

## 論文内容の要旨

### 論文題目：

## Phylogeny and Evolution of The Medaka

[メダカの系統と進化]

氏名 : Davin Hadryanto Ekaputra SETIAMARGA

(ふりがな: デフィン・ハドリヤント・エカプトラ・スティアマルガ)

### はじめに

メダカ (*Oryzias latipes*) は分類学上、メダカ亜科メダカ亜目ダツ目トウゴロウイワシ系に分類され、主に亜熱帯東アジア地域に分布している淡水小型(成魚の体長: 約 3~5 cm) 魚類である。近年、モデル生物としてポピュラーになりつつあり、2007 年にメダカの核ゲノム全長の解読完了が報告された (Kasahara et al., 2007; Takeda, 2008)。

大変重要な実験動物であり基礎研究の成果から様々な側面により生物学的に理解されつつあるメダカの系統関係の情報が比較的乏しく、近縁種との比較によって研究成果を正しい進化的な議論が未だ出来ないのが現状である。

そこで私は、魚類の高次系統を十分に解ける中立な分子マーカーであるミトコンドリアゲノムの全長配列を用いて、メダカ亜科の系統関係や棘鱗類とトウゴロウイワシ系魚類の中の系統的位をを確認した。そして、得られた精度の高い系統樹を用いて、分岐年代の推定を行った。

### メダカの姉妹群の探索とトウゴロウイワシ系魚類の系統的位

#### 1. はじめに

トウゴロウイワシ系魚類は、レインボウフィッシュ、ヨツメウオ、トビウオなど多様な生態的及び形態的形質を示した、1552 種からなる魚類分類群である。これらの魚は 3 目 6 亜目 21 科 193 属に分類されている (Nelson, 2006)。最近モデル生物として注目をあびた、ニホンメダカやメダカ属魚類や、サンマやトビウオなど水産重要種がトウゴロウイワシ系魚類に含まれている。

このように重要な魚類グループにも関わらず、それらの魚の系統的関係は十分に解明されていない。過去では、形態形質や分子マーカーを用いたいくつかの系統学的研究が行われたが、一致した見解が得られていない。トウゴロウイワシ系を巡る高次系統関係においては三つの課題を明らかにする必要がある。それらは: (1) トウゴロウイワシ系の単系統性、(2) トウゴロウイワシ系の正真骨魚類の中の系統的位、(3) 内部グ

ループ(目・亜目レベル)の系統関係、といった課題である。

メダカやその近縁種の系統・進化を議論する時に、メダカ亜科の姉妹群や近縁群の同定といった意味でトウゴロウイワシ系の系統関係や内部の各目の単系統性の再検討をさきに行う必要がある。形態形質に基づいた結果をもとにした最近の見解ではメダカはダツ目に含まれているが、分子系統の結果ではこの見解が必ずしも支持されているわけではない。

そこで私は、メダカの姉妹群や魚類大系統の中の位置を確認すべく、ミトコンドリアゲノム全長シーケンスを用いて、トウゴロウイワシ系魚類の系統関係を調べた。

## 2. 材料及び方法

Taxon sampleとしては、89種の有棘類魚類を選んだ。そのなかに、各亜目を代表した17種のトウゴロウイワシ系魚類が含まれている。用いられたミトゲノム配列は、12個のタンパクコード遺伝子(ND6 不使用)、2個のrRNA 遺伝子、22個のtRNA 遺伝子である。系統解析は、RaxML v. 7.0.3(Stamatakis, 2006)を用いたpartitioned 最尤法と、Mr. Bayes v. 3.1.2(Huelsenbeck&Ronquist, 2001)を用いたpartitioned ベイズ推測法を行った。

## 3. 結果及び考察

行われた系統解析から、以下の結果が得られた:

1. トウゴロウイワシ系は単系統である。これは、両方の解析法で得た高い統計値で支持されている。(BP = 90%; PP = 100%)
2. 系統的位置に関しては、トウゴロウイワシ系魚類は:(1) スズキ系魚類群に含まれている;この結果は様々な分子系統の先行研究の結果に一致している、(2) ボラ目+メギス科+スズメダイ科+ウバウオ亜目+ギンポ亜目+ウミタナゴ科+シクリド科と高い支持率(BP and PP 100%)で一つのクレードにまとまった。このクレードに含まれている魚類は付着糸をもった沈性卵を産むことが知られている。これは、この系統群の中に含まれている魚が示した特殊な繁殖方法の進化に関係している可能性がある。
3. トウゴロウイワシ系に含まれている三つの目(トウゴロウイワシ目、ダツ目、カダヤシ目)は全て単系統である。この結果で、メダカはダツ目であり、ダツ亜目魚類(サヨリ、トビウオなど)がメダカの姉妹群であることを示すことが出来た。

## ミトゲノムによるメダカ属魚類の分子系統解析と分岐年代推定

### 1. はじめに

記載分類学の研究結果(Nelson, 2006)によると、メダカ科魚類(Adrianichthyidae)は、3亜科4属28種からなる分類群である。その三つの亜科の一つであるメダカ亜科(Oryziinae)は1属のメダカ属(*Oryzias*; 約22種)に構成された(岩松, 1998; Nelson, 2006)。全ての*Oryzias*属魚類は東南アジア~東アジアにしか分布していない。

