

学 位 論 文 題 名

Mitochondrial DNA molecular evolution and evolutionary history of ninespine sticklebacks (genus *Pungitius*)

(トミヨ属魚類の進化史とミトコンドリア DNA の分子進化)

学位論文内容の要旨

自然集団において遺伝的多様性がどのようにして生まれ、維持されているのかという問題は、進化生物学上の中心的論点の一つである。全ての自然集団は‘遺伝子流動に対する障壁’によって他の集団から隔てられており、その効果によって集団間に遺伝的分化が起こり遺伝的多様性が増加する。遺伝子流動に対する障壁は生物学的障壁（生殖的隔離機構）と非生物学（物理）的障壁に大きく分けられるが、一般的に僅かな例外を除き、物理的障壁の出現が生殖的隔離機構の進化、すなわち種分化のきっかけになると考えられている（e.g., Mayr 1963; Templeton 1980; Futuyma 1998）。従って、現在捉えられる自然集団の遺伝的多様性を理解するには、近縁種間において、物理的障壁の出現から生物学的障壁が完成するまでの進化的歴史に沿った研究が必要である。

トミヨ属魚類（*Pungitius*）は北半球北部に広く周極的に分布する小型の冷水性魚類であり、形態的、行動的、また遺伝的形質に高い多様性を示す（e.g., Ikeda 1933; Münzing 1969; Wootton 1976）。本研究は東アジアにおけるトミヨ属魚類を対象に、その種分化過程から種内変異までを通したミトコンドリア DNA（mtDNA）の分子進化学的解析を行い、遺伝子流動の障壁の歴史的変遷と、現在の遺伝的多様性との関係を考察しようと試みた。mtDNA は進化速度が単一核 DNA に比べ 5～10 倍も速く、ほぼ厳密に母系遺伝をすることから、系統解析や集団解析、さらには種間の遺伝子流動を捉えるための高感度なマーカーとして知られている（e.g., Brown et al. 1979; Wilson et al. 1985）。

東アジアに分布するトミヨ属魚類はこれまで、背棘が低く体側の鱗板列形態が不

連続型のエゾトミヨ *Pungitius tymensis*、背棘が高く体側の鱗板列形態が不連続型のイバラトミヨ *P. pungitius*、そして背棘が高く体側の鱗板列形態が連続型のトミヨ *P. sinensis* の3種に分類されてきた (Berg 1902; Miyadi et al. 1978)。このうちイバラトミヨは北半球北部に広く分布するのに対し、残りの2種は東アジアに固有である (Münzing 1969)。1980年代後半以降に行われたアロザイム解析の結果、エゾトミヨは単一の生物学的種に相当するが、少なくとも日本列島では、従来イバラトミヨもしくはトミヨとされてきた中に、その鱗板列形態に拘わらず、淡水型、汽水型および雄物型という3つの互いに生殖的に隔離された遺伝的集団が存在することが示された (Niwa 1987; Takata 1987; Takata et al. 1987a, b)。

本研究では初めに、東アジアにおけるこれらの形態学的種および遺伝的集団間において mtDNA の系統解析を行い、その全体的な種分化過程を捉えようと試みた。クダヤガラ (*Aulichthys japonicus*) とイトヨ (*Gasterosteus aculeatus*) を外群に用い、調節領域の全域 (830-930 塩基対) の塩基配列に基づいた系統解析を行った結果、3つの大きく分化した系統 (A-C) が見いだされた。系統 A はエゾトミヨ、系統 B は東アジア大陸産トミヨ、そして系統 C は同大陸の島嶼部産トミヨと全てのイバラトミヨの mtDNA ハプロタイプから構成されていた。系統 A と B が姉妹群であることが複数の系統推定法から強く支持され、トミヨ (*Pungitius sinensis*) とされてきた集団は側系統群であることが示唆された。また、日本列島における上記3遺伝的集団はすべて系統 C に属した。

各系統の地理的分布パターンと化石の出現記録から、祖先系統 A+B と C との間の分岐年代が約3百万年と推定され、前者は東アジアに、後者は北太平洋に地理的起源を有すると推察された。この分岐年代を基準にすると、東アジアにおけるエゾトミヨと大陸産トミヨの分岐は、系統 C の東アジアへの進出よりも遙かに早く起きたと推定される。エゾトミヨの持つ退化的形態は、東アジア島嶼部における淡水域への適応と、後から侵入してきた系統 C との生態的相互作用の結果生じたと考えられる。

