

日本近海におけるマボヤ*Halocynthia roretzi* (Drasche)  
の遺伝的分化

神奈川大学 理学部 総合理学研究所

角田恒雄

## はじめに

脊索動物であるマボヤ属は、現在日本沿岸において5種の棲息が確認されている (Nishikawa, 1991). これらのうち、いくつかの種は、わが国では比較的広範囲に分布が確認されており、地域間で形態および遺伝的特性を比較して地理的変異を知ることが可能である。またそれら集団は比較的多数の個体で構成されていることが多く、付着性であるため採集が容易であり、集団単位での変異量の測定が可能である。東北地方を中心に食用とされ、一般に良く知られているマボヤ *Halocynthia roretzi* (Drasche) には、生殖時期と配偶子放出時刻の異なる3型が存在する (Numakunai and Hoshino, 1973, 1974). 3型すべての棲息が確認されているのは青森県陸奥湾内のみであり、北海道沿岸、そして陸奥湾を除いた本州沿岸ではそれぞれA型、C型のみが分布する (Tokioka, 1951a,b, 1953, 1959, 1962; Nishikawa 1991, 1992, 1995). 3型は生殖時期と産卵時刻の違いから分けられているが外部形態にも違いが認められ、特にC型の集団では、生殖時期、時刻は同じであっても、東北地方の集団と瀬戸内海の集団では被囊の色彩や突起の形態に著しい違いがみられる (西川, 「日本海岸動物図鑑」 1996 保育社). その一方で、内部形態に顕著な差異はみられない。

本研究では産地によって著しい形態差が見られるマボヤの地方集団間の遺伝的分化を解析するため、ミトコンドリアDNA (mt DNA) を指標として、各地集団内の変異を検出、比較し、マボヤ各地集団間における遺伝的分化の程度を検討した。

## 実験試料と実験方法

### 実験試料

マボヤ *Halocynthia roretzi* 陸奥湾産A型25個体，B型24個体，C型25個体，小樽産A型4個体，稚内産A型11個体，大槌産C型26個体，山田産C型26個体，鮫の浦産C型32個体，男鹿産C型24個体，佐渡産C型4個体，管島産C型15個体，牛窓産C型6個体，計222個体を実験試料とした。各試料は東北大学，浅虫臨海実験所，岡山大学，牛窓実験所，稚内水産試験場，秋田県水産振興センター，小樽市祝津，新潟県佐渡および牡鹿半島，鮫の浦の水産業者より恵与されたものや，東京大学海洋研究所大槌臨海センターで採集したもの，また山田湾において採集したものを使用した。図1に実験試料の採集地を示す。また，図2は各地個体の外形写真で a, b, c にはマボヤと同属のアカボヤ *H. aurantium*，イガボヤ類 *H. hispida* を別種の指標として示してある。

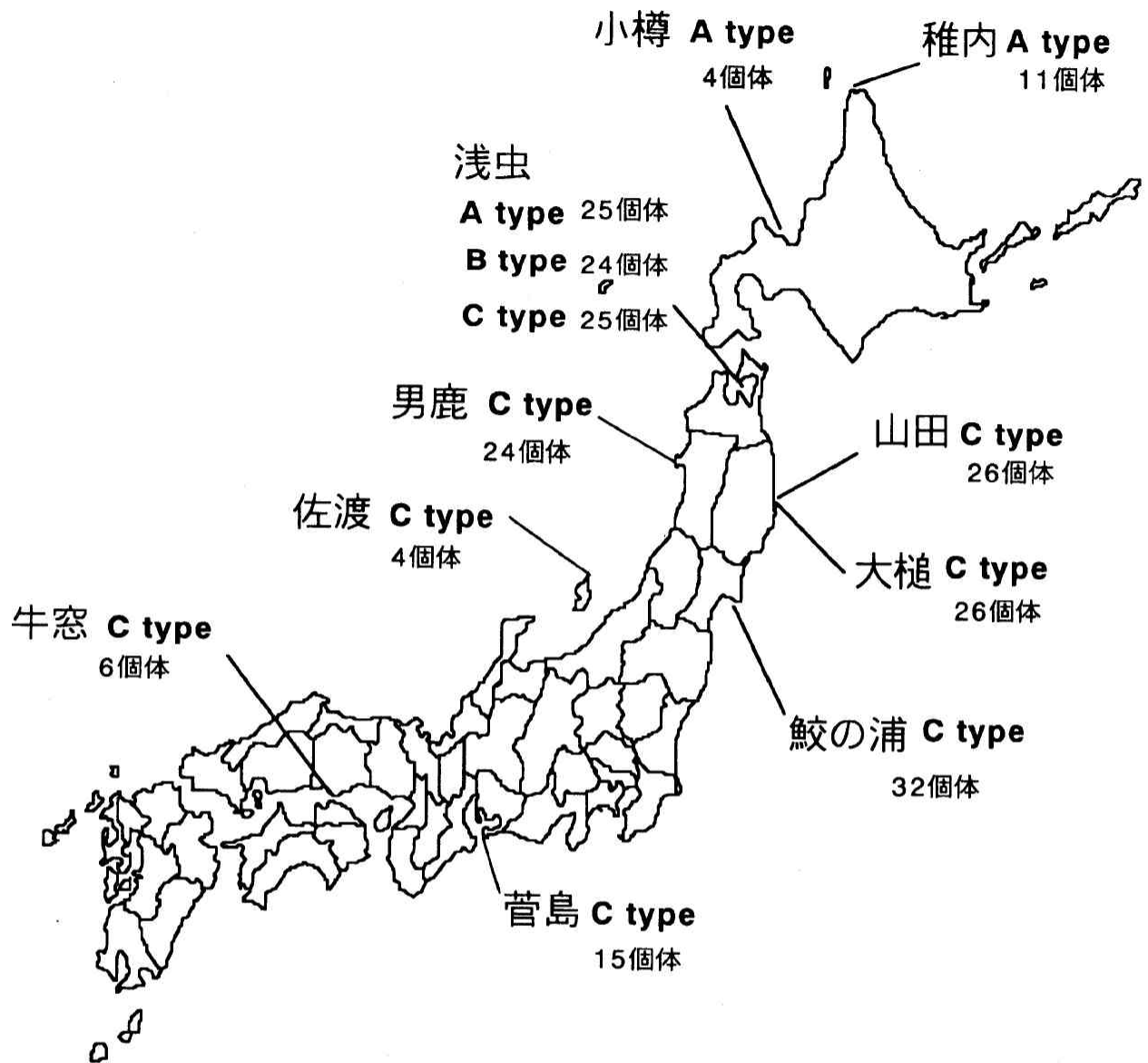
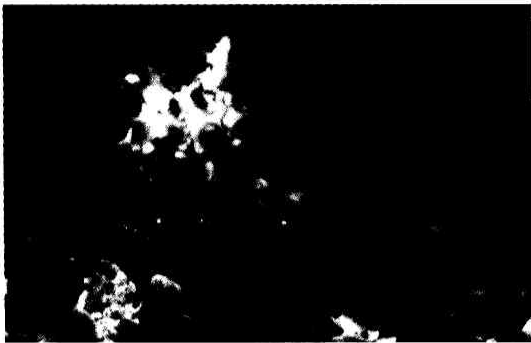
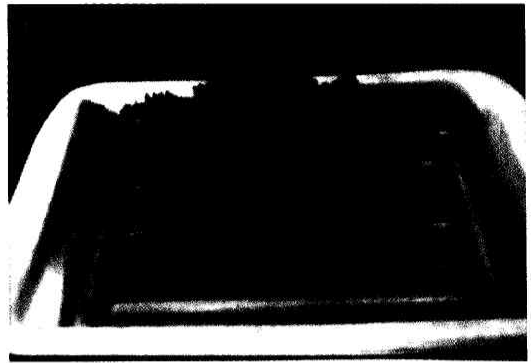


図1 実験試料の採集地



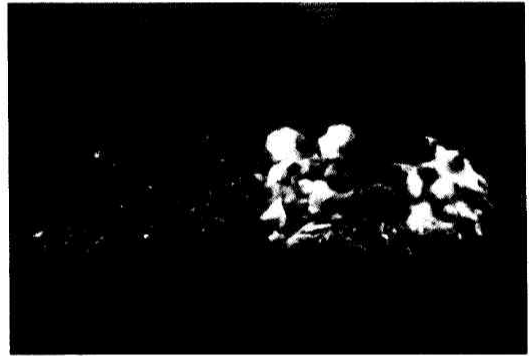
a



b



c



d



e



f

図2 各地個体の外形写真

a; 稚内A型（左奥の白桃色の個体），b; 小樽A型（右中央の赤褐色の個体はアカボヤ），c; 陸奥湾産3型と男鹿産C型（下左から陸奥湾産A, B, C型，男鹿産C型，上2個体はイガボヤ類），d; 佐渡産C型 e; 管島産C型, f; 牛窓産C型。

## 実験方法

### mtDNAの精製

mtDNAはKomm *et al.* (1982)の方法を改良し、生殖巣、中腸腺、筋肉などから抽出した。5~7gの組織を粥状にし、氷冷しながら40 mlのSP buffer (400 mM NaCl, 125 mM KCl, 100 mM EDTA 3 Na, 50 mM Tris-HCl)とともに、ホモジナイズした。試料を800×g, 2 °Cで10分間遠心を行い、その上清を更に10,000×gで10分間遠心した。遠心後、ペレットを2 mlのEST buffer (150 mM NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl)に懸濁し、500 μlの20% SDSを加え、室温で10分間置いた。その後、200 μl of RNase (0.2 unit/l)を試料に加え、室温で10分間置いた。4MのNaCl溶液を最終濃度 1.2Mになるように加えた。試料を30分氷冷後、10,000×g, 2 °Cで10分間遠心を行い、20 μlのエチジウムブロマイド(10 mg/ml)を加えた上清を3.9 mlチューブに封入した。垂直ローターを用い (TLN-100, Beckman OptimaTL), 399,000×g, 15 °Cで4時間超遠心を行い、閉環状 (closed circular ; cc) と開環状 (open circular ; oc) に分離したmtDNAをそれぞれ10 mlシリンジで吸い出し、試料からエチジウムブロマイドをNaCl飽和イソプロパノールを用いて除いた。mtDNA試料に100% エタノールを加えた後、-30 °Cで冷却した。70% エタノールで5~8回洗った後、mtDNA試料を吸引乾燥し、100 μlのTE buffer (10 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA 3 Na)に懸濁した。

