ミトコンドリアDNAを用いたクロフジツボ類の系統解析

長谷川貴志*, 山口寿之*, 小島茂明**, 太田 秀**

*千葉大学理学部地球科学教室, **東京大学海洋研究所海洋生物生態部門

Phylogenetic Analysis among Three Species of Intertidal Barnacles of the Genus

Tetracita (Cirripedia; Balanomorpha)

by Nucleotide Sequences of a Mitochondrial Gene

Takashi Hasegawa*, Toshiyuki Yamaguchi*, Shigeaki Kojima** and Suguru Ohta**

*Department of Earth Sciences, Chiba University,

and **Ocean Research Institute, University of Tokyo

ABSTRACT

Three species of *Tetracita*, *T. squamosa*, *T. formosana* and *T. japonica*, live in the intertidal zone in Japan. The phylogenetic relationships among them (formerly considered as different subspecies of *T. squamosa*) were examined in a previous study of Yamaguchi (1987) based not only on comparisons of morphology and geographic distribution, but also on isozyme electrophoresis. In the present study, their interrelationships are examined using parts of the nucleotide sequences of a mitochondrial gene for cytochrome oxidase subunit I (COI). In concordance with the results by isozyme electrophoresis, *T. formosana* and *T. japonica* are shown to be the closest among the three species. The ancestor of *T. formosana* and *T. japonica*, themselves being derived recently, diverged earlier from the last common ancestor of the three species.

Key words : mt DNA, COI, *Tetracita japonica*, *Tetracita squamosa*, *Tetracita formosana*

はじめに

日本近海には3種の現生クロフジツボ類が生息している。それらはクロフジツボ (*T. japonica*), タイワンクロフジツボ (*T. formosana*) とミナミクロフジツボ (*T. squamosa*) で、それらは殻の色以外に特別大きな形態的差異がなく、クロフジツボ以外は化石標本の確実な同定が得られていない。

クロフジツボは、灰色の個体で、台湾北部から津軽海峡にかけての外洋および内湾の潮間帯に生息し、3種の中

で唯一日本海沿岸にも分布する。タイワンクロフジツボは、赤灰色で、台湾から伊豆半島南岸にかけての外洋に面した潮間帯に生息している。ミナミクロフジツボは、緑灰色で、インド洋-太平洋の熱帯から温帯の外洋に面した潮間帯に分布し、房総半島南岸が分布域の北限に当たる。つまり最も広いミナミクロフジツボの分布域の縁辺部に同所的にタイワンクロフジツボとクロフジツボが分布している (山口 1986; Yamaguchi 1987)。

山口 (1986) および Yamaguchi (1987) は、3種の成体の形態の比較、リンゴ酸脱水素酵素 (Mdh) の対立遺伝子頻度の比較を行った。どちらの結果もクロフジツボは、ミナミクロフジツボとよりもタイワンクロフジツボとの

類似性が高いことを示し、クロフジツボとタイワンクロフジツボは、3種共通の祖先からミナミクロフジツボが分化した後、種分化によって生じたと推論した。

本研究では日本の現生クロフジツボ類3種のミトコンドリアDNA (mt DNA) の塩基配列の比較によって、それらの類縁関係および種分化過程を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

材 料

クロフジツボ類は、蔓脚類の中でもより派生的形質をもつグループであるフジツボ亜目 (Balanomorpha) に属し、タイワンクロフジツボやミナミクロフジツボの存在はあまり知られていないが、クロフジツボは日本の潮間帯中央部に普通に見られる。タイワンクロフジツボ (3個体使用) およびミナミクロフジツボ (2個体使用) は和歌山県すさみ町黒崎の海岸で1994年4月25日採集したものを、ドライアイス中に保存して運搬し、室内実験まで -80°C で冷凍保存した。クロフジツボ (3個体使用) は千葉県天津小湊町の海岸で1994年3月29日採集したものを、室内実験まで飼育したものを使用した。

外群としてカメノテ (*Capitulum mitella*) を1個体用いた。カメノテは、クロフジツボ類と同じ完胸目 (Thoracica) の異なる亜目、エボシガイ亜目 (Lepadomorpha) に属す、より原始的形質をもつ分類群である。カメノテはクロフジツボと同じ場所、日時に採集し、同様に室内実験まで飼育したものをを用いた。

