

コブセミエビ (*Scyllarides haanii*) で検出された  
核内ミトコンドリア偽遺伝子 (NUMTs)Nuclear mitochondrial pseudogenes (NUMTs) detected in the Aesop slipper lobster  
*Scyllarides haanii* (Crustacea: Decapoda: Scyllaridae)張 成年<sup>1,2\*</sup>・佐藤武宏<sup>3</sup>・柳本 卓<sup>4</sup>  
Seinen Chow<sup>1,2\*</sup>, Takehiro Sato<sup>3</sup>, Takashi Yanagimoto<sup>4</sup><sup>1</sup> 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所, 神奈川県横浜市金沢区福浦 2-12-4<sup>2</sup> アクオス研究所, 東京都八王子市元八王子町 3-2153-79<sup>3</sup> 神奈川県立生命の星・地球博物館, 神奈川県小田原市入生田 499<sup>4</sup> 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産資源研究所, 神奈川県横浜市金沢区福浦 2-12-4<sup>1</sup>Fisheries Technology Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency, 2-12-4 Fukuura, Yokohama, Kanagawa 236-8648, Japan, <sup>2</sup>Aquos Institute, 3-2153-79 Motohachioji-cho, Hachioji, Tokyo 193-0826, Japan, <sup>3</sup>Kanagawa Prefectural Museum of Natural History, 499 Iryuda, Kanagawa 250-0031, Japan, <sup>4</sup>Fisheries Resources Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency, 2-12-4 Fukuura, Kanagawa 236-8648, Japan.

\*Corresponding author; e-mail: kaiyoeel@yahoo.co.jp

## Abstract

The PCR-amplified partial mtDNA cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene of the Aesop slipper lobster (*Scyllarides haanii*) was subjected to direct nucleotide sequencing and clone library-based nucleotide sequencing analyses. A total of 35 clones were sequenced, of which 16 were determined to be the authentic mtDNA COI sequence (763 bp) of this individual. Nucleotide sequences of 10 clones that differed by one to three nucleotides from the authentic sequence were designated as variant artifacts by PCR-cloning. Seven haplotypes were obtained from the remaining nine clones, which differed by 70 to 112 nucleotides from the authentic COI sequence and were determined to be nuclear mitochondrial pseudogenes (NUMTs). Double peaks were observed in the electropherogram obtained by direct nucleotide sequencing, and the resulting nucleotide sequence was substantially different from both the authentic mtDNA COI and NUMT sequences. It was shown that the electropherogram obtained by direct nucleotide sequencing appeared to be a mixture of signals from the authentic mtDNA COI and NUMT sequences.

**Key words:** NUMTs; COI; slipper lobster; *Scyllarides*; direct nucleotide sequencing; electropherogram; double peaks; cloning

## 緒言

核ゲノム中にミトコンドリア DNA (mtDNA) 類似配列が存在することは 1960 年代に示唆されていたが (du Buy and Riley 1967)、実証されたのは 1980 年代に入ってからである (Lewin 1983; Fukuda et al. 1985)。その後、nuclear mitochondrial pseudogenes (NUMTs) と定義された核内ミトコンドリア偽遺伝子は広範囲にわたる真核生物で確認され、極めて多くの研究報告例がある (Lopez et al. 1994; Sorenson and Quinn 1998; Bensasson et al. 2001; Antunes and Ramos 2005; Pamilo et al. 2007;

Song et al. 2008; Hazkani-Covo et al. 2010; Wei et al. 2022)。核ゲノムへの mtDNA の移行は連続と継続的に起こっている現象であると考えられているが (Mourier et al. 2001; Gaziev and Shaikhaev 2010; Wei et al. 2022)、そのメカニズムについての統一の見解は無い (Xue et al. 2023)。複数の遺伝子の NUMTs が連続し、時には mtDNA 全域が NUMTs として挿入されていることがあることから、移行に関して RNA が介在しているとは考えにくい。

MtDNA の部分領域を PCR 法で増幅しダイレ

クトシーケンスによって塩基配列決定を行う場合、NUMTs の存在は様々な弊害をもたらす。NUMTs にもプライマー配列とよく一致する部分がある場合には、PCR の際に真正 (authentic) mtDNA とともに NUMTs も増幅される。通常はコピー数をはるかに多い真正 mtDNA 配列からのシグナルが電気泳動で分離される波形図 (エレクトロフェログラム) のピークを圧倒的に支配するが、同じ位置に別の強いピークが見られる場合があり、おそらくは NUMTs からのシグナルと考えられる。NUMTs のコピー数が多い場合にはそのピークが真正 mtDNA のものと比肩するあるいは超えることもあるであろう。さらに、NUMTs に挿入欠失がある場合にはピークがずれるため、エレクトロフェログラムが解読できないものとなる。このような問題以外に、NUMTs の混入は種多様性や遺伝的多様性の過大評価に繋がる。

Buhay (2009) はデータベースに登録されている甲殻類の COI 遺伝子情報に問題点が散見されることを指摘し、"COI-like"と定義したそれらの多くが NUMTs に関連すると推測している。筆者らは幅広い水生動物分類群について mtDNA のダイレクトシーケンスに携わってきた。その中で、魚類よりも甲殻類において良好なエレクトロフェログラムが得にくいことを経験してきた。例えば、モガニ属 (*Pugettia*) では塩基配列を解読できるエレクトロフェログラムがあまりにも少ないため分析を断念したことがあり、サンマヒジキムシ (*Pennalla* spp.) では全個体についてクローニングを行う必要があった (Suyama et al. 2019, 2020, 2021)。その他、オオミジンコ (*Daphnia magna*) (Kowai et al. 2020)、カイアシ類 (Copepoda) (Bucklin et al. 1999; Machida and Tsuda 2010; Halbert et al. 2013)、コエビ類 (Caridea) (Williams and Knowlton 2001; Williams et al. 2001; Robe et al. 2012; Baeza and Fuentes 2013; Iketani et al. 2021)、ザリガニ科 (Astacidae) (Nguyen et al. 2002; Munasinghe et al. 2003; Song et al. 2008; Tan et al. 2020)、カニ類 (Brachyura) (Kim et al. 2013; Schneider-Broussard and Neigel 1997)、イセエビ (*Panulirus japonicus*) (Chow et al. 2021, 2024a)

