

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 13 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770087

研究課題名（和文）日本産イモリ属の多様性評価と個体群分類のための分子遺伝学的研究

研究課題名（英文）Molecular analysis for evaluation of genetic diversity and taxonomic relationships among populations of Japanese newts

研究代表者

富永 篤（TOMINAGA ATSUSHI）

琉球大学・教育学部・准教授

研究者番号：60452968

研究成果の概要（和文）：アカハライモリの遺伝的分化について、全国的な調査を行い、mtDNAの結果から、本種は大きく4つの系統に区分されること、核DNAの結果でも東日本系統の独自瀬が認められることを明らかにした。また次世代シーケンサーを用いたマイクロサテライトマーカーの開発を行い、遺伝集団間の境界領域での遺伝的交流の実態把握を進めた。その結果、遺伝集団間に急激な対立遺伝子頻度の違いが見られ、アカハライモリには複数の種が含まれることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We investigated the phylogenetic relationships and estimated the historical demography of the Japanese fire-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*, from Japanese mainlands using 1407-bp sequences of the mitochondrial DNA (NADH6, tRNAglu, cyt b) and 1208-bp sequences of nuclear DNA (Rag-1) genes. Phylogenetic trees based on mitochondrial DNA revealed four major clades (NORTHERN, CENTRAL, WESTERN, and SOUTHERN clades) within this species. Nuclear gene presented no obvious patterns of geographic structure except for the NORTHERN clade, suggesting results of incomplete lineage sorting. We developed 15 novel microsatellite markers for *C. pyrrhogaster* using next generation sequencer. Genetic survey using these markers around a boundary region revealed allele frequencies of CENTRAL clade differ from those of WESTERN clade, suggesting these clades reproductively isolated from each other.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

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：分子系統地理

1. 研究開始当初の背景

日本産有尾目には、オオサンショウウオ科

の1種、サンショウウオ科の19種、イモリ科の3種が含まれ、そのうち1種を除くすべ

てが固有種である。こうした日本の有尾類の種の多様性、固有性は世界的にみても特異であり、日本の生物相の形成史を調べていく上でも、生物多様性の観点からも貴重な動物群といえる。

この仲間の多様性研究は古くから行われてきたが (Sato, 1943)、最近でも隠蔽種の発見が報告されていることからわかるとおり (Nishikawa et al., 2001; Tominaga et al., 2003)、その多様性の実態把握はいまだ中途段階にある。近年の有尾類研究の国内外の動向を見ると、遺伝学的調査手法の発達に伴い、個体群間の類縁関係の詳細が飛躍的な勢いで明らかになりつつある (Matsui et al., 2007a, b)。

日本産のイモリ属 (*Cynops*) にはアカハライモリとシリケンイモリの 2 種が含まれ、前者が青森から鹿児島までの日本本土に広く分布するのに対し、後者は奄美諸島と沖縄諸島の琉球列島にのみ分布する。先行研究からアカハライモリは繁殖行動と形態から 6 種族に (Kawamura and Sawada, 1959; Sawada, 1963a, b)、アロザイムの解析結果から 5 集団に分けられ (Hayashi and Matsui, 1988, 1992)、シリケンイモリも形態変異 (Inger, 1947)、アロザイム変異 (Hayashi and Matsui, 1988) に基づき、奄美と沖縄の個体群を別亜種とする考えが報告されている。アカハライモリでは種内の地域集団間に精包の受け渡し時の繁殖行動の違いによる様々な程度の交配前隔離が見られることも報告されており (Sawada, 1963 b)、実際には複数の種が含まれる可能性が高い。ただ、こうした種族・集団の地理的輪郭は用いるデータ (マーカー) の種類によって少なからず異なる上、これらの系統関係は明らかになっておらず、イモリ属の多様化のプロセスの詳細は不明であった。

2. 研究の目的

そこで、本研究ではイモリ属の遺伝的分化をマイクロサテライトマーカー、mtDNA マーカーの 2 つのマーカーで調査し、この仲間の多様化の過程を探り、生物の種分化のプロセスをより深く理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 両種についての全国的な標本収集はかなり進んでいたが、アカハライモリの標本が不足している東北地方南部、関東地方、中部地方での標本収集を行った。

