

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18570086

研究課題名（和文） 淡水魚類の遺伝的多様性および系統地理パターンの解明とデータベース構築

研究課題名（英文） Comparative phylogeography of Japanese freshwater fishes, and database construction of their genetic diversity

研究代表者

渡辺 勝敏（WATANABE KATSUTOSHI）

京都大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：00324955

研究成果の概要：本研究では、純淡水魚類の種多様性が高い本州中部地域をモデルとして、多数の魚種を用いたミトコンドリア DNA に基づく比較系統地理解析を行った。比較的単純だと想定された鈴鹿山系による東西の分断に関連して、予測に一致する系統地理パターンと一致しないパターンが見いだされ、淡水魚類相形成の複雑性が明らかにされた。さらに将来的な発展的活用を目指し、淡水魚の遺伝的多様性データベース（GEDIMAP）の構築・公開を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	1,600,000	0	1,600,000
平成 19 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成 20 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	600,000	4,200,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：遺伝子，進化，動物，生物多様性，遺伝的多様性，mtDNA，淡水魚

1. 研究開始当初の背景

系統地理学 phylogeography は、分布域形成史の科学的解明のために急速に発展している新しい分野であり、地域生物相の成立・維持機構を明らかにすることに貢献してきた。系統地理学は、分子マーカーを用いて、種内・近縁種間の分子系統とその地理分布、および遺伝的多様性のデータに基づき、分布形成パターンや集団の人口学的歴史を明らかにすることを目指す。これまで系統地理学は、各生物種の分布域形成史を鮮やかに解明してきた。一方、1980 年代後半の系統地理学

の誕生時には、種間の地理的集団構造パターンの共通性が注目され、重点が置かれたものの、これまで多種を対象としたまとまった比較系統地理的研究はほとんどなされてこなかった。

日本列島は、中期中新世の列島形成時以来の地質学的変遷や海水面の変動により、複雑な生物相形成の歴史を経ている。淡水魚類は分布域形成が陸水系の連絡に制限されることから、生物地理学の好材料の一つと認識されている。しかし、その系統地理的知見は断片的である。日本および東アジア地域の生物多様性の歴史的理解を前進させるためには、

共有可能なデータやアプローチに基づいた将来にわたる蓄積型の調査研究プログラムが必須であると考えられた。

2. 研究の目的

日本列島・東アジア地域の生物多様性の総合的理解を将来的な目標として、本研究では、(1) 淡水魚類を対象として、モデル地域において多数種を用いた比較系統地理の先導的研究を行うこと、および (2) 将来にわたり利用可能なデータベースシステムを構築し、実際のデータ（今回および既存のデータ）を用いて運用すること、の2点を目指した。

今回開発したデータベースは、国際的なDNA データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) や魚類のミトコンドリア DNA データベース (mitoFISH) などがカバーしていない集団内の遺伝子頻度など、特に系統地理・集団遺伝分析に必要なデータを含むものであり、淡水魚のみならず遺伝的多様性情報を蓄積・利用・追跡できるデータベースとしてユニークなものである。

3. 研究の方法

(1) 対象地域

対象地域は次の2点に着目して設定した：①種多様性が高い地域であること；②比較的単純な歴史的背景と系統地理パターンを想定できること。

検討の結果、淡水魚類が豊富な西日本において、特に種多様性の高い「琵琶湖-淀川流域」と、その東部に位置し、鈴鹿山系（伊吹-鈴鹿-布引-紀伊山地）を分水界として隔てられた「伊勢湾流域」を対象地域として設定した。より西部および東部の集団も一部比較のために解析に加えた。

(2) 対象種

対象種として、分子進化特性に大きなばらつきがないと想定でき、また多数種が比較できるよう、最も多くの種を含むコイ科魚類を選んだ。

分析対象としたのは次のコイ科 14 種群（計 21 種・亜種・隠蔽種）である：カワムツ、ヌマムツ、オイカワ、カワバタモロコ、タモロコ類、ムギツク、モツゴ類、ヒガイ類、カマツカ類、ゼゼラ類、スゴモロコ類、デメモロコ、イトモロコ、ズナガニゴイ。

