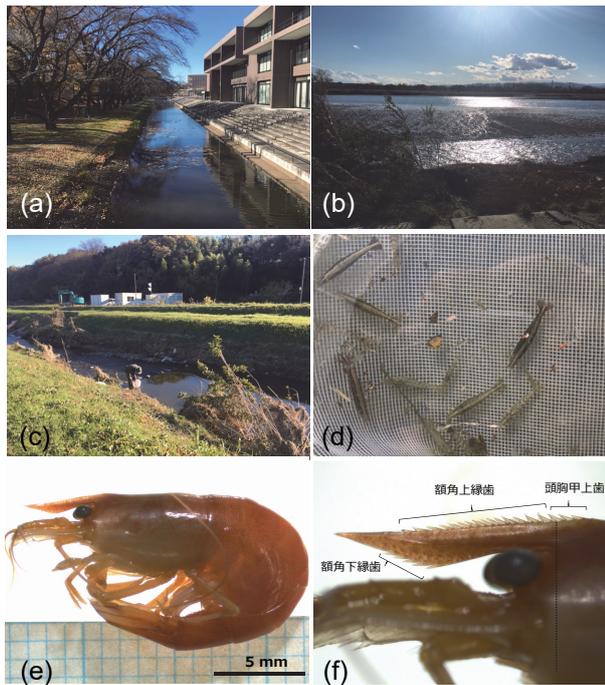


図1 調査地とカワリヌマエビ属 *Neocaridina* spp.  
 (a) 立正大学熊谷キャンパス水路。(b) 荒川。  
 (c) 和田吉野川。(d) 採集された *Neocaridina* spp.。  
 (e) 実体顕微鏡下で観察された *Neocaridina* spp.。  
 (f) *Neocaridina* spp.の額角。

歯数、および額角下縁歯数を計数し、比較した。

## (2) 塩基配列の特定と分子系統樹推定

エタノール固定された標本の胸脚をピンセットで取り出し、HotSHOT法 (Truett et al., 2000) によりDNAを抽出した。抽出されたDNAを用いて、ミトコンドリアDNAのCOI遺伝子を増幅するユニバーサルプライマー LCO-HCO (Folmer et al., 1994) によって、PCR増幅した。PCR産物をExoSAP IT (Thermo Fisher Scientific) によって精製し、BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) によってシーケンス反応した後、ABI 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いて塩基配列を決定した。

決定された塩基配列658 bpを用いて、MEGA 7 (Kumar et al., 2016) のソフトウェアでKimura-2 parameterによる近隣結合樹を作成した。また、各ノードの支持率を評価するため、ブートストラップ確率を算出した。今回特定された塩基配列の他、ミナミヌマエビ近縁種との比較をするため、先行研究Shih et al. (2017) で用いられている塩基配列を含め、*N. saccam*を外群とした (GenBank Accession No. AB300177, AB300178, AB300183, AB300185- AB300187, LC324764- LC324769)。

なお、種名の表記はShih et al. (2017) に従った。

## (3) HRM解析

High-resolution melting (HRM) 解析は比較的強力なインターカレーターを用いたリアルタイムPCR、高解像度の融解曲線解析を行なうことで、一塩基レベルでの変異を検出する手法である (Wittwer et al., 2003; Liew et al., 2004)。先行研究および本研究で決定された *Neocaridina* spp. のCOI遺伝子の塩基配列のなかから、PCR産物が80 bpになるようにPrimer 3Plus (Untergasser et al., 2007) を用いて、プライマーを設計した (Neo\_COI\_F1: 5'-AGAGAGAGGAGTCGGCACTG-3', Neo\_COI\_R1: 5'-TCCCATATCTACTGAGGCC-3')。CFX96 Touch™ Real-Time PCR (Bio-Rad) を用いて、98℃ (2分)、98℃ (2秒) - 60℃ (1秒) × 40回、95℃ (1分)、60℃ (1分)、60℃ - 95℃ (10秒、0.2℃ずつ加温) の反応条件でPCRおよび融解曲線解析を行なった。PCR試薬としてSsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) を用いた。