分析方法

冷凍または生きたフジツボの軟組織を緩衝液 (0.4M NaCl, 125mM KCl, 50mM Tris (pH8), 0.1M EDTA (pH8)) 中で細断、遠心分離を繰り返しミトコンドリアを分画した。そこからフェノールおよびクロロホルムに

より分析用のmtDNAを抽出し、それをエーテルで洗浄、エタノール沈殿を行い、滅菌蒸留水に溶解し -20°C で冷凍保存した。

次に、抽出したmtDNAのチトクロームオキシダーゼサブユニット I (COI) がコードされている領域中約900塩基対の部分 PCR (合成酵素連鎖反応) 法で増幅した。PCRに用いたプライマーは、渡辺・横堀 (1993) が後生動物間で保存的なアミノ酸配列に基づき設計したCOI-3およびCOI-6と、著者の1人が節足動物と環形動物の間で保存的なアミノ酸配列 (小島 未発表) に基づき設計したCOI-AおよびCOI-Bの4種類である (Table 1)。また、本研究では、 94°C で1分間保ったあと、熱変性 92°C 40秒間、プライマーのアニーリング 35°C から 50°C 1分間、複製 72°C 1分から1分30秒間という反応を30から40サイクル繰り返すという条件でPCRを行った。反応終了後、1.5%アガロースゲル中でサイズマーカーとともに電気泳動を行い、生成物の確認をした。

PCR産物は、ミネラルオイルを取り除き、フェノールおよびクロロホルム抽出、エタノール沈殿により回収した。回収されたPCR産物は、 $40\mu\text{l}$ の滅菌蒸留水に溶解させ、塩基配列決定に必要なものを以外は -20°C で冷凍保存した。

塩基配列の決定の準備段階として一本鎖のDNAを得る方法は、 λ エキソヌクレアーゼを利用した方法 (高木ほか 1992) を用いた。その後、 $\alpha^{32}\text{P}$ -dATPで標識してSequenase® Ver.2.0 (U.S.Biochemical社製) を用いて、ジデオキシ法 (Sanger *et al.* 1977) で塩基配列を決定した。なお一部分、CircumVent™ Phototope™ Kit (New England BioLabs® 社製) を用い、サイクルシーケンシング法で決定した配列も含まれている。塩基配列決定に用いたプライマーは、上述の4種類と同一である (Table 1)。そして、ショウジョウバエ mtDNA (Clary & Wolstenholme 1985) およびアルテミア mtDNA (Valverde *et al.* 1994) の遺伝暗号にしたがいアミノ酸

Table 1. List of primers used in this study. N, Y, R, S and W represent equal molar mixtures of (G, A, T, C), (T, C), (G, A), (G, C) and (A, T), respectively.

Name	Sequeuce
COI-A	5'-TCATCTRAANACYTTTRAT-3'
COI-B	5'-GGATGAACNGTNTAYCCNCC-3'
COI-3	5'-GTNTGRGCNCAYCAYATRTTYACNGT-3'
COI-6	5'-GGRTARTCNSWRTANCGNCGNGGYAT-3'

