

生物多様性調査

遺伝的多様性調査報告書

平成12(2000)年3月

環境庁自然保護局 生物多様性センター



## はじめに

本報告書は、自然環境研究センターが実施した環境庁請負業務「平成11年度 生物多様性調査 遺伝的多様性調査」の結果を取りまとめたものである。本調査は種の多様性調査の一環として行われ、平成11年度は5年間調査の4年目である。

生態系は、多様な種の共生によって成り立っている。生物多様性条約では、生態系レベル、種レベル、および遺伝子レベルの3つのレベルの生物多様性が定義されている。これらのレベルは相互に関連しており、遺伝子レベルの多様性は、種の存続を支え、種レベル、生態系レベルの多様性の維持に貢献している。

遺伝子レベルでの多様性に関し、特に希少生物におけるその減少が種の絶滅の要因となりうることが指摘されており、遺伝子レベルの情報整備は緊急を要する問題である。希少種以外でも、生息地が分断、隔離され、個体群サイズが縮小している種、近親交配で遺伝的多様性が失われつつある種、他地域個体もしくは近縁種個体の移入により遺伝的性質に変化が生じている種等、様々な局面において遺伝子レベルでの多様性把握の重要性、緊急性の高さは広く認められつつある。しかしながら、実効性のある保全計画をたてるには、遺伝子レベルの知見は少なく、取り組みは遅れているといわざるを得ない。

本調査では、遺伝子レベルの多様性保全の基礎情報を収集することを目的とし、日本産のいくつかの種をモデルケースとして、遺伝子レベル調査の分析結果、および今後の調査の方向性について検討を加え、報告するものである。

なお、末尾ながら本調査に協力していただいている遺伝的多様性調査検討委員会のメンバーの方々に心よりお礼申し上げます。

平成12年3月  
財団法人 自然環境研究センター  
理事長 大島 康行

生物多様性調査 遺伝的多様性調査委員会

<検討委員>

太田 英利	琉球大学熱帯生物圏研究センター
小池 裕子	九州大学比較社会文化研究科
鈴木 和雄	山口県立大学生活科学部
鈴木 仁	北海道大学大学院地球環境科学研究科
内藤 親彦	神戸大学農学部
西田 睦	東京大学 海洋研究所
増田 隆一	北海道大学理学部染色体研究施設
松井 正文	京都大学大学院人間・環境学研究科

## 目次

I. 遺伝的多様性調査の背景と目的	1
II. 平成11年度実施調査報告	2
1. 調査概略	2
(1)既存情報の整理	
①遺伝的多様性の分析手法	
②遺伝的多様性保存の現状(追補)	
(2)現地調査	
①調査種の選定	
②調査結果	
(3)分子遺伝学的調査	
①調査手法および目的	
②調査結果	
③分析および考察	
2. DDBJに登録されている塩基配列について	6
(1)DDBJ(DNA Data Bank of Japan)について	
(2) DDBJ/EMBL/GenBank 国際塩基配列データベースについて	
(3)生物種別登録塩基数について	
(4)日本産野生生物種の登録状況について	
(5)今後の課題等	
3. 哺乳類(小型)	12
(1)調査対象種	
(2)ヒミズ類の生息分布調査と試料採取	
(3)遺伝的多様性調査研究	
①日本産ヒミズ類の地理的分化	
②種内変異のレベル	
(4)考察	
(5)謝辞	
(6)引用文献	
4. 哺乳類(中・大型)	18
(1)遺伝的多様性関連情報の追加	
(2)遺伝的多様性調査の結果報告	
①目的	
②調査対象種・標本	
③調査方法	

④結果・考察	
(3)謝辞	
(4)参考文献	
5. 鳥類.....	25
(1)調査対象種	
(2)調査方法	
①DNAの抽出	
②DNAの増幅	
③DNA-塩基配列決定	
(3)調査結果と考察	
①コントロール領域の構造	
②置換頻度	
③脱落羽毛を用いたDNA増幅	
④ハプロタイプの検出	
⑤ハプロタイプ多様度	
⑥分子系統樹	
6. 爬虫類.....	36
(1)遺伝的多様性関連情報の追加	
(2)遺伝的多様性調査 調査結果報告	
①調査選定種	
②方法	
③結果	
④考察	
(3)引用文献	
7. 両生類.....	51
(1)現地調査	
①調査選定種	
②現地調査結果	
(2)分子遺伝学的調査	
①調査目的	
②調査手法	
③調査結果	
④分析および考察	
(3)引用文献	
8. 淡水魚類.....	64
(1)調査対象種と調査目的	

(2)調査手法	
(3)調査結果	
①遺伝的変異	
②種間の系統類縁関係	
(4)分析および考察	
①遺伝的分化と系統関係	
②遺伝的集団構造と生物地理	
(5)引用文献	
9. 昆虫類	71
(1)遺伝的多様性調査関連情報	
(2)遺伝的多様性調査 調査結果報告	
①調査選定種	
②調査方法-予備解析	
③ミトコンドリア COII遺伝子領域における遺伝的な変異	
(3)ハナカミキリ類の酷似する種群間の遺伝的多様性	
①この群の背景と研究の目的	
②研究の方法	
③研究対象群	
④解析結果	
⑤まとめ	
10. 高等植物	112
(1)現地調査	
①調査選定種	
②現地調査結果	
(2)分子遺伝学的調査	
①調査目的	
②調査方法	
③調査結果	
④分析および考察	
(3)引用文献	
Ⅲ. 本年度調査の評価	117





## I. 遺伝的多様性調査の背景と目的

生物多様性条約は、①生態系レベル、②種レベル、③遺伝子レベル、の3つのレベルの生物多様性を含むと定義している。各レベルの要素は、遺伝子レベルの多様性が種レベルの構成に、種レベルの多様性が生態系レベルの多様性の構成に相互に関係しており、種の生存や生物群集の維持に必要な相互関連をつくっている。

種の遺伝的多様性の減少は、生存に悪影響をおよぼす遺伝子の発現頻度を高めたり、繁殖障害を引き起こすことが従来から知られている。一方、野生生物種に関し、人工飼育などの手法で生息地域外(=“*ex situ*”)で保全した場合、種の保全は可能な場合であっても、遺伝的多様性のレベルを野生環境下と同等に維持することは一般に困難である。その結果、遺伝子レベルの多様性の維持のためには、“*in situ*”での保全を考えることが極めて重要であることが分かってきた。

すなわち、集団や種の野生下での現状を遺伝的な側面から診断、把握し、モニタリングしていくことは、適切な保全計画をたてる上で必要な作業である。しかし、野生生物種内の遺伝子レベルの情報はほとんど蓄積されていないのが現状である。実効的な遺伝的多様性保全の前提として、情報の十分でない野生生物の遺伝的多様性を調査することが急務である。

以上を踏まえ、本調査は、生物多様性調査の一環として、野生生物の遺伝的多様性に関する基礎情報の収集とその把握手法の検討に焦点を絞り、行われたものである。

## Ⅱ. 平成11年度実施調査報告

### 1. 調査概略

本調査では、前年度に引き続き、遺伝的多様性の情報分析の観点から既存情報の整理、遺伝的多様性の情報蓄積の観点から現地調査による試料の採集、およびそれらの分子遺伝学的解析を実施した。対象種ごとの調査概略を表1にまとめた。

#### (1) 既存情報の整理

前年度の追補として、前年度の報告書からもれているもの、修正など必要に応じて整理・作成した。

##### ① 遺伝的多様性の分析手法

特に前年度の報告に追加、修正するものはなかった。

##### ② 遺伝的多様性保存の現状(追補)

哺乳類(中・大型)について15点、爬虫類について4点、昆虫類について19点の文献を追加した。

#### (2) 現地調査

試行的に遺伝的多様性を分析するため、調査対象種を選定し、現地調査により試料を捕獲、採取した。分類群ごとに以下の項目を中心に解説、報告を行った。

##### ① 調査種の選定

本年度調査において各委員が選定した種およびその理由を説明した。表1に希少性(レッドデータブックのランク)をあわせて示したが、本年度もレッドリスト掲載種が多く対象種に選ばれた。

##### ② 調査結果

現地調査および試料収集の結果について概略を述べた。

#### (3) 分子遺伝学的調査

現地調査で得られた試料の遺伝子分析結果から、分子遺伝学・分類学などの専門家の意見を得ながら、遺伝的多様性の調査を行った。

##### ① 調査手法

選定された手法等は前年度とほぼ同じ傾向である。解析領域としてミトコンドリアDNAが、手法としてPCRによる遺伝子増幅-ダイレクトシーケンスが採用される傾向が強かった。一方で核型による解析の併用により、DNAレベルとは異なる調査が行われた種もあった。比較的安価な手法としてアロザイム解析もいくつかの種で採用された。

##### ② 調査結果

調査結果については、個々の状況が異なるため、省略した。詳細については、次項および各論参照のこと。

##### ③ 分析および考察

本年度の調査傾向として、希少種の近縁種間と種内での分岐分類学的類縁関係、ならびに多様性を分子レベルではかる研究が多く行われた。

平成11年度 遺伝的多様性調査 実施概要

種名	希少性等	解析サンプル	解析領域	解析方法	解析結果	考察
ヒメミズ	日本固有種	それぞれの核型集団より採取した40個体	ミトコンドリアDNA Cytb遺伝子領域1140bp	塩基配列	ヒメミズは東西に分かれ、さらに鮮明な地理的分化が認められる。	ヒメミズは予想以上に大きな地理的変異性を示し、多様性の度合いの高さは、保全にむけた枠組みの設定等を考える上で考慮しなければならない情報のひとつであると思われる。今回の結果は、保全の枠組みとして、九州、四国、紀伊半島、信州、東北をそれぞれ極めて特異性の高い地域集団として位置付けなければならない可能性を示唆している。
ヒメヒメミズ	日本固有種	宮崎県椎葉村大河内峠九十、東牟婁郡古座川町、四国(剣山)、長野県、青森県計7個体			ヒメヒメミズの2つのグループ間の変異はヒメミズ-ヒメヒメミズ間の変異と同等のレベルとも受け取れるほど大きい。	
ニホンイタチ	-	日本産	染色体	ギムザ染色通常核型、Gバンド核型、Cバンド核型分析	染色体数はともに38本。ギムザ染色通常核型、Gバンド核型、Cバンド核型は大きく異なっていた。	核型の違いとこれまでに得られた分子系統のおよび外部形態的差異は、両イタチを別種とすることの妥当性を示している。よって、ニホンイタチを日本固有の独立種Mustela itatsiと結論づけてよいと考える。
シベリアイタチ	-	日本産				
イズナ	準絶滅危惧(NT) ※ニホンイズナとして	日本産(北海道、本州)、大陸産(中央アジア、シベリア-東ヨーロッパ)	ミトコンドリアDNAコントロール領域(約570~580塩基)	PCR-直接塩基配列決定	クラスターBは中央アジアグループのみで形成、クラスターAには、中央アジアグループ、シベリア-東ヨーロッパグループ、北海道グループ、本州グループが含まれ、本州グループはシベリアグループに最も近い。	
オコジョ	準絶滅危惧(NT) ※エゾオコジョ、ホンドオコジョとして	日本産、大陸産				ユーラシア大陸において遺伝的変異幅が極めて小さく、遺伝距離は地理的距離を反映しなかった。日本列島内でも本州と北海道間の遺伝距離は小さく、ユーラシアにおいて極めて短期間に分布拡大したことを示唆している。
イタチ属	-	日本産、大陸産	ミトコンドリアDNA Cytb遺伝子領域1140bp	PCR-直接塩基配列決定		分子系統関係は、形態データによる系統関係とほぼ一致した。
ナベヅル	絶滅危惧II類(VU)	(1) 出水で死亡した個体 (2) 生息地で発見される脱落羽毛	ミトコンドリアDNA コントロール領域全体(ナベヅル: 1097塩基対)/Region 1	PCR-直接塩基配列決定	脱落羽毛から抽出されたDNAを用いて、約400塩基対のPCR産物が得られた。マナヅル羽根試料15サンプルおよびナベヅル羽根試料15サンプルを用いて10個のハプロタイプを同定した。マナヅル、ナベヅルは非常に高い遺伝的多様性を示しアデリーペンギンやキョウジョシギとならんで、もっとも多様度が高いグループに位置する。	
マナヅル	絶滅危惧II類(VU)					
オガサワラヤモリ	-	屋嘉比島・座間味島、宮古島・大神島・多良間島・来間島、石垣島・西表島・黒島・与那国島、小笠原諸島父島・母島・北大東島・南大東島計22個体	染色体・タンパク	核型・アロザイムの変異	142個体で核型の決定に成功。21遺伝子座のうち、13遺伝子座で変異。14のクローンが確認。	近縁両性生殖種のない石垣島産の不稔の雄型個体に関し、今回の結果からホルモン性の性転換に由来する仮説が強く支持された。大東諸島の3個体のクローンは、2倍体のオガサワラヤモリと両性生殖の雄との交雑に由来すると考えられる。
ハクバサンショウウオ	絶滅危惧II類(EN)	ハクバサンショウウオ(長野県白馬村産18個体)、ヤマサンショウウオ(富山県有峰産13個体、岐阜県天生峠産7個体)、トウホクサンショウウオ(福島県原町市産5個体)とカスミサンショウウオ(滋賀県日野町産4個体)	19酵素24遺伝子座	アロザイム	岐阜県天生峠産のヤマサンショウウオが、富山県有峰産ヤマサンショウウオとハクバサンショウウオの成す群から最初に分かれたが、その遺伝距離は小さな値であった。後二者の間の遺伝距離は、きわめて小さかった。	それぞれが独立の種とされているハクバサンショウウオとヤマサンショウウオは、各地での分化の程度が低く、遺伝的に極めて類似した動物群であることが明らかである。今回の結果は、ハクバサンショウウオとヤマサンショウウオが同種である可能性を極めて強く示唆している。分類学的変更を行う場合、レッドリストにおけるランクの見直しは必要なものの、広義のハクバサンショウウオをレッドリストに掲載し、保護の対象とせざるを得ない状況は変わらないであろう。
ヤマサンショウウオ	-					
静岡産未記載サンショウウオ	考察参照	静岡産未記載サンショウウオ(静岡市、藤枝市、水窪町産合計13個体)、トウキョウサンショウウオ(神奈川県横須賀市産5個体)、ヒダサンショウウオ(福井県武生市産5個体) プチサンショウウオ(滋賀県土山町産5個体)	合計16酵素25遺伝子座	アロザイム	静岡産未記載のサンショウウオと、残り2種(トウキョウサンショウウオとプチサンショウウオ)が、大きな遺伝距離をもって区分された。	静岡産未記載サンショウウオは、比較的用いた止水産卵性のトウキョウサンショウウオ、流水産卵性のヒダサンショウウオ、プチサンショウウオのいずれとも遺伝的に大きく異なることが明らかになった。完全に独立種であると判断されるから、早急に分類学的な記載を行う必要がある。現在、何ら保護を受けていないが、早急に保護保全の対策をとる必要があると考えられる。
スナヤツメ(北方型と南方型)	絶滅危惧II類(VU)	日本列島のほぼ全域にわたる38地点、および朝鮮半島南部の3地点の計41地点。	ミトコンドリアDNA COI遺伝子領域1085塩基対bp	PCR-直接塩基配列決定	Petromyzon marinusとLampetra fluviatilisを外群として用いた場合、スナヤツメ二種の単系統性は支持されなかった。	今回の解析結果から、スナヤツメ二種が、mtDNAレベルでも交流していないことが示された。アロザイム解析に基づき推定した結果、カワヤツメ、シベリアヤツメおよびスナヤツメ北方種の3者が近縁な関係にあり、これら比べてスナヤツメ南方種は高度に遺伝的分化を遂げていた。
ゲンジボタル	-	38地点で316サンプル	ミトコンドリアDNA COI1遺伝子領域800bp	PCR-RFLP	18のハプロタイプが確認され、{(北九州・南九州)}・{(西日本・中部)・(関東・東北)}のような入れ子構造が認められた。	分布のパターンから大きく6つのハプロタイプグループに分けられた。また、発光間隔からみた2秒型と4秒型の違いは、ハプロタイプグループ間の関係から東北と関東グループの祖先型において2秒型から4秒型が派生してきたものと考えられる。

平成11年度 遺伝的多様性調査 実施概要

種名	希少性等	解析サンプル	解析領域	解析方法	解析結果	考察
ハナカミキリ類 (ヤツボシハナカミキリ種群とヒメハナカミキリ属)	-	-	ミトコンドリアDNAのND5遺伝子領域810bp	PCR-直接塩基配列決定	ヤツボシハナカミキリは大きくみるとひとつの群にまとまっており、西日本と東日本および大陸の集団の3つに大別されるという結果になった。興味深い点は、上翅斑紋の表現型よりも地域的なくくりで集団が形成されているようになっている。ヒメハナカミキリ属(Pidonia)の4つの亜属の単系統性は支持された。しかし、Pidonia亜属のトウカイヒメハナカミキリ、Cryptopidonia亜属のオヤマヒメハナカミキリは従来含まれていた亜属から独立していることが新たにわかった。チャイロヒメハナカミキリ集団はサドチャイロヒメハナカミキリを完全に含み、この種は対馬の亜種よりも基亜種に近い関係にあることがわかった	
トキワイカリソウ	-	地理的分布からトキワイカリソウと考えられる5集団、バイカイカリソウ3集団、交雑帯に位置する7集団の計15集団	ゲノムDNA	Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	交雑によって集団の遺伝的多様性が高く維持されていることが分かった。交雑現象の進化的意義として、ことなる遺伝的組成の7種から、新しい遺伝的組成の個体が生じることが指摘されているが、そのような状況が実際に起こりうることを本調査では明らかにしたといえる。形態的にはバイカイカリソウもしくはトキワイカリソウの典型的な形を示している集団でも、遺伝的変異が大きい集団が見られた。形態形質には強い自然選択が働いているために、一方の種に近い形態が維持されているためではないかと考えられる。	
バイカイカリソウ	-					

## 2. DDBJ に登録されている塩基配列について

現在の分子遺伝学的研究にとって、塩基配列決定の作業は極めて日常的に行なわれるようになってきた。本調査のような遺伝的多様性調査においても塩基配列解析および系統樹作成は、基礎情報としてより取り上げられることが多くなると予想される。

既存の塩基配列情報は DDBJ を初めとする国際塩基配列データベースに登録することで全世界の研究者が共有できる形が整えられている。ここでは、全生物の塩基配列解析の進行状況を概観するため、DDBJ、ならびに DDBJ に登録されている塩基配列の生物種別の状況を紹介する。

### (1) DDBJ(DNA Data Bank of Japan)について

DDBJ は、欧州の EBI/EMBL および米国の NCBI/GenBank と国際塩基配列データベースを構築している三大国際 DNA データバンクのひとつで、静岡県三島市にある国立遺伝学研究所内に設置されている。DDBJ が管理・収集している塩基配列データベースは、リリースとして年 4 回公開されている。リリース 41 のエントリー数は 5,962,608、総塩基数は 6,409,581,885bp である。1 年前のリリース 37 と比較すると増加率はエントリー数 80%、総塩基数 170% である。登録塩基数の増加の推移から見て、2000 年以内に登録総塩基数は 100 億 bp を突破すると思われる。

### (2) DDBJ/EMBL/GenBank 国際塩基配列データベースについて

DDBJ/EMBL/GenBank 国際塩基配列データベースとは、全世界の研究者が実験によって決定した DNA(または RNA)の塩基配列データを DDBJ/EMBL/GenBank の間で定めたデータ構築規範に沿って収集・編集し、コンピュータファイルのかたちで提供するものを指す。塩基配列のほか、配列を決定した研究者、関連文献、生物種、遺伝子の機能、特性等に関する情報を含んでいる。研究者が利用できるようにオンライン等でデータを公開している。逆に、最終的な論文発表などを目的として塩基配列の解析を行なう際には、これらのデータバンクに配列を登録することは半ば常識化しており、情報共有のためのスタンダードとしてすでに確立されている。

### (3) 生物種別登録塩基数について

Web 上で公開されている登録塩基数の多い生物種上位 1000(DDBJ release 42)を元に表を作成した(表1)。上位 50 種に関してはすべて和名(通称)を付記し、それ以下の種に関しては、日本産野生生物、および代表的な種について付記した。最上位は当然であるが、ヒトである。2 位以下の上位にランクされている種はいわゆる実験動物が多く、それ以外は農作物、病原菌などの疫学的に重要な種で占められる。

#### (4) 日本産野生生物種の登録状況について

特記すべき種として、トラフグの登録塩基数が極めて多い(第 20 位)が、これは脊椎動物としては極めてゲノムサイズが小さいので、脊椎動物ゲノムプロジェクトのモデル生物として解析が進められているためである。このトラフグ、そしてイノシシ(ただし、多くは家畜化したブタの解析)、小型齧歯類のような実験動物としてもよく使われている少数の例外を除くと、日本にも生息する野生種のうち、上位 50 種に特筆すべき種はない。

範囲を広げて、在来、非在来を問わず、日本国内に生息する生物種の 50 位以下 1000 位までの主なものをあげると、アナウサギ(57 位)、イヌ(79 位)、セイヨウアブラナ(102 位)、コムギ(110 位)、ウマ(121 位)、ニジマス(138 位)、アカゲザル(163 位)、メダカ(165 位)、ホウレンソウ(168 位)、クマネズミ(171 位)、テンジクネズミ(172 位)、コイ(173 位)、ムラサキウマゴヤシ(178 位)、ネコ(186 位)、ヤギ(191 位)、トウゴマ(204 位)、セイバンモロコシ(205 位)、フダンソウ(212 位)、ノラニンジン(241 位)、ナイルティラピア(258 位)、タイセイヨウサケ(267 位)、ソラマメ(287 位)、ヤママユ(295 位)、アメリカナマズ(303 位)、キュウリ(310 位)、ウシガエル(384 位)、カラスムギ(430 位)、リョクトウ(461 位)、ライムギ(472 位)、クロマツ(489 位)、ニチニチソウ(515 位)、マガモ(539 位)、サケ(550 位)、スギ(559 位)、ドバト(569 位)、ダイコン(593 位)、アサガオ(603 位)、イモリ(610 位)、シロガラシ(612 位)、セイヨウカラシナ(620 位)、タマネギ(652 位)、ミツバチ(672 位)、ヤマナシ(676 位)、ホウライシダ(696 位)、ミンク(697 位)、マルバアサガオ(698 位)、ヨーロッパウナギ(724 位)、テッポウユリ(805 位)、ウナギ(815 位)、モモ(833 位)、オニドコロ(950 位)、オキナワハツカネズミ(983 位)、ギンザケ(995 位)があげられる。

以上のように、塩基配列情報の蓄積は種によって極めて偏りがあり、特に当調査で注目している希少種のようなものは上位 1000 種にはほとんど現れない。

#### (5) 今後の課題等

全体として、野生生物種の情報集積は期待されるものの、全ゲノムの解明までを語る状況にはなく、既存データの利用以前のデータ集積にとどまっているといえる。本調査の目的から見て、単純に種ごとの解析塩基配列総数を比較する必要はないが、一方で極めて限定された遺伝子解析しか行われていないことも事実である。

本調査等で明らかになった塩基配列情報を積極的に登録して、野生生物種の塩基配列データの充実に努めるべきである。また、当該種の塩基配列解析が進んでいなくても、遺伝マーカー開発などにおいては近縁種の塩基配列情報を利用できる場合がある。そういった点から、解析上位に近縁種がある種をターゲットに調査を進めることは、効率的であると考えられる。

表1 生物種別 DDBJ登録塩基数

No.	Organisms	Nucleotides(bp)	Entries	和名/通称
001	<i>Homo sapiens</i>	5655573401	3184947	ヒト
002	<i>Mus musculus</i>	746290379	1615485	ハツカネズミ
003	<i>Drosophila melanogaster</i>	483759334	152721	ショウジョウバエ
004	<i>Arabidopsis thaliana</i>	231111248	169113	シロイヌナズナ
005	<i>Caenorhabditis elegans</i>	199714201	106374	線虫
006	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	150727257	174026	フグ類(ミドリフグ?)
007	<i>Oryza sativa</i>	103128543	153153	イネ
008	<i>Rattus norvegicus</i>	69729606	142629	ドブネズミ
009	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	47565263	77521	北米産ウニ類
010	<i>Glycine max</i>	38708270	90316	ツルマメ
011	<i>Giardia intestinalis</i>	38669845	44226	ランブル鞭毛虫
012	<i>Lycopersicon esculentum</i>	38618305	75165	トマト
013	<i>Danio rerio</i>	37574584	78395	ゼブラフィッシュ
014	Unknown.	36763721	132005	-
015	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32976398	18431	イースト
016	<i>Zea mays</i>	32278011	66319	トウモロコシ
017	<i>Rattus sp.</i>	29305153	67312	ラット類
018	<i>Trypanosoma brucei</i>	29172840	47866	トリパノゾーマの一種
019	<i>Bos taurus</i>	22698842	53766	ウシ
020	<i>Fugu rubripes</i>	22368423	42774	トラフグ
021	<i>Medicago truncatula</i>	21267583	37119	アルファルフア近縁種
022	Human immunodeficiency virus type 1	20014719	41581	AIDSウイルス
023	<i>Xenopus laevis</i>	19166240	33012	アフリカツメガエル
024	<i>Escherichia coli</i>	19070514	5945	大腸菌
025	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	17522585	10419	分裂酵母
026	<i>Anopheles gambiae</i>	17225724	24023	ハマダラカの一種
027	<i>Gallus gallus</i>	14356757	19224	チキン、セキショクヤケイ
028	<i>Sus scrofa</i>	13692066	32228	ブタ、イノシシ
029	Unidentified	13657095	44637	-
030	<i>Plasmodium falciparum</i>	12160767	5960	熱帯熱マラリア原虫
031	<i>Neurospora crassa</i>	12097997	25170	アカパンカビ
032	<i>Leishmania major</i>	11722447	14154	Leishmania major原虫
033	<i>Bombyx mori</i>	10672803	15417	カイコガ
034	<i>Sorghum bicolor</i>	10545067	21850	モロコシ
035	<i>Gossypium arboreum</i>	10404411	13691	キワタ
036	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	10379859	20062	クラミドモナス
037	<i>Bacillus subtilis</i>	10132517	1125	枯草菌
038	<i>Dictyostelium discoideum</i>	9793743	20212	細胞性粘菌
039	<i>Lotus japonicus</i>	9367418	26017	ミヤコグサ
040	<i>Trypanosoma cruzi</i>	9191186	22678	トリパノゾーマの一種
041	<i>Pyricularia grisea</i>	8912296	13873	メヒジバいもち病菌
042	<i>Brugia malayi</i>	8827749	22259	マレー糸状虫
043	<i>Hordeum vulgare</i>	7957615	9671	オオムギ
044	<i>Pinus taeda</i>	7386224	16541	テーダマツ
045	<i>Streptomyces coelicolor</i>	7117760	449	放線菌
046	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	6745466	10347	アイスプラント(園芸名:花泉)
047	<i>Gossypium hirsutum</i>	5970976	9766	ワタ
048	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5834263	778	結核菌
049	<i>Cryptosporidium parvum</i>	5308180	8067	クリプトスポリジウム(原虫)
050	Synthetic construct	5258437	18971	合成由来
051	<i>Schistosoma mansoni</i>	5181745	13227	
052	<i>Toxoplasma gondii</i>	5144441	12476	
053	<i>Onchocerca volvulus</i>	4841719	11318	
054	<i>Porphyra yezoensis</i>	4750624	10223	
055	<i>Aspergillus nidulans</i>	4322385	12737	
056	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	4069307	6628	
057	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	4041082	4969	アナウサギ



表1 生物種別 DDBJ登録塩基数

No.	Organisms	Nucleotides(bp)	Entries	和名/通称
058	<i>Neisseria meningitidis</i>	3977870	1558	
059	Hepatitis c virus	3975276	7995	
060	<i>Synechocystis</i> sp.	3834669	151	
061	<i>Deinococcus radiodurans</i>	3359319	267	
062	<i>Mycobacterium leprae</i>	3210803	192	
063	<i>Physcomitrella patens</i>	2961117	7551	
064	<i>Meloidogyne incognita</i>	2831278	5841	
065	<i>Halocynthia roretzi</i>	2806558	4254	
066	<i>Borrelia burgdorferi</i>	2500385	1003	
067	<i>Salmonella typhimurium</i>	2310037	1702	
068	<i>Neisseria meningitidis mc58</i>	2284501	206	
069	<i>Eimeria tenella</i>	2227109	5436	
070	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	2208654	186	
071	<i>Pneumocystis carinii</i> f. sp. <i>carinii</i>	2107763	3916	
072	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	2077186	5219	
073	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	2052790	247	
074	<i>Thermotoga maritima</i>	2046198	204	
075	<i>Nicotiana tabacum</i>	2005485	1421	
076	<i>Staphylococcus aureus</i>	1993566	842	
077	<i>Solanum tuberosum</i>	1990676	2433	
078	<i>Campylobacter jejuni</i>	1986512	238	
079	<i>Canis familiaris</i>	1942815	2855	イヌ
080	<i>Populus tremula</i> x <i>populus tremuloides</i>	1915862	4841	
081	<i>Pristionchus pacificus</i>	1914461	4996	
082	<i>Haemophilus influenzae rd</i>	1841837	165	
083	<i>Medicago truncatula/glomus versiforme mixed est library</i>	1785721	3259	
084	<i>Pyrococcus abyssi</i>	1784306	17	
085	<i>Methanococcus jannaschii</i>	1751285	156	
086	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	1742678	10	
087	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1725278	838	
088	<i>Aeropyrum pernix</i>	1709144	17	
089	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1694220	1248	
090	<i>Helicobacter pylori 26695</i>	1675581	134	
091	Influenza a virus	1672753	1526	
092	<i>Helicobacter pylori j99</i>	1651611	132	
093	<i>Aquifex aeolicus</i>	1595349	110	
094	Simian immunodeficiency virus	1562993	1864	
095	<i>Candida albicans</i>	1546079	733	
096	<i>Lycopersicon pennellii</i>	1532756	2939	
097	<i>Pan troglodytes</i>	1478619	1095	
098	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	1478461	239	
099	<i>Rickettsia prowazekii</i>	1462169	533	
100	<i>Paralichthys olivaceus</i>	1447515	2090	
101	<i>Chlamydia trachomatis</i>	1421446	945	
102	<i>Brassica napus</i>	1393008	2295	セイヨウアブラナ
103	<i>Mus</i> sp.	1392623	1737	
104	<i>Ovis aries</i>	1377595	1662	
105	<i>Emericella nidulans</i>	1315278	662	
106	<i>Treponema pallidum</i>	1314337	190	
107	<i>Pisum sativum</i>	1298518	989	
108	Measles virus	1254680	939	
109	<i>Chlamydophila pneumoniae ar39</i>	1235433	94	
110	<i>Triticum aestivum</i>	1229257	1055	コムギ
111	<i>Helicobacter pylori</i>	1214591	1330	
112	<i>Ancylostoma caninum</i>	1197550	3337	
113	<i>Aedes aegypti</i>	1186634	1515	
114	<i>Ciona intestinalis</i>	1179765	1660	

表1 生物種別 DDBJ登録塩基数

No.	Organisms	Nucleotides(bp)	Entries	和名/通称
115	Hepatitis b virus	1167544	1415	
116	<i>Pseudomonas putida</i>	1154266	456	
117	<i>Chlamydia muridarum</i>	1128687	108	
118	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1058745	211	
119	<i>Metarhizium anisopliae</i>	1043810	1723	
120	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1028400	1019	
121	<i>Equus caballus</i>	1023285	1760	ウマ
122	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	992562	160	
123	<i>Mitochondrion homo sapiens</i>	978995	3109	
124	<i>Lactococcus lactis</i>	976252	392	
125	<i>Lycopersicon hirsutum</i>	968287	1862	
126	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	942123	2479	
127	<i>Strongyloides stercoralis</i>	939124	2218	
128	<i>Unidentified cloning vector</i>	923236	385	
129	<i>Yersinia pestis</i>	908338	151	
130	<i>Drosophila pseudoobscura</i>	901101	541	
131	<i>Marchantia polymorpha</i>	893375	1442	
132	<i>Unidentified bacterium</i>	867087	1530	
133	<i>Schistosoma japonicum</i>	864771	1824	
134	Human herpesvirus 5	858557	594	
135	<i>Eremothecium gossypii</i>	856967	1176	
136	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	854645	162	
137	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	854275	322	
138	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	840450	834	ニジマス
139	<i>Manduca sexta</i>	837026	1099	
140	<i>Vibrio cholerae</i>	822126	467	
141	<i>Drosophila simulans</i>	817301	736	
142	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	802570	403	
143	<i>Bacillus thuringiensis</i>	784496	299	
144	<i>Mycoplasma genitalium</i>	767896	392	
145	Vaccinia virus	766263	199	
146	<i>Brassica rapa</i>	758717	2123	
147	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	758257	464	
148	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	757318	596	
149	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	752112	164	
150	<i>Brucella abortus</i>	736351	1489	
151	Hepatitis g virus	729766	1569	
152	<i>Mentha x piperita</i>	708456	1326	
153	Tt virus	707398	2112	
154	<i>Kluyveromyces lactis</i>	699687	935	
155	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	694490	1180	
156	Human herpesvirus 1	692842	353	
157	<i>Drosophila virilis</i>	682885	375	
158	<i>Mesocricetus auratus</i>	682853	495	
159	<i>Cricetulus griseus</i>	676754	362	
160	Human immunodeficiency virus type 2	674493	1199	
161	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	662677	378	
162	<i>Ceratodon purpureus</i>	657360	1683	
163	<i>Macaca mulatta</i>	655375	1001	アカゲザル
164	Human herpesvirus 4	639677	280	
165	<i>Oryzias latipes</i>	636817	448	メダカ
166	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	633728	306	
167	<i>Zymomonas mobilis</i>	632920	68	
168	<i>Spinacia oleracea</i>	627559	305	ホウレンソウ
169	Dengue virus type 2	626656	327	
170	<i>Oryza sativa/pyricularia oryzae mixed est library</i>	622072	962	
171	<i>Rattus rattus</i>	621124	504	クマネズミ

表1 生物種別 DDBJ登録塩基数

No.	Organisms	Nucleotides(bp)	Entries	和名/通称
172	<i>Cavia porcellus</i>	613600	427	テンジクネズミ
173	<i>Cyprinus carpio</i>	606634	655	コイ
174	Human t-cell lymphotropic virus type 1	595700	911	
175	Human herpesvirus 6	592664	60	
176	<i>Mus musculus domesticus</i>	586987	647	
177	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	586693	82	
178	<i>Medicago sativa</i>	571177	942	ムラサキウマゴヤシ
179	<i>Aspergillus niger</i>	564584	591	
180	<i>Haemophilus influenzae</i>	561214	358	
181	<i>Pleuronectes americanus</i>	558175	944	
182	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus	543995	231	
183	Variola virus	540786	38	
184	<i>Rhizobium</i> sp. ngr234	539795	47	
185	<i>Globodera rostochiensis</i>	532592	919	
186	<i>Felis catus</i>	526310	957	ネコ
187	Jc virus	513174	744	
188	<i>Entamoeba histolytica</i>	506917	802	
189	Japanese encephalitis virus	506792	399	
190	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	503428	236	
191	<i>Capra hircus</i>	500083	911	ヤギ
192	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	499700	207	
193	<i>Takifugu rubripes</i>	496654	377	
194	<i>Biomphalaria glabrata</i>	492094	1217	
195	<i>Populus balsamifera</i> subsp. <i>trichocarpa</i>	489482	925	
196	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	484279	710	
197	African swine fever virus	482902	184	
198	Influenza b virus	478614	409	
199	<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	474834	167	
200	<i>Pseudomonas</i> sp.	474173	245	
201	Hepatitis gb virus c	472220	1008	
202	<i>Salmonella enterica</i>	468806	310	
203	<i>Plasmodium vivax</i>	460211	673	
204	<i>Ricinus communis</i>	445872	830	トウゴマ
205	<i>Sorghum halepense</i>	439974	1204	セイバンモロコシ
206	<i>Gorilla gorilla</i>	438561	480	
207	<i>Citrus unshiu</i>	431899	1286	
208	Uncultured eubacterium	428947	724	
209	Newcastle disease virus	427433	466	
210	<i>Coliphage t4</i>	424190	155	
211	<i>Bacillus</i> sp.	415576	207	
212	<i>Beta vulgaris</i>	413970	386	フダンソウ
213	<i>Yarrowia lipolytica</i>	412659	267	
214	Equine infectious anemia virus	406440	377	
215	<i>Drosophila subobscura</i>	403846	217	
216	<i>Cladosporium fulvum</i>	401964	623	
217	<i>Salmonella typhi</i>	399146	85	
218	Rabies virus	397874	510	
219	Fowlpox virus	394963	32	
220	Venezuelan equine encephalitis virus	394842	157	
221	<i>Phaseolus vulgaris</i>	392702	321	
222	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	391034	78	
223	<i>Bacillus anthracis</i>	387487	61	
224	<i>Enterococcus faecalis</i>	386899	194	
225	<i>Yersinia enterocolitica</i>	384313	166	
226	<i>Petunia x hybrida</i>	382654	267	
227	Mouse cytomegalovirus 1	377114	129	
228	<i>Myxococcus xanthus</i>	376750	141	

### 3. 哺乳類(小型)

北海道大学大学院地球環境科学研究科 篠原 明男 鈴木 仁  
宮崎医科大学 土屋 公幸  
大阪市立大学 原田 正史

#### (1)調査対象種

平成 11 年度はヒミズ類、モグラ類(食虫目モグラ科)に焦点をあて、その系統学的位置付けおよび種内の遺伝的多様性に関する調査を行った。日本列島には、本州以南の島々に、モグラ科に属する、ヒミズ、ヒメヒミズ、ミズラモグラ、サドモグラ、アズマモグラ、コウベモグラの計 6 種の生息が知られる(阿部, 1994)。このうち前 5 種はわが国の固有種である。この種の多様度・固有度の著しい高さに比べ、ロシア沿海州や朝鮮半島など近隣地域にはコウベモグラ 1 種が生息しているのみである。さらに日本産の場合、各種内で、形態学的あるいは細胞遺伝学的(染色体)に異なる地域集団の存在が知られている。場合によっては、別種としての扱ひも受けている。

モグラ科の遺伝的変異に関する研究報告例は少なく、今回は、集団構造や集団形成の歴史的背景を明らかにすることを目的として、ミトコンドリア DNAの変異に基づく分子系統学的解析を行った。特にヒミズ類 2 種の地理的変異の解析に重点を置いた。サドモグラ、アズマモグラ、コウベモグラの遺伝的多様性については最近の報告が参照できる(Okamoto, 1999; Tsuchiya *et al.*, 2000)。ミズラモグラについて資料の収集が十分でなく、今後の解析課題として残されている。

#### (2)ヒミズ類の生息分布調査と試料採取

ヒミズは北海道、南西諸島を除き、全国にくまなく分布する。ヒミズには核型変異があり、静岡県一富山県上にその境界線が存在する(Harada *et al.*, 2001 Kawada and Obara, 1999)。今回はそれぞれの核型集団より採取した 40 個体を遺伝的解析に用いた。

ヒメヒミズは本州・四国・九州の限られた山塊にのみ分布し、それぞれの個体群は隔離されている。特に九州個体群は捕獲の報告や情報が少なく、絶滅も危惧されている。宮崎県椎葉村大河内峠丸十においてシャーマントラップ 50 台を用いて、平成 10 年 5 月 3 日、5 月 19 日、平成 11 年 3 月 23 日、11 月 28 日の計 4 回の罠がけ(一晚)を行ったところ、4 回目にヒメヒミズ 1 頭(個体番号 KT3227)が捕獲された(採集者:土屋公幸)。これにより、この地域での本種の生息維持が確認された。

ヒメヒミズが紀伊半島に生息することが確認されたのは比較的近年である(清水, 1988; 岩佐, 1998)。今回、紀伊半島南端の東牟婁郡古座川町で採取された個体(MI-68)を解析することができた。他に、四国(剣山、2 個体)、長野県(2 個体)、青森県(岩木山、1 個体)より採取された個体を使用し、計 5 地点からの 7 個体を解析した。

### (3) 遺伝的多様性調査研究

#### ① 日本産ヒミズ類の地理的分化

ヒミズ 40 個体、ヒメヒミズ 7 個体について、ミトコンドリア DNA チトクロム b (Cytb) 遺伝子領域 1140 塩基配列を決定した。Kimura(1980)の 2 パラメーター法を用いて全置換情報から塩基置換度( $d$ )を求め、ついで近隣結合(NJ)法を用いて系統樹を作成した(図 1)。その結果、ヒミズとヒメヒミズの種内変異の地理的要素について以下のことが判明した。

##### a. ヒミズの地理的変異のパターン

- 1) ヒミズ類の Cytb 遺伝子は東西でクラスターが分かれ、それは核型変異の分化と完全に一致する。
- 2) 東日本グループはさらに地理的に分化した 2 つのハプロタイプグループに分けることが可能である。太平洋側と日本海側とに分けることができ、その境界線が岩手県—青森県上にあると推察された。この境界線の位置はアズマモグラの種内変異の境界線との類似性が観察された。詳しい境界線の位置についてはヒミズ、アズマモグラとも現在のところ不明である。
- 3) 西日本グループはまず対馬に他とは大きく異なるハプロタイプが存在した。
- 4) さらに西日本グループは九州、四国、本州に異なるクラスターが存在し、鮮明な地理的分化が認められた。それぞれの枝の長さは同等で、東日本グループ内の分化のレベルとも同等であることが判明した。

##### b. ヒメヒミズの地理的変異のパターン

- 1) ヒメヒミズは 2 つの大きなグループ、四国・九州グループと本州グループとに分けられる。
- 2) 四国と九州のハプロタイプとの間に大きな変異性が認められた。
- 3) 本州グループは、調べた 3 地点がすべて互いに大きな変異性を示した。和歌山、長野、青森との間にはヒミズの核型集団間が示す変異に匹敵するほどの変異性が認められた。

#### ② 種内変異のレベル

次に上に記した種内変異のレベルをモグラ類の場合と比較した。主だった系統を代表する配列を選び、塩基置換情報( $d$ )から NJ 系統樹を作成した。ここで得られたトポロジーを用いて Linearized tree (Takezaki *et al.*, 1995)を作成した(図 2)。枝の長さ(変異の蓄積の早さ)について統計学的検定を行ったところ(two-cluster test; Takezaki *et al.*, 1995)、有意な差は認められず、枝の長さはほぼ時間的尺度を示すものと思われた。この図から以下のことが判明した。

- a. ヒミズの東西の塩基置換度の最大値はアズマモグラやコウベモグラ間のそれとほぼ同等である。
- b. ヒメヒミズの 2 つのグループ間の変異はヒミズ—ヒメヒミズ間の変異と同等のレベルとも受け取れるほど大きい。
- c. ヒメヒミズは調べた 5 地点間でそれぞれ大きな特異性を示すハプロタイプを持

つものと思われる。

#### (4) 考察

ヒミズ類は日本列島内で鮮明な地理的変異性を示す。ヒミズ類の遺伝的多様性の度合いの高さの理由は進化的に長い間列島内でその系統を維持した結果であることを強く示唆しており、今日みる mtDNA の地理的変異のパターンはかなりの長い進化時間(たとえば数百万年間)の中で培われてきたものであると考えられる。また、今回認められた遺伝的変異のパターンはそれ自身が列島内の哺乳類相形成の歴史、あるいは列島そのものの歴史を考える上でも有益な情報を提供しているものと思われる。さらには、地域密着型の環境保全活動にとっても、今回のデータは十分に活用価値の高いものであると考えている。

列島に広域分布するヒミズ、アズマモグラ、コウベモグラの示す地理的変異と塩基置換度のパターンは比較生物地理学的に興味深いものである。すなわち、東日本のヒミズとアズマモグラ(日本海側と太平洋側)、西日本のヒミズとコウベモグラ(本州・四国・九州)は非常に類似した地理的分化のパターンを示している。モグラ類の場合、アズマモグラは先に大陸から移入した系統で、コウベモグラは後に移入した系統であると考えられている(Tsuchiya *et al.*, 2000)。一方、ヒミズの場合、核型変異もミトコンドリア DNA の変異も、東西で自然に分化したと考えるのがより自然であろう。大陸にはもはや日本のヒミズ類に類縁なものは存在しないからである。このように、進化的背景の異なるヒミズ類とモグラ類で類似した地理的変異のパターンが認められることは、列島の地質学的な環境変遷と地形学的特性がこの2種の分類群の遺伝的分化に大きく寄与したものと推察される。一般に、日本の小型哺乳類の場合、1)列島の東西で種あるいは集団の分化、2)関東以北の本州で東西(日本海側と太平洋側)の分化、さらには 3)西日本で、本州、四国、九州のブロックごとに分化する傾向を示す。そしてこれらは、なんらかの共通の環境要因が進化的時間の中で影響をおよぼしたことによる必然的な結果であるとも考えられることも可能であろう。

ヒメヒミズは予想以上に大きな地理的変異性を示した。モグラ類では種間変異ほどの塩基置換度がヒメヒミズの地域集団間で認められた。この多様性の度合いの高さは、ヒメヒミズの地域分化の歴史、その要因、分類学的位置付け、保全にむけた枠組みの設定等を考える上で考慮しなければならない情報のひとつであると思われる。今回の結果は、保全の枠組みとして、九州、四国、紀伊半島、信州、東北をそれぞれ極めて特異性の高い地域集団として位置づけなければならない可能性を示唆している。一方で、一般に、mtDNA は雌の移動に関する情報しか示さない。また、現生の集団が保有する mtDNA のタイプは過去に集団間で遺伝的な流通が何度行なわれようと、現在たまたま維持されているタイプの流通の情報しか教えてくれない。ヒメヒミズの場合、今後、各地域集団の遺伝的分化の実態を正確に把握するためにも核の遺伝子マーカーを用いた解析が必須であると思われる。

以上のように、ヒミズ、ヒメヒミズにおいては、予想以上に、地域分化のレベルは高いことが判明した。つまり、各地域に細分化され、それぞれの地域集団間の遺伝子の塩基置換度は高い。今後は、境界領域の解明も含め、より詳細な研究が

必要であろう。これにより、遺伝的多様性のレベルが進化的プロセスが明らかになり、またさまざまなレベルの地域関係が存在するため、種分化のプロセスをも明らかにするための貴重なヒントを与えてくれるものと期待している。ジネズミ類 (Motokawa *et al.*, 2000)、トガリネズミ類などとの比較生物地理学的解析も有益であろう。

#### (5)謝辞

有益な御助言をいただいた岩佐真宏氏、山岸学氏、相良直彦氏、佐々木堅吉氏、浜田俊氏、細田徹治氏の各氏に心より感謝いたします。

#### (6)引用文献

- 阿部永 (1994) 日本の哺乳類. 195pp. 東海大学出版会, 東京.
- 岩佐真宏 (1998) 紀伊半島における小型哺乳類の捕獲記録. *南紀生物* **40**: 119-120.
- Harada, M., Ando, A., Tsuchiya, K. and Koyasu, K. (2001) Geographical variations in chromosomes of the greater Japanese shrew-mole, *Urotrichus talpoides* (Mammalia: Insectivora). *Zoological Science* **18** (in press).
- Okamoto, M. (1999) Phylogeny of Japanese moles inferred from mitochondrial CO1 gene sequences. In *Recent Advances in the Biology of Japanese Insectivora*. Hiba Society of Natural History. pp. 21-27.
- Kawada, S. and Obara, Y. (1999) Reconsideration of the karyological relationship between two Japanese species of shrew-moles, *Dymecodon pilirostris* and *Urotrichus talpoides*. *Zoological Science* **16**: 167-174.
- Motokawa, M., Suzuki, H., Harada, M., Lin, L.-K., Koyasu, K. and Oda, S. (2000) Phylogenetic relationships among East Asian *Crociodura* (Mammalia: Insectivora) inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene. *Zoological Science* **17**: 497-504.
- Takezaki, N., Rzhetsky A. and Nei, N. (1995) Phylogenetic test the molecular clock and linearized trees. *Molecular Biology and Evolution* **12**: 825-833.
- Tsuchiya, K., Suzuki, H., Shinohara, A., Harada, M., Wakana, S., Sakaizumi, M., Han, S. H., Lin, L. K. and Kryukov, A. P. (2000) Molecular phylogeny of East Asian moles inferred from the sequence variation of the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Genes and Genetic Systems* **75**: 17-24.
- 清水善吉 (1988) 紀伊半島におけるヒメヒズメの分布. *三重動物学会会報* **10/11**: 67-70.

