

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2005～2008

課題番号：17207007

研究課題名 (和文) コイ目魚類の大系統解明：ミトゲノム分析による国際的イニシアチブの確立

研究課題名 (英文) Resolving higher-level relationships of the Cypriniformes (Teleostei):  
A mitochondrial phylogenomic approach

研究代表者

宮 正樹 (MIYA MASAKI)

千葉県立中央博物館・動物学研究科・上席研究員

研究者番号：30250137

研究成果の概要 (和文)：コイ目魚類は世界の淡水魚の中で最も多様性の高い分類群であり、6科 350 属に分類される約 3500 種を含む。本研究の第一の目的は、この莫大な多様性をもつコイ目魚類の大系統を、ミトコンドリアゲノム全長配列 (約 16,500 塩基対) の比較分析によって網羅的かつ迅速に解明することである。また、並行して解明される他魚種の系統進化とあわせて、魚類の分子系統進化学的研究において国際的イニシアチブを確立することを第二の目的とした。第一の目的は、Saitoh *et al.* (2006) を国際誌 *Journal of Molecular Evolution* に出版することによってその第一段階が達成された。本論文は、コイ目魚類 53 種のミトゲノム全長配列を分析することにより世界に先駆けて本目魚類の高次系統関係を明らかにしただけでなく、わずか 3 年間で 45 件もの被引用数を誇るこの分野の中心的存在となった。また、本研究期間中に 400 種を超えるコイ目魚類のミトゲノム全長配列を決定することができ、現在その比較分析を行っている。第二の目的 (国際的イニシアチブの確立) については、ミトゲノム全長配列の比較分析に基づく一連の研究の被引用件数が 2,000 件を超えたことから、十分に達成されたことが明らかであろう。さらには「深海魚の三つの科が一つに」(Johnson *et al.* 2009)、「メダカの分岐年代」(Setiamarga *et al.* 2009)、「深海起源のウナギ」(Inoue *et al.* 2010) など、最近マスメディアで話題になった一連の研究がいずれも本研究グループから出されたことから、一般社会への還元も積極的かつ十分に行われたといえよう。

研究成果の概要 (英文)：Fishes of the order Cypriniformes are almost completely restricted to freshwaters and number over 3500 species placed in six families, each with poorly-defined subfamilies and/or tribes. The first purpose of this study was to resolve the higher-level relationships of the World's largest freshwater-fish clade based on whole mitochondrial (mt) genome sequences from a number of cypriniforms in a short period of time. This has been accomplished by the new sequencing method developed by Miya *et al.* (2006) and subsequent publication of Saitoh *et al.* (2006). In the latter paper we assembled the mt genome sequences from 56 cypriniforms and analyzed the datasets using the Bayesian method. The resulting phylogenies in Saitoh *et al.* (2006) have had a great impact on the cypriniform systematics, being cited by 45 papers up to now. We have determined over 400 mt genome sequences during this study and are currently constructing a large dataset comprising those mt genome sequences and numerous partial sequences downloaded from the DNA databases. This mixed dataset is called a "mitogenomic supermatrix" and is currently analyzed by a cluster of 4 desktop machines each with 4 CPUs. The second purpose was to gain the initiative in molecular phylogenetics of fishes by publishing a number of papers based on numerous whole mt genome sequences from various groups of fishes. It appears that our mt genomic papers have attracted considerable attention from the scientific community, with being cited over 2,000 scientific papers during these 10 years. Also our outreaches to the public are outstanding, with numerous newspapers and scientific journals having featured our papers, such as Johnson *et al.* (2009) on the whalefish families, Setiamarga *et al.* (2009) on the divergence times of medaka, and Inoue *et al.* (2010) on deep-ocean origin of the freshwater eels.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	19,500,000	5,850,000	25,350,000
2006年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2007年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
総計	38,800,000	11,640,000	50,440,000

## 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・動物・ゲノム・進化・分類学

### 1. 研究開始当初の背景

コイ目魚類は6科350属に含まれる3,400を超える種を含む淡水性魚類の中では最大の多様性をもつクレードである。コイ、ドジョウ、金魚など日本人に馴染み深いものから、ゼブラフィッシュのようなモデル生物まで、その科学的・社会的・産業的重要性は計り知れない。また、南米とオセアニアを除く全世界の大陸に広く分布しているため、大陸移動と関連した生物地理学のモデル生物としても大きな注目を集めてきた。