## 3. 結果および考察

### (1) 熊谷キャンパス水路、和田吉野川および荒川に認められた *Neocaridina* spp. と遺伝的2系統

2019年に採集された立正大学熊谷キャンパス、和田吉野川および荒川で採集されたカワリヌマエビ属の額角歯相を表1に示す。本調査で得られた立正大学熊谷キャンパス水路、和田吉野川、および荒川におけるカワリヌマエビ属の額角歯相 (頭胸甲上歯数 + 額角上縁歯数 / 額角下縁歯数) はそれぞれ1-5 + 14-20 / 3-7 (各歯数を最小値 - 最大値で示す)、1-4 + 15-24 / 3-7、および2-3 + 14-18 / 4-7であった。荒川水系と利根川水系における埼玉県内全域のカワリヌマエビ属820個体の額角歯相を調べた先行研究では、0-7 + 8-23 / 2-13と報告されており (金澤, 2015b)、本調査結果で得られたほとんどの個体の歯数は最小値 - 最大値の範囲内に含まれた。和田吉野川から額角上縁歯数が24と先行研究 (金澤, 2015b) より多い歯数が1個体からのみ認められた。金澤 (2015b) では、西日本の在来ミナミヌマエビの額角歯相が1-4 + 7-16 / 0-9であり、埼玉県内のカワリヌマエビ属のなかには頭胸甲上歯数、額角上縁歯数および額角下縁歯数の多い個体がいることが指摘されている。本調査で得られた標本からは、西日本在来ミナミヌマエビと比べて額角下縁歯数について多いものはなかったが、頭胸甲上歯数が5と

表1 熊谷キャンパスおよびその周辺で採集されたカワリヌマエビ属の額角歯相と金澤(2015b)との比較

採集地	採集日	遺伝子系統	額角歯相 (頭胸甲上歯数+額角上縁歯数/額角下縁歯数)		調査 個体数
			最小-最大値	平均値	
埼玉県熊谷市					
万吉、立正大学熊谷 キャンパス水路	2019年11月20日 (遺伝子系統別にしたもの)	NdtおよびNdv	1-5+14-20/3-7	2.61+16.11/4.50	18
		Ndt	1-5+14-20/3-7	2.55+16.38/4.54	13
		Ndv	1-4+14-18/3-6	2.20+15.40/4.40	5
万吉、和田吉野川	2019年12月5日 (遺伝子系統別にしたもの)	NdtおよびNdv	1-4+15-24/3-7	2.50+17.38/5.00	8
		Ndt	2-4+15-24/3-7	2.80+17.00/5.00	5
		Ndv	1-3+17-19/4-6	2.00+18.00/5.00	3
熊谷大橋より約500m 下流、荒川	2019年12月5日 (遺伝子系統別にしたもの)	NdtおよびNdv	2-3+14-18/4-7	2.67+15.33/6.00	3
		Ndt	2-3+14-18/7	2.50+16.00/7.00	2
		Ndv	3+14/4	3+14/4	1
久下、荒川 (金澤, 2015b)	2014年11月16日	-	1-4+13-17/3-9	2.50+14.80/5.40	10
埼玉県全域 (金澤, 2015b)	2014年-2015年	-	0-7+8-23/2-13	-	820

多いものが水路で1個体、額角上縁歯数が17-24と多いものが水路で5個体、和田吉野川で4個体、荒川で1個体認められた。したがって、先行研究(金澤, 2015b)同様、本調査で得られたサンプルは形態的に西日本在来ミナミヌマエビに類似しているものの、やや異なる特徴を持ったカワリヌマエビ属であると考えられる。

2016年、2017年、2019年の熊谷キャンパス水路から採集された33個体、和田吉野川8個体、荒川4個体を用いた分子系統解析からは、強く支持されたクレードが2つ認められ、一つは *N. davidi* との単系統群(Ndv)であり、もう一方はミナミヌマエビ *N. denticulata* (Ndt) とで構成された(図2)。したがって、遺伝的なデータからも本調査で得られた熊谷キャンパス内の水路や和田吉野川、荒川におけるサンプルはカワリヌマエビ属であることが支持された。また、国外外来の *N. davidi* および国内在来のミナミヌマエビといった複数種と同種、あるいは近縁である可能性が高いと考えられる。