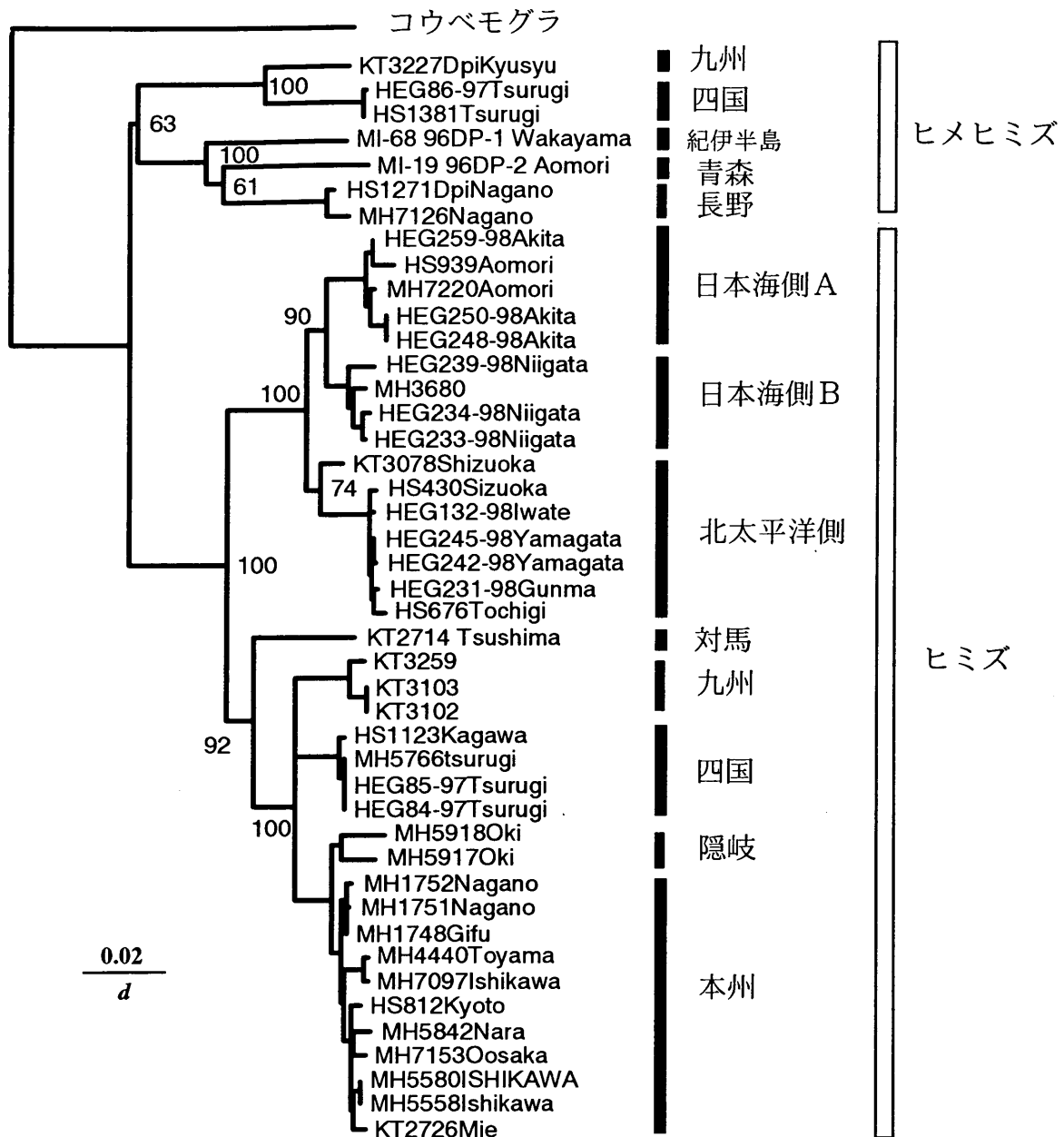


図1 NJ法による系統樹

ミトコンドリア DNA のチトクロム *b* 領域 1140 塩基対の変異をもとにヒミズ、ヒメヒミズの種内変異を調べた。すべての塩基置換の情報を用いた。ノードに記した数字はブートストラップ値を示す(%)。



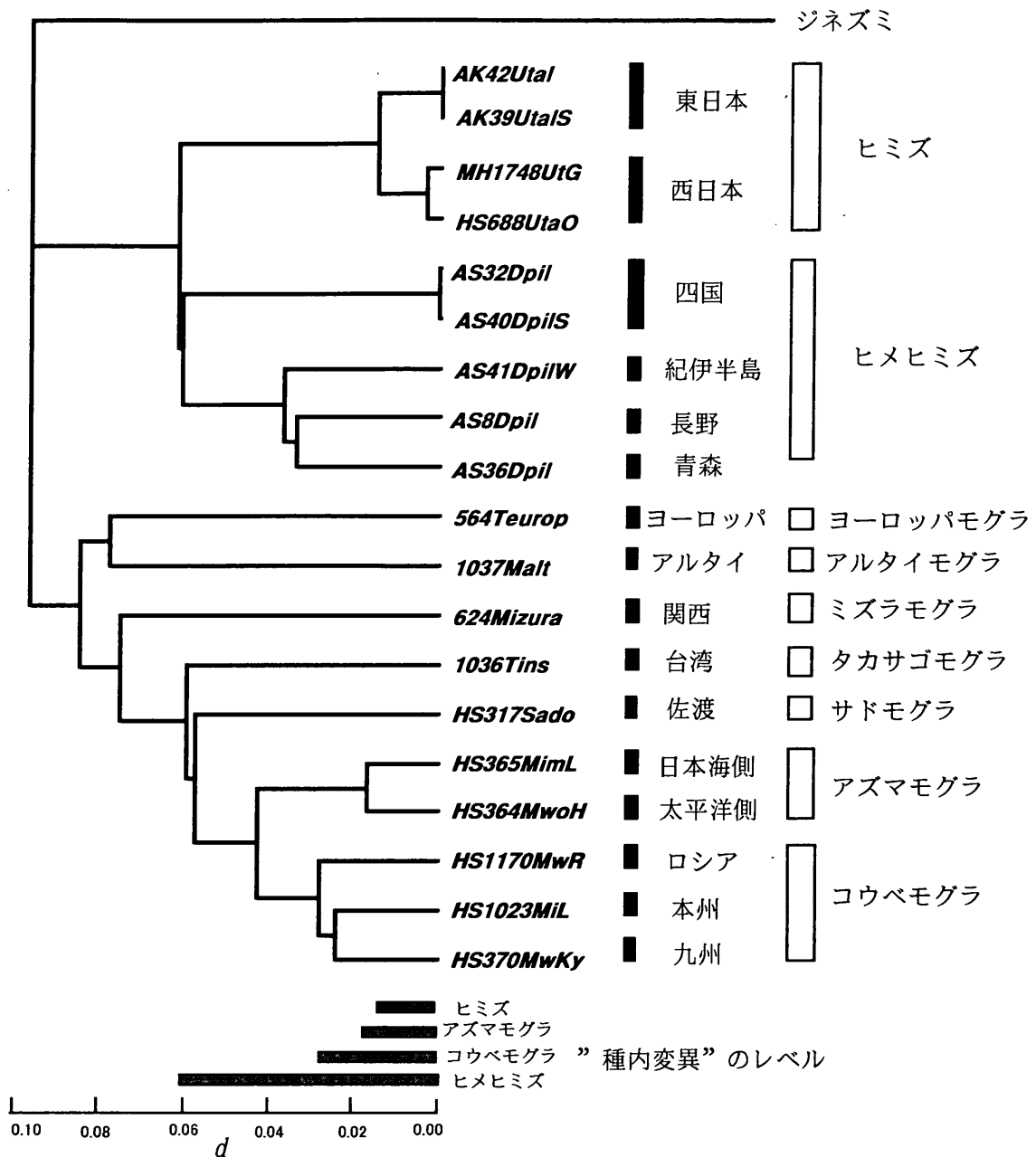


図2 ヒミズ類、モグラ類の種内変異のレベルの比較

ミトコンドリア DNA のチトクロム *b* 領域 1140 塩基対の変異をもとに NJ 系統樹を描き、このトポロジーを利用して、次に Linearized tree (Takezaki *et al.*, 1995) を作成した。すべての塩基置換の情報を用いた。種内変異のレベルとして塩基置換度 ( $d$ ) の最大値を下部に示した。ヒメヒミズは著しく高い値を示す。

#### 4. 哺乳類(中・大型)

北海道大学理学部附属動物染色体研究施設 増田 隆一

##### (1) 遺伝的多様性関連情報の追加

本年度、日本産哺乳類(中・大型)の遺伝的多様性について、以下のような学術論文が公表された。その他見落とした過去の論文についても追加した。

- Kurose, N., Masuda, R., and Yoshida, M. C. (1999) Phylogeographic variation in two mustelines, the least weasel *Mustela nivalis* and the ermine *M. erminea* of Japan, based on mitochondrial DNA control region sequences. *Zoological Science* **16**: 971-977.(イイズナ、オコジョ)
- Kurose, N., Abramov, A. V., and Masuda, R. (2000) Intrageneric diversity of the cytochrome *b* gene and phylogeny of Eurasian species of the genus *Mustela* (Mustelidae, Carnivora). *Zoological Science* **17**: 673-679.(ニホンイタチ、シベリアイタチ、イイズナ、オコジョ)
- 増田隆一 (1999) ブラキストン線(津軽海峡)に関する食肉類の生物地理と遺伝的特徴. 哺乳類科学 **39**: 351-358.(日本産の食肉類)
- 増田隆一 (2000) ヒグマの遺伝的多様化と北海道への渡来. 月刊海洋 **32**: 214-218.(ヒグマ)
- Nagata, J., Masuda, R., Tamate, H. B., Hamazaki, S., Ochiai, K., Asada, M., Tatsuzawa, S., Suda, K., Tado, H. and Yoshida, M. C. (1999) Two genetically distinct lineages of the sika deer, *Cervus nippon*, in Japanese islands: Comparison of mitochondrial D-loop region sequences *Molecular Phylogenetics and Evolution* **13**: 511-519.(ニホンジカ)
- 永田純子 (1999) 日本産偶蹄類の遺伝学的知見とブラキストン線について. 哺乳類科学 **39**: 343-350.(日本産の偶蹄類)
- Tamate, H. B., Okada, A., Minami, M., Ohnishi, N., Higuchi, H. and Takatsuki, S. (2000) Genetic variations revealed by microsatellite markers in a small population of the sika deer (*Cervus nippon*) on Kinkazan Island, Northern Japan. *Zoological Science* **17**: 47-53.(ニホンジカ)
- Tamate, H. B., Mamuro, R., Izawa, M., Shiroma, T. and Doi, T. (2000) Genetic differentiation among subspecies of the sika deer (*Cervus nippon*), with special reference to the phylogeny of *C. n. keramae* in the Kerama island group. *Tropics* (熱帯研究) **10**: 73-78. (ニホンジカ)
- 玉手英利, S.J. Goodman, 岡田あゆみ(2000) DNA 配列自動分析装置を用いたニホンジカの遺伝子分析. 石巻専修大学研究紀要 **11**: 93-104.(ニホンジカ)
- Okada, A. and Tamate, H. B. (2000) Pedigree analysis of the sika deer (*Cervus nippon*) using microsatellite markers. *Zoological Science* **17**: 335-340.(ニホンジカ)

- Kuwayama, R. and Ozawa, T. (2000) Phylogenetic relationships among European red deer, wapiti, and sika deer inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **15**: 115-123. (ニホンジカ)
- Goodman, S. J., Barton, N. H., Swanson, G., Abernethy, K. and Pemberton, J.M. (1999) Introgression through rare hybridization: A genetic study of a hybrid zone between red and sika deer (genus *Cervus*) in Argyll, Scotland. *Genetics* **152**: 355-371. (スコットランドに導入された日本産ニホンジカとアカシカのハイブリッド)
- Cook, C. E., Wang, Y. and Sensabaugh, G. (1999) A mitochondrial control region and cytochrome *b* phylogeny of Sika deer (*Cervus nippon*) and report of tandem repeats in the control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **12**: 47-56. (アメリカに導入された日本産ニホンジカ)
- Watanabe, T., Okumura, N., Ishiguro, N., Nakano, M., Matsui, A., Sahara, M. and Komatsu, M. (1999) Genetic relationship and distribution of the Japanese wild boar (*Sus scrofa leucomystax*) and Ryukyu wild boar (*Sus scrofa riukiuanus*) analysed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* **8**: 1509-1512. (イノシシ)

<見落としていた過去の論文>

- Okumura, N., Ishiguro, N., Nakano, M., Hirai, K., Matsui, A. and Sahara, M. (1996) Geographic population structure and sequence divergence in the mitochondrial DNA control region of the Japanese wild boar (*Sus scrofa leucomystax*), with reference to those of domestic pigs. *Biochemical Genetics* **34**: 179-189. (イノシシ)

(2) 遺伝的多様性調査の結果報告

① 目的

本年度は以下の 3 つの目的に従い、イタチ属に関する遺伝的特性を調査した。

- a. ニホンイタチ (*Mustela itatsi*) およびシベリアイタチ (*Mustela sibirica*) の染色体構成 (核型)

外部形態ならびにミトコンドリア DNA 分子系統に関する従来の調査結果は、ニホンイタチを別種に位置づける記載当初の分類を支持した。本調査ではさらに種の遺伝的特徴を明らかにするため、ニホンイタチとシベリアイタチの間で染色体構成を比較分析した。

- b. ユーラシア大陸におけるイイズナ (*Mustela nivalis*) およびオコジョ (*Mustela erminea*) 集団の遺伝的特徴

これまでに日本国内において分布パターンが類似するイイズナおよびオコジョの遺伝的多様性をミトコンドリア DNA 分析から検討した (平成 9 年度本調査報告書; Kurose *et al.*, 1999)。本年度は両種について、ユーラシア

大陸集団の遺伝的特徴を調査し、日本集団と比較分析した。

c. ユーラシア産イタチ属(*Mustela*)の種間系統関係

ユーラシアのイタチ属の分子系統解析を行ない、日本産イタチ属 4 種の系統進化的位置を検討した(Kurose *et al.*, 2000)。

②調査対象種・標本

日本産種 : ニホンイタチ(*Mustela itatsi*)、シベリアイタチ(*Mustela sibirica*)、イイズナ(*Mustela nivalis*)、オコジョ(*Mustela erminea*)

大陸産種 : イイズナ(*Mustela nivalis*)、オコジョ(*Mustela erminea*)、アルタイイタチ(*Mustela altaica*)、ステップケナガイタチ(*Mustela evermanni*)、ヨーロッパケナガイタチ(*Mustela putorius*)、ヨーロッパミンク(*Mustela lutreola*)、アメリカミンク(*Mustela vison*)

家 畜 : フェレット(*Mustela furo*)

③調査方法

a. イタチの染色体分析

ニホンイタチおよびシベリアイタチの皮膚小片を滅菌状態で採取し、初代組織培養を行った。増殖した繊維芽細胞を用いて空気乾燥法により染色体標本を作製し、ギムザ染色通常核型、G バンド核型、および C バンド核型を分析した。

b. イイズナおよびオコジョの遺伝的変異解析

ユーラシア大陸産個体の筋組織から抽出した DNA を用いて、ミトコンドリア DNA コントロール領域の遺伝子増幅法(PCR)および PCR 産物の直接塩基配列決定法を行ない、塩基配列(約 570~580 塩基)を決定した。そのデータと日本産集団のデータ(Kurose *et al.*, 1999)を分子系統学的に比較解析した。

c. イタチ属の分子系統関係

主にユーラシアに分布するイタチ属 10 種について、PCR 産物の直接塩基配列決定法によりミトコンドリア DNA チトクロム**b**遺伝子全塩基配列(1140 塩基)を決定した(Kurose *et al.*, 2000)。そのデータに基づき、種間の分子系統関係を解析した。

④結果・考察

a. ニホンイタチおよびシベリアイタチの染色体分析

両種の染色体数はともに 38 本( $2n=38, XY$ )であることを確認した。ギムザ染色通常核型、G バンド核型、C バンド核型はどれも両種の間で大きく異なっていた。図 1 に両種の通常核型を示した。このような核型の違いとこれまでに得られた分子系統のおよび外部形態的差異は、両イタチを別種とすることの妥当性を示している。よって、ニホンイタチを日本固有の独立種 *Mustela itatsi*

と結論づけてよいと考える。

b. ユーラシアにおけるイイズナおよびオコジョの遺伝的特性

ミトコンドリア DNA コントロール領域の分子系統解析により、ユーラシアのイイズナにおいて大きく2つの系統を見出した(クラスターA, Bのブーツストラップ値は各々94%, 100%:図2)。クラスターBは中央アジアグループ(黒海、カスピ海の周辺域)のみで形成された。一方、クラスターAには、別の中央アジアグループ、シベリア-東ヨーロッパグループ、北海道グループ、本州グループが含まれた。イイズナの染色体数は一般に  $2n=42$  であることが知られているが、本州グループの核型のみが転座により  $2n=38$  と報告されている(小原, 1991)。本調査結果における遺伝距離(図2)からみて、本州グループはシベリアグループにもっとも近い。染色体転座は本州に地理的に隔離された後に起こった可能性が高い。

オコジョについては、ユーラシア大陸(東シベリアから東ヨーロッパにかけて)において遺伝的変異幅が極めて小さく、遺伝距離は地理的距離を反映しなかった。日本列島内でも本州と北海道間の遺伝距離は小さく、遺伝的分化が十分に進んでいないことが示唆されている(Kurose *et al.*, 1999)。以上の結果は、オコジョがユーラシアにおいて極めて近い過去(おそらく最終氷期以降)に短期間のうちに分布を拡大したことを示唆している。

c. イタチ属の分子系統関係

ミトコンドリア DNA のチトクロム *b* 塩基配列を用いて分子系統樹を作成した(Kurose *et al.*, 2000)。その結果、近隣結合法および最尤法から得られた系統樹はともにほぼ同様の系統種間関係を示した(図3)。この分子系統関係は、従来の形態データによる系統関係とほぼ一致した。アメリカミンクはイタチ属の中でもっとも離れた距離にあり、アメリカミンクがイタチ属において特異的な形態的特徴をもっていることと矛盾しない。次にオコジョが分岐することは、オコジョの核型が祖先型であるという従来の核型進化の知見(小原, 1991)と一致する。イイズナとアルタイイタチはともに小型のイタチ属であり、クラスターを形成した。上記以外の種は高い信頼度(97-99%ブーツストラップ値)でクラスターを形成した。フェレット、ヨーロッパケナガイタチ、およびステップケナガイタチの間の遺伝距離が極めて小さいこと(フェレットクラスター)は、フェレットがこれら2種のケナガイタチから家畜化されたという歴史を物語っている。一方、ヨーロッパミンクはフェレットクラスターに近かった。同じ「ミンク」とよばれていても、アメリカミンクとは進化的に大きく異なることが分子系統的にも明らかとなった。シベリアイタチおよびニホンイタチは、フェレットクラスターおよびヨーロッパミンクに近縁であった。シベリアイタチがヨーロッパミンクやフェレットに近いことは、従来の形態分類と一致する。シベリアイタチとニホンイタチ間の遺伝距離が他の種間の遺伝距離に相当することがここでも証明された。

### (3)謝辞

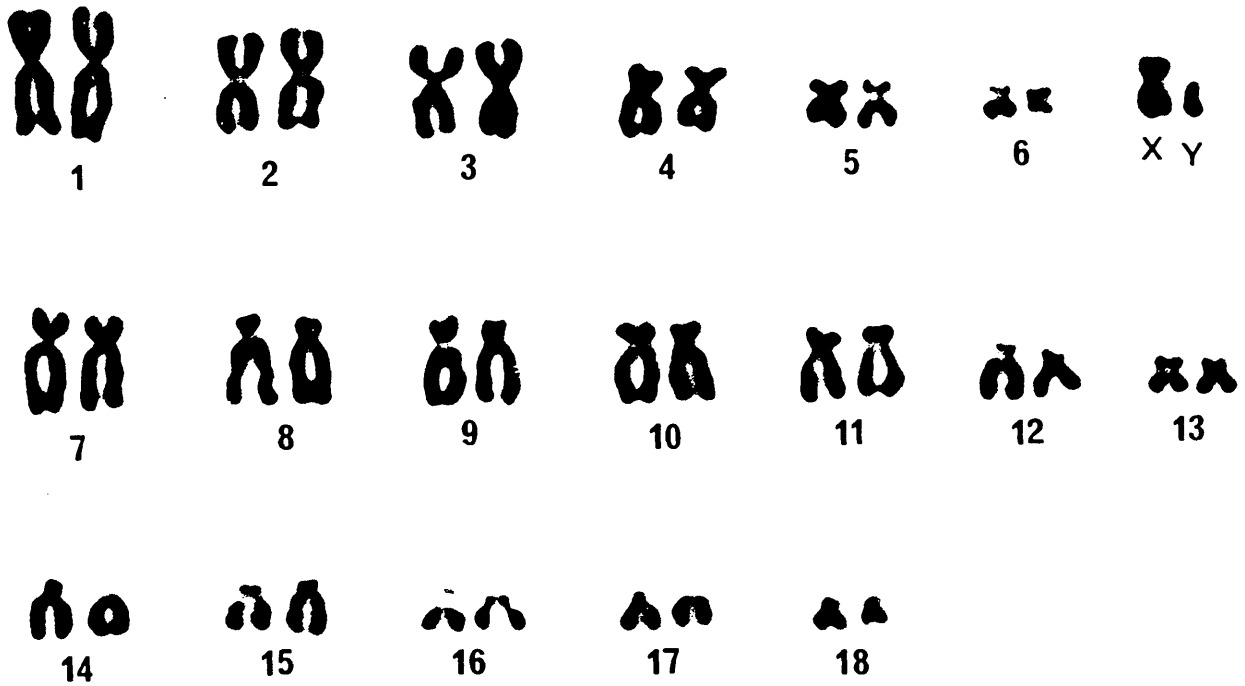
本報告をまとめるにあたりご協力いただきました共同研究者である黒瀬奈緒子氏(北海道大学大学院地球環境科学研究科)、青井俊樹氏(岩手大学農学部)ならびに渡辺茂樹氏(箕面市)に感謝いたします。

### (4)参考文献

Kurose, N., Masuda, R. and Yoshida, M. C. (1999) Phylogeographic variation in twomustelines, the least weasel *Mustela nivalis* and the ermine *M. erminea* of Japan, based on mitochondrial DNA control region sequences *Zoological Science* **16**: 971-977.

Kurose, N., Abramov, A. V. and Masuda, R. (2000) Intrageneric diversity of the cytochrome *b* gene and phylogeny of Eurasian species of the genus *Mustela* (Mustelidae, Carnivora). *Zoological Science* **17**: 673-679.

小原良孝 (1991) 日本産食肉類イタチ科の起源と系統進化 一核学的知見の示すもの一. 哺乳類科学 **30**: 197-220.



*Mustela itatsi* ニホンイタチ (♂)  $2n=38$

*Mustela sibirica* シベリアイタチ (♀)  $2n=38$

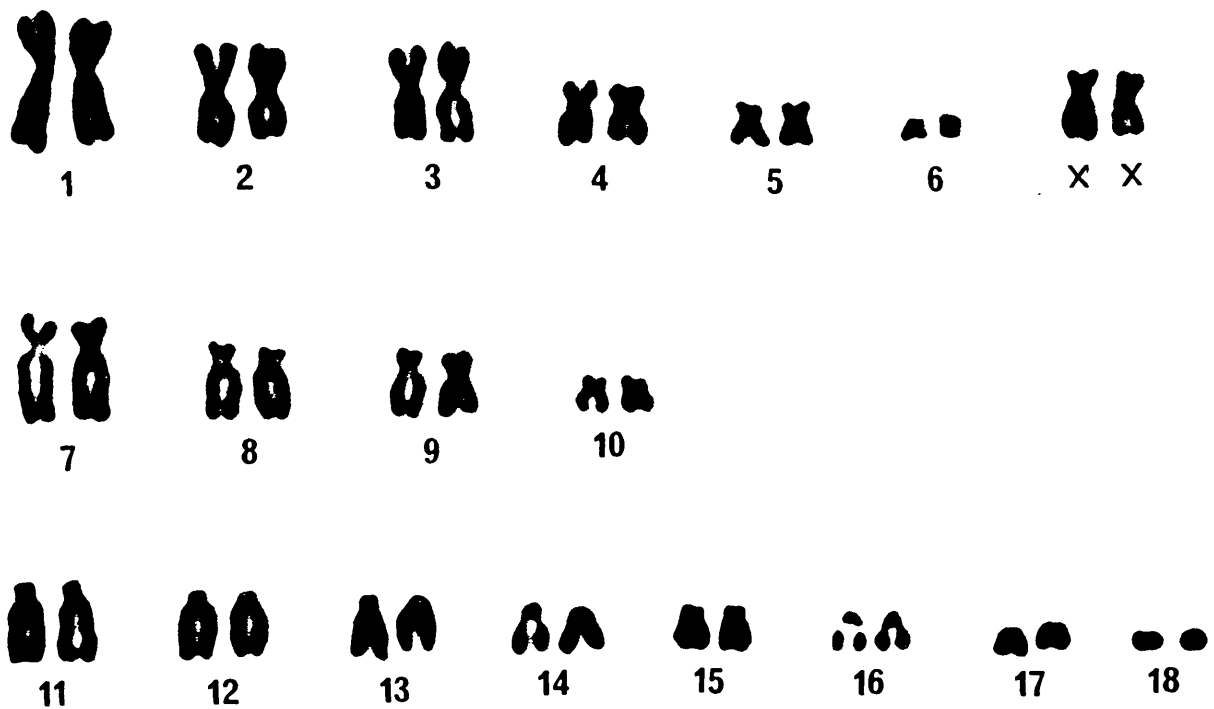


図1 ニホンイタチ *Mustela itatsi* ・シベリアイタチ *Mustela sibirica* の核型

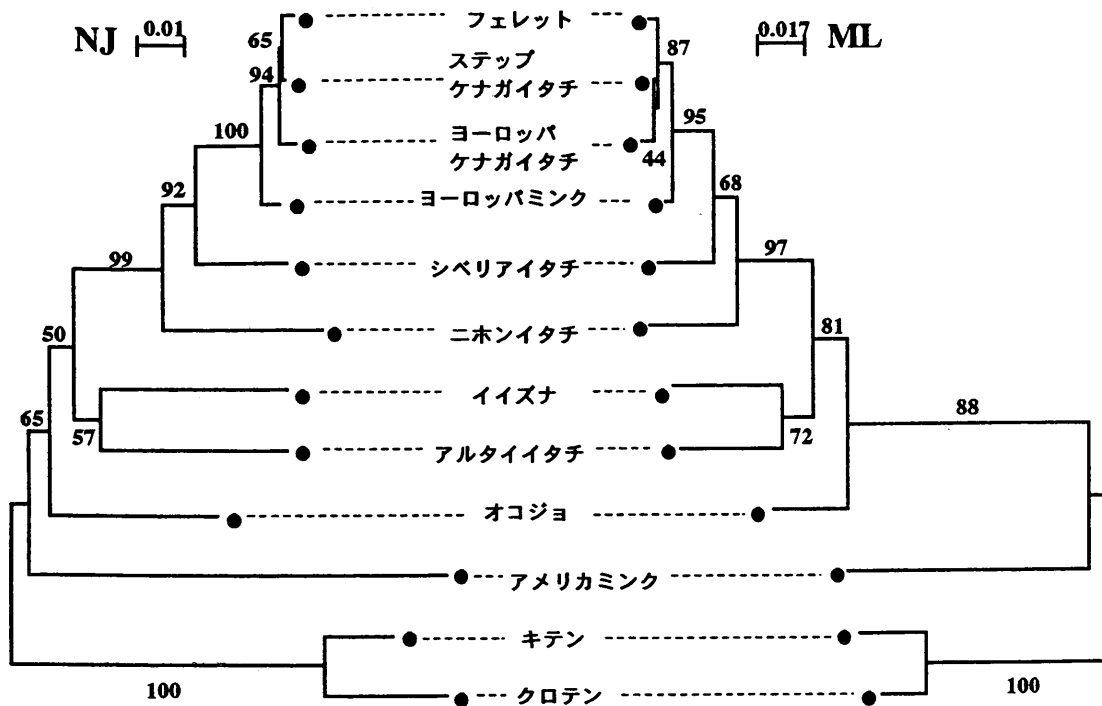


図2 ユーラシア産イズナ集団の系統関係 近隣結合法によるミトコンドリア DNA コントロール領域塩基配列の分子系統樹。枝上の数値はブーツストラップ値、横棒は遺伝距離を表す。

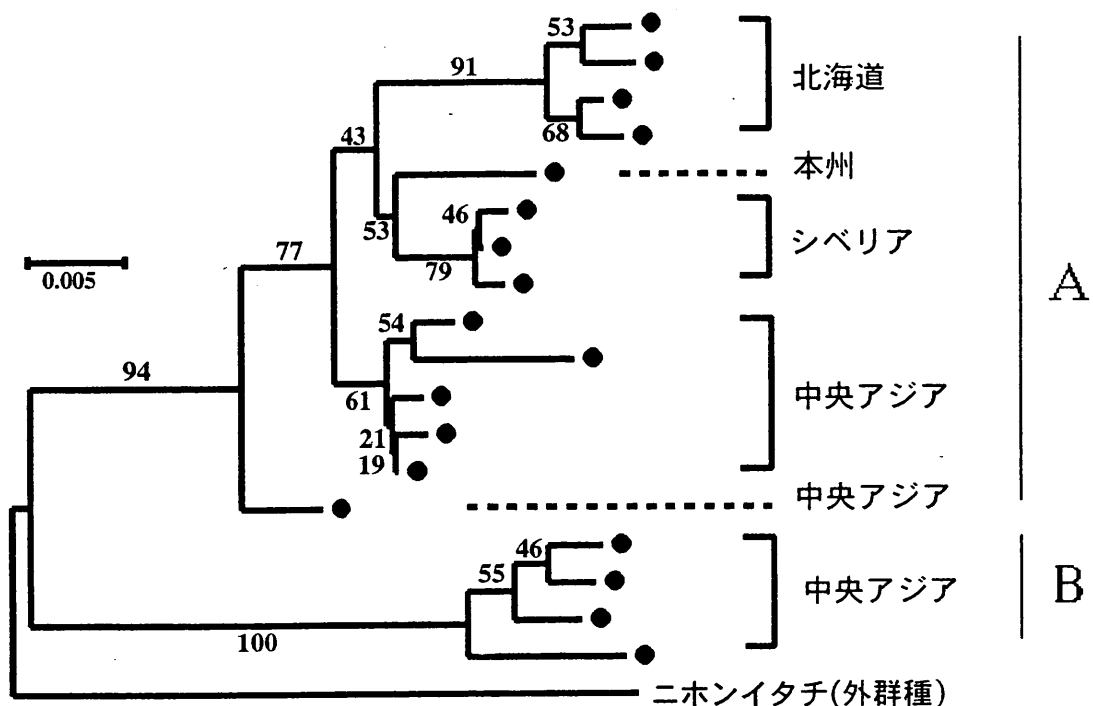


図3 ユーラシア産イタチ属の種間系統関係(Kurose et al., 2000) ミトコンドリア DNA チトクローム b 全塩基配列の遺伝距離に基づいて作成した近隣結合法(NJ)および最尤法(ML)による分子系統樹。枝上の数値はブーツストラップ値(NJ は 1000 回、ML は 100 回)を示す。横棒のスケールは遺伝距離。



## 5. 鳥類

九州大学大学院比較社会文化院 馬場 芳之 小池 裕子

### (1)調査対象種

平成 11 年度は、危急種であるナベヅル・マナヅルの遺伝的解析を試みた。

両種とも中国・ロシア国境、もしくはモンゴルとの国境地帯が繁殖地と推定されているが、ナベヅル *Grus monacha* はその生息個体のほとんどを占める約 7000 羽が越冬のため鹿児島県出水市にきており、山口県熊毛町でも約 60 羽の越冬が確認されている。マナヅル *Grus vipio* は、この種の大半が越冬地として出水市にくるといわれており、出水市は両種の越冬地として保全上重要な地域になっている。

ナベヅルはその名前の鍋色からきているように、灰色がかった体色をしており、全長は約 95 センチに達する。マナヅルは、ナベヅルよりやや大きく、顔の多くの部分が褐色なのが特徴である。出水平野で冬に両種をみると常に家族単位で行動している。時は出水平野の中でも環境庁や文化庁による借り上げ農地に集中し、かなり過密な状況にある。これらのツルを保護するために出水平野では、給餌など様々な活動が行なわれている。

個体数に関する過去の記録は不明確で、戦後両種の生息数が減った時期があるといわれているが、今後の保護計画に対して十分な資料とはいえない。また出水平野はナベヅル・マナヅルの越冬地として重要な位置にあり、その地で採取された試料を分析することにより、両種の個体群の遺伝的構造が明らかになると期待される。

そこで今回は、出水平野に飛来するナベヅル・マナヅルに関して、(1)出水で死亡した個体の組織片から良好な DNA 断片を抽出し、ツル類の多型解析適する特異的なプライマーを設計する、(2)生息地で発見される脱落羽毛から DNA を抽出し塩基配列の決定ができることを確認する、ことを目的として予備調査を行った。

### (2)調査方法

#### ①DNA の抽出

羽毛サンプル(表 1)は液体窒素中ですりつぶし、1.5 ml エッペンドルフチューブに入れ、1×RSB-buffer を 450ml、10%SDS を 25ml、20mg/ml Proteinase K を 25ml 加え、55°C で 2 時間ローテーター上でインキュベートし蛋白を分解した。

組織片や羽毛が分解され白濁したことを確認した後、IsoQuick 法によりイソプロピルアルコールと 70%エタノールを用いて、DNA を抽出した。

野生サンプルから抽出した DNA は試料により量と断片化の程度が非常に異なるので、抽出された全 DNA の約 1/20 量を電気泳動し、DNA のスメアの状態を確認し、試料ごとに希釈量を定め DNA 濃度を調整した。

## ②DNA の増幅

今回の分析したミトコンドリア DNA コントロール領域(図 1)は、組織片から抽出した DNA を用いて、以前ライチョウの分析に作成した L16775.gr ( 5'-GCTTGAAAAGCCATTGTTGTAATTTCAACTACAGA-3' ) と H00683.rai ( 5'-GTTTTCCCAGCTGCGGATACTTGCATGT-3' ) を用い、コントロール領域全領域を増幅した。次にインターナルプライマーとして L387.gr ( 5'-CAACCGGGTGTAGTAAGAT-3' )、H454.gr ( 5'-CTCTGGTTCCTATGTCAGGGC-3' )、H756.gr ( 5'-TCTGGTTATGGTGTGTCCAC-3' ) の 3 本を作成し内側の塩基配列を決定した。

PCR 反応は 95°C15 秒のプレラン後、95°C15 秒・55°C30 秒・72°C45 秒を 30 サイクル、最後に 72°C60 秒のポストランの条件で行った。PCR 反応後、1.5%アガロースゲルで電気泳動を行いエチジウムブロマイドで染色した後に、UV 光下で PCR 産物を確認した。1 回の PCR で十分な DNA の増幅ができなかったときは、1 回目の PCR 反応液をテンプレートとし同一プライマーを用い、2 回目の PCR 反応を行った。

## ③DNA-塩基配列決定

PCR 産物は Thermo Sequence fluorescent labelled primer cycle sequencing kit (United States Biochemical) を用いプライマーの除去・精製が行われた。

塩基配列の決定は PCR で使用したプライマーと同じ配列の Cy5 蛍光標識されたプライマーを用い、Thermo Sequence fluorescent labelled primer cycle sequencing kit (Amersham Life Science) に従い、95°C30 秒・65°C30 秒を 25 サイクルの条件で、サイクルシーケンス反応を行った。

次に Long Ranger Gel Solution (FMC Bio Products) でゲルを作成し、ALFred DNA シーケンサー (Pharmacia LKB) を用いてゲル温度 47°C、26mA、1200V の条件で 10 時間泳動し、ヘリウムネオンレーザー(波長 633nm)で Cy5 蛍光標識を検出した。検出された波形は、ALF Manager を用いて編集し塩基配列を決定した。

このようにして得られた試料のコントロール領域の塩基配列を GENETYX-MAC 10.1.3 (Software Development Co., LTD.) で解析した。

## (3) 調査結果と考察

### ①コントロール領域の構造

ナベヅルの死亡個体の組織片試料(00gr03)を用いたコントロール領域全体の塩基配列を決定した(図 2)。ナベヅルの全領域の長さは 1097 塩基対であった。ニワトリの塩基配列とアライメントを行い、ニワトリなどで認められた保存領域を検索した結果、ミトコンドリアの複製に関係していると考えられている F Box、D Box、C Box と CSB-1 が確認された。しかしニワトリなどで報告されている tRNA-Glu 付近にあったループ構造や、CSB-1 領域付近にあるクローバーリーフ構造は確認できなかった。

鳥類ではコントロール領域を、L鎖5'側のRegion 1(哺乳類ではleft domain)、中央の変異が少ないRegion 2(central domain)、3'側の領域のRegion 3(right domain)の3領域に分けられており、ニワトリの塩基配列と比較して、ナベヅルでもこれら3領域に区分した。

さらにGENETYX-MAC Ver.10.1.3を用いたリピート解析の結果、コントロール領域開始115塩基対目から160塩基対目にかけて、2回の塩基配列の繰り返しを検出された。

## ②置換頻度

今後分析する領域が種内で十分に置換頻度が高いかを調べるために、GenBankの検索で得られたタンチョウの配列とアライメントを行い、2種間の塩基置換を50塩基対ごとの頻度として表した(図3)。中央部の塩基置換頻度が低く、両端の塩基置換頻度が比較的高い結果が得られた。中央部の塩基置換頻度が低い部位は、F Box、D Box、C BoxとCSB-1があるRegion 2に相当する部位である。

このように塩基置換頻度が高い部位としてRegion 1とRegion 3の2カ所あるが、Region 3の塩基置換頻度が高い箇所にはT連続など単一塩基の繰り返しが多く、多型解析に不向きなので、他種でも多く分析されてきたRegion 1を分析対象領域として設定した。

## ③脱落羽毛を用いたDNA増幅

脱落羽毛から抽出されたDNAを用いて、コントロール領域全体を増幅する試みは、なかなか良好な結果を得ることができなかった。そこで今回作成したツル用プライマーのL387.gr、H756.grを用いて増幅したところ、約400塩基対のPCR産物が得られ、脱落羽毛からのDNAはサンプルの質にばらつきがあるものの、PCR法による目的DNAの増幅が確認できた。

## ④ハプロタイプ検出

マナヅル羽根試料15サンプルおよびナベヅル羽根試料15サンプルを用いてmtDNAコントロール領域Region1の塩基配列を決定し、塩基置換部位を検出した(表2)。マナヅルからは21箇所の塩基置換部位が検出され、そのうち1箇所は欠損、1箇所はtransversionで、残りはすべてtransitionであった。これらの置換部位から10個のハプロタイプを同定した。

ナベヅルからは10箇所の塩基置換部位が検出され、そのうち2箇所は挿入、1箇所はtransversionで、残りはすべてtransitionであった。これらの置換部位から10個のハプロタイプを同定した。

## ⑤ハプロタイプ多様度

今回検出されたマナヅル・ナベヅルの遺伝的多様性を調べるために、下記の式によるハプロタイプ多様度(h)を計算した。

$$h = (1 - \sum x_i^2) n(n-1)$$

その結果マナヅルのハプロタイプ多様度は 0.94、ナベヅルのハプロタイプ多様度は 0.91 で、ともに非常に高い遺伝的多様性を示した。これらのハプロタイプ多様度を、エゾライチョウ、ライチョウ、タンチョウ(阿部, 1996a)、シマフクロウ(阿部, 1996b)、ハクガン(Quinn, 1992)、ハマシギ(Wenink *et al.*, 1993)、キョウジョシギ(Wenink *et al.*, 1994)と比較すると(図 4)、アデリーペンギンやキョウジョシギと並んで、もっともハプロタイプ多様度が高いグループに位置することが分かった。

#### ⑥分子系統樹

これらのマナヅル 10 ハプロタイプとナベヅル 10 ハプロタイプ、およびアウトグループとして GenBank から検索されたタンチョウヅル(AB017621/ AB017622)とクロヅル(AB017623/ AB017624/ AB023812)を加え、近隣接合法による分子系統樹を作成した(図 5)。

