

研究成果報告書

事業名（補助金名）： 基盤的開発研究育成事業（若手研究補助金）
研究開発テーマ名： 日本産カミムラカワゲラ属の系統地理（分子系統地理）
研究代表者名： 大槻 章子 【 北海道大学農学研究科／博士後期課程 】

事業の背景・目的

氷期-間氷期サイクルに代表される第四紀の気候変動と、それに伴う大陸・島間の陸橋形成などの地史が生物種の分布と多様性に与えた影響について、近年分子系統地理的な研究が活発になされている。ヨーロッパと北米では特に研究が盛んであり、氷期に生物のリフュージア（避難場所）となった地域が複数見いだされている。例えばヨーロッパでは、イベリア半島南端、イタリア南端、バルカン半島南端など複数の半島南端が氷期に生物のリフュージアとなっていたことが植物の花粉化石などから推測され、これは多くの動物・植物種の系統地理研究によって支持されてきた。間氷期である現在、氷期に氷床におおわれていた欧米北部に多くの生物種が分布しているが、これらは氷期以後にリフュージアから拡散したものと考えられている。第四紀には 10 万年単位の氷期-間氷期の繰り返しが 4 回は起こったことが古気候研究から示されており、生物種は氷期にリフュージアに分布を縮小し、間氷期に再び拡散することを繰り返したと考えられている。その過程で地理的に分断された複数のリフュージアに種の分布が縮小し集団が細分化されることで、遺伝的浮動によって地域集団間の分化が起こったとする報告が、これまでに複数なされている。例えば北米ロッキー山脈の直翅目（バッタ）では、第四紀の分布変動が急速な種分化の要因となったことが知られており、氷期-間氷期サイクルが生物の種分化と多様性増加に大きく影響したことが指摘されている。また地史の面からは、ユーラシアと北米間のベーリングアのように、氷期に形成される陸橋を通じて生物の移動分散が起こったことは古くから指摘されている。これらの研究に際して、移動力が大きくさかんに遺伝子流動(gene flow)が起こる種では遺伝的変異の地理的な傾向が消されてしまうため、対象として適さない。そのため、成虫が飛翔能力を欠く昆虫や陸水巻貝、淡水魚など、移動力が低く地理的分化が大きい生物がよく扱われる。

日本列島は地形が複雑で、大陸や国内の島間をつなぐ陸橋が、氷期に形成され間氷期に消えることを繰り返した。そのため日本の生物は、氷期-間氷期サイクルにともなう分布の北上と南下に加え、氷期に形成される陸橋を通じた大陸からの移入や国内の島間の移動を繰り返して多様化したと予測され、このことが、日本が面積に比して非常に多様な生物相を持つに至った要因の一つであると考えられる。

日本における研究では、第四紀に植物の分布変動があったことが花粉化石から示されており(図 1)、黒潮の影響で温暖な九州・四国・紀伊半島の南端が、常緑広葉樹の氷期のリフュージアとなったことが示唆されている。しかし動物種では、日本列島全体にわたる精密な化石記録が残ることはきわめて稀であるため、第四紀にどのような分布の変動があったのか、氷期-間氷期サイクルが多様性増加と種分化の原動力になったのかについて、明確な結果は得られていない。そこで本研究では、カワゲラ目昆虫を用いて、ミトコンドリア DNA の塩基配列情報から、種の歴史的な分布変遷過程の推定を試みた。

カワゲラ目昆虫は、生活史の大半を占める幼虫期を河川で過ごすため移動力が小さく、地域個体群が遺伝的に分化していること、それが過去の分布変遷過程を反映していることが予想される。材料としたカワゲラ科カミムラカワゲラ(*Kamimuria tibialis*)は日本固有種であり国内に広く分布するが、温暖な河川に多く、北海道などの寒冷地域では、湖沼の流出河川や大きな河川の下流域など、夏に比較的高温になる河川に分布する。そのためその分布は、氷期の影響を大きく受けたと予想される。