### mtDNAの制限酵素による消化

本研究ではmtDNAを切断後した際に解析可能な泳動像の得られた12種類の制限酵素 (*Ava*I, *Bam*HI, *Ban*II, *Bgl*II, *Eco*RV, *Eco*T14I, *Eco*T22I, *Hinc*II, *Hind*III, *Pst*I, *Xba*I, *Xho*I ; TAKARA syuzo Co.) を使用し、各個体より抽出、精製したmtDNA試料を消化した。5 μlのmtDNA資料に対し、それぞれ10 - 12 ユニットの制限酵素を使用し、37 °Cで4 ~12時間反応を行った。

## アガロースゲル電気泳動

各制限酵素で個々に消化した試料mtDNAをミューピッド電気泳槽を用い、1%アガロースゲル中で泳動した。泳動は50Vで行い、泳動終了後ゲルをEtBr染色液(0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )で15分間染色し、長波長紫外線を照射してバンドを検出、コダック社製モノクロポラロイドカメラ、もしくはATTOデンストグラフver.1.2.によって泳動像の確認、撮影を行った。mtDNAの断片長はmtDNA試料とともに泳動を行ったHindIII-digested lambda-DNA分子量マーカー(TAKARA syuzo Co.)の泳動距離との相対的距離から積算した。

## 集団遺伝学的解析

各酵素により切断されたmtDNAの泳動像から断片型を決定し、その組み合わせからハプロタイプを決定した。更に制限消化断片長の相違(RFLP法; Restriction Fragment Length polymorphism; Nei and Li, 1979)及び、マボヤmtDNAの全塩基配列(横堀 1994)から使用した制限酵素の認識部位を推定し、マボヤ各ハプロタイプ間及び、各地集団間における遺伝的距離 $d$ (Nei and Li 1979)の推定を行った。遺伝的距離の算出はKobayashi and Saitoh (1989)のRestriction Fragment Length Polymorphism by RFLP ver.2によって行い、UPGMA(Unweighted Pair-Group Method-determined)法による系統樹の作成には、Nanba and Saitoh (1989)のTURBO Pascal system ver.3.02Aを使用した。

## DNAの増幅(PCR)

RFLPに用いた各地方集団のうち、それぞれ5~7個体の塩基配列の決定を行った。増幅反応は10~100ngのDNAに対し、ex Taq premix reagent 25  $\mu\text{l}$ (TAKARA Syuzo Co.)、プライマーは各50pgを使用し、反応溶液が全量で50  $\mu\text{l}$ となるように滅菌水を加えた。PCRプライマーはマボヤmtDNA全塩基配列(Yokobori 1993)と5種の動物

のチトクローム*b* (Cyt*b*) 領域を比較し、保存性の高い領域を参考に設計した。

プライマーの配列は、5'-TGAAGGGCAACGGTTATTAC-3' (Hrf1) , と 5'-TAGCGCAAGTGTGTAGGT GTCC- 3' (Hrr1)とした。増幅は94°C 30秒, 52°C 30秒, 72°C 1分, の条件で30サイクル行った。増幅されたPCR産物はUltra clean Kit (Mo Bio Lab. Inc.) で精製を行った。PCR産物から直接塩基配列決定法で塩基配列の決定を行った。反応にはdRhodamine dye terminator sequencing Kit (ABI)を用い、96°C 10秒, 50°C 5秒, 60°C 4分, の条件で25サイクル行った。塩基配列決定の際のプライマーには、forwardとreverseそれぞれHrf1 とHrr1を用いた。

## 結果

### RFLPによる結果

全国10地点の集団から抽出したマボヤmtDNAの切断を12種類の制限酵素で行った結果、多くの個体が1~8本の断片に切断された(図3)。12種類の制限酵素のうち、5酵素(*Ava*I, *Ban*II, *Eco*T22I, *Hinc*II, *Xba*I)で変異(多型)が検出された。図4に多型の検出された各酵素の制限切断地図を示す。

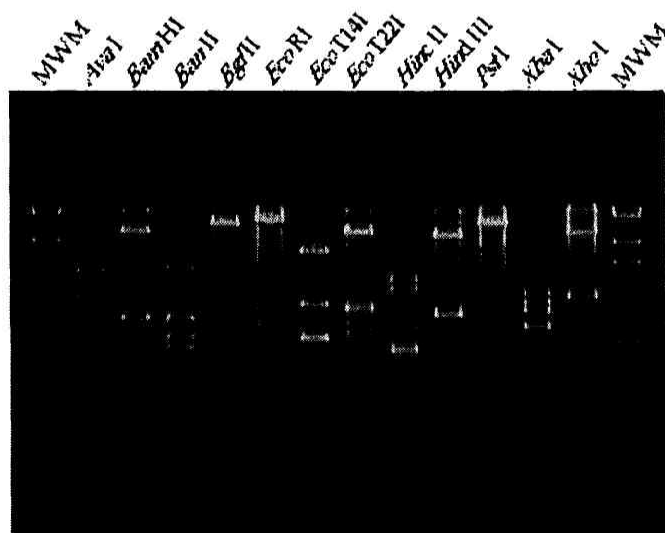


図3 マボヤmtDNAの電気泳動像  
写真上部に制限酵素名を示す。MWMは分子量マーカー。



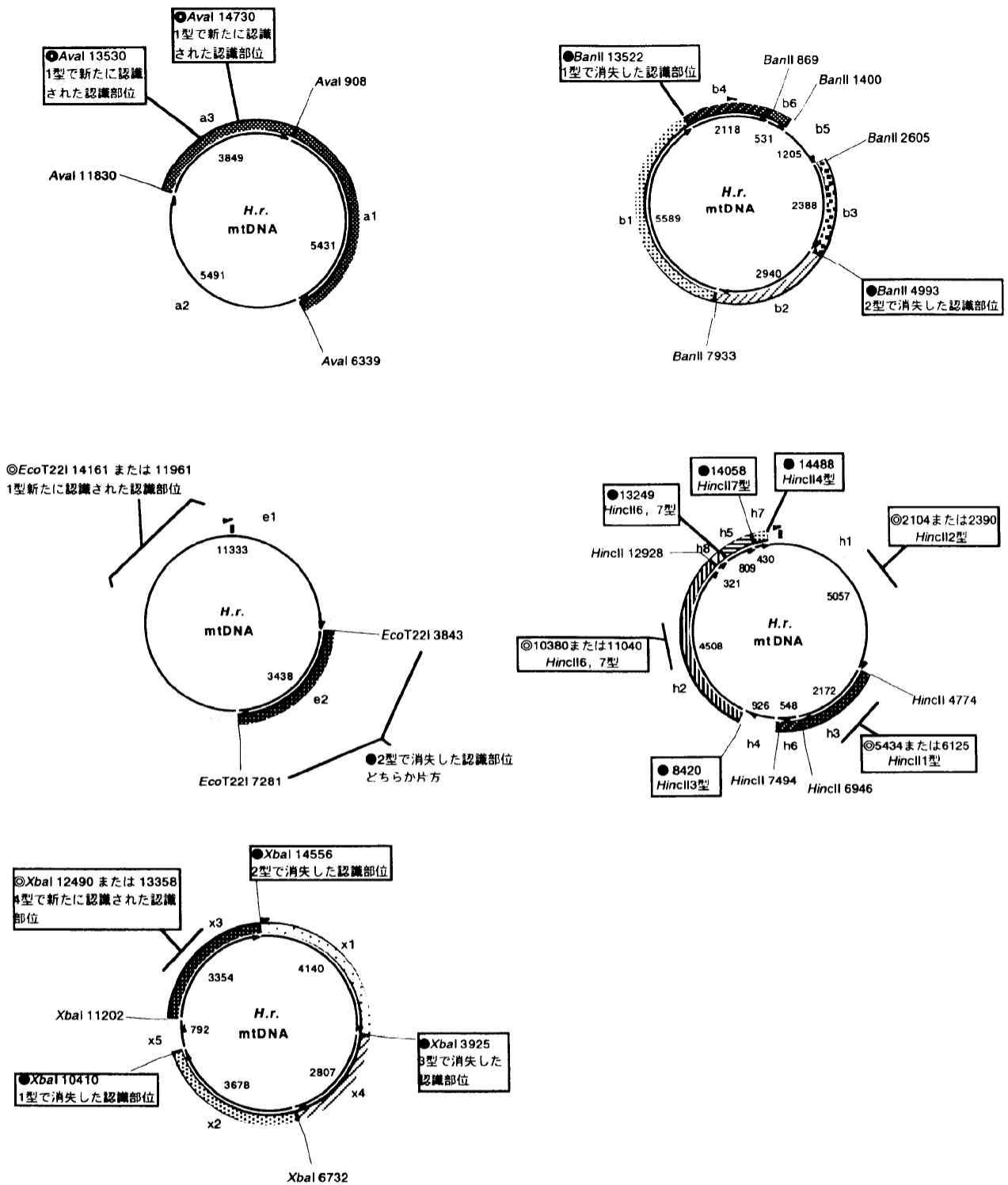


図4 多型の検出された制限酵素によるマボヤmtDNAの切断地図

制限酵素名の後の算用数字は認識部位の位置を表す。◎は各切断型で特有に認識された部位，●は各切断型で消失したと考えられる部位。

## RFLP解析によるマボヤ各地集団標本のハプロタイプの決定と特徴

各地域集団のマボヤ合計222個体のRFLP解析において31個体の多型が検出できた。12種類の制限酵素を使用したか、複数の切断型が検出できたのはAvaI, BanII, EcoT22I, HincII, XbaIの5酵素で、検出された切断型は2~7種類だった。これらの各切断型の組み合わせからハプロタイプを決定し、表1にまとめた。マボヤ集団では15種類のハプロタイプ (I~XV) に分類できた。これらハプロタイプのうち、I型はマボヤの各地域集団標本のどの地域標本群からも最も高い頻度 (50~100%) で見られたものであった。ほかのハプロタイプについてみると、II型は浅虫産A型および稚内産A型標本群のみに見られたハプロタイプであり、A型独特といえる。一方、IV, VI型は浅虫, 山田C型の標本群のみで、IX型は大槌, 鮫の浦C型標本群のみで検出され、C型のみで検出されたハプロタイプであった。VII型, VIII型, X型, XI型, XII型, XIII型, XIV型, XV型は各標本集団においてのみ検出されたハプロタイプでそれぞれの地域で1, 2個体ずつ検出された。III型については生殖時期と産卵時刻の相違によって分けられた3型に関わらず、地理的に近い地点内でみられた。V型は3型間、地理的距離に関わらず各地で検出されたハプロタイプであった。またVI型は2種類の制限酵素で、XIII型は3種類の制限酵素で多型を表したハプロタイプであった。これらハプロタイプは上述のように若干の特異性をもって検出されているようにみえた。しかし、調査個体数の少ない標本群以外はI型以外の各ハプロタイプの検出率は8~20%と非常に低かった。各地域標本群における集団内の多型率をNei and Tajima (1981) の Nucleon diversity (h) で表すと、表2に示す結果となる。この値によると、調査個体数が少ない標本群以外では陸奥湾のA型が最も多様度が高く、ついで男鹿のC型、陸奥湾のC型という結果になった。

表1 マボヤで検出された切断型とハプロタイプ及び地域集団との相関

上表の横はマボヤ各地標本集団で検出されたハプロタイプを示し、縦は使用した制限酵素名を示す。表内のHrはマボヤ種内で最も多く見られた切断型を示し、各算用数字はそれぞれの制限酵素で見られた多型を示す。下表の縦は各地標本集団、横内の算用数字は各ハプロタイプの検出個体数を示す。

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
<i>Ava</i> I	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	1
<i>Ban</i> II	Hr	Hr	Hr	Hr	1	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	2	Hr
<i>Eco</i> T14I	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr
<i>Hln</i> c II	Hr	1	2	Hr	Hr	3	4	5	6	Hr	Hr	Hr	7	Hr	Hr
<i>Bam</i> HI	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr
<i>Bgl</i> II	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr
<i>Eco</i> RV	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr
<i>Eco</i> T22I	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	1	Hr	2	Hr	Hr
<i>Hln</i> d III	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr
<i>Pst</i> I	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr
<i>Xba</i> I	Hr	Hr	Hr	1	Hr	2	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	3	4	Hr	Hr
<i>Xho</i> I	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr	Hr
検出個体数	192	6	4	2	4	2	1	1	2	2	1	1	1	2	2

陸奥河A	20	5														
陸奥河B	22		2													
陸奥河C	21		1	1	1											
大槌C	23				1		1									
山田C	22			1		1					1					
鯉の浦C	28		1		1			1	1							
権内A	9	1			1											
小樽A	3									1						
男鹿C	20											1	1	2		2
佐渡C	2															
菅島C	17															
牛窓C	5							1								

表2 各地域標準集団における各ハプロタイプの頻度

横は各地域標準集団を示す。縦は各ハプロタイプの検出個体数とその頻度を示す。hはNei&Tajima(1981)が提唱した各集団内における多様性の大きさを表す指数でこの値が大きい程多様性が大きいとする。

	陸奥湾A			陸奥湾B			陸奥湾C					大槓C				
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	IV	V	VI	I	V	VII	IX
個体数	20	5	22	2	21	1	1	1	1	1	1	1	23	1	1	1
頻度	0.80	0.20	0.92	0.083	0.84	0.040	0.040	0.040	0.040	0.040	0.040	0.040	0.89	0.039	0.039	0.039
h	0.64			0.30			0.36					0.28				

	山田C						数の浦C						小樽A			稚内A		
	I	IV	VI	XI	I	III	V	IX	X	I	X	I	II	V				
個体数	23	1	1	1	28	1	1	1	1	3	1	9	1	1				
頻度	0.89	0.039	0.039	0.039	0.88	0.031	0.031	0.031	0.031	0.75	0.25	0.82	0.091	0.091				
h	0.28						0.29						0.75			0.47		

	男鹿C						佐渡C			曹島C		牛窓C	
	I	XII	XIII	XIV	XV	VIII	I	XV	I	I	I	VIII	
個体数	20	1	1	2	2	2	2	2	17	5	1	1	
頻度	0.83	0.042	0.042	0.083	0.50	0.50	0.50	0.50	1	0.83	0.20	0.20	
h	0.39						1			0		0.54	

一方，陸奥湾B型では調査個体数が比較的多いにもかかわらず，I型以外としてはIII型のみしか検出されず，菅島C型では17個体全てがI型のみを表す結果となった．菅島C型においては，他の標本集団で多型の検出された3酵素では30個体以上の解析を行ったが，I型以外の切断型は検出されなかった．小樽産A型，稚内産A型，佐渡産C型，牛窓産C型の各集団については調査個体数が4個体，11個体，4個体，6個体と少なかったため，調査個体数を増やし，精度を高める必要がある．

### ハプロタイプ間，各地域集団間における塩基置換率

#### ハプロタイプ間における塩基置換率

各地域標本集団から検出されたハプロタイプ間，および各地域標本集団間の塩基置換率をNei and Li (1979)の方法を用いて，制限酵素切断部位データから算出した．各ハプロタイプ間の $d$ 値を表3に示す．表の下三角内には各ハプロタイプ間における4.2塩基対，6塩基対認識酵素による共通切断部位数を，上三角内は各ハプロタイプ間における $d$ の値を示している．これによると，マボヤ集団の14種類のハプロタイプ間の遺伝的距離 $d$ は約 $0.209 \sim 1.6 \times 10^{-2}$ となり，陸奥湾のマボヤ3型間で見られた値よりも大きな値をとった．これら $d$ の値から各ハプロタイプ間の系統樹をUPGMA法で作製し，図5に示した．陸奥湾の3型で検出されたI型，II型，III型のクレードとIV型の間には各地標本群で検出されたハプロタイプが先に連結する結果になった．

表3 切断部位データによるマボヤハプロタイプ間の遺伝的距離

上三角形内部の算用数字はマボヤで検出されたハプロタイプ間の遺伝的距離  $d$  ( $\times 0.01$ ) を表し、下三角形内部は共通切断部位数 (右が6塩基対認識酵素、左が4,2塩基対認識酵素) を表す。  
 三角形長辺の ( ) の中に各ハプロタイプの切断断片数を示す。

	I	II	III	IV	V	VI	VII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
I	(21 21)	0.209	0.209	0.214	0.214	0.436	0.214	0.214	0.426	0.208	0.651	1.098	0.214	0.416
II	21 21	(22 21)	0.416	0.426	0.426	0.651	0.426	0.426	0.636	0.415	0.426	1.311	0.426	0.622
III	21 21	21 21	(22 21)	0.426	0.426	0.651	0.426	0.426	0.636	0.415	0.426	1.311	0.426	0.622
IV	21 20	21 20	21 20	(21 20)	0.436	0.219	0.436	0.436	0.651	0.432	0.436	1.344	0.436	0.637
V	20 21	20 21	20 21	20 20	(20 21)	0.219	0.436	0.436	0.651	0.425	0.436	1.343	0.436	0.636
VI	20 20	20 20	20 20	20 19	20 20	(20 20)	0.667	0.667	0.884	0.650	0.667	1.599	0.667	0.864
VII	20 20	20 21	20 21	20 20	19 21	19 20	(20 21)	0.436	0.651	0.425	0.436	1.343	0.436	0.636
IX	20 21	20 21	20 21	20 20	19 21	19 20	19 21	(20 21)	0.651	0.425	0.436	1.343	0.436	0.636
X	20 21	20 21	20 21	20 20	19 21	19 20	19 21	19 21	(21 21)	0.635	0.651	0.650	0.651	0.844
XI	21 21	21 21	21 21	21 20	20 21	20 20	20 21	20 21	20 21	(21 22)	0.425	1.309	0.425	0.621
XII	20 20	21 20	21 20	21 19	20 20	20 19	20 20	20 20	20 20	21 20	(21 20)	1.344	0.436	0.637
XIII	19 20	19 20	19 20	19 19	18 20	18 19	18 20	18 20	20 20	19 20	19 19	(20 21)	1.343	1.523
XIV	20 21	20 21	20 21	20 20	19 21	19 20	19 21	19 21	19 21	20 21	20 20	18 20	(20 21)	0.636
XV	21 21	21 21	21 21	21 20	20 21	20 20	20 21	20 21	20 21	21 21	21 20	19 20	20 21	(22 21)

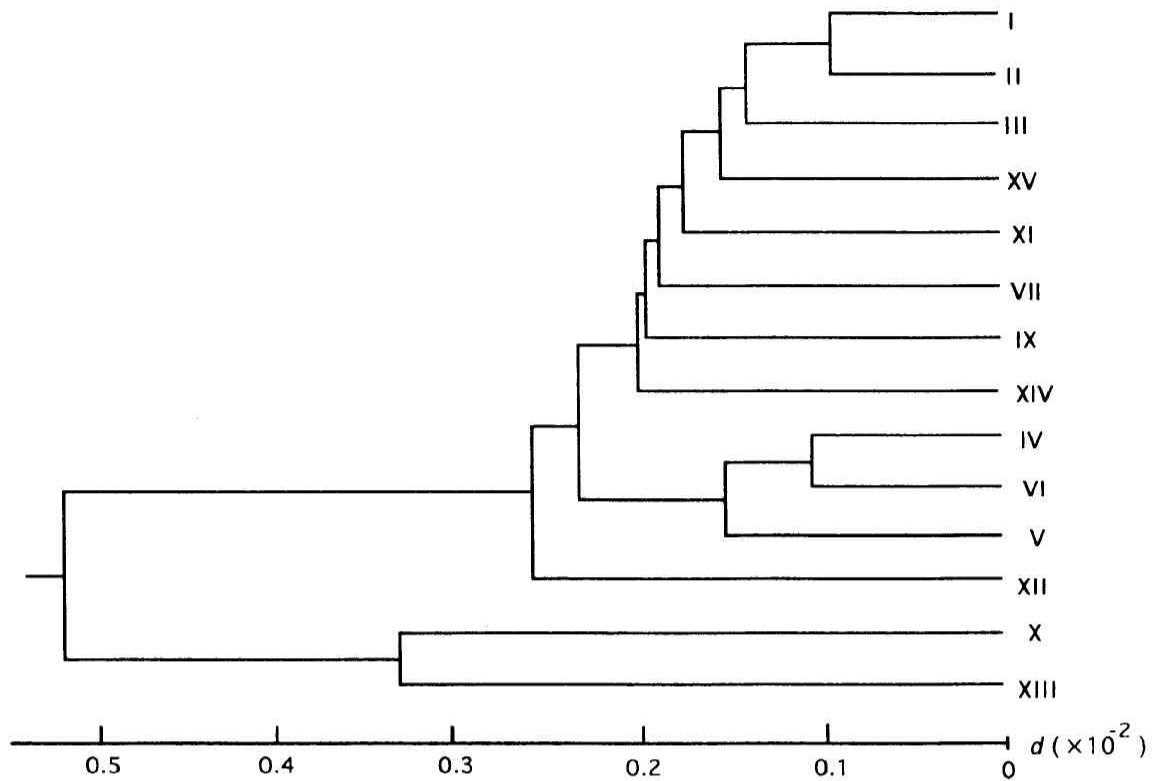


図5 切断部位データによるマボヤのハプロタイプの系統樹 (UPGMA法)

### 各地標本集団間における塩基置換率

各ハプロタイプ間の塩基置換率と、各標本集団で検出されたハプロタイプの頻度から各標本集団間の塩基置換率を算出することができる (Nei, 1987)。表4に各地域標本集団間の $d$ 値を示す。各地域標本集団間における $d$ 値は $0.042 \times 10^{-2}$  (陸奥湾B型と大槌C型) から $0.21 \times 10^{-2}$  (小樽A型と佐渡C型) で、ハプロタイプ間で見られた $d$ 値よりも10分の1程度小さくなった。これらの値より系統樹を作製し、各地標本集団間の関係を解析した。UPGMA法で作製した系統樹を図6に、NJ法で作製した系統樹を図7に示す。図6では陸奥湾B型に大槌C型、鮫の浦C型、山田C型、と繋がる形となり、一番外側に男鹿C型が繋がる形となった。調査個体数が少ないため他の各地標本集団と同等に見ることはできないが、小樽産A型と佐渡産C型は明らかに他のクラスターから離れていることなどが明らかになった。

表4 切断部位データによるマボヤ各地集団間における遺伝的距離  
 三角形内部の算用数字はマボヤ各地集団間の遺伝的距離  $d$  ( $\times 0.01$ )を表す。

	陸奥湾 A型	陸奥湾 B型	陸奥湾 C型	大槌 C型	山田 C型	鯨の浦 C型	小樽 A型	権内 A型	男鹿 C型	佐渡 C型
陸奥湾 A型	0.0591									
陸奥湾 B型	0.0848	0.0589								
陸奥湾 C型	0.0666	0.0421	0.0668							
大槌 C型	0.0749	0.0504	0.0720	0.0572						
山田 C型	0.0751	0.0496	0.0747	0.0577	0.0659					
鯨の浦 C型	0.1484	0.1239	0.1590	0.1359	0.1336	0.1333				
小樽 A型	0.0727	0.0558	0.0784	0.0618	0.0701	0.0703	0.1452			
権内 A型	0.1298	0.1065	0.1311	0.1136	0.1219	0.0674	0.1839	0.1261		
男鹿 C型	0.1461	0.1218	0.1476	0.1294	0.1295	0.1374	0.2111	0.1110	0.1864	
佐渡 C型										



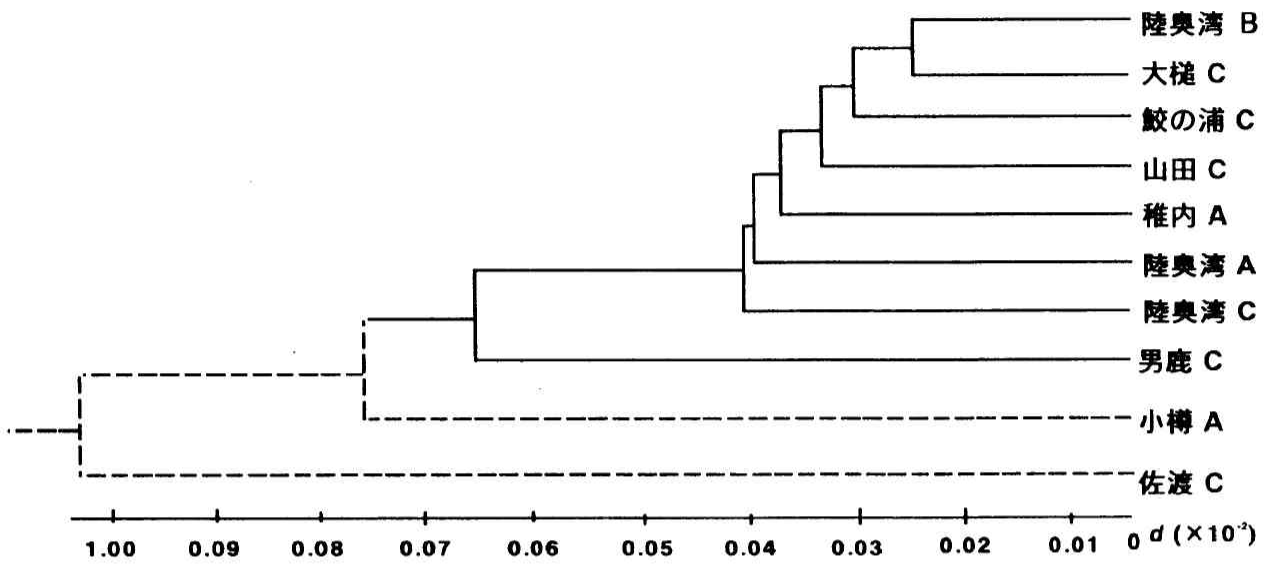


図6 マボヤ各地方集団の系統樹 (UPGMA)

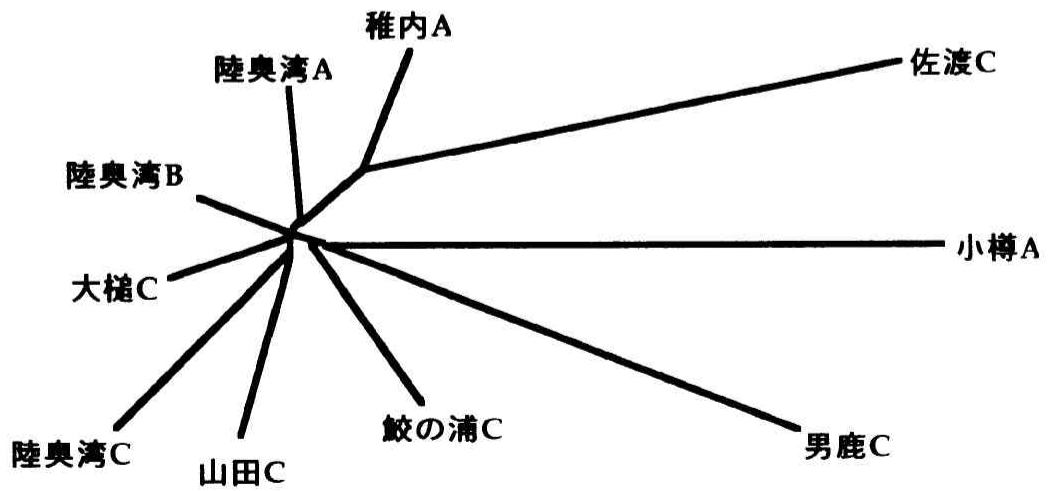


図7 マボヤ各地域集団の系統樹 (NJ)

小樽産A型と佐渡産C型は調査個体数が少ないことを考慮し、点線で他のクレードとつなげている。また切断部位の確定が確定できなかった為表記はしていないが、牛窓産C型は小樽産A型と同程度の遺伝的距離となった。次にNJ法で作製した図7では、小樽、佐渡、男鹿、稚内などの集団が明らかに他集団から離れているが、地理的關係や生殖時期、時刻の異なる3型をきれいに表すような樹形は得られなかった。

### Cyt b 遺伝子一部領域の塩基配列

各地域集団，それぞれ5～7個体のCyt b 遺伝子一部領域の塩基配列を決定した（図8）。小樽産A型や，牛窓産C型，佐渡産C型など各地域集団に固定された変異も数塩基検出された。しかしそれら変異はいずれも点変異であり，すべて第3コドンに生じたものであった。23のハプロタイプが検出されたが（表5），その他配列の大部分に変異が見つからなかった。また得られたデータから系統樹を作成したが，こちらも各地域集団の地理的關係を表す形にはならなかった（図9）。

表5 塩基配列データより各地域標本集団で検出されたハプロタイプ

	陸奥湾A		陸奥湾B		陸奥湾C		大磯C		
	i	ii	i	iii	i	iii	i	iv	v
個体数	6	1	6	1	6	1	5	1	1
頻度	0.86	0.14	0.86	0.14	0.86	0.14	0.71	0.14	0.14

	山田C			鯉の浦C		小樽A		
	i	vi	vii	i	viii	ix	x	xi
個体数	3	1	1	7	1	3	2	1
頻度	0.6	0.2	0.2	0.86	0.13	0.5	0.33	0.17

