

## 論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 9 年度博士課程入学

氏名 森田ひとみ

指導教官名 西田 睦

### 論文題目 日本産ヨシノボリ属魚類の系統と進化に関する研究

ヨシノボリ属 (*Rhinogobius*) 魚類は、極東アジアに広く分布し主に両側回遊性の生活史をもつハゼ科魚類である。本属魚類の中には、海へ下ることなしに一生を河川内で過ごす河川性の種や、湖にのみ生息して止水性の生活史をする種がいることが知られている。ヨシノボリ類の持つこういった生活史特性は、通し回遊魚における種分化や生活史進化を考える上で非常に興味深い対象となっており、こういった議論をするためには系統学的アプローチが必要不可欠である。しかし、ヨシノボリ属魚類の系統類縁関係についてはほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では、分子生物学的手法を用いて日本産ヨシノボリ属魚類の系統類縁関係を明らかにすることを目的とした。さらに、河川性の 2 種（アオバラヨシノボリとキバラヨシノボリ）に着目し、それぞれの集団構造を解明し、それらの出現過程について推察することも目的とした。こうして得られた知見をもとにヨシノボリ属魚類の進化について議論する。

#### 日本産ヨシノボリ属魚類の種の整理

本属魚類には、色彩や斑紋の変異に富んだ多くの「色斑型」が知られていたが、近年の生態学的、遺伝的研究によりほとんどの色斑型はそれぞれ別種と判断されている。本研究では、これまでに知られている種とは異なる色斑を持ち、主にため池などの止水的な環境に生息する集団を愛知県で発見した。アロザイム分析の結果、この集団はこれまで知られている日本産の本属魚類とは遺伝的に交流がないことが推察された。したがって、この集団も含めれば、日本には少なくとも 14 種のヨシノボリ属魚類が生息することが推察された。

#### 日本産ヨシノボリ属魚類の系統類縁関係

日本産ヨシノボリ属魚類 13 種 27 集団 481 個体を用いてアロザイム分析をおこなった。23 遺伝子座を分析したところ、各種間には少なくとも 1 つの遺伝子座で完全な遺伝子の置換が

みられた。集団間の Nei (1972) の遺伝距離を算出し、UPGMA 法により分子系統樹を推定したところ、いくつかの遺伝的なグループに分けることができた。しかし、色斑などの特徴から近縁であると考えられた種どうしが単系統にならないなど、いくつかの枝の分岐関係に疑問な点が残った。

そこで、mtDNA 分析により系統類縁関係の推定を試みた。mtDNA 分析では、14 種 22 集団 44 個体において、NADH 脱水素酵素サブユニット 2 (ND2) 遺伝子領域、調節領域、16SrRNA 遺伝子領域の 3 つの領域 (合計 1934 塩基) を用いた。近隣結合法と最節約法により分子系統樹を推定したところ、アロザイムデータから推定された樹形とは大きく異なるものとなった。mtDNA 分析から推定された樹形では、明らかに同種と思われるシマヨシノボリの日本列島集団と琉球列島集団、およびクロヨシノボリの日本列島集団と琉球列島集団がそれぞれ単系統とならず、ゴクラクハゼを除く琉球列島産の全種が単系統群を形成し、その外側に日本列島と小笠原諸島に生息する集団が位置するという樹形になった。

そこで核ゲノムから新たな情報を得るために AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法による分析を試みた。14 種 25 集団 124 個体で 11 プライマーセットを用いて分析をおこなったところ、2503 バンドの相同性が確認できた。近隣結合法と最節約法により推定した分子系統樹は、アロザイム分析で示された分子系統樹とほぼ一致した。しかし、AFLP 分析の方がより多くの多型を検出したことから、アロザイム分析で明確にできなかった分岐関係をより明確にすることができた。