本研究は、以下を目的として行った。国内複数地域のカミムラカワゲラについて、1) 塩基配列型

(ハプロタイプ)間の系統関係を推定し、各地域のハプロタイプ分布パターンを明らかにする、2) 塩基配列情報から集団構造解析を行い、地域集団間の分化の程度や、各地域集団の経た歴史的イベントを推定する、3) 1)と2)をもとに各種の分布変遷およびその相対的な時期を推定する。

内容・方法

日本全国を網羅するように、対馬 4 地点・九州 8 地点・四国 6 地点・本州 29 地点・北海道 6 地点の河川からカミムラカワゲラの幼虫を採集し(図 2、表 1)、計 197 個体を解析に用いた。全ての採集地点は、異なる河川水系に属している。採集地点のうち、7-10 個体を扱った 18 地点を、集団解析に用いる「地域集団」とした。ただし 18 集団中で、北海道の阿寒地域のみ個体数が 3 である。系統解析における外群には、姉妹種のウエノカワゲラ(*K. uenoi*)と、同属のクロヒゲカワゲラ(*K. quadrata*)を用いた。

これらのサンプルについて DNA を抽出し、ミトコンドリア DNA のシトクロームオキシダーゼサブユニット I(COI)の一部(853bp)および、NADH デヒドロゲナーゼサブユニット 5(ND5)の一部(413bp)を PCR 法により増幅し、計 1266bp の塩基配列をダイレクトシーケンス法によって決定した。

決定した塩基配列情報に基づき、塩基配列型(ハプロタイプ)間の遺伝子系統樹を構築した。遺伝子系統樹の作成にはソフトウェア PAUP4.0b10 を用い、最節約法と最尤法の 2 手法を行った。最尤法に用いる最適塩基置換モデルの推定はソフトウェア Modeltest3.7 により行った。各樹形の信頼度はブーツストラップ値で評価した。

さらに、詳細な集団構造を検出するため、いくつかの集団構造分析を行った。まず集団ごとに、ハプロタイプ多様度(Haplotype diversity: h)、塩基多様度(Nucleotide diversity: π)を算出した。つぎに、集団間のハプロタイプ頻度の異質性の検定、集団構造の階層分散分析(AMOVA: 解析データの全サンプルの遠近関係を数値化し、1)地域集団のグループ、2)各地域集団、3)地域集団内の個体、に起因するばらつきが、全体のばらつきに対してそれぞれどのくらいの割合を占めるかをみることで、集団構造を分析する)、集団の歴史の推定(過去に母集団サイズの急増が起きたかどうかを、推定した母集団サイズ急増モデルと観測データとの当てはまりの良さを検定することで推測する: Mismatch distribution 分析)を行った。これらの解析はソフトウェア Arlequin2.0 により行った。

結果・成果

197個体のカミムラカワゲラについて、計1266bpの塩基配列を解読した結果、290の変異サイト(そのうち246が系統推定に有効な情報を有する)がみつきり、132のハプロタイプが見いだされた(表1)。

塩基配列型(ハプロタイプ)間の遺伝子系統樹とその分布パターン

最節約法で構築された63の最節約樹の厳密合意樹(CI=0.55, RI=0.85)を図3に示した。最尤法により構築された系統樹は最節約法によるものとほぼ同じ樹形を持ち、異なるのは分岐の浅い末端部のみで、考察には影響しない部分であった。この樹形から、対馬、九州、本州・四国・北海道の大きな3つのクレードが見いだされ、それぞれのクレードを支持する枝は、72-92%という高いブーツストラップ値を示した。対馬クレードはもっとも基部から深く分岐していた。分子時計によると、その分岐時期は約100万年と推定される。九州クレードはさらに2つのクレードにわかれ、それらを支持する枝のブーツストラップ値は95%と56%であった。支持枝が95%のブーツストラップ値を持つクレード(九州クレード2)では、最も基部に鹿児島南端に分布するハプロタイプが位置し、その樹形は高いブーツスト