において NUMTs が報告されている。

最近、筆者らはセミエビ科 (*Scyllaridae*) のコブセミエビ (*Scyllarides haanii*) 標本においても COI の NUMTs と推定される配列を検出した (Chow et al. 2024b)。この標本の COI 領域に対するダイレクトシーケンスを行ったところダブルピークが散見されたため、クローニングが行われた。その結果、大きく異なる 2 種のハプロタイプ (SH746-C1, SH746-C2) が得られ、SH746-C1 はこの個体の真正 mtDNA 配列、SH746-C2 は NUMTs と推定された (Chow et al. 2024b)。本研究ではこのコブセミエビ標本について分析クローン数を増やし、NUMTs と推定される配列とダイレクトシーケンスで得た塩基配列及び真正 mtDNA 配列との比較検討を行った。

### 材料および方法

本研究で使用したコブセミエビは神奈川県立生命の星・地球博物館の収蔵標本 (KPM-NH0140746) であり、1962 年に和歌山県で採集されたものである (Chow et al. 2024b)。筋肉からの DNA 抽出、COI 領域の PCR 増幅とクローニング、塩基配列解析については前報に示した (Chow et al. 2021, 2024a, b)。粗抽出 DNA を鋳型にした PCR 増幅に用いたプライマーは SCOIF1 (5'-AAYCATAAAGACATTGGTAC-3') と SCOIR1 (5'-CTAATATRGCR TARATTATTC-3')、クローンの PCR 増幅に用いたプライマーは M13 Forward (-20) (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') と M13 Reverse Primer (5'-CAGGAAACAGCTATG AC-3') である。PCR 産物のシーケンスにはこれらのプライマーをそれぞれ用いた。前報ではこの標本の COI 領域に対するダイレクトシーケンスを行ったところダブルピークが散見されたため、クローニングが行われた (Chow et al. 2024b)。その結果、大きく異なる 2 種のハプロタイプ (SH746-C1, SH746-C2) が得られ、SH746-C1 はこの個体の真正 mtDNA 配列、SH746-C2 は NUMTs と定義された (Chow et al. 2024b)。本研究ではこのコブセミエビ標本について、分析クローン数を増やすとともにダイレクトシーケン

Table 1. Summary of clone sequences obtained from an individual slipper lobster (*Scyllarides haanii*). The number of nucleotide differences between the authentic haplotype and other clone sequences is given in the square brackets. Number of clones obtained in the previous study (Chow et al. 2024b) is shown in parentheses.

category	No. of clone	No. of haplotype	length (bp)	nonsense codon
authentic COI	16 (3)	1	763	no
variant COI [1]	9 (4)	9	762, 763	8 no, 1 yes
variant COI [3]	1	1	763	no
NUMTs? [71]	1	1	763	no
NUMTs? [74]	1	1	764	no
NUMTs? [102]	2	1	764	yes
NUMTs? [103]	2	2	763, 764	yes
NUMTs? [111]	2	1	769	yes
NUMTs? [113]	1 (1)	1	762	no

スによって得られた塩基配列と比較検討した。GENETYX ver. 12 (GENETYX Co., Tokyo) を用いて ClustalW による塩基配列のアライメントを行い、マニュアルで編集した。配列間の K2P 値 (Kimura two parameter distance) の計算と系統樹の作成には MEGA6 (Tamura et al. 2013) を用いた。NUMTs における塩基置換はコドン部位とは無関係に起こることが予想されることから、真正 mtDNA 配列とのアライメントに基づいて想定した各コドン部位における塩基置換数を集計した。各コドン部位で予想される塩基置換度数 (1 : 1 : 1) からの有意な乖離を検査するために G-test を用いた。本研究ではエラーと推定される配列も含め異なる配列は全てハプロタイプと定義する。

