

## 1. 目的、動機

オカガニは陸に棲みながら、幼生期を海で過ごすため、繁殖期になるとメスが放卵のため海岸に降りることで有名です。しかし、オカガニの繁殖生態に関する文献は古いものしかなく、まだ謎も多く残っています。そこで、私たちは一昨年から身近にいながらもいまだ多くの謎に包まれているオカガニについて詳しく調べることにしました。

一昨年の調査では、沖縄本島付近でもオカガニは2回産卵することをはじめて明らかにし、昨年は、この2回産卵する個体の割合が、全産卵個体の5%程であることがわかりました。

そして、今年は二つのアプローチからオカガニについて調べました。

1つは生態学的なアプローチから、毎年行っている産卵個体数の調査と同時に総合的な生態調査を行いました。もう1つは生化学的なアプローチから、宮城島のオカガニは他の地域のオカガニと、どのくらい遺伝的に違いがあるのか、海流散布による混ざり合いがどの程度起こっているか等、DNAを比較して調べました。

### (1) 宮城島のオカガニの産卵生態の継続調査および総合的な生態調査

#### 方法

##### <道路・海岸線でのオカガニ出現個体数調査>

2011年4月～10月の満月の日の前後3～4日間、19時～21時の間にうるま市宮城島の砂浜200mと護岸120m、海岸線から最も近い幹線道路500mとでオカガニの産卵降海個体のカウント調査を行いました。

調査場所に出現したオカガニを捕獲し、ホワイトマーカーで甲にナンバリングし、甲幅を測定し放逐した。出現個体数が多い日は、捕獲・測定をすべての個体に行うことができないので、出現した放卵メスすべてにカラスプレーを用いてマーキングし、次回以降の調査時に1度放卵していることを確認できるようにしました。

##### <新月の調査>

昨年、伊良部高校のオカガニ調査結果で、新月の日も放卵個体がみられるという報告がありました。宮城島では新月の日には調査していなかったため、宮城島にも、新月の日に放卵する個体がいるかを調査しました。2011年4月～9月の新月の日、19時～21時の間に、満月調査と同様に、オカガニの出現個体を調べました。

その結果、巣穴付近で出歩いてエサを食べている個体は見ることができましたが、抱卵個体を見ることはありませんでした。沖縄本島付近宮城島では、新月に放卵することはないと考えて良いと思います。



図1, 2 オカガニの食事風景



図3 ナンバリングしたカニ

結果と考察

<道路・海岸線でのオカガニ出現個体調査>

4月～10月の調査で合計1269個体のオカガニの出現を確認しました。出現個体数の結果は以下に示します。産卵個体数は2009年とほぼ同じで、1028個体でした。宮城島では、安定して個体群が維持されていることが確かめられました。

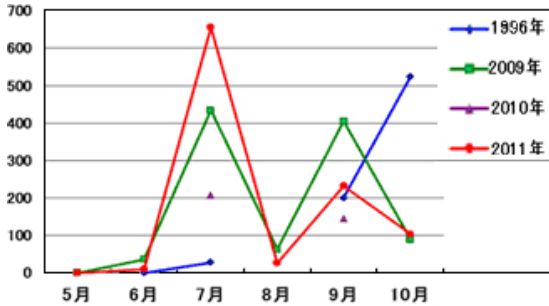


表1 各年、各月ごとの産卵個体数

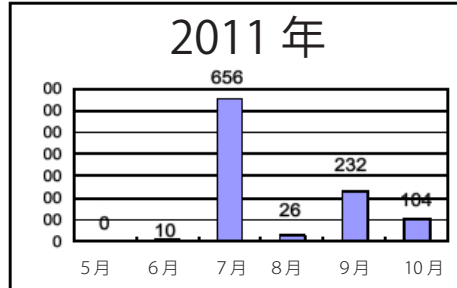


表2 月別産卵個体数

2回産卵した個体は、昨年の調査では4.8%でしたが、今年は約2倍近い11.4%でした。宮城島の個体群では、少なくとも10分の1以上の成熟メスが2度産卵することが確認されました。

	8月	9月	10月	スプレーのマークがついた再産卵個体数合計	1度目の産卵時にスプレーでマークした全個体数	割合
2010	ND	10	ND	10	206	4.8%
2011	1	83	6	90	791	11.4%

