

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：82617

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870320

研究課題名(和文) 有尾両生類における種分化と種間干渉：種の形成とその維持機構の解明に向けて

研究課題名(英文) Mechanisms of speciation, isolation, and maintenance of species diversity in Japanese salamanders

研究代表者

吉川 夏彦 (Yoshikawa, Natsuhiko)

独立行政法人国立科学博物館・分子生物多様性研究資料センター・特定非常勤研究員

研究者番号：60726892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：日本産ハコネサンショウウオ属を対象として日本列島の有尾両生類の種分化及びその維持機構の解明を目指して研究を行った。ハコネサンショウウオ属の複数種で共通して使用可能なマイクロサテライトマーカー18遺伝子座を開発した。東北本州からは本属の2新種(バンダイハコネサンショウウオ、タダミハコネサンショウウオ)を記載し、分類学的整理を行った。東北地方南部に分布する4種の分布境界・同所的分布域で集団遺伝構造を調査し、本属の種分化と二次的接触、およびその後の種間関係について調査を行い、系統地理学的な考察を行った。

研究成果の概要(英文)：We studied taxonomy, population genetic structure, and phylogeography of salamanders of the genus *Onychodactylus* in Japan as the aim to reveal speciation process, evolutionary history, and phylogeographic patterns in Japanese salamanders. We developed 18 microsatellite loci for *Onychodactylus japonicus* and its allies. Two new species of the genus *Onychodactylus*, *O. intermedius* and *O. fuscus* were described from southern part of Tohoku District, eastern Honshu, Japan. We surveyed population genetic structure of *Onychodactylus* salamanders in southern Tohoku District, where four species are parapatrically or sympatrically distributed, especially focused on the relationships of *O. japonicus* with *O. fuscus* (sympatric) and *O. intermedius* (parapatric). We detected hybrid zones between parapatric species and low degree of hybridization between sympatric species, and estimated phylogeographic history and evolutionary process of the genus *Onychodactylus*.

研究分野：爬虫両棲類学、動物系統分類学

キーワード：有尾両生類 生殖的隔離 種分化 交雑 系統地理

1. 研究開始当初の背景

サンショウウオ科は日本列島に3属28種(研究開始当時23種)を産し、さらに複数の隠蔽種の存在も示唆されるなど、非常に多様化している。このような種多様性は、この仲間の乏しい分散能力と日本列島を中心とする東アジアの複雑な地史によって生じたと考えられているが、その形成過程や種分化機構などに関する知見は限定的だった。ハコネサンショウウオ属は日本産サンショウウオ科の3属の一つで、国内では従来ハコネサンショウウオ(*Onychodactylus japonicus*)1種のみが知られていたが、我々が行った一連の先行研究から、実際には6種の隠蔽種からなる種群を形成していることが明らかとなり、研究開始当初は日本産種は4種となっていた。これまでの遺伝的な調査(mtDNAとアロザイム)から、これらの種が異所的種分化により生じてきたことが推定されており、また種間で明瞭な生殖的隔離が存在していることが明らかになっていた。一方で種間の分布様式については、同所的に生息し分布が重複するものや、分布が接するが重複しない側所的なものがみられることが知られており、互いに比較的近縁な種でありながらも種分化の過程で異なる種間関係を形成してきたと推定される。本種群は、サンショウウオ類の種分化および生殖隔離の形成、そして種間関係の研究に適した材料であることが考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アジアで多様化を遂げているサンショウウオ科のうち、特に極東地域固有の属であるハコネサンショウウオ属の種の多様化とその維持機構を探ることにある。同属のうち日本産のハコネサンショウウオ種群は単系統群であり、種間の遺伝的分化程度はそれほど高くなく、日本産の他のサンショウウオ類に比べて種の多様化の歴史は浅いと考えられる一方で、種間の地理的分布における同所性・側所性の違いがみられる。本研究では、分類学的再編の途上にある本種群の分類学的整理を進めるとともに、本種群の種間関係の違いを生じさせている要因について、自然下の集団遺伝構造の調査や飼育実験等により明らかにすることを目指す。本研究により明らかとなった事項を総合し、本属の異所的種分化とその後の二次的接触を伴う進化史の再構築を目指し、東アジアにおけるサンショウウオ類の多様化機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 遺伝マーカーの整備

まず本研究で行う遺伝的解析の整備を行った。次世代シーケンサーを用いた標準的な方法によりハコネサンショウウオ種群の各種で使用可能なマイクロサテライトマーカーを開発した。

(2) ハコネサンショウウオ種群の分類学的整理

これまでに明らかになっている未記載種について、既存の標本および新規に収集した標本により新種記載を行い、分類学的な整理を行った。

(3) 集団遺伝構造の解析

ハコネサンショウウオ種群の種が同所的に生息する地域および側所的に生息する種の分布境界域で集中的なサンプリングを行い、mtDNAおよびマイクロサテライトによる集団解析と系統地理推定を行った。一部の個体については次世代シーケンサー(Miseq)を用いたMIG-Seq法によりゲノムワイドSNP解析を行った。特に後述の理由により東北地方における種間の同所域および分布境界で重点的な調査を行い、遺伝子浸透や交雑帯の実態解明を行った。

4. 研究成果

(1) ハコネサンショウウオ属のマイクロサテライトマーカーの開発

日本産ハコネサンショウウオ属の集団遺伝構造の解析を行うための基盤としてマイクロサテライトマーカーの開発を行った。福島県産狭義ハコネを用いて次世代シーケンサーによるゲノム配列の取得と、モチーフ検索・プライマーデザインを行い、合計18遺伝子座のマーカーを開発した。バンダイハコネ、タダミハコネ、筑波山産ツクバハコネについて利用可能性を評価したところ、これらの種においても9~13遺伝子座で利用可能であった。これらのマーカーはハコネサンショウウオ属の交雑帯・集団構造・系統地理の解析だけでなく、希少種の保全に向けた遺伝的多様性の評価などにも広く利用可能である。

(2) ハコネサンショウウオ属の分類学的整理

研究開始の時点でハコネサンショウウオ属の中には隠蔽種の存在が明らかになっていたが、本研究の期間中にバンダイハコネサンショウウオ *O. intermedius* およびタダミハコネサンショウウオ *O. fuscus* の2種を新種記載した(図1:以下種名のサンショウウオ略)。バンダイハコネは先行研究で東北部型隠蔽種とされていた集団に相当し、狭義のハコネ、キタオウシュウと分布が隣接している。タダミハコネは先行研究で明らかになっていた6つの隠蔽種とは異なる、本研究の過程で新規に発見された種で、狭義のハコネと同所的に分布している。これら2新種は筑波山系産のツクバハコネを姉妹群として一群をなす、互いに近縁な姉妹種の関係にある。形態的にはタダミハコネは背面の斑紋を欠きほぼ一様に暗褐色であり、左右の鋤骨齒列間に間隙を生じるなどの点で異なる。タダミハコネは繁殖期が初冬であるのに対して

バンダイハコネでは初冬と初夏の両方の繁殖期が示唆されている。興味深いことに、狭義ハコネとの関係においてバンダイハコネは側所的に分布して生息場所を共有しないのに対し、タダミハコネは既知の分布域の全域で同所的に生息していた。姉妹種の間で狭義のハコネに対する種間関係が異なる例として興味深かったため、以後タダミハコネ・バンダイハコネと狭義ハコネとの種間関係について重点的に調査した。これら2種の記載により、極東アジアに固有であるハコネサンショウウオ属は10種（国内6種、海外4種）となり、同属の種多様性に関する知見が大きく前進した。また、同属も含めた東アジアの両生類相形成過程の理解も進むものと期待される。



図1. 左からバンダイハコネサンショウウオ、タダミハコネサンショウウオ、狭義のハコネサンショウウオ（いずれも福島県産）

(3) 東北地方で同所的に生息するハコネサンショウウオ属2種の遺伝構造と系統地理

タダミハコネおよび狭義のハコネの2種について、それらの同所的分布域における集団遺伝構造をmtDNAおよびマイクロサテライトマーカーにより比較した。その結果、mtDNAではこの地域の個体はタダミハコネ、狭義ハコネの2系統に分かれ、マイクロサテライトによる判別でもその結果とほぼ一致していた。一部の少数の個体では中間的なマイクロサテライト遺伝子型を示し、若干の交雑が存在していることが示唆されたものの、その割合は非常に低く、交雑は低頻度で抑えられていることが示唆された。また、その地理的分布にも大きな偏りはなく、分布域全体で非常に低頻度の交雑で抑えられていた。両マーカー、特にmtDNAのハプロタイプネットワーク樹等による解析では狭義のハコネが近年の急速な個体群拡大（一斉放散型：図2A）を示唆したのに対し、タダミハコネでは長期間安定的に個体群が維持されてきた（安定維持型：図2B）ことが示唆された。同地域での両種の個体群構造の違いから、タダミハコネが古くからこの地域に分布してきたのに対

して、狭義ハコネが近年分布を拡大して二次的に接触し、現在のような同所的分布が成立したと考えられた。

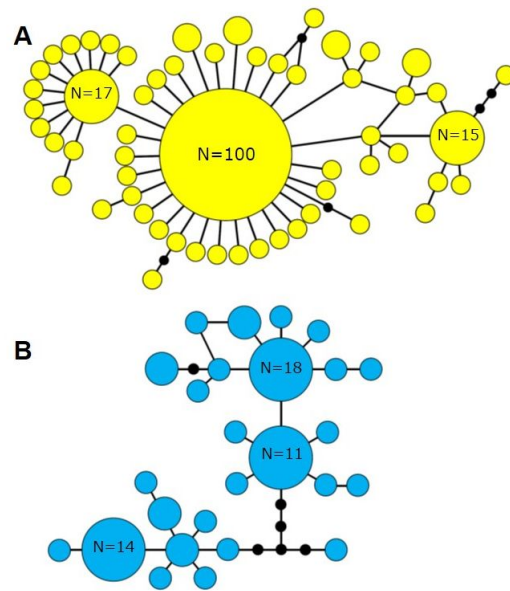


図2. 東北地方南部における狭義ハコネ (A) とタダミハコネ (B) の mtDNA・Cytb 領域に基づくハプロタイプネットワーク樹。

(4) ハコネサンショウウオ属4種の分布境界と遺伝構造

東北地方のキタオウシュウ、バンダイハコネ、狭義ハコネ、タダミハコネの分布域でサンプリングを行い、mtDNA、マイクロサテライトマーカー（一部MIG-Seq法）による遺伝的解析を行ってこれらの種の分布境界域における遺伝構造を調査した。mtDNAによる解析の結果、この地域の4種は先行研究と同様に明瞭に分岐したが、山形・福島県境の飯豊山地において、遺伝的に比較的大きく分化したバンダイハコネ地域系統（図3灰色）が新規に発見された。この系統は同地域に固有で、一部で既知の広域分布のバンダイハコネ系統（図3白）と混在していた。マイクロサテライトの分析では他地域のバンダイハコネとの明瞭な違いは検出できず、分類学的にはバンダイハコネサンショウウオに属する。

キタオウシュウとバンダイハコネの分布境界は山形県北部から宮城県中部にあり（図3破線A）mtDNAとマイクロサテライトのいずれでも明瞭に識別でき、交雑は確認できなかった。山形県北部の境界線上の1地点を除くと混生は見られず、現在の両種はほぼ完全に生殖的に隔離されていると考えられるが、日本海側の個体群で若干のキタオウシュウからバンダイハコネへの過去の遺伝子浸透が疑われた。バンダイハコネと狭義ハコネの境界は図3の破線B付近にあり、猪苗代湖南部の1地点を除いて混生は見られなかった。両種はmtDNAとマイクロサテライトの両方で明瞭に識別できたが、分布境界に近い