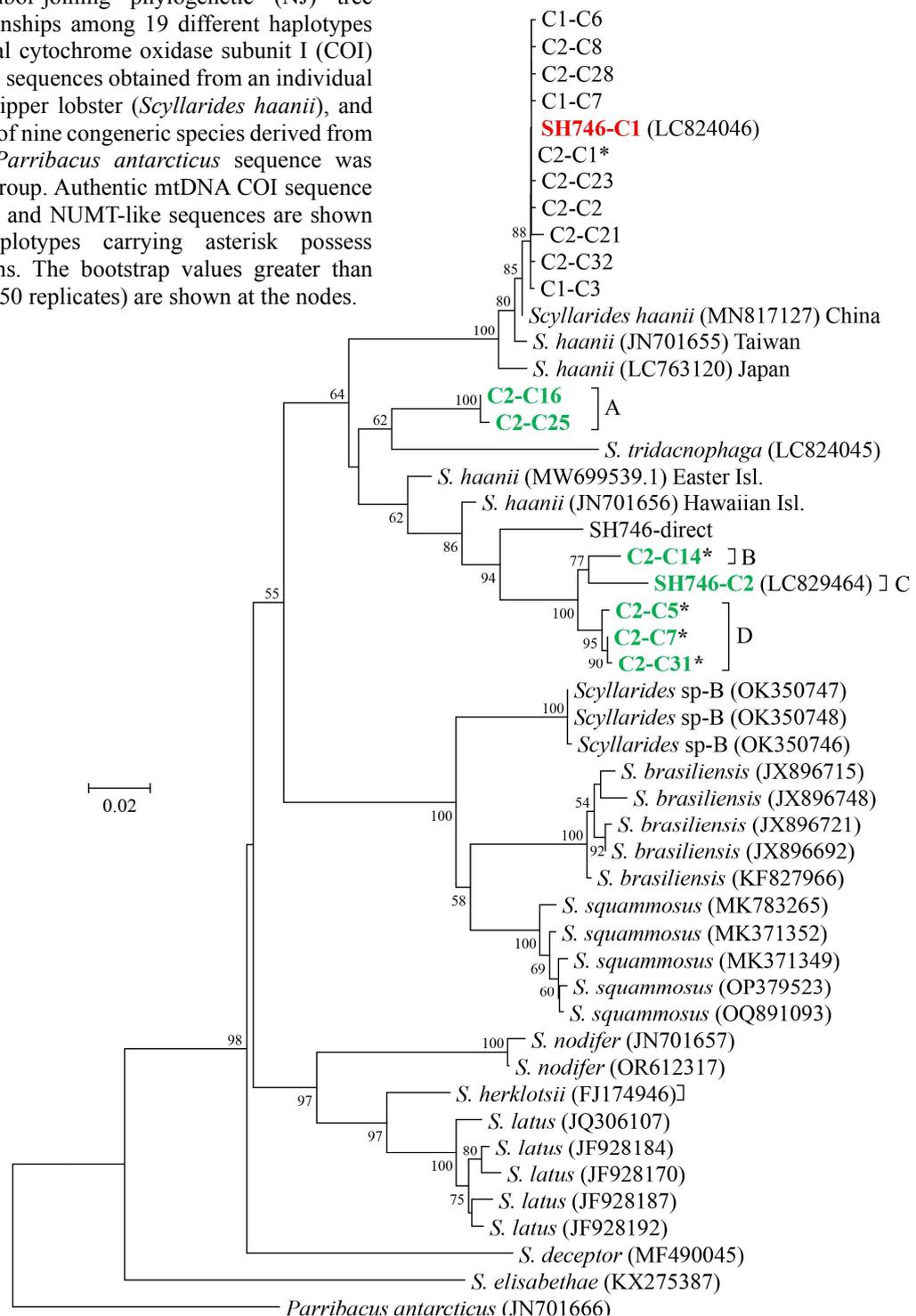
## 結果

本研究で塩基配列を決定した 27 クローンと前報 (Chow et al. 2024b) の 8 クローンのデータ、計 35 クローンの塩基配列が得られた。16 クローンで同一配列 (763 bp) が得られ、これらを真正 mtDNA 配列と定義した。他のクローンについて真正 mtDNA 配列との塩基置換数別に集計した (Table 1)。真正 mtDNA 配列から 1 塩基異なる 9 ハプロタイプと 3 塩基異なる 1 ハプロタイプが得られ、これらは Chow et al. (2024a) が示した PCR-cloning の工程で生じるエラーの範囲に収まる。これら 10 ハプロタイプ中 1 ハプロタイプで

ナンセンスコドンが見られた。残る 9 クローンからは 7 ハプロタイプが検出された。これら 7 ハプロタイプの塩基配列と真正 mtDNA 配列間の差異は大きく、71 から 113 個の塩基置換 (インデルを含む) が見られたことから NUMTs と推定し、データベースに登録した (LC829464-LC829470)。これら 7 ハプロタイプに対する BLAST トップヒットは全てコブセミエビであり、7 ハプロタイプとそれぞれのトップヒット配列間の一致率は 90.8 から 93.3 %であった。また 7 ハプロタイプとセミエビ属他種間との一致率は 83 から 89 %であった。これら 7 ハプロタイプのうちナンセンスコドンは 4 ハプロタイプで見られた。

以上の 18 ハプロタイプの配列とダイレクトシーケンスで得られた配列 (SH746-direct) 及び現在までに報告されているセミエビ属の COI 配列を用いて系統樹を作製した (Fig. 1)。ミナミゾウリエビ (*Parribacus antarcticus*) の配列を外群として用いた。真正 mtDNA 配列 (SH746-C1) とそのエラー配列と考えられる 10 ハプロタイプは、日本、台湾、中国産のコブセミエビとともに 1 つのクレードを形成した。NUMTs と推定した 7 ハプロタイプは 4 グループ (A-D) に分けられ、真正 mtDNA 配列が属するクレードとは大きく分化していた。これらのグループは、中部 (ハワイ) と東部 (イースター島) 太平洋のコブセミエビとインド洋種である *S. tridacnophaga* が含まれる大き

Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic (NJ) tree showing relationships among 19 different haplotypes of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) and NUMT-like sequences obtained from an individual of the Aesop slipper lobster (*Scyllarides haanii*), and COI sequences of nine congeneric species derived from the database. *Parribacus antarcticus* sequence was used as an outgroup. Authentic mtDNA COI sequence is shown in red and NUMT-like sequences are shown in green. Haplotypes carrying asterisk possess nonsense codons. The bootstrap values greater than 50 % (out of 1050 replicates) are shown at the nodes.