近年、交雑を介した種間の遺伝子流動 (異種間浸透) は、遺伝的多様性増加機構の一つとして関心が高まってきている (Arnold 1997, 1999)。魚類においては異種間浸透現象が比較的多数報告されているにも拘わらず、それらの遺伝的多様性に対する効果は確かめられていない。そこで、生物学的障壁を超えた遺伝子流動が、おも

にレシピエント系統の遺伝的多様性に与える影響を把握する目的で、稀な自然種間交雑が報告されているエゾトミヨと淡水型との間で、mtDNA 母系解析による浸透交雑の検出と、個体群間の遺伝的多様性の比較を行った。

エゾトミヨの分布域はサハリン、北海道北部、東部および中央部の 4 地域に分かれており、それらすべてが淡水型の連続的な分布域に含まれている。これら同所的 4 地域と、それを取り巻く淡水型の異所的生息地から個体群を採集し、全 mtDNA の制限断片長多型 (RFLP) 解析を行った。mtDNA ハプロタイプ間の系統解析の結果、北海道北部と中央部のいくつかのエゾトミヨ個体群から、淡水型が本来保有してきた mtDNA 系統が見いだされ、淡水型からエゾトミヨへの mtDNA 異種間浸透が起きたことが示唆された。独立した複数の浸透交雑に由来するレシピエント個体群において、他の純粋な個体群や同所的淡水型個体群よりも有意に高い遺伝的多様性が検出された。これらの結果は、少なくとも mtDNA レベルでは、過去の浸透交雑によってレシピエント系統の遺伝的多様性が増加する可能性があることを示唆する。

次に、北海道東部の複数の水系で共存する淡水型と汽水型を対象に、水系間の遺伝子流動量の差が、全体の遺伝的多様性に与える影響について調査した。ほぼ同じ地理的距離から採集された両型の地域集団の部分セットにおいて、個体群内の mtDNA ハプロタイプ頻度分布に基づき、地域間の遺伝子流動量と遺伝的分散成分の分布様式を比較した。その結果、一生を淡水域で過ごす淡水型は、水系間の遺伝子流動量が極めて低く、全体の遺伝的分散の半分以上が地域集団間の遺伝的分化によって説明されることが示された。一方、その生活環の多くを汽水域で過ごす汽水型では、海水域を通した水系間の個体の移動が高頻度に起きており、遺伝的分散の大部分が地域集団内に存在することが示された。

最後に、日本列島において最も広く連続的な分布域を持つ淡水型について、その種内における鱗板列連続型と不連続型の側所的分布の形成過程について、系統地理学的研究を行った。日本列島における淡水型の分布範囲のほぼ全域から採集された個体群間で mtDNA RFLP 解析を行い、検出された mtDNA ハプロタイプ間の塩基置換率に基づくクラスター分析を行った。その結果、構成ハプロタイプが地理的に広範囲にわたり分布する 2 つのクラスターと、それらが比較的狭い地域にまとまって分布する 4 つのクラスターが見いだされた。前者は主に鱗板列連続型の、後者は主に不連続型個体群のハプロタイプから構成されていた。トゲウオ科魚類において、

淡水域への隔離期間と鱗板列の退化に正の相関が示されている。このことを考慮すると、鱗板列不連続型が多数を占める2型の側所的分布は、鱗板列連続型（もしくは多型性）祖先集団の、時間的に異なる2回の分散によって形成されたと考えられた。

以上のことから、トミヨ属魚類の進化史を mtDNA の分子進化を通してみた場合、その遺伝的多様性の創出・維持機構には、1) 比較的長期間の物理的障壁の形成に伴う遺伝的分化と生物学的障壁の進化、2) 物理的障壁の消失後における2次的接触と生物学的障壁を超えた遺伝子流動、3) 種間の生活環の相違によって生じる集団構造の差異、および4) 更新世の気候変動下での分散と淡水域への隔離の繰り返し、などが深く関わっていることが明らかとなった。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 荒 井 克 俊

副 査 教 授 仲 谷 一 宏

副 査 助 教 授 後 藤 晃

学 位 論 文 題 名

## Mitochondrial DNA molecular evolution and evolutionary history of ninespine sticklebacks (genus *Pungitius*)

(トミヨ属魚類の進化史とミトコンドリア DNA の分子進化)

魚類自然集団がもつ遺伝的多様性は、進化の材料そのものとして、また将来の水産育種を担う遺伝資源として、生物学的側面と水産学的側面の両方から注目を受け研究されている。しかしながら、自然集団において遺伝的多様性がどの様にして生まれ、維持されているのかについて詳しく研究した例は少ない。本研究は東アジア産トミヨ属魚類 (genus *Pungitius*) を材料に、ミトコンドリア DNA (mtDNA) を分子マーカーに用いた系統進化学的・集団生物学的解析を行い、遺伝的多様性の創出機構として最も基本的な現象である種分化過程、種間の移入交雑現象とその遺伝的多様性創出に対する効果、種内の集団構造が全体の遺伝的多様性に与える影響、そして種内表現型変異の地理的分布パターンの形成過程について明らかにすることを目的として行われ、以下の成果が評価された。

- 1) 東アジア産トミヨ属魚類はこれまで、形態学的特徴に基づき、エゾトミヨ *P. tymensis*、トミヨ *P. sinensis*、およびイバラトミヨ *P. pungitius* の3種に分類されてきた。このうちイバラトミヨは北半球北部に広く分布するのに対し、残りの2種は東アジア地域に固有である。これら3種の東アジア地域における分布域のほぼ全域から採集された地域集団について、mtDNA 分子系統解析を行った結果、大きく遺伝的に分化した3つの母系統を見出した。各母系統とアロザイム解析で見出された生物学的種との対応から、長期間の地理的分断による遺伝的分化が、種分化、すなわち遺伝的多様性のもっとも重要な創出機構に繋がったことを明らかにした。また、従来の形態学的分類において、これまで日本列島でトミヨ、イバラトミヨの2種に分類されていたものは、両者とも世界的分布を示すイバラトミヨに含まれ、東アジア大陸部に分布するトミヨとは明瞭に区別されることを見出した。
- 2) 長期間の地理的隔離の結果、互いに高度に遺伝的分化を遂げた2種、エゾトミヨ

とイバラトミヨとの間で、mtDNA の浸透交雑（種の境界を越えた遺伝子流動）が複数の河川で独立に起きたことを見出した。また各地点において、イバラトミヨ由来の mtDNA の異種間浸透を受けたエゾトミヨ河川集団の遺伝的多様性が増大していることを示し、種間交雑と、それに引き続く戻し交雑の過程を通して、親種の遺伝的多様性が増加する可能性を、脊椎動物においてはじめて実証的に指摘した。

- 3) イバラトミヨの2つの生態型、淡水型と汽水型について、その生態的な違いが集団構造に与える影響について、集団内の mtDNA 遺伝子型頻度に基づき調査した。その結果、より淡水環境に適応している淡水型の方が、河川水系間の遺伝子流動量が少なく、集団構造が明瞭であることを見出した。一方、汽水型は海を通じた遺伝子流動が比較的多く、河川集団間に明瞭な遺伝的差異は認められなかった。以上の結果から、両型は同所的に存在しても全く異なる集団構造を持つ、独立した生物学的種であることを示唆した。両型の河川集団内および型全体の遺伝的多様性を比較したところ、集団構造が明瞭なほど全体の遺伝的多様性が大きくなるという傾向が示され、集団構造が種全体の遺伝的多様性維持機構として重要であることを示した。
- 4) イバラトミヨの淡水型には、鱗板列連続型と不連続型という2つの表現型がみられ、これらは日本列島において側所的な分布パターンを示す。この様な分布パターンが、どのような歴史的過程を経て現在の様相を示すようになったのかについて、mtDNA 遺伝子型と表現型2型の地理的分布パターンを比較することにより推定した。検出された mtDNA 遺伝子型間の塩基置換率に基づくクラスター分析の結果、構成遺伝子型が地理的に広範囲に渡り分布する2つのクラスターと、それらが狭い地域にまとまって分布する4つのクラスターが見出された。また、前者は主に鱗板列連続型の、後者は主に不連続型の個体群の持つ遺伝子型から構成されていた。トゲウオ科魚類において、淡水域への隔離期間と鱗板列の退化に正の相関が示されていることから、前者はより最近の、後者はその一つ前の氷期の分散に由来すると推定した。また、各クラスター間の塩基置換率が比較的小さかったことから、これらの分散と間氷期における淡水域への隔離の結果生じた遺伝的分化は更新世後半の氷期と間氷期の繰り返しの中で形成されたこと、さらに、そのような気候サイクルによる分布域の拡大・分断が、遺伝的多様性の維持に重要であることを示唆した。

申請者による以上の成果は、魚類の遺伝的多様性創出・維持機構に関する理解の進展に大きく寄与するものであり、審査員一同は本研究が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。