近年、モデル生物としてのメダカの有用性が評価され、メダカとその近縁種との系統的關係が注目している。最初にUwa (1990) が、染色体の核型によるとメダカ属魚類はジャワメダカ種群、スラウェシメダカ種群、ニホンメダカ種群と、三つの種群に分類することが出来ること報告した。その後、Naruse (1996)や Takehana et al. (2005) がいくつかの分子マーカーを用いてメダカの分子系統を行った。彼らの結果は、Uwa が報告した三つの種群の存在を確認出来たほか、スラウェシ島の固有種メダカ属は全てスラウェシメダカ種群に含まれたことや、Adrianichthyinae 亜科のメンバーでスラウェシ島の固有種の *Xenopoecilus* がスラウェシメダカ群種に含まれることも見付けた。

メダカ属魚類の分岐年代推定が、ゲノム進化や種分化・動物系統地理学的な研究を行うための基礎情報として非常に重要である。しかしながら、しっかりとした分岐年代推定の研究がないのは現状である。近年、魚類大系統の關係がミトゲノム全長配列を用いた系統解析によって明らかにされつつある。これらの情報を用いた硬骨魚類の分岐年代推定の結果が報告された(e.g. Yamanoue et al., 2006; Azuma et al., 2008)。最

新の報告の Azuma et al. (2008)では著者らは分岐年代推定に必要な古生物学的制約を使用した以外、大陸の分裂時期など生物地理学的時間制約が魚類の分岐年代推定に有効であることを示した。

これらの結果を踏まえて本研究ではミトゲノム配列を用いてメダカ属魚類の系統関係を確認し、分岐年代推定を行った。得られた結果を用いて南北メダカ集団のゲノム進化の解釈にとういった意義をもたらしたかについても議論する。

## 2. 材料及び方法

Taxon sampling としては、76 種のミトゲノム配列を OTU として用いた。そのうち、各種群から代表として選んだ 7 種の *Oryzias* 魚類と、大陸・南北日本集団のニホンメダカのサンプルから選んだ 7 種のサンプルを解析に用いた。メダカ亜目の外群として 9 種のトウゴロウイワシ系魚類を用いた。その他、50 種の条鰭類と 2 種の肉鰭類、そして外群として 2 種の軟骨魚類を解析に使用した。用いられたミトゲノム配列は、12 個のタンパクコード遺伝子 (ND6 不使用)、2 個の rRNA 遺伝子、22 個の tRNA 遺伝子である。系統解析は、RaxML v. 7.0.4 を implement している RAxML Blackbox で partitioned 最尤法を行った (Stamatakis et al., 2008)。分岐年代推定は、Bayesian 法を implement した multidivtime 分岐年代推定プログラム (Thorne et al, 1998) を使用した。推定に使用した Age 制約は、Azuma et al. (2008) が用いた古生物学的及び生物地理学的制約を全て使用した。

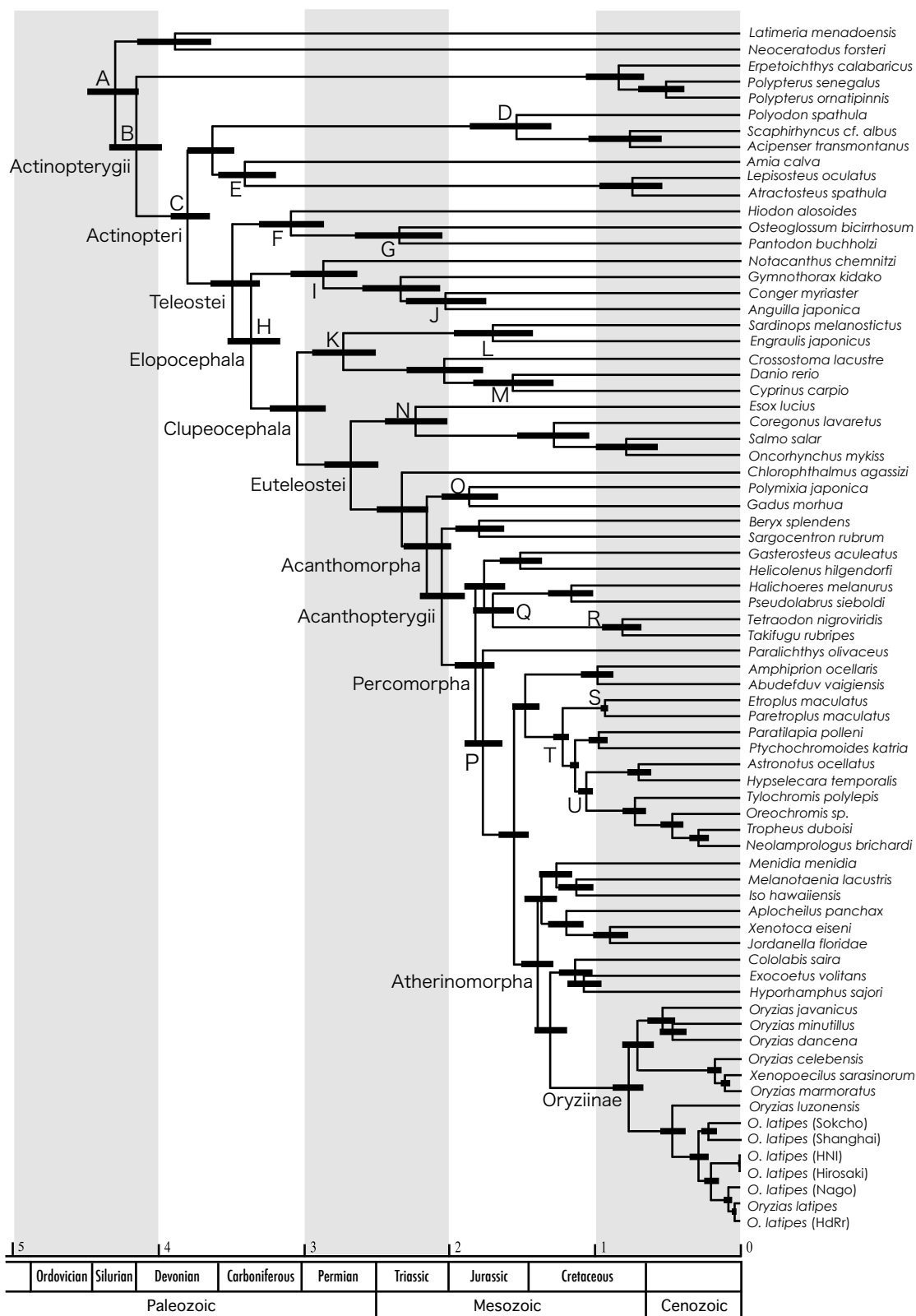
## 3. 結果及び考察

行われた系統解析及び分岐年代推定解析から、以下の結果が得られた：

1. 魚類大系統内のメダカ亜目魚類の位置は確認出来た。前説の結果に述べたように、メダカ亜目がダツ亜目にくっついて、ダツ目を形成している。そして、トウゴロウイワシ系が単系統であり、スズキ型魚類のなかに入った。
2. メダカ亜科魚類の系統解析では、Takehana et al. (2005) で報告された結果と一致した結果が得られた。メダカ属魚類は三つの種群に分類された他、*Xenopoecilus* がスラウェシメダカ種群に入った。
3. Multidivtime を用いて分岐年代推定を行った結果は、以下のとおり：
  - A. メダカ属対ダツ目：130 MYA；ニホンメダカ種群がほかの二つから分岐したのが：76 MYA
  - B. ニホンメダカ対大陸メダカの分岐：29 MYA；南北ニホンメダカ集団の分岐：20 MYA。これらの結果によると、ニホンメダカ種群内の分岐が今まで考えられた分岐年代よりもはるかに古い。しかしながら、今まで参考にされてきたメダカの南北集団の分岐年代推定はハゼ科魚類であるヨシノボリに推定された *cytb* 遺伝子の塩基置換率をメダカに当てはめたといった非常に単純な方法である (Takehana et al., 2003)。本研究で行われた分岐年代推定法は rigorous な方法で行い、しかも化石や大陸移動などの古生物学的な情報をより正確な制約として使用した。

南北メダカに分岐年代が今まで提唱された年代より古いことが、今までのメダカゲノム進化の解釈に影響をもたらす。今まで約 5 MYA とされた分岐年代は、ヒト対チンパンジー (チンプ) の分岐時期に非常にほぼ同じである。ヒト対チンプが 5 MYA の間に全く別種に文化したに対して南北メダカはまだ同種である。しかし、様々な遺伝子の分子進化速度を表すアミノ酸置換率/塩基置換率 (Ka/Ks) の値が、南北メダカはヒト・チンプよりも二倍高い。これは、魚類、特に南北メダカでは進化速度が哺乳類のより高いと、解釈されている。

本研究の結果では、今までの分岐年代よりも 4 倍古い (約 20 MYA) とされた。この結果で解釈すると、Ka/Ks 値が高いのは進化速度が早いためではなく、分岐が古いからである。この考察を確認するために、本研究で出された分岐年代を用いる進化速度の値を調べる必要があるのである。



**Figure 3.2. Divergence times of the medaka fishes genus *Oryzias* (Oryziinae) estimated from the partitioned Bayesian analysis.** A posterior distribution of divergence times with 95% credibility intervals (black rectangles at nodes) was obtained using mitogenomic DNA sequences (13411 sites). Two sharks (*Scyliorhinus canicula* and *Mustelus manazo*) were used as outgroups (not shown). The multidistribute program (Thorne et al., 1998) was used to estimate divergence times assuming the tree topology shown in Fig. 3.1. Capital letters at internal nodes indicate nodes at which maximum and/or minimum time constraints were set (see Table 2 for details of the individual constraints). Constraints S, T, and U are the biogeographical constraints of cichlids suggested by Azuma et al. (2008).