なクレードに属した。グループ A 内ハプロタイプ間の塩基置換数は 2、K2P は 0.26 %、グループ D 内ハプロタイプ間の塩基置換数は 1-4、K2P は 0.13-0.53 %であった。これらの値はエラーの範囲に収まるが、同じ遺伝子座上の対立遺伝子の可能

性もある。グループ A とグループ B-D 間の K2P は 11.44-12.30 %、グループ B-D 間の K2P は 2.34-3.37 %であり、これらのグループは異なる遺伝子座に対応しているものと考えられる。真正 mtDNA 配列とグループ A-D 間の K2P は 10.28-

16.43%であった。また、これら7ハプロタイプと、西部太平洋産コブセミエビ間のK2Pは9.90–15.84%、中部–東部太平洋産のコブセミエビ間のK2Pは7.02–9.02%であった。これら7ハプロタイプとその他のセミエビ属種間のK2Pは9.61–23.87%であった。

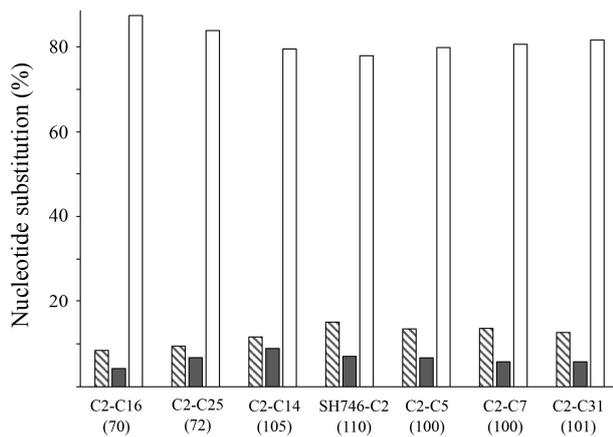


Fig. 2. Percentage of nucleotide substitutions at first (shaded bar), second (closed bar), and third (open bar) codons of NUMT-like sequences (see Fig. 1 for haplotypes) against the authentic COI sequence in the Aesop slipper lobster (*Scyllarides haanii*). Total number of nucleotide substitutions is shown in parenthesis.

NUMTs と推定した 7 ハプロタイプと真正 mtDNA 配列をアライメントし、7 ハプロタイプで見られた挿入欠失塩基のうち挿入塩基を削除して塩基置換サイトを検討した。その結果、塩基置換が真正 mtDNA 配列の第 3 コドンに対応する部位に偏在していることが観察された (Fig. 2)。各コドン部位で予想される塩基置換度数 (1 : 1 : 1) からの乖離は 7 ハプロタイプ全てにおいて有意であった (G-test,  $p < 0.005$ )。また、挿入塩基を除いた後、欠失があった 1 ハプロタイプ (C2-C5) のみにナンセンスコドンが見られた。NUMTs と推定される 7 ハプロタイプと真正 mtDNA 配列間の演繹アミノ酸置換数は 7 から 12 残基であった。

ダイレクトシーケンスで得られた配列 (SH746-direct) は系統樹上で真正 mtDNA 配列 (SH746-C1) から大きく離れて位置するとともに、これら配列間の塩基置換数は 90、K2P は 14.38% とかなり大きい値を示した。一方、SH746-

direct と NUMTs と推定したハプロタイプの 1 つ (SH746-C2) 間の塩基置換数は 44、K2P は 6.6% であった。また、SH746-direct の演繹アミノ酸配列を検討したところナンセンスコドンは無かったが、真正 mtDNA 配列の演繹アミノ酸配列とは 5 残基異なっていた。そこで、SH746-direct、SH746-C2 および SH746-C1 のエレクトロフェログラムの一部を比較した (Fig. 3) (元のエレクトロフェログラムはここより入手可)。SH746-direct のエレクトロフェログラムにはダブルピーク (\*) が散見されるものの最大ピークは明瞭であり解読可能なレベルと考えられた (Fig. 3A)。ところが、これらのダブルピーク部位では NUMTs と推定した配列 (Fig. 3B) と真正 mtDNA 配列 (Fig. 3C) の塩基が明らかに異なっていた。このことは SH746-direct のエレクトロフェログラムが、NUMTs と推定した配列と真正 mtDNA 配列からのシグナルがモザイク状に混在したものであることを示す。

## 考察

MtDNA と考えられる配列が単一個体から複数種出現する場合には、外来生物の混入、ヘテロプラスミー、PCR やクローニング工程でのエラー、NUMTs の混入が可能性として考えられる。本研究で検出され NUMTs と推定した 7 ハプロタイプの配列は、セミエビ属の COI 配列に高い類縁性を持つことから外来生物由来とは考えにくい。セミエビ属には 14 種が記載され (Holthuis 1991, 1993)、未記載種の可能性が高い 2 種が最近報告された (Chow et al. 2022, 2024b)。そのうち 10 種の COI 配列が登録されているが、7 ハプロタイプの配列とほぼ一致する種はなかった (Fig. 1)。また、日本周辺にはコブセミエビとセミエビ (*Scyllarides squammosus*) の 2 種だけが分布するとされており (Holthuis 1991)、過去から現在にいたるまで神奈川県立生命の星・地球博物館はこれら 2 種の標本しか収蔵していない。ヘテロプラスミーはごく普通の事象と考えられ、核に移行して間もない NUMTs とヘテロプラスミーは区別しにくいことが指摘されている (Parakatselaki and