これらの計約 180 集団、1800 個体を系統地理解析に用いた。

(3) 方法

遺伝標識としては、汎用性と比較可能性、

蓄積性に基づいて、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の塩基配列を用いた。既存文献と予備実験から、十分な変異性をもつと判断されたシトクロム *b* の後半約 600bp を標準的な遺伝標識として用いた。

塩基配列決定は定法に従い、自動 DNA シーケンサーを用いて行った。

一部の対象種については、より詳細な系統地理特性の解明のために、マイクロサテライト DNA のプライマーを開発し、適用した。

(4) 検証内容

琵琶湖-淀川流域と伊勢湾流域における多数種の系統地理解析により、主に以下の3つの仮説検証を行った。

①両地域にわたる系統地理パターンが種間で一致するか。予測：鈴鹿山系によって2つに分断された集団構造を示す。

②鈴鹿山系によって分断されている場合、その遺伝的分化の大きさは種間で一致するか。予測：鈴鹿山系の隆起時期（150-100 万年前）に対応する遺伝的分化が共通してみられる。

③比較的閉鎖的な伊勢湾流域において集団構造は種間で一致するか。予測：種の生態・生息環境に対応した分散能力を反映して一致しない。

(5) データベース構築

既存データ、そして今回および将来にわたって取得される遺伝的多様性データを効率的に蓄積し、利用可能とすることを目標として、データベース GEDIMAP (Genetic Diversity and Distribution Map) を設計・構築した。

GEDIMAP では、汎用性、比較可能性、蓄積性に基づき、mtDNA の塩基配列データを基本的対象とした。ミトコンドリア・ハプロタイプの塩基配列とその集団内の頻度を基本情報として、地理的情報、分類体系、文献情報を含めたりレーショナルデータベースとして設計し、外部データベースとのリンク、および簡易解析機能を実装させることとした。

4. 研究成果

(1) 比較系統地理

①両地域にわたる系統地理パターン

分析されたコイ科の多くのグループで、琵琶湖-淀川流域と伊勢湾流域の間で、いわゆるダンベル型の分子系統樹が得られ、両地域の集団が鈴鹿山系で分断・隔離された歴史を共有することが支持された（図 1）。