	稚内A				男鹿C		
	i	xii	xiii	xiv	i	xv	xvi
個体数	2	2	1	1	3	2	1
頻度	0.33	0.33	0.17	0.17	0.5	0.33	0.17

	佐渡C				菅島C		牛窓C		
	xvii	xviii	xix	xx	i	xxi	xxii	xxiii	xxiv
個体数	4	2	1	1	7	1	4	1	1
頻度	0.57	0.29	0.14	0.14	0.86	0.13	0.67	0.17	0.17

```

A1 1 TTTAGTGCATCCCTTTTATG6GG6TTGATATTGTGACTGGGTATGGAGGAGGTATTCTGTTAGAGCTCCGACATTAACTCGATTTTATACCTTTCACTTTTATTTTCCCTTTTGTATTGCTGTATTGCTTTTATAGTATTTTACATAGTA 160
A2 T
A3 T
A4 T
A5 T
A6 T
A7 T
B1 T
B2 T
B3 T
B4 T
B5 T
B6 T
B7 T
C1 T
C2 T
C3 T
C4 T
C6 T
C7 T
ots 1 T
ots 2 T
ots 3 T
ots 4 T
ots 5 T
ots 6 T
wakka1 T
wakka2 T
wakka3 T
wakka4 T
wakka5 T
wakka6 T
ot1 T
ot2 T
ot3 T
ot4 T
ot5 T
oga1 T
oga2 T
oga3 T
oga4 T
oga5 T
oga6 T
sado1 T
sado2 T
sado3 T
sado4 T
sado5 T
sado6 T
sado7 T
yam1 T
yam2 T
yam3 T
yam4 T
yam5 T
same1 T
same2 T
same3 T
same4 T
same5 T
same6 T
same7 T
same8 T
suga1 T
suga2 T
suga3 T
suga4 T
suga5 T
suga6 T
suga7 T
suga8 T
usi1 T
usi2 T
usi3 T
usi4 T
usi5 T
usi6 T

```

A, B, Cは陸奥湾産の3型, otsは大槌産C型, wakkaは稚内産C型, otは小樽産C型, ogaは男鹿産C型, sadoは佐渡産C型, yamは山田産C型, sameは鮫の浦産C型, sugaは管島産C型, usiは牛窓産C型鋸体を表す。

図8 各地域集団, それぞれ5~7個体のCyt b 遺伝子一部領域の塩基配列 (1/3)

A, B, Cは陸奥湾産の3型, otsは大槌産C型, wakkaは稚内産C型, otは小樽産C型, ogaは男鹿産C型, sadoは佐渡産C型, yamは山田産C型, sameは鮫の浦産C型, sugaは管島産C型, usiは牛窓産C型鋸体を表す。

A1	161	AGGGAAGTACTAATCCGCTTAAGGCTACAACCGCTAGGTTAAAGGTAAGTTTTGGCCATTATTTGGGTTAAGGATATTTATAGATTTTTGTTGTTTTTGGGTTTGTATTGGTGGTTGGTTTTTATCCAGATGCTTTTAGGATCCGGATAATTT
A2	161	.....
A3	161	.....
A4	161	.....
A5	161	.....
A6	161	.....
A7	161	.....
B1	161	.....
B2	161	.....
B3	161	.....
B4	161	.....
B5	161	.....
B6	161	.....
B7	161	.....
C1	161	.....
C2	161	.....
C3	161	.....
C4	161	.....
C6	161	.....
C7	161	.....
ots 1	161	.....
ots 2	161	.....
ots 3	161	.....
ots 4	161	.....
ots 5	161	.....
ots 6	161	.....
wakka1	161	.....
wakka2	161	.....
wakka3	161	.....
wakka4	161	.....
wakka5	161	.....
wakka6	161	.....
ot1	161	.....
ot2	161	.....
ot3	161	.....
ot4	161	.....
ot5	161	.....
oga1	161	.....
oga2	161	.....
oga3	161	.....
oga4	161	.....
oga5	161	.....
oga6	161	.....
sado1	161	.....
sado2	161	.....
sado3	161	.....
sado4	161	.....
sado5	161	.....
sado6	161	.....
sado7	161	.....
yam1	161	.....
yam2	161	.....
yam3	161	.....
yam4	161	.....
yam5	161	.....
same1	161	.....
same2	161	.....
same3	161	.....
same4	161	.....
same5	161	.....
same6	161	.....
same7	161	.....
same8	161	.....
suga1	161	.....
suga2	161	.....
suga3	161	.....
suga4	161	.....
suga5	161	.....
suga6	161	.....
suga7	161	.....
suga8	161	.....
usi1	161	.....
usi2	161	.....
usi3	161	.....
usi4	161	.....
usi5	161	.....
usi6	161	.....

図8 各地域集団，それぞれ5～7個体のCyt b 遺伝子一部領域の塩基配列 (2/3)

A, B, Cは陸奥湾産の3型，otsは大槌産C型，wakkaは稚内産C型，otは小樽産C型，ogaは男鹿産C型，sadoは佐渡産C型，yamは山田産C型，sameは鮫の浦産C型，sugaは管島産C型，usiは牛窓産C型鋸体を表す。

A1	321	TATAAAAGCCAATCCTATAGTAACTCCATTGCATATTAAG	360
A2	321	.....	360
A3	321	.....	360
A4	321	.....	360
A5	321	.....	360
A6	321	.....	360
A7	321	.....	360
B1	321	.....	360
B2	321	.....	360
B3	321	.....	360
B4	321	.....	360
B5	321	.....	360
B6	321	.....	360
B7	321	.....	360
C1	321	.....	360
C2	321	.....	360
C3	321	.....	360
C4	321	.....	360
C6	321	.....	360
C7	321	.....	360
ots 1	321	.....	360
ots 2	321	.....	360
ots 3	321	.....	360
ots 4	321	.....	360
ots 5	321	.....	360
ots 6	321	.....	360
wakka1	321	G.....C.....	360
wakka2	321	.....	360
wakka4	321	.....	360
wakka5	321	.....	360
wakka6	321	G.....	360
wakka7	321	G.....	360
ot1	321	.....	360
ot2	321	G.....	360
ot3	321	.....	360
ot4	321	.....	360
ot5	321	.....	360
oga1	321	.....	360
oga2	321	.....	360
oga3	321	.....	360
oga4	321	.....	360
oga5	321	.....	360
oga6	321	.....	360
sado1	321	.....	360
sado2	321	.....	360
sado3	321	.....	360
sado4	321	.....	360
sado5	321	.....	360
sado6	321	.....	360
sado7	321	.....	360
yam1	321	.....	360
yam2	321	.....	360
yam3	321	.....	360
yam4	321	.....	360
yam5	321	.....	360
same1	321	.....T.....	360
same2	321	.....	360
same3	321	.....	360
same4	321	.....	360
same5	321	.....	360
same6	321	.....	360
same7	321	.....	360
same8	321	.....	360
suga1	321	.....	360
suga2	321	.....	360
suga3	321	.....	360
suga4	321	.....	360
suga5	321	.....	360
suga6	321	.....	360
suga7	321	.....	360
suga8	321	.....	360
usi1	321	.....	360
usi2	321	.....	360
usi3	321	.....	360
usi4	321	.....	360
usi5	321	.....	360
usi6	321	.....	360

.. \*\*\*\*\*

図8 各地域集団，それぞれ5～7個体のCyt b 遺伝子一部領域の塩基配列（1/3）  
A, B, Cは陸奥湾産の3型，otsは大槌産C型，wakkaは稚内産C型，otは小樽産C型，ogaは男鹿産C型，sadoは佐渡産C型，yamは山田産C型，sameは鮫の浦産C型，sugaは管島産C型，usiは牛窓産C型鋸体を表す。

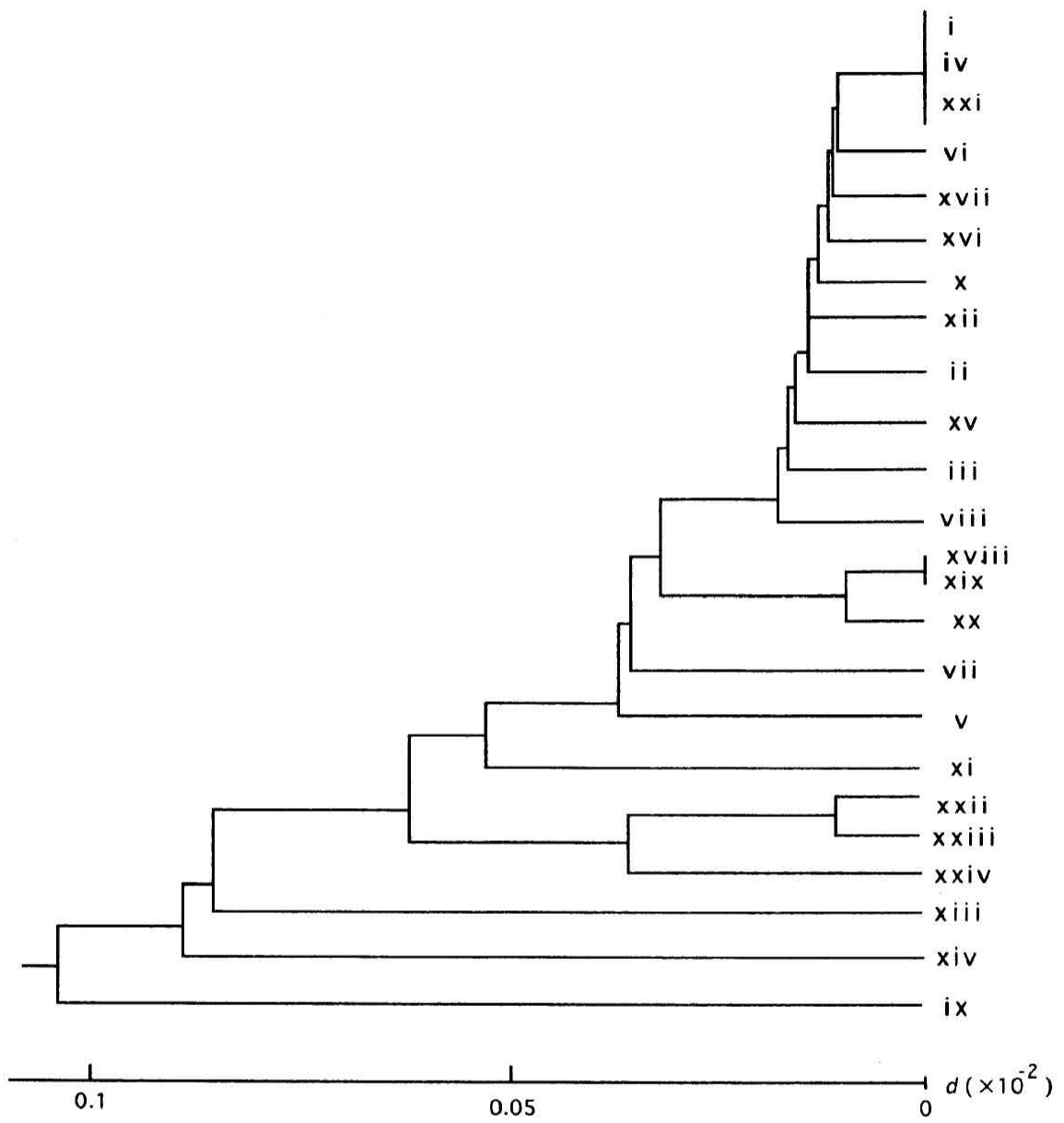


図9 塩基配列データによるハプロタイプの系統樹 (UPGMA)

## 考察

### マボヤmtDNA変異の位置

マボヤmtDNA配列上において、本研究で解析に使用した12種類の制限酵素の認識部位は42箇所、約210塩基対であり、これら領域について変異の有無を調査したことになる。図10にマボヤmtDNAの全酵素切断部位を、図11に変異の起きたと考えられる切断部位を示す。マボヤmtDNAの全配列上において、本研究で使用した制限酵素の認識部位は42箇所存在し、これは約214の塩基対について変異の有無を調査したことに相当する。mtDNAには遺伝子をコードしている領域と何もコードしていない領域があり (Clayton 1982)、何もコードしていない領域には、H鎖複製起点と転写開始点を含み、複製の初期に短い伸張鎖が確認されることからD loopと呼ばれている領域や遺伝子と遺伝子の間の短いスペーサーと呼ばれる領域が存在する。このD loopやスペーサーといった領域は塩基置換が最も速く生じる領域といわれており (Wolstenholme 1992)、マボヤのmtDNAにもこれら領域は存在する。本研究において検出された多型の変異の起きたと考えられる部位を図11で見えてみると、mtDNAほぼ全体にあるが、若干一部の領域 (13,000~14,000塩基対付近) に偏りがあるように見える。マボヤmtDNAではこの領域はD loopやスペーサーといった領域ではなく、NADH脱水素酵素のサブユニットND1やATPase 6をコードしており (横堀 未発表データ)、遺伝子領域であった。何もコードしていない領域よりも遺伝子領域に変異が多く検出された原因としては、使用した12酵素が認識する塩基配列がD loop、スペーサーといった領域に少なかった事が1つの原因として考えられる。

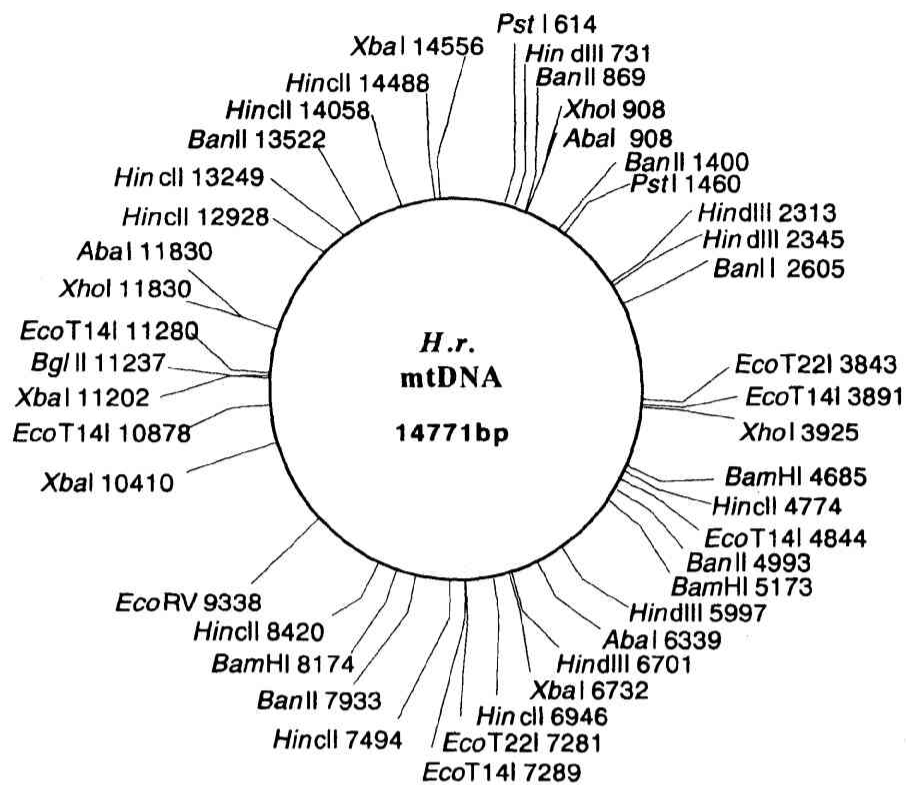


図10 マボヤmtDNA配列上における全切断部位

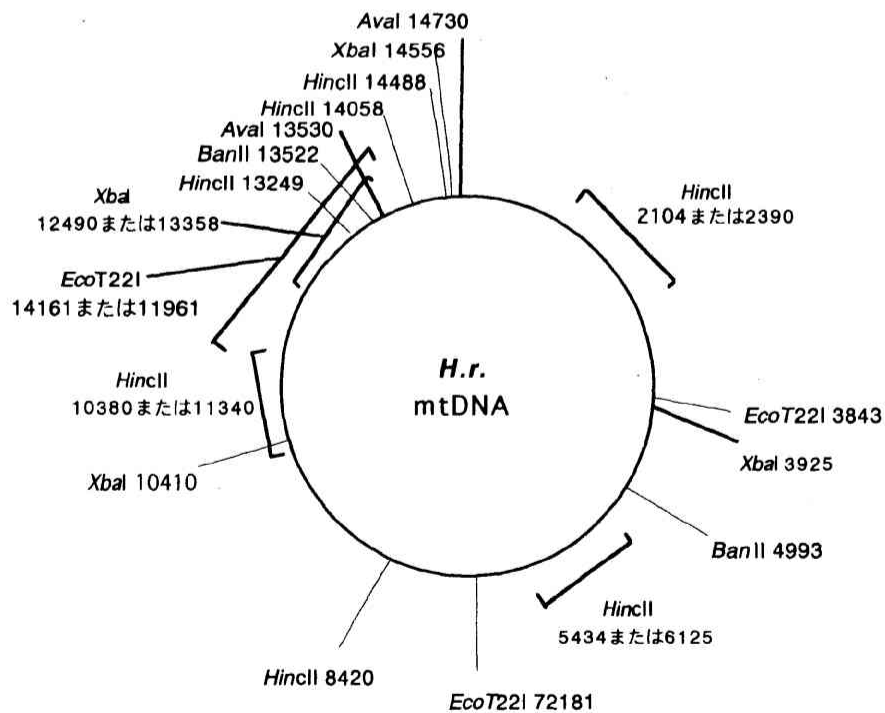


図11 マボヤmtDNA配列上で変異が起こったと考えられる切断部位



一方、*Cyt b* 遺伝子一部領域（360塩基対）の比較においては、小樽産A型で、1塩基、佐渡産C型で2塩基、牛窓産C型で3塩基の固定された変異が検出された。しかしどの変異も第3コドンで起きたものであり、他の部位での変異も数個体で検出されたのみであった。

#### 検出されたハプロタイプ

##### RFLP解析

I型はどの集団にも高頻度で検出されたハプロタイプであった。I型以外のハプロタイプを見てみると、II型は浅虫A型と稚内A型の標本群のみに見られ、IV、VI型は浅虫、山田C型の標本群のみで、IX型は大槌、鮫の浦C型標本群のみで検出されたハプロタイプであり、II型、VIII型、X型、XI型、XII型、XIII型、XIV型、XV型などは出現頻度は非常に小さいながらも、各地域集団独特に検出されている。これらハプロタイプの分布様式はアメリカカキ*Crassostrea virginica*の各地域集団（Reeb and Avise 1990）やカブトガニ*Limulus polyphemus*の各地域集団（Saunders *et al.*, 1986）の分化の程度と比較すると、僅かではあるが各地域集団の特徴、すなわち各集団内において遺伝子拡散（gene flow）が起きている可能性を示唆しているようにみえる。

#### *Cyt b* 遺伝子一部領域の塩基配列

塩基配列の解析では24のハプロタイプが検出された。それぞれのハプロタイプは各地域集団に独特にみられたものだったが、検出されたすべての変異が点変異であったため、RFLPの結果よりもさらに、地域集団の地理的距離と相関するような結果は得られなかった。