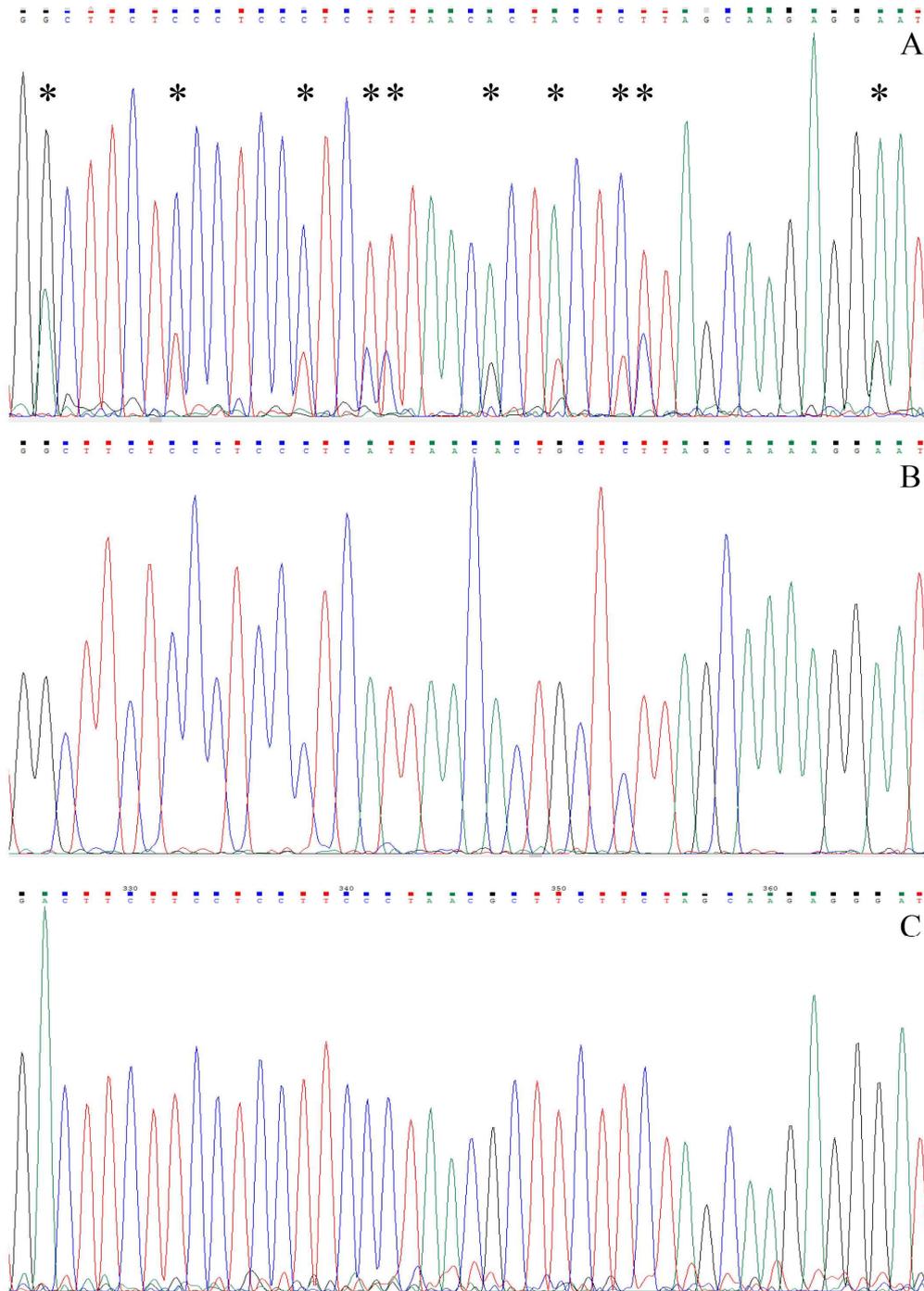


Fig. 3. A part of electropherogram obtained by direct nucleotide sequencing (A) for COI region of the Aesop slipper lobster *Scyllarides haanii*, and corresponding parts obtained in clones of a NUMT-like haplotype (SH746-C2) (B) and authentic mtDNA haplotype (SH746-C1) (C). Double peaks are indicated by asterisks.

Ladoukakis 2021)。すなわち種内変異のレベル以上に分化した配列はヘテロプラスミーではないことを意味し、本研究で検出した7ハプロタイプはそれに該当する。PCR産物をクローニングした場合にはポリメラーゼのエラーがより顕在化することが知られているが (Pääbo and Wilson 1988)、

7ハプロタイプと真正 mtDNA 配列間で見られた大きな差異がポリメラーゼのエラーによって生成されるとは考えられない。NUMTs と推定した配列において塩基置換が第3コドンに偏在する点については、Bensasson et al. (2000) や Cai et al. (2011) が昆虫で、Chow et al. (2024a) がイセエ

びで同様の現象を観察している。これについては、分子化石 (molecular fossil) と呼ばれる NUMTs の突然変異が停滞する一方 (Perna and Kocher 1996; Bensasson et al. 2001)、真正 mtDNA がはるかに速く突然変異を第 3 コドンに蓄積してきた結果と考えられる。以上のことから本研究で検出した 7 ハプロタイプを NUMTs と定義し論議を進める。

一般的に NUMTs は直列重複によってコピー数が増えてゆくと考えられている (Lopez et al. 1994)。核ゲノムへ移行して間もない (新しい) NUMTs は、真正 mtDNA とよく類似する配列であってもコピー数が非常に少ないため、本研究で用いた手法で検出することは難しいものと考えられる。一方、時間経過とともに NUMTs のコピー数は増加するが、徐々に短くなるとともに塩基置換の蓄積によって真正 mtDNA 配列との類似性が低下してゆくため (Pamilo et al. 2007; Hlaing et al. 2009)、古い NUMTs の検出も難しくなる。すなわち、本研究で用いた手法で検出された NUMTs はコピー数が比較的多く、核への移行後極端に時間が経過しておらずプライマー部分の配列がある程度保存されていたものとなる。本研究で得られたコブセミエビの NUMTs が核ゲノムへ移行した年代を Li et al. (1981) に従って計算したところ、3.5 から 6.5 百万年前と推定された。この値は Chow et al. (2024a) がイセエビの NUMTs で推定した年代 (2 から 8 百万年前) の範囲に収まる。これ以上古い NUMTs はプライマー部分も含めて塩基配列が大きく変化しているため検出されにくくなるのであろう。Chow et al. (2024a) は同様の手法を用いて、甲殻類のカメノテ (*Capitulum mitella*)、クルマエビ (*Penaeus japonicus*)、モクズガニ (*Eriocheir japonica*) そして脊椎動物のウナギ (*Anguilla japonica*)、ヌタウナギ (*Eptatretus burger*)、クロマグロ (*Thunnus orientalis*) を分析したが、NUMTs と推定される配列は検出されなかった。動物群間で NUMTs の多寡に差異があるのかもしれないが、分析に用いたプライマーの影響は充分考えられる。しかし、イセエビとコブセミエビでは異なるプライマーが使用されているため (Chow et al. 2021, 2024a,