このように多様で、しかも重要種を数多く含むにもかかわらず、コイ目魚類における大系統研究の進展は滞っていた。実際、魚類分類で認められている科の数はわずか6つにすぎず、ほぼ同じレベルの多様性を有するナマズ目の35科に対して著しく少ない。これは形態に基づく単系統群の認識が困難であることを如実に示しており、大規模な分子データによる大系統解明が待たれていた。

### 2. 研究の目的

本研究は、淡水性魚類最大のクレードであるコイ目魚類の大系統を、ミトコンドリアゲノム全長配列に基づき科・亜科・族・属のレベルで解明することを第一の目的とする。

第二に、コイ目に加えてこれまで蓄積してきた他魚種のミトゲノム全長配列の比較分析に基づき論文を迅速に発表することによって、魚類分子系統学の分野で国際的イニシアチブを確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

研究材料は国際共同研究における海外調査に加えて、独自に企画した海外・国内調査を通じて得た。また、入手が困難なものについては、観賞魚店などを通じて購入した。

試料から市販のキットを用いて全DNAを抽出した。Miya *et al.* (1999) が開発し、Miya *et al.* (2006) がコイ目用に改良した手法によりコイ目魚類のミトゲノム全長配列を決定した。データはすべてDDBJに登録した。

得られた多数の配列を比較分析した後、多重整列を行い、得られたデータ行列に基づき最尤法とベイズ法による系統解析を行った。解析結果をさまざまな角度から検討し、結果の統計的信頼度を求めた。

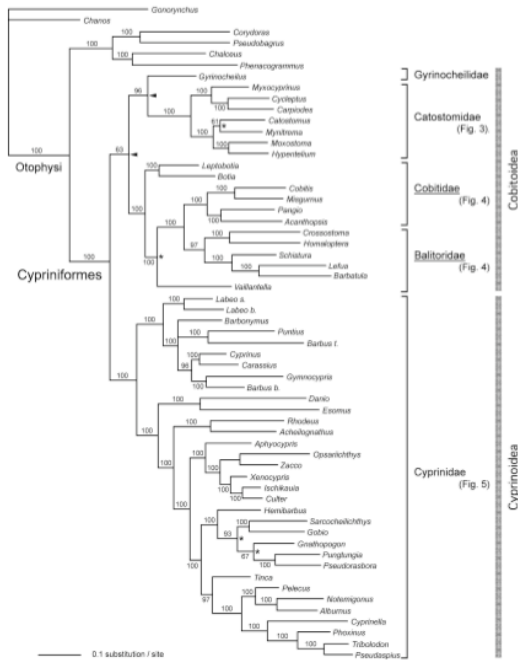
### 4. 研究成果

本研究で行った一連の調査により、世界各国から6科219属923種のコイ目魚類を収集することができた。このうち研究期間内に460種のミトゲノム全長配列を決定した。これは目標とした350種を大幅に上回る数字であると共に、条鰭類全体の既存のコイ目以外のミトゲノム全長配列が598種であることを考えると、コイ目魚類の数字がいかに突出したものであることがわかるであろう。

今回得られたミトゲノム全長配列を比較分析した結果、コイ目魚類ではミトゲノムに遺伝子配置の変動などゲノム構造の再編が起こっていないことが明らかになった。また、ミトゲノムの分子進化速度が全般に遅く、コドンの第三座位にも十分な系統的情報が含まれていることが明らかになった (Saitoh *et al.* 2006)。

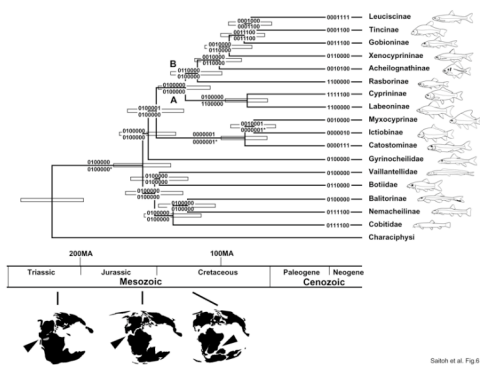
コイ目53種を含むデータ行列に基づきベイズ法による系統解析を行った結果、コドンの第三座位の扱いによってこれまで形態で認識されてきた二つの亜目(コイ亜目・ドジョウ亜目)が再現されたり、されなかったりなど頑健な結果は得られなかった。しかしながら、その内部の系統関係は(既往の仮説とは大きく異なるものの)高い確率で支持される頑健な結果が得られ、それは並行して行わ

れた核遺伝子に基づく解析によっても支持された (Saitoh *et al.* 2006; 下図参照).



これらの結果に基づき、分類群のサンプリングをより密にする戦略がデータのシステムティックなノイズを減少させることにつながると考え、53種から412種にまでデータ行列を増やした。この巨大データに基づき RAxMLを用いた最尤法による予備的解析を行ったところ、コイ目内の科間の関係を解くには分類群のサンプリング密度を高めるだけでは十分でないことが明らかになった。一方、その他の部分では頑健な系統樹が得られ、コイ目魚類の大系統を世界に先駆けて俯瞰することができるようになった。

これら一連の系統解析と並行して、系統樹に時間軸を入れてコイ目魚類の進化史を明らかにする試みを行ってきた。その結果、コイ目が現在考えられているよりはるかに古い起源(2億年前を超える中生代三畳紀)をもつことが明瞭に示され、今後のコイ目魚類の進化的研究の方向性を示すことができた (Saitoh *et al.* 2010; 下図参照)。



## 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 37 件)

- Saitoh, K.**, T. Sado, M.H. Doosey, H.L. Bart, Jr., Jun G. Inoue, R.L. Mayden, **M. Nishida** & **M. Miya**. 2010. Evidence from mitochondrial genomics supports the lower Mesozoic of South Asia as the time and place of basal divergence of cypriniform fishes (Actinopterygii: Ostariophysi). *Zool. J. Linn. Soc.* (In press.)
- Doosey, M.H., H.L. Bart, Jr., **K. Saitoh** & **M. Miya**. 2010. Phylogenetic relationships of catostomid Fishes (Actinopterygii: Cypriniformes) based on mitochondrial ND4/ND5 gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* (In press.)
- Lavoué, S., **M. Miya** & **M. Nishida**. 2010. Mitochondrial phylogenomics of anchovies (family Engraulidae) and recurrent origins of pronounced miniaturization in the order Clupeiformes. *Mol. Phylogenet. Evol.* (In press.)
- Inoue, J.G., **M. Miya**, M.J. Miller, T. Sado, R. Hanel, K. Hatooka, J. Aoyama, Y. Minegishi, **M. Nishida** & K. Tsukamoto. 2010. Deep-ocean origin of the freshwater eels. *Biol. Lett.* (In press.)
- Setiamarga, D.H.E., **M. Miya**, J.G. Inoue, N.B. Ishiguro, K. Mabuchi & **M. Nishida**. 2009. Divergence time of the two regional medaka populations in Japan as a new time scale for comparative genomics of vertebrates. *Biol. Lett.*, 5(5): 812–816.
- Mayden, R.L., W.-J. Chen, H.L. Bart, M.H. Doosey, A.M. Simons, K.L. Tang, R.M. Wood, M.K. Agnew, L. Yang, M.V. Hirt, M.D. Clements, K. Saitoh, **M. Miya**, **M. Nishida**. 2009. Reconstructing the phylogenetic relationships of the Earth's most diverse clade of freshwater fishes — Order Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi): A case study using multiple nuclear loci and the mitochondrial genome. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 51(3): 500–514.
- Johnson, G.D., J.R. Paxton, T.T. Sutton, T.P. Satoh, T. Sado, **M. Nishida** & **M. Miya**. 2009. Deep-sea mystery solved: Astonishing larval transformations and extreme sexual dimorphism unite three fish families. *Biol. Lett.*, 5(2): 235–239.
- Chen, W.-J., **M. Miya**, **K. Saitoh** & R.L. Mayden. 2008. Phylogenetic utility of two existing and four novel nuclear gene loci in reconstructing Tree of Life of ray-finned fishes: The order Cypriniformes (Ostariophysi) as a case study. *Gene*, 423(2): 125–134.
- Azuma, Y., Y. Kumazawa, **M. Miya**, K. Mabuchi & **M. Nishida**. 2008. Mitogenomic evaluation of the historical biogeography of cichlids toward reliable dating of teleostean divergences. *BMC Evol. Biol.*, 8: 215.
- Yamanoue, Y., **M. Miya**, K. Matsuura, M. Katoh, H. Sakai & **M. Nishida**. 2008. A new perspective on phylogeny and evolution of tetraodontiform fishes (Pisces: Acanthopterygii) based on whole mitochondrial genome sequences: Basal ecological diversification? *BMC Evol. Biol.*, 8: 212.
- Mayden, R.L., K.L. Tang, R. M. Wood, W.-J. Chen, M.K. Agnew, K.W. Conway, L. Yang, A.M. Simons,