ラップ値(99%)で支持された。本州・四国・北海道クレード内では北海道の4ハプロタイプが単系統を形成し、82%という高いブーツストラップ値で支持されたが、その他のハプロタイプはほとんどが多岐の状態であり、系統関係がはっきりわからない状態であった。これは種内レベルで系統解析を行う場合にはしばしばみられることで、ハプロタイプ間の遺伝的分化が小さく、系統推定に必要な形質数が限られるために起こったものと考えられる。

ハプロタイプの分布パターンをみると、各地域集団(18集団)には、地域集団固有のハプロタイプと、他の地域集団でもみられるハプロタイプが見いだされたが、対馬、九州、本州・四国、北海道の4地域グループはそれぞれ異なるハプロタイプを有し、地域間でハプロタイプの重複はみられなかった(表1)。九州の2つのクレードに属するハプロタイプは、九州全域に混じりあって分布していた。本州・四国クレードのハプロタイプには、本州・四国内でかなりの広域分布をする(石川県、静岡県、和歌山県、高知県、兵庫県、島根県)ものもあった。

以上のハプロタイプの系統関係と分布パターンでみられた結果から、次のことが示唆される。1)カミムラカワゲラ種内の分化は第四紀半ば以降の、氷期-間氷期サイクルが顕著になった時期に生じたものである。2)対馬の集団は、もっとも初めに他の地域集団との隔離が起こった。3)九州では古い時期に分岐した2クレードのハプロタイプが混ざって分布している。これは地理的に隔離された複数の地域間で分化が生じたのち2次的に混合した場合に多くみられるパターンであり、九州に複数のリフュージアが存在した可能性がある。5)対馬、九州、本州・四国、北海道の4地域間には分断が起こっている。

集団構造分析

以上のようなハプロタイプ分布パターンが示されたので、以下の集団解析において、対馬、九州、四国・本州、北海道の4地域を、それぞれ複数の地域集団を含む地域集団グループとして扱った。解析によっては、四国・本州・北海道を1つの地域集団グループとして、また四国と本州を別の地域集団グループとして扱った。

対馬、九州、四国、本州では、ハプロタイプ多様度(Haplotype diversity: h)が高い(0.91-0.98%)一方で、塩基多様度(Nucleotide diversity: π)が低い(0.011-0.014%)傾向にあった。これは、それぞれの地域集団グループがボトルネック(集団サイズの縮小により、集団内の遺伝的変異が小さくなる現象)を経た後に、大きな拡散があったことを示唆するものである。北海道集団グループだけはハプロタイプ多様度があまり高くなく(0.52%)、かつ塩基多様度も非常に低かった(0.0005%)。これは長期あるいは重度のボトルネックが起こり、後に集団が回復しはじめて間もないことを示唆する。

対馬、九州、四国・本州、北海道の4地域集団グループ間でハプロタイプ頻度の異質性の検定を行ったところ、非常に強く異質性が示された($p < 0.0001$)。また、集団構造の階層分散分析(AMOVA)の結果、対馬、九州、四国・本州・北海道の3地域間の違いによるばらつき(地域集団グループに起因するばらつき)が最も大きく、全体の71.65%を占め、各地域集団(18集団)に起因するばらつきが7.08%、各地域集団内の個体によるばらつきが21.27%を占めていた。これらは、先に示したハプロタイプの系統関係(対馬、九州、四国・本州、北海道の4地域のハプロタイプがそれぞれ高い信頼度でクレードを形成する)と分布パターン(対馬、九州、四国・本州、北海道の4地域集団グループ間でハプロタイプは重複しない、各地域集団グループ内では広域分布をするハプロタイプがある)から考えて妥当な結果である。

対馬、九州、四国、本州、北海道の5つの地域集団グループについて、集団の歴史の推定(Mismatch distribution分析)を行った結果、集団内個体間のcoalescent timeの頻度分布は、対馬と九州では複数の山型を示し、1山型の母集団急増モデルと異なっていたが、両者に有意な差は認められなかった。四国、北海道は明瞭な1山型を、本州はやや起伏はあるものの1山にまとめ、いずれも母集団急増モデルと観測データとに有意差はみられなかった。このMismatch distribution分析の結果は、対馬、九州、四国、本州に分布するハプロタイプのそれぞれのクレードがボトルネックを経た後に、

大きな拡散があった（北海道では長期あるいは重度のボトルネックが起こった）とする、ハプロタイプ多様度と塩基多様度の傾向から得られた結果（上述）と一致する。

地理学分野からの情報とあわせた考察

以下では、これまでに地理学分野で明らかにされている日本列島周辺海峡の形成史の情報とあわせて、本研究で示された結果について考察をしていく。

対馬集団は最も初期に他の集団と分断され、その分岐時期から複数回の氷期を経たことが推定された。対馬海峡は非常に深く、氷期の九州との陸橋形成期間は短く、かつ最も寒冷な時期であったと考えられる。そのため複数回の氷期にわたり、対馬集団と他集団との2次接触は起こらなかったのだろう。氷期には対馬集団もボトルネックが起こり、以後島内に拡散したと推察される。

九州と本州間の最も近年での海峡形成時期は5000年前、本州と四国では7000年前と地理学分野では推定されている。これらの海峡は氷期には消えて間氷期にあらわれることを繰り返したが、海峡の深さは九州-本州間の方が本州-四国間よりもやや浅いことを考えると、九州-本州の接続期間は本州-四国よりもやや長いかほぼ同じ長さであっただろう。それにも関わらず、本研究でカミムラカワゲラは、九州と本州では遺伝的に大きく分化している一方、本州と四国との分化はそれに比べてはるかに小さかった。氷期には生息域が限定されるため、陸橋が形成されても移動分散は制限される。間氷期に入り温暖になるにしたがって陸橋は消えはじめるが、おそらく南部に形成されたであろうリフュージアからの分散速度と、陸橋が消滅するまでの時間との関係によって島間の移動分散がおこるかどうかが決まるだろう。また陸橋部分に、生息に適する河川が存在したかどうかに関わってくる。九州-本州と本州-四国間での移動分散に違いが見られる要因は、現段階では言及できない。

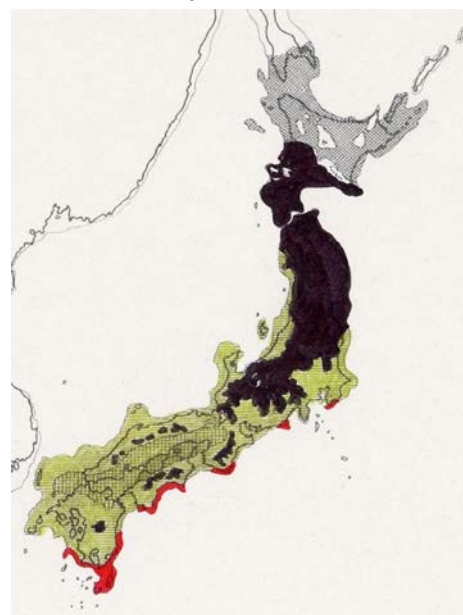
北海道-本州間の津軽海峡は10万年前に形成され、2-1.2万年前の最終氷期にも陸橋でつながることはなかった。したがって北海道への移入は10万年以上前であったと考えられる。北海道は氷期には厳しい寒冷環境におかれ、温暖な河川に適するカミムラカワゲラが生息できる地域はごく限られたはずである。本研究で北海道集団の4ハプロタイプは単系統を形成し、本州集団とある程度長い分断があったことが明らかになった。また集団解析から、北海道集団では重度あるいは長期のボトルネックをくぐった後に分散が起こったことが示唆された。これらの結果から、北海道集団は10万年以上前に確立し、氷期に分布地域がかなり狭まることで大きなボトルネックをくぐり、温暖化に伴ってふたたび道内に広く分散したと考えられる。

今後の展望

本研究により、現在日本に広く分布する日本固有種のカミムラカワゲラは、第四紀後半に集団の細分化が起こり、地域集団間の分化が進んだこと、以後に全国に拡散したことが、ミトコンドリア DNA ハプロタイプの系統解析および集団解析から示唆された。この集団の細分化が起こった第四紀後半は氷期-間氷期サイクルが顕著になった時期であり、氷期に複数のリフュージアに分布が縮小したことが原因である可能性がある。しかし、集団の縮小時期が氷期と一致し、分散時期が間氷期と一致するのかどうか、日本列島のリフュージアはどこにあったのか、という点については、本研究からだけでは完全に明確になっていない。この部分については、日本についても欧米のように研究がすすみ、さらに多くの分類群について遺伝情報や化石記録を蓄積していけば、総合的に判断できるようになるであろう。