b)、イセエビ亜目 (Achelata) には NUMTs が多い、あるいは検出されやすい状態の NUMTs が多いのかもしれない。一方、保存条件にもよるが、mtDNA の変性は核 DNA より速く進むと考えられている (Higgins et al. 2015)。エタノール中で長期保存されてきたイセエビ標本 (25 年間)

(Chow et al. 2021; 2024a) とコブセミエビ標本 (60 年間) (Chow et al. 2024b; 本研究) では多くの NUMTs が検出されている。一方、Chow et al. (2024a) が分析した新鮮なイセエビ標本からは NUMTs が検出されなかった。また、Chow et al. (2024b) が分析したコブセミエビのフィロソーマ標本 (LC763120) は分析までに 8 年間エタノール中で保存されていたものであるが、ダイレクトシーケンシングによって得られたそのエレクトロフェログラムにはダブルピークがほとんど見られない (元のエレクトロフェログラムはここより入手可)。このように、標本の保存期間も NUMTs の検出に影響している可能性はある。

イセエビではクローンライブラリ法で最も多く検出されるハプロタイプである真正 mtDNA 配列とダイレクトシーケンシングで得られた配列が一致していた (Chow et al. 2021)。一方、今回のコブセミエビではダイレクトシーケンシングで得られた配列 (SH746-direct) と真正 mtDNA 配列 (SH746-C1) は大きく異なっており、SH746-direct のエレクトロフェログラムは真正 mtDNA と NUMTs からのシグナルが混在したものであることが示された (Fig. 3)。すなわち SH746-direct は廃棄すべき配列であるが、一見したところそのエレクトロフェログラムは解読可能であり (Fig. 3A)、ナンセンスコドンや挿入欠失が無いこのような塩基配列は品質管理をすり抜け得る。Buhay (2009) は、近縁と考えられる他の配列から特異的に分化する配列や系統樹中で長い枝を持つ配列には特に注意が必要であること、アミノ酸配列も検討材料になることを指摘している。そこで本研究で用いたセミエビ属の COI 配列から得た演繹アミノ酸配列を検討したところ、コブセミエビ以外では種内個体間でのアミノ酸置換は非常に稀であり、種間でも 0-3 残基の差であった。それ

と比較すればコブセミエビの真正 mtDNA 配列と SH746-direct 間の 5 残基差は極めて大きい値と言える。西部太平洋と中—東部太平洋のコブセミエビ集団間には大きな遺伝的分化があることが示唆されているが (Hidaka et al. 2022; Chow et al. 2024b)、西部太平洋と中—東部太平洋コブセミエビ標本間ではアミノ酸で 2–3 残基の差があることから、NUMTs の影響を受けている可能性があり、今後の精査が必要である。

以上のように NUMTs はダイレクトシーケンスに悪影響を及ぼすだけでなく、誤った結果に導く可能性があるため有害無益な DNA 情報と見なされがちであるが、ヒト特異的 NUMTs は進化系統の研究に応用されている (Lang et al. 2012; Dayama et al. 2014; Popadin et al. 2022)。しかしながら、現状ではゲノム情報が豊富なモデル生物でのみ利用されており、一般に NUMTs 配列はノイズとして扱われている。PCR による NUMTs の増幅を抑制するために、長い領域を増幅するプライマーの利用、ミトコンドリアリッチな組織の利用、cDNA 解析、mtDNA の濃縮、新鮮な組織の利用等が提案されているが (Collura et al. 1996; Sorenson and Quinn 1998; Song et al. 2008; Calvignac et al. 2011; Chow et al. 2024a)、cDNA 解析以外は効果的な抑制が期待できない。NUMTs の混入が顕著であると想定される場合は、クローニングによって NUMTs 配列と真正 mtDNA 配列を決定し、NUMTs 配列の増幅を避けるプライマーの設計が効果的であろう。

### 謝辞

DNA 解析や標本の保管に協力していただいた水産資源研究所の林 順子氏及び重要な指摘と貴重な助言をいただいた 2 名の査読者に感謝いたします。本研究は、水産研究・教育機構水産資源研究所の試験研究費「水産資源のゲノム情報の収集・管理・活用」で行われた。

### 引用文献

Antunes, A., Ramos, M. J. (2005). Discovery of a large number of previously unrecognized mito-

chondrial pseudogenes in fish genomes. *Genomics* 86: 708–717.