- H.L. Bart, P.M. Harris, L.I. Junbing, X. Wang, **K. Saitoh**, S. He, H. Liu, Y. Chen, **M. Nishida** & **M. Miya**. 2008. Inferring the Tree of Life of the order Cypriniformes, the earth's most diverse clade of freshwater fishes: Implications of varied taxon and character sampling. *J. Syst. Evol.*, 46(3): 424–438.
- Lavoué, S., **M. Miya**, J. Y. Poulsen, P.R. Moller & **M. Nishida**. 2008. Monophyly, phylogenetic position and inter-familial relationships of the Alepocephaliformes (Teleostei) based on whole mitogenome sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 47(3): 1111–1121.
- Miya, M.**, N. I. Holcroft, T.P. Satoh, M. Yamaguchi, **M. Nishida** & E.O. Wiley. 2007. Mitochondrial genome and a nuclear gene indicate a novel phylogenetic position of deep-sea tube-eye fish (Stylephoridae). *Ichthyol. Res.*, 54(4): 323–332.
- Mayden, R.L., K. W. Conway, K. Tang, J. Freyhof, S. Chamberlain, M. Haskins, L. Schneider, M. Sudkamp, R.M. Wood, M. Agnew, A. Bufalino, Z. Sulaiman, **M. Miya**, **K. Saitoh**, S. He. 2007. Phylogenetic relationships of *Danio* within the order Cypriniformes: A framework for comparative and evolutionary studies of a model species. *J. Exp. Zool. Part B, Mol. Devel. Evol.*, 308B(5): 642–654.
- Lavoué, S., **M. Miya**, J. G. Inoue, **K. Saitoh**, N. B. Ishiguro & **M. Nishida**. 2007. Phylogenetic relationships among anchovies, sardines, herrings and their relatives (Clupeiformes), inferred from whole mitogenome sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 43(3):1096–1105.
- Mabuchi, K., **M. Miya**, Y. Azuma & **M. Nishida**. 2007. Independent evolution of the specialized pharyngeal jaw apparatus in cichlid and labrid fishes. *BMC Evol. Biol.*, 7:10.
- Saitoh, K.**, T. Sado, R.L. Mayden, N. Hanzawa, K. Nakamura, **M. Nishida** & **M. Miya**. 2006. Mitogenomic evolution and interrelationships of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi): The first evidence towards resolution of higher-level relationships of the World's largest freshwater-fish clade based on 59 whole mitogenome sequences. *J. Mol. Evol.*, 63 (6): 826–841.
- Miya, M.**, **K. Saitoh**, R. Wood, **M. Nishida** & R. L. Mayden. 2006. New primers for amplifying and sequencing the mitochondrial ND4/ND5 gene region of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi). *Ichthyol. Res.*, 53 (1): 75–81.
- Lavoué, S., **M. Miya**, J. G. Inoue, **K. Saitoh**, N. B. Ishiguro & **M. Nishida**. 2005. Molecular systematics of the gonorynchiform fishes (Teleostei) based on whole mitogenome sequences: Implications for higher-level relationships within the Otocephala. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 37 (1): 165–177.
- Ishiguro, N.B., **M. Miya**, J. G. Inoue & **M. Nishida**. 2005. *Sundasalanx* (Sundasalangidae) is a progenetic clupeiform, not a closely-related group of salangids (Osmeriformes): Mitogenomic evidence. *J. Fish Biol.*, 67 (2): 561–569.
- Miya, M.**, T. P. Satoh & **M. Nishida**. 2005. The phylogenetic position of toadfishes (order Batrachoidiformes) in the higher ray-finned fish as inferred from partitioned Bayesian analysis of 102 whole mitochondrial genome sequences. *Biol. J. Linn. Soc.*, 85 (3): 289–306.