得られたサンプルのミトコンドリア DNA の塩基配列を解読し、系統解析を行い、各系統の大まかな地理的分布を把握した。

(2) 得られた各系統の分布情報を元に境界地域を絞り込み、その地域で更なるサンプリ

ングを重ね、ミトコンドリア DNA、核 DNA の塩基配列を解読し、系統解析を行った。

(3) 系統地理解析で明らかになった分布の境界付近での系統間の遺伝的交流の有無について調査をするために、アカハライモリのマイクロサテライトマーカーを開発した。計画当初は、マグネティックビーズ法を用いてマイクロサテライト領域を含むマイクロサテライトエンリッチライブラリーを作成してからクローニングすることで、効率的にマイクロサテライト領域周辺の DNA 塩基配列を決定する予定であったが、この手法では、効率的なマーカーの開発が難しかったために、次世代シーケンサーを利用したマーカーの作成を行った。

(4) 作成されたマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝系統間の分布境界付近での遺伝的交流について調査した。

4. 研究成果

分布調査、ミトコンドリア DNA の系統地理解析の結果から、日本本土のアカハライモリでは東北から関東に分布する東日本系統がまず分かれ、次に中部から北陸、近畿の大部分、中国地方東部にかけて分布する中部日本系統が分かれた。残りの西南日本のアカハライモリは、紀伊半島沿岸部、中国地方西部、四国、九州北中部にかけて分布する西日本系統と、西九州と南九州に分布する南日本系統に分かれた。琉球列島のシリケンイモリは奄美諸島の奄美系統と、沖縄諸島の沖縄系統に分かれ、後者はさらに沖縄島北部で分布域を重ねる 2 亜群に分かれた。

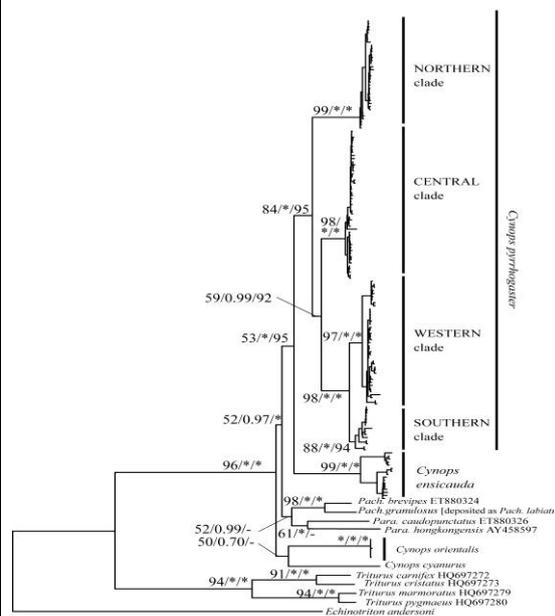


図 1. ミトコンドリア DNA に基づく分子系統樹

アカハライモリの東日本群は、アロザイム、形態、配偶行動で区分される東北集団と関東集団を含むが、ミトコンドリア DNA では2集団は区分できず、東日本系統内全体での遺伝的分化の程度も低かった。

形態と配偶行動で他から区分され、別亜種とされたこともある近畿北部、中国地方東部の篠山種族の独自性ははっきり認められず、中部日本系統に含まれた。これは篠山種族の形態や行動の分化が急速に進んだ可能性、もしくは、生息地外への放流により本来の地理的な分布パターンが不明慮になっている可能性が考えられる。

アロザイム分析で高い独自性を示す南九州集団は西九州の個体群とともに南日本系統を形成した。九州地方に分布する西日本群と西南九州群の分布は側所的で、後者のほうが遺伝的分化の程度が大きかった。西日本群の多様性は中国地方西部で高く、九州内で低かった。九州内には中国地方西部にも分布する西日本群の一部系統が広く分布していることから、西日本群が中国地方西部から九州に分布拡大したことにより、九州における現在の2群の分布パターンが形成されたものと思われる。

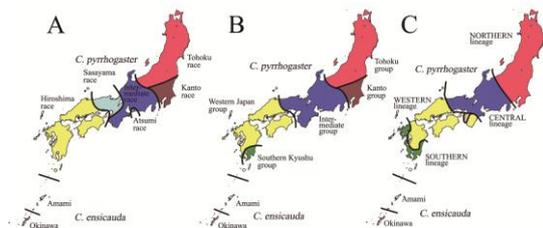


図2. アカハライモリ、シリケンイモリの文化パターン。A:外部形態+配偶行動、B:アロザイム、C:ミトコンドリア DNA。

シリケンイモリの沖縄群内の2亜群は異所的に分化した集団が二次的に分布域を重ねたものと思われるが、補足的に行ったアロザイム分析では2亜群が区別されないことから、現在は一つの任意交配集団を形成していると考えられる。