また、筆者によるその後の研究により、対馬集団と他地域集団では形態形質にも違いがみられ、さらにある程度の交配隔離も生じていることが明らかになった。九州の2集団と北海道の集団について比較を行ったところ、繁殖行動に関する形質に地理変異が認められている。さらに詳細な形態や行動の観察、交配実験を行うことで、日本において更新世の分布変動により生じた遺伝的分化が種分化にどのような影響を及ぼしたかについて、議論することができるだろう。

最終氷期(約1.2万年前の植生)



(吉岡,1973, 那須, 1980を五十嵐改変, 1991)

図1. 現在の日本の植生(左)と、花粉化石情報により推定された最終氷期最寒冷期の植生(右)

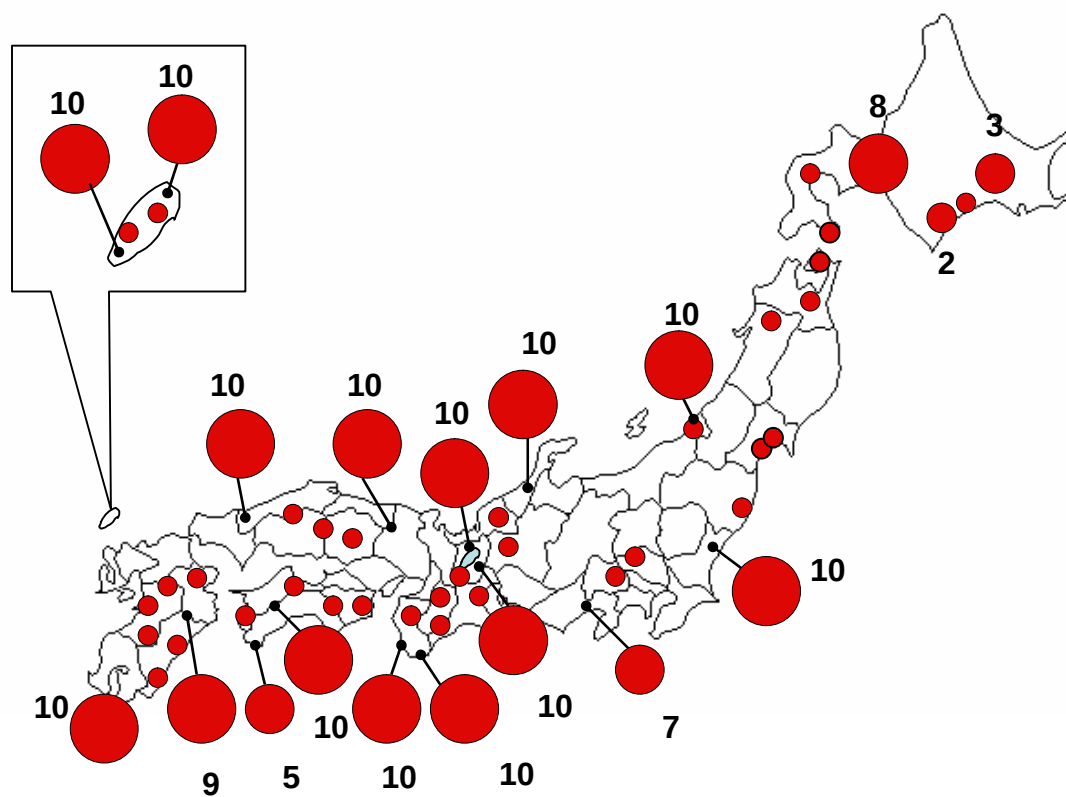


図2. サンプリング地点とサンプル数.
数字はサンプル数(表示のない地点は1)、○の大きさはサンプル数に比例する.