*Neocaridina davidi* の単系統群内では、Shih et al. (2017) で報告されている塩基配列と同一のものが本調査の標本から認められたが(ハプロタイプNdv-6)、今回初めて認められたハプロタイプNdv-aもあった。ミナミヌマエビとの単系統群では、広島県や、岡山県、兵庫県、岐阜県の西日本で認められたハプロタイプNdt-1とNdt-2との単系統内に入るNdt-cと、これらのクレードと姉妹群をつくるNdt-aとNdt-bが新しいハプロタイプとし

て認められた。埼玉県の利根川水系および荒川水系のカワリヌマエビ属を調べたIshiguro et al. (2018) では塩基配列の公開はされていないため、本研究で得られた塩基配列データと直接比較することはできない。ただし、分子系統解析からの樹形から判断する限り、複数の系統が認められており、本研究で認められた *N. davidi* とミナミヌマエビの2つの単系統群に加えて、両系統の姉妹群となるような単系統群が認められている。本調査地と同じ熊谷市内の荒川本川で採集されたサンプルは、いずれも本調査結果と同様のもので2つの単系統群に含まれる(Ishiguro et al., 2018)。一方、荒川水系の支川である入間川や高麗川、都幾川、越辺川では、別系統のカワリヌマエビ属が主に認められている。この別系統のカワリヌマエビ属は熊谷市内の熊谷キャンパス水路や和田吉野川、荒川ではまだ確認されておらず、河川域によって異なる系統が生息しているものと考えられる。しかし、今後、カワリヌマエビ属の同一水系内や別水系からの侵入・分布拡大によって、各系統の分布に変化が生じていく可能性があると考えられる。

今回調査した熊谷キャンパス水路、和田吉野川および荒川のいずれからも、*N. davidi* の系統(Ndv)とミナミヌマエビの系統(Ndt)の両系統が認められた。埼玉県では2003年ごろから県西部において、在来のミナミヌマエビと国外外来の *Neocaridina* spp. が生息していた可能性について報告されている(金澤, 2015a, b)。しか