表3 産卵個体の割合

調査中に、2009年と2010年にマーキングされた後、脱皮をしていない個体が8個体確認されました。そのため、新たな知見がありました。

それは、2009年度のマーキングをそのままつけている6個体は2年前から脱皮していないということです（2010年度の2個体は1年前から脱皮していない）。

このことから、オカガニが脱皮をせずに交尾をするHFM種である可能性は非常に高くなりました。



図4 今年で3度目の捕獲となる個体

(2) 宮城島のオカガニ個体群と他地域のオカガニ個体群との比較  
～生化学的アプローチからの比較～

琉球大学熱帯生物圏研究センター分子生命科学研究施設の前川秀彰教授をはじめポストドク研究員のご協力を得て、それぞれの地域のオカガニのミトコンドリアDNA塩基配列にどの程度違いがあるのかという、生化学的なアプ

ローチからの比較を行いました。ミトコンドリア DNA を用いた理由は台湾のオカガニの既知のミトコンドリア DNA 塩基配列 (16SrRNA 領域 約 500bp) があり (N.K.Ng ら, 2007) 同じ領域で比較できる点と、ミトコンドリアゲノムは比較的小さく抽出しやすいという点からです。

## 方法

### ①ミトコンドリアDNAの抽出

各地域で採取した、オカガニの脚の筋肉や卵などからミトコンドリア DNA を抽出しました。

マイクロチューブにオカガニの脚の筋肉または卵を入れて、SNET (組織溶解液)、ProteinaseK (タンパク質分解酵素) を加え、チューブホモジナイザーで粉碎し、55℃の恒温器で組織を溶解→95℃でタンパク質分解酵素を失活させた後に、遠心器で遠心分離し DNA を抽出しました。

### ②PCR法による抽出したDNAの増幅

PCR 法とは人工的に特定の領域の DNA を複製できる方法です。ミトコンドリア DNA 塩基配列を決定するために DNA が多く必要となるので PCR 法を用いて DNA の増幅を行いました。

抽出した各地域のオカガニのミトコンドリア DNA の台湾の既知のオカガニのミトコンドリア DNA 塩基配列 (16SrRNA 領域) と同じ領域を増幅させるために、文献 (N.K.Ng ら, 2007) を参考に、試薬を調整し増幅を行いました。

### ③ダイレクトシーケンスによる配列決定

ダイレクトシーケンスとは、特定のプライマーにより DNA の一部を直接取り出す方法です。その後、

PCR 法で増幅させた各地域のミトコンドリア DNA の 16SrRNA 領域を、シーケンサーという装置を用いて塩基配列を決定しました。そして各地域のものを比較しました。

## 結果

### ①配列決定したDNA

シーケンサーにより決定した配列は、コンタミのあるものも多く、すべてに信憑性があるとは言えませんでした。

しかし、いくつかのサンプルで、宮城島、瀬長島、宮古島、伊良部島の 4ヶ所の地域のオカガニのミトコンドリア DNA 塩基配列 (16SrRNA 領域) を決定することができました。

宮城島のオカガニのミトコンドリア DNA (16SrRNA 領域)
TCGCNNNNTNNNAAAAACATGTCTGTTAGTAGATATAAAGAGTTTAACTGCCACTGATAGAAATGTAAGGGTCGCTGTA TTGTGACTGTGCAAAGGTAGCAAATCGCTAGTTTTTAAGAGGAATCTTGTATGAATGGTTGGAGATAGGAAAATCTGTCTC TATAGCTATTAAGTGAATTTAAGTTCAAGTGAAGGCTTCAATTAATTAAGGGATGATAAGACTCCGTAAAGCTTGATA TAAAGATTTTATTTGGCTGAATTTTATATATTATACAAACCTGGTGATTTATATTTATTATGTTGGGGTGATAAGAGTCAAAT GATTATTAAGTCTTATTATTTAAATAAAAAATAGGTGAATAAAGTTATAAATGATCTTAATTAAGATTTTAAGTTACGTT AGGGATAACAGCATTATTCTTTTAGAGCACCTATTGAGAAAAAGTTTGTGACCTCGATGTTGAACCAAAGTATCTGTACA ATTGCAGTAACTGTTTGACCTTTAAATTTGACATAATTTGAGTTCAGATCANCATGAGCCAGGTGNNNTNNNNNNNA

### ②既知の台湾のオカガニの塩基配列 (DDBJ, N.K.Ng ら, 2007) との比較

配列決定した沖縄のオカガニのミトコンドリア DNA 塩基配列と台湾のオカガニのミトコンドリア DNA を比較したところ、宮城島、宮古島、伊良部島地域のオカガニのミトコンドリア DNA 塩基配列は台湾のものと約 83 ~ 90% 一致していることがわかりました。同じ沖縄地域だが、瀬長島のオカガニのミトコンドリア DNA 塩基配列は台湾のものと 96.5% も一致していることがわかりました。