しかし、2 地域の境界を越えて一方の遺伝子グループが分布を拡げているケースもあり（タモロコ類）、地理的分化後、独自の分散の歴史を反映している可能性が高い。

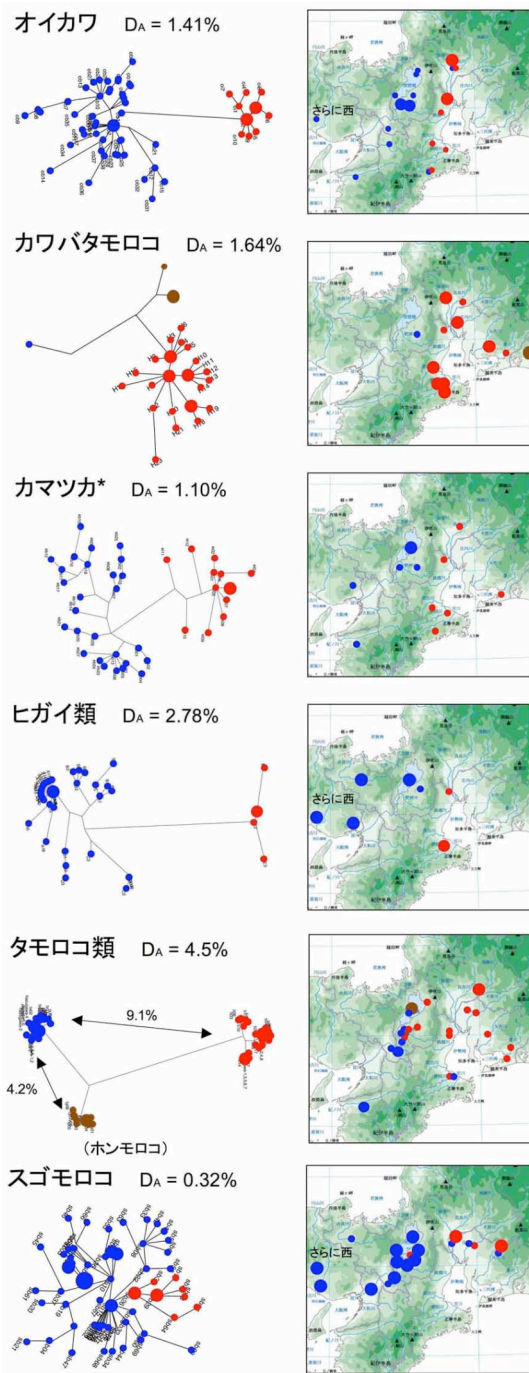


図1. 琵琶湖-淀川流域と伊勢湾流域に生息する魚種の遺伝的集団構造(一部)。典型的には2地域の集団が、 D_A (純塩基置換率)=1-2%のダンベル型のハプロタイプ樹に対応した集団構造を示すが(上3種)、遺伝的分化が大きいもの(ヒガイ類、タモロコ類)、2地域の境界を超えて一方の遺伝子グループが分布を拡げているもの(タモロコ類)、分化の程度が小さいもの(スゴモロコ類など)があった。

②鈴鹿山系による遺伝的分化

両地域間の遺伝的分化は、典型的には、純

塩基置換率で1-2%の種が約半数を占めた(オイカワ、カワバタモロコ、カマツカ種群の2種など; 図1)。mtDNAシトクロムbの分子進化速度はコイ科において約1.5%/百万年(ペア間距離)、また魚類の多くで1-3%/百万年という推定がなされていることから、1-2%の分化は100万年前後と推定され、鈴鹿山系の隆起時期に対応するものと考えられる。

一方、より大きな遺伝分化を示す種(約3-6%)や分化がより小さい種(1%未満)も存在した。これらの理由を明らかにするためには、分子進化速度の検討やより広い地域における系統地理解析が必要であると考えられる。分化の不明瞭なスゴモロコ類では、マイクロサテライトを用いた分析により、この種が伊勢湾流域に比較的新しい時代に侵入し、分布を拡大したことが示唆された。

③伊勢湾流域における集団構造

伊勢湾流域に広く分布する種のうち、広範な生息環境に分布するオイカワ、カワムツなどでは明瞭な集団構造が見られなかった。一方、ウシモツゴやカワバタモロコのように平野・山間部の溜め池や水路に生息する種においては、共通して、南部地域の伊勢湾対岸で遺伝的な類縁関係が見られ(trans-bay構造)、海退期に伊勢湾流域に存在した古水系の中・下流域における遺伝子交流が示唆された。

(2) 淡水魚遺伝的多様性データベース

GEDIMAPは、日本および周辺域の淡水魚類のmtDNA塩基配列とその集団内頻度、および地理情報や文献を包括的に含むウェブデータベースとして、2008年1月にβ版が公開され、その後2009年6月に正式版が公開された(<http://gedimap.zool.kyoto-u.ac.jp/>)。

GEDIMAPは、個体群(集団)、ハプロタイプ、および文献を主なサブデータベースとし、地理・水系情報や分類体系とともにリレーションデータベースとして構成されている。外部データベースとして、国際DNAデータベース(DDBJ)、生物バーコード(BOLD)、魚類データベース(FishBase)、デジタルオブジェクト識別システム(DOI)等に動的にリンクする。

GEDIMAPの機能は、登録、検索、解析に分けられる。データの登録は管理者および登録提供者がウェブブラウザから既存・新規データを登録する。正規版公開時時点で、153種・亜種、986個体群、1440ハプロタイプ、355文献が登録されている。

検索機能としては、分類体系、地域、解析領域、その他キーワードから、関連する個体群、ハプロタイプ、文献を検索できる。また手元の塩基配列について、GEDIMAP内、および国際DNAデータベースに対してBlastnに

よるホモロジー検索が可能であり、前者に対しては、個体群レベルの検索が可能である。

簡易解析機能として、他の遺伝集団解析ソフトの形式のデータファイルの出力や、集団間の遺伝距離やそれに基づく樹状図の算出、アライメント等が可能である。

(3) 到達点と今後の発展

今回 14 種群 20 余種にわたる比較系統地理学分析をモデル地域で大規模に実施することにより、基本的には予測されたパターンが見いだされた一方、より複雑な分類群ごとの差異も見いだされた。これらの複雑な系統地理学パターンを統合的に理解するためには、種の形成史を分布域全域に拡げて解明する必要がある。