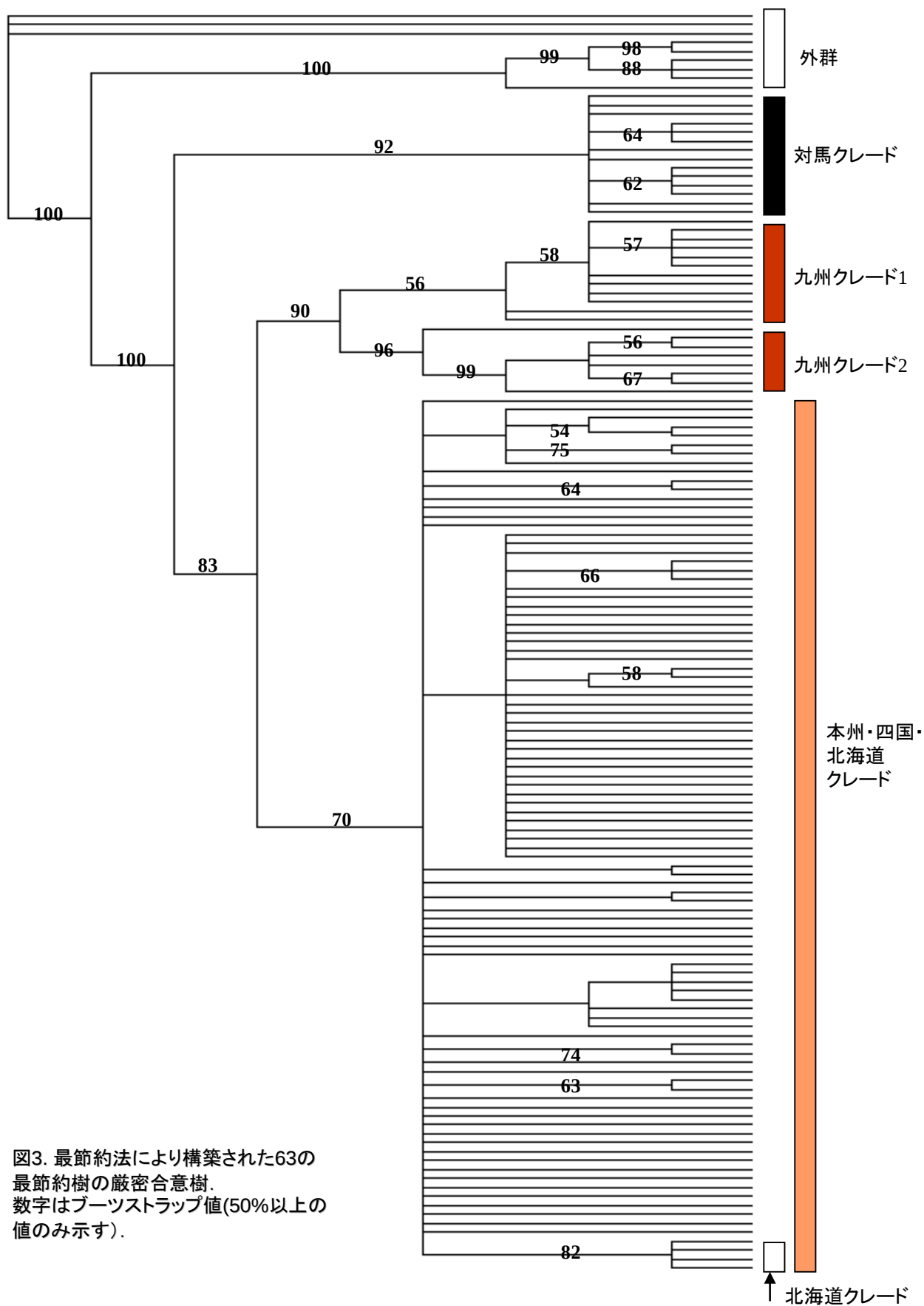


図3. 最節約法により構築された63の最節約樹の厳密合意樹. 数字はブーツストラップ値(50%以上の値のみ示す).