## 菅島の標本集団

RFLPの解析においては、調査を行ったどの標本集団からも1個体以上多型切断型が検出されたが、菅島の集団からは15個体中、1個体も多型が検出されなかった。菅島の集団は、多型の検出されている3酵素 (*Ban* II, *Hinc* II, *Xba*I) では30個体以上の解析を行ったが、I型以外の切断型は1個体も検出されなかった。これは他標本集団と比較検討して明らかに通常では考えられない遺伝的に単一な集団である。菅島の標本集団が自然の状態で棲息範囲を拡大し、菅島に棲息するようになったならば、その過程で遺伝的な変異がmtDNAに生じ、蓄積されていても不思議はない。しかし本研究のRFLP解析で検出された変異はほぼ皆無であった。この原因の1つとして、本研究で使用した菅島の集団は人為的な影響によって菅島周辺に棲息するようになったという事が考えられる。人為的な影響としては、多々考えられるが、そのひとつとしてカキの養殖があげられる。菅島では約10年程前からカキの養殖をはじめており、その種苗は仙台からのものを使用している(西川 1998)。マボヤが菅島付近に棲息するのが確認されるようになったのはおよそ7, 8年前からであり、これらのことを考慮すると、本研究で使用した菅島の集団はカキ種苗とともに菅島に運ばれてきた少数のマボヤがその小集団のなかで交雑を繰り返し、周辺に棲息するようになった可能性が高い。

## マボヤ各地集団の遺伝的分化の割合

RFLP解析におけるマボヤmtDNAの多型出現頻度を見てみると、総数226個体のうち、多型を表した個体はわずかに31個体であった。すなわち、86%が1つのハプロタイプI型を表している。地域集団とハプロタイプの関係をもみても、I型がどの地域集団からも0.5~0.92と最も優位に検出されており、他のゲノム型の出現頻度はほとんどが0.1を越えない低い

ものであった。mtDNAを指標とした地理的変異の研究は種々の動物群で行われており，日本の5河川に遡上するシロサケ*Oncorhynchus keta*の各集団で検出されたハプロタイプの出現頻度（小林 1988）は，最も優位に見られた型が0.25～0.875であり，つぎに優位に見られた型は0.143～0.75と各集団内で優位に見られたハプロタイプが異なり，複数確認されている。また太平洋の各海域において採取されたキハダマグロ*Thunnus albarares*の各集団では，2つのハプロタイプが優位に検出され，その頻度は0.254～0.608と報告されており（R.D.ward *et al.*, 1994），ニューハンプシャーからフロリダ半島までの各地域に棲息するアメリカカキ*Crassostrea virginica*の各地域集団では，地域集団で全く異なったハプロタイプが検出されている（Reeb and Avise 1990）。これらと本研究で得られた結果を比較してみると，生殖時期，産卵時刻の違いから生殖的隔離が成立しているであろうマボヤの3集団における多様性は非常に低く，地理的隔離の成立している各地集団間においても，その程度は非常に低いことがわかる。つまり生殖的，地理的隔離が成立していても，mtDNAを指標とした場合，マボヤの各標本集団間の遺伝的多様性は非常に小さいものであると考えられる。検出されたハプロタイプ間，各標本集団間の関係を数値化し，表したものがNei and Liの提唱した $d$ 値であり，これらの値はハプロタイプ間では $0.209 \sim 1.6 \times 10^{-2}$ ，各標本集団間では $0.042 \sim 0.21 \times 10^{-2}$ という値をとった。 $d$ 値は塩基置換率 $p$ に変換することが可能で，ハプロタイプ間では $p=0.21 \sim 1.6\%$ ，各標本集団間では $p=0.04 \sim 0.21\%$ となる。アメリカのノースカロライナからルイジアナ州の14河川の集団を用いたサンフィッシュ*Lepomis macrochirus*の解析では， $d=0.19 \sim 10.0 \times 10^{-2}$ であり（Avise *et al.*, 1984），日本の188地点の標本集団を用いたメダカ*Oryzias latipes*の解析では $p=0.1 \sim 12.4\%$ という値が得られている（Matsuda *et al.*, 1997）。これらの値と比較

しても、マボヤ各標本集団間の遺伝的分化は非常に小さいことがわかる。

#### 各地標本集団の関係

ハプロタイプ間の系統樹では、各集団間の地理的な位置関係と一致するような樹形は得られなかった（図5と図9）。これは各集団で検出された切断型が、1部位しか異ならないなど非常に類似したものが多くみられたためと推察する。

各地域標本集団間の系統樹でも、樹形は地理的位置関係ときれいに一致しなかった。このような結果の現因としては、様々な要因が考えられるが、そのひとつとしてmtDNAの進化速度とマボヤという種の生息域拡大の速度の関係が考えられる。mtDNAは近縁と考えられる動物集団間の系統関係を知る遺伝マーカーとして、様々な動物集団の研究にもちいられてきており（Yonekawa *et al.*, 1981; Ferris *et al.*, 1983; Berg and Ferris 1984; Barrio *et al.*, 1992; Tamura *et al.*, 1991; Wada *et al.*, 1991), 多くの有効な結果を提示している反面, Palumbi and Wilson (1990) による *S. purpuratus* や *S. droebachiensis* の解析, *Echinometra mathaei* (Palumbi *et al.* 1991), *Drosophila monitum* のサブグループ (Kim *et al.*, 1993) などの解析では明らかな遺伝的差異を提示できていない。mtDNAは核DNAよりも進化速度が5~10倍も速い (Brown *et al.*, 1979) といわれているが、生物の変化（進化）がmtDNAに変異が蓄積されるよりもはやい、もしくは急激に起こった場合、その生物の変化をたどることは非常に難しい。マボヤは幼生期には遊泳能力を持ち、移動可能であるが、その期間は2, 3日で付着後は固着生活を送るため、生息域を広げるためには相当な時間が必要なのではないかと考えられてきた。しかし、捕食される外敵がほとんどいないことや、水槽での飼育や、菅島の例などから異なる環境への順応性は高いと考えら

れ、生息域の拡大には他の海棲底性生物ほど時間がかからない可能性もある。いくつかあるであろう原因のもう一つとして考えられるのは、人為的影響によるもので、特に太平洋岸の養殖が盛んな地域では菅島などのように少なからず、影響を受けている可能性はある。

しかしながら、本研究ではマボヤの各地集団の明確な棲息生息域と遺伝的分化の関係を明確に推定することはできなかった。しかしながら、検出された変異はわずかではあるが、ハプロタイプの出現頻度が太平洋岸よりも日本海岸の方が高いこと、得られた集団間の系統樹において日本海岸の集団が太平洋岸の集団の外側にきていること、日本海沿岸においては、北海道から本州西端にまで分布しているにもかかわらず、太平洋岸では北海道沿岸や関東から東海地方沿岸に棲息が確認されていないこと、などから考えると、マボヤという種は日本海起源ではないかということ強く推測させる。本研究ではマボヤ各地域集団間の遺伝的距離および塩基置換率を算出したが、これらの値から分岐年代を推定することができる (Nei, 1987)。分岐年代を推定する際に塩基置換速度が必要となるが、ホヤの化石は現在までのところほとんど発見されていないため、系統的に比較的近縁と考えられている棘皮動物のウニ類における、制限酵素認識部位あたり年あたりの塩基置換速度1%~1.5%/100万年 (Vawter and Brown, 1986) を使用した。その結果、マボヤ3型の分岐はおよそ3~1.7万年前との推定が得られた。この推定時は地質年代で第四紀更新世の最後期にあたる。また脊椎動物の塩基置換速度はおよそ2.0%/100万年 (Brown *et al.*, 1979) であり、その数値を当てはめた場合の分岐年代はおよそ2~1万年前となる。この推定年代も第四紀更新世の最後期にあたり、ホヤ類の系統上の位置から考えると、上記進化速度の適用は妥当であると考えられる。第四紀はおよそ170万年前より始まる更新世から、完新世とよばれる最後の約1万年をさし、更新世は大規模な気候変化と寒冷化が起こった時代と

して知られている。4回以上の氷河期があったが、更新世最後の約7万年は最終氷期であるヴュルム氷期にあたり、日本海に連絡する間宮海峡、宗谷海峡、津軽海峡、対馬海峡、朝鮮海峡の5海峡は氷期と間氷期による海水準の下降、上昇によって外海との連絡、遮断が繰り返し起きていたことが地質調査などにより判明している。ヴュルム氷期の最盛期、主ヴュルム亜氷期IIの時代には日本海は外海からほぼ隔離された状態であったと考えられており（湊，1967），西村（1990）は，対馬海峡，朝鮮海峡が開通したのはヴュルム氷期の末期以降で，それ以前は鮮新世末期以前まで閉じていた可能性が強いことを述べている。これらの報告から考えると，マボヤ3型間の推定分岐年代であるおよそ3～1.7万年前は，日本海は北の海峡が陸橋化し，対馬海峡，朝鮮海峡は非常に狭まった，もしくは陸橋化した時代と，ヴュルム氷期が終わりに近づいて海水準が上昇し，日本海が再びいくつかの海峡で外海と連絡し始める時代とをはさんだ時期であることがわかる。また陸奥湾の深度は平均40mと非常に浅いため（箕浦，1985），その成立は最終氷期以降と考えられ，現在陸奥湾に棲息している生物はすべてそれ以降に移入してきたと考えられる。これら地質学的証拠と現在のマボヤ3型の分布パターンから考えると，図12に示すように，マボヤの祖先集団は北方より沿岸流などによって日本海に分布域を広げ，最終氷期後期に少なくともA型とC型の分化は日本海の陸奥湾付近で生じた可能性が高い。B型においては，A型とC型の交雑種である可能性もあるが，A，C両型がほぼ同所的に確認される陸奥湾以外の下北半島沿岸では，B型の個体数は少なく，陸奥湾内においてのみその生息数が多く観察されることからその可能性は低いと考える。本研究で算出された3型の遺伝的距離は統計的に有意でないほどの小さな値ではあったが，この値から算出された分岐年代は地質学的証拠と一致する結果となったことは興味深い。

本研究では日本海岸の集団は4集団を解析したが、個体数などの面で更なる解析が必要である。精度の高い遺伝マーカー（核DNAなど）を用いた解析と共に日本海岸の集団や、瀬戸内の集団の解析を更に行うことで、マボヤという種からみた形態変異の変遷が推定できるのではないかと考える。

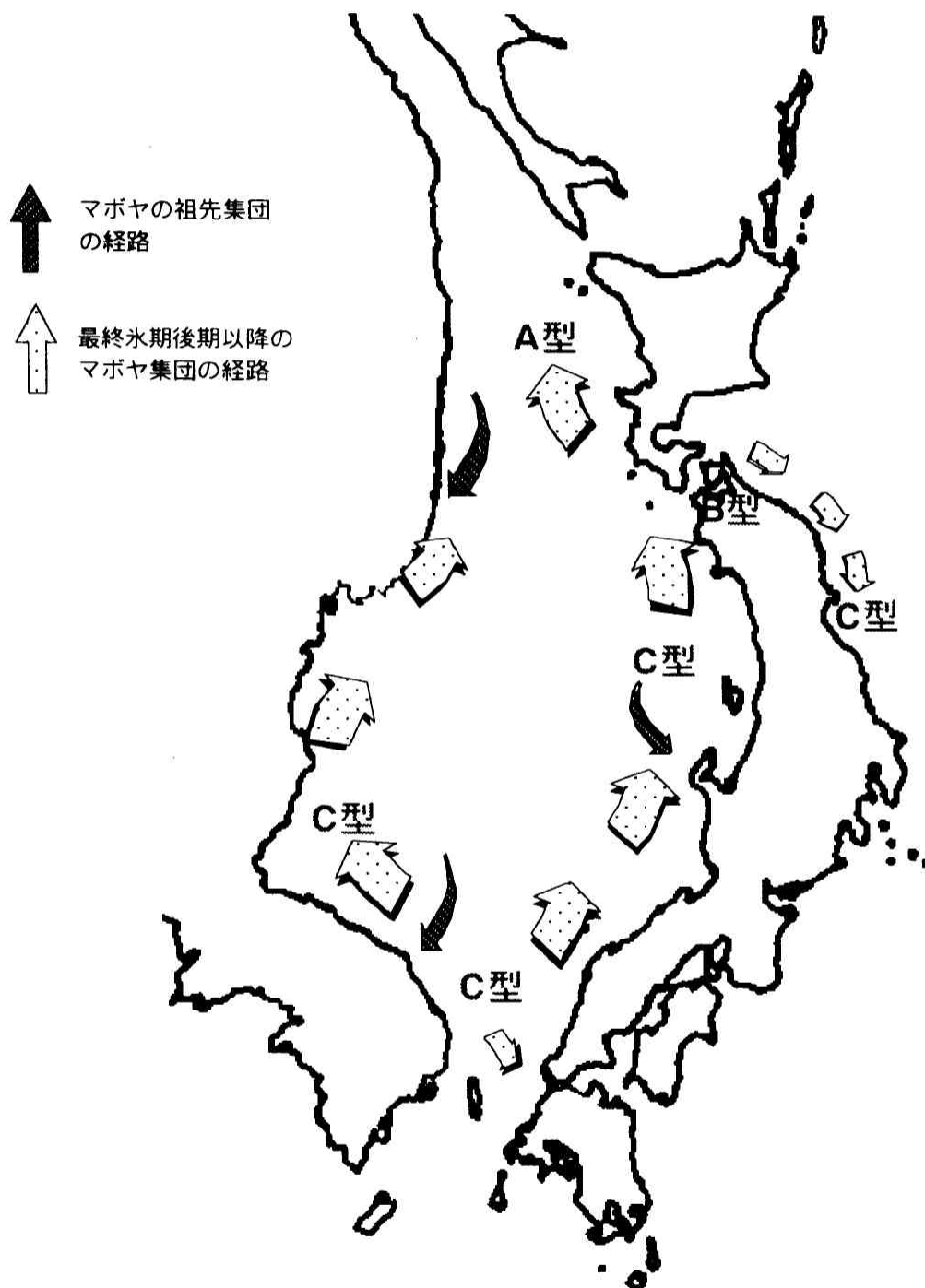


図12 マボヤの生息域拡大の推定図

## 引用文献

Awise JC, Bermingham E, Kessler LG, Suneders NC (1984)

Characterization of mitochondrial DNA variability in a hybrid swarm between subspecies of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*).

Evolution 38: 931-941

Barrio E, Latorre A, Moya A, Ayala FJ (1992) Phylogenetic

reconstruction of the *Drosophila obscura* group, on the basis of mitochondrial DNA. Mol Biol Evol 9: 621-635

Berg WJ, Ferris SD (1984) Restriction endonuclease analysis of

salmonid mitochondrial DNA. Can J Fish Aquat Sci 41: 1041-1047

Brown WM, George JrM, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal

mitochondrial DNA. Proc Natl acad sci USA 76: 1967-1971

Clayton DA (1982) Replication of animal mitochondrial DNA. Cell

28:693-705

Ferris SD, Wilson AC, Brown WM (1981) Evolutionary tree for apes

and humans based on clavage maps of mitochondrial DNA. Proc

Natl acad sci USA 78: 6319-6323

Kim B. K, Aotsuka T, Kitagawa O (1993) Evolutionary genetics of the

*Drosophila montium* subgroup. II. Mitochondrial DNA variation.

Zool Sci 10: 991-996.

Kobayashi T, Saitoh N (1982) RFLP ver.2. Program for Maxmum

likelihood estimation of nucleotide substitutions from restriction site data. N88 Basic for PC9801.



- Komm B, Allan M, tsokos J, Linton J (1982) Isolation and characterization of the mitochondrial DNA from the Florida spiny lobster, *Panulirus argus*. *Comp. Biochem Physiol* 73B: 923-929
- Matsuda M, Yonekawa H, Hamaguchi S, Sakaizumi M (1997) Geographic variation and diversity in the mitochondrial DNA of the Medaka, *Oryzias Latipes*, as determined by restriction endonuclease analysis. *Zool sci* 14: 517-526
- Nanba K, Saitoh N (1989) TURBO Pascal system ver.3.02A. Program for calculation of values to construct dendrograms by NJ- and UPG - method.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press NY 512pp.
- Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl acad sci USA* 76: 5269-5273
- Nei M, Tajima F (1981) DNA polymorphism detectable by restriction endnucleases. *Genetics* 97; 145-163
- Nishikawa T (1991) The ascidians of the Japan sea. II. *Publ Seto Mar Biol* 35: 25-170
- Nishikawa T (1992) The ascidians of the Japan sea. III. *Publ Seto Mar Biol* 35: 303-334
- Numakunai T, Hoshino Z (1973) Biology of the ascidian, *Halocynthia roretzi* (Drasche), in Mutsu Bay. I. Differences of spawning time and external features. *Bull Mar Biol Stat asamushi Tohoku Univ* 14: 191-196

- Numakunai T, Hoshino Z (1974) Biology of the ascidian, *Halocynthia roretzi* (Drasche), in Mutsu Bay II. One of the three types which has the spawning season and the time different from two others. Bull Mar Biol Stat asamushi Tohoku Univ 15: 23-27
- Palumbi SR, and Wilson AC (1990) Mitochondrial DNA diversity in the sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus* and *S. droebachiensis*. Evolution 44: 403-415
- Palumbi, SR, Metz EC (1991) Strong reproductive isolation between closely related tropical sea urchins (genus *Echinometra*). Mol Biol Evol 8: 227-239
- Reeb CA, Avise JC (1990) A genetic discontinuously distributed species: mitochondrial DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. Genetics 124: 397-406
- Saunders NC, Kessler LG, Avise JC (1986) Genetic variation and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. Genetics 112: 613-627
- Tamura K, Aotsuka T, Kitagawa O (1991) Mitochondrial DNA polymorphism in the two subspecies of *Drosophila sulfurigaster*: Relationship between geographic structure of population and nucleotide diversity. Mor Biol Evol 8: 104-114
- Tokioka T (1951a) Contributions to Japanese ascidian fauna, IV  
Notes on some ascidians collected in Osaka Bay. Publ Seto Mar Biol Lab I: 11-26
- Tokioka T (1951b) The fauna of Akkeshi Bay XVIII. Ascidia (Contribution to Japanese Ascidian fauna. III). Publ f Akkeshi Mar Biol Stat 1: 1-25

- Tokioka T (1953) Contributions to Japanese ascidian fauna, VI  
Simple ascidians of the museum of Hukui. Publ Seto Mar Biol Lab  
VII: 27-32
- Tokioka T (1959) Contributions to Japanese ascidian fauna, XIII  
Sporadic Memoranda (4). Publ Seto Mar Biol Lab VII: 223-236
- Tokioka T (1962) Contributions to Japanese ascidian fauna, XVIII  
Ascidians from Sado Island and some records from Sagami Bay.  
Publ Seto Mar Biol Lab X: 1-26
- Vawter L, Brown WM (1986) Nuclear and mitochondrial DNA  
comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock.  
Science 234: 194-196
- Wada S, Kobayashi T, Numachi K (1991) Genetic variability and  
differentiation of mitochondrial DNA in minke whales. Rep Int  
Whal Commn special issue 13: 203-215
- Wolstenholme DR (1992) Animal mitochondrial DNA: structure and  
evolution. Int Rev Cyt 141: 173-216
- Yonekawa H, Moriwaki K, Gotoh O, Hayashi J, Watanabe J,  
Miyashita N, Petras ML, Tagashira Y (1981) Evolutionary  
relationships among five subspecies of *Mus musculus* based on  
restriction enzyme cleavage patterns of mitochondrial DNA.  
Genetics 98 : 801-816
- 小林敬典 (1982) サクラマスとシロサケのmtDNAの遺伝生化学的研究：集団  
分析のための分離抽出法と遺伝的変異性 東京大学博士論文
- 西村三郎 (1990) 日本海の成立 改訂版 築地書館
- 西川輝昭 (1995) '脊索動物門' 原色検索 日本海岸動物図鑑II 西村三郎編著  
保育社

湊正雄（1967）第四紀末葉の海水面変動と日本列島の古地理 動物分類学会会  
報 36 : pp1-3

箕浦幸治（1985）'陸奥湾' 日本全国 沿岸海洋誌 日本海洋学会 沿岸海洋  
研究部会編 東海大学出版会

横堀伸一（1994）後生動物ミトコンドリア遺伝子の進化の研究 東京工業大  
学博士論文