本研究で開発し、運用を開始したデータベース GEDIMAP を基盤に、今後、データの蓄積や集約を促進することにより、各研究投資が有効に累積され、遺伝的多様性をベースにした生物多様性の歴史的な理解につながるものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Watanabe, K., N. Kanagawa, R. Kakioka, T. Itai and S. Mori. In press. Genetic diversity and conservation units in wild and captive populations of endangered freshwater fishes: a case of *Hemigrammocypris rasborella* in Shizuoka, Japan. *Ichthyol. Res.*, 56. 査読有
- ② Kakioka, R., K. Watanabe, H. Takeshima, M. Nishida. 2009. Isolation and characterization of 12 microsatellite loci for cross-species amplification in the cyprinid gudgeons *Squalidus chankaensis* and *S. japonicus*. *Mol. Ecol. Resources*. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02584.x. 査読有
- ③ Tominaga, K., K. Watanabe, R. Kakioka, S. Mori, S.-R. Jeon. 2009. Two highly divergent mitochondrial DNA lineages within *Pseudogobio esocinus* populations in central Honshu, Japan. *Ichthyol. Res.*, 56: 195-199. 査読有
- ④ Fujita, S., T. Komiya, H. Takeshima, K. Watanabe and M. Nishida. 2008. Isolation and characterization of 15 microsatellite loci for the Japanese gudgeon *Sarcocheilichthys variegatus*. *Mol. Ecol. Resources*, 8: 1335-1337. 査読有
- ⑤ Kubota, H., K. Watanabe, Y. Kakehi and S. Watanabe. 2008. An assessment of genetic diversity in wild and captive populations of endangered Japanese bitterling *Tanakia tanago* (Cyprinidae) using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Fish. Sci.*, 74: 494-502. 査読有
- ⑥ Sato, T., K. Watanabe, M. Arizono, S. Mori, M. Nagoshi and Y. Harada. 2008. Intergeneric hybridization between sympatric Japanese charr and red-spotted masu salmon in a small Japanese mountain stream. *North Amer. J. Fish. Manag.*, 28: 547-556. 査読有
- ⑦ Watanabe, K. and S. Mori. 2008. Comparison of genetic population structure between two cyprinids, *Hemigrammocypris rasborella* and *Pseudorasbora pumila* subsp., in the Ise Bay basin, central Honshu, Japan. *Ichthyol. Res.*, 55: 309-320. 査読有
- ⑧ Watanabe, K., H. Takeshima, A. Iwata, T. Abe, K. Uehara, R. Kakioka, D. Kihira and M. Nishida. 2008. Isolation and characterisation of 39 microsatellite loci in the endangered Japanese loach *Leptobotia curta*. *Mol. Ecol. Resources*: 8, 145-148. 査読有
- ⑨ Ma, G.-C., K. Watanabe, H.-S. Tsao, and H.-T. Yu. 2006. Mitochondrial phylogeny reveals the exotic origin of the pale chub *Zacco platypus* (Cyprinidae) in Taiwan. *Ichthyol. Res.*, 53: 323-329. 査読有
- ⑩ Iwata, H., K. Watanabe, H. Takeshima, K. Iguchi and M. Nishida. 2006. Isolation and characterization of 49 polymorphic microsatellite loci in the ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Mol. Ecol. Notes*, 6: 1076-1079. 査読有
- ⑪ 渡辺勝敏・高橋 洋・北村晃寿・横山良太・北川忠生・武島弘彦・佐藤俊平・山本祥一郎・竹花佑介・向井貴彦・大原健一・井口恵一朗. 2006. 日本産淡水魚類の分布域形成史: 系統地理学的アプローチとその展望 (総説). *魚類学雑誌*, 53: 1-38. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① 小宮竹史・藤田彩理・渡辺勝敏. 2009 (3/19). 現在進行形の適応的種形成: 琵琶湖固有魚類におけるケーススタディ. 第 56 回日本生態学会 (岩手県立大学, 盛岡).
- ② 渡辺勝敏・小宮竹史・柿岡諒・富永浩史・高橋洋・森誠一. 2008 (9/22). 西日本の