mt DNA によるクロフジツボ類の系統解析

1900																					
Tsq	L	S	I	F	S	L	H	L	A	G	A	S	S	I	L	G	A	I	N	F	M
Tsq	TTA	TCA	ATC	TTC	TCT	CTT	CAT	CTA	GCC	GGT	GCC	TCC	TCA	ATT	CTT	GGA	GCT	ATT	AAT	TTC	ATG
Tja	***	**T	***	***	***	**C	**C	***	**T	**G	**T	**T	**C	***	T*A	**G	**A	**C	***	**T	**A
Tfo	***	**T	***	***	***	**C	**C	***	**T	**G	**T	**T	**C	***	T*A	**G	**A	**C	***	**T	**A
Tfo	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cmi	***	A*C	***	***	**C	***	**C	T*G	**T	**G	**T	***	**T	***	***	**G	***	***	***	**T	***
2000																					
Tsq	S	T	V	I	N	M	R	A	E	T	L	T	F	D	R	L	P	L	F	V	W
Tsq	TCT	ACA	GTT	ATT	AAT	ATA	CGA	GCA	GAA	ACC	TTA	ACC	TTT	GAC	CGA	CTT	CCA	TTA	TTT	GTC	TGA
Tja	**A	**	**	**	**C	***	***	**C	***	**T	C**	**T	***	**T	**T	***	**C	***	***	**T	**
Tja	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tfo	**A	***	***	***	**C	***	***	**C	***	**T	C**	**T	***	**T	**T	***	**C	***	***	**T	***
Tfo	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cmi	**C	**	**A	***	**C	***	***	***	***	**T	C**	**A	***	***	**T	**A	**C	***	***	**A	***
2100																					
Tsq	S	V	F	I	T	V	I	L	L	L	L	S	L	P	V	L	A	G	A	I	T
Tsq	AGT	GTC	TTT	ATT	ACA	GTT	ATT	CTT	CTC	CTC	CTT	TCT	CTT	CCA	GTT	CTG	GCT	GGA	GCT	ATT	ACA
Tja	**A	**T	**C	***	**T	***	***	***	**T	***	T*G	***	**A	***	***	**A	**A	***	***	**C	***
Tja	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tfo	**A	**T	**C	***	**T	***	***	***	**T	***	T*G	***	**A	***	***	**A	**A	***	***	**C	***
Tfo	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cmi	**A	**T	***	G*A	**C	**A	***	**C	**T	**T	***	**C	***	**T	***	**C	**A	***	**C	***	***
2200																					
Tsq	I	L	Y	Q	H	L	F	W	F	F	G	H	P	E	V	Y	I	L	I	L	P
Tsq	ATT	CTT	TAT	CAA	CAC	TTA	TTC	TGA	TTC	TTC	GGA	CAC	CCT	GAA	GTC	TAC	ATT	TTA	ATT	TTA	CCA
Tja	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tja	***	***	**C	***	***	***	**T	***	***	**T	**T	***	**R	***	**T	***	***	***	***	C*T	***
Tja	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tfo	***	***	**C	***	**T	***	**T	***	***	**T	**T	***	**G	***	**T	***	***	***	***	C*T	***
Tfo	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cmi	***	***	***	***	***	C**	**T	***	**T	***	**C	**T	***	***	***	***	***	***	***	C*T	**T
2300																					
Tsq	A	F	G	M	I	S	H	I	V	A	S	E	S	G	K	K	E	S	F	G	T
Tsq	GCT	TTT	GGT	ATA	ATT	TCA	CAC	ATT	GTG	GCA	AGA	GAA	AGT	GGT	AAA	AAA	GAA	TCC	TTT	GGA	ACA
Tja	**C	***	***	***	**C	**T	**T	***	***	***	***	***	**A	**R	***	***	***	***	**G	**G	**C
Tja	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*
Tfo	**C	***	***	***	**C	**T	**T	***	***	***	***	***	**A	**A	***	***	***	***	**G	**A	**C
Tfo	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cmi	***	**C	**C	**G	***	***	**T	***	**T	**C	***	***	**A	***	***	***	***	**A	***	***	**T
2400																					
Tsq	L	G	M	I	Y	A	M	I	A	I	G	I	L	G	F	V	V	W	A	H	H
Tsq	TTA	GGA	ATA	ATT	TAC	GCA	ATA	ATC	GCA	ATT	GGA	ATC	TTA	GGA	TTT	GTA	GTC	TGA	GCC	CAC	CAC
Tja	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tja	***	**C	**G	***	***	***	***	***	**T	***	***	***	C*T	**T	***	***	**A	***	**G	***	***
Tja	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tfo	***	**C	**G	***	***	***	***	***	**T	***	***	**T	C*T	**T	***	***	**A	***	**G	***	***
Tfo	*	*	*	*	*	*	I	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cmi	C**	***	***	***	**T	**C	**T	***	***	***	***	**T	C**	***	**C	**T	**A	***	**T	***	***

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of part of COI gene for *Tetraclita squamosa*#(Tsq), *Tetraclita japonica*#(Tja), *Tetraclita formosana*#(Tfo) and *Capitulum mitella*#(Cmi). Identity to *T. squamosa* is indicated by an asterisk. Question marks represent missing data. Nucleotides at intraspecific polymorphic sites indicated by R(A or G) or Y(C or T). Attached numbers above sequences correspond to the position of the homologous nucleotide in *Drosophila yakuba* (Clary & Wolstenholm 1985).