個体群で若干の遺伝子浸透が確認された。

同地域の各種は先行研究により異所的に種分化したと考えられるが、その過程でバンダイハコネ・タダミハコネ・ツクバハコネなどを含む系統の祖先は東北南部から関東北部にかけて広範に分布し、各地で系統分化していたものと考えられる。その後(3)の結果でも示されたように狭義ハコネが北上して分布域を拡大、バンダイハコネの系統と置換していった一方でタダミハコネは狭義ハコネとの共存し、現在の分布を確立したと推定される。狭義ハコネの北上とバンダイハコネ分布域との置換は現在も進行しているものと考えられる。

本研究の結果は異所的種分化と生殖隔離の成立、二次的接触による交雑帯の形成と競争排除や資源分割等による共存など、種分化とその多様性の形成・維持過程についての有用な知見となると考えられる。

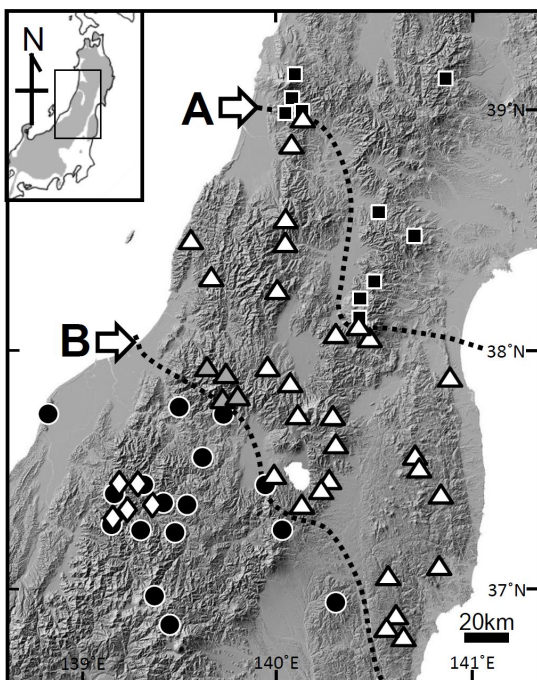


図3 東北地方南部におけるハコネサンショウウオ属4種の分布。キタオウシュウ(○)、バンダイハコネ(□)、タダミハコネ(△)、狭義ハコネ(◇)。灰色の○は本研究で新規に発見されたバンダイハコネの地域系統の産地を表す。Aの破線はキタオウシュウとバンダイハコネ、Bの破線はバンダイハコネと狭義ハコネの分布境界。

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3件)

Natsuhiko Yoshikawa, Nobuaki Nagata, Eighteen SSR markers for the Japanese clawed salamander, *Onychodactylus japonicus*, and cross-amplification in its congeners, *Current Herpetology*, 査読有, vol.36, 2017, in press

吉川夏彦、只見町に生息するタダミハコネサンショウウオについて、只見の自然只見町プナセンター紀要、査読無、4巻、2015、2-6、

<http://www.tadami-buna.jp/publications.html#3>

Natsuhiko Yoshikawa, Masafumi Matsui, Two new salamanders of the genus *Onychodactylus* from eastern Honshu, Japan (Amphibia, Caudata, Hynobiidae), *Zootaxa*, 査読有, vol.3866, 2014, 53-78, DOI:<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3866.1.3>

〔学会発表〕(計9件)