- Inoue, J. G., **M. Miya**, B. Venkatesh & **M. Nishida**. 2005. The mitochondrial genome of Indonesian coelacanth *Latimeria menadoensis* (Sarcopterygii: Coelacanthiformes) and divergence time estimation between the two coelacanths. *Gene*, 349: 227–235.
- [学会発表] (計 68 件)
- Miya, M. Patterns of diversification in modern ray-finned fishes: An overview based on 327 whole mitogenome sequences. EEB Seminar, Yale University, New Haven CT, USA, 17 September 2008.
- Miya, M., T. Sado, K. Saitoh, H.L. Bart, Jr., M.H. Doosey, I. Doadrio, Y. Keivany, J. Shrestha, V. Lhekni, R. Zardoya, M. Nishida, R.L. Mayden. Higher-level relationships of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi) inferred from 238 whole mitochondrial genome sequences. Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists. Montreal, Canada, July 23, 2008.
- Azuma, Y. Y. Kumazawa, M. Miya, K. Mabuchi, M. Nishida. Mitogenomic evaluation of historical biogeography of cichlids toward reliable dating of teleostean divergences. Annual Meeting of Society for Molecular Biology and Evolution. Barcelona, Spain, June 8, 2008.
- Lavoué, S., M. Miya & M. Nishida. Higher-level relationships of the Otocephala (Teleostei) inferred from whole mitogenome sequences. International Symposium on Systematics and Diversity of Fishes. National Museum of Nature and Science, Tokyo, Japan, March 4, 2008.
- Sado, T. and M. Miya. Collecting trips of the Cypriniformes to South and Southeast Asian countries. Special Symposium: Biology of Cypriniformes. Chiang Rai, Thailand, November 2007.
- Saitoh, K., T. Sado, M.H. Doosey, H.L. Bart, Jr., R.L. Mayden, M. Nishida & M. Miya. Resolving power of mitochondrial genomic data for interrelationships among cypriniform fishes (Actinopterygii: Ostariophysi). Special Symposium: Biology of Cypriniformes. Chiang Rai, Thailand, November 2007.
- Lavoué, S., M. Miya & M. Nishida. Higher-level relationships of the Otocephala (Teleostei) inferred from whole mitogenome sequences. Special Symposium: Biology of Cypriniformes. Chiang Rai, Thailand, November 2007.
- 宮 正樹・佐土哲也・斎藤憲治・西田 睦. コイ目魚類の大系統解明プロジェクト (Cypriniformes Tree of Life): その進展と成果. 2007年度日本魚類学会年会, 北海道大学, 札幌, 2007年10月.
- Lavoué, S., M. Miya, J. Poulsen, P. Møller & M. Nishida. Molecular systematics of the deep-sea alepocephaliform fishes (Teleostei) based on whole mitogenome sequences. 2007年度日本魚類学会年会, 北海道大学, 札幌, 2007年10月.
- 馬淵浩司・宮 正樹・東 陽一郎・西田 睦. シクロッドとベラ科魚類にみられる特殊な咽頭顎器官は独立に進化した. 日本進化学会第9回京都大会, 京都大学, 2007年8月.
- Miya, M., T. Sado, K. Saitoh, H.L. Bart, Jr., M.H. Doosey, I. Doadrio, Y. Keivany, J. Shrestha, R. Zardoya, M. Nishida, R.L. Mayden. Cypriniformes Tree of Life (CToL): Higher-level relationships of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi) inferred from 152 whole mitochondrial genome sequences. Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists. St. Louis, Missouri, USA, July 2007.
- Miya, M., J. G. Inoue, K. Mabuchi & M. Nishida. Patterns of diversification in modern ray-finned