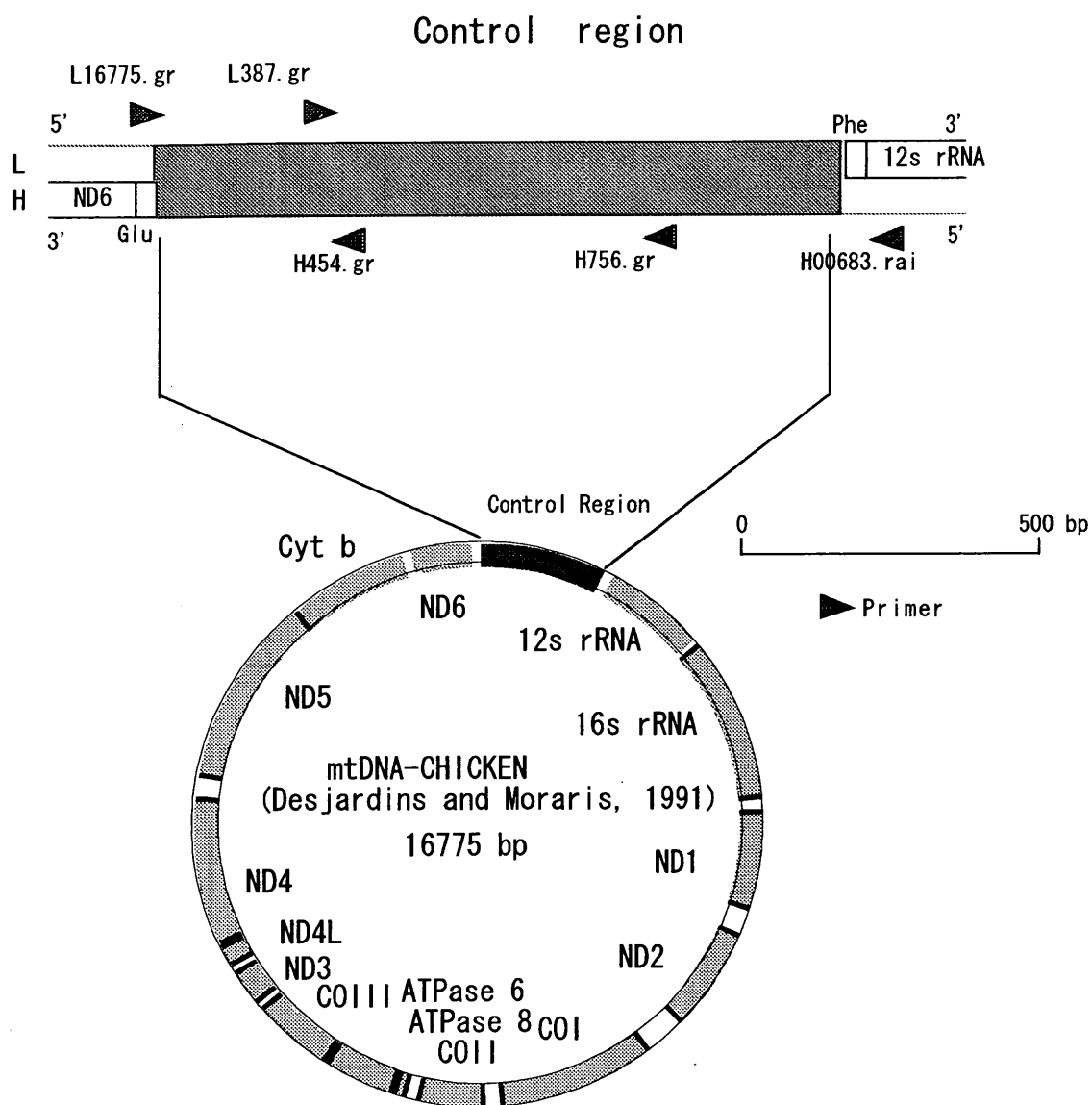
その系統樹はまずタンチョウ、マナヅル、ナベヅル・クロヅルの 3 つのクラスターに分離し、ナベヅルとクロヅルが非常に近縁であることを示唆した。

次にマナヅル 10 ハプロタイプにおけるネットワーク系統樹を作成した(図 6)。ネットワーク樹の中心はハプロタイプ Gm1 が位置し、これが今回検出されたマナヅルのハプロタイプ全体の基本ノードであると推定される。このハプロタイプ Gm1 からハプロタイプ Gm2・Gm3・Gm4・Gm5・Gm6・Gm8・Gm9 の 7 つのハプロタイプが 1 塩基置換で放散しており、またハプロタイプ Gm7・Gm10 の 2 つのハプロタイプが 2 塩基置換の距離に位置していた。この基本ノードのハプロタイプ Gm1 は 5 試料から検出されており、出現頻度も高かった。

一方マナヅルは、ハプロタイプ間の塩基置換距離がやや長い傾向が認められた。今回検出されたマナヅルの 10 個のハプロタイプの基本ノードは、NJ 系統樹からもハプロタイプ Gv3・Gv7・Gv8 の中心に位置するノードが基本ノードと考えられた。その基本ノードからハプロタイプ Gv8 は 4 塩基置換距離、Gv6 も 4 塩基置換距離・Gv10 は 6 塩基置換距離と離れており、これらの中間ノードに位置するハプロタイプが今後検出されるかどうか、個体群の変遷史を知る上でも興味深い課題であり、今後分析個体数を追加しながら検討していきたい。

表1 マナヅル・ナベヅル試料リスト

試料番号	種名	採集地	採集年月	ハプロタイプ
99gr23	マナヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gv9
99gr24	マナヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gv10
99gr25	マナヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gv6
99gr26	マナヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gv3
99gr27	マナヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gv8
99gr28	マナヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gv4
99gr29	マナヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gv1
99gr30	マナヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gv2
99gr31	マナヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gv1
99gr32	マナヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gv7
99gr33	マナヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gv2
99gr34	マナヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gv5
99gr35	マナヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gv6
99gr36	マナヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gv7
99gr37	マナヅル	出水市 保護舎	1999/11/25	Gv6
99gr38	ナベヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gm1
99gr39	ナベヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gm3
99gr40	ナベヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gm1
99gr41	ナベヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gm7
99gr42	ナベヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gm8
99gr43	ナベヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gm9
99gr44	ナベヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gm5
99gr45	ナベヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gm4
99gr46	ナベヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gm1
99gr47	ナベヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gm5
99gr48	ナベヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gm1
99gr49	ナベヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gm2
99gr50	ナベヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gm5
99gr51	ナベヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gm10
99gr52	ナベヅル	出水市荒崎 餌場	1999/11/25	Gm1



プライマーの塩基配列

AVEL16775. gr	5' -GCTTGAAAAGCCATTGTTGTAATTTCAACTACAGA-3'
AVEL387. gr	5' -CAACCGGGTGTTAGTAAGAT-3'
AVEH454. gr	5' -GCCCTGACATAGGAACCAGAG-3'
AVEH756. gr	5' -GTGGACACACCATAACCAGA-3'
H00683. rai	5' -GTTTCCCAGCTGCGGATACTTGCATGT-3'

図1 ミトコンドリア DNA コントロール領域の増幅に使用したプライマーの位置



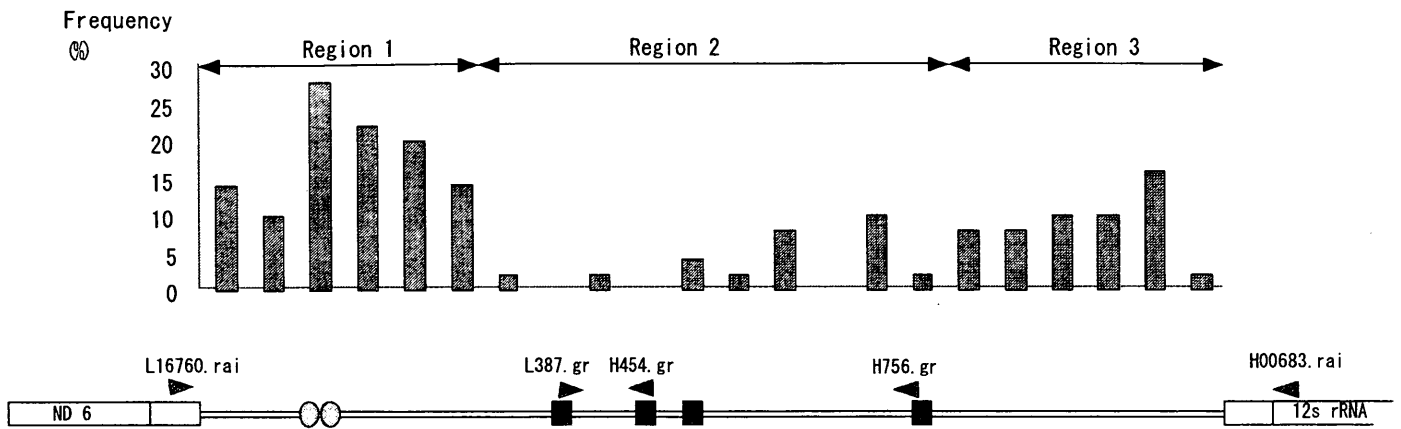


図3 ナベヅル・タンチョウ間の塩基置換頻度

表2 マナヅル・ナベヅルのコントロール領域の塩基置換部位

マナヅル *Grus vipio* ( $h=0.94$ )

ハプロタイプ	塩基置換位置																				
	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	4				
Gv1	C	A	C	G	C	A	T	C	G	C	T	T	T	C	T	G	T	T	G	T	G
Gv2	-	T							G	T											
Gv3		T				T													A	C	
Gv4		T				T			C				C		C						
Gv5		T	A			T									C						
Gv6		G	T			T	A		C										C		
Gv7		T				T						C									
Gv8		T		G		T							C		T	A					C
Gv9		T							T		C										
Gv10		T		T		C			T		C								C		

ナベヅル *Grus monacha* ( $h=0.91$ )

ハプロタイプ	塩基置換位置										
	1	1	1	1	1	1	2	3			
Gm1	-	-	T	T	G	C	C	C	C	G	G
Gm2	C										
Gm3							T				
Gm4		C									
Gm5										A	
Gm6										T	
Gm7		C		T							
Gm8										T	
Gm9						T					
Gm10	C						T				



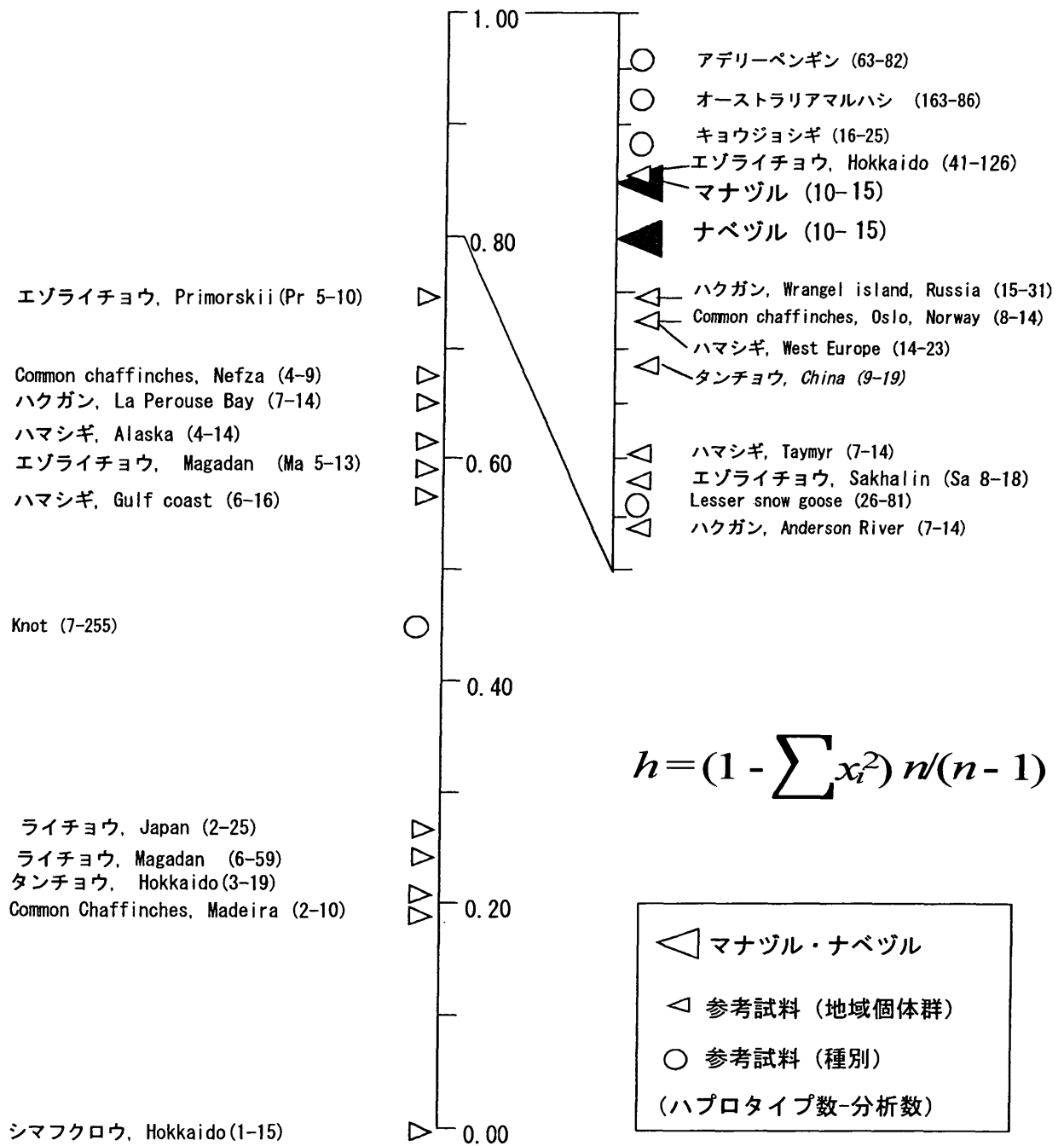


図4 マナヅル・ナベヅルのハプロタイプ多様度(h)

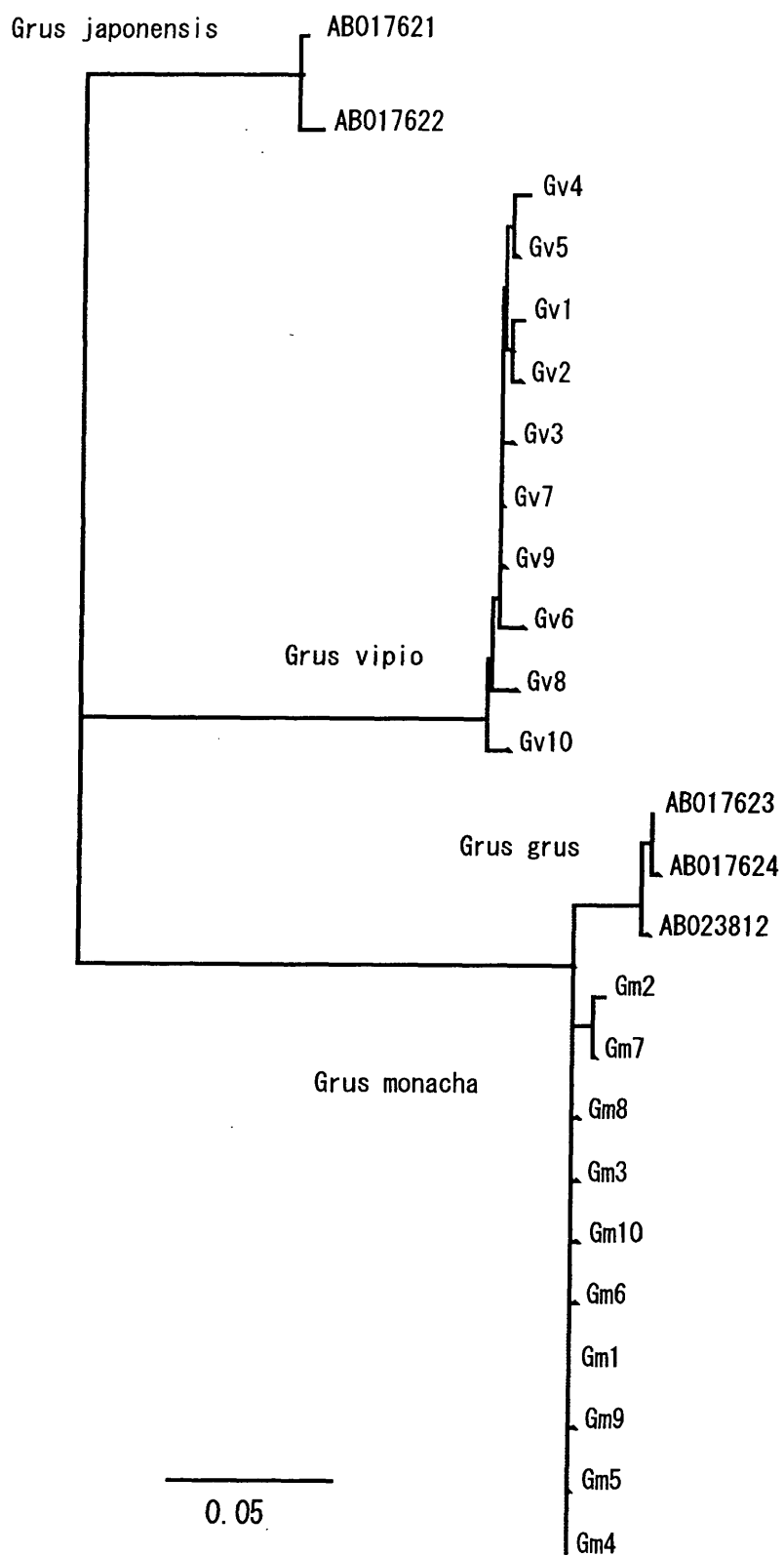
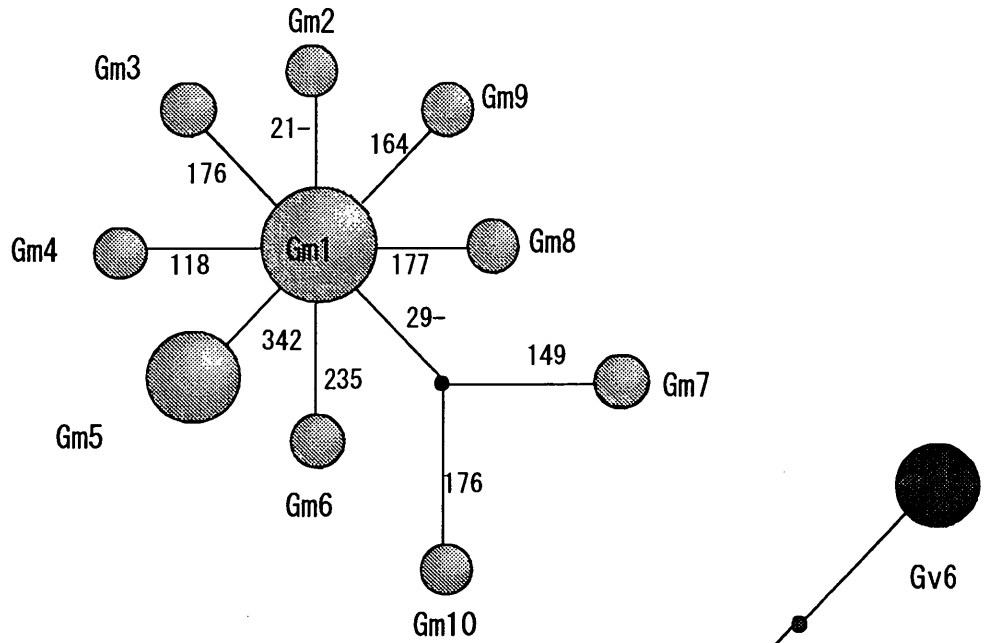


図5 近隣接合法によるツル4種の分子系統樹

# ナベヅル



# マナヅル

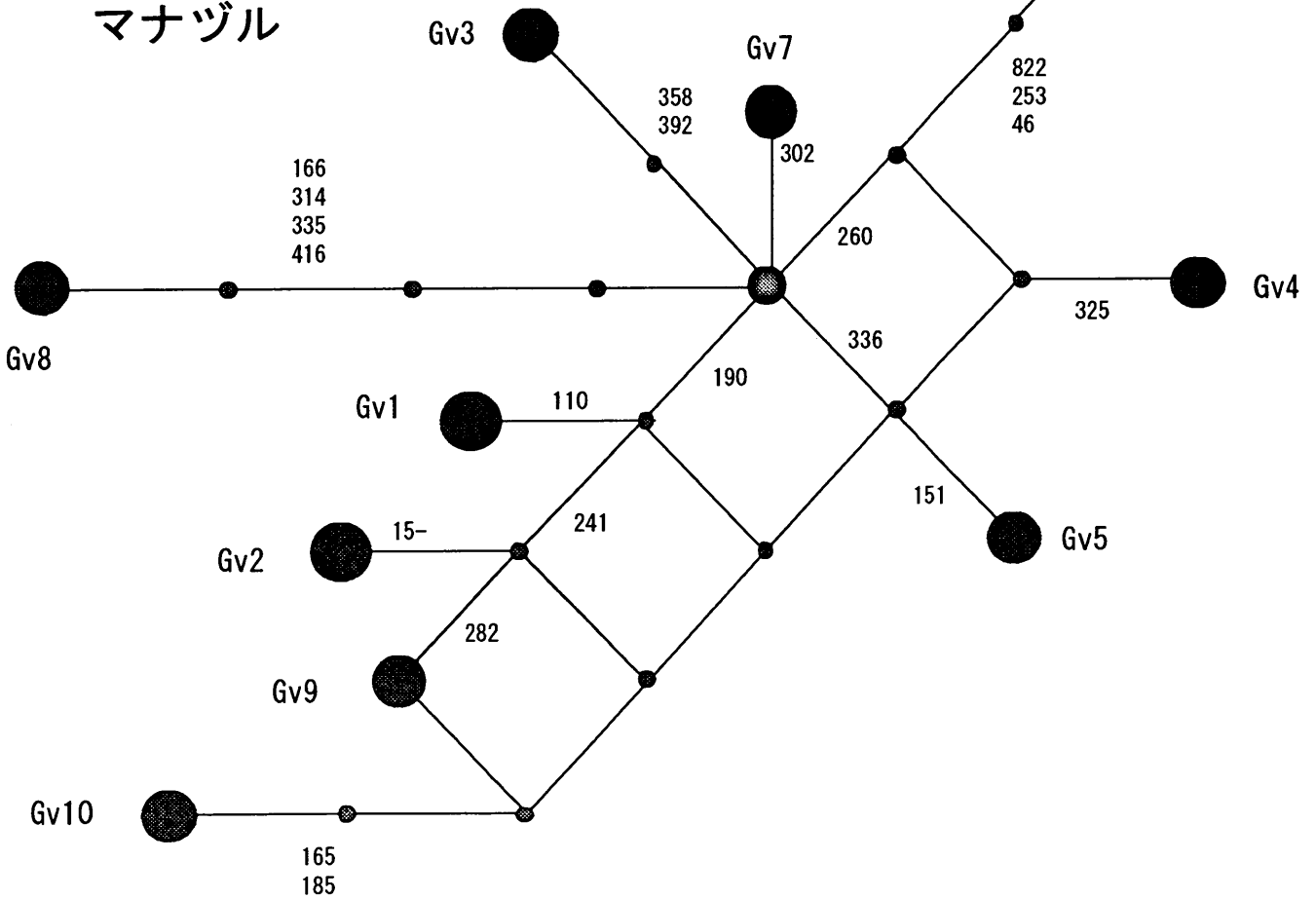


図6 マナヅル・ナベヅルのネットワーク系統樹

## 6. 爬虫類

琉球大学熱帯生物圏研究センター 太田 英利  
琉球大学理工学研究科 山城 彩子

### (1) 遺伝的多様性関連情報の追加

日本産爬虫類の遺伝的多様性に関して以下の文献が追加された。

- Honda, M., Ota, H., Kobayashi, M., Nabhitabhata, J., Yong, H.-S., Sengoku, S. and Hikida, T. (2000) Phylogenetic relationships of the family Agamidae (Reptilia: Iguania) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Zoological Science* **17**: 527-537. (オキナワキノボリトカゲの 12S・16SrRNA 遺伝子の塩基配列をアガマ科の他種のデータとともに解析)
- Honda, M., Ota, H., Kobayashi, M., Nabhitabhata, J., Yong, H.-S. and Hikida, T. (2000) Phylogenetic relationships, character evolution, and biogeography of the subfamily Lygosominae (Reptilia: Scincidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **15**(3): 452-461. (ニホントカゲの 12S・16SrRNA 遺伝子の塩基配列を解析の外群に使用)
- Tu, M.-C., Wang, H.-Y., Tsai, M.-P., Toda, M., Lee, W.-J., Zhang, F.-J. and Ota, H. (2000) Phylogeny, taxonomy, and biogeography of the Oriental pitvipers of the genus *Trimeresurus* (Reptilia: Viperidae: Crotalinae): a molecular perspective. *Zoological Science* **17**: 1147-1157. (ハブ, トカラハブ, サキシマハブ, タイワンハブ, ヒメハブの 12SrRNA 遺伝子の塩基配列をハブ属の他種のデータとともに解析)
- Yamashiro, S., Toda, M. and Ota, H. (2000) Clonal composition of the parthenogenetic gecko, *Lepidodactylus lugubris*, at the northernmost extremity of its range. *Zoological Science* **17**: 1013-1020. (日本のオガサワラヤモリ集団の核型ならびに酵素支配遺伝子型を解析)

### (2) 遺伝的多様性調査 調査結果報告

#### ① 調査選定種

オガサワラヤモリ *Lepidodactylus lugubris*

太平洋やインド洋の熱帯・亜熱帯の島嶼域および近隣の大陸沿岸部に分布する単為生殖種(たとえば Bauer and Henle, 1994; Ineich, 1999)である。最近行なわれたミクロネシアやポリネシアでのいくつかの研究により、本種が 2 倍体 ( $2n=2x=44$ ) と 3 倍体 ( $2n=3x=66$ ) の両方の系列から成ること (Moritz and King, 1985; Volobouev *et al.*, 1993)、それぞれの系列の中にも遺伝的に異なる複数のクローンが存在すること、さらにそれらのクローンが背面の斑紋によってある程度識別できることが明らかになった (Ineich, 1988, 1999; Moritz *et al.*, 1993)。2 倍体のクローンは近縁の両性生殖種の種間交雑に由来し、3 倍体のクローンは 2 倍体のクローンと親種の方の雄との戻し交雑によって生じたと考えられ

ている(Volobouev *et al.*, 1993; Radtkey *et al.*, 1995)。

分布の北限に位置する日本では、オガサワラヤモリは琉球列島の南部、大東諸島、および小笠原諸島にみられる(Ota, 1989, 1994)。このような分布の境界域におけるクローンの多様性や組成を分布の中心地域のものと比較することにより、いろいろなクローンとその親種の系列における空間的・時間的な変遷に関するいくつかの仮説(たとえば Ineich, 1999)を検証できることが期待できる。しかしながら、Makino and Momma (1949) が小笠原諸島で採集された 1 標本のみに基づいて行なった核型の報告と、外部形態のみに基づいた Ineich (1999) のクローン組成に関する予備的な報告を除いては、日本国内の集団の遺伝的な多様性や系統的な類縁関係についての報告はまったくない。そこで本研究では、日本国内のオガサワラヤモリ集団のクローン組成についての詳細な調査を行なった。

## ②方法

本研究で用いた標本は、1997 年から 1999 年に以下の島々から採集した: 沖縄諸島の屋嘉比島・座間味島、宮古諸島の宮古島・大神島・多良間島・来間島、八重山諸島の石垣島・西表島・黒島・与那国島(以上、琉球列島); 小笠原諸島の父島・母島; 大東諸島の北大東島・南大東島(図 1)。クローンによって異なる生息地を好む可能性がある(Bolger and Case, 1994)ため、各島では特定のクローンに偏らないように、できるだけ多くのタイプの環境(たとえば明かりのついた家屋、廃屋、木など)から採集するように努めた。

採集個体は生標本として研究室へ持ち帰り、骨髓細胞空気乾燥法(Ota *et al.*, 1987)を用い、分裂中期の細胞を取り出した。取り出した細胞を 2~3%のギムザ染色液で 30 分間染色し、顕微鏡下で撮影して核型を決定した。

各個体の斑紋は核型の実験の前に観察・撮影した。斑紋の名称については、基本的に Ineich (1988)、および斑紋について記述のある他のいくつかの文献(Ineich and Ota, 1992; Moritz *et al.*, 1993)に従った。

上記の核型実験と平行して肝臓を摘出して $-80^{\circ}\text{C}$ で保存し、水平式デンブングル電気泳動の試料とした。電気泳動で調べた酵素とその E. C. (Enzyme Commission)ナンバー、想定される遺伝子座、実験で用いたバッファーステムを表 1 に示す。

## ③結果

### a. フィールド調査の結果と核型・アロザイムの変異の概要

標本は小笠原諸島から 58 個体、琉球列島から 90 個体、大東諸島から 74 個体の計 222 個体を採集した。そのうち 142 個体で核型の決定に成功した(表 2)。得られたすべての個体の核型は、大きさの連続した単腕型の染色体セットで構成され、倍数性の違い(2 倍体は 44 本、3 倍体は 66 本)を除いてはこれらの中に変異はみられなかった(図 2)。そこで、核型の得られなかった個体については、核型の得られた同じ島群内のよく似た斑紋をもつ個体と同じ核型をもつとみなした。この仮定は電気泳動の結果と矛盾しなかった。

遺伝的な変異は調べた21の遺伝子座のうち、13の遺伝子座で観察された。3倍体のバンドパターンで濃さが2倍になる現象や3つの対立遺伝子の出現は、7つの遺伝子座でみられた。電気泳動により全部で14のクローンが確認され、これらの結果は斑紋や倍数性でのクローンのタイプ分けと矛盾しなかった(表3)。

## b. 各地のクローン組成

### 1) 小笠原諸島

現在のフィールド調査で父島と母島から得られたすべての個体は2倍体で、対になった小さなV字型の斑紋が背中線上に7または8対並ぶ以外、目立った模様はみられなかった(図3A)。またこれらの中に遺伝的な変異はみられなかった(表4)。そこでこれらを太平洋熱帯域の島々に広く分布し、背面のV字型の模様で特徴づけられるクローンA (Ineich, 1988, 1999) と同定した。

### 2) 琉球列島

沖縄諸島、宮古諸島、八重山諸島から採集した雌の標本89個体はすべて、Ineich (1988)の太平洋の島々にみられるクローンCと同様に、首の側面と尾の基部にそれぞれ対になった黒色斑を、また背中線上には不明瞭なW型の模様がみられた(図3B)。さらに、これらの間に遺伝的な変異は確認されなかった。したがって琉球列島から採集されたすべての雌の標本をクローンCと同定した。

また八重山諸島の石垣島からは、倍数性が不明でクローンCに似た斑紋をもち、稔性のない雄型個体が1個体見ついている(Yamashiro and Ota, 1998)。電気泳動で調べたところ、この雄型個体と石垣島や琉球列島の他の島々から採集されたクローンCと思われる個体との間には、遺伝的な違いは認められなかった。

### 3) 大東諸島

調査した2つの島の標本には2倍体と3倍体の両方のクローンが含まれていた。このうち2倍体のクローンはすべて、比較的是っきりしたW型の模様が頭部にあり、首の側面と尾の基部には対になった黒色斑がみられた。さらに胴部の背中線上には、山形と短い線が交互に並んでいた(図4A)。これら2倍体のクローン内に遺伝的な違いはなかった。小笠原諸島の2倍体のクローンAと比較したところ、これら大東の2倍体とは11の遺伝子座で異なっていた。この違いと独特な斑紋パターンから、今後この大東諸島の2倍体をクローンDaと呼ぶ。

これとは対照的に大東諸島の3倍体個体は、斑紋パターン、遺伝子組成ともに変異に富んでいた(表3)。このうち北大東島の4個体は、首の側面と尾の基部に対になった黒色斑をもち、頭部にはW型の模様があった。また胴のやや体側寄りの所には、幅の広い三日月形の模様が2列に並んでいた(図4B)。さらに遺伝子型を琉球列島の3倍体のクローンCと比較したところ、7つの遺伝子座で異なっていた。これらはこうした斑紋の特

徴から、仏領ポリネシアやマイクロネシアに分布する Ineich (1988)のクローン B と同定された。南大東島で採集された 1 個体は、クローン B に似た斑紋を持つが加えて背中線を横切る点線がはいっていた。また、遺伝的にもクローン B とよく似た遺伝子型を示したが、遺伝子座 *Pgm-2* で対立遺伝子 *c* をもっていない点で異なっていた。したがってこの個体をクローン B' と呼ぶ(図 4C)。

残りの 3 倍体は 1 個体を除きすべて、クローン B に似るが、はっきりした黒い斑紋がやや少ない点で異なっていた(図 4D~K)。電気泳動で調べたところ、これらの 3 倍体個体は 8 つのクローン(クローン B1-1~B1-8)に分かれた(表 3)。クローン B1-1 はクローン B とは 4 つの遺伝子座(*Aat*, *Glydh*, *Pgdh*, *Pgm-2*)で異なっており、南大東島の 3 倍体の中で数的にもっとも優位であった(表 4)。クローン B1-2~B1-7 は互いとクローン B1-1 とは 1 つか 2 つの遺伝子座、クローン B と B'からは 3 つか 4 つの遺伝子座で異なっており、南大東島でのみ見つかった。これに対してクローン B1-8 は北大東島でのみ見つかっており、クローン B1-1~B1-7 とは 1 つか 2 つの遺伝子座で異なり、クローン B と B'からは 3 つの遺伝子座で異なっていた。南大東島から採集された残りの 1 個体の斑紋は独特の斑紋で、首の側面と尾の基部にしか黒色斑がなかった(図 4L)。電気泳動でみると、この個体はアロザイムのバンドの出なかった遺伝子座 *Glydh* を除いてはクローン B1-5 と同じ遺伝子型(表 3)を示した。今後この個体をクローン N と呼ぶ。

#### ④考察

電気泳動の結果、すべてのクローンでヘテロ接合性が高いことが示された。これはオガサワラヤモリが雑種起源であるということも強く支持している(Volobouev *et al.*, 1993; Radtkey *et al.*, 1995; Boissinot *et al.*, 1997)。ところで今回の実験では、3 倍体のいくつかの遺伝子座において、2 つの対立遺伝子座を想定することでしか説明できないような電気泳動像がいくつかみられた(表 3)。たとえば 3 倍体のクローン C では、遺伝子座 *Glydh* で 2 つの対立遺伝子の生成物であると解釈するのが妥当と思われる 2 つの等しい濃度のバンドが現れた。Pasteur *et al.* (1987)も、太平洋熱帯域の 3 倍体の個体を用いたアロザイム電気泳動で同じ様な現象を報告している。これらの結果は、3 倍体のゲノムで 3 つの対立遺伝子のうちのひとつが頻繁に抑制されている可能性を示唆している。

今回の調査により、日本国内、特に大東諸島のオガサワラヤモリ集団は驚くほどクローンの多様性が高いことが明らかになった。とはいえ小笠原諸島の集団については、2 倍体のクローン A のみから構成されていることが強く示唆された(表 4)。Makino and Momma (1949) は、父島から採集された 1 標本を調べ、63 本の単腕型の染色体をもつと報告している。この染色体数については議論のあるところだが(Moritz and King, 1985)、その当時父島に染色体数に変異のあるクローンがいたというよりは、むしろ  $2n=3x=66$  のクローンがおり、その染色体数の算定を彼らが誤った可能性が高い。Makino and Momma (1949)が父島の標本の

染色体をみるために用いた生殖腺切片法は、通常あまり細胞が広がらず、正確に染色体を数えるのが難しいからである(Gorman, 1973; Ota and Lue, 1994)。

Ineich (1999)は様々な年代にわたって南太平洋やインド洋の島嶼から採集された多くのオガサワラヤモリの博物館標本を調べ、もともとニューギニアやニューブリテン、ソロモン諸島などの限られた地域にしかいなかったクローン A が、第二次世界大戦中やその後の物資の輸送に伴ってその分布を急激に拡大した可能性が高いことを指摘した。さらに彼は、ポリネシアやミクロネシアのいくつかの島で、クローン A の到着前後にクローン組成の明らかな変化が認められることを報告し、このこともクローン A が競争の結果、他のクローンを容易に駆逐してしまうことを反映するとしている。第二次世界大戦後に小笠原諸島と、クローン A が豊富にいるマリアナ諸島(Ineich, 1999)の間に活発な軍事輸送があったことを考慮に入れると、そのときにクローン A が小笠原諸島に入り、かつてそこに存在したと思われる 3 倍体のクローンを駆逐してしまったことが考えられる。

1971 年に初めてオガサワラヤモリの記録された(柴田ほか, 1972)琉球列島では、島嶼間の距離が比較的大きいにもかかわらず、今回得られたサンプルはすべて 3 倍体のクローン C と同定された。このエリアでは、最初に本種が発見されてから 20 年以内にその南部のほとんどの島で相次いでオガサワラヤモリが記録された(Ota, 1989, 1999, 未公開データ)。これらのことから琉球列島のオガサワラヤモリ集団は、比較的最近の少数個体の侵入とその後の列島内の他の島々への分散に由来すると考えられる。

これまで南太平洋のいくつかの島のオガサワラヤモリ集団で稔性のない雄型個体の出現が報告されており(Ineich, 1988, 1999; Ota *et al.*, 1995)、一般にこれらが単為生殖の雌とその同属の両性生殖の雄との間に起こった交雑に由来するとされてきた(Ineich, 1988; Ineich and Ota, 1992; Boissinot *et al.*, 1997)。この仮説に基づいて Ineich (1999)は、全雌集団であるオガサワラヤモリのサンプル内の不稔雄の存在を、同属の両性生殖種が同所的に生息することの指標として用いた。しかしながら、近縁両性生殖種のいない石垣島から不稔の雄型個体が見つかったことから、このような仮定の妥当性には疑問があり、Yamashiro and Ota (1998)は、この雄型個体がホルモン性の性転換に由来すると推測した。今回タンパク質電気泳動の結果、この雄型個体がクローン C と同じ遺伝子型を示すことが明らかになった。このことは Yamashiro and Ota (1998)の仮説を強く支持し、この個体が単為生殖種と両性生殖種の間での交雑に由来することを強く否定する。

琉球列島や小笠原諸島からは 1 種類のクローンしか見つかっていないのに対し、大東諸島からは 2 倍体のクローンと、少なくとも 11 種類の 3 倍体のクローンが見つかった。これらのうち、南大東島では 9 種類、北大東島では 3 種類の 3 倍体のクローンが 2 倍体のクローンと同所的に存在している。北大東島で見つかったクローン B を除くと、大東諸島のすべてのクローンが固有のものであるらしいことも興味深い。大東諸島におけるクローンのこのような多様性と固有性は、以前に南太平洋やインド洋の各島嶼群の集団について報告されたもの(Ineich, 1988, 1999; Ineich and Ota, 1992, 1993; Bolger and Case, 1994; Moritz *et al.*,



1993; Hanley *et al.*, 1994)よりも高く、南大東島と北大東島がどちらも小さく平坦な島である(それぞれ面積が 30.74 と 12.71km<sup>2</sup>、標高が 62 と 74.6m)ことを考えると驚くべきことである。雑種起源で単為生殖をする脊椎動物のクローンの多様化については、2 つの過程が考えられる。すなわち、(1)複数回の交雑による多様化、(2)クローンの系列が確立された後での突然変異の蓄積、である(Darevsky [1992] 参照)。仮説(2)の場合、クローンは突然変異の結果、他のクローンと異なる特有の対立遺伝子を持つことが予想されるが、今回調査した大東諸島のクローンの多様性は明らかにこのような条件を満たしていない(表 3)。したがって大東諸島の 3 倍体のクローンは、2 倍体のオガサワラヤモリと両性生殖の雄との交雑に由来すると考えられる。

大東諸島のような地理的に特別な地域での高いクローン多様性の起源に対しては 2 つの過程が想定できる。すなわち(3)島の中での多様化、(4)島の外からの複数回の侵入である。一般にオガサワラヤモリは、特に人間の活動に伴って分布を拡げるのが得意だと考えられ(上記の琉球列島や小笠原諸島の集団についての考察を参照)、一見(4)の解釈が妥当であるように思われる。しかしながら他の島々とは違い、大東諸島は 1900 年に初めて人間が入植して以来(南大東村誌, 1989)、クローンの多様性の供給源となるような地域との直接的な交易はなく、船や飛行機はクローン C のみが見つかっている琉球列島(上記参照)にしか連絡していない。大東諸島が他のオガサワラヤモリの分布地とも遠く離れている(1800km 以上)ことや、大東諸島のほとんどのクローンが他の地域で見つかっていないことから、(4)の可能性は低いと思われる。このことは大東諸島に南方からの他の陸生動物がまったく入植していないことともよく合う。一方近縁の両性生殖種が大東諸島に存在しないことから、この島の中で複数回の交雑が起こった可能性も低いように見える。Ineich (1999)は、南太平洋やインド洋の島々において、同属の両性生殖種やオガサワラヤモリのいくつかのクローンが、競争や人為的な生息環境の悪化に伴って近年絶滅してしまった事例を紹介している。南大東島と北大東島はかつて密林に覆われており、人間の入植以来、急激に森が切り開かれ鳥類を含む多くの陸生動物が絶滅に追いやられてしまったことが知られている(南大東村誌, 1989;北大東村誌, 1986)。したがって上で述べた複数回の侵入に比べ、両性生殖種の最近の絶滅は、よりありそうである。以上から現在の大東諸島の 3 倍体のクローンにおける多様性は、絶滅してしまった同属の両性生殖種と、クローン Da もしくは絶滅した他の 2 倍体のクローンが、大東諸島内で複数回交雑したことに由来すると予想できる。ただ広い分布域をもつクローン B(Ineich, 1988, 1999)だけは、近年北大東島に入ったのかもしれない。この仮説を検証するためには、ミクロネシアやその他の地域でのオガサワラヤモリ集団と同属の両性生殖種に関する詳細な遺伝的調査が必要である。

### (3)引用文献

Bauer, A.M. and Henle, K. (1994) Familia Gekkonidae (Reptilia, Sauria) Part I

- Australia and Oceania. In *Das Tierreich* Ed by Wermuth, H. and Fischer, M., Walter de Gruyter, Berlin, 306 pp.
- Boissinot, S., Ineich, I., Thaler, L. & Guillaume, C. P. (1997) Hybrid origin and clonal diversity in the parthenogenetic gecko, *Lepidodactylus lugubris* in French Polynesia. *Journal of Herpetology* **31**: 295-298.
- Bolger, D. T. and Case, T. J. (1994) Divergent ecology of sympatric clones of the asexual gecko, *Lepidodactylus lugubris*. *Oecologia* **100**: 397-405.
- Boyer, S. H., Fainer, D. C., Watson, E. J. (1963) Lactate dehydrogenase variation from human blood: Evidence for molecular subunit. *Science* **141**: 642-643.
- Clayton, J. W. and Tretiak, D. N. (1972) Amine-citrate buffers for pH control in starchgel electrophoresis. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **29**: 1169-1172.
- Darevsky, I. S. (1992) Evolution and ecology of parthenogenesis in reptiles. In *Herpetology: Current Research on the Biology of Amphibians and Reptiles. Proceedings of the First World Congress of Herpetology* Ed by Adler, K. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Oxford (Ohio), pp 21-39.
- Gorman, G. C. (1973) The chromosomes of Reptilia, a cytotaxonomic interpretation. In *Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution* Ed by Chiarelli, A. B. and Capanna, E., Academic Press, New York, pp 347-424.
- Hanley, K. A., Bolger, D. T., Case T. J. (1994) Comparative ecology of sexual and asexual gecko species (*Lepidodactylus*) in French Polynesia. *Evolutionary Ecology* **8**: 438-435.
- Ineich, I. (1988) Mise en évidence d'un complexe unisexé-bisexué chez le gecko *Lepidodactylus lugubris* (Sauria, Lacertilia) en Polynésie Française. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **307** (3): 271-277.
- Ineich, I. (1999) Spatio-temporal analysis of the unisexual-bisexual *Lepidodactylus lugubris* complex (Reptilia, Gekkonidae). In *Tropical Island Herpetofauna: Origin, Current Diversity, and Conservation. Developments in Animal and Veterinary Sciences 29* Ed by Ota, H., Elsevier, Amsterdam-Lausanne-New York-Oxford-Shannon-Singapore-Tokyo, pp 199-228.
- Ineich, I. and Ota, H. (1992) Additional remarks on the unisexual-bisexual complex of the gecko, *Lepidodactylus lugubris*, in Takapoto Atoll, French Polynesia. *Bulletin of the College of Science, University of the Ryukyus* **53**: 31-39.
- Ineich, I. and Ota, H. (1993) Morphological variation and distribution of the unisexual-bisexual complex of the gecko, *Lepidodactylus lugubris*, in French Polynesia and Easter Island. *Bulletin of the College of Science,*

- University of the Ryukyus* **56**: 113-120.
- 北大東村誌編集委員会(1986)北大東村誌. 1025 pp. 沖縄県北大東村, 沖縄.
- Makino, S. and Momma, E. (1949) An idiogram study of the chromosomes in some species of reptiles. *Cytologia* **15**: 96-108.
- 南大東村誌編集委員会 (1989)南大東村誌. 1230pp. 沖縄県南大東村, 沖縄.
- Moritz, C. and King, D. (1985) Cytogenetic perspectives on parthenogenesis in the Gekkonidae. In *Biology of Australasian frogs and reptiles* Ed by Grigg, G., Shine, R. and Ehmann, H., Royal Zoological Society of New South Wales, pp 327-337.
- Moritz, C., Case, T. J., Bolger, D. T., Donnellan, S. (1993) Genetic diversity and the history of pacific island house geckos (*Hemidactylus* and *Lepidodactylus*). *Biological Journal of the Linnean Society* **48**: 113-133.
- Ota, H. (1989) A review of the geckos (Lacertilia: Reptilia) of the Ryukyu Archipelago and Taiwan. In *Current Herpetology in East Asia* Ed by Matsui, M., Hikida, T. and Goris, R. C., Herpetological Society of Japan, Kyoto, pp 222-261.
- Ota, H. (1994) Female reproductive cycles in the northernmost populations of the two gekkonid lizards, *Hemidactylus frenatus* and *Lepidodactylus lugubris*. *Ecological Research* **9**: 121-130.
- Ota, H. (1999) Introduced amphibians and reptiles of the Ryukyu Archipelago, Japan. In *Problem snake management: The habu and the brown treesnake* Ed by Rodda, G. H., Sawai, Y., Chiszar, D. and Tanaka, H., Cornell University Press, Ithaca, New York, U. S. A., pp 439-452.
- Ota, H. and Lue, K. Y. (1994) Karyotypes of two Lygosomine skinks of the genus *Sphenomorphus* from Taiwan. *Journal of Herpetology* **28**: 253-255.
- Ota, H., Matsui, M., Hikida T., and Tanaka, S. (1987) Karyotype of a gekkonid lizard, *Eublepharis kuroiwae kuroiwae*. *Experientia* **43**: 924-925.
- Ota, H., Fisher, R. N., Ineich, I. and Case, T. J. (1995) Geckos of the genus *Lepidodactylus* (Squamata: Reptilia) in Micronesia: Description of a new species and reevaluation of the status of *Gecko moestus* Peters, 1867. *Copeia* **1995**: 183-195.
- Pasteur, G., Agnès, J.-F., Blanc, Ch. P. and Pasteur, N. (1987) Polyclony and low relative heterozygosity in a widespread unisexual vertebrate, *Lepidodactylus lugubris* (Sauria). *Genetica* **75**: 71-79.
- Radtkey, R. R., Donnellan, S. C., Fisher R. N., Moritz C., Hanley K. A. and Case T. J. (1995) When species collide: the origin and spread of an asexual species of gecko. *Proceeding of the Royal Society of London* **259**: 145-152.
- Ridgway, G. J., Sherbrune, S. W., Lewis R. D. (1970) Polymorphisms in the esterase of Atlantic herring. *Transaction of the American Fisheries Society* **99**: 147-151.

