

論文内容の要旨

論文題目 **Molecular Phylogenetic Study on Tetraodontiform Fishes Based on Mitochondrial Genome Sequences**

(ミトコンドリアゲノム分析に基づくフグ目魚類の分子系統学的研究)

氏名 山野上 祐介

フグ目 (Tetraodontiformes) は Cuvier (1817) によって提唱され、それ以降多くの研究者によって単系統群として認められてきた分類群である。フグ目魚類は最も派生的な魚類の一群であるスズキ類 (Percomorpha) に属し、8科100属に分類される340種を含む。そのほとんどは海産魚で、一部が淡水域に生息する。近年では、フグ目フグ科のトラフグが脊椎動物最小のゲノムをもつ生物として注目され、ゲノムの全塩基配列が決定された。しかし、フグ目の系統的位置や内部の系統関係についてはいくつかの仮説があり、いまだにコンセンサスが得られていない。また、フグ目が他のグループから分岐した年代についても研究例がない。

本研究では、近年高次系統解析に有用であることが明らかになったミトコンドリアゲノム全長配列に基づき、フグ目の単系統性と系統的位置、そしてその内部の系統関係を明らかにした。特にモンガラカワハギ科についてはミトコンドリアゲノムに遺伝子配置変動が見られたため、属レベルで塩基配列を決定し、遺伝子配置の比較および系統解析を行った。またフグ目内ならびにフグ目と他のグループとの分岐年代についても推定を試みた。

1. フグ目のミトコンドリアゲノムの構造

Miya and Nishida (1999) によるロング PCR と多数の魚類汎用プライマーを適用した手法を用いることにより、計61種のフグ目ならびにフグ目に近縁なグループのミトコンドリアゲノム全長配列を新たに決定した。その結果、フグ目のミトコンドリアゲノムは、他の脊椎動物と同様におよそ16,500 bp からなる環状構造をもち、13のタンパク質遺伝子、22のtRNA遺伝子、2つのrRNA遺伝子をコードしていた。遺伝子の配置も、モンガラカワハギ科のアミメハギを除き、他の脊椎動物に見られる典型的なものと同一であった。また、モンガラカワハギ科のハナツノハギとテングカワハギにおいて、tRNA^{Phe}遺伝子と12S rRNA遺伝子の間に約180 bpの挿入配列が見られた。

2. 系統解析法

本研究で得られたミトコンドリアゲノム全長配列の多重整列は、Proalign 0.5a (Löytynoja and Milinkovitch, 2003) を用いて行った。系統解析については、複雑な進化モデルを大規模なデータにも適用できることで近年注目を集めているベイズ法 (MrBayes 3.04b; Ronquist and Huelsenbeck, 2003) を用いた。ベイズ法は、樹形と置換パラメータの探索を同時に行い、短時間で系統樹の事後確率を算出できるという他の方法には見られない大きな利点がある。また、

AIC (Akaike, 1973) と Bayes factor (Kass and Raftery, 1995) という基準により, 3~5 の研究で用いたデータセットに対して, タンパク質遺伝子を第一・第二・第三座位の 3 つに分け, 残りの領域を tRNA 遺伝子 と rRNA 遺伝子 の 2 つ, 計 5 パーティションに分割することが最適であると判断された. また, 塩基置換モデルは GTR + I + Γ , m モデルが最適であると判断された.

3. フグ目の単系統性と姉妹群の探索

フグ目魚類は眼下骨, 鼻骨, 頭頂骨, 臀鰭棘が欠失し, 腹鰭が退縮していることなどの形質を共有し, フグ目の単系統性について形態形質からの異論は見られない. 一方, その姉妹群については, ニザダイ亜目 (Mok and Shen, 1983; Rosen, 1984; Holcroft, 2003), マトウダイ目 (Rosen, 1983), アンコウ目やヒンダイ亜目 (マトウダイ目) (Miya et al., 2003) などの仮説が提出された.