fishes: A mitogenomic overview. Evolution 2007, Christchurch Convention Center, Christchurch, New Zealand, June 2007.

Miya, M., T. Sado, K. Saitoh, J. Shrestha, M. Nishida & R.L. Mayden. Higher-level relationships of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysii): A new perspective based on >100 whole mitochondrial genome sequences. First Symposium on Biology of Cypriniformes, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, P. R. China, October 2006.

Chen, W.-J., K.L. Tang, R.M. Wood, S. He, M. Miya, K. Saitoh, J. Freyhof, Z.H. Sulaiman & R.L. Mayden. Cypriniformes Tree of Life: A phylogenetic perspective on the diversity of Earth's most diverse freshwater fish group. First Symposium on Biology of Cypriniformes, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, P. R. China, October 2006.

Wood, R.M., K.L. Tang, W.-J. Chen, S. He, M. Miya, K. Saitoh, J. Freyhof, Z.H. Sulaiman & R.L. Mayden. Molecular systematics of the order Cypriniformes based on a large DNA sequence data set composed of nuclear and mitochondrial genes. First Symposium on Biology of Cypriniformes, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, P. R. China, October 2006.

宮 正樹・N. Holcroft・E. O. Wiley・佐藤 崇・西田 睦。スタイルフォルスはアカマンボウ目ではない：ミトコンドリアゲノム全長配列と核遺伝子に基づく新たな解釈。日本魚類学会，静岡県グランシップ，2006年10月。

川原玲香・宮 正樹・馬淵浩司・西田 睦。ミトコンドリアゲノム配列から明らかになったトゲウオ目魚類の多系統性。日本魚類学会，静岡県グランシップ，2006年10月。

Saitoh, K., M. Miya, N. Hanzawa, K. Nakamura, S. Lavoué & M. Nishida. Relationships among major groups of cypriniform fishes based on mitochondrial genomic data. 2005 Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists, Tampa, Florida, USA, July 2005.

Lavoué, S., M. Miya, J. G. Inoue, K. Saitoh & Mutsumi Nishida. Molecular systematics of the gonorynchiform fishes (Teleostei) based on whole mitogenome sequences: Implications for higher relationships within the Otocephala. 2005 Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists, Tampa, Florida, USA, July 2005.

Lavoué, S., M. Miya, K. Saitoh, N.B. Ishiguro, J.G. Inoue & M. Nishida. Molecular systematics of the Clupeiformes based on whole mitogenomic sequences. 2005 Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists, Tampa, Florida, USA, July 2005.

Saitoh, K., M. Miya, N. Hanzawa, K. Nakamura & M. Nishida. Phylogenetic analysis of complete mitochondrial genomes from cypriniform fishes revealed some geographic phylogenetic assemblages. The 7th Indo-Pacific Fish Conference. Taipei, Taiwan, May 2005.

Lavoué, S., M. Miya, K. Saitoh, N.B. Ishiguro, J.G. Inoue & Mutsumi Nishida. Molecular systematics of the Clupeiformes based on whole mitogenomic sequences. The 7th Indo-Pacific Fish Conference. Taipei, Taiwan, May 2005.

Yamanoue, Y., M. Miya, K. Matsuura, H. Sakai, M. Katoh & Mutsumi Nishida. Phylogenetic relationships of tetraodontiform families (Teleostei: Acanthopterygii). The 7th Indo-Pacific Fish Conference. Taipei, Taiwan, May 2005.

〔図書〕(計1件)

宮正樹・西田睦。2009. 魚類の大系統：ミトコンドリアゲノムクスによるアプローチ。82—101頁。所収：海洋の生命史—生命は海でどう進化したか—。東海大学出版社。

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

**MitoFish** <<http://mitofish.ori.u-tokyo.ac.jp/>>  
魚類のミトゲノム全長配列と断片配列に絞り込んで構築したデータベース。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

宮 正樹 (MIYA MASAKI)  
千葉県立中央博物館・首席研究員  
研究者番号：30250137

### (2)研究分担者

西田 睦 (NISHIDA MUTSUMI)  
東京大学海洋研究所・教授  
研究者番号：90136896

斎藤憲治 (SAITOH KENJI)  
独立行政法人水産総合研究センター・東北  
区水産研究所・室長

### (3)連携研究者

なし