	2400																				
Tsq	M	F	T	V	G	M	D	V	D	T	R	A	Y	F	T	S	A	T	M	I	I
	ATG	TTC	ACA	GTA	GGT	ATA	GAC	GTT	GAT	ACT	CGA	GCT	TAC	TTT	ACA	TCC	GCT	ACT	ATA	ATT	ATC
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tja	**A	**T	***	***	**A	**G	***	***	***	**G	***	**C	***	***	**T	**T	**C	***	***	***	**T
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tfo	**G	**T	***	***	**A	**G	***	***	***	**G	***	**?	***	***	**T	**T	**A	***	***	***	**T
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cmi	**A	**T	**T	***	**A	**G	**T	**G	***	***	**T	**C	***	***	**T	**A	***	***	***	***	**T
Tsq	A	V	P	T	G	I	K	V	F	S	W	L	G	T	L	H	G	S	Q	F	S
	GCG	GTC	CCA	ACC	GGG	ATT	AAA	GTA	TTC	AGT	TGA	CTA	GGA	ACA	CTC	CAT	GGC	TCT	CAA	TTC	TCC
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tja	**T	**T	***	**A	***	***	***	***	***	**C	***	**T	**T	**T	**T	***	***	**A	***	***	**T
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tfo	**T	**T	***	**A	***	***	***	***	***	**C	***	**T	**T	**T	**T	***	***	**A	***	***	**Y
	?	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*
Cmi	?*A	**A	**T	***	**T	***	***	***	***	***	***	T**	***	***	***	**A	***	***	A*C	***	**T
	2500																				
Tsq	Y	S	P	P	L	L	W	A	G	F	L	F	L	F	T	V	G	G	V	T	
	TAC	AGT	CCT	CCT	CTC	CTC	TGA	GCT	LTT	GGG	TTT	CTC	TTC	TTA	TTT	ACA	GTT	GGG	GGA	GTA	ACA
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tja	***	**A	***	**C	**T	***	**G	**C	**C	**C	**C	**A	**T	C**	***	***	**A	**A	***	**T	***
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tfo	***	**A	***	**C	**T	***	**G	**C	**C	**C	**C	**A	**T	C**	***	***	**A	**A	***	***	***
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cmi	***	***	**C	***	**A	**A	**G	**C	T*A	**A	***	T*A	**T	C*T	***	**G	**G	**A	***	***	***
Tsq	G	V	V	L	A	N	S	S	L	D	I	V	L	H	D	T	Y	Y	V	V	A
	GGA	GTA	GTA	CTA	GCG	AAT	TCA	TCT	TTA	GAC	ATC	GTC	TTA	CAC	GAT	ACC	TAC	TAT	GTA	GTA	GCC
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tja	***	***	**C	**G	**T	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**C	***	***	**C	**T	**C	**A
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tfo	***	***	**C	**G	**T	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**C	***	***	**C	**T	**C	**A
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cmi	***	***	**T	**C	**C	**C	**T	***	C*C	***	**T	***	***	***	**C	***	***	**C	***	***	**T
	2600																				
Tsq	H	F	H	Y	V	L	S	M	G	A	V	F	G	I	M	A	G	A	V	Y	W
	CAC	TTC	CAC	TAC	GTC	CTT	TCT	ATA	GGA	GCA	GTA	TTT	GGC	ATC	ATA	GCA	GGA	GCA	GTT	TAC	TGA
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tja	**T	***	**T	***	**T	***	**C	***	***	**T	***	**C	**A	**T	***	***	**G	***	***	***	**G
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tfo	**T	***	**T	***	**T	***	**C	***	**R	**T	***	**C	**A	**T	***	***	**G	***	***	***	**G
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cmi	***	***	***	***	***	***	**C	***	**C	**C	**G	***	**T	**T	***	***	***	***	**C	***	***
	2700																				
Tsq	F	P	L	L	T	G	I	T	M	K	P	K	W	L	K	I	H	F	G	S	M
	TTC	CCC	CTT	CTT	ACA	GGT	ATT	ACT	ATA	AAA	CCT	AAA	TGA	TTA	AAA	ATT	CAT	TTC	GGT	TCC	ATA
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*
Tja	**T	**T	**C	***	**T	***	***	**C	***	***	**C	**G	***	C**	***	**C	**C	**T	**A	G*T	***
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*
Tfo	**T	**T	**C	***	**T	***	***	**C	***	***	**C	**G	***	C**	***	**C	**C	**T	**A	G*T	***
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*
Cmi	**T	***	**A	T*A	**C	**A	***	***	***	***	**A	***	**G	C**	***	**C	**C	**T	**G	G*T	**G
Tsq	F	V	G	V																	
	TTC	GTA	GGA	GTT																	
	*	*	*	*																	
Tja	***	**T	**G	**A																	
	*	*	*	*																	
Tfo	***	**T	**G	**A																	
	*	A	*	*																	
Cmi	***	*C*	**T	***																	