本研究では, フグ目と近縁であるとされたグループを系統解析に用い, フグ目の単系統性の確認と姉妹群の探索を行った. ベイズ法による系統解析を行った結果, 図 1 の系統樹が得られた. フグ目の単系統性は事後確率 100% で支持され, その姉妹群はアンコウ目 + ヒンダイ亜目 となり, 古くから近縁だと考えられていたニザダイ亜目は比較的離れた系統的な位置を占めることが明らかになった.

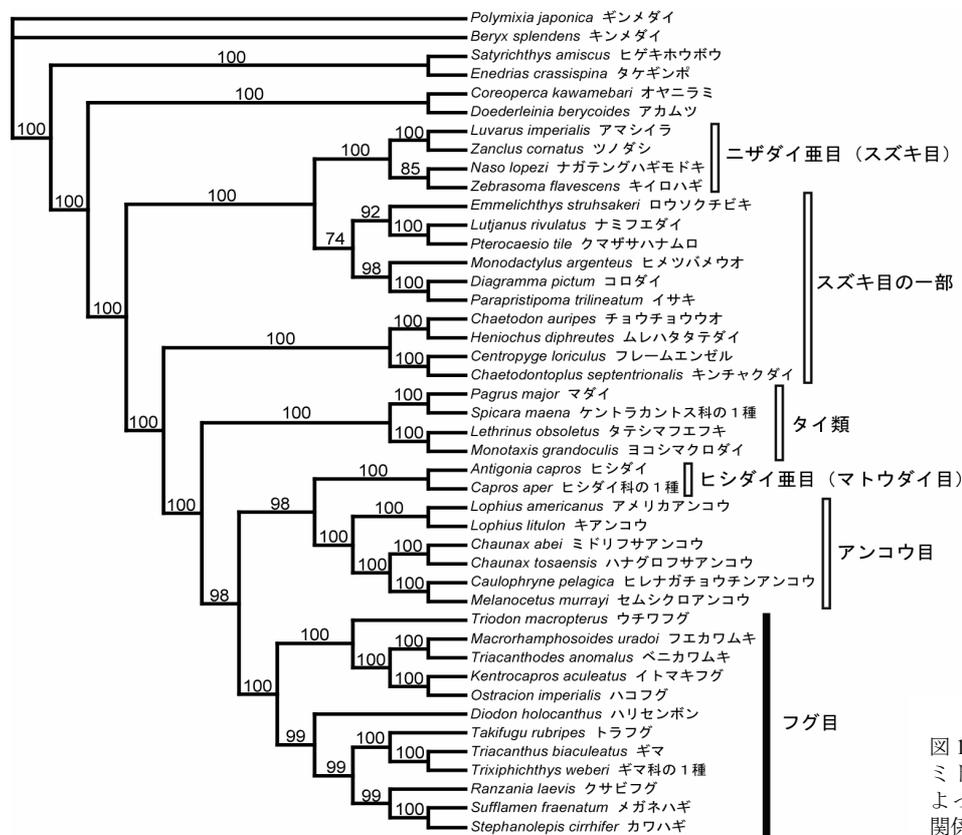


図 1. ミトコンドリアゲノム全長配列に基づきベイズ法によって得られたフグ目とその近縁なグループの系統関係. 内部枝に示した数値は事後確率 (%) を示す.

4. フグ目内部の系統関係

現在, フグ目は 8 科に分けられており, これらはギマ上科 (ベニカワムキ科, ギマ科), モンガラカワハギ上科 (モンガラカワハギ科, ハコフグ科), フグ上科 (ウチワフグ科, フグ科, ハリセンボン科, マンボウ科) の三つの上科に分けられている (Winterbottom, 1974). しかし, ウチワフグ科, ギマ科, ハコフグ科の系統的な位置については諸説あり, コンセンサスは得られていない.

ベイズ法による系統解析の結果, 図 2 のようにフグ目の科は全て単系統群であり, A 群と B 群の大きく 2 群に分かれた. A 群にはハコフグ科, ウチワフグ科, ベニカワムキ科の 3 科が含まれ, B 群には残りの 5 科が含まれる. 3 上科は何れも単系統とはならなかった. 過去の解析に使われた形態形質でこの 2 群を明確に識別できる形質は見つかっていない. しかし, A 群はハコフグ科の一部を除き深海底層域に生息する一方で, B 群は浅海域, 外洋表層域, 淡水域に生息するといった違いが見られる.