### ③沖縄に生息するオカガニ間での比較

沖縄本島および離島の地域間でミトコンドリア DNA 塩基配列を比較したところ、宮城島、宮古島、伊良部島地域のオカガニのミトコンドリア DNA 塩基配列は約 96 ~ 98% 一致していることがわかりました。また、瀬長島地域のオカガニのミトコンドリア DNA 塩基配列だけは他地域と約 81 ~ 82% しか一致していないことがわかりました。

②の結果では瀬長島地域だけが台湾のオカガニのミトコンドリア DNA 塩基配列と高い一致率が出ました。③の結果では瀬長島地域と沖縄の他地域の一一致率が台湾のものと同様のような結果が出ました。

	台湾	瀬長島	伊良部島	宮古島
宮城島	84.9%	82.3%	98.7%	97.6%
宮古島	83.0%	81.3%	98.3%	
伊良部島	83.9%	82.4%		
瀬長島	96.5%			

表4 各地域のオカガニとの一致率

## 考察

沖縄本島および離島地域に生息するオカガニのミトコンドリア DNA 塩基配列を比較した結果から、台湾との比較では本島南部の瀬長島だけが台湾と遺伝子的差異があまり見られなかったことから台湾の個体群と瀬長島の個体群は遺伝的に近いと考えられ、さらに、沖縄本島の宮城島、離島の宮古島、伊良部島の個体群は遺伝子的差異があまりみられないことから遺伝的に近いと考えられます。

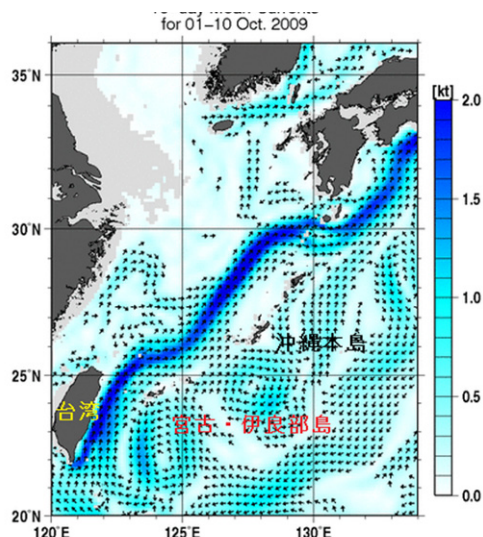
台湾、先島諸島、沖縄本島付近のオカガニは同種のものでありますが、台湾や瀬長島の個体が本島および離島の個体と遺伝子的差異が大きいことから、かなりの変異が進んでいると考えられます。

これらをまとめると、沖縄本島および離島のオカガニは宮城島、宮古島、伊良部島の3ヶ所では遺伝的にほぼ同種、瀬長島と台湾のオカガニが遺伝的にほぼ同種と考えられます。

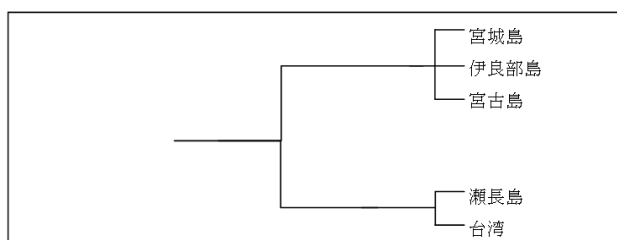
さらに、この考えを裏付けるために琉球列島の周りを流れる海流について調べてみました。

オカガニは海に産卵するので海流により幼生が散布される可能性が高いです。

下の気象庁ホームページの海流図で見られる濃い青いラインは黒潮の流れを表しています。台湾の東海岸を洗う黒潮は、琉球列島では西海岸を流れています。瀬長島は沖縄本島の西側にあるので、台湾で放たれた幼生が黒潮のつて瀬長島へ散布されていると考え、DNA解析の結果と一致します。



また、伊良部島・宮古島辺りの海流は沖縄本島の東側へ流れており、伊良部島・宮古島・宮城島のオカガニが遺伝的に近いことも一致します。



(上) 5か所のオカガニの系統関係

(左) 海流図

## おわりに・・・

調査の中で車に轢かれる危険を冒してまで砂浜に放卵をしに来るところを見て、『生命の神秘』というものを実感することができました。そして、大切な生命を守っていくためにも轢かれないように対策を練ることが重要だと感じました。また、この研究でオカガニの生態について少しずつではありますが知ることができました。しかし、謎はまだ多く残っています。これからも継続して研究をし、オカガニの生態を解き明かしていこうと思います。