表1. 採集地点とサンプル数および検出されたハプロタイプ番号(括弧内の数字は検出された個数)

地域集団グループ	地域集団	個体数	ハプロタイプ番号
対馬	対馬北部 仁田川	10	1 (3), 2 (1), 3 (2), 4 (1), 5 (1), 6 (1), 9 (1)
	対馬南部 瀬川	10	3 (2), 7 (1), 8 (1), 10 (1), 11 (1), 12 (1), 13 (2), 14 (1)
	対馬 三根川	1	3 (1)
	対馬 佐須川	1	13 (1)
九州	鹿児島南部	10	15 (3), 16 (1), 17 (1), 18 (2), 19 (1), 20 (2)
	宮崎 五ヶ瀬川	9	15 (1), 21 (1), 22 (1), 23 (1), 24 (1), 25 (1), 26 (1), 27 (1), 28 (1)
	宮崎 一ノ瀬川	1	29 (1)
	宮崎 広渡川	1	30 (1)
	熊本 菊池川	1	32 (1)
	熊本 万江川	1	33 (1)
	熊本 市の俣川	1	31 (1)
	大分	1	34 (1)
四国	高知 橋原川	10	35 (1), 36 (1), 37 (3), 40 (1), 41 (1), 43 (1), 44 (1), 45 (1)
	高知 福良川	5	38 (1), 39 (1), 42 (1), 46 (1), 47 (1)
	高知 穴内川	1	37 (1)
	愛媛 重信川	1	68 (1)
	愛媛 津島	1	37 (1)
	徳島	1	37 (1)
本州	兵庫	10	37 (3), 71 (1), 72 (1), 73 (1), 74 (1), 75 (1), 76 (1), 77 (1)
	島根	10	37 (2), 86 (1), 88 (1), 89 (1), 90 (1), 91 (1), 92 (1), 93 (1), 94 (1)
	新潟 中継川	10	63 (1), 66 (1), 100 (2), 118 (1), 119 (1), 120 (1), 121 (1), 122 (1), 123 (1)
	石川	10	37 (2), 78 (1), 79 (1), 80 (1), 81 (1), 82 (1), 83 (1), 84 (1), 85 (1)
	静岡	7	37 (1), 50 (1), 57 (1), 99 (1), 100 (1), 116 (1), 117 (1)
	茨城	10	63 (1), 66 (1), 95 (1), 96 (1), 97 (1), 98 (3), 99 (1), 100 (1)
	紀伊 田辺	10	49 (1), 52 (1), 54 (1), 55 (2), 56 (1), 57 (1), 60 (1), 61 (1), 65 (1)
	紀伊 古座	10	37 (1), 50 (2), 51 (1), 53 (1), 58 (1), 59 (1), 62 (1), 63 (1), 64 (1)
	滋賀 犬上川	10	50 (1), 63 (2), 104 (1), 105 (2), 111 (1), 113 (1), 115 (1), 131 (1)
	滋賀 安曇川	9	102 (1), 103 (1), 106 (1), 107 (1), 108 (1), 109 (1), 110 (1), 112 (1), 114 (1)
	広島	1	37 (1)
	岡山	1	89 (1)
	島根 塩谷川	1	87 (1)
	紀伊 龍神	1	48 (1)
	奈良	1	55 (1)
	三重 大又川	1	70 (1)
	三重 服部川	1	62 (1)
	滋賀 御池川	1	50 (1)
	山梨	1	69 (1)
	埼玉	1	66 (1)
	福島	1	101 (1)
	福井	1	37 (1)
	新潟 小俣川	1	124 (1)
	岐阜	1	100 (1)
	宮城 仙台 名取川	1	124 (1)
	宮城 仙台 広瀬川	1	130 (1)
	秋田	1	67 (1)
	青森 清水川	1	100 (1)
	青森 大畑川	1	125 (1)
北海道	千歳	8	127 (1), 128 (7)
	阿寒	3	126 (3)
	浦幌	2	128 (2)
	道東 茶路川	1	128 (1)
	道南 尻岸内川	1	129 (1)
	道南 後志利別川	1	128 (1)