- 純淡水魚類相の形成史を解明するための課題とアプローチ. 第41回日本魚類学会年会(愛媛大学, 松山).
- ③ 柿岡諒・渡辺勝敏・森誠一. 2008(9/22). コイ科スゴモロコ属魚類で過去に起きた交雑によるミトコンドリアDNAの置換. 第41回日本魚類学会年会(愛媛大学, 松山).
- ④ 富永浩史・中島淳・渡辺勝敏. 2008(9/22). ミトコンドリアおよび核DNAから示唆された西日本のカマツカにおける隠蔽種. 第41回日本魚類学会年会(愛媛大学, 松山).
- ⑤ 渡辺勝敏・鹿野雄一・高橋洋・柿岡諒. 2008(3/15-17). 日本産淡水魚類の遺伝的多様性データベースと網羅的系統地理解析の展望. 第55回日本生態学会(福岡国際会議場, 福岡).
- ⑥ 柿岡諒・小宮竹史・渡辺勝敏. 2008(3/15-17). コイ科魚類スゴモロコの移植集団における形態変化と集団遺伝学的特性. 第55回日本生態学会(福岡国際会議場, 福岡).
- ⑦ Kakioka, R., T. Komiya and K. Watanabe. 2008(3/3-4). Genetic and morphological variation of *Squalidus chankaensis* (Cyprinidae) between lacustrine and fluvial populations around Lake Biwa. Commemoration of the 130th Anniversary of the National Museum of Nature and Science: International Symposium on Systematics and Diversity of Fishes (National Museum of Nature and Science, Tokyo).
- ⑧ Komiya, T., K. Watanabe and M. Hori. 2008(3/3-4). Evolutionary history of endemic *Sarcocheilichthys* fishes (Cyprinidae) in Lake Biwa: An example of ecological divergence and speciation associated with novel environments in the growing lake. Commemoration of the 130th Anniversary of the National Museum of Nature and Science: International Symposium on Systematics and Diversity of Fishes (National Museum of Nature and Science, Tokyo).
- ⑨ Watanabe, K., Y. Kano, H. Takahashi and R. Kakioka. 2008(3/3-4). A strategy for exhaustive phylogeographic analyses of Japanese freshwater fishes, using GEDIMAP, a database for mtDNA genetic diversity. Commemoration of the 130th Anniversary of the National Museum of Nature and Science: International Symposium on Systematics and Diversity of Fishes (National Museum of Nature and Science, Tokyo).
- ⑩ 柿岡諒・渡辺勝敏・森誠一. 2007(10/7-8). コイ科スゴモロコ類とデメモロコの形態

- 変異と遺伝的集団構造. 第40回日本魚類学会年会(北海道大学, 札幌).
- ⑪ 中川光・渡辺勝敏・石川孝典・関伸吾. 2007(10/7-8). ミトコンドリアDNA塩基配列分析に基づくアカザ *Liobagrus reini* の遺伝的集団構造. 第40回日本魚類学会年会(北海道大学, 札幌).
- ⑫ 小宮竹史・渡辺勝敏. 2007(10/7-8). コイ科ヒガイ属にみる琵琶湖固有魚類の種形成メカニズム. 第40回日本魚類学会年会(北海道大学, 札幌).
- ⑬ 渡辺勝敏・鹿野雄一・高橋洋・柿岡諒. 2007(10/7). GEDIMAP: 日本産淡水魚類の遺伝的多様性データベース. 第40回日本魚類学会年会(北海道大学, 札幌).
- ⑭ 渡辺勝敏・富永浩史・柿岡諒・森誠一. 2007(10/7). 本州中部のカマツカにおける大きく分化したmtDNAの集団内多型. 第40回日本魚類学会年会(北海道大学, 札幌).
- ⑮ 渡辺勝敏・柿岡諒・森誠一. 2006(10/9). 伊勢湾-琵琶湖-淀川流域における淡水魚類の比較系統地理. 第39回日本魚類学会年会(グランシップ, 静岡)

[図書] (計1件)

- ① 渡辺勝敏・前川光司. 2008. 日本列島の形成と淡水魚類相の成立過程-陸域の長周期変動. 沢田健・綿貫豊・西弘嗣・枅内新・馬渡俊輔編, pp. 117-150. 地球の変動と生物進化, 新・自然史科学 II. 北海道大学出版会, 札幌.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

公開データベース

「淡水魚遺伝的多様性データベース GEDIMAP」

<http://gedimap.zool.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 勝敏 (WATANABE KATSUTOSHI)
京都大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 00324955

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし