

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20405013

研究課題名（和文） 流水性種からみたボルネオ産両生類多様性の起源

研究課題名（英文） Origin of Bornean amphibian diversity viewed from lotic breeders

研究代表者

松井 正文（MATSUI MASAFUMI）

京都大学大学院人間・環境学研究科・教授

研究者番号：40101240

研究成果の概要（和文）：流水性種からみたボルネオ産両生類多様性の起源を探るため、マレーシア領のマレー半島とボルネオ島のサラワク州において野外調査を行い、得られた標本や組織サンプルから形態・音声・分子に基づく系統分類学的な解析を行った結果、ボルネオの両生類ファウナは高度の固有性をもち、極めて古い時代に周辺地域から孤立して独特の進化を遂げたこと、マレー半島の両生類相の固有性が高いことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify the origin of amphibian diversity in Borneo, lotic-breeding species were collected from Malay Peninsula and Borneo. Morphological, acoustic, and molecular phylogenetic analyses of these samples revealed that the Bornean amphibian fauna is highly endemic as a result of unique evolution through very long separation from adjacent areas, and that amphibian fauna of Malay Peninsula is also more highly endemic than has been considered.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20年度	2,100,000	630,000	2,730,000
21年度	1,900,000	570,000	2,470,000
22年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	6,000,000	1,800,000	7,800,000

研究分野：生物多様性・分類

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：両生類、ボルネオ、多様性、起源

1. 研究開始当初の背景

□東南アジアを代表するボルネオ島は、南アジアのスリランカと並ぶ、アジアにおける両生類多様性のホットスポットである。ボルネオ島のうち、マレーシア領サバ州・サラワク州は、両生類に関するインベントリー調査が東南アジアで最も進んでいる。

研究代表者は系統解析上の主役となる遺伝生化学的手法に関して、過去20年以上にわ

たる経験をもち、東南アジア産のみならず、日本と北東アジア産の両生類の分子系統学的研究成果を多数発表してきたが、ボルネオ島での両生類インベントリーを再調査し、その際にも、遺伝学的情報は種同定の際に大きな威力を発揮し、隠蔽種の存在の検出を導くことを確認していた。

2. 研究の目的

本研究では、その基盤を活かしながら、東南アジア全体における両生類の進化過程解明の一環として、進化的、生物地理学的に特筆すべき、流水産卵性の数属について、ボルネオ島産と周辺地域産との遺伝レベルでの多様性の異同を解析することとした。

研究代表者はこれまでの経験から、豊かな多様性を構成する両生類の中でも、進化的、生物地理学的に特筆すべきものは、コオロギヒキガエル属、ウデナガガエル属、ハヤセガエル属など、流水産卵性の要素であると考えた。

そこで、ボルネオ島における両生類相成立の歴史を明らかにするうえでの鍵となる、流水産卵性要素の系統進化を解き明かそうと計画し、研究課題とした。ボルネオ島のうち、マレーシア領サバ州の流水産卵性要素については、科学研究費補助金を受け、2005年度までに研究代表者らが行った両生類多様性インベントリー再調査の際に、かなりの資料が得られているので、それとの比較のために、これらの要素の近縁群が分布するタイ西南部から、マレー半島、ボルネオ島ではサラワク州という、周辺地域が重要となっていた。従って、本研究の舞台は、ボルネオ島サバ州よりも、むしろこの島の両生類相成立に大きく影響したはずの、これら周辺地域を主体とした。

3. 研究の方法

平成20年度から3年間にわたって、主に、マレーシア領のマレー半島とサラワク州において、現地研究機関、研究者の支援を受けながら、野外調査を行った。その過程で得られた資料と、過去の海外調査によってすでに集積されている他地域（ボルネオ島のサバ州、タイ、インドネシア）産の資料とを用いて、標本の形態解析、鳴き声の解析、組織サンプルを用いた系統遺伝学的解析を行いつつある。これまでに以下の成果が得られている。

4. 研究成果

(1) コノハガエル科 Megophryidae に関しては、まずウデナガガエル属 *Leptobrachium* の各種の標本を山地溪流において採集した。この属の種は比較的緩やかな流水で繁殖する種から成る。すでに集積されている中国、インドシナ、タイ、インドネシア産の標本（ヒゲガエル属 *Vibrissaphora* とされる種を含む）を加えた30分類群について、ミトコンドリアDNA (12S rRNA, tRNA^{val}, 16S rRNA) の塩基配列を調べ、MP法、ML法、Bayes法を用いて分子系統解析を行った。その結果、ウデナガガエル属の単系統性はよく支持され、内部に2

主要群が認められた。その1つはボルネオ、マレー半島とジャワ、タイの3地域に分断分布する3つのクレードを含んでいた。ボルネオ産のクレードにはフィリピン、スマトラ産各1種も含まれた。第2の主要群はインドシナと中国南部（ヒゲガエル属）から成っていた。分岐年代を推定したところ、それぞれの群は東南アジア陸塊の地史からは説明できない古い歴史をもつことが示唆された (Matsui et al., 2010d)。

この研究によって、ボルネオ島固有の種は近隣のフィリピン産と姉妹関係にあること、それらとマレー半島やジャワ産との分断の歴史は古いこと、複数の未記載の隠蔽種を含むことが示唆された。そこで、ボルネオ島固有のウデナガガエル属について、詳細な系統関係をミトコンドリアDNAの塩基配列を用いて解析したところ、現行の分類体系に大きな問題のあることが分かった。その結果について、現在専門誌に投稿中である。

(2) 同じくコノハガエル科のホソウデナガガエル属 *Leptolalax* は、ウデナガガエル属にくらべ、より源流域に近い細流、より急流で繁殖し、幼生は砂礫の間で生活する傾向が強い。まず、鳴き声と形態的特徴に基づき、マレー半島のキャメロンハイランドから、新種 *L. kecil* を記載した。この種の広告音は同属の他種とはまったく異なり、体は最小の大きさである。小型であることはベトナム産の *L. pluvialis* に似るが、腹の色、胸部の腺の色と大きさがまったく異なる。この種の分布域は極めて限られていると思われる (Matsui et al., 2009a)。それに対し、タイ南部のマレーシア国境近くで採集された1個体に基づいて記載された本属の1種 *L. solus* が、半島南部のマレーシア領に広く生息していることも音声学的、形態学的、分子系統学的な手法から明らかになった。

この属について、ボルネオからマレー半島、インドシナ、中国南部までを含む多くの地点からのサンプルを入手し、同じく分子系統解析を行った結果、ボルネオ島産の諸種は半島や大陸産とは完全に独立の単系統群を成すこと、複数の未記載の隠蔽種が存在することが確認されている。その成果の一部はすでに何度か学会発表し、現在投稿準備中である。

(3) ヒキガエル科 Bufonidae のコオロギヒキガエル属は山地の急流で繁殖し、幼生は巨大な口器をもつ。ごく一部が低地にも分布するが、やはり幼生には特殊化が見られる。この属の系統関係と種分化、多様化の進化史を探るために、記載種、未記載種を含む32分類群についてミトコンドリアDNA (12S rRNA, tRNA^{val}, 16S rRNA) の塩基配列を調べ、MP法、ML法、Bayes法を用いて分子系統解析を行っ

た。その結果、この属の単系統性はよく支持され、生物地理学的推測が可能となった。この属は2主要群から成る。その1つは互いに姉妹関係にあるマレー半島およびタイ産の単系統群と、ボルネオ産の単系統群とを含んでいた。もう1つの主要群は主にボルネオ産から成り、それにフィリピン産2種とマレー半島産1種が含まれていた。東南アジア域の主要な陸塊間の動物相の交流の相対的な年代を構築するために、Bayes法を用いて分化年代を推定した。その結果、マレー半島とボルネオ島との分岐は極めて古いだけでなく、マレー半島内部での分化も古い時代に始まったこと、ボルネオからフィリピンへの分散も古い時代に生じたことが推定され、地域間での侵入や分散の歴史には、山地急流を必要とする生態的要因が深く関わっていることが推定された (Matsui et al., 2010a)。

また、本研究の過程で、これまで知られていなかった本属の繁殖習性の一端を明らかにすることができた。すなわち、サラワク州の一部の溪流で未知のカエル類の卵塊を発見し、飼育およびDNA鑑別によって、これが *A. leptopus* であることを確認した。これは本属の卵の野外における最初の確認例となる。

(4) アカガエル科 Ranidae のボルネオハヤセガエル属 *Meristogenys* は、たぶん、流水生活に最も適応したカエル類で、山地溪流で繁殖し、幼生はコオロギヒキガエル属と同様の巨大な口器に加え、腹部に大きな吸盤をもって岩石に吸着する。この属のカエルはボルネオ島特産で、山地には普通に見られるが、分類学的には知られる幼生の種類数よりも、記載された成体の種数が少ないという大きな問題があった。しかし、本研究によって、この問題のかなりの部分が解決された。

まず、これまで単一種とされてきたサバ州およびカリマンタン (インドネシア) 産の *M. amoropalamus* について、ミトコンドリア DNA (12S rRNA と cytochrome b) の 909 bp の配列を調べたところ、その中には、同所的に分布する3独立系統が存在することが分かった。これらの中に繁殖隔離があるかどうかを確認するために、まず核 DNA の POMC 遺伝子の 249-bp を解析したところ、5つのハプロタイプが確認された。そのうち2つは系統1に限られ、3つは系統3と4に見られた。それに続く核 DNA の POMC, Rag-1, rhodopsin 遺伝子の 1313-bp の解析でも系統1は独特だったが、系統3と4は区別できなかった。核遺伝子の解析結果は、系統3と4間には繁殖隔離がないが、系統1はこれらから強く繁殖隔離されていることを示唆する。この結論は幼生の形態から得られた区分と一致するものである。これらの結果から、成体の形態

から *M. amoropalamus* と同定されるカエルは同所的な2種に区分されるべきであり、そのうち1種は深い一体化によって維持されている2つのミトコンドリア系統を含むと考えられる (Shimada et al., 2008)。

次いで、形態学的解析結果に基づき、1新種をボルネオ島サバ州西部のクロッカー山脈から記載した。この新種 *M. maryatiae* は同属他種から、体が小型で体長はオスで 31-37 mm、メスで 65-66 mm であること、頭部は幅より長さが大きいこと、眼は中型で吻長に等しいこと、虹彩は単色であること、脛部腹面に色素が沈着しないこと、大腿後部に黒色とクリーム色の斑紋があること、水かきは完全に発達していること、外シヨ隆起をもつこと、幼生の歯式が 7(4-7)/6(1) であることによって区別される (Matsui et al., 2010c)。

さらにサバ州とサラワク州産の *Meristogenys. whiteheadi* について、分子および、成体と幼生の形態学的な変異の調査を行った結果、この種には異所的に分布する3つの系列を認めた。これらは単系統群をなさず、互いに大きな遺伝距離をもって区分されることからそれぞれは独立種と考えられた。形態的特徴から、狭義の *M. whiteheadi* の分布範囲は、サバ州のキナバル山域とサラワク州北部の2地域に分断されていることが示唆された。他の2系列は *M. whiteheadi* の分布域の間を占める未記載の隠蔽種と考えられる。そのうちの1新種 *M. stigmachilus* はクロッカー山脈の北部から得られ、上唇に黒斑があり、背中に濃い斑点があることで *M. whiteheadi* と区別される。第2の新種 *M. stenocephalus* は主にクロッカー山脈の南部から得られたもので、オスの体が大きいことと、頭幅が狭いことで特徴づけられる。*M. stenocephalus* はまた、幼生の形態でも他の2種から区別できるが、*M. stigmachilus* と *M. whiteheadi* の幼生は形態的な区別が難しい。ボルネオハヤセガエル属で識別形質とされる脛長の相対長と、体サイズと性的二型との関係についても議論を行った (Shimada et al., 2011a)。

(5) ヌマガエル科 Dicroglossidae で現在クールガエル *Limnonectes kuhlii* とされているカエル類の分類は完全に混乱している。これまでの形態、音声、分子系統解析の結果から、ボルネオ産の個体群には多数の隠蔽種の含まれることが明らかであるが、問題は複雑で結論を得るに至っていない。

これまでに解析が終わっているのはタイ産のカエル類についてである。ミトコンドリア DNA の 12S rRNA, tRNA^{val}, 16S rRNA 遺伝子および、核 DNA の POMC, RAG-1 遺伝子の塩基配列から系統関係を解析したところ、クール

ガエルとされてきたタイ産のカエル類は単系統群を成し、中国産と日本産の3種を含む群と姉妹群を成した。タイ産の群の中には、北部系統、南部系統、*L. megastomias* とされてきた系統が認められたが、それらの関係は不明であった。一方、これらは中国産と日本産の種間で認められるのと同等の遺伝距離で分離され、それらの間で交雑や過去の遺伝子浸透のあった証拠は認められなかった。北部系統と南部系統の成体は形態的によく似ているが、いくつかの計量形質の組み合わせで区別される。遺伝および形態的証拠から、それらは分類学的に別の種と判断されるので、北部系統を *L. taylori*、南部系統を *L. jarujini* として新種記載した。*L. megastomias* のローエイ産個体群は形態的に調査する必要がある。これらクールガエル類似種のタイにおける分布成立の問題を論じ、Three Pagodas Fault Zone が重要であることを初めて指摘した (Matsui et al., 2010e)。

(6) 無足目ヌメアシナシイモリ科のアシナシイモリ類の多くは、流水近くの湧水で繁殖し、幼生の一部は溪流中で見られる。今回の調査で得られた標本を中心とする東南アジア産ヌメアシナシイモリ科の系統関係を、ミトコンドリア DNA の 12SrRNA、16SrRNA、Cyt b 領域の合計 3843bp を用いて、最尤法およびベイズ法で推定した。その結果、東南アジア産の種は大きく2つの系統に分けられた。その1つはインドシナ、マレー半島、ジャワに分布しており、もう1つはボルネオとマレー半島に分布していた。このような分化パターンの形成には、スンダ地域の地史が影響していることが推測されるので、今後スマトラやフィリピンなどのサンプルを追加する必要がある。ボルネオ産のサンプルは、マレーシア領のサバ州と、サラワク州の一部という狭い範囲から採集されたものであるにも関わらず、きわめて大きな分化を遂げており、2地点では同所的に3種が生息していた。サラワク州のクバ国立公園で採集された2種のアシナシイモリのうち1種は1965年に記載されて以来、初めて採集された個体である可能性が高い。マレー半島部でも複数種が同所的に生息しており、東南アジアにはまだまだ、多くの未記載種が存在することは明らかで、分子系統解析とともに形態的調査が必要であるが、得られた成体の個体数が少ないので、今後さらに調査を進める必要が残されている。

(7) 上記流水種の解析に加えて、それらとは対照的に止水で繁殖する数系統についても調査を開始している。サラワク州のクバ国立公園から新種として報道されたカエルが既知のボルネオヒメアマガエル *Microhyala*

borneensis であり、同種とされていた大形の種が新種であることを確認し、記載した (Matsui, 2011)。2010年の夏に Das と Haas は、「旧世界最小のカエルがウツボカズラの壺から飛び出す」というタイトルのもとに、ボルネオ島サラワク州から新種のヒメアマガエル *M. nepenthicola* を発見したと報じた。この「発見」はマスコミに大々的に取り上げられたが、彼らが記載した新種のもつ、体が小さく、みずかきの発達が悪く、吻が短く丸まっているという特徴のすべては、1998年に科学研究費補助金の援助によって、英国自然史博物館で確認されたボルネオヒメアマガエル *M. borneensis* のホロタイプと完全に一致する。このことから、これら2者は同種で、*M. nepenthicola* なる名称は *M. borneensis* の新参異名であることは間違いない。ボルネオヒメアマガエルがウツボカズラの壺の中で繁殖することも古くから知られていた事実で、科学研究費補助金の海外調査により、1989年以来観察してきたことである。Das と Haas はこの種と同地的に生息する、より大形の種を *M. borneensis* としたが、これは明らかに誤りである。この大形種には適用できる名称がないので *M. malang* の名で新種記載した。*M. malang* は *M. borneensis* と姉妹関係にあり、両者のなす単系統群はマレー半島産の *M. mantheyi* と姉妹群をなした。Das と Haas は *M. nepenthicola* (= *M. borneensis*) を旧世界最小としたが、これも誤りでヒメアマガエル科の数属でより小型の種が報告されている。また Das と Haas は *M. nepenthicola* (= *M. borneensis*) の第1指の退化傾向をウツボカズラ中での繁殖と関連させて論じたが、同様に壺で繁殖するのに指の退化が見られない種、第1指が退化しているが池や水たまりで繁殖する種もいるから、これも正しくない可能性が高い。

(8) これら3年にわたる流水性種の研究成果から、ボルネオの両生類相は高度の固有性をもつことが明らかとなった。コオロギヒキガエル属の2主要群、マレー半島およびタイ産の単系統群と、ボルネオ産の単系統群と、主にボルネオ産でフィリピン産2種とマレー半島産1種を含む群との分岐は、4950万年前以前、マレー半島およびタイ産と、ボルネオ産の単系統群との分岐も4260万年前以前という極めて古い時代と推定された。また、ウデナガガエル属でも、ボルネオ固有種、フィリピン、スマトラを含む系統と、マレー半島とジャワを含む系統の分岐は2250万年前以前という推定がなされ、どの系統のカエル類でも、極めて古い時代に周辺地域から孤立した独特の進化の生じたことが示された。残念ながら、そうした時代に関する地史的証拠は得られておらず、今後の地質学における成果

を待つしかない。他方、これまで無視されてきた、マレー半島の両生類相の固有性の高さも明らかになり、通説となっているクラ地峡の成立等よりも古い時代に半島南北の両生類相の分断の生じたことが示唆された。流水性種で得られた傾向が、止水性種ではどうなっているのかを調査し、結果を総合することによってボルネオやマレー半島の両生類成立史を推定していくことができるであろう。

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 10 件)

- ① Shimada, T., M. Matsui 他 3 名, Detection of two cryptic taxa in *Meristogenys amoropalamus* (Amphibia, Ranidae) through nuclear and mitochondrial DNA analyses, *Zootaxa*, 査読有、1843 巻、2008、24-34
- ② Matsui, M., Belabut, D. M 他 2 名, A new species of *Leptolalax* (Amphibia, Anura, Megophryidae) from Peninsular Malaysia, *Zool. Sci.*, 査読有、26 巻、2009a、243-247
- ③ Matsui, M., A new species of *Philautus* (Amphibia, Anura, Rhacophoridae) from the lowland of Sarawak, western Borneo, *Zool. Sci.*, 査読有、26 巻、2009b、437-442
- ④ Matsui, M., A. Tominaga 他 9 名、Phylogenetic relationships of *Ansonia* from Southeast Asia inferred from mitochondrial DNA sequences: Systematic and biogeographic implications (Anura: Bufonidae), *Mol. Phyl. Evol.*, 査読有、54 巻、2010a、561-570
- ⑤ Matsui, M., T. Shimada, A. Sudin, A new species of *Meristogenys* from Sabah, Borneo (Amphibia, Anura, Ranidae), *Zool. Sci.*, 査読有、27 巻、2010c、61-66
- ⑥ Matsui, M., A. Hamidy 他 7 名、Phylogenetic relationships of megophryid frogs of the genus *Leptobrachium* (Amphibia, Anura) as revealed by mtDNA gene sequences, *Mol. Phyl. Evol.*, 査読有、56 巻、2010d、259-272
- ⑦ Matsui, M., S. Panha 他 2 名, Two new species of the “*kuhlii*” complex of the genus *Limnectes* from Thailand (Anura: Dicroglossidae), *Zootaxa*, 査読有、2615 巻、2010e、1-22
- ⑧ Shimada, T., M. Matsui 他 2 名, A taxonomic study of Whitehead’s torrent frog, *Meristogenys whiteheadi*, with descriptions of two new species (Amphibia: Ranidae), *Zool. J. Linn. Soc.*, 査読有、161 巻、2011a、157-183
- ⑨ Matsui, M., Taxonomic revision of one

of the Old World’s smallest frogs, with description of a new Bornean *Microhyla* (Amphibia, Microhylidae), *Zootaxa*, 査読有、2814 巻、2011、33-49

⑩ Shimada, T., M. Matsui 他 2 名, A survey of morphological variation in adult *Meristogenys amoropalamus*, with a description of a new cryptic species (Amphibia, Anura, Ranidae), *Zootaxa*, 査読有、2011b、印刷中

[学会発表] (計 8 件)

- ① 松井正文・ダイクス=ベラブート他 4 名、マレー半島産ホソウデナガガエル属について、第 47 回日本爬虫両棲類学会、平成 20 年 10 月 26 日、栃木県総合教育センター
- ② 松井正文・富永篤他 2 名、マレー半島産流水産卵性両棲類：高度の固有性とスンダ列島産との系統的独立性、日本生物地理学会、平成 21 年 4 月 4 日、立教大学
- ③ アミール=ハミディ・松井正文、東南アジア産ウデナガガエル属の系統関係、第 48 回日本爬虫両棲類学会、平成 21 年 11 月 8 日、天理大学
- ④ 松井正文、種の多様性と絶滅危機～日本とマレーシア、生き物文化誌学会、平成 22 年 6 月 13 日、軽井沢町万平ホテル
- ⑤ 松井正文・アミール=ハミディ・西川完途、マレー半島産チョボグチガエル属について、第 81 回日本動物学会、平成 22 年 9 月 25 日、東京大学教養学部
- ⑥ 松井正文・西川完途 他 2 名、マレー半島産チョボグチガエル属について、第 49 回日本爬虫両棲類学会、平成 22 年 10 月 9 日、慶応大学
- ⑦ 西川完途・松井正文 他 8 名、東南アジア産ヌメアシナシイモリ科の分子系統関係、第 49 回日本爬虫両棲類学会、平成 22 年 10 月 9 日、慶応大学
- ⑧ アミール=ハミディ・松井正文、ボルネオ産のウデナガガエル属について、第 49 回日本爬虫両棲類学会、平成 22 年 10 月 9 日、慶応大学

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://zoo.zool.kyoto-u.ac.jp/~hynobius/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 正文 (MATSUI MASAFUMI)

京都大学大学院・人間・環境学研究科・教授

研究者番号：40101240

(2) 研究分担者

西川 完途 (NISHIKAWA KANTO)

京都大学大学院・人間・環境学研究科・助教

研究者番号：10335292