配列を推定した。

塩基座位当たりの置換数は、Kimura (1980) の2変数法により計算した。また、系統樹は近隣結合法、UPGMA、および最大節約法の3つの方法で作成した。これらの解析には、コンピュータソフトMEGA Version 1.01 (Kumer *et al.* 1993) を使用した。

結果および考察

塩基配列の比較

クロフジツボ類3種は連続する約830塩基、カメノテは一部Van Syoc (1994) および長谷川 (未公表資料) より引用し、同様に連続する約830塩基について比較を試みた (Fig. 1)。クロフジツボ類3種では、ミナミクロフジツボ対クロフジツボおよびタイワンクロフジツボの間に、それぞれ147個および144個と比較的多くの塩基置換が観察される。しかし、アミノ酸配列を比較すると、277個のアミノ酸座位のうち、置換が起きているのは2座位にすぎない。

すなわち、生じた塩基置換のほとんどはアミノ酸の置換を伴わない同義的置換であった。このように3種間のアミノ酸置換が少ないことは、3種間が従来考えられていたように比較的近縁な関係にあることを示唆するものと考えられる。

一方、クロフジツボ類の中でもクロフジツボとタイワンクロフジツボとの間にはアミノ酸の置換は1つも観察されない。塩基置換のすべてが、コドンの第3座位に生じた同義的置換である。しかも、その個数はこれら2種とミナミクロフジツボとの間の置換数と比べると、著しく少ない。

なお、クロフジツボとタイワンクロフジツボには、同種個体間でそれぞれ2個および3個の塩基の差異が存在した。それらはすべて、コドンの第3座位に生じた転位 (トランジション) 型の置換である。クロフジツボとタイワンクロフジツボとの種間には最大で13個の塩基の差異があり、その中には2個の転換 (トランスバージョン) 型の置換も含まれている。したがって、置換数と置換型の両

Table 2. Genetic distances in the upper-right matrix and standard errors in the lower-left matrix computed by Kimura's 2-parameter method (Kimura 1980).

	<i>T. japonica</i>	<i>T. formosana</i>	<i>T. squamosa</i>	<i>C. mitella</i>
<i>T. japonica</i>		0.0122	0.2034	0.2194
<i>T. formosana</i>	0.0039		0.2000	0.2178
<i>T. squamosa</i>	0.0178	0.0176		0.2024
<i>C. mitella</i>	0.0184	0.0183	0.0176

Fig. 2. A phylogenetic tree for 3 species of tetracilitids and a goose barnacle as an outgroup, constructed by the neighbor joining method.

方に関して、これら2種について種間の変異が種内の変異を上回っているといえる。

系統関係

まず、塩基配列データをもとに、祖先種の塩基配列から最少の置換数で得られる系統樹を選択するという最大節約法 (Fitch 1971) で解析を行った。なお、カメノテは比較のための外群である。その結果得られた系統樹は、クロフジツボが、ミナミクロフジツボとよりも、タイワンクロフジツボとより近縁であることを示している。

Table 2は、Kimura (1980) の2変数法により計算された、各種間の座位当たりの塩基置換数、すなわち遺伝距離と、その標準誤差を示している。この遺伝距離をもとにしたUPGMA (Sokal & Michener 1958) とFig.2に示す近隣結合法 (Saitou & Nei 1987) による系統樹は、最大節約法による系統樹と同じ樹形を示した。この系統樹の信頼性を調べるため、ブーツストラップ法 (Felsenstein 1985) で検定を行った。多くの場合、ブーツストラップ確率が70以上であれば、95%以上の確率で、その部分の系統関係が正しいことが知られている (Hillis & Bull 1993)。ここでは500回の計算を行い、クロフジツボとタイワンクロフジツボの分岐に関して100という値が得られた。また、UPGMAと近隣結合法の両方で同じ樹形が得られれば、その結果はかなり信用できるという (根井 1990)。