日本産2種全体では、面積当たりの遺伝的多様性の程度は南の地域集団ほど高い傾向があり、更新世の氷期による寒冷化で、北の地域集団ほど分布域の縮小と個体群サイズの低下による瓶首効果の影響を強く受け、遺伝的な多様性を失ったことが示唆された。

核DNAのrag1遺伝子の配列を元に行った系統解析では、日本産2種が区別され、アカハライモリの内部では東日本系統のみが他から分けられることが明らかとなった。

マイクロサテライトの開発では、実用可能な15以上のマーカーを作成することがで

きた。これらのマーカーを用いた、分布境界での遺伝解析の結果、中部日本系統と西日本系統は、マイクロサテライトマーカーでも区別され、狭い移行帯をはさんで両者の遺伝子頻度が急激に変化することが明らかとなった。

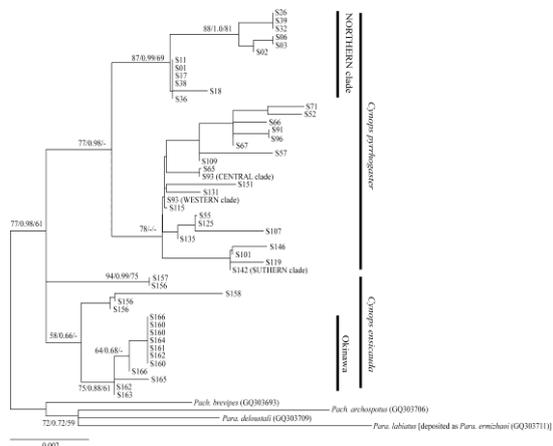


図3. 核DNAに基づく系統樹。

これらの結果から、アカハライモリには少なくとも東日本系統、中部日本系統、西日本系統をそれぞれ形成する3種が含まれることが明らかとなった。西日本系統と南日本系統の分類学的関係は今後マイクロサテライトなどのマーカーを用いて更なる検討を行う必要がある。

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1件)

- ① Tominaga, A., Matsui, M., Yoshikawa, N., Nishikawa, K., Hayashi, T., Misawa, Y., Tanabe, S., Ota, H. 2013. Phylogeny and historical demography of *Cynops pyrrhogaster* (Amphibia: Urodela): taxonomic relationships and distributional changes associated with climatic oscillations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 査読有 Vol.66, pp. 654-667

[学会発表] (計5件)

- ① 富永篤, 松井正文. 九州(西日本)におけるアカハライモリの遺伝的分化. 九州両生爬虫類研究会 第4回大会. 2013年2月9-10日
- ② 富永篤, 松井正文, 吉川夏彦, 西川完途, 林光武. アカハライモリにみられる遺伝的分化. 日本動物学会 第83回大会. 2012年9月13-15日

- ③ Tominaga, A., Matsui, M., Yoshikawa, N., Nishikawa . Phylogeny and historical demography of *Cynops pyrrhogaster* (Amphibia: Urodela). 5th Asian Herpetological Conference. 2012年6月2-3日
- ④ 富永篤、松井正文、吉川夏彦、西川完途、林光武. アカハライモリにみられる遺伝集団とその分布. 日本爬虫両棲類学会 第50回大会. 2011年10月8-10日
- ⑤ 富永篤、松井正文、吉川夏彦、西川完途、林光武. 日本産イモリ属2種の分子系統地理解析. 日本動物分類学会 第47回大会. 2011年6月3日~5日

〔図書〕(計1件)

富永篤. 島の陸棲生物の魅力. 琉球大学編. やわらかい南の学と思想 第5巻. 沖縄タイムス社. 那覇. 2013.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等：
<http://kenkyushadb.lab.u-ryukyu.ac.jp/profile/ja.WC6JJ3jHaZcGESQ5odDdcQ==.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富永篤 (TOMINAGA ATSUSHI)
琉球大学・教育学部・准教授
研究者番号：60452968