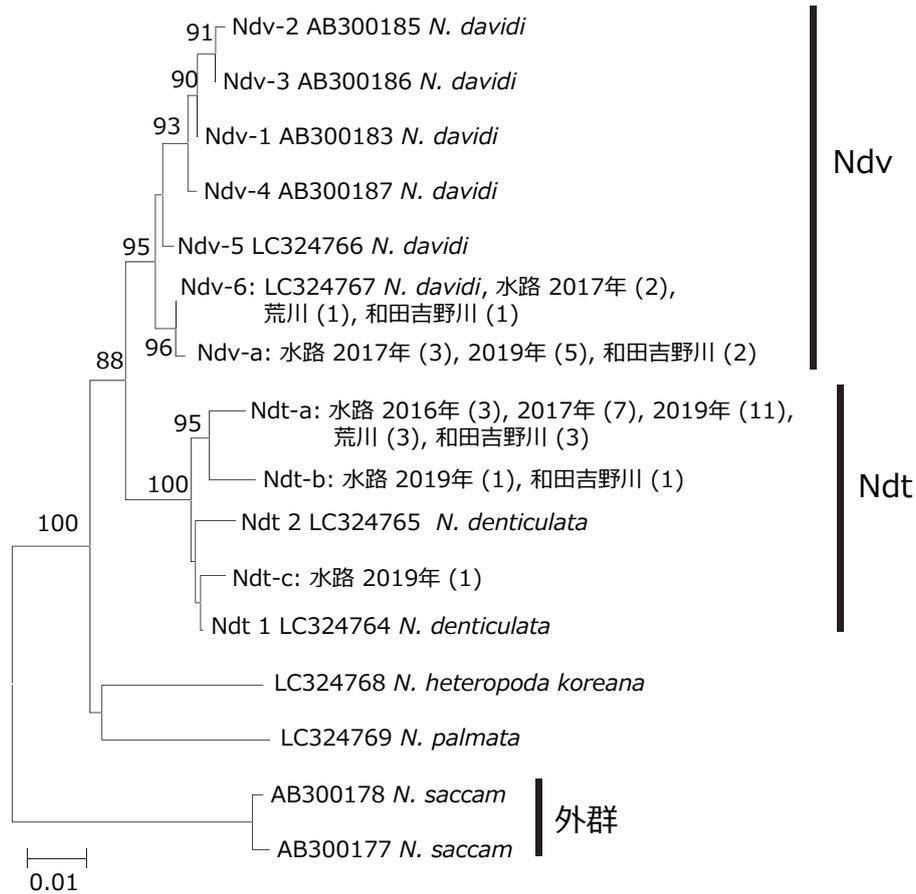


図2 COI (658 bp) に基づく近隣結合樹

ノード上の数値はブートストラップ確率を示し、85以下については表記を省略した。括弧内の数値は個体数を示す。

し、カワリヌマエビ属では、観賞用として交雑等品種改良されてきたこともあり、交雑個体の子孫がミナミヌマエビのハプロタイプを保持しているとも考えられる。形態データである額角歯相についても、NdvとNdtの系統別に見たとしても、系統間で明瞭な違いがあるとは言えず(表1)、また、西日本の在来ミナミヌマエビの額角上縁歯数より多いものは両系統で認められる。ハプロタイプNdt-cを持つ個体さえも額角歯相は1+20/5と、額角上縁歯数が多い。したがって、飼育実験や核DNAからの解析といった詳細な調査も必要となるが、熊谷市をはじめとする埼玉県内のカワリヌマエビ属は在来のミナミヌマエビと国外外来の *Neocaridina* spp. 間の交雑個体、あるいはその子孫である可能性が高いと思われる。

## (2) HRM解析を用いた2系統の検出

本調査で得られたハプロタイプはNdv-6、Ndv-a、Ndt-a、Ndt-b、およびNdt-cの5種類であった。HRM解析用に作成されたプライマーでの増幅領域について、*N. davidi* 系統のNdv-6とNdv-a、および、Shih et al. (2017) で決定づけられているNdv-1~Ndv-5といったNdv系統の

間での変異はない(表2)。一方で、Ndv-Ndt系統間では1~3塩基の変異があり、本研究で明らかになったNdt-a、Ndt-b、およびNdt-cはShih et al. (2017) で特定されているNdt-1、Ndt-2とは1~2塩基異なる。

2019年に採集され、シーケンス解析により塩基配列が決定している熊谷キャンパス水路の16個体(Ndv系統: 5個体、Ndt系統: 11個体)、和田吉野川8個体(Ndv: 3個体、Ndt: 5個体)、および荒川4個体(Ndv: 1個体、Ndt: 3個体)のDNAサンプルを用いてリアルタイムPCRおよびHRM解析を実施した結果を図3に示す。ノーマライズされた融解曲線(図3c)および差分曲線(図3d)において、明瞭な分離が認められ、Ndv系統とNdt系統の融解曲線がそれぞれまとまった。また、Ndt-aとNdt-b、c間についても、やや明瞭さに欠けてはいたものの、1塩基の変異(A/C)による融解曲線の違いが認められた。

したがって、シーケンス解析をしなくとも、本研究で開発したプライマーでのHRM解析で、Ndv系統とNdt系統のどちらの系統かを検出することは可能となった。また、比較的信頼性は低くなるものの、系統内での多型

表2 HRM解析用のPCR増幅配列において認められる変異

ハプロタイプ名	増幅塩基配列位置*									
	22	25	31	37	40	43	55	58	64	
Ndv-1	C	A	T	C	A	A	T	C	A	
Ndv-2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Ndv-3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Ndv-4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Ndv-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Ndv-6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Ndv-a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
-----										
Ndt-1	.	.	.	.	G	.	.	.	.	
Ndt-2	.	.	.	.	G	.	.	T	.	
Ndt-a	.	G	.	A	G	.	.	.	.	
Ndt-b	.	G	.	.	G	.	.	.	.	
Ndt-c	.	G	.	.	G	.	.	.	.	
-----										
<i>Neocaridina heteropoda koreana</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	G	
<i>Neocaridina palmata</i>	.	.	.	.	.	G	C	.	.	
<i>Neocaridina saccam</i> AB300178	T	.	C	.	.	.	.	.	.	
<i>Neocaridina saccam</i> AB300177	T	.	C	.	.	.	.	.	.	

\*プライマー Neo\_COI\_F1の塩基配列数20 bpもカウント。  
同じ塩基配列は省略されている。

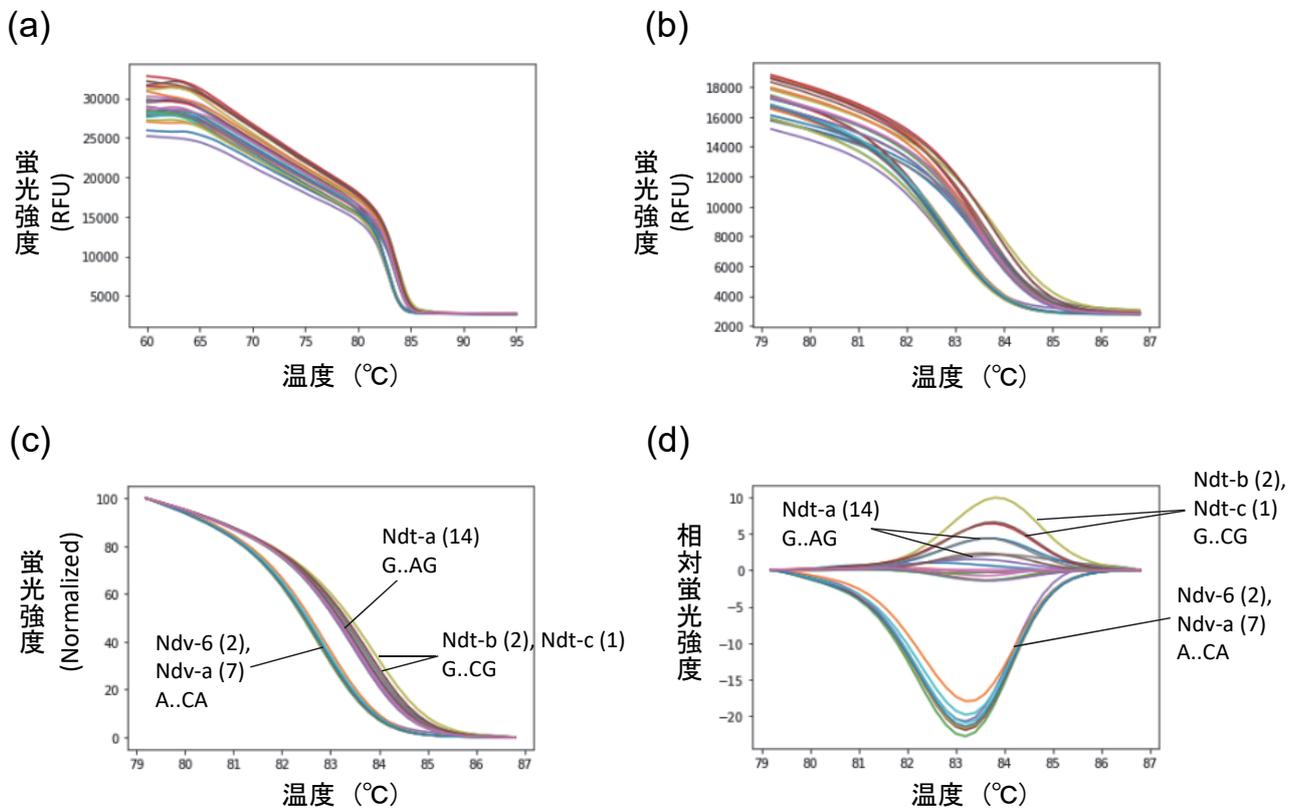


図3 HRM解析

- (a) 融解曲線のRaw data。
- (b) 79°C - 87°C間を示した融解曲線。
- (c) ノーマライズされた融解曲線。
- (d) 蛍光強度の差分曲線。

を検出する上でも利用できると考えられる。本研究では、カワリヌマエビ属の近縁種、例えば *N. heteropoda koreana* や *N. palmata* については、PCR増幅配列内に変異があることを確認してはいるが、実際にHRM解析したわけではなく、融解曲線が明らかではない。したがって、別種や別系統が生息する地点や、新たに入り込んだ場合に見落とされる可能性もあるので、注意する必要がある。しかしながら、HRM解析はPCRまでの作業で塩基配列の変異を検出することができるため、精製やシーケンス解析といった手順や時間、試薬の使用が大幅に削減される。状況に合わせて、シーケンスとHRM解析を使い分けることで、より効率的なモニタリング調査などが可能になると考えられる。

### 謝辞

本研究は2019年度立正大学研究推進・地域連携センター支援費第2種による支援を頂いた。また、熊谷キャンパス内でのサンプル採集には、2016年-2019年度生物学実験の履修生にご協力いただいた。心から感謝申し上げます。

### 引用文献

- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and R. Vrijenhoek (1994): DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**, 294-299.
- 長谷川政智・池田実・藤本泰文 (2015): 宮城県に侵入した淡水エビ: カワリヌマエビ属 *Neocaridina* spp. の分布拡大とヌカエビ *Paratya compressa improvisa* への影響. 伊豆沼・内沼研究報告, **9**, 47-60.
- Ishiguro, N., Tamura, N., and M. Ohkashiwa (2018): Habitat of a native freshwater shrimp *Paratya improvisa* in Iruma River system in Saitama Prefecture and the invasion status of alien species, *Neocaridina* spp. DNA鑑定, **10**, 51-57.
- 金澤光 (2015a): 外来甲殻類が及ぼす水域の生態系サービスへの影響 (特集 外来生物がもたらす水環境問題). 水環境学会誌, **38**, 51-55.
- 金澤光 (2015b): 埼玉県に侵入した外来甲殻類ヌマエビ科カワリヌマエビ属の現状について. 埼玉県環境科学国際センター報, **15**, 152-156.

- 片山敦・佐藤僚介・吉川朋子 (2017): 東日本鶴見川水系におけるカワリヌマエビ属とヌカエビの急激な分布の変化. 自然環境科学研究, **30**, 5-12.
- Kumar, S., Stecher, G. and K. Tamura (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, **33**, 1870-1874.
- Liew, M., Pryor, R., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E. and C. Wittwer (2004): Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clinical chemistry*, **50**, 1156-1164.
- Mitsugi, M., Hisamoto, Y. and H. Suzuki (2017): An invasive freshwater shrimp of the genus *Neocaridina* Kubo, 1938 (Decapoda: Caridea: Atyidae) collected from Boso Peninsula, Tateyama City, Chiba Prefecture, eastern Japan. *Crustacean Research*, **46**, 83-94.
- 西野麻知子 (2017): 日本への外来カワリヌマエビ属 (*Neocaridina* spp.) の侵入とその分類学的課題 (特集 シンポジウム「在来種を脅かす近縁外来種の侵入: 水域の生物を中心に」). 地域自然史と保全, **39**, 21-28.
- 西野麻知子・丹羽信彰 (2004): 新たに琵琶湖へ侵入したシナヌマエビ?. オウミア (琵琶湖研究所ニュース), **80**, 3.
- 丹羽信彰 (2010): 外来輸入エビ, カワリヌマエビ属エビ (*Neocaridina* spp.) および *Palaemonidae* spp. の輸入実態と国内の流通ルート. *Cancer*, **19**, 75-80.
- Shih, H.T., Cai, Y., Niwa, N. and Y. Nakahara (2017): A new species of land-locked freshwater shrimp of the genus *Neocaridina* (Decapoda: Caridea: Atyidae) from Iki Island, Kyushu, Japan. *Zoological Studies*, **56**, 30.
- 豊田幸詞・関慎太郎 (2014) 日本の淡水性エビ・カニ: 日本産淡水性・汽水性甲殻類102種. ネイチャーウォッチングガイドブック. 誠文堂新光社. 255p.
- Truett, G., Heeger, P., Mynatt, R., Truett, A., Walker, J. and M. Warman (2000): Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques*, **29**, 52-54.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R. and J.A.Leunissen (2007): Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, **35**, W71-W74.
- Wittwer, C.T., Reed, G.H., Gundry, C.N., Vanderstee, J.G. and R.J. Pryor (2003): High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical chemistry*, **49**, 853-860.

# Invasive freshwater shrimps, *Neocaridina* spp. inhabiting the irrigation canal in Kumagaya Campus Rissho University —genetic two lineages and identification by HRM analysis—

SEKINÉ Kazuki\*, KOBAYASHI Kenta\* and YAMAGUCHI Rikimaru\*

\* Faculty of Geo-Environmental Science, Rissho University

**Key words:** crustacean, DNA, High Resolution Melt Analysis, invasive species, Real-time PCR