- Baeza, J. A., Fuentes, M. S. (2013). Exploring phylogenetic informativeness and nuclear copies of mitochondrial DNA (numts) in three commonly used mitochondrial genes: mitochondrial phylogeny of peppermint, cleaner, and semi-terrestrial shrimps (Caridea: *Lysmata*, *Exhippolysmata*, and *Merguia*). *Zool. J. Linn. Soc.* 168: 699–722.
- Bensasson, D., Zhang, D. X., Hewitt, G. M. (2000). Frequent assimilation of mitochondrial DNA by grasshopper nuclear genomes. *Mol. Biol. Evol.* 17: 406–415.
- Bensasson, D., Zhang, D. X., Hartl, D. L., Hewitt, G. M. (2001). Mitochondrial pseudogenes, evolution's misplaced witnesses. *Trends Ecol. Evol.* 16: 314–321.
- Buhay, J. E. (2009). "COI-like" sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *J. Crust. Biol.* 29: 96–110.
- Bucklin, A., Guarnieri, M., Hill, R. S., Bentley, A. M., Kaartvedt, S. (1999). Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive, species-specific PCR. *Hydrobiologia* 401: 239–254.
- Cai, Y., Cheng, X.-Y., Duan, D., Xu, R. (2011). Mitochondrial COI gene transfers to the nuclear genome of *Dendroctonus valens* and its implications. *J. Appl. Entomol.* 135: 302–310.
- Calvignac, S., Konecny, L., Malard, F., Douady, C. J. (2011). Preventing the pollution of mitochondrial datasets with nuclear mitochondrial paralogs (numts). *Mitochondrion* 11: 246–254.
- Chow, S., Yanagimoto, T., Takeyama, H. (2021). Detection of heteroplasmy and nuclear mitochondrial pseudogenes in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Sci. Rep.* 11: 2178.
- Chow, S., Konishi, K., Yanagimoto, T. (2022). Identification of phyllosoma larvae of the slipper lobster (Family Scyllaridae). 3. Genus *Scyllarides*. *Aquat. Anim.* 2022: AA2022-4. (In Japanese with English abstract).
- Chow, S., Yasuike, M., Yanagimoto, T. (2024a). Re-evaluation of nuclear mitochondrial pseudogenes (NUMTs) and heteroplasmy in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Crust. Res.* 53: 27–36.
- Chow, S., Bakker, P. A. J., Sato, T., Mastunaga, H., Takeyama, H., Yanagimoto, T. (2024b). Cryptic diversity of the slipper lobster genus *Scyllarides* (Crustacea: Decapoda: Scyllaridae) in the Pacific. *Aquat. Anim.* 2024: AA2024-xx (in press).
- Collura, R. V., Auerbach, M. R., Stewart, C. B. (1996). A quick, direct method that can differentiate expressed mitochondrial genes from their

- nuclear pseudogenes. *Curr. Biol.* 6: 1337–1339.
- Dayama, G., Emery, S. B., Kidd, J. M., Mills, R. E. (2014). The genomic landscape of polymorphic human nuclear mitochondrial insertions. *Nucleic Acids Res.* 42: 12640–12649.
- du Buy, H. G., Riley, F. L. (1967). Hybridization between the nuclear and kinetoplast DNA's of *Leishmania enriettii* and between nuclear and mitochondrial DNA's of mouse liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 57: 790–797.
- Fukuda, M., Wakasugi, S., Tsuzuki, T., Nomiyama, H., Shimada, K., Miyata, T. (1985). Mitochondrial DNA-like sequences in the human nuclear genome: Characterization and implications in the evolution of mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 186: 257–266.
- Gaziev, A. I., Shaikhaev, G. O. (2010). Nuclear mitochondrial pseudogenes. *Mol. Biol.* 44: 358–368.
- Halbert, K. M. K., Goetze, E., Carlon, D. B. (2013). High cryptic diversity across the global range of the migratory planktonic copepods *Pleuromamma piseki* and *P. gracilis*. *PLOS ONE* 8: e77011.
- Hazkani-Covo, E., Zeller, R. M., Martin, W. (2010). Molecular poltergeists: mitochondrial DNA copies (numts) in sequenced nuclear genomes. *PLOS Genet.* 6: e1000834.
- Hidaka, C., Yang, C. H., Wakabayashi, K. (2022). Finding the missing puzzle piece of the nisto stage in the larval cycle of the slipper lobster *Scyllarides squammosus*: a molecular and morphological approach. *Zool. Stud.* 61: 73.
- Higgins, D., Rohrlach, A. B., Kaidonis, J., Townsend, G., Austin, J. J. (2015). Differential nuclear and mitochondrial DNA preservation in post-mortem teeth with implications for forensic and ancient DNA studies. *PLOS ONE* 10: e0126935.
- Hlaing, T., Tun-Lin, W., Somboon, P., Socheat, D., SETHA, T., Min, S., Chang, M. S., Walton, C. (2009). Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: Implications for past and future population genetic studies. *BMC Genet.* 10: 11.
- Holthuis, L. B. (1991). FAO Fisheries Synopsis FAO species catalogue. Vol. 13. Marine Lobsters of the World. FAO, Rome.
- Holthuis, L. B. (1993). *Scyllarides obtusus* spec. nov., the scyllarid lobster of Saint Helena, Central South Atlantic (Crustacea: Decapoda Reptantia: Scyllaridae). *Zool. Meded., Leiden* 67: 505–515.
- Iketani, G., Pimentel, L., Torres, E. dos S., Rêgo, P. S. do., Sampaio, I. (2021). Mitochondrial heteroplasmy and pseudogenes in the freshwater prawn, *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862): DNA barcoding and phylogeographic implications. *Mitochondrial DNA Part A* 32: 1–11.
- Kim, S.-J., Lee, K. Y., Ju, S.-J. (2013). Nuclear mitochondrial pseudogenes in *Austinograea alayseae* hydrothermal vent crabs (Crustacea: Bythograeidae): effects on DNA barcoding. *Mol. Ecol. Resour.* 13: 781–787.
- Kowai, K., Tkaczyk, A., Pierzchala, M., Bownik, A., Slaska, B. (2020). Identification of mitochondrial DNA (NUMTs) in the nuclear genome of *Daphnia magna*. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 8725.
- Lang, M., Sazzini, M., Calabrese, F. M., Simone, D., Boattini, A., Romeo, G., Luiselli, D., Attimonelli, M., Gasparre, G. (2012). Polymorphic NumtS trace human population relationships. *Hum. Genet.* 131: 757–771.
- Li, W. H., Gojobori, T., Nei, M. (1981). Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. *Nature* 292: 237–239.
- Lewin, R. (1983). Promiscuous DNA leaps all barriers. *Science* 219: 478–479.
- Lopez, J. V., Yuhki, N., Masuda, R., Modi, W., O'Brien, S. J. (1994). Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *J. Mol. Evol.* 39: 174–190.
- Machida, R. J., Tsuda, A. (2010). Dissimilarity of species and forms of planktonic *Neocalanus* copepods using mitochondrial *COI*, *12S*, nuclear *ITS*, and *28S* gene sequences. *PLOS ONE* 5: e10278.
- Mourier, T., Hansen, J. H., Willerslev, E., Arctander, P. (2001). The human genome project reveals a continuous transfer of large mitochondrial fragments to the nucleus. *Mol. Biol. Evol.* 18: 1833–1837.
- Munasinghe, D. H. N., Murphy, N. P., Austin, C. M. (2003). Utility of mitochondrial DNA sequences from four gene regions for systematic studies of Australian freshwater crayfish of the genus *Cherax* (Decapoda: Parastacidae). *J. Crustacean Biol.* 23: 402–417.
- Nguyen, T. T. T., Murphy, N. P., Austin, C. M. (2002). Amplification of multiple copies of mitochondrial Cytochrome b gene fragments in the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* Clark (Parastacidae: Decapoda). *Anim. Genet.* 33: 304–308.
- Pääbo, S., Wilson, A. (1988). Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts. *Nature* 334: 387–388.
- Pamilo, P., Viljakainen, L., Vihavainen, A. (2007). Exceptionally high density of NUMTs in the honeybee genome. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1340–1346.
- Parakatselaki, M.-E., Ladoukakis, E. D. (2021). MtDNA heteroplasmy: origin, detection, significance, and evolutionary consequences. *Life* 11: 633.
- Perna, N. T., Kocher, T. D. (1996). Mitochondrial DNA: Molecular fossils in the nucleus. *Curr. Biol.*