以上のように、本属魚類の核 DNA と mtDNA にはそれぞれ大きく異なる系統情報が含まれていることは統計的にも支持された (テンプレートンテスト:  $P < 0.0001$ )。しかし、遺伝情報の大部分を担う核 DNA 全体から、まんべんなく情報を取り出した AFLP 分析やアロザイム分析などの核 DNA 分析結果の意味するところは大きいと考えられる。また、mtDNA 分析では、上記のように明らかに同種と思われる集団がそれぞれ単系統群を形成しなかった。これらをあわせて考えれば、mtDNA から推定された分子系統樹は種の系統を反映していない可能性が高いと推察される。組み換えなしに母系遺伝するという mtDNA の遺伝様式の特異性から考えると、mtDNA から推定された遺伝子系統樹は、過去に異種間の交雑による mtDNA の浸透 (introgression) があつたことを示している可能性が高い。

したがって、本属魚類の場合より系統類縁関係を反映していると判断された、核 DNA 分析で得られた分子系統樹をもとにヨシノボリ属魚類の系統類縁関係を推定すると、シマヨシノボリや、カワヨシノボリおよび愛知県で初めて採集された新種と思われる種 (本研究では、ゴマヨシノボリと呼ぶことにする) が最も古くに分岐し、その後、ルリヨシノボリが分岐したと推定された。さらに、ルリヨシノボリと分かれた残りの種の共通祖先は大きく 2 つのグループに分かれた。1 つはトウヨシノボリ、ピワヨシノボリ、アヤヨシノボリ、アオバラヨシノボリのグループで、もう 1 つのグループはオオヨシノボリ、ヒラヨシノボリ、オガサワ

ラヨシノボリ, クロヨシノボリ, キバラヨシノボリのグループである. 前者はその後, トウヨシノボリ, ピワヨシノボリとアヤヨシノボリ, アオバラヨシノボリのグループに分かれ, 後者はオオヨシノボリ, ヒラヨシノボリ, オガサワラヨシノボリとクロヨシノボリ, キバラヨシノボリのグループに分かれた. このようなヨシノボリ属魚類の遺伝的類縁関係にはトカラ海峡の成立など地史的要因が関わっていることが推察された.

さらに核 DNA 分析から推定されたヨシノボリ属魚類の系統樹に両側回遊性と河川性および止水性の生活史を最節約復元してみると, 両側回遊性の生活史を基本にしてカワヨシノボリとアオバラヨシノボリとキバラヨシノボリの系統で河川性の生活史が少なくとも 3 回分化し, アオバラヨシノボリとキバラヨシノボリにはそれぞれ非常に近縁な両側回遊性種がいることが示された. 一方, ピワヨシノボリとゴマヨシノボリの系統では両側回遊性の生活史から止水性の生活史が少なくとも 2 回, それぞれ独立に生じたことが推察された.

#### 河川性種アオバラヨシノボリの集団構造と進化

上記のように, アオバラヨシノボリ (以下, アオバラ) には非常に近縁な両側回遊性種のアヤヨシノボリ (以下, アヤ) がいることが見いだされた. そこで, アオバラの集団構造を解明するため, アロザイム分析 (23 遺伝子座) と AFLP 分析 (2248 バンド) をおこなった. どちらの分析でも, アオバラ集団は遺伝的分化程度の大きい 2 つのグループ (沖縄本島北部の北側グループと南側グループ) に分かれることが明らかになった. アロザイム分析では, アオバラの南側グループは, 同じアオバラの北側グループよりもアヤに遺伝的に近いことが示された. アロザイムデータに基づく分子系統樹では, アオバラのどちらかのグループが先に分岐し, その後, アヤとアオバラのもう 1 つのグループが分岐するという関係を示した. しかし, AFLP データから算出した純置換係数, 平均置換率および固定指数 (*Fst*) など集団間の分化程度を表す指標では, アロザイム分析で示されたような, アオバラの南側グループが, 同じアオバラの北側グループよりもアヤ集団に遺伝的に近いという傾向は示されなかった. そして, AFLP データから推定された分子系統樹では, アオバラの 2 つのグループは単系統群を形成し, アヤはアオバラ 2 グループの姉妹群となることが, 94~100% の高いブーツストラップ値で支持された. さらにテンプレトテストにより樹形の検定をおこなったところ, AFLP データではアロザイム分析で示されたような樹形は棄却された ( $P < 0.001$ ).