6. 分岐年代の推定

(1) モデル生物を含めた魚類の主要系統間の分岐年代推定

近年、全ゲノム塩基配列解読が終了したトラフグ、ミドリフグに加えて、ゼブラフィッシュ、メダカ、トゲウオなどさまざまな魚類で同様のプロジェクトが進められている。一方、ゲノム配列を比較し、その違いがどれだけのタイムスケールで生じたのか知るためには、その分岐年代を知ることが欠かせない。モデル生物間の分岐年代は化石記録に基づく仮説を用いるのが一般的となっているが、Kumazawa et al. (1999) によるミトコンドリアゲノムの部分配列 (約 2200 bp) の分子時計 (進化速度一定) を用いた推定では、分岐年代が化石記録とは大きく異なる結果が報告されている (表 1)。本研究では、ミトコンドリアゲノム全長配列 (ND6 遺伝子とコドンの第 3 座位を除く 1,0781 bp) に基づきベイズ法による分岐年代推定を試みた。本手法は、分子時計に基づく手法とは異なり、進化速度の一定性を仮定する必要がなく、また年代設定を範囲で指定できるなど柔軟性が高い。

データは、コドンの第一・第二座位, tRNA, rRNA の 4 パーティションに分け、PAML 3.0 (Yang, 1997) と *estbranches + divtime 5b* (Thorne et al., 1998; Kishino et al., 2001) を使い、HKY + Γ モデルによる推定を行った。肉鰭類と条鰭類の分岐は分子時計と化石記録の両者から 4 億 5 千万年前と推定されているため (Benton, 1990; Kumar and Hedges, 1998), 本研究ではこの年代に固定し、それ以外にも化石記録から 8 つの年代の制約を与えた。その結果、表 1 の結果を得た。これは Kumazawa et al. (1999) の分子時計に基づく推定値に近く、一方、化石記録による推定値との隔たりは極めて大きかった。これはそれぞれの系統が分岐した年代と化石記録に残るほどのバイオマスを得るまでの年代に大きな差があったためだと考えられている (Kumazawa et al., 1999)。

表 1. ミトコンドリアゲノム全塩基配列を用いてベイズ法により推定されたフグ目魚類とモデル生物を含む魚類の主要系統との分岐年代。分子時計による推定値は Kumazawa et al. (1999), 化石による推定値は Benton (1990) を参照した。単位は 100 万年。

	推定年代	95% 信頼区間	分子時計による推定値	化石記録による推定値
フグ目魚類/アミア	371.8	348.9–394.9	404	250
フグ目魚類/ゼブラフィッシュ	299.6	272.9–327.1	296	130
フグ目魚類/ニジマス	266.3	240.9–294.5	265	125
フグ目魚類/メダカ, ヒラメ	174.9	152.4–201.9		90
フグ目魚類/トゲウオ	166.7	144.8–193.0		

(2) フグ目に関する分岐年代推定

上記 3–5 の研究で用いた計 84 種を用い、コドンの第一・第二・第三座位, tRNA, rRNA の 5 パーティションで HKY + Γ モデルを用いた解析を行った。外群 (ギンメダイ) と内群 (キンメダイ) の分岐年代の上限と下限に 6 (1) の解析結果の 95% 信頼区間を用い、さらに化石の産出記録より 14 の年代の制約を与えた。その結果、フグ目は 1 億 2600 万年前に最も近縁なアンコウ目 + ヒシダイ亜目と分岐し、その後、A 群と B 群が 1 億 2200 万年前に分岐したことが推定された。フグ目の 8 科は白亜紀の中ごろまでに分岐しており、最も分岐が古い科はウチワフグ科 (1 億 1300 万年前) で、最後に分岐した科はフグ科とハリセンボン科 (1 億年前) であった。挿入配列を持つテングカワハギとハナツノハギは 1600–2600 万年前に分岐しており、この挿入配列は最低でも 1600 万年の間保持されてきたと考えられた。