- 柴田保彦, 窪田正寛, 石村貢(1972)オガサワラヤモリの沖縄本島・与那国島からの記録. 爬虫両棲類学雑誌 **5** (1): 11-12.
- Shaw, C.R. and Prasad, R.(1970) Starch gel electrophoresis of enzymes — A compilation of recipes. *Biochemical Genetics* **4**: 297-320.
- Volobouev, V., Pasteur, G., Ineich, I. and Dutrillaux, B. (1993) Chromosomal evidence for a hybrid origin of diploid parthenogenetic females from the unisexual-bisexual *Lepidodactylus lugubris* complex (Reptilia, Gekkonidae). *Cytogenetics and Cell Genetics* **63**: 194-199.
- Yamashiro, S. and Ota, H. (1998) Discovery of a male phenotype of the parthenogenetic gecko , *Lepidodactylus lugubris*, on Ishigakijima Island of the Yaeyama Group, Ryukyu Archipelago. *Japanese Journal of Herpetology* **17**: 152-155.

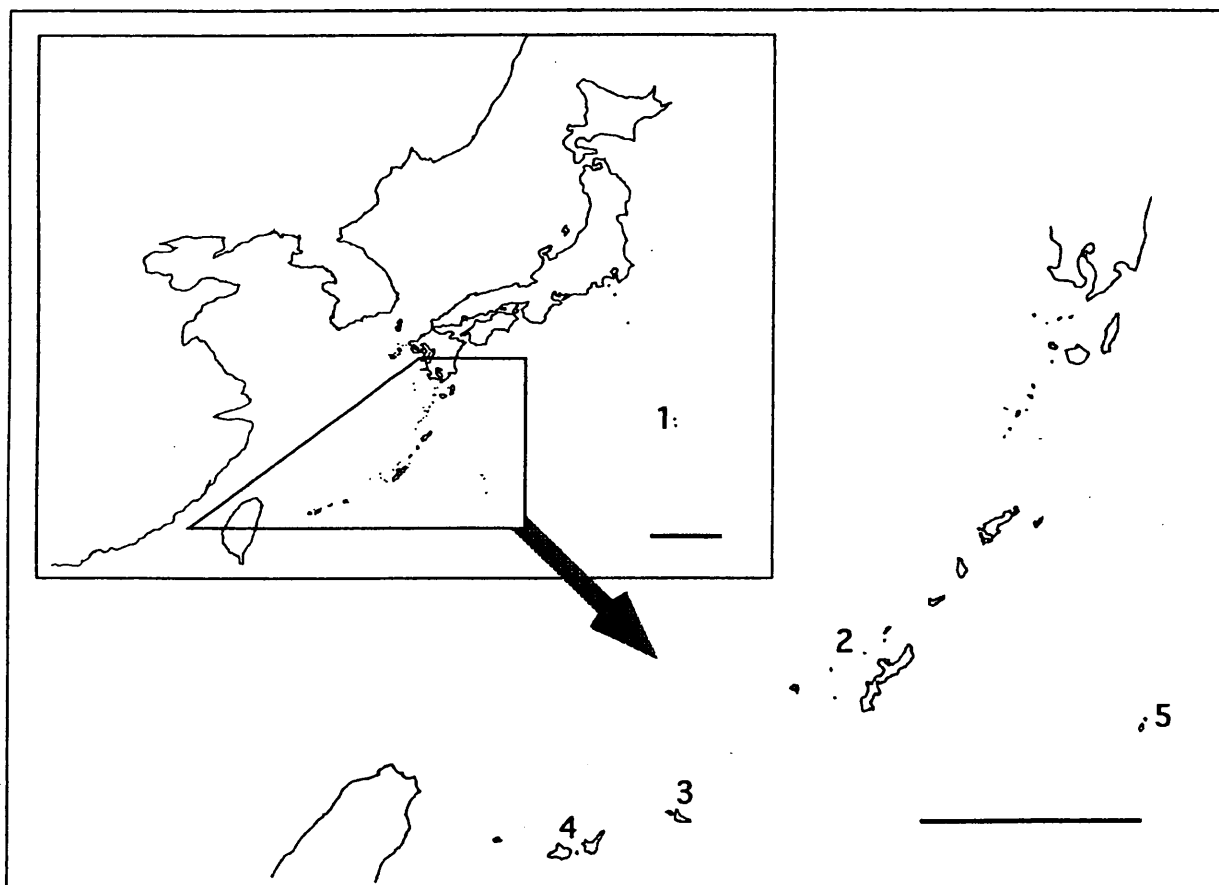


図 1 今回用いたサンプルの採集場所 1.小笠原諸島. 2.沖縄諸島. 3.宮古諸島. 4.八重山諸島. 5.大東諸島。スケールは 300 km。

表 1 電気泳動により検出された酵素、用いたバッファー系、および想定された遺伝子座。  
 \*略記されたバッファー系の出典は次の通り。 AC6, Clayton and Tretiak (1972);  
 TC7, Shaw and Prasad (1970); TC8, Clayton and Tretiak (1972); TBE 8.7, Boyer  
*et al.* (1963); LiOH, Ridgway *et al.* (1970) を改変。

Proteins	E. C. numbers	Buffer system*	Presumed loci
Aspartate aminotransferase	2.6.1.1	TBE8.7	<i>Aat</i>
Adenosine deaminase	3.5.4.4	TC7	<i>Ada</i>
Aconitate hydratase	4.2.1.3	TC7	<i>Acoh</i>
Esterase	3.1.1.1	TC8	<i>Est-1</i> <i>Est-2</i>
Fumarate hydratase	4.3.1.2	TC7	<i>Fumh</i>
Glycerate dehydrogenase	1.1.1.29	AC6	<i>Glydh</i>
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	1.1.1.8	TC7	<i>G3pdh</i>
Glucose-6-phosphate isomerase	5.3.1.9	TC8	<i>Gpi</i>
L-Iditol dehydrogenase	1.1.1.14	LiOH	<i>Iddh</i>
Isocitrate dehydrogenase	1.1.1.42	TC7	<i>Idh</i>
L-Lactate dehydrogenase	1.1.1.27	TC7	<i>Ldh</i>
Malate dehydrogenase	1.1.1.37	AC6	<i>Mdh</i>
Malate dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> )	1.1.1.40	TC7	<i>Mdhp</i>
Mannose-6-phosphate isomerase	5.3.1.8	LiOH	<i>Mpi</i>
Peptitase (Leucyl-glycyl-glycine)	3.4.--	TC8	<i>Pep-Igg</i>
Peptitase (Leucyl-valine)	3.4.--	TC8	<i>Pep-Iv</i>
Purine-nucleoside phosphorylase	2.4.2.1	TBE8.7	<i>Pnp</i>
Phosphogluconate dehydrogenase	1.1.1.44	LiOH	<i>Pgdh</i>
Phosphoglucomutase	5.4.2.2	TC7	<i>Pgm-1</i> <i>Pgm-2</i>

表 2 今回用いた標本の産地と数.

Locality	Sample size	
	Dorsal pattern and electrophoresis	Karyotype
Ogasawara Islands		
Chichi-jima	22	16
Haha-jima	36	25
Ryukyu Archipelago		
Okinawa Islands		
Yakabi-jima	3	0
Zamami-jima	14	11
Miyako Islands		
Kurima-jima	2	1
Miyako-jima	11	4
Ogami-jima	2	1
Tarama-jima	16	8
Yaeyama Islands		
Iriomote-jima	4	2
Ishigaki-jima	15	3
Kuro-shima	21	18
Yonaguni-jima	2	1
Daito Islands		
Kitadaito-jima	11	8
Minamidaito-jima	63	44

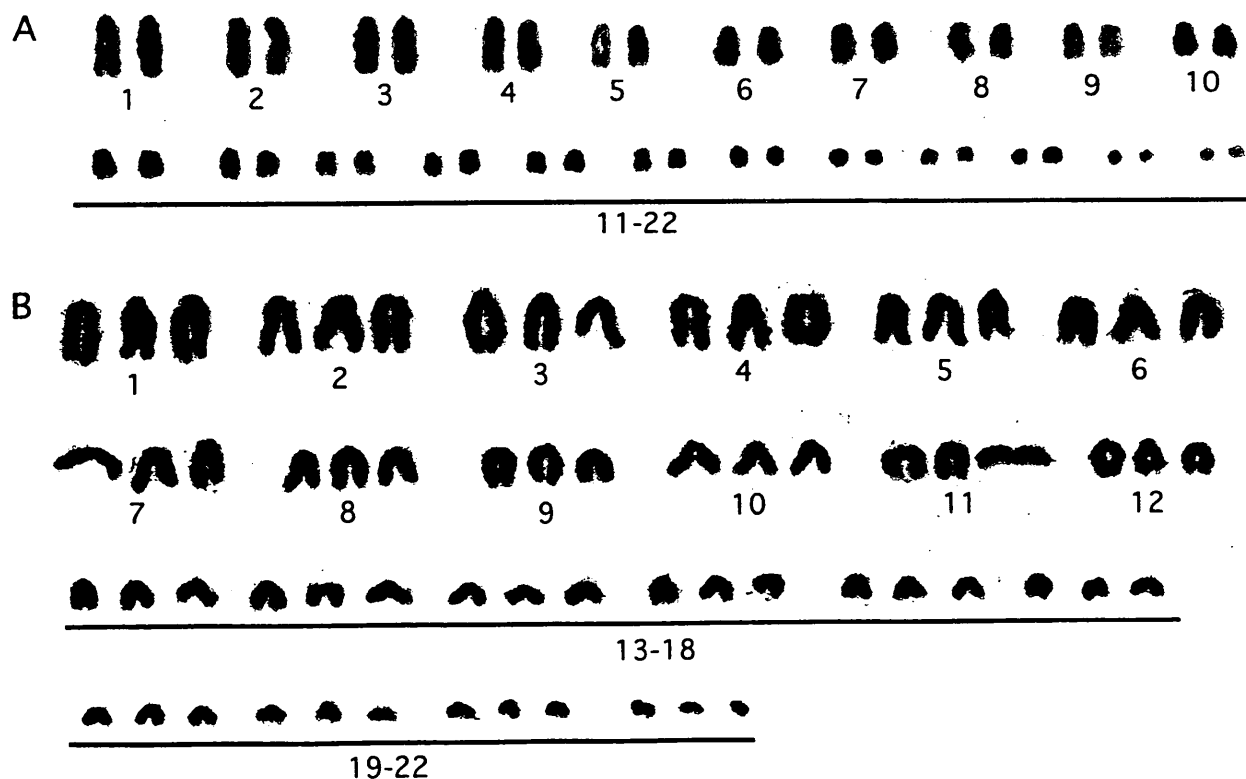


図 2 日本産オガサワラヤモリの核型. A.小笠原諸島母島産のクローン A(2 倍体)個体のもの. B.八重山諸島西表島産のクローン C(3 倍体)個体のもの.

表 3 日本産オガサワラヤモリのサンプルにおける多型遺伝子座の遺伝子型. \*2 倍体, および 3 倍体クローンにおける 1 本バンドのみの出現は、それぞれ 2 および 3 遺伝子の同型接合体を示すとして表記してあるが、それぞれ 1 および 2 遺伝子のみの同型接合体の可能性もある (詳しくは本文を参照のこと).

Clone	Ploidy	Locus												
		<i>Aat</i>	<i>Acoh</i>	<i>Glydh</i>	<i>G3pdh</i>	<i>Gpi</i>	<i>Ldh</i>	<i>Mdh</i>	<i>Pnp</i>	<i>Pgdh</i>	<i>Pgm-1</i>	<i>Pgm-2</i>	<i>Est-1</i>	<i>Est-2</i>
A	2x	<i>ab</i>	<i>ac</i>	<i>bb*</i>	<i>bb*</i>	<i>bb*</i>	<i>bb*</i>	<i>bb*</i>	<i>ac</i>	<i>bb*</i>	<i>bb*</i>	<i>cc*</i>	<i>bb*</i>	<i>aa*</i>
C	3x	<i>abb</i>	<i>abb</i>	<i>ab</i>	<i>aaa*</i>	<i>abb</i>	<i>aaa*</i>	<i>aaa*</i>	<i>ac</i>	<i>abb</i>	<i>abb</i>	<i>ccc*</i>	<i>acc</i>	<i>bbb*</i>
Da	2x	<i>ab</i>	<i>ab</i>	<i>ab</i>	<i>aa*</i>	<i>ab</i>	<i>aa*</i>	<i>ab</i>	<i>ab</i>	<i>ab</i>	<i>ab</i>	<i>cc*</i>	<i>cc*</i>	<i>bb*</i>
B	3x	<i>aab</i>	<i>abc</i>	<i>bbb*</i>	<i>aaa*</i>	<i>abb</i>	<i>aaa*</i>	<i>bbb*</i>	<i>ab</i>	<i>aab</i>	<i>abb</i>	<i>acc</i>	<i>acc</i>	<i>bbb*</i>
B'	3x	<i>aab</i>	<i>abc</i>	<i>bbb*</i>	<i>aaa*</i>	<i>abb</i>	<i>aaa*</i>	<i>bbb*</i>	<i>ab</i>	<i>aab</i>	<i>abb</i>	<i>aaa*</i>	<i>acc</i>	<i>bbb*</i>
BI-1	3x	<i>abb</i>	<i>abc</i>	<i>ab</i>	<i>aaa*</i>	<i>abb</i>	<i>aaa*</i>	<i>bbb*</i>	<i>ab</i>	<i>abb</i>	<i>abb</i>	<i>bcc</i>	<i>acc</i>	<i>bbb*</i>
BI-2	3x	<i>bbb*</i>	<i>abc</i>	<i>ab</i>	<i>aaa*</i>	<i>abb</i>	<i>aaa*</i>	<i>bbb*</i>	<i>ab</i>	<i>abb</i>	<i>abb</i>	<i>bcc</i>	<i>acc</i>	<i>bbb*</i>
BI-3	3x	<i>aab</i>	<i>abc</i>	<i>ab</i>	<i>aaa*</i>	<i>abb</i>	<i>aaa*</i>	<i>bbb*</i>	<i>ab</i>	<i>bbb*</i>	<i>abb</i>	<i>bcc</i>	<i>acc</i>	<i>bbb*</i>
BI-4	3x	<i>abb</i>	<i>abc</i>	<i>ab</i>	<i>aaa*</i>	<i>abb</i>	<i>aaa*</i>	<i>bbb*</i>	<i>ab</i>	<i>bbb*</i>	<i>abb</i>	<i>bcc</i>	<i>acc</i>	<i>bbb*</i>
BI-5	3x	<i>aab</i>	<i>abc</i>	<i>ab</i>	<i>aaa*</i>	<i>abb</i>	<i>aaa*</i>	<i>bbb*</i>	<i>ab</i>	<i>abb</i>	<i>abb</i>	<i>bcc</i>	<i>acc</i>	<i>bbb*</i>
BI-6	3x	<i>abb</i>	<i>abc</i>	<i>ab</i>	<i>aaa*</i>	<i>abb</i>	<i>aaa*</i>	<i>bbb*</i>	<i>ab</i>	<i>aab</i>	<i>abb</i>	<i>ccc*</i>	<i>acc</i>	<i>bbb*</i>
BI-7	3x	<i>abb</i>	<i>abc</i>	<i>ab</i>	<i>aaa*</i>	<i>abb</i>	<i>aaa*</i>	<i>bbb*</i>	<i>ab</i>	<i>abb</i>	<i>abb</i>	<i>bcc</i>	<i>acc</i>	<i>bbb*</i>
BI-8	3x	<i>abb</i>	<i>abc</i>	<i>bbb*</i>	<i>aaa*</i>	<i>abb</i>	<i>aaa*</i>	<i>bbb*</i>	<i>ab</i>	<i>abb</i>	<i>abb</i>	<i>bcc</i>	<i>acc</i>	<i>bbb*</i>
N	3x	<i>aab</i>	<i>abc</i>	?	<i>aaa*</i>	<i>abb</i>	<i>aaa*</i>	<i>bbb*</i>	<i>ab</i>	<i>abb</i>	<i>abb</i>	<i>bcc</i>	<i>acc</i>	<i>bbb*</i>



図 3 A.小笠原諸島母島産のクローン A 個体.  
B.沖縄諸島座間味島産のクローン C 個体.



表 4 それぞれの調査地におけるオガサワラヤモリのクローン組成.  
\*石垣島のサンプルには1頭の雄型個体が含まれる.

Site	Clone	Sample size
Ogasawara Islands		
Chichi-jima	clone A	22
Haha-jima	clone A	36
Ryukyu Archipelago		
Okinawa Islands	clone C	17
Miyako Islands	clone C	31
Yaeyama Islands	clone C	42*
Daito Islands		
Kitadaito-jima	clone Da	5
	clone B	4
	clone BI-1	1
	clone BI-8	1
Minamidaito-jima	clone Da	30
	clone B'	1
	clone BI-1	23
	clone BI-2	1
	clone BI-3	1
	clone BI-4	2
	clone BI-5	2
	clone BI-6	1
	clone BI-7	1
	clone N	1

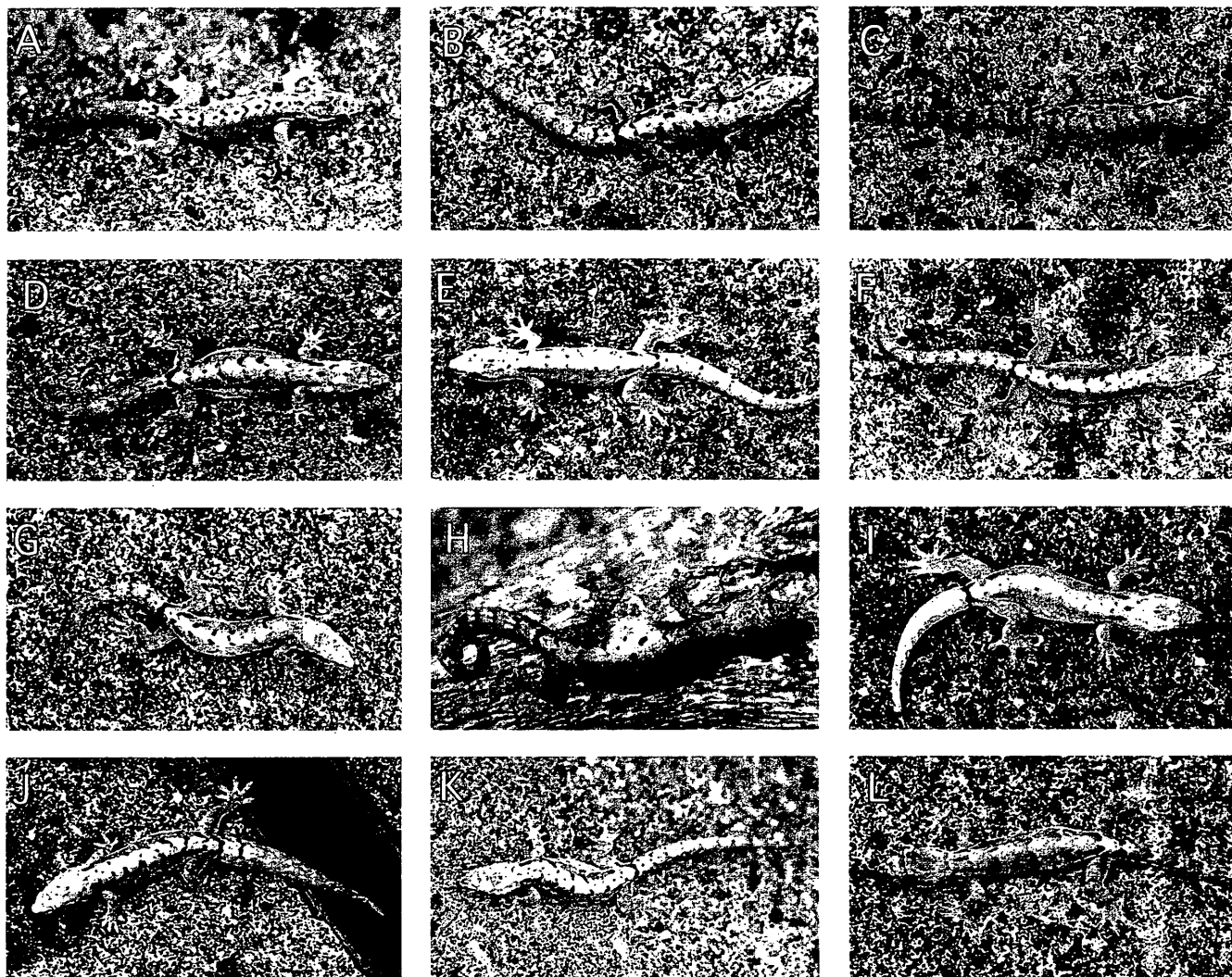


図4 大東諸島のクローン. A. 南大東島産のクローン Da. B. 北大東島産のクローン B.  
 C. 南大東島産のクローン B'. D-J. 南大東島産のクローン BI-1--BI-7.  
 K. 北大東島産のクローン BI-8. L. 南大東島産のクローン N.

## 7. 両生類

京都大学大学院人間環境学研究科 松井 正文

### (1) 現地調査

#### ① 調査選定種

1999 年度は、a. ハクバサンショウウオとヤマサンショウウオの遺伝的關係および、b. 静岡産未同定サンショウウオの近縁種との遺伝的關係、の 2 項目について調査を行った。その理由は以下の通りである。

#### a. ハクバサンショウウオとヤマサンショウウオの遺伝的關係

環境庁版レッドデータブック(環境庁, 1991)において、ハクバサンショウウオ *Hynobius hidamontanus* Matsui, 1987 は危急種として取りあげられ、改訂版(環境庁, 2000)においても絶滅危惧 IB 類とされている。一方、ヤマサンショウウオ *H. tenuis* Nanbu, 1991 はレッドリストにまったく取りあげられていないが、これら 2 種の分類学的関係には問題がある。

そもそも、ヤマサンショウウオの原記載(Nanbu, 1991)によれば、この種はハクバサンショウウオと極めて近縁で、わずかに頭骨の湾曲の程度が異なるというに過ぎない。しかし、頭骨の形態には個体群内でも変異のあることが他の種で知られている。また、ハクバサンショウウオが形態だけでなく、生化学的な根拠にも基づいて記載されたのに対し、ヤマサンショウウオの記載は純粋に形態上の微細な特徴のみからなされており、その種としての独立性には大きな疑問がもたれる。このことから、両者の関係を生化学的な手法を用いて再検討することが不可欠であった。

こうした問題を抱えたヤマサンショウウオ、ハクバサンショウウオは、生息地が山地に限られているものの、ハクバサンショウウオはレッドリストに取りあげられるほど、生息域が狭く、同様にヤマサンショウウオの生息地点も不連続である。こうしたことから、これらはともに環境変化があればただちに危機に陥る可能性が高く、両者の分類学的問題の解決は急を要する課題である。そこで、本年度は、ヤマサンショウウオの分類学的位置を決定すべく、基準産地である長野県産のハクバサンショウウオ、基準産地を含む富山県、岐阜県産のヤマサンショウウオを用いて、それぞれの間の遺伝的關係をアロザイム分析を通じて調査した。また、この調査は、広域に分布する希少種の遺伝的多様性の程度を評価する際の参考資料を得るという目的も含んでいる。

#### b. 静岡産未同定サンショウウオの近縁種との遺伝的關係

1977 年に静岡市安倍川流域で採集されたヒダサンショウウオの中に、体が小さく明らかに別種と思われる小型サンショウウオが含まれていた。このサンショウウオはその後の調査で、静岡県下の数箇所と長野県南部の 1 箇所に分布することが確認されているが、繁殖生態はまったく不明である。これまでに採集された個体はすべて、山地溪流付近に生息していることから、流水

産卵性の種であることは間違いないと思われるが、卵嚢や幼生が未知のため、分類学的結論を出すことができなかった。そこで本年度は、静岡産未同定サンショウウオと、比較のために近隣地域産の数種の小型サンショウウオの標本を採集し、アロザイム分析を通じて種間の遺伝的関係を調査した。

## ②現地調査結果

平成11年4月から11月にかけて、本州の各地で現地調査を行った。その結果、ハクバサンショウウオに関しては基準産地(長野県白馬村)付近で、ヤマサンショウウオについても基準産地(富山県有峰)付近で生息を確認した。また、岐阜県天生峠でもヤマサンショウウオを確認した。なお、比較のためにトウホクサンショウウオ(福島県原町市)とカスミサンショウウオ(滋賀県日野町)の採集を行った。

また静岡産未記載のサンショウウオについては、静岡県内(静岡市、藤枝市、水窪町)で生息を確認したものである。比較のための止水産卵性の種トウキョウサンショウウオは神奈川県横須賀市、流水産卵性の種ブチサンショウウオとヒダサンショウウオは、それぞれ滋賀県土山町と福井県武生市で採集された。

## (2)分子遺伝学的調査

### ①調査目的

上述のように、今回の調査は個体群間の遺伝的多様性に注目し、小型サンショウウオ類の分類学的な問題を解決しようとしたものである。

### ②調査手法

遺伝的多様性を電気泳動法によるアロザイム分析を用いて調査した。現地では採集した成体ないし幼生を生かしたまま研究室に持ち帰り、幼生の一部はただちに、残りは変態させた後に組織を取りだし、遺伝解析の実験に供した。これらについて、すべての個体で常に明瞭な結果の得られた遺伝子座について遺伝子型の特定を行った。

アロザイムパターンから得られた遺伝子型より Nei(1978)の遺伝距離および Wright(1978)の変形 Rogers 距離を算出し、前者については UPGMA 法、後者には Distance Wagner 法を適用して OTU 間関係を表す表形図を作成した。

主として幼生の組織を用いて分析を行った理由は、1)日本産小型サンショウウオが一般に隠棲的で採集が難しく、2)繁殖期以外に多数の成体の標本を得ることが難しいため、分析に十分な数の成体をサンプリングするには長い期間を要し、3)多数の成体を採集すること自体が、種の保護と生息環境の保全を目指すための基礎資料を得るという研究の目的にそぐわず、4)発育に伴って酵素の発現型が変化することはなく、成体と幼生間で遺伝子型に違いのないことがすでに他種で分かっているためである。

### ③調査結果

#### a. ハクバサンショウウオとヤマサンショウウオの遺伝的關係

ハクバサンショウウオ(長野県白馬村産 16 個体)、ヤマサンショウウオ(富山県有峰産 13 個体、岐阜県天生峠産 7 個体)、トウホクサンショウウオ(福島県原町市産 6 個体)とカスミサンショウウオ(滋賀県日野町産 4 個体)のすべてで明瞭なバンドのみられた合計 19 酵素 24 遺伝子座(表 1)について遺伝子型の特定を行なった(表 2)。

UPGMA 法(図 1)では、各 OTU はまず、トウホクサンショウウオと、その他の 2 グループに分けられた。これら 2 グループ間の Nei(1978)の遺伝距離は 0.43 であった(表 3)。次に後者のグループではカスミサンショウウオが他の OTU の外側に位置し、カスミサンショウウオと他の OTU との遺伝距離は 0.42 と大きな値をとった。この後者のグループ内部ではヤマサンショウウオの 2 個体群がグループを形成することはなかった。すなわち、岐阜県天生峠産のヤマサンショウウオが、富山県有峰産ヤマサンショウウオとハクバサンショウウオの成す群から最初に分かれたが、その遺伝距離(Nei, 1978)は 0.067 という小さな値であった。富山県有峰産ヤマサンショウウオとハクバサンショウウオの間の距離は、0.009 と、極めて小さかった。

Distance Wagner 法(図 2)では、トウホクサンショウウオ、カスミサンショウウオ、その他 OTU の 3 グループが分かれた点で UPGMA 法の結果とは異なっていたが、その他 OTU 内部での関係については、樹形は UPGMA 法の結果と完全に一致していた。

#### b. 静岡産未同定サンショウウオの近縁種との遺伝的關係

静岡産未記載のサンショウウオ(静岡市、藤枝市、水窪町産合計 13 個体)、トウキョウサンショウウオ(神奈川県横須賀市産 5 個体)、ヒダサンショウウオ(福井県武生市産 5 個体)とブチサンショウウオ(滋賀県土山町産 5 個体)のすべてで明瞭なバンドのみられた合計 16 酵素 25 遺伝子座(表 4)について遺伝子型の特定を行なった(表 5)。

UPGMA 法(図 3)では、各 OTU はまず、ヒダサンショウウオとその他 OTU の 2 グループに分けられ、両者間の Nei(1978)の遺伝距離平均値は 1.03 と極めて大きかった(表 6)。ヒダサンショウウオを除いた OTU の内部では、静岡産未記載のサンショウウオと、残り 2 種の 2 グループが、やはり大きな遺伝距離(0.76)をもって区分された(図 3)。残りの 2 種、トウキョウサンショウウオとブチサンショウウオの差もかなり大きく遺伝距離は 0.57 に及んだ。

Distance Wagner 法(図 4)では、UPGMA 法の結果とは異なった樹形が得られた。まず、ヒダサンショウウオとその他 OTU が分かれた後、最初に分岐したのはトウキョウサンショウウオで、静岡産未記載のサンショウウオはブチサンショウウオとグループを形成した。しかし、それぞれの種間の分岐関係はほぼ同様の、極めて深いものであった(図 4)。

#### ④分析および考察

##### a. ハクバサンショウウオとヤマサンショウウオの遺伝的關係

今回の結果から、現在、それぞれが独立の種とされているハクバサンショウウオとヤマサンショウウオは、各地での分化の程度が低く、遺伝的に極めて類似した動物群であることが明らかである。ヤマサンショウウオの2個体群どうしではなく、一方の個体群(富山県有峰産)がハクバサンショウウオとグループを形成し、その間の遺伝距離が極めて小さかったこと、しかもこの個体群はヤマサンショウウオの基準産地から得られたものであることを考慮すれば、今回の結果は、ハクバサンショウウオとヤマサンショウウオが同種である可能性を極めて強く示唆しているといえる。ヤマサンショウウオのもう一方の個体群(岐阜県天生峠産)と、これらとの遺伝距離(0.067)も、亜種を認めるほどの分化を示していないと判断される。一方、比較のために用いたカスミサンショウウオとトウホクサンショウウオは、ともにハクバサンショウウオとヤマサンショウウオの成すグループから十分に大きな遺伝距離をもって区別され、別種であることは間違いない。

先に述べたように、現在、ハクバサンショウウオは環境庁のレッドリスト(環境庁, 2000)に絶滅危惧IB類として掲載されているが、その主な理由は分布範囲が基準産地である長野県白馬村付近に限られ、極めて狭いことにある(松井, 2000)。今回の結果から、ヤマサンショウウオがハクバサンショウウオと同種であることが強く示唆された。これに基づいて分類学的変更を行なう場合、ヤマサンショウウオはハクバサンショウウオの同物異名となるだけでない。両者を含めた広義のハクバサンショウウオの分布域は長野県、富山県、岐阜県と、現在よりずっと広範になる。しかし、ヤマサンショウウオの分布域も富山県、岐阜県の内部ではごく限られ、各生息地は互いに孤立している。したがって、レッドリストにおけるランクの見直しは必要なものの、広義のハクバサンショウウオをレッドリストに掲載し、保護の対象とせざるを得ない状況は変わらないであろう。

##### b. 静岡産未同定サンショウウオの近縁種との遺伝的關係

今回の調査の結果から、静岡産未同定サンショウウオは、比較に用いた止水産卵性のトウキョウサンショウウオ、流水産卵性のヒダサンショウウオ、ブチサンショウウオのいずれとも遺伝的に大きく異なることが明らかになった。静岡産未同定サンショウウオは他の種との遺伝的距離からみて、完全に独立種であると判断されるから、早急に分類学的な記載を行なう必要がある。また、今回の結果からは、静岡産未同定サンショウウオは、止水産卵性のトウキョウサンショウウオ、流水産卵性のブチサンショウウオのどちらにより近縁であるかは解明できなかった。このサンショウウオの繁殖習性は、いまのところまったく不明なので、今後一層の野外生態調査が必要である。一方、このサンショウウオは現在、何ら保護を受けていないが、その分布域が極めて狭く、種内部での遺伝的多様性の程度を調査することができないほど個体数も少ないことを考慮すれば、早急に保護保全の対策をとる必要があると考えられる。

(3)引用文献

環境庁自然保護局野生生物課（1991）日本の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブック—（脊椎動物編）. 340pp. (財)日本野生生物研究センター, 東京.

環境庁自然保護局野生生物課（2000）改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブック—(爬虫類・両生類). 120pp. (財)自然環境研究センター, 東京.

Nunbu, H. (1991) *Hynobius tenuis* (Caudata, Hynobiidae), a new species of salamander from central Japan. *Zoological Science* 8: 991-997.

表 1 ハクバサンショウウオとヤマサンショウウオの遺伝的關係について  
調査された酵素

Enzyme	E.C. number	Locus	Buffer system
Asparate aminotransferase	2.6.1.1	Aat-1	CAPM6
Asparate aminotransferase	2.6.1.1	Aat-2	CAPM6, TC7
Aconitate hydratase	4.2.1.3	Ah	TC8
Alcohol dehydrogenase	1.1.1.1	Adh	TBE8.7
Fumarate hydratase	4.2.1.1	Fum	TBE8.7
Guanine deaminase	3.5.4.2	Gda	TBE8.7
Glucose-6-phosphate isomerase	5.3.1.9	Gpi	CAPM6
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	1.1.1.8	G3pdh	TC8
Glutamate dehydrogenase	1.4.1.3	Gtdh	TC8
3-Hydroxybutyrate dehydrogenase	1.1.1.30	Hbdh	CAPM6
Isocitrate dehydrogenase	1.1.1.42	Idh	TC7
L-Lactate dehydrogenase	1.1.1.27	Ldh-1	CAPM6, TC7
L-Lactate dehydrogenase	1.1.1.27	Ldh-2	CAPM6, TC7
Malate dehydrogenase	1.1.1.37	Mdh-1	CAPM6, TC8
Malate dehydrogenase	1.1.1.37	Mdh-2	CAPM6, TC8
Malic enzyme*	1.1.1.40	Me-1	TC7
Malic enzyme*	1.1.1.40	Me-2	TC7
Peptidase(leucyl-alanine)	3.4.11.-	Pep-la	TBE8.7
Phosphogluconate dehydrogenase	1.1.1.44	Pgd	TC7
Phosphoglucomutase	5.4.2.2	Pgm-1	TC7
Phosphoglucomutase	5.4.2.2	Pgm-3	TC7
Sorbitol dehydrogenase	1.1.1.14	Sdh	CAPM6
Superoxide dismutase	1.15.1.1	Sod	TBE8.7
Xanthine dehydrogenase	1.1.1.204	Xdh	TC8

\*NADP-dependent malate dehydrogenase

Buffer systems

CAPM6:Citrate-aminopropylmorpholine, pH6.0 (Clayton and Tretiak,1972)

TC7:Tris-citrate, pH7.0 (Show and Prasad,1970)

TC8:Tris-citrate, pH8.0 (Clayton and Tretiak,1972)

TBE8.7:Tris-borate-EDTA, pH8.7 (Boyer et al.,1963)



表2 ハクバサンショウウオとヤマサンショウウオの遺伝的關係について  
調査された多型遺伝子の頻度

	OTU				
	ハクバ N=16	ヤマ(富山) N=13	ヤマ(岐阜) N=7	カスミ N=4	トウホク N=6
AAT-1					
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
AAT-2					
A	.000	.000	.000	.000	1.000
B	1.000	1.000	1.000	1.000	.000
ACN-1					
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
ADH					
A	.000	.000	.000	1.000	.000
B	.000	.000	.000	.000	1.000
C	1.000	1.000	1.000	.000	.000
FUM					
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
GDA					
A	.000	.077	.429	.000	.000
B	.000	.000	.429	.000	.000
C	.000	.000	.000	1.000	1.000
D	1.000	.923	.143	.000	.000
G3PDH					
A	.000	.000	.000	1.000	1.000
B	.938	1.000	1.000	.000	.000
C	.063	.000	.000	.000	.000
GPI					
A	.000	.000	.000	.375	.000
B	1.000	.462	1.000	.000	.833
C	.000	.192	.000	.500	.000
D	.000	.346	.000	.125	.167
GTDH					
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
HBDH					
A	.000	.000	.000	.000	1.000
B	1.000	1.000	1.000	1.000	.000
IDH					
A	.000	.000	.000	.500	.000
B	.000	.038	.000	.000	.167
C	1.000	.962	1.000	.500	.833
LDH-1					
A	.000	.077	1.000	1.000	.000
B	1.000	.923	.000	.000	1.000
LDH-2					
A	1.000	1.000	1.000	.000	1.000
B	.000	.000	.000	.500	.000
C	.000	.000	.000	.500	.000
MDH-1					
A	1.000	1.000	1.000	.750	.000
B	.000	.000	.000	.000	1.000
C	.000	.000	.000	.250	.000
MDH-2					
A	1.000	1.000	1.000	1.000	.833
B	.000	.000	.000	.000	.167
ME-1					
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ME-2					
A	1.000	1.000	1.000	.000	.000
B	.000	.000	.000	1.000	1.000
PEPla					
A	.000	.000	.000	.000	.750
B	1.000	1.000	1.000	.000	.083
C	.000	.000	.000	.000	.083
D	.000	.000	.000	1.000	.083
PGD					
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
PGM-1					
A	.063	.000	.000	.875	.000
B	.938	1.000	1.000	.125	1.000
PGM-3					
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
SDH					
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
SOD					
A	.000	.077	.000	.250	.000
B	.031	.000	.000	.000	.000
C	.969	.923	1.000	.750	1.000

表3 ハクバサンショウウオとヤマサンショウウオの遺伝的關係について調査された OTU 間の遺伝的距離

OTU	1	2	3	4	5
1 ハクバ	--	.009	.067	.457	.406
2 ヤマ (富山)	.102	--	.067	.429	.419
3 ヤマ (岐阜)	.255	.253	--	.383	.460
4 カスミ	.592	.573	.551	--	.433
5 トウホク	.569	.571	.596	.573	--

上段: Nei (1978) の遺伝的距離

下段: Rogers の変形遺伝的距離 (Wright, 1978)

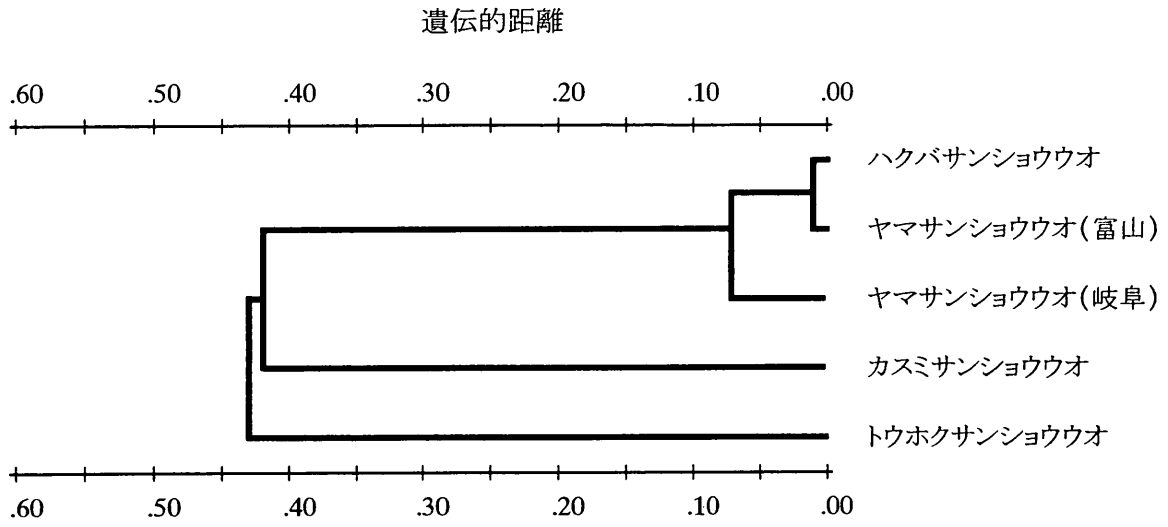


図1 Nei (1978)の遺传的距離に基づく各 OTU の関係

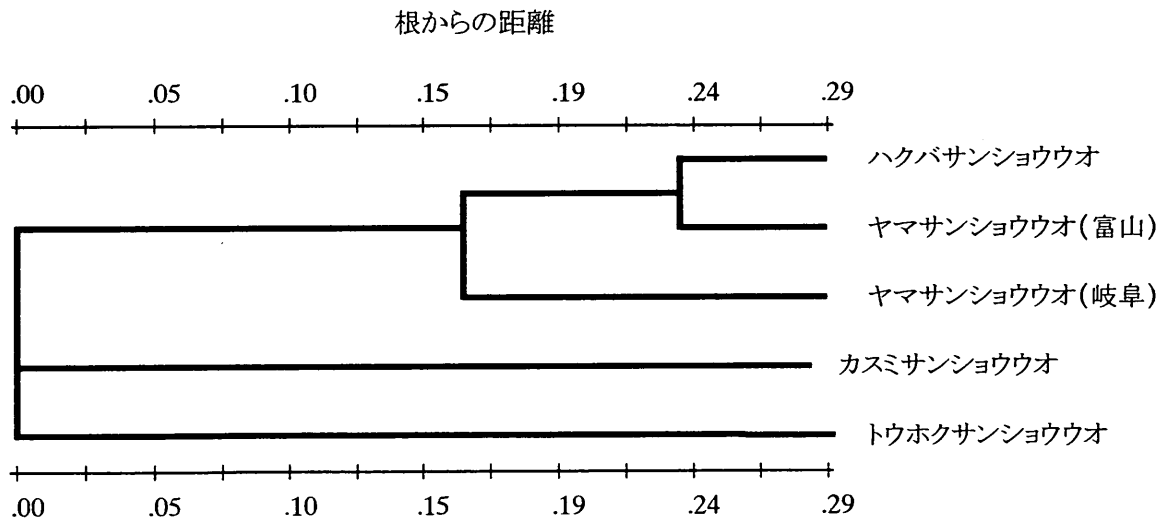


図2 Rogers の変形遺传的距離に基づく各 OTU の関係

表 4 静岡産未同定サンショウウオの近縁種との遺伝的關係について調査された酵素

Enzyme	E.C.number	Locus	Buffer system
Asparate aminotransferase	2.6.1.1	Aat-1	CAPM6
Asparate aminotransferase	2.6.1.1	Aat-2	CAPM6, TC7
Aconitate hydratase	4.2.1.3	Ah-1	TC8
Aconitate hydratase	4.2.1.3	Ah-2	TC8
Esterase	3.1.1.1	Est-1	TC7
Esterase	3.1.1.1	Est-2	TC7
Fumarate hydratase	4.2.1.1	Fum	TBE8.7
Guanine deaminase	3.5.4.2	Gda	TBE8.7
Glucose-6-phosphate isomerase	5.3.1.9	Gpi	CAPM6
Glutamate dehydrogenase	1.4.1.3	Gtdh	TC8
Isocitrate dehydrogenase	1.1.1.42	Idh	TC7
L-Lactate dehydrogenase	1.1.1.27	Ldh-1	CAPM6, TC7
L-Lactate dehydrogenase	1.1.1.27	Ldh-2	CAPM6, TC7
Malate dehydrogenase	1.1.1.37	Mdh-1	CAPM6, TC8
Malate dehydrogenase	1.1.1.37	Mdh-2	CAPM6, TC8
Malic enzyme*	1.1.1.40	Me-1	TC7
Malic enzyme*	1.1.1.40	Me-2	TC7
Peptidase(leucyl-alanine)	3.4.11.-	Pep-la	TBE8.7
Peptidase(leucyl-glycine)	3.4.11.-	Pep-lg	TBE8.7
Peptidase(leucyl-glycyl-glycine)	3.4.11.-	Pep-lgg	TBE8.7
Phosphogluconate dehydrogenase	1.1.1.44	Pgd	TC7
Phosphoglucomutase	5.4.2.2	Pgm-1	TC7
Phosphoglucomutase	5.4.2.2	Pgm-3	TC7
Sorbitol dehydrogenase	1.1.1.14	Sdh	CAPM6
Superoxide dismutase	1.15.1.1	Sod	TBE8.7