- 6: 128–129.
- Popadin, K., Gunbin, K., Peshkin, L., Annis, S., Fleishmann, Z., Franco, M., Kravtsov, Y., Markuzon, N., Ackermann, R. R., Khrapko, K. (2022). Mitochondrial pseudogenes suggest repeated inter-species hybridization among direct human ancestors. *Genes* 13: 810.
- Robe, L. J., Machado, S., Bartholomei-Santos, M. L. (2012). The DNA barcoding and the caveats with respect to its application to some species of Palaemonidae (Crustacea, Decapoda). *Zool. Stud.* 29: 714–724.
- Schneider-Broussard, R., Neigel, J. E. (1997). A large-subunit mitochondrial ribosomal DNA sequence translocated to the nuclear genome of two stone crabs (*Menippe*). *Mol. Biol. Evol.* 14: 156–165.
- Song, H., Buhay, J. E., Whiting, M. F., Crandall, K. A. (2008). Many species in one, DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 13486–13491.
- Sorenson, M. D., Quinn, T. W. (1998). NUMTs, a challenge for avian systematics and population biology. *Auk* 115: 214–22.
- Suyama, S., Masuda, Y., Yanagimoto, T., Chow, S. (2019). Genetic and morphological variation in *Pennella* sp. (Copepoda: Siphonostomatoida) collected from Pacific saury, *Cololabis saira*. *Mar. Biodivers.* 49: 1233–1245.
- Suyama, S., Kakehi, S., Yanagimoto, T., Chow, S. (2020). Infection of the Pacific saury *Cololabis saira* (Brevoort, 1856) (Teleostei: Belontiiformes: Scomberesocidae) by *Pennella* sp. (Copepoda: Siphonostomatoida: Pennellidae) south of the Subarctic Front. *J. Crust. Biol.* 40: 384–389.
- Suyama, S., Yanagimoto, T., Nakai, K., Tamura, T., Shiozaki, K., Ohshimo, S., Chow, S. (2021). A taxonomic revision of *Pennella* Oken, 1815 based on morphology and genetics (Copepoda: Siphonostomatoida: Pennellidae). *J. Crust. Biol.* 41: 1–12.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6, molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725–2729.
- Tan, M. H., Gan, H. M., Lee, Y. P., Grandjean, F., Croft, L. J., Austin, C. M. (2020). A giant genome for a giant crayfish (*Cherax quadricarinatus*) with insight into *cox1* pseudogenes in decapod genomes. *Front. Genet.* 11: 201.
- Wei, W., Schon, K. R., Elgar, G., Orioli, A., Tanguy, M., Giess, A., Tischkowitz, M., Caulfield, M. J., Chinnery, P. F. (2022). Nuclear-embedded mitochondrial DNA sequences in 66,083 human genomes. *Nature* 611: 105–114.
- Williams, S. T., Knowlton, N. (2001). Mitochondrial pseudogenes are pervasive and often insidious in the snapping shrimp genus *Alpheus*. *Mol. Biol. Evol.* 18: 1484–1493.
- Williams, S. T., Knowlton, N., Weigt, L. A., Jara, J. A. (2001). Evidence for three clades within the snapping shrimp genus *Alpheus* inferred from nuclear and mitochondrial gene sequence data. *Mol. Phyl. Evol.* 20: 375–389.
- Xue, L., Moreira, J. D., Smith, K. K., Fetterman, L. (2023). The mighty NUMT: mitochondrial DNA flexing its code in the nuclear genome. *Biomolecules* 13: 753.

Received: 13 July 2024 | Accepted: 24 August 2024 | Published: 4 September 2024