以上の結果をあわせて考えると, 河川性の生活史を持つアオバラの 2 つのグループはアヤと分かれた後大きく 2 つのグループに分かれた可能性が高いと考えられる.

#### 河川性種キバラヨシノボリの集団構造と進化

上述のように, キバラヨシノボリ (以下, キバラ) にも非常に近縁な両側回遊性種のクロヨシノボリ (以下, クロ) がいることが示された. そこで, キバラの集団構造を解明するた

め、日本列島と琉球列島の各島々から採集されたキバラとクロ 98 個体に、外群のオオヨシノポリとヒラヨシノポリ 5 個体ずつを加えた計 108 個体で AFLP 分析をおこなった。14 プライマーセットで 2513 バンドの相同性が確認でき、最節約法と近隣結合法により分子系統樹を推定した結果、クロとキバラの各集団は、種ごとに単系統群を形成せず、大きく 2 つの地域グループ（日本—中琉球グループと南琉球グループ）に分かれることが推察された（テンプレートテスト： $P=0.0008$ ）。さらに、日本—中琉球グループ内の各集団間にも比較的大きな遺伝的分化があり、日本—中琉球グループ内の各集団も種ごとにそれぞれ単系統とならない可能性があることが示唆された（テンプレートテスト： $P=0.0389$ ）。このようなクロとキバラの集団構造は純置換率や固定指数（ $F_{st}$ ）などの遺伝的分化の指標によっても支持された。日本—中琉球グループは、中琉球のクロ（奄美大島、加計呂麻島、沖縄島）、日本列島（愛媛）のクロ、奄美大島のキバラ、徳之島のキバラ、沖縄島のキバラの 5 つのサブグループに分かれることが推察された。

得られた分子系統樹にクロの持つ両側回遊性の生活史とキバラの持つ河川性の生活史を最節約復元してみると、両側回遊性の生活史を基本にして河川性の生活史が平行的に生じたことが示された。すなわち、琉球列島の島々に分布を広げたクロもしくは類似の祖先種から、キバラが島ごとに独立に生じた可能性が高いと考えられた。

以上のすべての分析結果をまとめると、ヨシノポリ属魚類では両側回遊性の生活史を基本にして、卵の大卵化とそれに伴う大きな初期発育史の変化が起こる河川性種への分化が、カワヨシノポリとアオバラヨシノポリとキバラヨシノポリの系統で少なくとも 3 回それぞれ平行的に起こったと考えられる。一方、卵の大型化とそれに伴う初期発育史の変化が起こらない湖や池などの止水性的環境へ適応した種への分化が、ピワヨシノポリとゴマヨシノポリの系統で少なくとも 1 回ずつ平行的に起こったと推測される。さらに、両側回遊性種から河川性種への分化はキバラヨシノポリ・クロヨシノポリの系統で繰り返し起こった可能性が推察された。このことは、何らかの条件が整えばよく似た表現型を持った系統を形成する分化が繰り返し起こることがあるという非常に興味深い種分化の例を示していると考えられる。

本研究において得られたヨシノポリ属魚類の系統類縁関係と河川性種の集団構造に関する知見は、生物一般の生活史進化や種分化研究にとって重要な知見を提供するだけでなく、水産資源として重要な魚種が多く含まれる通し回遊魚の進化や起源を考える上でも興味深い材料となると考えられる。さらに、生物多様性の理解や保全に向けても重要な基礎情報となるであろう。今後、新たな核 DNA 分析を導入することによって、外国産も含めたヨシノポリ属全体における分子生物学的研究が望まれる。また、特に、河川性の種や止水性の種については、初期生活史、産卵生態、分布など、より詳しい生態的知見が望まれる。