\*NADP-dependent malate dehydrogenase

Buffer systems

CAPM6: Citrate-aminopropylmorpholine, pH6.0 (Clayton and Tretiak, 1972)

TC7: Tris-citrate, pH7.0 (Show and Prasad, 1970)

TC8: Tris-citrate, pH8.0 (Clayton and Tretiak, 1972)

TBE8.7: Tris-borate-EDTA, pH8.7 (Boyer et al., 1963)

表5 静岡産未同定サンショウウオの近縁種との遺伝的關係について調査された多型遺伝子の頻度

	OTU			
	静岡 N=13	トウキョウ N=5	ヒダ N=5	ブチ N=5
AAT-1				
A	1.000	1.000	1.000	1.000
AAT-2				
A	.000	.000	.000	.000
B	.000	1.000	.000	.000
C	.962	.000	1.000	1.000
D	.038	.000	.000	.000
ACN-1				
A	.000	.900	1.000	.000
B	1.000	.100	.000	1.000
ACN-2				
A	.000	1.000	.000	.000
B	1.000	.000	.000	.000
C	.000	.000	1.000	.000
D	.000	.000	.000	1.000
EST-1				
A	.000	.000	.000	.000
B	.000	.000	.000	.900
C	.000	1.000	.000	.100
D	.000	.000	.000	.000
E	1.000	.000	1.000	.000
EST-2				
A	1.000	.000	.000	.000
B	.000	.000	.000	.600
C	.000	1.000	.000	.400
D	.000	.000	.000	.000
E	.000	.000	1.000	.000
FUM				
A	1.000	1.000	.000	1.000
B	.000	.000	1.000	.000
GDA				
A	.000	.000	.000	.600
B	.000	.000	1.000	.400
C	.000	1.000	.000	.000
D	1.000	.000	.000	.000
GPI				
A	.000	.000	.000	.000
B	.000	1.000	1.000	1.000
C	.000	.000	.000	.000
D	1.000	.000	.000	.000
GTDH				
A	1.000	1.000	1.000	1.000
IDH				
A	1.000	1.000	1.000	1.000
LDH-1				
A	1.000	.000	.000	.000
B	.000	.000	1.000	.000
C	.000	1.000	.000	1.000
LDH-2				
A	.846	.000	.000	.000
B	.154	.000	.000	.000
C	.000	.000	.000	1.000
D	.000	1.000	.000	.000
E	.000	.000	1.000	.000
MDH-1				
A	.000	.000	.000	.700
B	1.000	1.000	.000	.300
C	.000	.000	.000	.000
D	.000	.000	1.000	.000
MDH-2				
A	.000	.000	1.000	.000
B	.000	.000	.000	.000
C	1.000	1.000	.000	1.000

ME-1				
A	.000	1.000	1.000	1.000
B	.000	.000	.000	.000
C	.000	.000	.000	.000
D	.192	.000	.000	.000
E	.808	.000	.000	.000
ME-2				
A	.000	.200	1.000	.000
B	1.000	.800	.000	1.000
PEPla				
A	.923	.000	.000	.000
B	.077	1.000	1.000	.000
C	.000	.000	.000	.900
D	.000	.000	.000	.100
PEPlg				
A	1.000	1.000	1.000	.000
B	.000	.000	.000	1.000
PEPgg				
A	.000	1.000	1.000	.600
B	.000	.000	.000	.400
C	1.000	.000	.000	.000
PGD				
A	.000	.000	1.000	.000
B	.000	.000	.000	.000
C	1.000	1.000	.000	.900
D	.000	.000	.000	.100
PGM-1				
A	1.000	1.000	1.000	1.000
PGM-3				
A	.000	.000	.800	.000
B	.000	.000	.200	.000
C	.000	.000	.000	1.000
D	1.000	.000	.000	.000
E	.000	1.000	.000	.000
SDH				
A	1.000	.000	.000	.000
B	.000	.000	1.000	1.000
C	.000	1.000	.000	.000
SOD				
A	.000	.000	1.000	.000
B	1.000	1.000	.000	1.000

表 6 静岡産未同定サンショウウオの近縁種との遺伝的關係について調査された OTU 間の遺伝的距離

OUT	1	2	3	4
1 静岡	--	.795	1.244	.733
2 トウキョウ	.732	--	.888	.571
3 ヒダ	.834	.761	--	.958
4 ブチ	.700	.643	.765	--

上段: Nei (1978) の遺伝的距離

下段: Rogers の変形遺伝的距離 (Wright, 1978)

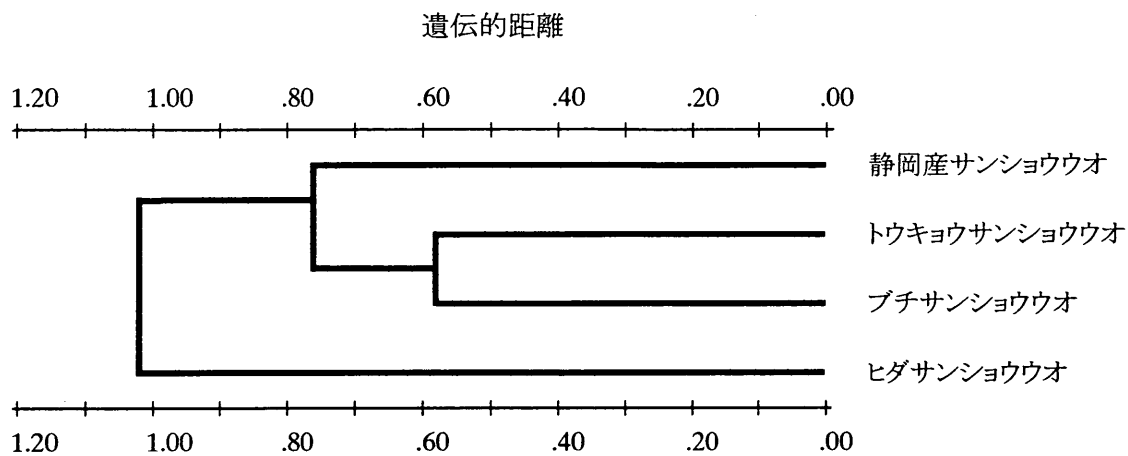


図 3 Nei (1978)の遺伝的距離に基づく各 OTU の関係



図 4 Rogers の変形遺伝的距離に基づく各 OTU の関係

## 8. 淡水魚類

東京大学海洋研究所 山崎 裕治 西田 睦

### (1) 調査対象種と調査目的

本年度はヤツメウナギ科カワヤツメ属のスナヤツメ(*Lethenteron reissneri*)について調査を行った。本種はロシア・アムール川で採集された標本について記載(Dybowski, 1869)されて以降、日本列島ほぼ全域、朝鮮半島およびロシア極東域から報告されている(岩田, 1989; 山崎・後藤, 2000)。本種は1999年に再検討された環境庁のレッドリストにおいて、絶滅危惧 II 類にランクされている希少魚である。また、スナヤツメは商業的な価値が低く、他魚種との混獲も少ないと考えられることから、本種の人為的な移植は起きておらず、地理的集団構造は乱されていないと考えられる。そのため本種は分布域形成プロセスの研究対象としても適していると考えられ、それを解明することは、日本列島における淡水魚類相の形成史の解明に寄与すると期待される。

最近のアロザイム解析により、スナヤツメには高度に遺伝的分化を遂げた二型(北方型と南方型)の存在が明らかになった(Yamazaki and Goto, 1996)。二型の同所的生息地において、両者間に遺伝子交流が認められず、生殖的隔離の存在が示唆されたため、それぞれ独立した種であると考えられている。そこで本報告では便宜的に、これら二型をそれぞれ種として扱う。

本調査はスナヤツメ 2 種について、アロザイムより高い変異性を有することが期待されるミトコンドリア DNA(mtDNA)の塩基配列を遺伝的指標として用い、両者間の分化程度および各種内の地域集団構造を解明することを目的とした。そして、それらの結果に基づいて、各種の遺伝的な独立性および分布域形成プロセスを検討する。

### (2) 調査手法

日本列島のほぼ全域にわたる 38 地点、および朝鮮半島南部の 3 地点の計 41 地点から、各 1-11 個体を分析試料として用いた(図 1)。粗全 DNA は、アロザイム分析により 2 種判別が行なわれた標本の筋肉片から、標準的なフェノール・クロロホルム法とエタノール沈殿法によって抽出・精製された。

遺伝的指標としては、mtDNA の cytochrome oxidase subunit I (COI) 遺伝子領域の塩基配列を用いた。この領域の一部を 2 つのプライマー・ペアによって PCR 法で増幅し、ダイレクトシーケンス法により、自動シーケンサーを用いて塩基配列を決定した。

得られた DNA 配列をアライメントした後、PAUP\*4.0b2 (Swofford, 1999)を用いて、近隣結合法(NJ)により分子系統樹を推定し、1000 回のブーツストラップ確率を算出し、各枝の信頼性を評価した。この際、外群としては同じヤツメウナギ科の *Petromyzon marinus*(Lee and Kocher, 1995)と *Lampetra fluviatilis*(Delarbre et al., 2000)を用いた。



### (3)調査結果

#### ①遺伝的変異

全 75 個体について、COI 遺伝子領域から 1095 塩基対(bp)の塩基配列が決定された。塩基組成は、A が 27.9%、T が 32.8%、G が 23.6%、C が 15.6% であり、A-T 含量が比較的高い傾向が認められた。外群を含めると変異サイトは 264bp(24.1%)であり、算出されたトランジション/トランスバージョン比は 4.28 であった。

同一地点内での塩基配列の個体変異は低く(0.00-0.64%)、いずれの地点においても、地点内の他個体と顕著な差異を示す個体が認められなかったことから、他地点個体の塩基配列ともっとも類似したそれを有する 1 個体を各地点から選び、系統解析に供した。スナヤツメ北方種の 20 地点間における配列差異(表 1:0.09-2.10%, 平均±標準偏差=1.09±0.45%)は、南方種の 24 地点間のそれ(0.00-2.65%, 1.60±0.43%)に比べて有意に低かった(Mann-Whitney の U 検定,  $p<0.0001$ )。

#### ②種間の系統類縁関係

スナヤツメ2種間の配列差異は8.12-10.05%(9.05±0.34%)で(表1)、Kimura の 2 変数距離は 0.087-0.110(0.098±0.004)であった(表 2)。

NJ 法(Kimura の 2 変数距離)により推定された分子系統樹において、アロザイム解析の結果認められたスナヤツメ北方種個体と南方種個体はそれぞれ独立のグループを形成し、それらは高いブーツストラップ確率で支持された(図2)。 *Petromyzon marinus* と *Lampetra fluviatilis* を外群として用いた場合、スナヤツメ 2 種の単系統性は支持されなかった。

### (4)分析および考察

#### ①遺伝的分化と系統関係

今回の解析結果から、アロザイム解析においてそれぞれ独立の遺伝子プールであることが認められたスナヤツメ 2 種が、mtDNA レベルでも交流していないことが示された。これらの結果から、いくつかの魚類種群において報告されている mtDNA のイントログレッションが(Dowling *et al.*, 1989; Wilson and Bernatchez, 1998 ほか)、スナヤツメ 2 種間では起きていないことが示唆される。

日本列島およびその周辺に生息するカワヤツメ属として、スナヤツメ 2 種のほかにカワヤツメとシベリアヤツメが報告されている(岩田, 1989; 山崎・後藤, 2000)。これら 4 分類群の遺伝的類縁関係をアロザイム解析に基づき推定した結果、カワヤツメ、シベリアヤツメおよびスナヤツメ北方種の 3 者が近縁な関係にあり、これら 3 者に比べてスナヤツメ南方種は高度に遺伝的分化を遂げていた(Yamazaki and Goto, 1998)。本研究における *Petromyzon marinus* と *Lampetra fluviatilis* を外群として用いた mtDNA 解析の結果、スナヤツメ北方種と *L. fluviatilis* の単系統性が高いブーツストラップ確率(100%)で支持された。今後、mtDNA を遺伝的指標として、カワヤツメ属 4 分類群の系統関係を推定し、アロザイム解析の結果および従来の形態的特徴とあわせて、スナヤツメ 2

種の帰属問題を解明する必要がある。

## ②遺伝的集団構造と生物地理

スナヤツメ2種いずれにおいても、同一地点の個体間における塩基配列の類似性は高いにも拘わらず、種内地点間の遺伝的分化の程度は、北方種に比べて南方種の方が高い傾向が認められた。また、NJ 樹上で認められたグループは、南方種では地理的に近い地点同士がまとまる傾向が示されたのに対し、北方種ではその傾向は明確には示されなかった(図 2)。すなわち、南方種では山形(22 Ushiwatari, 23 Gakko, 24 Mogami)、環富山湾(26 Kado-kawa, 27 Shou-gawa, 28 Yo-kawa)、日本中部(29 Sagami, 30 Tenryu, 33 Hasu, 34 Makino, 35 Ishida)、東海(31 Tomoe, 32 Hida)、紀伊水道兩岸(36, Kino-kawa, 39 Ogawadani)、北九州(40 Onga, 41 Tade)および韓国洛東江(42 Song, 43 Nam)のそれぞれの地域でグループを形成し、50%以上の高いブーツストラップ確率で支持された。これに対して北方種では、北海道東部(4 Parumai, 5 Okoppe)、南中部(7 Monbetsu, 10 Toshihetsu)、南端部(8 Ohno, 9 Koren)のそれぞれの地域でグループを形成したが、北海道と本州中部の地点(2 Nobusha, 19 Tsuya)が形成したグループが高いブーツストラップ確率(83%)で支持されるなど、地理的位置と関係なくグループを形成するか、明確なグループ形成が認められなかった。アロザイム解析の結果からは、北方種および南方種にはそれぞれ2および3つの地域集団群が認められている(Yamazaki and Goto, 1996)。本研究における mtDNA 解析の結果においては、南方種ではアロザイム解析における地域集団群を細分化する集団構造が示されたのに対し、北方種では明確な対応関係は認められなかった。

2 種間におけるこのような集団構造の違いは、分布域形成における分散経路および時期の違いに起因すると推察される。すなわち、遺伝的集団構造と地理的分布が比較的一致したスナヤツメ南方種では、それぞれの地域ごとに独自の遺伝的分化を遂げ、その後他の地域と交流する機会を得なかったと推察される。一方北方種は、南方種に比べて種分化の時期が新しく、また分散経路も異なると考えられていることから(Yamazaki and Goto, 1998 ほか)、より新しい時代に分布を拡大したことにより、地域ごとの遺伝的分化が十分に起きていないと考えられる。あるいは北方種は特に本州中部域においては遺存的な分布をしていることから(Yamazaki and Goto, 1996 ほか)、各集団における遺伝的浮動の結果、あるいは集団が絶滅した結果として遺伝的集団構造の地域性がうち消された可能性が考えられる。

## (5)引用文献

- Delarbre, C., Escriva, H., Gallut, C., Barriol, V., Kourilsky, P., Janvier, P., Laudet, V. and Gachelin, G. (2000) The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the agnathan *Lampetra fluviatilis*: bearings on the phylogeny of cyclostomes. *Molecular Biology and Evolution* 17: 519-529.

- Dowling, T. E., Smith, G. R. and Brown, W. M. (1989) Reproductive isolation and introgression between *Notropis cornutus* and *Notropis chrysocephalus* (Family Cyprinidae): comparison of morphology, allozymes, and mitochondrial DNA. *Evolution* **43**: 620-634.
- Dybowski, B. N. (1869) Vorläufige Mittheilungen über Fischfauna des Ononflusses und des Ingoda in Transbaikalin. *Verhandlungen Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien* **19**: 945-958.
- 岩田明久 (1989) ヤツメウナギ類. 川那部浩哉・水野信彦(編), 日本の淡水魚. pp. 30-40. 山と溪谷社, 東京.
- Lee, W. J. and Kocher, T. D. (1995) Complete sequence of a sea lamprey (*Petromyzon marinus*) mitochondrial genome: early establishment of the vertebrate genome organization. *Genetics* **139**: 873-887.
- Swofford, D. L. (1999) PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. *Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts*.
- Wilson, C. C. and Bernatchez, L. (1998) The ghost of hybrids past: fixation of arctic charr (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial DNA in an introgressed population of lake trout (*S. namaycush*). *Molecular Ecology* **7**: 127-132.
- Yamazaki, Y. and Goto, A. (1996) Genetic differentiation of *Lethenteron reissneri* populations, with reference to the existence of discrete taxonomic entities. *Ichthyological Research* **43**: 283-299.
- Yamazaki, Y. and Goto, A. (1998) Genetic structure and differentiation of four *Lethenteron* taxa from the Far East, deduced from allozyme analysis. *Environmental Biology of Fishes* **52**: 149-161.
- 山崎裕治, 後藤晃 (2000) ヤツメウナギ類における系統分類と種分化研究の現状と課題. *魚類学雑誌* **47**: 1-28.

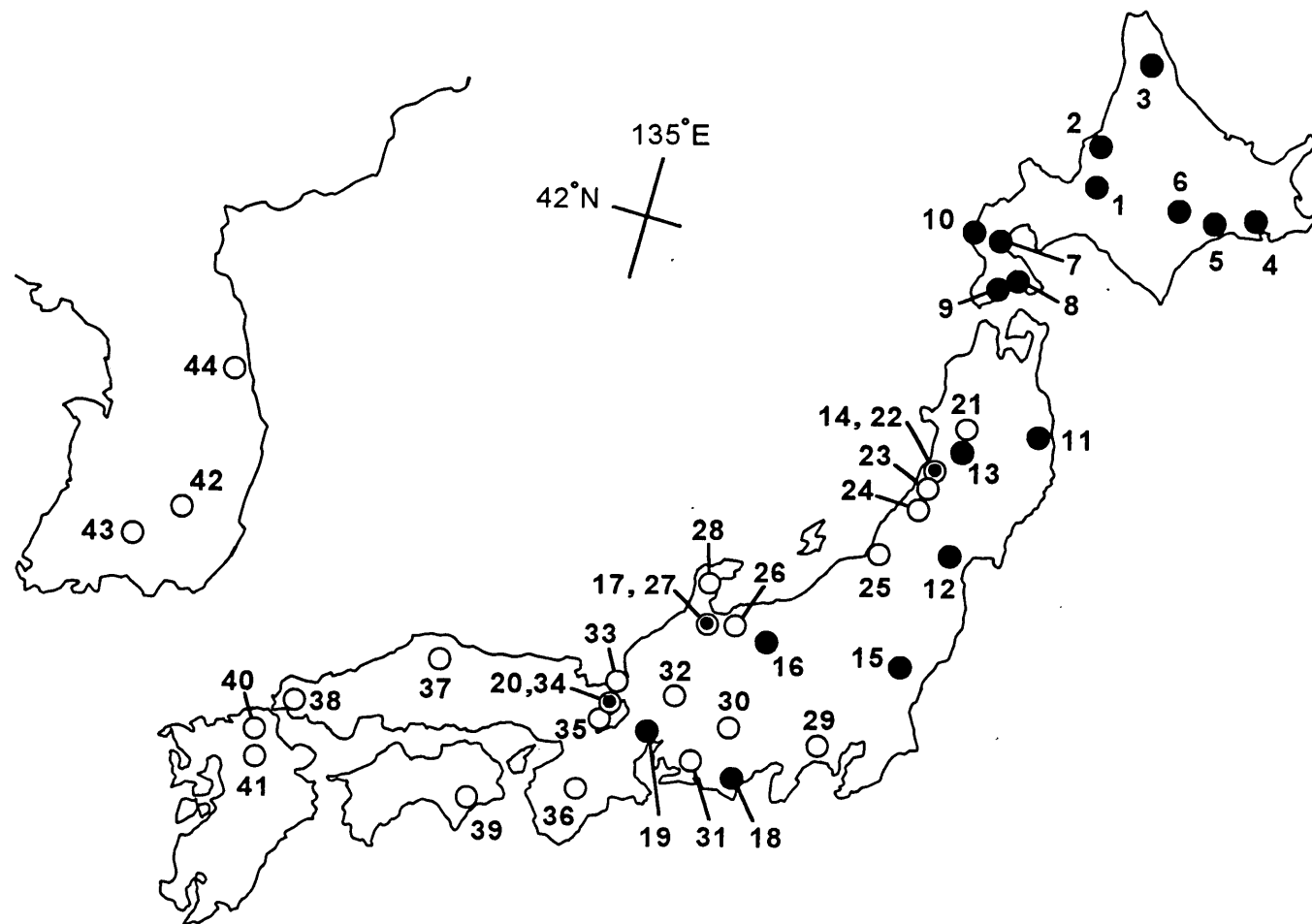


図1 スナヤツメ北方種(黒丸)と南方種(白丸)の採集地点。二重丸は二種の同所的  
生息地点を示す。集団番号は図2に対応。

表1 ヤツメウナギ類4種間における塩基置換率(%)。  
 値は平均値±標準偏差を示す。かっこ内の数値は値の範囲。

	<i>n</i>	<i>P.marinus</i>	<i>L.fluviatilis</i>	Northern species	Southern species
<i>Petromyzon marinus</i>	1	-			
<i>Lampetra fluviatilis</i>	1	13.33	-		
Northern species of <i>Lethenteron reissneri</i>	20	13.49±0.27 (13.15-14.25)	7.01±0.25 (6.67-7.49)	1.09±0.45 (0.09-2.10)	
Southern species of <i>Lethenteron reissneri</i>	24	11.92±0.22 (11.60-12.33)	8.79±0.25 (8.31-9.22)	9.05±0.34 (8.12-10.05)	1.60±0.43 (0.00-2.65)

表2 ヤツメウナギ類4種間におけるKimuraの2変数距離。  
 値は平均値±標準偏差を示す。かっこ内の数値は値の範囲。

	<i>n</i>	<i>P.marinus</i>	<i>L.fluviatilis</i>	Northern species	Southern species
<i>Petromyzon marinus</i>	1	-			
<i>Lampetra fluviatilis</i>	1	0.150	-		
Northern species of <i>Lethenteron reissneri</i>	20	0.152±0.004 (0.147-0.162)	0.075±0.003 (0.071-0.080)	0.011±0.005 (0.001-0.021)	
Southern species of <i>Lethenteron reissneri</i>	24	0.132±0.003 (0.128-0.137)	0.095±0.003 (0.090-0.100)	0.098±0.004 (0.087-0.110)	0.016±0.004 (0.000-0.027)

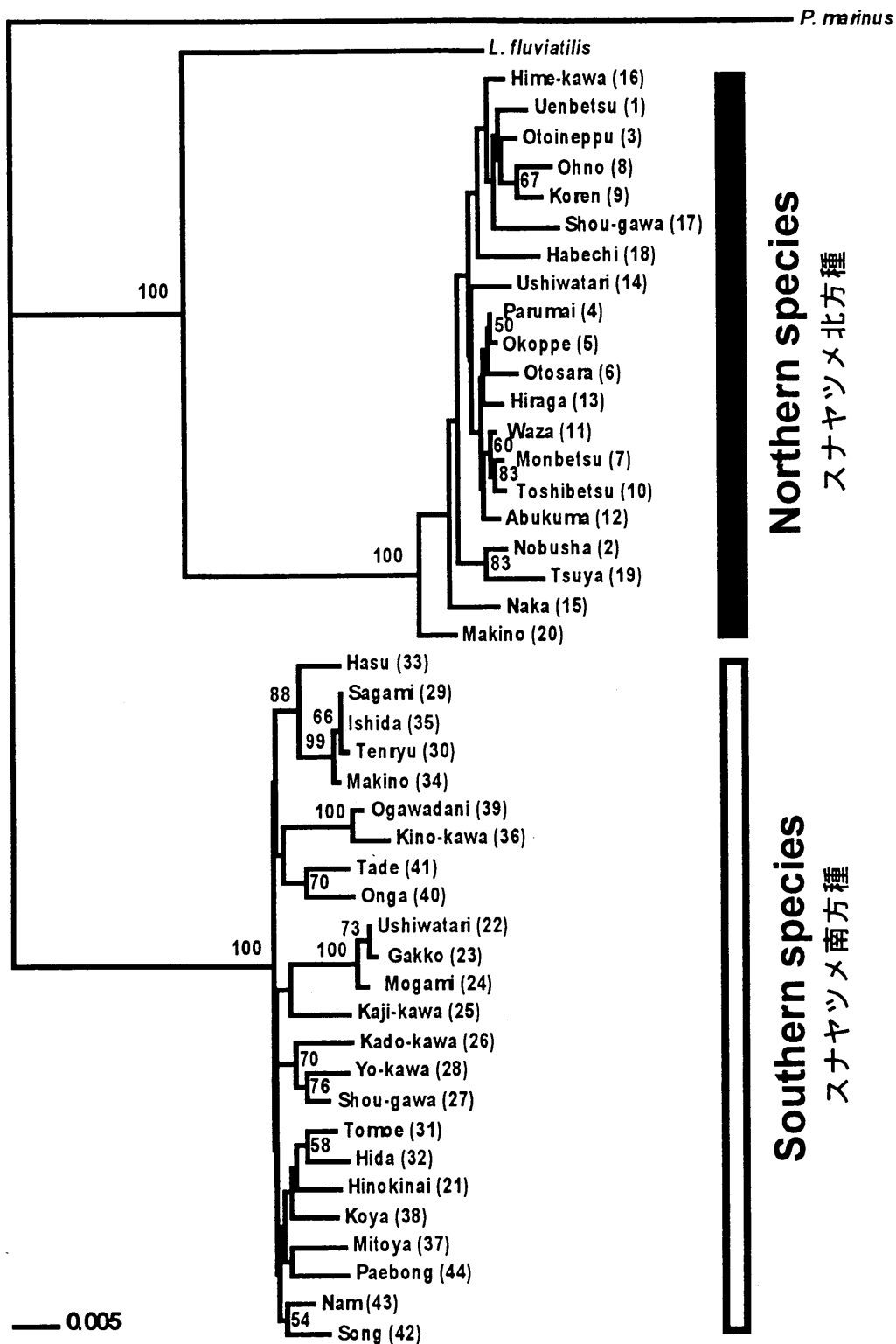


図2 mtDNA COI 遺伝子の部分配列 1095 塩基対から推定されたスナヤツメ二種の系統類縁関係。Kimura の 2 変数距離に基づいた近隣結合樹と 1000 回のブーティストラップ確率(50%以上のみ表示)。集団名のかっこ内は集団番号を示す。

## 9. 昆虫類

神戸大学 内藤 親彦  
東京都立大学 鈴木 浩文  
農林水産省 野菜・茶業試験場 佐藤 安志  
横須賀市自然博物館 大場 信義  
(財)自然環境研究センター 斉藤 秀生

### (1) 遺伝的多様性調査関連情報

日本産昆虫の遺伝的な多型解析に関する文献

[アロザイム関係]

- 網代健一郎, 森重宏, 井狩徹 (1995) キボシカミキリのエステラーゼアロザイムにおける地理的変異と遺伝様式. 鳥取大学農学部研究報告 **48**: 9-15.
- 伊澤宏毅, 刑部正博, 守屋成一 (1992) アロザイム分析によるクリタマバチの輸入天敵チュウゴクオナガコバチと土着天敵クリマモリオナガコバチの判別法. 日本応用動物昆虫学会誌 **36**: 58-60.
- Konno, Y. and Tanaka, F. (1996) Aliesterase isozymes and insecticide susceptibility in rice-feeding and water-oat-feeding strains of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Applied Entomology and Zoology* **31**: 326-329.
- 宮ノ下明大, 田付貞洋, 草野忠治, 藤井宏一 (1991) スギマルカイガラムシのエステラーゼアロザイム変異. 日本応用動物昆虫学会誌 **35**: 317-320.
- Nomura, M. (1998) Allozyme Variation and phylogenetic analysis of genera and species of Japanese Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae) *Applied Entomology and Zoology* **33**: 513-524.
- Rozalski, R. J., Sakurai, H. and Tsuchida, K. (1996) Esterase and malate dehydrogenase isozymes analysis in the population of honeybee, *Apis cerana japonica* and *Apis mellifera*. *Japanese Journal of Entomology*. **64**: 910-917.
- Sasaji, H. and Nishide, K. (1994) Genetics of esterase isozymes in *Harmonia yedoensis* (Takizawa) (Coleoptera: Coccinellidae). *Memoirs of the Faculty of Education, Fukui University. Ser. II, (Natural Science)* **45**: 1-13.
- 佐藤安志 (1998) アロザイムからみたホタルの遺伝的変異と種分化. 昆虫と自然 **33**(7): 19-25.
- Shintani, Y., Ishikawa, Y. and Honda, H. (1992) Geographic variation in esterase isozymes of the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* (Pascoe) (Coleoptera: Cerambycidae)
- Suzuki, H., Sato, Y., Fujiyama, S. and Ohba, N. (1993) Genetic differentiation between ecological two types of the Japanese firefly *Hotaria parvia*: An electrophoretic analysis of allozymes. *Zoological Science* **10**: 697-703.

- Suzuki, H., Sato, Y., Fujiyama, S. and Ohba, N. (1996) Biochemical systematics of Japanese fireflies of the subfamily Luciolinae and their flash communication systems. *Biochemical Genetics* **34**: 191-200.
- Suzuki, H., Sato, Y. Fujiyama, S. and Ohba, N. (1996 b) Allozymic differentiation between two ecological types of flashing behavior in the Japanese Firefly, *Luciola cruciata*. *Japanese Journal of Entomology*. **64**: 682-691.

[DNA 関係]

- Honnda, J., Nakashima, Y., Yanase, T., Kawarabata, T. and Hirose, Y. (1998) Use of the internal transcribed spacer (ITS-1) region to infer *Orius* (Hemiptera: Anthocoridae) species phylogeny. *Applied Entomology and Zoology* **33**: 567-572.
- Kim, C. G., Hoshizaki, S., Huang, Y. P., Tatsuki, S. and Ishikawa, Y. (1999) Usefulness of mitochondrial CO II gene sequences in Examining phylogenetic relationships in the asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*, and allied species (Lepidoptera: Pyralidae). *Applied Entomology and Zoology* **34**: 405-412.
- Makita, H., Shinkawa, T., Ohta, K., Kondo, A. and Kanazawa, T. (2000) Phylogeny of Luehdorfia butterflies inferred from mitochondrial ND5 gene sequences. *Entomological Science*. **3**: 321-329.
- 柘永一宏 (1999) 外部形態解析と分子系統解析から推測した海浜性アシナガバエの系統関係. *昆虫と自然* **34**(2): 30-34.
- Maekawa, K., Miura, T., Kitade, O. and Matsumoto, T. (1998) Genetic variation and molecular phylogeny based on the mitochondrial genes of the Damp Wood Termite *Hodotermopsis japonica* (Isoptera: Termopsidae). *Entomological Science*. **1**: 561-571.
- Maekawa, K., Kitade, O. and Matsumoto, T. (1999) Molecular phylogeny of orthopteroid insects based on the mitochondrial cytochrome oxidase II gene. *Zoological Science* **16**: 175-184.
- Maekawa, K. and Matsumoto, T. (2000) Molecular phylogeny of cockroaches (Blattaria) based on mitochondrial CO II gene sequences. *Systematic Entomology*. **25**: 511-519.
- Muraji, M. and Tachikawa, S. (2000) Phylogenetic analysis of water striders (Hemiptera: Gerroidea) based on partial sequences of mitochondrial and nuclear ribosomal RNA genes. *Entomological Science*. **3**: 615-626.
- Muraji, M., Kawasaki, K. and Shimizu, T. (2000) Phylogenetic utility of nucleotide sequences of mitochondrial 16S ribosomal RNA and cytochrome *b* genes in anthocorid bugs (Heteroptera: Anthocoridae). *Applied Entomology and Zoology* **35**: 293-300.
- Muraji, M., Kawasaki, K. and Shimizu, T. (2000) Nucleotide sequence variation and phylogenetic utility of the mitochondrial CO I fragment in



- anthocorid bugs (Hemiptera: Anthocoridae). *Applied Entomology and Zoology* **35**: 301-308.
- Osawa, S., Su, Z. H., Kim, C. G., Okamoto, M., Tominaga, O. and Imura, Y. (1999) Evolution of the carabid ground beetles. *Advances in Biophysics* **36**: 65-106.
- 大澤省三 (1999) オサムシにおける系統多様化の道のり. *昆虫と自然* **34**(2): 15-19.
- 斎藤秀生 (1999) カミキリムシの DNA 解析のこころみ. *昆虫と自然* **34**(2): 35-38.
- Shirota, Y., Iituka, K., Asano, J., Abe, J. and Yukawa, J. (1999) Intraspecific variations of mitochondrial cytochrome oxidase I sequence in an aphidophagous species, *Aphidoletes aphidimyza* (Diptera: Cecidomyiidae). *Entomological Science*. **2**: 209-215.
- 新川勉 (1999) ギフチョウ属(*Luehdorfia*)のミトコンドリア分子系統. *昆虫と自然* **34**(2): 26-29.
- Sonoda, S., Yamada, T., Naito, T. and Nakasuji, F. (1992) A family of highly repeated DNA sequences of the fern sawfly *Hemitaxonus japonicus* complex (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Applied Entomology and Zoology* **27**: 399-405.
- Sonoda, S., Yamada, T., Naito, T. and Nakasuji, F. (1995) Molecular characterization of a family of tandemly repetitive DNA sequences (pYS family) in the genus *Hemitaxonus* (Hymenoptera: Tenthredinidae). *The Japanese Journal of Genetics* **70**: 533-542.
- Sota, T., Kusumoto, F. and Kubota, K. (2000) Consequences of hybridization between *Ohomopterus insulicola* and *O. arrowianus* (Coleoptera, Carabidae) in a segmented river basin: parallel formation of hybrid swarms. *Biological Journal of the Linnean Society* **71**: 297-313.
- 曾田貞滋 (2000) 分子系統で見るオサムシの進化. オオオサムシ亜属は平行進化したか? *インセクトリウム* **37**(6): 20-29.
- Su, Z. H., Ohoma, T., Okada, T. S., Nakamura, K., Ishikawa, R. and Osawa, S. (1996) Phylogenetic relationships and evolution of the Japanese Carabinae ground beetles based on mitochondrial DNA gene sequences. *Journal of Molecular Evolution*. **42**: 124-129.
- Su, Z. H., Tominaga, O., Ohama, T., Fujiwara, E., Ishikawa, R., Okada, T., Nakamura, K. and Osawa, S. (1996) Parallel evolution in radiation of *Ohomopterus* ground beetles inferred from mitochondrial ND5 gene sequences. *Journal of Molecular Evolution*. **43**: 662-671.
- 蘇智慧, 金衝坤 (1999) オサムシのきた道を DNA でたどる. *昆虫と自然* **34**(2): 4-10.
- Suzuki, H. (1997) Molecular phylogenetic studies of Japanese fireflies and their mating systems (Coleoptera: Cantharoidea). *Tokyo Metropolitan*

*University Bulletin of Natural History* 3: 1-53.

鈴木浩文 (1998) DNA レベルでみた日本産ホタルの系統進化. 昆虫と自然 33(7): 11-15.

Yagi, T., Sasaki, G. and Takebe, H. (1999) Phylogeny of Japanese papilionid butterflies inferred from nucleotide sequences of the mitochondrial ND5 gene. *Journal of Molecular Evolution*. 48: 42-48.

八木孝司, 佐々木剛 (1999) DNA によるチョウの系統解析. 昆虫と自然 34(2): 20-25.

## (2) 遺伝的多様性調査 調査結果報告

### ① 調査選定種

#### ゲンジボタル

ゲンジボタルは日本の固有種で、北海道と沖縄を除く全国各地に生息している。この種の生態や光を用いた配偶行動などはよく研究されており、中部山岳地帯を境とした生態的な二型の存在が知られている。すなわち中部山岳地帯の西側では、雄が集団同時明滅しながら雌を探すときの発光の周期が2秒で、雌は集団で産卵する。これに対して東側では、雄の発光の周期は4秒と長く、雌は単独で産卵する。しかも、西側のゲンジボタルを東側に移植しても、その集団は本来の習性を維持していることから、この生態的な二型にはすでに遺伝的な分化が生じていると思われる。また、本種の幼虫は水生であるため各水系間での移動は制限されており、各地域間における遺伝的な分化も進んでいる可能性がある。そこで、この生態的二型および各地域における遺伝的な変異、多様性を調査し、ゲンジボタル集団間の遺伝的な分化の程度や分布拡散の経路を明らかにし、人為的な移入による遺伝的な攪乱の影響についても考えていきたい。

### ② 調査方法-予備解析

#### a. アロザイム

17種類の酵素遺伝子座について、15集団でアロザイム解析を行ったところ6つの遺伝子座(アルカリ性ホスファターゼ、グルコース6リン酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、グリセロリン酸脱水素酵素、スーパーオキシドジスムターゼ)で多型がみられた。特にスーパーオキシドジスムターゼ遺伝子座(SOD)では2つの対立遺伝子が確認され(図1)、東日本側と西日本側において分布の偏りがみられた(図2)。次に集団間の違いをより明確に表せる遺伝子マーカの検索を行った。

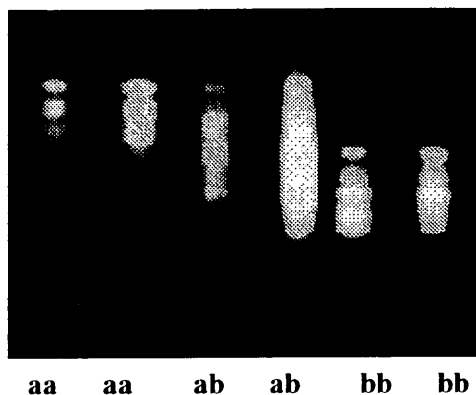


図1 スーパーオキシドジスムターゼの電気泳動パターン。下の文字は遺伝子型を示す。

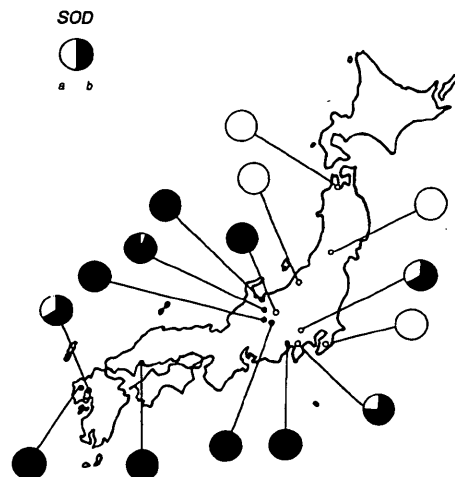


図2 スーパーオキシドジスムターゼ対立遺伝子の頻度分布。

b. ミトコンドリア 16SリボソームRNA遺伝子領域

この遺伝子領域の一部の約500bpの塩基配列を決定し、切断が予想される制限酵素を選定した(*Mob I*, *Alu I*, *Taq I*, *Dra I*, *Hinf I*, *Hind III*)。そして、山形県米沢市と宮崎県宮崎市の集団で制限酵素の切断パターンを比較した。しかし、集団内の変異および集団間の差異は認められなかった。

c. ミトコンドリア チトクロームオキシターゼ II(COII)遺伝子領域

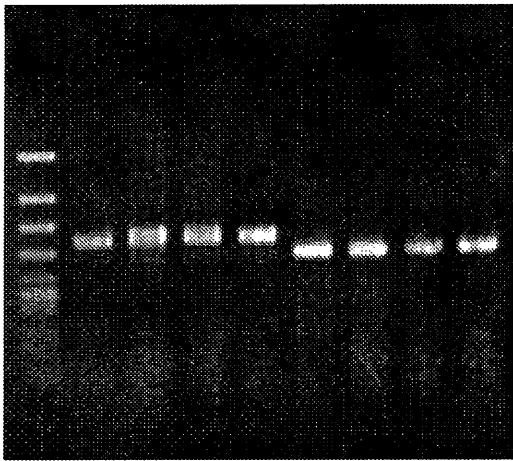
この遺伝子領域の約750bpの塩基配列を決定し、切断が予想される制限酵素を選定した(*Ase I*, *Rsa I*, *Mva I*, *Hae III*, *Hinf I*, *Hpa II*)。そして、山形県米沢市と宮崎県宮崎市の集団で制限酵素の切断パターンを比較したところ、米沢の集団内での変異はみられなかったが、宮崎では、*Rsa I*, *Mva I*, *Hpa II*において変異がみられた。また、*Ase I* と *Hinf I* では集団間での違いが認められ、遺伝的多型を調査するのに有用な候補遺伝子と考えられた。

d. 核リボソームRNA遺伝子のITS-I領域

山形県米沢市と宮崎県宮崎市の集団において、この領域の約500bpをPCRで増幅したところ、増幅断片長に30bpほどの違いのあることが見いだされた(図3)。その後、各集団でも調べたところ、さらに様々の長さの多型が見いだされ、通常の電気泳動では各対立遺伝子やホモ・ヘテロ個体を識別することが困難となった。

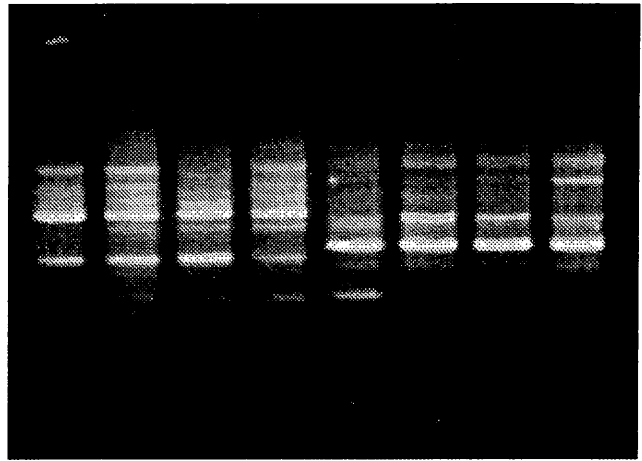
e. RAPDによる解析

トータルDNAをもとに10塩基の単一プライマーでPCRを行ない増幅断片長を比較した。20種類のプライマーを検討した結果、4種類のプライマー OPA2 ( TGCCGAGCTG )、OPA 3 ( AGCAGCCAC )、OPA 9 ( GGGTAACGCC )、OPA12(TCGGCGATAG)、OPA18(AGGTGACCGT)で良好な増幅パターンと集団間の差異が見い出された(図4)。しかし、PCRにおいて別のサーマルサイクラーを使うと同じ泳動パターンが得られず、それぞれの研究室での結果を直接比較することは難しいと思われる。



1 2 3 4 5 6 7 8

図3 PCRによるITS-I領域の増幅パターン。  
1-4:米沢, 5-8:宮崎



1 2 3 4 5 6 7 8

図4 OPA-3プライマーによるRAPDパターン。  
1-4:米沢, 5-8:宮崎

これらの予備的な実験により、ミトコンドリアのCOII領域を対象として各集団で解析を進めていくこととした。

③ミトコンドリア COII遺伝子領域における遺伝的な変異

個々のゲンジボタルからトータルDNAを抽出し、ミトコンドリアCOII領域の外側にあるtRNA-LeucineおよびtRNA-Lysine遺伝子領域に設定したプライマー (5'-ATGGCAGATTAGTGCAATGG、5'-GTTTAAGAGACCAGTACTTG)でPCRを行ないCOII領域を増幅した。PCR反応は94℃で4分変性後、94℃1分、50℃1分、72℃1分の行程を30サイクル行った。そして、6種類の制限酵素(*Ase* I, *Rsa* I, *Mva* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Hpa* II)で消化後、4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって切断パターンを比較した。

調査地は以下の62地点で、括弧の中の数字は個体数を示している。

青森県 青森市(10)、弘前市(5)  
岩手県 盛岡市(10)、釜石市(6)  
山形県 山形市(4)、米沢市(10)  
宮城県 仙台市(10)  
福島県 いわき市(2)  
栃木県 足利市(10)  
群馬県 富岡市(10)  
茨城県 御前山村(10)、つくば市(9)、潮来町(5)  
埼玉県 嵐山町(10)  
千葉県 大原町(8)  
東京都 あきる野市(7)  
神奈川県 横浜市(12)、横須賀市(10)、箱根町(5)  
新潟県 長岡市(7)、糸魚川市(7)、佐渡島(7)  
山梨県 下部町(6)、平瀬町(10)  
長野県 松本市(10)、野沢温泉村(10)、大町市(8)、白馬村(9)、茅野市(4)  
福井県 福井市(10)  
岐阜県 関市(10)、高山市(10)、美濃加茂市(8)、高鷲村(10)  
静岡県 沼津市(7)、金谷町(9)  
愛知県 豊橋市(10)、津具村(10)  
三重県 尾鷲市(9)  
滋賀県 山東町(9)、志賀町(3)  
兵庫県 浜坂町(10)  
和歌山県 宮本町(2)  
島根県 三刀屋町(9)、隠岐(10)  
岡山県 岡山市(4)、哲多町(10)  
広島県 安芸津町(4)  
山口県 豊田町(10)  
香川県 塩江町(4)  
愛知県 面河村(10)  
高知県 土佐山村(9)  
福岡県 小倉市(5)  
佐賀県 小城町(10)  
長崎県 対馬(10)  
熊本県 山鹿市(9)、旭志村(5)、人吉市(3)  
大分県 大分市(5)  
宮崎県 宮崎市(10)、北川町(10)  
鹿児島県 宮之城町(9)

電気泳動の結果、*Hpa* II では5つ、*Ase* I と *Rsa* I ではそれぞれ4つのパターンが得られ、*Mva* I と *Hinf* I では3つ、*Hae* III では2つのパターンがみられた(図5)。例として、図6には東日本側の青森集団と西日本側の尾鷲集団における *Hinf* I と *Hae* III で消化したときの泳動パターンが示してある。2つの集団でそれぞれ異なったパターンを示しており、両者の違いがよくわかる。そして、これらの泳動パターンの組み合わせとして、全体で19のハプロタイプ(A~S)が確認された。

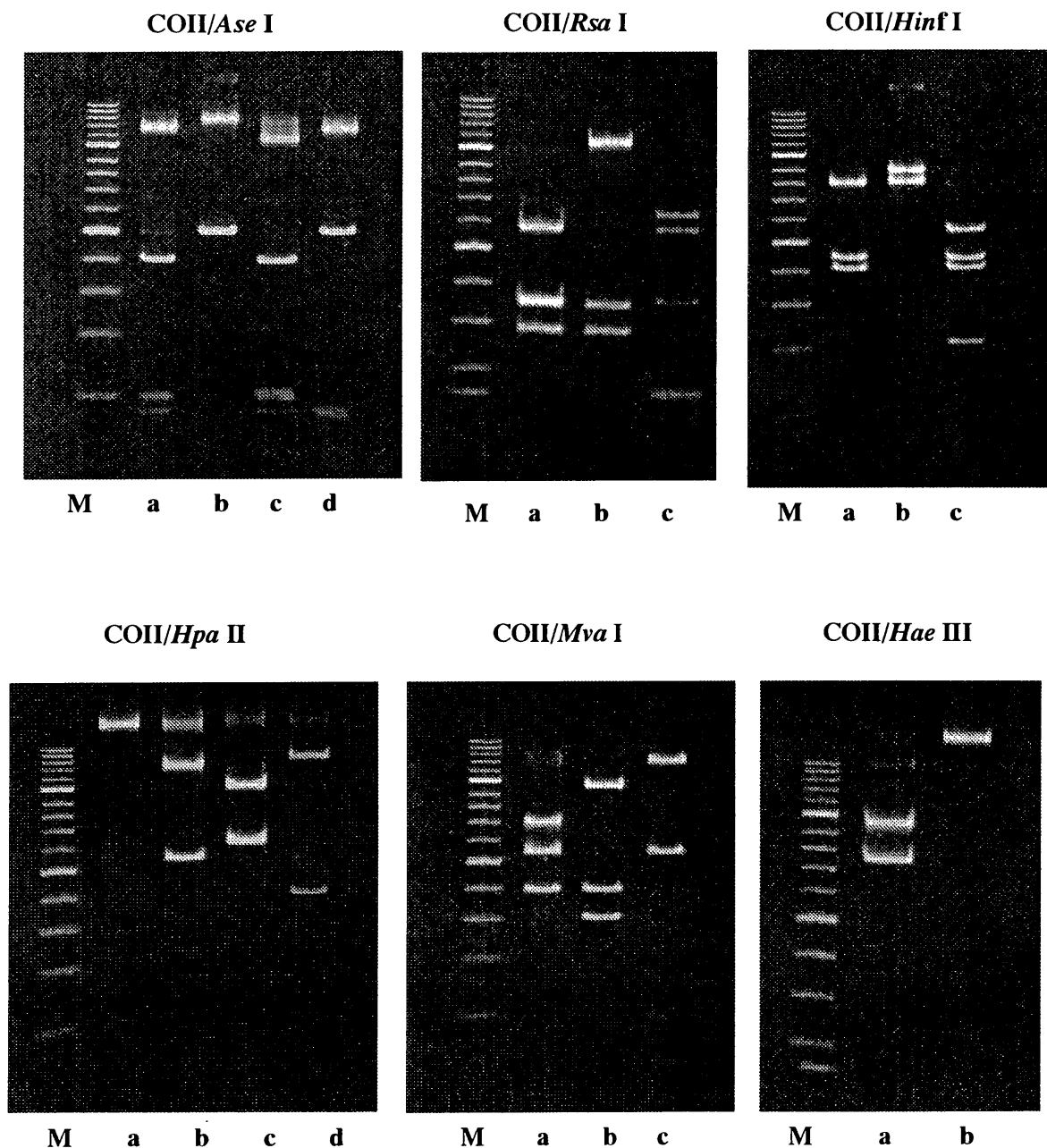


図5 ミトコンドリア COII領域の制限酵素切断パターン。  
M:50bpマーカ、a、b、c、d は切断パターンの種類を表す。

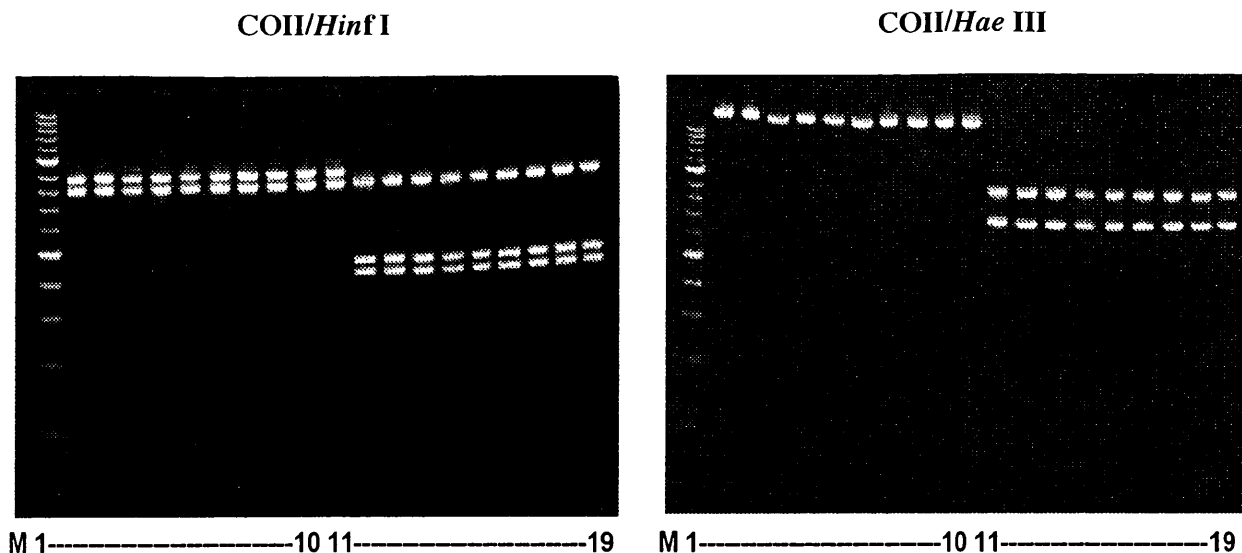


図6 Hinf Iおよび Hae III消化による電気泳動パターン。

M:50bpマーカ, 1-10:青森, 11-19:尾鷲

各地域におけるハプロタイプの頻度は表1に、その分布は図7に示してある。

次に、ハプロタイプ間の関係を知るためにそれぞれの塩基配列(740bp)を比較し系統樹を作成したところ、次の6つのハプロタイプグループに分けられた(図8)。東北のグループ(ハプロタイプA, D)、関東のグループ(B, C)、中部のグループ(F, G)、西日本のグループ(E, H, I, J)、北九州のグループ(K, L, M, N, O, S)、南九州のグループ(P, Q, R)。

各グループの境界をみると、東北のグループには東北6県の他茨城県、栃木県、新潟県が含まれ、栃木県南部の足利市では関東型のハプロタイプCが混在し、山形県の米沢市では関東のBタイプがみられた。

関東のグループには群馬県南部、栃木県南部、埼玉県、東京都、千葉県、神奈川県が含まれる。また、長野県の白馬村も関東のグループに含まれ、野沢温泉町にもBタイプが若干混在していた。東京都のあきる野市で西日本型のEタイプがみられるが、この集団には西日本からの移入が確認されている。また、神奈川県横須賀市、箱根町でもEタイプがみられるが、人為的な移入があったのか定かではない。

中部のグループには長野県、山梨県、静岡県、愛知県東部が含まれるが、長野県の茅野市、山梨県、静岡県、愛知県では西日本型のEタイプが混在している。西日本のグループは、Eタイプが混在する中部型の地域に加え、東海・北陸・近畿・中国・四国地方が含まれる。

北九州のグループには福岡県、佐賀県、長崎県の対馬、大分県、宮崎県北部の北川町、熊本県山鹿市が含まれ、山口県の豊田町にもタイプKがみられた。

南九州のグループには宮崎県南部、鹿児島県、熊本県の人吉市、旭志村が含まれるが、旭志村においては北九州型のタイプKが若干みられた。

このようにハプロタイプは日本全国に一様に分布しているのではなく、それぞれ各地域に局在している。このことから、自然状態での移動はかなり制限されていることがわかる。



表1. 各集団におけるハプロタイプの種類と頻度

集団	Haplotype	集団	Haplotype
1. 青森	A	32. 美濃加茂	E(0.75), G(0.25)
2. 弘前	A	33. 高山	E
3. 盛岡	A	34. 高鷲	E
4. 釜石	A	35. 沼津	E(0.29), F(0.71)
5. 仙台	A	36. 金谷	E(0.86), F(0.11)
6. 山形	A	37. 豊橋	E(0.80), F(0.20)
7. 米沢	B	38. 津具	E(0.40), F(0.20), H(0.40)
8. いわき	A	39. 尾鷲	E
9. 足利	A(0.70), C(0.30)	40. 山東	E
10. 富岡	C	41. 志賀	E
11. 御前山	A	42. 浜坂	E
12. つくば	A	43. 宮本	E
13. 潮来	A	44. 隠岐	E(0.80), I(0.20)
14. 嵐山	C	45. 三刀屋	E
15. 大原	B	46. 哲多	E(0.80), J(0.20)
16. あきる野	C(0.57), E(0.23)	47. 岡山	E
17. 横浜	C	48. 安芸津	E
18. 横須賀	C(0.90), E(0.10)	49. 豊田	E(0.40), K(0.50), L(0.10)
19. 箱根	E	50. 塩江	E
20. 長岡	A(0.86), D(0.14)	51. 面河	E
21. 糸魚川	A(0.86), B(0.14)	52. 土佐山	E
22. 佐渡	A	53. 小城	K(0.40), M(0.50), N(0.10)
23. 平瀬	E(0.50), F(0.50)	54. 小倉	K
24. 下部	E(0.67), F(0.33)	55. 対馬	K
25. 松本	F	56. 山鹿	K(0.56), O(0.44)
26. 茅野	E(0.25), F(0.75)	57. 旭志	K(0.20), O(0.40), P(0.40)
27. 野沢温泉	B(0.10), F(0.90)	58. 人吉	P
28. 大町	F	59. 大分	K(0.80), O(0.20)
29. 白馬	B	60. 北川	K(0.40), O(0.40), R(0.10), S(0.10)
30. 福井	E	61. 宮崎	P(0.80), Q(0.10), R(0.10)
31. 関	E	62. 宮之城	P

括弧の中の数字は頻度を表す。

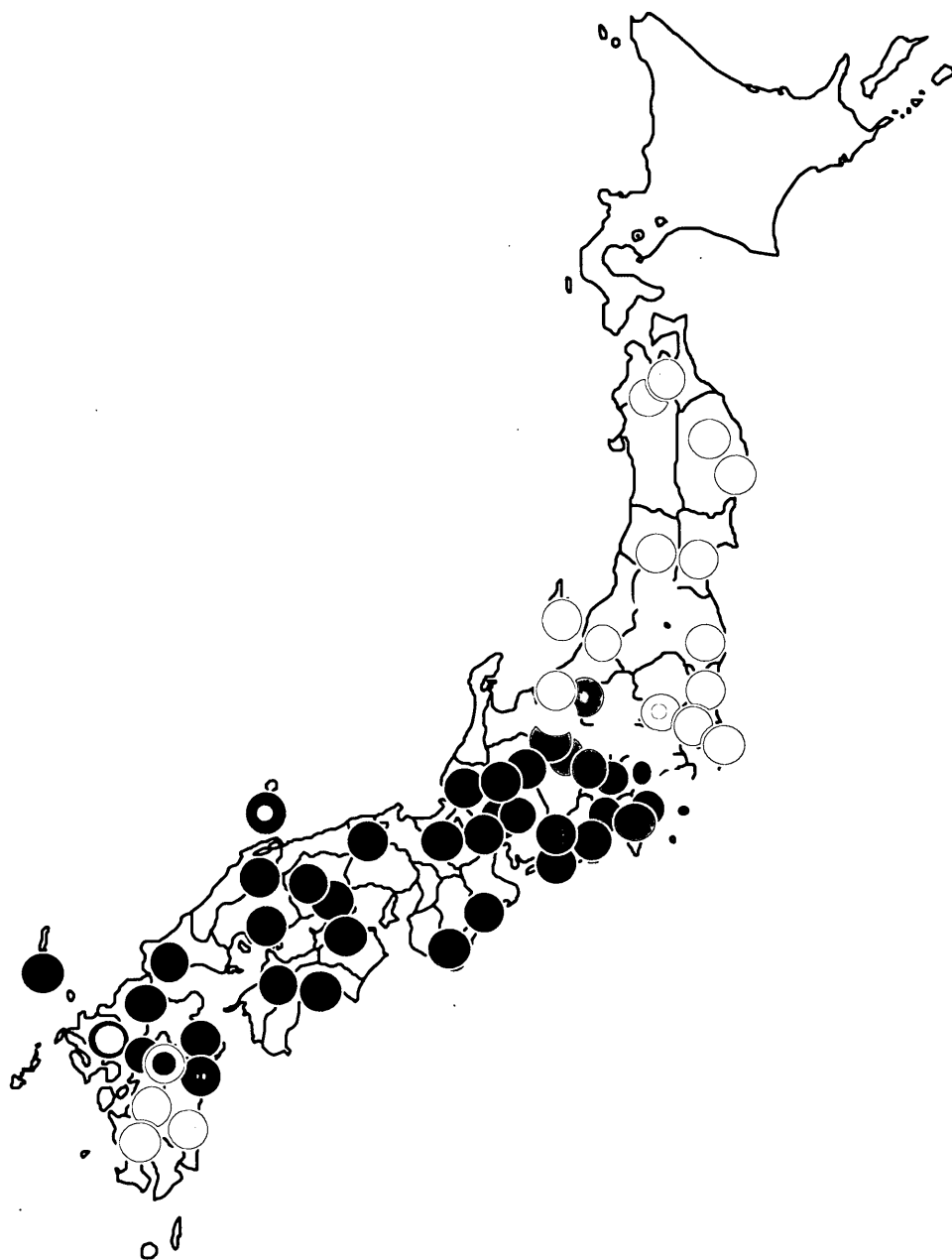


図7 ハプロタイプの分布  
色はそれぞれのハプロタイプの種類を、円の大きさはその頻度を表す。

また、ハプロタイプ間の関係をみてみると(図 8)、九州と本州の間に遺伝的なギャップがあり、次に本州の中で東日本と西日本、さらに東日本の中では東北と関東のグループ、西日本の中では中部と西日本グループ、九州の中では北九州と南九州グループに分けられ、次のような入れ子構造が認められた。《[(北九州・南九州)]・[(西日本・中部)・(関東・東北)]》

この系統図の枝の基部にある数字はブーツストラップ確率で、その枝の中にあるハプロタイプをひとつのグループとしてまとめることの統計的な信頼度である。この数字をみてみると、それぞれのハプロタイプグループは80%以上の信頼度でグループ分けされている。しかし、中部と西日本のグループを分ける信頼度は低く、面河のハプロタイプEが中部のグループに入ってしまった。また、この2つのグループの境界は不明瞭でハプロタイプEとFが混在している。

このようなゲンジボタルの種内変異の程度と種間の違いの比較として、久米島に生息する極めて近縁なクメジマボタルを用いた。ゲンジボタルとクメジマボタルのCO II 遺伝子の違いは約 11%であるのに対して、ゲンジボタルのハプロタイプグループ内での違いは 1%程度で、これはクメジマボタルの種内の変異の程度と同じであった。また、ハプロタイプグループ間の違いは、九州と本州のグループ間で 4.5%と大きく、西日本と東日本では約 3%、西日本と中部のグループ間、東北と関東のグループ間、北九州と南九州のグループ間では約 1.5%の違いであった。

次に、それぞれのハプロタイプグループ間の入れ子構造と地理的な位置関係をみてみると(図9)、九州と本州は海峡によって隔てられている。本州の東北と関東グループを含む東日本型と西日本と中部グループを含む西日本型の境界はフォッサ・マグナの東側にほぼ対応している。中部グループはフォッサ・マグナのちょうど地溝帯にあたるが、静岡側では西日本グループとの境界は不明瞭となる。そして西日本グループはフォッサ・マグナの西側の糸魚川－静岡構造線以西に対応している。一方、関東グループは関東山地の東側の平野部に位置し、それ以东が東北グループとなる。また、九州においては、東海地方より始まり紀伊半島、四国を通り九州に至る中央構造線が境となり北九州と南九州グループに分けられる。しかし本州、四国においては、中央構造線を挟んだ両側で明瞭な違いは認められなかった。このようにミトコンドリアDNAからみたハプロタイプグループは地理的・地質的な構造に対応して明確に区別され、自然状態での移動はかなり制限されていることがわかる。これは幼虫が水生であるために水系ごとに移動が制限されているためと思われる。

また、発光間隔からみた2秒型と4秒型の違いは、図10のハプロタイプグループ間の関係から東北と関東グループの祖先型において2秒型から4秒型が派生してきたものと考えられる。

本研究では自然集団のものと考えられるサンプルを用いたが、現在調査を進めている東京都多摩地区においては人為的な移入による遺伝的な攪乱が確認されており、今後自然環境の保全・復元においてホタルを移植する場合には、このような遺伝的な背景を考慮していく必要があると思われる。

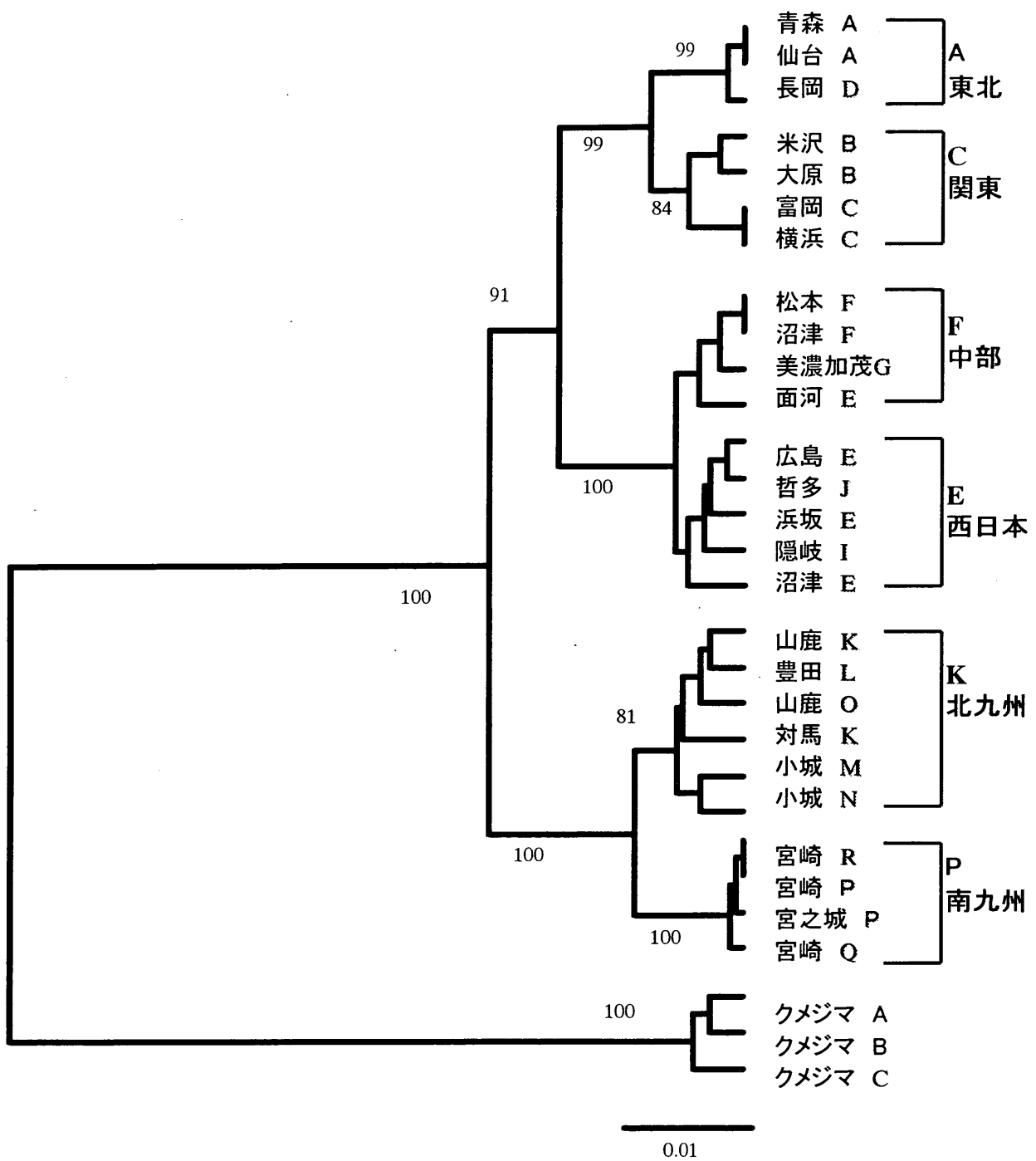


図8 ハプロタイプ間の遺伝的な類縁関係

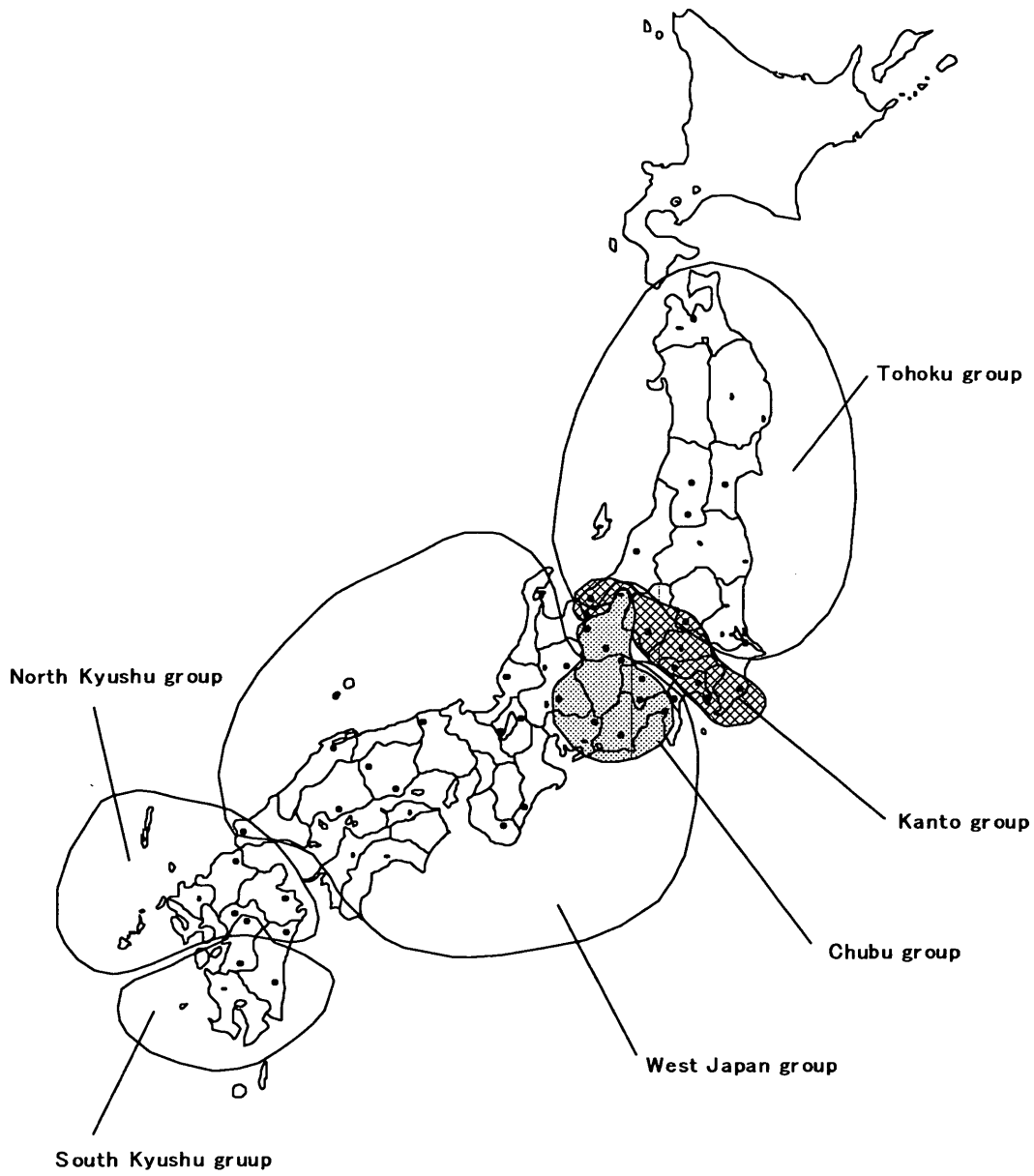


図9 ハプロタイプグループの地理的な関係

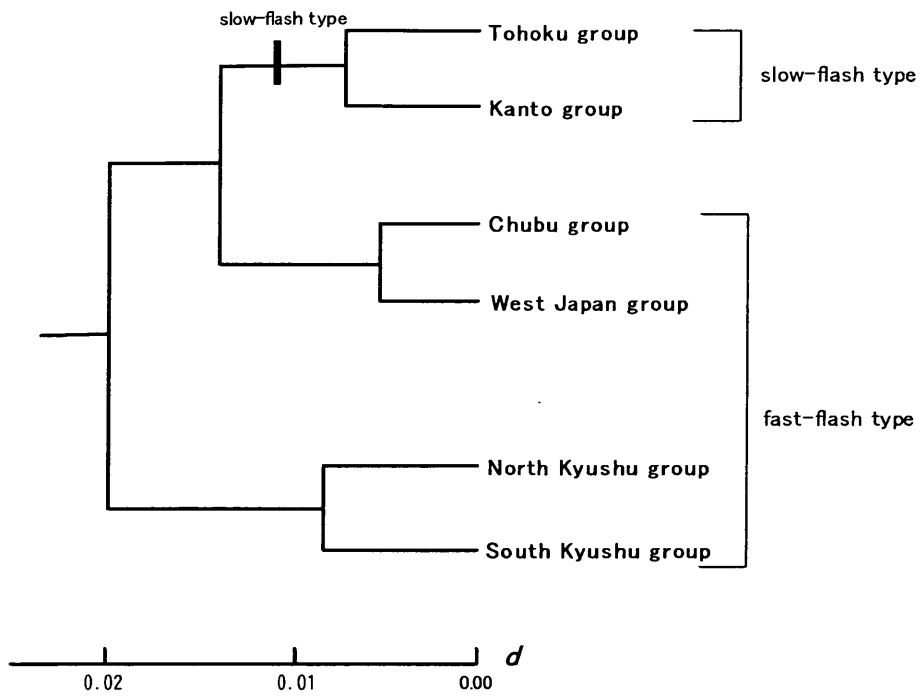


図 10 ハプロタイプグループ間の関係と生態型

### (3)ハナカミキリ類の酷似する種群間の遺伝的多様性

#### ①この群の背景と研究の目的

カミキリムシ科(Cerambycidae)はコウチュウ目の中でも分類が進んだグループであり、オサムシ類やクワガタムシ類と同様にマニアの人気も高く、わが国でも保育社(原色日本昆虫生態図鑑Ⅱカミキリ編)、講談社(日本産カミキリ大図鑑)、東海大学出版会(日本産カミキリムシ検索図説)など全種を収録した図鑑が出版されている。さらに地方や県別の調査や目録もよく整備されており、環境アセスメントの調査などにもよく用いられ解析されている。

その中でも、他の群が全世界に広く分布し、その中心が主に熱帯地域であるのに対し、ハナカミキリ亜科(Lepturinae)は温帯地域が分布の中心で、世界的にみてもわが国での多様性が高い群である。このような背景から、生物多様性調査(全種調査)の対象群ともなっており、環境庁でも第3回自然環境保全調査から全国の分布調査が行われている。

一方、カミキリムシの分類学の視点からは、多くの場合その分類形質が外部形態、特に外見のプロポーション(前胸背板の長さや幅、触角の長さ、上翅の点刻や翅端の形状、交尾器の形態比)や、斑紋、色彩などによっており、概して外部形態に大きな差異の現れていない他のコウチュウ群よりも比較形態学的解析が遅れている。そのような中で、現在でもほぼ確定したと考えられる日本のカミキリムシ相においても、少ないながら新種が発表されている。この近年の新種発表にはひとつの傾向があり、従来一種と考えられていたものが、外部形態の違いから地域的に識別、分割され、一方を新種として命名するという場合がほとんどである(表1)。これは、全体的には種が姿形、色彩や模様で容易に判別できることの反映とも受け取れる。形態による種判別が容易であることは、一方で詳細な分析的な研究が遅れているという弊害をもたらしている。

また、近年の同じコウチュウ目であるオサムシの一連のDNA解析の結果によれば、目でみる形態の相違から私たちが認識していることと進化の事実とは必ずしも一致していないことが明らかになってきた。

そこで、遺伝子多様性調査の一環として、このようにこれまで主に外部形態で分類され、現在もその相違の程度により、集団の一部が地域的に分割され新種として発表されているハナカミキリ類について、遺伝子による分子系統学的解析を試みた。

表1 近年(1990~1999年)に新種・新亜種として記載されたカミキリムシ

和名	学名	発見内容
ホンドハイロハナカミキリ	<i>Rhagium femorale</i> Ohbayashi, 1994	ニセハイロハナカミキリ(対馬)より分離
キュウシュウキベリカタビロハナカミキリ	<i>Pachyta uenoi</i> Makihara, 1995	キベリカタビロハナカミキリの九州の集団を分離
ムネモンヒメハナカミキリ	<i>Pidonia misenina</i> S. et A. Saito, 1992	ツマグロヒメハナカミキリの隠蔽種を発見
フトエリマキヒメハナカミキリ	<i>Pidonia himehana</i> S. Saito, 1992	対象学名消失に伴う新称の処置
サドセスジヒメハナカミキリ	<i>Pidonia sadoensis</i> Kuboki, 1993	セスジヒメハナカミキリの佐渡の集団を分離
アワシマセスジヒメハナカミキリ	<i>Pidonia amentata awashimana</i> Kuboki, 1993	セスジヒメハナカミキリの佐渡の集団を分離
トウカイヒメハナカミキリ	<i>Pidonia tsuyukii</i> Kuboki, 1994	マツシタヒメハナカミキリの隠蔽種を発見
サドチャイロヒメハナカミキリ	<i>Pidonia telephia</i> Kuboki, 1996	チャイロヒメハナカミキリの佐渡の集団を分離
ヒスイヒメハナカミキリ	<i>Pidonia tsutsuii</i> Kuboki, 1996	ナガバヒメハナカミキリの上越地域の集団を分離
サイゴクヒメハナカミキリ	<i>Pidonia falcata</i> Kuboki, 1997	ヤノヒメハナカミキリの四国・九州の集団を分離
ヤマヒメハナカミキリ	<i>Pidonia modesta</i> Kuboki, 1997	フトエリマキヒメハナカミキリの佐渡の集団を分離
シコクヒメヨツスジハナカミキリ	<i>Leptura kusamai keiichii</i> Ohbayashi, 1999	ヒメヨツスジハナカミキリの四国の集団を分離
ウスモンメダカカミキリ	<i>Stenomalus kumaso</i> Niisato et Makihara, 1991	ヨツボシメダカカミキリ(中国・台湾)の九州の集団を分離
ナガサキアメイロカミキリ	<i>Obrium semiformosanum</i> Niisato et Takakuwa, 1996	ニセタカサゴアメイロカミキリ(台湾)の九州の集団を分離
リュウキュウメダカアメイロカミキリ	<i>Obrium takeshitai</i> Niisato et Ohmoto, 1994	メダカアメイロカミキリ(台湾)の西表島の集団を分離
ムコジマクトラカミキリ	<i>Chlorophorus kusamai</i> Sato, 1999	小笠原羣島での新発見
クサマサビカミキリ	<i>Pterolophia kusamai</i> Hasegawa et Makihara, 1999	小笠原父島での新発見
ウスキアラゲサビカミキリ	<i>Egesina fujiwarai</i> Toyoshima, 1999	ツキアラゲカミキリ(トカラ・奄美)の屋久島の集団を分離
アマミスフタモンサビカミキリ	<i>Ropica japonica amamiana</i> Makihara, 1995	ウスフタモンサビカミキリ(南西諸島)の奄美の集団を分離
	<i>Miccolamia insipinosa</i> Takakuwa et Ohbayashi, 1995	チビコバカミキリの八丈島の集団を分離
	<i>Miccolamia pulurae</i> Takakuwa et Ohbayashi, 1995	<i>tuberculata</i> の隠蔽種を発見
ニセゴマダラモモトカミキリ	<i>Leiops masaoi</i> Tamura et Tamura, 1991	ゴマダラモモトカミキリの隠蔽種を発見
キュウシュウシナカミキリ	<i>Eutetrappa sedecimpunctata australis</i> Takakuwa et Hirokawa, 1998	シナカミキリの九州の集団を分離

## ②研究の方法

### a. DNAの抽出

ゲノムDNAは、100%エタノール液浸標本(一部の個体は乾燥標本)の胸部の筋肉組織から抽出した。摘出した筋肉はProteinase Kを用いて蛋白質を分解し、QIAmp DNA Mini Kit(QIAGEN)により全DNAを分離した。

### b. PCR法によるミトコンドリアDNAの増幅・精製

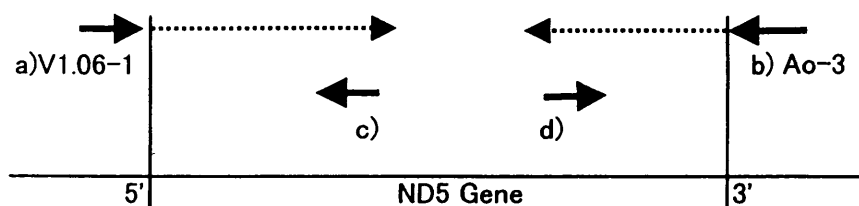
カミキリムシと同様のコウチュウ目において、すでに実績のあるオサムシ類などで使用されているプライマーV1.06-1、Ao-3(図1参照)を用いたPCR法でミトコンドリアDNAのND5(NADH dehydrogenase subunit5)の遺伝子領域910bpを増幅し、得られたPCR産物をQIAquick PCR Purification Kit(QAIGEN)で精製した。

### c. シークエンシング

解析領域を、精製したPCR産物をもとにDye Terminator Cycle Sequencing Kitを用いてダイデオキシ法によりダイレクトシークエンシングを行ない、塩基配列データを読みとった。

なお、各種において各領域で増幅に成功したプライマーのリスト(図1参照)を作成し、今後のカミキリムシDNA解析の資料としてその実績を収録し整理している。





#### Primer list

- a) V1.06-1 : 5' - CCT GTT TCT GCT TTA GTT CA -3'  
 b) Ao-3 : 5' - ATA TTC ATT TCA ACC TTG ATC -3'  
 c) Lept-La : 5' - TGT ATA ATA TTT CCA GCA C - 3'  
    Lept-Lb : 5' - TGT ATA ATA TTC CCA GCA C - 3'  
    Pido-L : 5' - TGT ATA ATA TTA CCA GCA C - 3'  
    Pido-Lt : 5' - TGT ATA ATG TTT CCT GCA CA - 3'  
 d) Lept-R : 5' - ATA TTA AAG GGT ATA GGA GG - 3'  
    Pido-R : 5' - ATA TTA AAA GGT ATA GGA GG - 3'

図1 解析に使用したPrimerの位置と配列

#### d. 系統解析

得られた塩基配列データをもとに最節約法、近隣結合法などの方法で系統解析を行った。

#### e. 形態形質の見直し

各群の形態形質による系統分類と比較し、異なった結果を示す群については形態形質の見直しを行う。

### ③研究対象群

解析の対象としたのは*Leptura*属(今回はヤツボシハナカミキリ種群)と*Pidonia*属(日本産のものを中心に)である。

#### a. ヤツボシハナカミキリ種群

*Leptura*(ヨツスジハナカミキリ)属はハナカミキリ亜科を大きく2分するひとつの族 *Lepturini*の代表属であり、現在日本から16種6亜種が知られている(表2)。

表2 日本産*Leptura*属の種・亜種一覧

和名	学名	分布
クロハナカミキリ	<i>Leptura aethiops</i> Poda, 1761	北海道、本州
ムネアカクロハナカミキリ	<i>Leptura dimorpha</i> Bates, 1873	北海道、本州、佐渡、四国、九州、
キモンハナカミキリ	<i>Leptura duodecimguttata</i> Fabricius, 1801	北海道、本州、対馬
ヤツボシハナカミキリ	<i>Leptura mimica</i> Bates, 1884	北海道、本州、隠岐
ツマグロハナカミキリ	<i>Leptura modicenotata</i> Pic, 1901	北海道、本州、佐渡、四国、九州、屋久島
カラフトヨツスジハナカミキリ	<i>Leptura quadrifasciata</i> Linnaeus, 1758	北海道
ヨツスジハナカミキリ	<i>Leptura ochraceofasciata ochraceofasciata</i> Motschulsky, 1861	北海道、本州
シコクヨツスジハナカミキリ	<i>Leptura ochraceofasciata ochrotela</i> Bates, 1873	四国、九州
ツシマヨツスジハナカミキリ	<i>Leptura ochraceofasciata chujoi</i> Hayashi, 1961	対馬
ヤクヨツスジハナカミキリ	<i>Leptura ochraceofasciata yokoyamai</i> Hayashi, 1961	屋久島
アマミヨツスジハナカミキリ	<i>Leptura ochraceofasciata amamiana</i> Hayashi, 1960	奄美大島、徳之島
オキナワヨツスジハナカミキリ	<i>Leptura ochraceofasciata watanabei</i> Hayashi, 1962	沖縄本島
ヒメヨツスジハナカミキリ	<i>Leptura kusamai kusamai</i> Ohbayashi et Nakane, 1955	本州、九州
シコクヒメヨツスジハナカミキリ	<i>Leptura kusamai keichii</i> N. Ohbayashi, 1999	四国
コヨツスジハナカミキリ	<i>Leptura subtilis</i> Bates, 1884	本州、四国、九州、屋久島
ヤクシマヨツスジハナカミキリ	<i>Leptura yakushimana</i> Tamanuki, 1942	屋久島
ハネヒロハナカミキリ	<i>Leptura latipennis</i> Matsushita, 1933	北海道、本州、四国
フタスジハナカミキリ	<i>Leptura vicaria vicaria</i> (Bates, 1884)	北海道、本州、四国、九州、屋久島
エトロフハナカミキリ	<i>Leptura varicornis</i> (Matsushita, 1933)	北海道
カタキハナカミキリ	<i>Leptura femoralis</i> (Motschulsky, 1860)	北海道、本州、佐渡
オオヨツスジハナカミキリ	<i>Leptura regalis</i> (Bates, 1884)	北海道、本州、四国、九州、屋久島
オオクロハナカミキリ	<i>Leptura thoracica</i> Creutzer, 1799	北海道、本州、四国

ヤツボシハナカミキリ*Leptura arcuata*は、上翅が一樣に黒色の個体から黒色地に8つの黄褐色斑紋の現れる個体とそれらの中間型変異があることが古くから知られ、大林(1957,58)などにより型や変種として多くの名称が付けられた。これらは1963の原色昆虫大図鑑(北隆館)によって広く知られることになった。

その後、長く上翅が全体に黄褐色で西日本一帯と東日本の平地に現れるものをツマグロハナカミキリ、黒色のものから黒色地に8つの斑紋が現れるものをヤツボシハナカミキリと呼んでいた。しかし、これらが長い間、種あるいは亜種というTaxaに明確に整理されることはなかった。

榎原・斉藤(1985)による整理が行なわれる以前は、左の列のように大陸産のものを*arcuata*の基亜種とし、上翅が黒色から8つの斑紋が現れるものを*a. mimica*、黄褐色のものを*a. tsumagurohana*とし、この3群をすべて亜種としていた。

その後、榎原・斉藤(1985)は、大陸の*arcuata*と日本の8つの斑紋を持つ*mimica* ヤツボシハナカミキリではspermathecal duct受精囊管の長さ、あるいはspermatheca受精囊の形態に大きな差が認められ、雌交尾器の全体的な形態差により大陸の*arcuata*と日本の*mimica*は別種であるとしている。

さらに榎原他(1991)では黒色の集団を黄褐色の集団に含め学名を*modicenotata*と整理した上で*arcuata*、*mimica*を独立させた。この段階でヤツボシハナカミキリ群はタイリクヤツボシハナカミキリ*arcuata*、ヤツボシハナカミキリ*mimica*、ツマグロハナカミキリ*modicenotata*の3種となった。

図2はこれまでの経緯を踏まえたヤツボシハナカミキリ群についての分布を示した概念図である。西日本一帯および東日本沿岸域を中心とした部分は*modicenotata*ツマグロハナカミキリの分布域であるが、本来黄褐色のツマグロハナカミキリ分布域である和歌山や三重あるいは千葉などに8つの斑紋を持つ個体が現れている。北日本にはおもに*mimica*ヤツボシハナカミキリ、大陸には*arcuata*タイリクヤツボシハナカミキリ、サハリンには記録上この双方が分布するらしい。

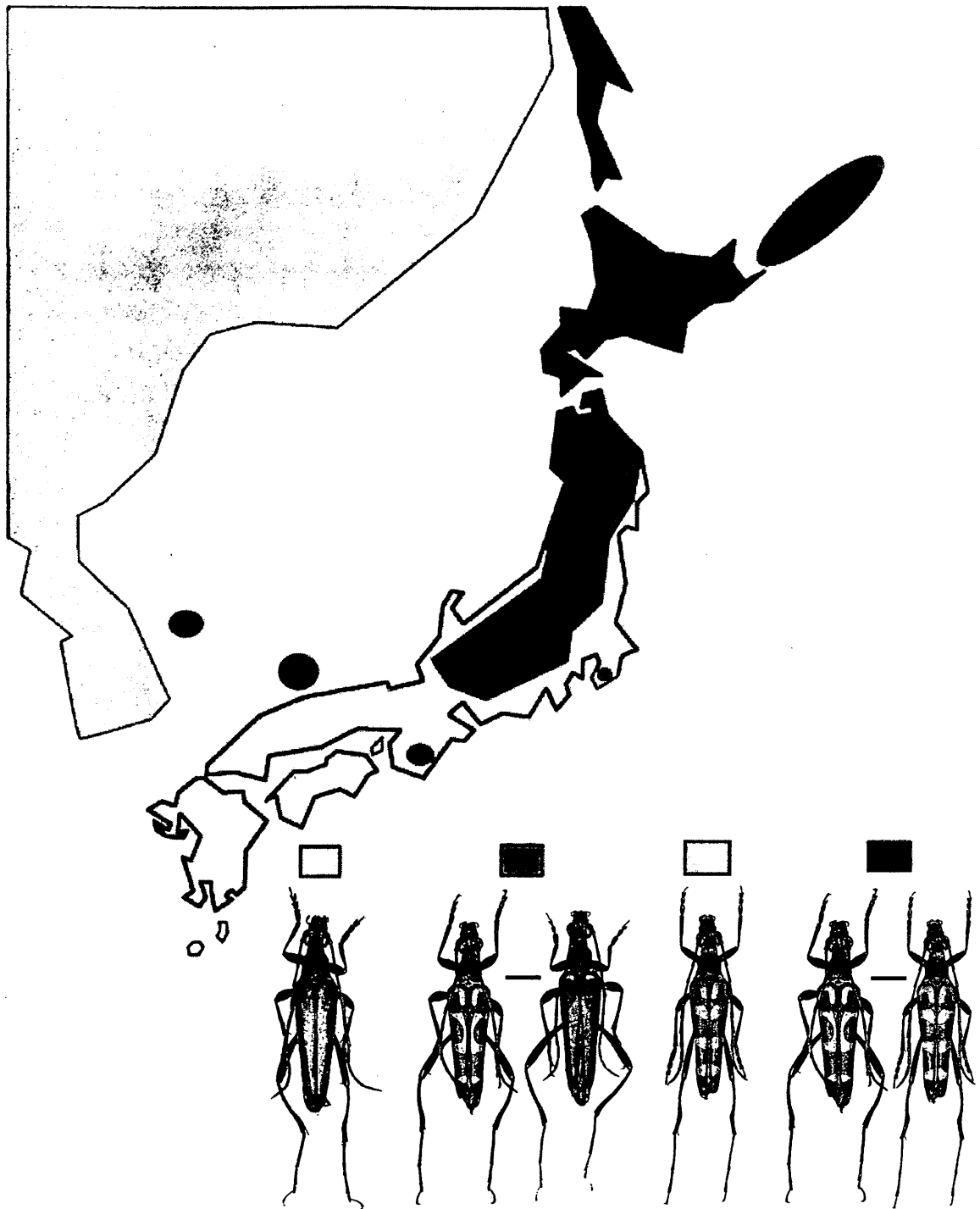


図2 ヤツボシハナカミキリ種群の分布概念図

b. ヒメハナカミキリ属

*Pidonia*属は北半球の温帯地域に限って分布する属で、ヨーロッパに1種、北アメリカの東部と西部にそれぞれ3種、東アジアから100種余りが知られている。このうち、東アジアの半数以上の種が日本に生息している。

体は黄褐色～黒色で上翅にさまざまな斑紋や列条があり、どの種もよく似ていて種の識別が難しい群である。この色彩や斑紋は同一地域での個体変異があり、

さらに地域的な変異もある。また雌雄に大きな差があり、別の種の同性同士より同種の雄と雌での方が差が大きいのが一般的である。

以上のような背景から、これらはカミキリムシ科全体の中でももっとも分類が難しいグループである。

#### ④解析結果

##### a. ヤツボシハナカミキリ種群の分析

先に示したように、現状では上翅斑紋の表現型や交尾器などの外部形態の差を用いた解釈ではそれぞれの形態形質の評価がまちまちであるため、これらについてミトコンドリアND5遺伝子の910bpを用いて系統関係を解析した。

図3は解析に使用したサンプルの採集地点を示したものである。▽は従来の*modicenotata*ツマグロハナカミキリ、▲は8つの斑紋が現れるヤツボシハナカミキリ*mimica*に相当する。▼・◇はタイリクヤツボシハナカミキリ*arcuata*である。■は1985年以前はヤツボシハナカミキリに、榎原他(1991)ではツマグロハナカミキリに含まれているもので上翅が黒色の表現型を示すものである。

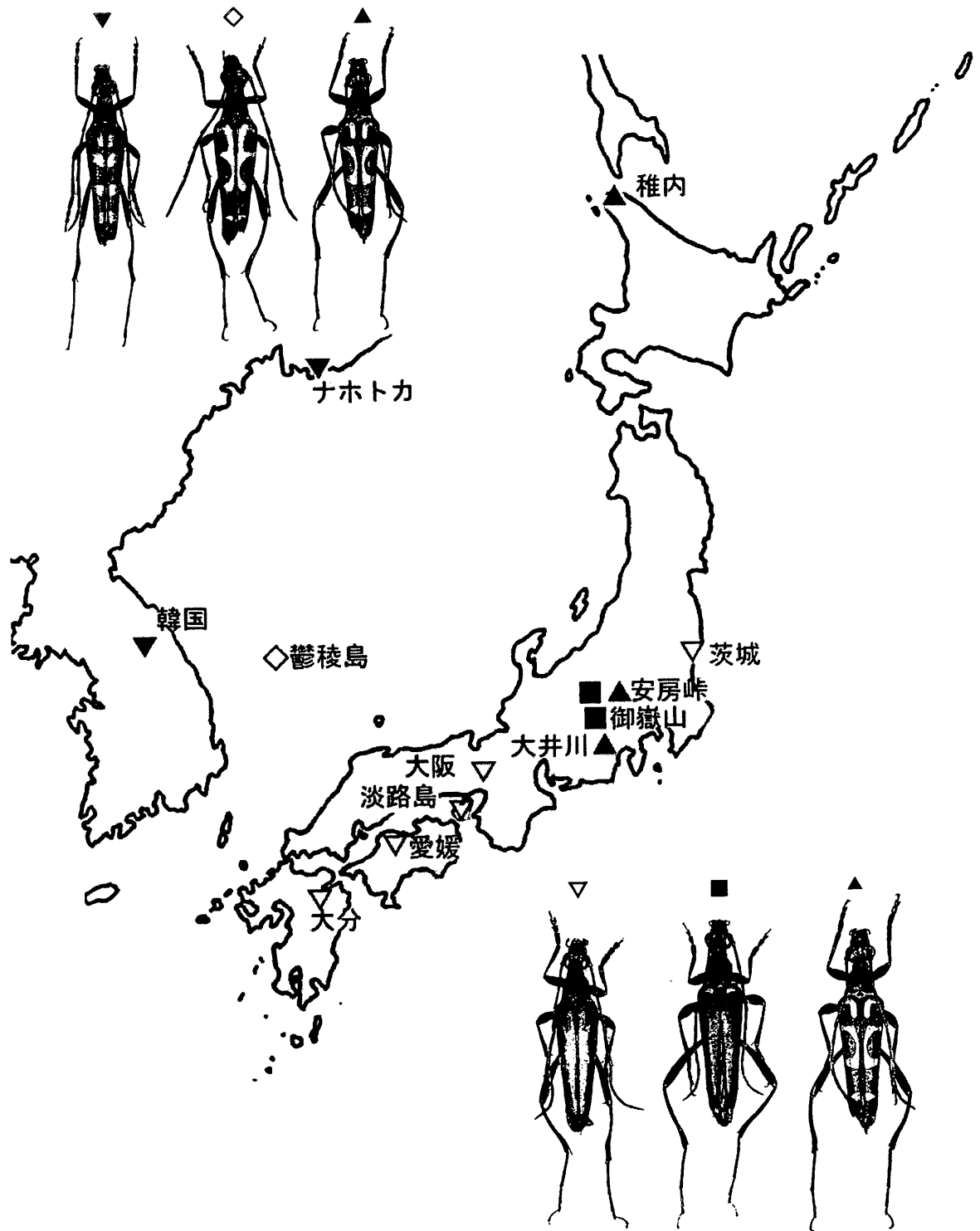


図3 DNA解析に用いたOTUの採集地点

数種のハナカミキリを外群として解析し、系統図を作成すると図4となった。

ヤツボシハナカミキリと、同属のヨツスジハナカミキリの長野と屋久島のもの、そして別種のアカムネハナカミキリ、セスジヒメミハナカキリ、アラメハナカミキリ、ヒゲジロホソコバネなどを加えて分析しても、ヤツボシハナカミキリの3群は大きくみるとひとつの群にまとまっており、さらに3つの小群に分かれている。

解析したOTUとその表現型との対応は、▽が上翅が黄色のツマグロハナカミキリ、■が上翅が黒色のツマグロハナカミキリ、▲がヤツボシハナカミキリで、▼が大陸産タイリクヤツボシハナカミキリ、◇が鬱陵島のタイリクヤツボシハナカミキリである。

これによれば九州の大分、四国の愛媛と淡路島、大阪などの黄褐色のツマグロハナカミキリと御嶽山の黒色のツマグロハナカミキリがひとつの集団で、表現型は大きく異なるもののこれに韓国の鬱陵島のものが加わる。大陸のものは韓国本土とナホトカの2個体が同じ集団となり、長野の安房峠から東は北海道の稚内までひとつの集団を作っている。

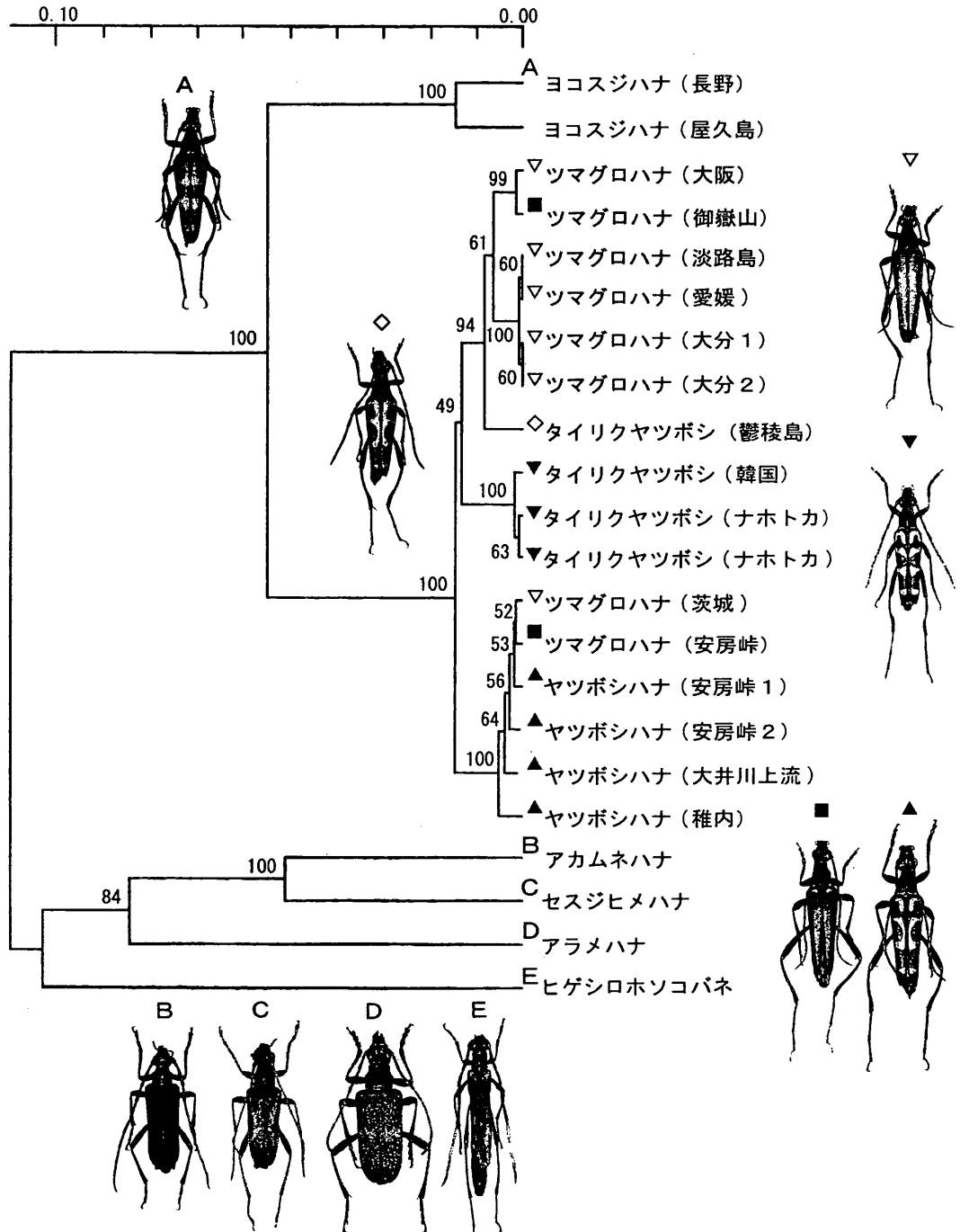


図4 mtDNAによるヤツボシハナカミキリ種群の系統解析結果

全体的にみると、日本の西日本と東日本および大陸の集団の3つに大別されるという結果になった。興味深い点は、第一にこれまで韓国において鬱陵島の *arcuata* だけが変わった表現型を示すものとされていたが、これは韓国本土よりも西日本の集団に近いこと、第二に表現型として上翅が黒色のものであっても、御嶽山と安房峠では別の集団になり、これは茨城のサンプルに代表されるように関東の上翅が黄褐色のツマグロハナカミキリと西日本各地の同様のツマグロハナカミキリとが別の集団になっていることである。すなわち、上翅斑紋の表現型よりも地域的なくくりで集団が形成されているようになっている。

#### b. ヒメハナカミキリ属 (*Pidonia*) の分析

*Pidonia* 属は、現在でも国内で新種の記載が行われている分類段階で(表1参照)、一部の群では種や亜種の扱いも混沌としている。したがって、各種群について個々に分析する前に国内と近隣諸国の種を総括的に調査し、この属の遺伝的な変異の程度を全体的にみる必要があると考えた。

今回は、国内の種を中心になるべく多くの種を分析し、属の全体像を把握することに努めた。また、ごく近年、新種、新亜種が記載された種群のうち、チャイロヒメハナカミキリ (*P. aegrota*) 群とセスジヒメハナカミキリ (*P. amentata*) 群について各地のOTUを分析した。

#### ア. *Pidonia* 属全体の遺伝的な変異の概観

今回は個々の種群における分類学的再検討を行なう前段階として、*Pidonia* 属全体の遺伝的な変異の程度を概観するために、群 (Group) や亜群 (Subgroup) に着目した解析を行った。解析には大陸産の3種、台湾産の11種を含む65のOTUを用いた(表3)。

表3 mtDNA ND5により分析を行ったPidonia等のOTU一覧

OTUの種または亜種名	採集地	採集年月
アカムネハナカミキリ	<i>Macropidonia ruficollis</i>	長野県 川上村 1998年7月
トウカイヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) tsuyukii</i>	静岡県 早川町 1999年6月
アサマヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) takechii</i>	宮城県 栗駒町 1999年8月
サイゴクヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) falcata</i>	徳島県 一宇村 1998年6月
フトエリマキヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) himehana</i>	静岡県 御殿場市 1998年5月
ミヤマヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) sylvicola</i>	長野県 三岳村 1998年7月
カクムネヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) orientalis</i>	岐阜県 上宝村 1998年7月
ムネモンヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) misenina</i>	兵庫県 大屋町 1998年7月
ブービエヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) bouvieri</i>	長野県 安曇村 1998年7月
アサマヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) takechii</i>	長野県 小諸市 1998年7月
ツマゴロヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) maculithorax</i>	兵庫県 大屋町 1998年7月
イシツチヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) shikokensis</i>	愛媛県 面河村 1998年6月
	<i>Pidonia(Pidonia) paradisiacola</i>	台湾省 花蓮縣 1999年5月
	<i>Pidonia(Pidonia) gloriosa</i>	台湾省 台中縣 1999年5月
	<i>Pidonia(Pidonia) submetallica</i>	台湾省 南投縣 1999年5月
オオヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) grallatrix</i>	千葉県 天津小湊町 1999年5月
オオヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) grallatrix</i>	徳島県 東祖谷山村 1998年6月
	<i>Pidonia(Pidonia) palleana</i>	中国 四川省 1998年6月
シナノヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) suzukii</i>	山梨県 芦安村 1998年7月
フライヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) signata</i>	長野県 朝日村 1998年7月
シラネヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) obscurior obscurior</i>	群馬県 片品村 1998年7月
ハクサンヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) obscurior hakusana</i>	長野県 大町市 1998年7月
ホソガタヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) semiobscura</i>	山梨県 芦安村 1998年7月
ヒスイヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) tsutsuii</i>	長野県 白馬村 1998年6月
ナガノヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) signifera</i>	新潟県 相川町 1998年5月
ホクリクヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) jasha</i>	福井県 今庄町 1998年6月
ニッコウヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) limbaticollis limbaticollis</i>	群馬県 片品村 1998年7月
オオバヤシヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) limbaticollis ohbayashii</i>	岐阜県 高根村 1998年7月
ブロンングヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) limbaticollis stephani</i>	徳島県 東祖谷山村 1998年6月
キュウシュウヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) kyushuensis</i>	大分県 庄内村 1998年5月
	<i>Pidonia(Pidonia) amurensis</i>	韓国 江原道 1998年6月
ヤマトヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) yamato</i>	大分県 庄内村 1998年5月
タカネヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) tsukamotoi</i>	長野県 八千穂村 1998年7月
	<i>P.(Mumon) debilis</i>	韓国 江原道 1998年6月
サドチャイロヒメハナカミキリ	<i>P.(Mumon) telephia</i>	新潟県 相川町 1998年5月
チャイロヒメハナカミキリ	<i>P.(Mumon) aegrota</i>	長野県 戸隠村 1998年7月
	<i>P.(Mumon) aestivalis</i>	台湾省 南投縣 1999年6月
	<i>P.(Mumon) formosana</i>	台湾省 高雄縣 1999年5月
	<i>P.(Mumon) sacrosancta</i>	台湾省 花蓮縣 1999年5月
	<i>P.(Mumon) confusa</i>	台湾省 花蓮縣 1999年5月
フダオビチビハナカミキリ	<i>P.(Omphalodera) puziloi</i>	神奈川県 津久井町 1998年5月
ニセフダオビチビハナカミキリ	<i>P.(Omphalodera) testacea</i>	山梨県 芦安村 1998年7月
ワルサワダケヒメハナカミキリ	<i>P.(Omphalodera) warusawadakensis</i>	山梨県 芦安村 1998年7月
	<i>P.(Omphalodera) poziloi</i>	韓国 江原道 1998年6月
フダオビチビハナカミキリ	<i>P.(Omphalodera) puziloi</i>	長崎県 上県町 1999年5月
コトヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) lyra</i>	静岡県 東伊豆町 1998年6月
トサヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) approximata</i>	徳島県 東祖谷山村 1998年6月
ミワヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) miwai</i>	鳥取県 大山町 1998年5月
セスジヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) amentata amentata</i>	山梨県 三富村 1998年6月
セスジヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) amentata amentata</i>	大分県 庄内村 1998年5月
キタセスジヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) amentata kurosawai</i>	岩手県 一関市 1998年5月
アワシマセスジヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) amentata awashimana</i>	新潟県 粟島浦村 1998年5月
ニセヨコモンヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) similima</i>	愛媛県 面河村 1998年5月
ムネアカヨコモンヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) masakii</i>	長野県 安曇村 1998年7月
シラユキヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) dealbata</i>	兵庫県 大屋町 1998年7月
クロヨコモンヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) hayashii</i>	新潟県 湯沢町 1998年8月
ヨコモンヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) insuturata</i>	山梨県 芦安村 1998年7月
イヨヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) hyliphila</i>	徳島県 東祖谷山村 1998年6月
	<i>P.(Cryptopidonia) hohuanshana</i>	台湾省 花蓮縣 1999年7月
	<i>P.(Cryptopidonia) pilushana</i>	台湾省 花蓮縣 1999年5月
	<i>P.(Cryptopidonia) aenipennis</i>	台湾省 高雄縣 1999年5月
	<i>P.(Cryptopidonia) subaenea</i>	台湾省 台東縣 1999年5月
オギマヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) oyamae</i>	長野県 安曇村 1998年7月

解析結果を図5、6に示した。双方とも近縁属のアカムネハナカミキリ *Macropidonia ruficollis* を外群として系統図を作成した。ブートストラップ値は70以上のもののみ示している。図5がNJ(近隣結合)法、図6がUPGMA法で書いたものである。なお、MP(最節約)法でも解析したが、全体として、同様の結果であったため、以後、個々の関係についてはみやすいUPGMA法の系統図で説明を加える。



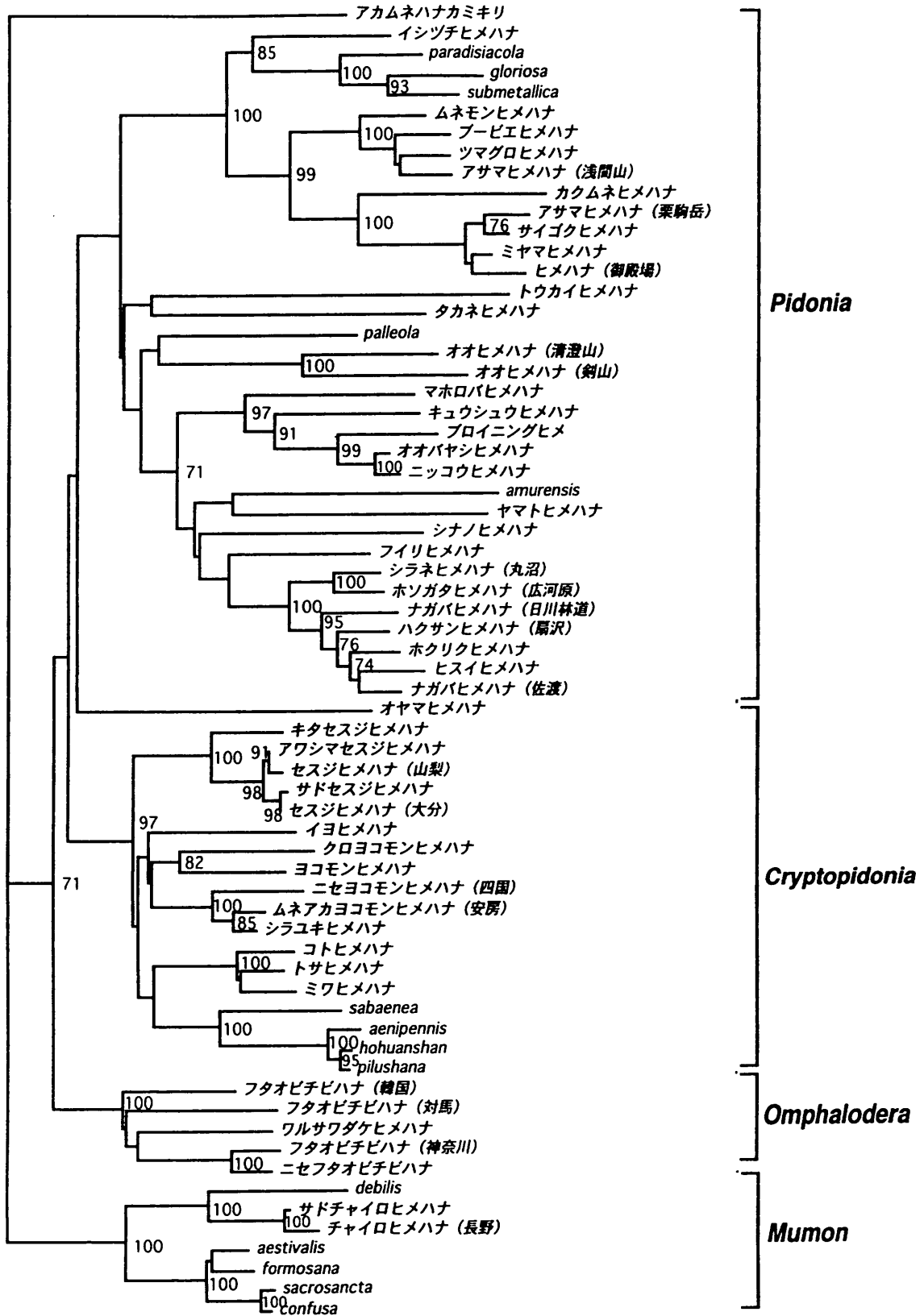


図5 *Pidonia*属の系統樹(NJ法)

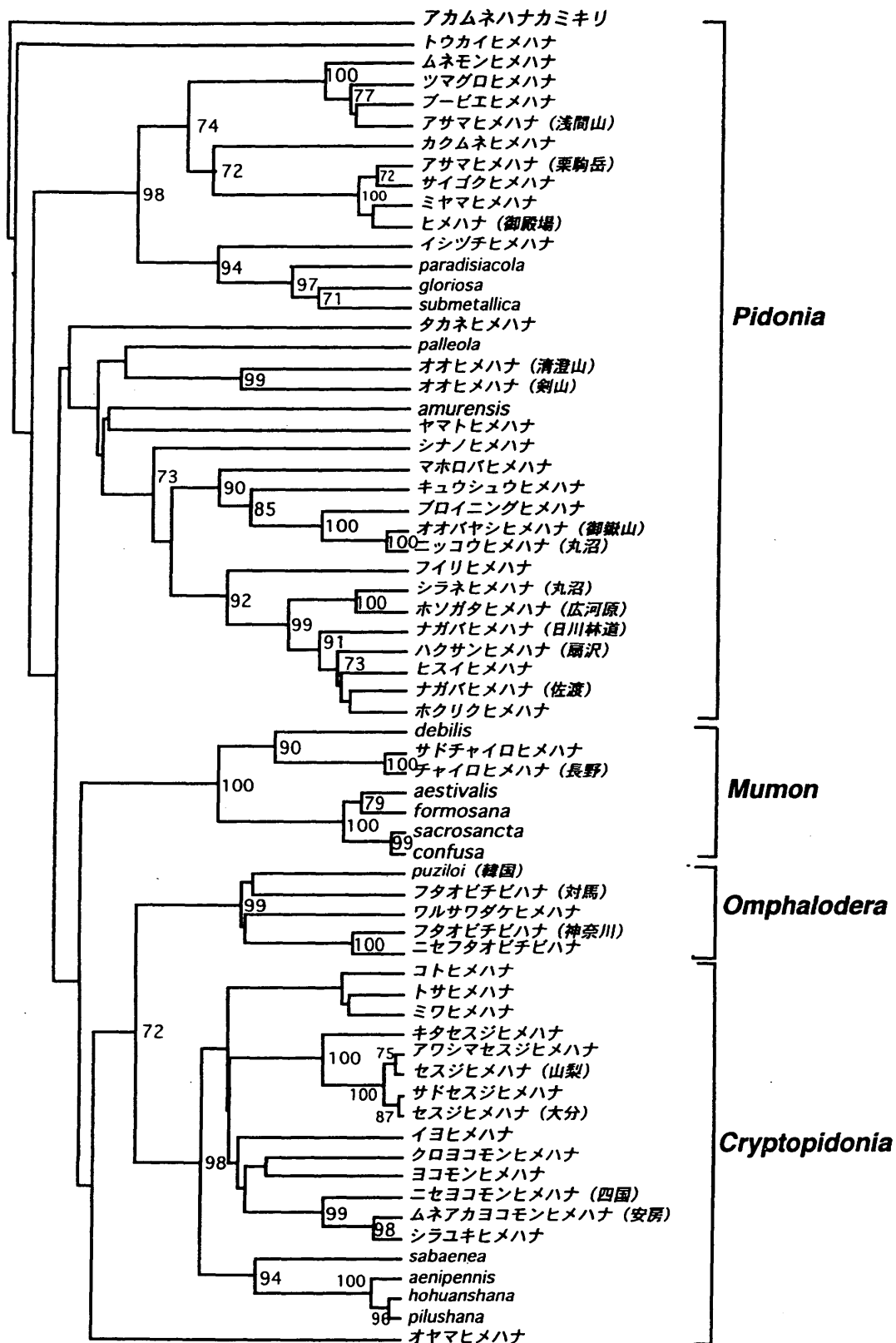


図6 Pidonia属の系統樹(UPGMA法)

<各亜属の確認について>

日本産の*Pidonia*属には現在4つの亜属が設立されている。解析の結果、およそそれぞれ4つの亜属(*Pidonia*、*Mumon*、*Omphalodera*、*Cryptopidonia*)の単系統性は支持された。

しかし、*Pidonia*亜属のトウカイヒメハナカミキリ*P. tsuyukii*、*Cryptopidonia*亜属のオヤマヒメハナカミキリ*P. oyamae*はそれのみの群を形成しており、それぞれ従来含まれていた亜属から独立していることが新たにわかった。

<個々の亜属内の群について>

1) *Pidonia*亜属(トウカイヒメハナカミキリ<matsushitai群>を除く)

図7は図6の上半分の*Pidonia*亜属の部分を示したものであるが、これによれば、全体として大きく3群、すなわち、①上から2つ目のムネモンヒメハナカミキリから12のOTUを含み、台湾の*submetallica*までの*orientalis*(カクムネヒメハナカミキリ)群と、②シナノヒメハナカミキリとフイリヒメハナカミキリを含むマホロバヒメハナカミキリから4つ目のニッコウヒメハナカミキリまでと、シラネヒメハナカミキリから6つ目のホクリクヒメハナカミキリまでを含む*signifera*(ナガバヒメハナカミキリ)群、そして③その他として残りのタカネヒメハナカミキリから5つ目のヤマトヒメハナカミキリまでのそれぞれ独立群として現れているものに分けられる。

なお、現状では③のその他の群(タカネヒメハナカミキリからヤマトヒメハナカミキリまで)については、さらにサンプル数を増やした解析が必要であると判断される。

さらに、他の2群、すなわち*orientalis*群と*signifera*群については、この2つの大きな集団があるものと考えられる。それぞれの群内には、

- a. ムネモンヒメハナカミキリからアサマヒメハナカミキリまでの4つのOTUを含む亜群(*maculithorax*亜群)
- b. カクムネヒメハナカミキリの単独亜群
- c. サイゴクヒメハナカミキリ、ミヤマヒメハナカミキリ、フトエリマキヒメハナカミキリの3つのOTUを含む亜群(*himehana*亜群)
- d. イシヅチヒメハナカミキリの単独亜群(*discoidalis*亜群)
- e. 台湾産の*Pidonia*亜属の種をすべて含む亜群、の5つの亜群が認められる。(なお、栗駒山のアサマヒメハナカミキリのOTUの扱いについては、今後の検討課題としたい)

一方、*signifera*群では、

- a. シナノヒメハナカミキリ、フイリヒメハナカミキリのそれぞれ単独亜群(これらについては、さらにOTUを増やして再検討したい)
- b. マホロバヒメハナカミキリとキュウシュウヒメハナカミキリおよび3つの亜種を含むニッコウヒメハナカミキリの亜群(*limbaticollis*亜群)
- c. ホソガタヒメハナカミキリからホクリクヒメハナカミキリまでの亜群(*signifera*亜群)があると全体像を整理したい。

従来は、ナガバヒメハナカミキリ群にフトエリマキヒメハナカミキリ類が含まれ、シラネヒメハナカミキリ類は別の群に、ミヤマヒメハナカミキリはカクムネヒメハナ

カミキリ群に含まれるなどと考えられていた。

しかし、今回の解析の結果、ナガバヒメハナカミキリ群にはシラネヒメハナカミキリ類がすべて含まれ、ヤマトヒメハナカミキリはシラネヒメハナカミキリ類とは独立していた。また、これに含まれると考えられていたフトエリマキヒメハナカミキリ類はすべてカクムネヒメハナカミキリ群に含まれることがわかった。さらにカクムネヒメハナカミキリ類に近いと考えられていたミヤマヒメハナカミキリはむしろ狭義のフトエリマキヒメハナカミキリ亜群であった。

また、これまで類縁関係の確定できていなかったマホロバヒメハナカミキリはニッコウヒメハナカミキリ亜群に、オオヒメハナカミキリ類に含まれていたシナノヒメハナカミキリ、フイリヒメハナカミキリは独立していることが新たにわかった。

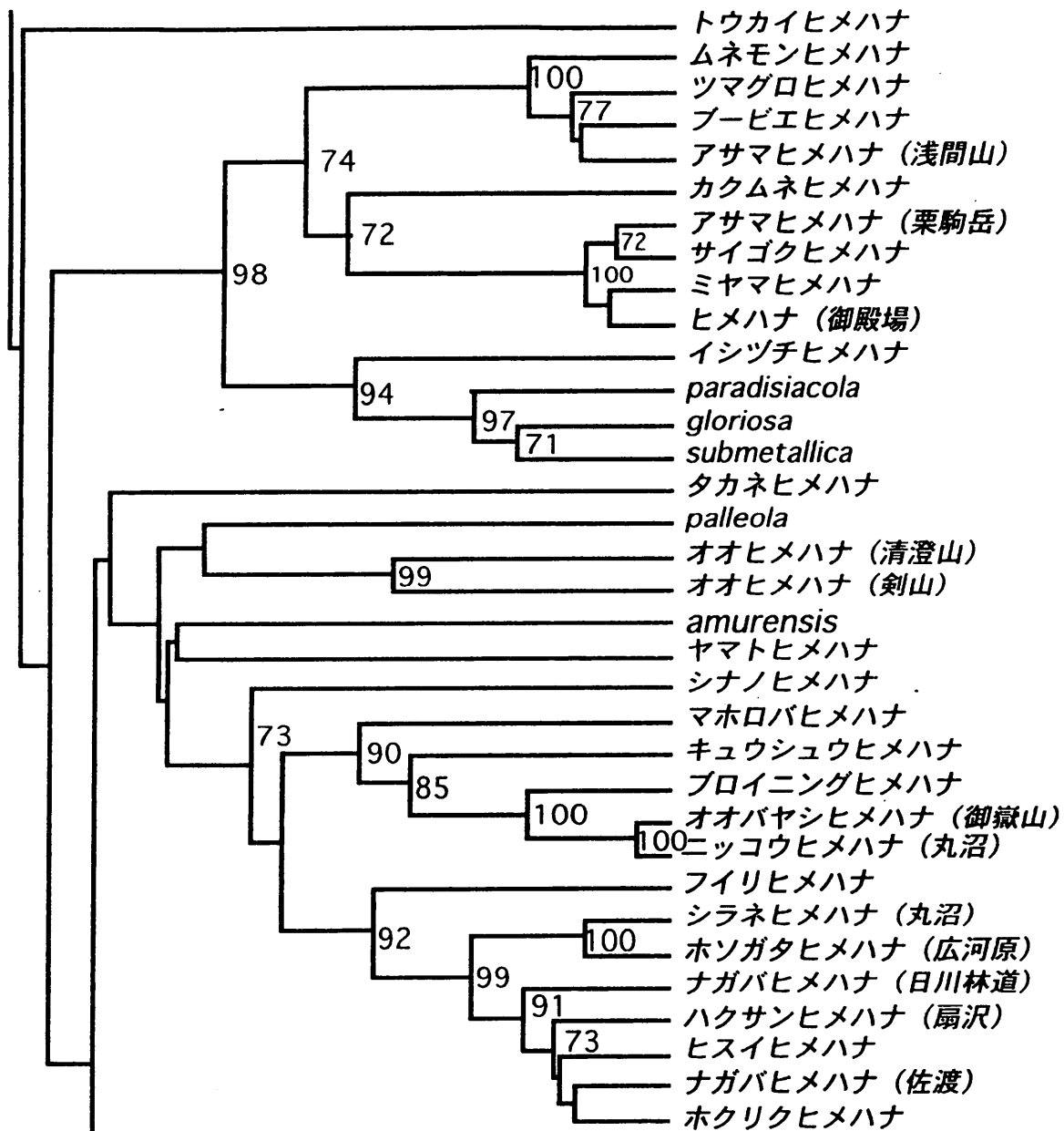


図7 *Pidonia* 亜属の系統図(UPGMA法)

## 2) *Mumon*亜属と*Omphalodera*亜属

図8では*Mumon*亜属と*Omphalodera*亜属を示しているが、いずれも先の*Pidonia*亜属、そして次の*Cryptopidonia*亜属とはそれぞれ独立した亜属である。

*Mumon*亜属は大きく、大陸産の*debilis*と日本産の種、そして台湾産の種の3群がほぼ独立的に現れている。

*Omphalodera*亜属では、ワルサワダケヒメハナカミキリが1種で単独、韓国産と対馬産の*puziloi*フタオビチビハナカミキリがそれぞれ単独、そして本州の*puziloi*フタオビチビハナカミキリと*testacea*ニセフタオビチビハナカミキリを含む集団の4群がそれぞれ独立的な関係になっていることがわかった。

## 3) *Cryptopidonia*亜属(オヤマヒメハナカミキリ<oyamae群>を除く)

図9は*Cryptopidonia*亜属を示したものであるが、先に述べたようにオヤマヒメハナカミキリ*P. oyamae*はこの亜属より独立している。

全体としては4群とその他の群の5つに分けられる。その他の群は図の中ほどのイヨヒメハナカミキリからヨコモモンヒメハナカミキリまでの3つのOTUで、それぞれ独立していると見えるが、現状では先の*Pidonia*亜属のケースと同様さらにサンプル数を増やして解析した結果を待たなければならない。

それ以外の4群はそれぞれ独立の集団であると考えている。すなわち、

- a. コトヒメハナカミキリ、トサヒメハナカミキリ、ミワヒメハナカミキリの群(*miwai*群)
- b. キタセスジヒメハナカミキリから4つのOTUを含む群(*amentata*群)
- c. ニセヨコモモンヒメハナカミキリ、ムネアカヨコモモンヒメハナカミキリ、シラユキヒメハナカミキリの群(*simillima*群)
- d. 台湾産の*Cryptopidonia*亜属の種の群である。

この亜属では、従来セスジヒメハナカミキリ群とヨコモモンヒメハナカミキリ群の2群と考えられていたが、前者には3種よりなるミワヒメハナカミキリ群とセスジヒメハナカミキリ群に、後者は3種よりなるニセヨコモモンヒメハナカミキリ群とヨコモモンヒメハナカミキリ、クロヨコモモンヒメハナカミキリ、イヨヒメハナカミキリの単独となった。

以上のように、mtDNAによる解析では今回扱った64の*Pidonia*属のOTUは表4のように分類された。

表 4 mtDNA による解析で得られた *Pidonia* 属の大分類

亜 属	群	亜 群	解析したOUT	未解析の種名
<i>Pidonia</i> 亜属	matsushitai群		<i>tsuyukii</i>	( <i>matsushitai</i> ) ( <i>pallidicolor</i> ) ( <i>mutata</i> )
	1. orientalis群	1. maculithorax亜群	<i>misenina</i>	
			<i>maculithorax</i>	
			<i>bouvieri</i> <i>takechii</i>	
		2. orientalis亜群	<i>orientalis</i>	
		3. himehana亜群	<i>falcata</i> <i>sylvicola</i> <i>himehana</i>	( <i>modesta</i> ) ( <i>pallida</i> )
	2. signifera群	4. discoidalis亜群	<i>shikokensis</i>	( <i>discoidalis</i> ) ( <i>neglecta</i> )
		5. 台湾Pidonia亜群	<i>paradisiacola</i> <i>gloriosa</i> <i>submetallica</i>	
	3. ( 単独群? ) ( 単独群? ) ( 単独群? ) ( 単独群? )	1. (単独亜群?) (単独亜群?)	<i>signata</i>	
			<i>suzukii</i>	
		2. limbaticollis亜群	<i>leucamthophila</i> <i>kyushuensis</i> <i>limbaticollis stephani</i> <i>limbaticollis ohbayashii</i> <i>limbaicollis limbaticollis</i>	
			3. signifera亜群	<i>semiobscura</i> <i>obscurior obscurior</i> <i>obscurior hakusana</i> <i>signifera</i> <i>tsutsuii</i> <i>jasha</i>
<i>yamato</i> <i>amurensis</i> <i>grallatrix</i> <i>tsukamotoi</i>			( <i>ohminesana</i> ) ( <i>gibbicollis</i> )	
			<i>debilis</i>	
<i>Mumon</i> 亜属		2. aegrota群		<i>aegrota</i> <i>telepia</i>
	3. 台湾Mumon群		<i>aestivalis</i> <i>formosana</i> <i>sacrosancta</i> <i>confusa</i>	
	<i>Omphalodera</i> 亜属	1. 韓国puziloi群		<i>puziloi</i> (韓国)
2. 対馬puziloi群			<i>puziloi</i> (対馬)	
3. 本州puziloi群			<i>puziloi</i> (本州)	
4. warusawadakensis群			<i>testacea</i> <i>warusawadakensis</i>	
<i>Cryptopidonia</i> 亜属	1. miwai群		<i>lyra</i> <i>approximata</i> <i>miwai</i>	
		2. amentata群	<i>amentata amentata</i> <i>amentata kurosawai</i> <i>amentata awashimana</i> <i>sadoensis</i>	
			3. simillima群	<i>simillima</i> <i>masakii</i> <i>dealbata</i>
	4. ( 単独群? ) ( 単独群? ) ( 単独群? )			<i>hylophila</i> <i>insuturata</i> <i>hayashii</i>
	5. 台湾Cryptopidonia群			<i>sabaenea</i> <i>aenipennis</i> <i>hohuanshana</i> <i>pilushana</i>
		oyamae群		<i>oyamae</i>

注): 群、亜群の?はそれぞれ1種による単独群・亜群の可能性もあるが未解析の種もあるため、解釈を保留とした。

: 最左列の( )内の種名は、未解析の種名。形態分類から右のグループに含まれると想定されるもの。

: " は今回新たに亜属程度の独立性が認められた群。

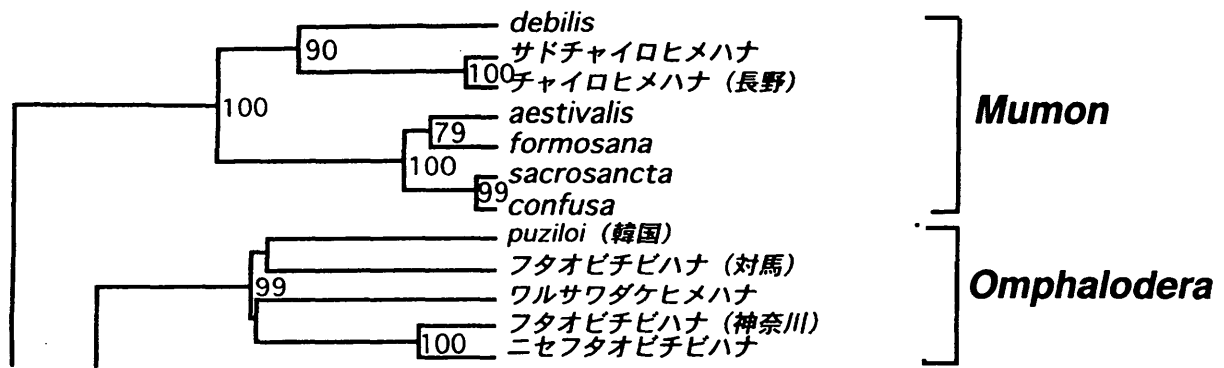


図8 *Mumon*亜属と*Omphalodera*亜属の系統図(UPGMA法)

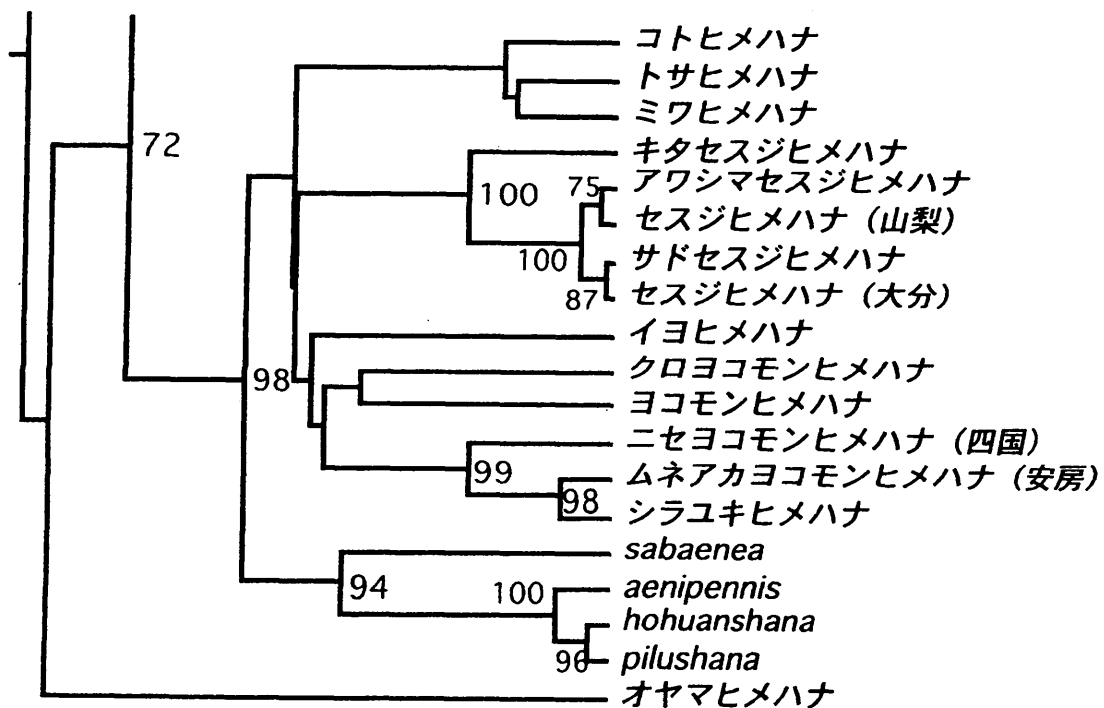


図9 *Cryptopidonia*亜属の系統図(UPGMA法)