吉川夏彦、別種にするには理由があるハコネサンショウウオの場合、日本爬虫両棲類学会第55回大会、2016年11月26~27日、「琉球大学(沖縄県・西原町)」

吉川夏彦、ツクバハコネサンショウウオの生態調査、日本爬虫両棲類学会第55回大会、2016年11月26~27日、「琉球大学(沖縄県・西原町)」

Yoshikawa N., Matsui M., Phylogenetic relationships and population genetic structures of the *Onychodactylus japonicus* species complex (Amphibia: Caudata: Hynobiidae), The 87th meeting of Zoological Society of Japan, 17-19 November 2016, 「Okinawa Convention Center (Ginowan, Okinawa)」

吉川夏彦、会津地方のカエル・サンショウウオ類とその生態、プナセンター講座、2016年10月22日、「只見町プナセンター(福島県・只見町)」

Yoshikawa N., Matsui M., Cryptic species diversity in the clawed salamanders of the genus *Onychodactylus* revealed by recent molecular and morphological analyses, The 8th World Congress of Herpetology, 15-22 August 2016, 「Hangzhou (China)」

吉川夏彦、タダミハコネサンショウウオの生息状況と集団遺伝構造：サンショウウオの過去を知り、未来を考える、平成27年度「自然首都・只見」学術調査研究助成事業成果発表会、2016年1月31日、「只見町朝日振興センター(福島県・只見町)」

吉川夏彦・松井正文、福島県西部におけるハコネサンショウウオ属2種の分布と集団遺伝構造、日本動物学会第86回大会、2015年9月17~19日、「朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)」

吉川夏彦、只見町より記載された新種タダミハコネサンショウウオ、平成26年度「自然首都・只見」学術調査研究助成事業成果発表会、2015年1月31日、「只

見町朝日振興センター（福島県・只見町）」
吉川夏彦・松井正文、東北地方南部におけるハコネサンショウウオ属の隠蔽種について、日本爬虫両棲類学会第 53 回大会、2014 年 11 月 8～9 日、「神戸山手大学」（兵庫県・神戸市）」

〔その他〕

報道関連情報（計 8 件）

「タダミハコネサンショウウオ 県内初、新種を発見」. 福島民友新聞 2014 年 10 月 9 日付朝刊 1 面、22 面 .
「エコパーク登録・只見に新種サンショウウオ」. 福島民報 2014 年 10 月 9 日付朝刊 1 面 .
「サンショウウオ新種認定 豊かな自然只見に『勲章』」. 読売新聞福島版 2014 年 10 月 9 日付朝刊 33 面、37 面 .
「只見で新種発見 サンショウウオ」. 朝日新聞福島版 2014 年 10 月 9 日付朝刊 24 面 .
「只見で新種発見 タダミハコネサンショウウオ」. 毎日新聞福島版 2014 年 10 月 9 日付朝刊 27 面 .
「三条に新種のサンショウウオ 国立科学博物館・吉川さんら発見」. 新潟日報 2014 年 10 月 10 日付朝刊 31 面 .
「新種認定 命名『バンダイハコネサンショウウオ』」. 福島民友 2014 年 11 月 20 日付朝刊 1 面 .
「バンダイハコネサンショウウオ 新種と判明、和名決定」. 福島民報 2014 年 11 月 21 日付朝刊 .

アウトリーチ活動（一般向け講演：計 3 件）

吉川夏彦、サンショウウオの分類学 6 種に分かれたハコネサンショウウオ、若手研究者が語る両生爬虫類研究最前線、2016 年 3 月 26 日、「栃木県立博物館（栃木県・宇都宮市）」
吉川夏彦、最近の日本産ハコネサンショウウオ属の分類について、第 18 回トウキョウサンショウウオシンポジウム、2016 年 2 月 20 日、「トヨタドライビングスクール東京（東京都・立川市）」
吉川夏彦、福島県産ハコネサンショウウオ属 3 種について、2015 年 6 月 6 日、第 17 回両生類自然史フォーラム、「南相馬市博物館（福島県・南相馬市）」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 夏彦 (YOSHIKAWA, Natsuhiko)
国立科学博物館・分子生物多様性研究資料センター・特定非常勤研究員
研究者番号：60726892