以上のことから、日本沿岸に生息するクロフジツボ類は、3種共通の祖先からまずミナミクロフジツボが分化し、次にタイワンクロフジツボとクロフジツボとが分化したと結論でき、それは統計的にも支持される。山口 (1986) およびYamaguchi (1987) は、3種のクロフジツボ類の地理的分布から、クロフジツボとタイワンクロフジツボはミナミクロフジツボの分布の周辺での地理的隔離によって生じたと解釈した。本研究で得られた結果は、この予想と対立するものではない。現在、他の2種に比べて非常に広い分布域をもつミナミクロフジツボが、地質時代の比較的初期から存在し、最近になってその分布の周辺で種分化が生じて、クロフジツボとタイワンクロフジツボが派生したと考えられる。

謝 辞

カメノテの塩基配列はカリフォルニア科学アカデミーのR.J. Van Syoc博士から贈られた学位論文の資料を使った。また実験および資料解析にあたっては、東京大学海洋研究所海洋生物生態部門、千葉大学理学部地球科学教

室地史学・古生物学教育研究グループおよび自然科学研究科環境科学専攻環境基礎科学講座地殻進化学講座のみなさんから貴重な意見をいただいた。以上の方々に感謝申し上げる。

また、この研究の一部に科学研究費・一般研究 (A) (代表山口寿之 (No.06404001)), 国際学術研究 (学術調査) (代表池谷仙之 (No.06041045)), および総合研究 (A) (代表棚部一成 (No.07304042)) を使用した。

引用文献

- Clary, D. O. and D. R. Wolstenholme 1985 The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 252-271.
- Felsenstein, J. 1985 Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Fitch, W.M. 1971 Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*, 20: 406-416.
- Hillis, D.M. and J.J. Bull 1993 An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42: 182-192.
- Kimura, M. 1980 A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei 1993 *MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 1.01*. Institute of Molecular Evolutionary Genetics, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania. 130pp.
- 根井正利 1990 分子進化遺伝学, 五條堀孝・斎藤成也 (共訳), 培風館, 東京. 433pp.
- Saitou, N. and M. Nei 1987 The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 5463-5467.
- Sokal, R.R. and C.D. Michener 1958 A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*, 28: 1409-1438.
- 高木茂・木村穰・勝木元也 1992 λエキソヌクレアーゼを利用したPCR産物の直接塩基配列決定法. 蛋白質 核酸 酵素, 37: 868-873.
- Valverde, J.R., B. Batuecas, C. Moratilla, R. Marco and R. Garesse 1994 The complete mitochondrial DNA sequence of the crustacean *Artemia franciscana*. *Journal of Molecular Evolution*, 39: 400-408.

Van Syoc, R.J. 1994 Molecular Phylogenetics and Population Structure Derived from Mitochondrial DNA Sequence Variation in the Edible Goose Barnacle Genus *Pollicipes* (Cirripedia, Crustacea). Ph.D. dissertation, University of California, San Diego, 60pp.

山口寿之 1986 日本のクロフジツボ類の地理的分布および種間関係. 日本ベントス研究会誌, 29: 25-36.

Yamaguchi, T. 1987 Changes in the barnacle fauna since the Miocene and the infraspecific structure of *Tetraclita* in Japan (Cirripedia; Balanomorpha). *Bulletin of Marine Science*, 41: 337-350.

渡辺公綱・横堀伸一 1993 ミトコンドリア遺伝子の進化. 分子進化実験法, 日本生化学会 (編), 東京化学同人, 東京, pp.241-259.

連絡先

山口寿之 (別刷請求先), 長谷川貴志 : 千葉大学理学部地球科学教室, 〒263 千葉市稲毛区弥生町1-33

小島茂明, 太田 秀 : 東京大学海洋研究所海洋生物生態部門, 〒164 東京都中野区南台1-15-1

Address

Toshiyuki Yamaguchi (reprint request), **Takashi Hasegawa** : Department of Earth Sciences, Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Inage, Chiba 263, Japan

Shigeaki Kojima, Suguru Ohta : Ocean Research Institute, University of Tokyo, 1-15-1 Minamidai, Nakano, Tokyo 164, Japan