イ. 2つの種群(チャイロヒメハナカミキリとセスジヒメハナカミキリ)の分析

以上のような属の全体像をおさえた上で、さらに本年度は近年新種が追加された、*Mumon* 亜属に含まれる種および *amentata* 種群について、各地のサンプルを解析した。

<チャイロヒメハナカミキリ(*Mumon*) 亜属について>

日本のチャイロヒメハナカミキリは長く *P. debilis* の学名が当てられていたが、後にロシアのアムール地方で記載された *debilis* と日本の種は分離され、現在は *P. aegrota* の学名が使用されている。また、対馬の集団は亜種 *kubokii* として本州、四国、九州産のものとは区別されている(図9参照)。さらに近年佐渡の集団を *telephia* として別種の扱いがなされた。

今回はこれら日本の各集団の遺伝的な関係について解析を試みた。使用したのは、これらに加え台湾産の4種と本州の5地域および九州のものを加え、表5に示した14のOTUと外群として4つのOTUである。

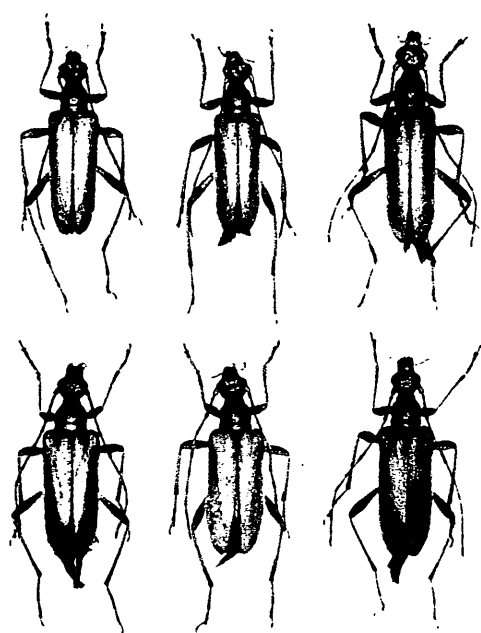


図10 チャイロヒメハナカミキリ種群の3つのタクサと分析に用いたOTUの採集地点  
上:雄 下:雌 右: telephia、  
中: a. aegrota、左: a. kubokii

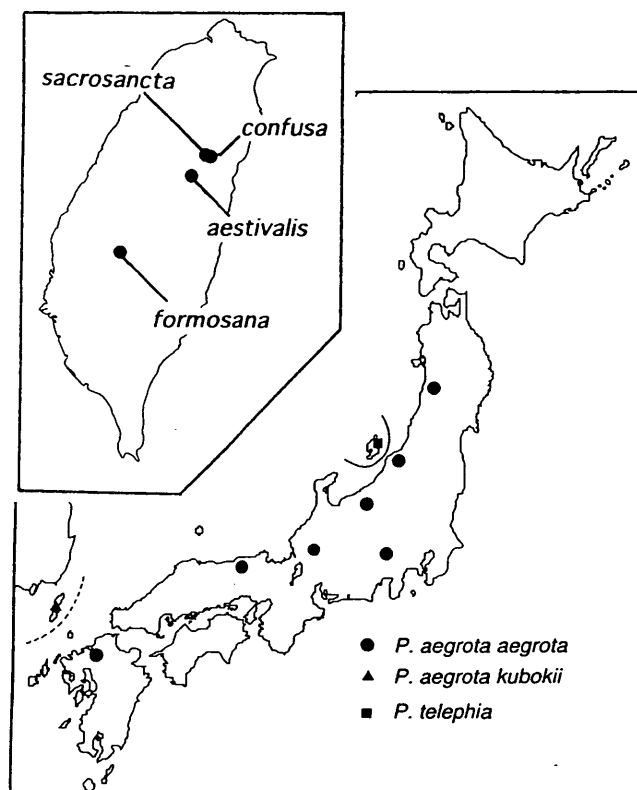


表5 チャイロヒメハナカミキリ群の分析に用いたPidoniaのOTU一覧

OTUの種または亜種名		採集地	採集年月
オオヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) grallatrix</i>	徳島県 東祖谷山村	1998年6月
フタオビヒメハナカミキリ	<i>P.(Omphalodera) puziloi</i>	神奈川県 津久井町	1998年5月
ヨコモンヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptoidonia) insuturata</i>	山梨県 芦安村	1998年7月
セスジヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) amentata amentata</i>	山梨県 塩山市	1998年6月
	<i>P.(Mumon) sacrosancta</i>	台湾省 花蓮縣	1999年5月
	<i>P.(Mumon) confusa</i>	台湾省 花蓮縣	1999年5月
	<i>P.(Mumon) aestivalis</i>	台湾省 南投縣	1999年6月
	<i>P.(Mumon) formosana</i>	台湾省 高雄縣	1999年5月
	<i>P.(Mumon) debilis</i>	韓国 江原道	1998年6月
ツシマチャイロヒメハナカミキリ	<i>P.(Mumon) aegrota kubokii</i>	長崎県 上県町	1998年5月
チャイロヒメハナカミキリ	<i>P.(Mumon) aegrota aegrota</i>	兵庫県 波賀町	1998年5月
チャイロヒメハナカミキリ	<i>P.(Mumon) aegrota aegrota</i>	福井県 今庄町	1998年5月
サドチャイロヒメハナカミキリ	<i>P.(Mumon) telephia</i>	新潟県 相川町	1998年5月
チャイロヒメハナカミキリ	<i>P.(Mumon) aegrota aegrota</i>	秋田県 象潟町	1998年7月
チャイロヒメハナカミキリ	<i>P.(Mumon) aegrota aegrota</i>	長野県 戸隠村	1998年7月
チャイロヒメハナカミキリ	<i>P.(Mumon) aegrota aegrota</i>	山梨県 塩山市	1998年5月
チャイロヒメハナカミキリ	<i>P.(Mumon) aegrota aegrota</i>	新潟県 黒川村	1998年5月
チャイロヒメハナカミキリ	<i>P.(Mumon) aegrota aegrota</i>	福岡県 福岡市	1998年5月

解析結果を図11および図12に示した。これらの図によれば、チャイロヒメハナカミキリ *P. aegrota* の集団はサドチャイロヒメハナカミキリ *P. telephia* を完全に含んでしまい、この種は対馬の亜種 *P. a. kubokii* よりも基亜種の *P. a. aegrota* に近い関係にあることがわかった。

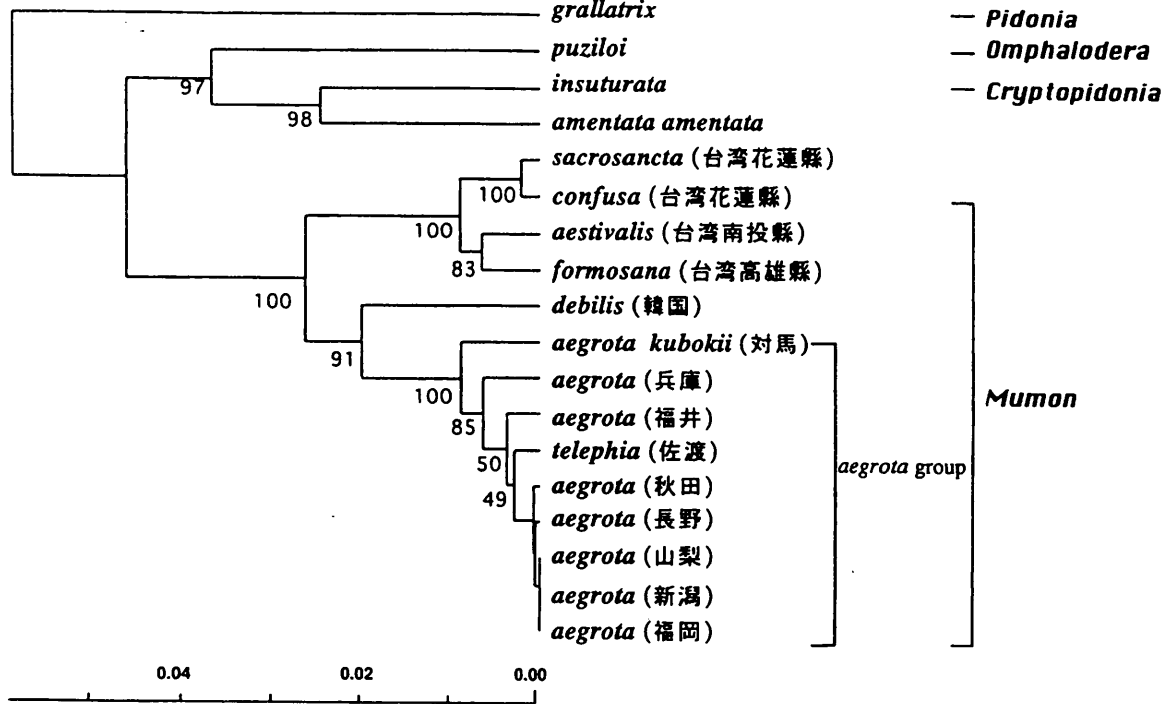


図11 チャイロヒメハナカミキリ種群の系統図 (UPGMA法)

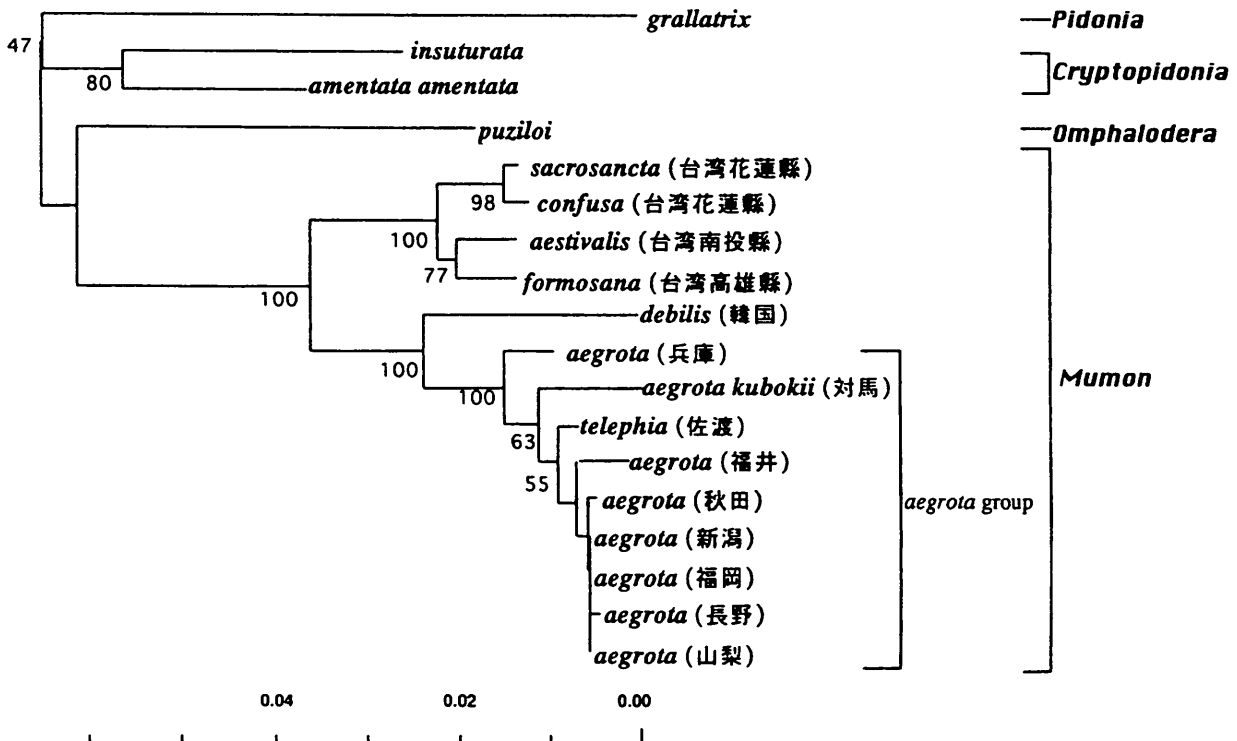


図12 チャイロヒメハナカミキリ種群の系統図 (NJ法)

<セスジヒメハナカミキリ(*amentata*)群について>

セスジヒメハナカミキリは、図13に示したように太平洋側は分布を界に関東から西日本に基亜種の*amentata amentata*、長野県の一部と新潟、福島県中、東部を除く東北、北海道にキタセスジヒメハナカミキリ*amentata kurasawai*が分布している。

さらに近年、佐渡の個体群が本種とは別の種サドセスジヒメハナカミキリ*sadoensis*、粟島の個体群が本種の別亜種 *a. awashimana*として記載された。図14では左に *P. sadoensis*、右に *P. a. amentata*、中央にこの両者の中間的な位置に生息している新潟県黒川村の*P. a. amentata*を示した。

このように上翅班紋や触角の長さなどの表現形の違いが遺伝的にはどのくらいの距離として現れるか分析してみた。表6はこの分析に用いたOTUデータの一覧である。図15、16がその結果である。

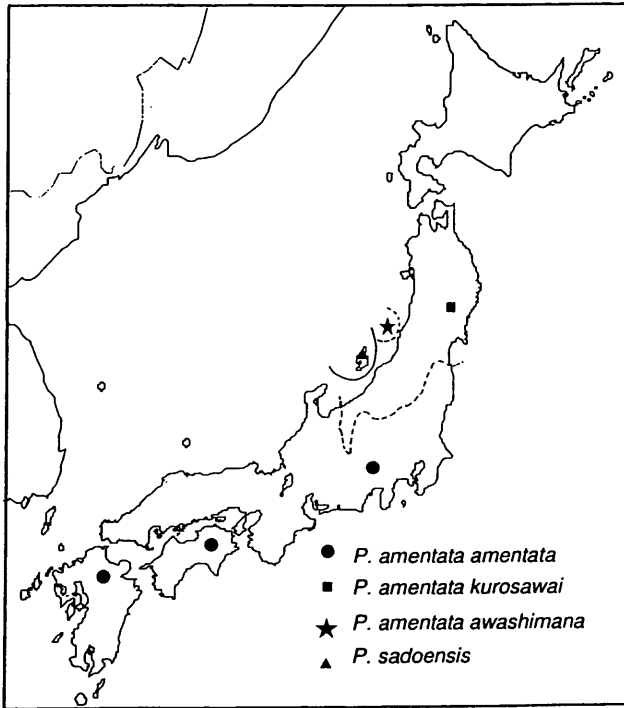


図13 分析に用いたセスジヒメハナカミキリ群の採集地点

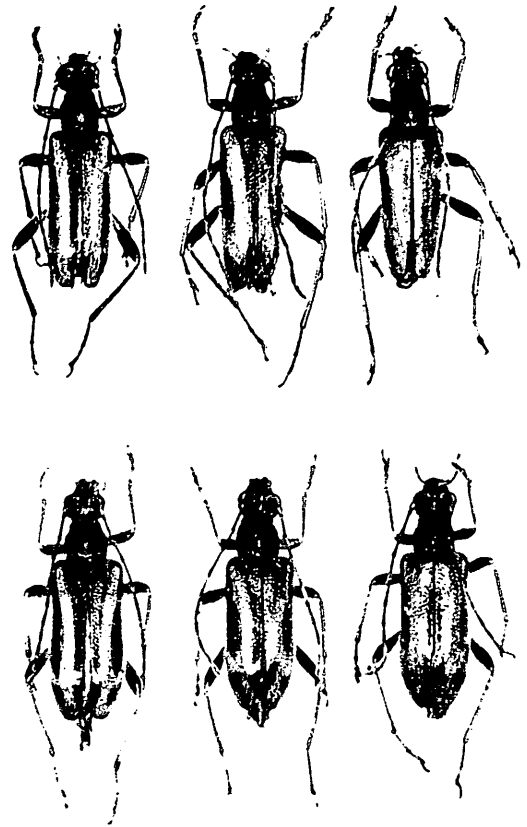


図14 近年記載されたセスジヒメハナカミキリ群の新タクサ 1: sadoensis 2: a. amentata 3: a. awashimana、上: 雄、下: 雌

表6 セスジヒメハナカミキリ群の分析に用いたPidoniaのOTU一覧

OTUの種または亜種名		採集地	採集年月
オオヒメハナカミキリ	<i>Pidonia(Pidonia) grallatrix</i>	徳島県 東祖谷山村	1998年6月
チャイロヒメハナカミキリ	<i>P.(Mumon) aegrota aegrota</i>	山梨県 塩山市	1998年5月
フタオビチビハナカミキリ	<i>P.(Omphalodera) puziloi</i>	神奈川県 津久井町	1998年5月
ミワヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) miwai</i>	鳥取県 大山町	1998年5月
ヨコモヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) insuturata</i>	山梨県 芦安村	1998年7月
キタセスジヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) amentata kurosawai</i>	岩手県 一関市	1998年5月
セスジヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) amentata amentata</i>	徳島県 一宇村	1998年6月
サドセスジヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) sadoensis</i>	新潟県 相川町	1998年5月
セスジヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) amentata amentata</i>	大分県 庄内村	1998年6月
アワシマセスジヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) amentata amashimana</i>	新潟県 粟島浦村	1998年5月
セスジヒメハナカミキリ	<i>P.(Cryptopidonia) amentata amentata</i>	山梨県 塩山市	1998年5月

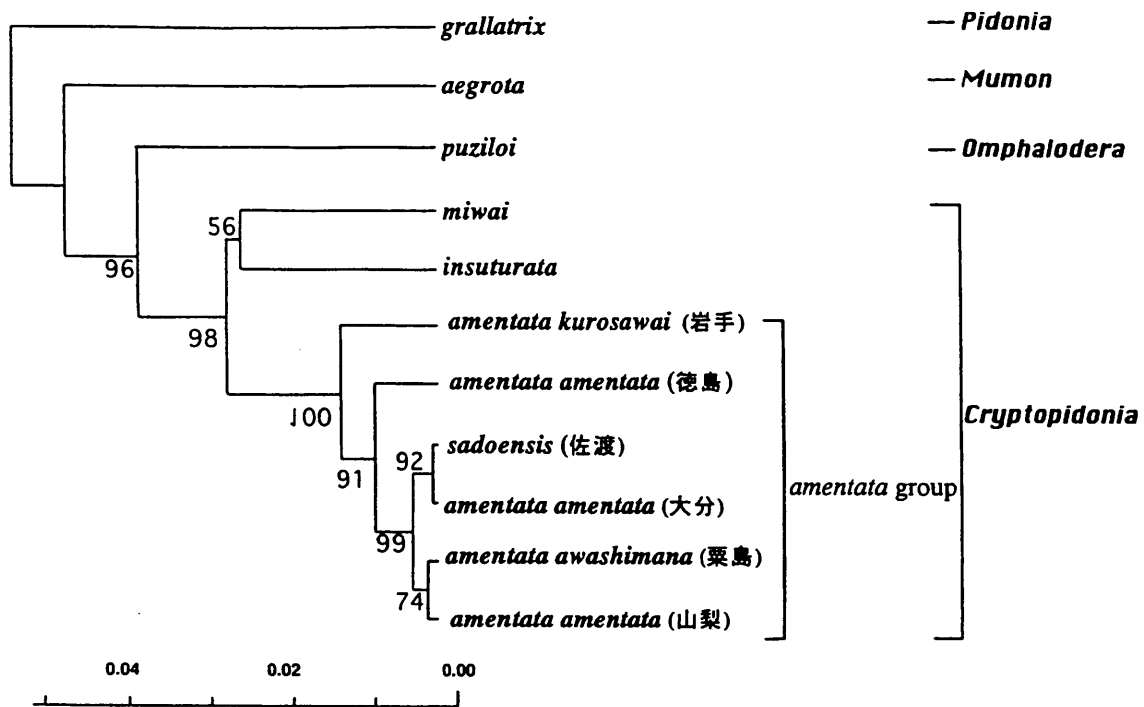


図15 セスジヒメハナカミキリ種群の系統図 (UPGMA法)

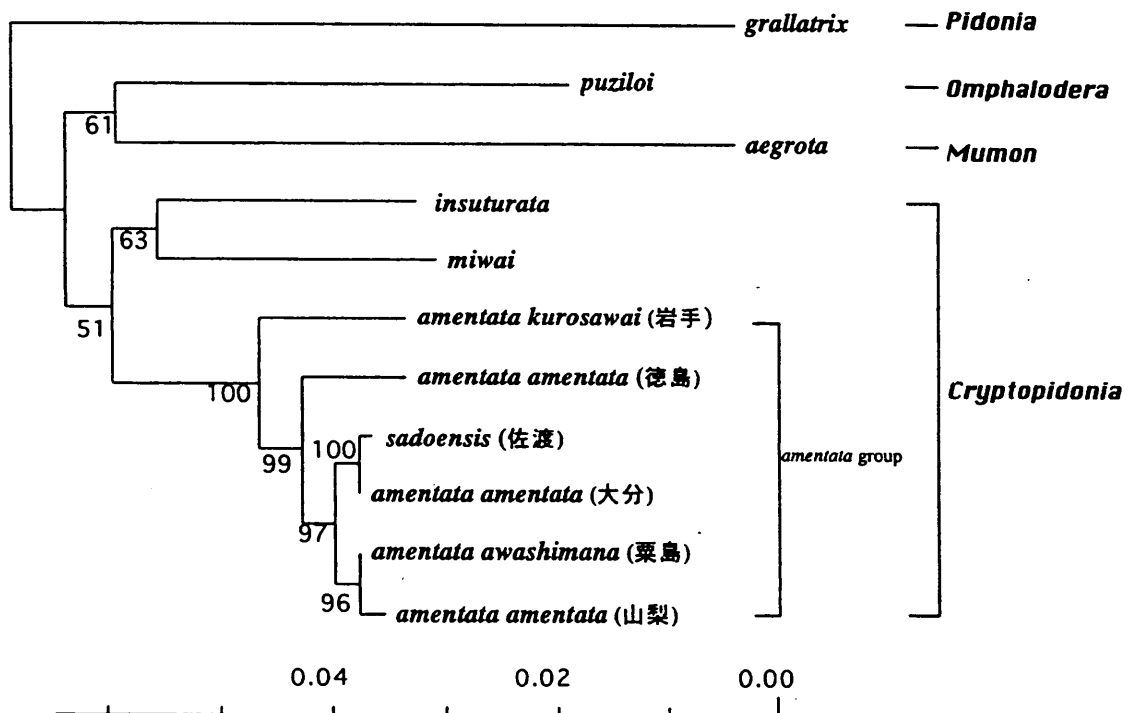


図16 セスジヒメハナカミキリ種群の系統図 (NJ法)

amentata群の全体的な関係は図15と16によれば、岩手県一関市の本種OTUは全体として比較的独立性が高いものの、別種として記載されたsadoensisを含むa. awashimanaも全体として本来の基亜種a. amentataの一群に含まれてしまうことがわかった。

#### ⑤まとめ

本年度は、ハナカミキリ類の2つの属(*Leptura* と *Pidonia*)からいくつかの種群を選び、ミトコンドリア DNA の解析を行った。*Leptura* 属のヤツボシハナカミキリ種群では、これまでの形態的な分類とは異なり、日本の西と東で大きく集団が分かれていることが、また、*Pidonia* 属のチャイロヒメハナカミキリ種群とセスジヒメハナカミキリ種群では、いくつか細分されている種が統括され、各地の個体群の全体的な系統関係がわかった。

今回の解析結果から、従来分類体系とは異なった集団が形成されていることがいくつか判明したが、これらの分類学的な解析は、次年度行うものとする。

また、次年度はさらに日本産ヒメハナカミキリ属全 60 種・亜種について台湾および大陸に分布する数種も含めての分子系統解析を継続して行い、本属を中心にハナカミキリ類の遺伝的多様性を明らかにし、分類学的再検討を行う予定である。

なお、本調査は文部省平成 11-12 年度科学研究費補助金(C): (1)11640706「カミキリムシ科甲虫における分子系統解析の基礎を築く」の一部として、千葉県立中央博物館の斉藤明子博士とJT生命誌研究館の蘇智慧博士との共同研究の形ですすめている。

## 10. 高等植物

山口県立大学 鈴木 和雄  
東北大学大学院理学研究科 牧 雅之 堀江佐知子

### (1) 現地調査

#### ① 調査選定種

本年の調査で用いた種は、メギ科の草本バイカイカリソウ (*Epimedium diphylum*) とトキワイカリソウ (*E. sempervires*) の 2 種であり、これらの典型的集団と 2 種間の交雑集団の遺伝的変異を対象とした。これら 2 種は、本州の中国地方の広い範囲で交雑帯を形成しており、交雑現象による遺伝子流動のパターンや集団における遺伝的変異の維持について解析するのに適していると考えられる。

#### ② 現地調査結果

現地では、平成 11 年度の 4 月から 5 月の開花期に集団から個体ごとに花および葉を採集して、形態計測を行った。計測を行った形態形質は図 1 に示す。これらの形態形質をもとに雑種指数を求め、集団がバイカイカリソウからトキワイカリソウにいたる連続変異のどのあたりに位置するかを求め、②で行った分子遺伝学的解析のデータを対応させた。また、分子遺伝学的解析を行なうために、現地で個体別に葉を採集して持ち帰り、研究室のディープフリーザーに保存した。

### (2) 分子遺伝学的調査

#### ① 調査目的

野生植物では交雑が起きた結果、異なる種間で遺伝子流動が起きていると考えられる例が少なくない。もし、2 種の間で遺伝的な隔離が一切なければ、長い間にはこの 2 種が遺伝的に均一になってしまうことになる。

一方、遺伝的な隔離が非常に強ければ、交雑が起きても、2 種間で遺伝的交流は起こり得ず、雑種個体は一時的には存在しても、長い期間維持されることはない。

もし、遺伝的な隔離がそれほど強くなければ、2 種間で遺伝的交流が起きることにより、新しい遺伝的組成をもった個体が生じ、そのような個体が両親種とは異なった進化的実体として成立しうる場合もあると考えられている (Arnold, 1993)。

メギ科イカリソウ属の 2 種、トキワイカリソウとバイカイカリソウは、これまでの形態的な観察から、中国地方において非常に広い範囲で交雑を起こしていると考えられている (鈴木, 1990)。これら 2 種は、複数の形質で違いがみられ、明らかに異なる種として認識できる。これら 2 種の交雑が起きている範囲を推定することを目的に、集団あたりの遺伝的多様性を推定することを試みた。

これら 2 種は、少なくとも形態的には非常に異なっていることから、遺伝的に



は分化しているものと予想される。したがって、これらが交雑している集団は、両方の種の遺伝的変異を取り込んでいるために、遺伝的変異性が高く、交雑の影響を受けていない集団では遺伝的変異は低いレベルに維持されていると推定される。本調査では、分子遺伝学的手法を用いることによって、集団の遺伝的変異を推定し、交雑の影響が及ぶ範囲を推定することを目的とした。

## ②調査方法

集団ごとの遺伝的変異量を比較するためには、十分な変異が存在するマーカーを用いることが重要である。そこで、本調査では、Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)を用いた。これは、任意の配列を持った 10 塩基程度からなるプライマーを用いて、低いアニーリング温度で PCR を行ない、変異を検出する方法である(Williams *et al.*, 1993)。ひとつのプライマーで、複数の領域が増幅されるのが通常であり、ゲノム全体をサーベイできる。この手法の利点としては、1)プライマーの設計に既知の配列を必要としない、2)プライマーの種類は原理上は無数といえる、3)プライマーを変えることによって非常に多くの変異を検出することができる、4)タンパク多型よりもサンプルの保存状態に影響されない(DNA 多型解析一般の利点)、などがあげられる。

図 2 に示したような集団から、集団あたり 10 個体をサンプリングし、CTAB 法を用いて、トータル DNA を抽出して、Williams *et al.* (1993)の原法にしたがって、RAPD の増幅を試みた。用いたプライマーは、予備実験の結果、変異性に富むことが分かった 5 種類であり、その配列は、OPA2(TGCCGAGCTG)、OPA4(AATCGGGCTG)、OPA9(GGGTAACGCC)、OPA16(AGCCAGCGAA)、OPA17(GACCGCTTGT)である。

得られたバンドパターンについて、それぞれのバンドが独立の遺伝子座によって決定されていると仮定し、バンドがある場合を 1、ない場合を 0 と数値化し、Shannon の  $H$  指数を求めた。この指数は、RAPD の変異量を数値化するのに非常によく使われるものであり、RAPD のような優性遺伝子マーカーにおいても、ヘテロ接合体がマスクされる影響をあまり受けないとされている(Lewontin, 1973)。

## ③調査結果

図 3 に、各集団の Shannon の  $H$  指数を示す。図の中心が交雑帯の中心にあたる。この図から明らかなように、交雑帯の中心では、Shannon の  $H$  指数が高い傾向があり、中心から外れるにしたがって、その値が小さくなっていく。これは、交雑帯の中心では維持されている遺伝的変異量が大きく、そこから離れた典型的集団では、遺伝的変異量が小さくなっていることを示している。

図 4 に形態的形質から求めた雑種指数と Shannon の  $H$  指数との関係を示す。この図をみると、雑種指数が中間的な集団(雑種指数=2~4)では Shannon の  $H$  指数が大きいことがわかる。しかし、雑種指数からみると中間的ではなく、むしろ一方の種の典型的な集団であるにもかかわらず、Shannon の  $H$  指数が大きい集団もみられる。これらの集団は、交雑帯の中心からあまり離れていな

い点が注目される。

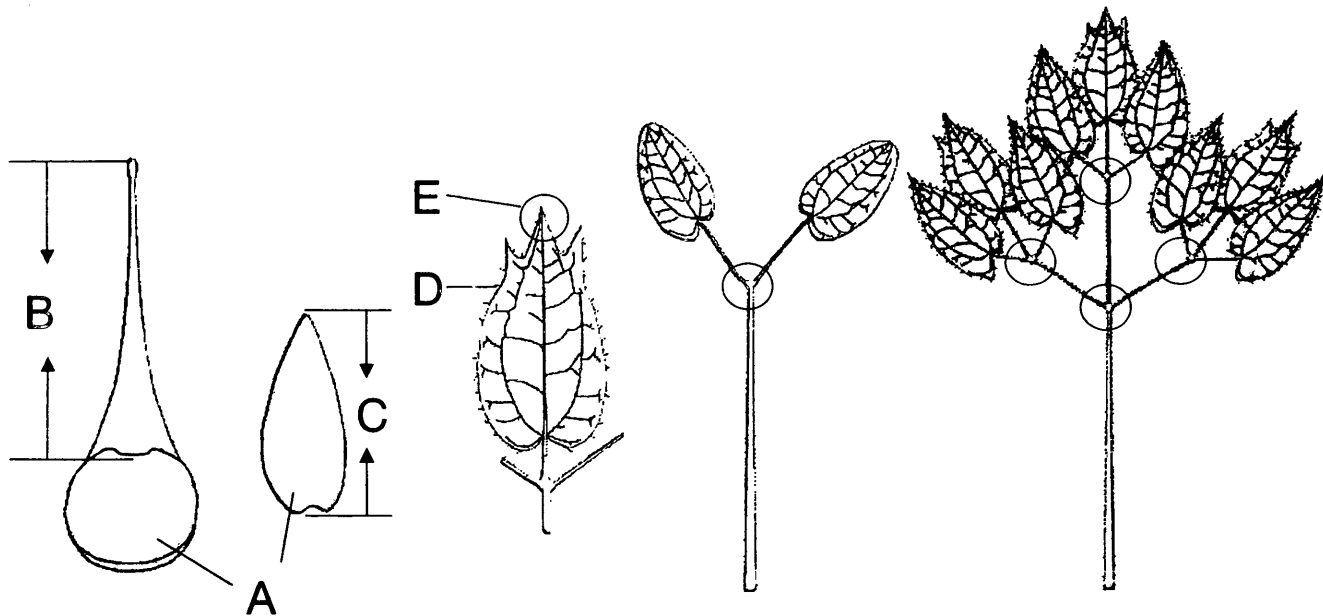
#### ④分析および考察

交雑帯の中心に近いほど、Shannon の  $H$  指数が高いことから、交雑によって集団の遺伝的多様性が高く維持されていることが分かった。交雑現象の進化的意義として、異なる遺伝的組成の 2 種から、新しい遺伝的組成の個体が生じることが指摘されているが、そのような状況が実際に起こりうることを本調査では明らかにしたといえる。一方、交雑帯の中心から離れるにしたがって、遺伝的変異は小さくなることから、交雑による遺伝子の流動はそれほど広い範囲に広がっていないことが推定される。

形態的にはバイカイカリソウもしくはトキワイカリソウの典型的な形を示している集団でも、遺伝的変異が大きい集団がみられた。これらの集団は交雑帯内部に位置しており、これらの集団で遺伝的変異量が大きいのは、交雑による影響を受けているためと考えられる。それにもかかわらず、形態的には一方の種の典型的な状態を示しているのは、形態形質には強い自然選択が働いているために、一方の種に近い形態が維持されているためではないかと考えられる。

#### (3)引用文献

- Arnold, M. L. (1993) *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Lewontin, R. C. (1973) The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology* **6**: 381-398.
- 鈴木和雄(1990)日本のイカリソウ. 187pp. 八坂書房, 東京.
- Williams, J. G. K., Hanafey, M. K., Raflaski, J. A. and Tingey, S. V. (1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology* **218**: 704-740.



■ 花の形態

A:花の色 B:距の長さ C:内萼片の長さ

■ 葉の形態

D:鋸歯数 E:小葉の先端、茎葉の分岐

図1 形態の測定箇所

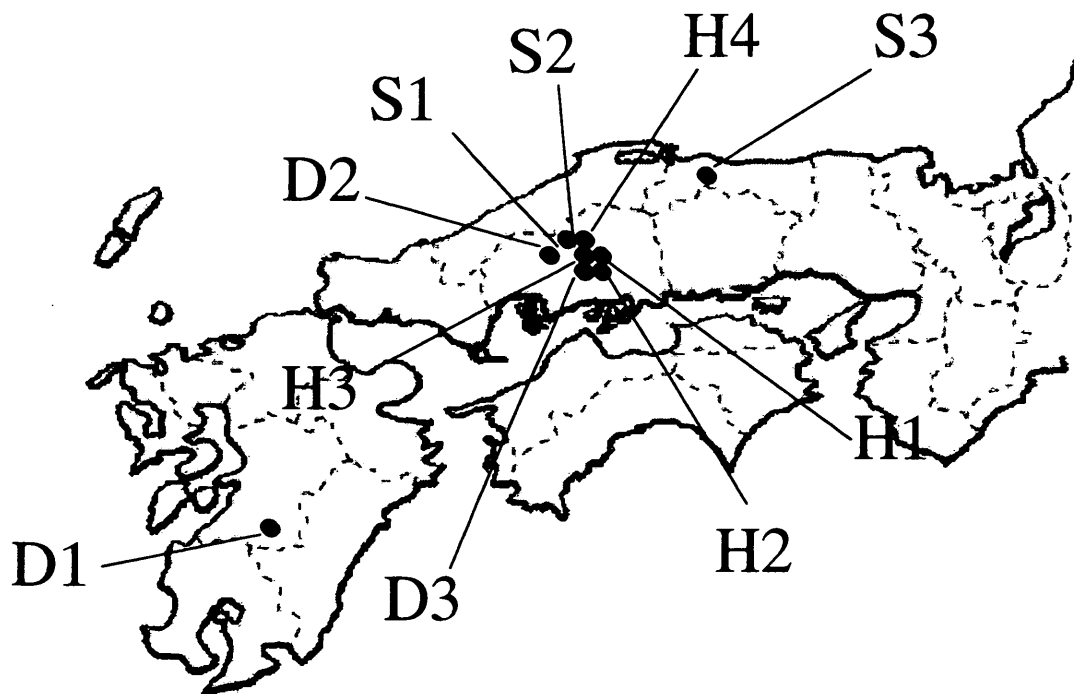


図2 サンプルングした集団(D:バイカタイプ集団、S:トキワタイプ集団、H:交雑集団)

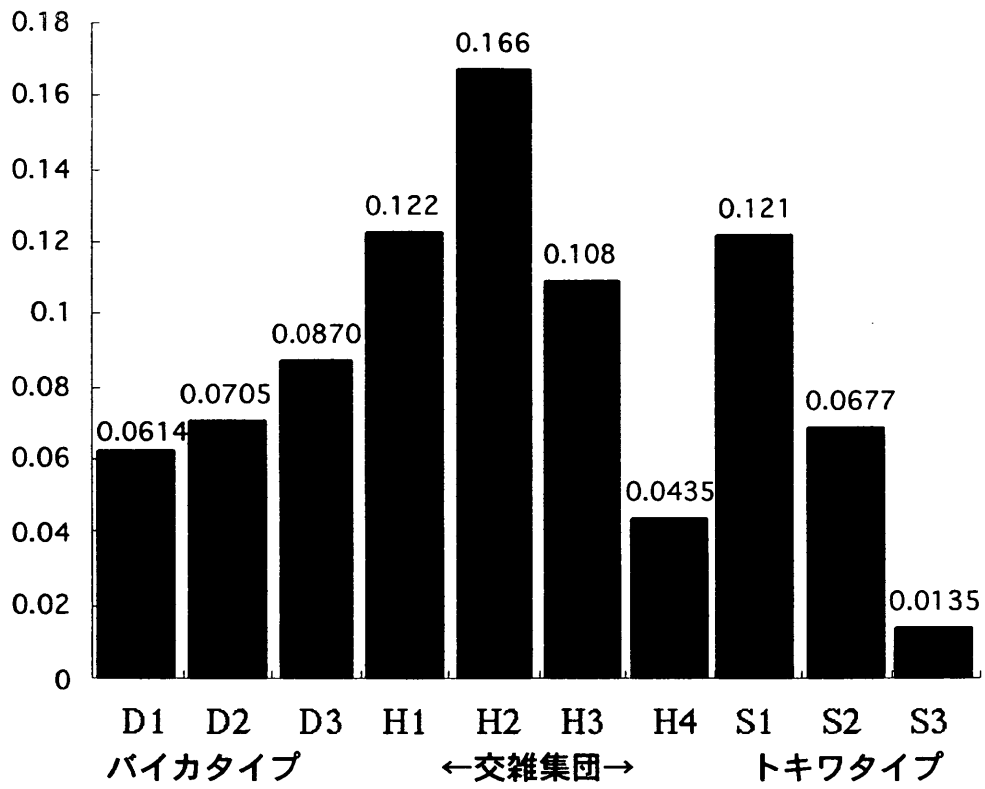


図3 各集団の Shannon の  $H$

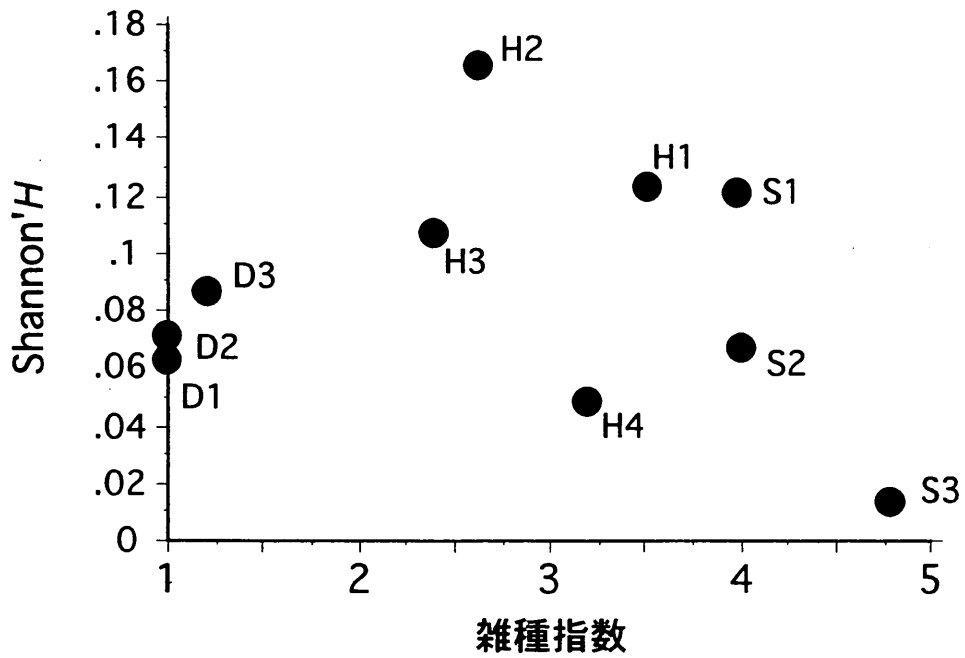


図4 雑種指数と遺伝的多様性の関係

### Ⅲ. 本年度調査の評価

調査対象種は、調査概略で述べたように、レッドデータブック掲載種が多く選ばれた。

ハクバサンショウウオ(絶滅危惧 IB 類)とヤマサンショウウオの遺伝的な類縁性が本調査において示された。これは両種の保全に関して極めて重要な情報であるとともに、今後のレッドデータブック改訂時に考慮されるべき重要な指摘である。

また、ヤツメウナギはサンショウウオとは逆に形態上は1種であるが、その中に、遺伝的に異なる種が存在する隠蔽種の例である。本種では隠蔽種の存在が以前より指摘されていたが、本調査により、さらに確証を得た。遺伝的二型の遺伝的集団構造および起源等を調べることは、極めて重要な研究課題であるが、一方で絶滅危惧Ⅱ類である本種のレッドデータブックのランク検討の資料のためにも、今後さらに調査を急ぐべきと考える。

レッドデータ種の遺伝子レベルの調査は、多くの場合未着手もしくは不十分である。しかし、上記の知見は、レッドデータ種の遺伝子レベルの調査をすることによって、選定の根拠となる知見が見直される可能性があるということでもあり、その意味で、レッドデータ種の選定に際し、その遺伝的実態を明らかにしておくことの必要性を示唆するものである。

また、希少種の保護増殖事業などの具体的な保全施策の実施に遺伝的多様性の知見を取り入れることは、現時点において極めて断片的にしか行われていない。生物多様性の観点から考慮した上で保全施策を決定する場合、遺伝的多様性の知見は必要不可欠のものと認識されているが、現状は極めて不十分である。本調査においては、遺伝子レベルの調査に関する基礎的検討という目的上、具体的な施策に活用するための知見を十分に集積することは難しく、上記の目的のためには体制の整理が必要と思われる。今後の課題として、基礎的情報収集を継続し、情報を質・量ともに充実させるとともに、具体的施策への活用を目的とした調査計画の立案が重要である。

レッドデータ種で遺伝子レベルの調査が急がれるのは当然であるが、保全という観点から、分布が広く、比較的普通に見られる種(普通種)を対象とした遺伝的多様性の調査はそれほど重要視されてきていなかった。しかし、いわゆる普通種であっても、本年度調査のヒメヒミズのように、形態では差がないが、非常に大きい遺伝距離がある集団が見い出されるケースが存在することが明らかになった。つまり、ヒメヒミズの種内の多様性は高いものの、地域集団ごとに遺伝的に独自性が高く、遺伝的多様性の保全のためには、地方・地域別に保全を考える必要が示唆された。このことは、遺伝子レベルの調査を行って初めて明らかになる知見が生物多様性の理解に重要であり、普通種とされている種であっても、遺伝的多様性の調査やその保全は軽視できないことを改めて示唆している。

オガサワラヤモリは従来から移入種だとされ、普通種同様、保全の対象種として優先度は低かった。しかし、遺伝的多様性の調査から明らかになった大東諸島クロウンの多様性の高さは、単に移入種とは考えにくいほどで、自然分布の可能性を示唆するものである。もし、移入種でなく、自然分布したものであるならば、その地理的な特異性や生息密度の低さから、大東諸島のオガサワラヤモリの保全の必要性は検討に値するものであることは明らかである。この調査結果は、従来移入種とされてきた種においても、遺伝的多様性の調査により、そ

の種の履歴が明らかになり、その結果、従来の知見とは異なる保全上の情報が提示される可能性を示している。

上記のヒメヒズやオガサワラヤモリは、従来の調査ではそもそも保全を論議する対象とはならない可能性が高いが、遺伝的多様性の調査をすることにより、保全の必要性が示唆された例である。さらには、今後の調査によって、同様の生物種が見いだされる可能性を示しており、わが国の生物多様性保全上、広く遺伝子レベルの調査を進めることが必要であることを裏付けたといえる。

自然環境保全基礎調査

## 生物多様性調査 遺伝的多様性調査報告書

---

平成 12(2000)年 3 月

環境庁自然保護局 生物多様性センター

〒403-0005 山梨県富士吉田市剣丸尾 5597-1

電話:0555-72-6033 FAX:0555-72-6035

業務名 生物多様性調査 遺伝的多様性調査業務

請負者 財団法人 自然環境研究センター

〒113-0034 東京都文京区湯島 2-29-3

電話 03-3813-8806 FAX 03-3813-8898