

日本産ミミズハゼにおけるミトコンドリアDNAの系統と地理的分化

向井貴彦^{1,2} · 西田 瞳¹

¹〒164-8639 東京都中野区南台1-15-1 東京大学海洋研究所分子海洋科学分野

²現住所 〒501-1193 岐阜市柳戸1-1 岐阜大学地域科学部

(2003年11月20日受付；2004年3月8日改訂；2004年3月29日受理)

キーワード：ミミズハゼ，隠蔽種，地理的変異，琉球列島

魚類学雑誌
Japanese Journal of Ichthyology

© The Ichthyological Society of Japan 2004

Takahiko Mukai* and Mutsumi Nishida. 2004. Intraspecific mitochondrial DNA phylogeny of a Japanese brackish water goby, *Luciogobius guttatus*. Japan. J. Ichthyol., 51(2): 157–161.

Abstract The intraspecific mitochondrial DNA (mtDNA) phylogeny of a Japanese brackish water goby, Mimizu-haze (*Luciogobius guttatus*) (Perciformes: Gobiidae), was inferred from partial nucleotide sequences of the mitochondrial 12S and 16S rRNA genes (1,053 bp). The resultant mtDNA tree showed two major intraspecific lineages, and suggested that there were two cryptic species in the goby. One of the major lineage also showed two haplotype groups, one being distributed on the northeastern Japan and another on southwestern Japan and Ryukyu Islands. The mtDNA divergence between the two haplotype groups suggested that those mtDNA groups have been isolated for about one million years.

*Corresponding author: Faculty of Regional Studies, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan (e-mail: tmukai@cc.gifu-u.ac.jp)

本列島に分布する汽水性（もしくは通し回遊性）魚類の中には、九州以北と琉球列島の間で地理的に隔離された近似種が分布するものが存在する。両地域間で隔離されたものとして、アユ *Plecoglossus altivelis altivelis* とリュウキュウアユ *P. a. rykyensis*, トウゴロウイワシ *Hypoatherina valenciennei* とオキナワトウゴロウ *H. woodwardi*, クロダイ *Acanthopagrus schlegelii* とミナミクロダイ *A. sivicolus*, アシシロハゼ *Acanthogobius lactipes* とミナミアシシロハゼ *A. insularis*, アベハゼ *Mugilogobius abei* とイズミハゼ *M. sp. 1*, オオヨシノボリ *Rhinogobius* sp. LD とヒラヨシノボリ *R. sp. DL*, ヌマチチブ *Tridentiger brevispinis* とナガノボリ *T. kuroiwae* などが知られており（明仁ほか, 2000; Sakai et al., 2001），さらに、同種とされるものでも、汽水性の小型魚類であるゴマハゼ *Pan-*

daka lidwilli やヒモハゼ *Eutaeniichthys gilli* の日本列島（九州以北）産個体群と琉球列島産個体群は遺伝的に大きく分化していることが知られている（Mukai et al., 2003, Mukai et al., 2004）。したがって、生物地理学的には日本列島と琉球列島の間で汽水性魚類相の分断が示唆され、他の魚種の場合も両地域にまたがって分布する種においては、琉球列島の個体群が日本列島の個体群から隔離されて、遺伝的に分化した固有の地域集団を形成している可能性が存在する。

このような遺伝的分化の可能性がある魚種の一つとして、汽水性の小型ハゼ類であるミミズハゼ *Luciogobius guttatus* が挙げられる。ミミズハゼは、茶褐色の細長い体型をしたハゼ科魚類であり、日本・中国・朝鮮半島・沿海州の汽水域に分布する（明仁ほか, 2000）。日本国内では北海道から琉球

列島まで分布するが、その地理的変異に関する知見はほとんど得られていない。そこで、本研究では日本列島から琉球列島までの15地点より採集したミミズハゼのミトコンドリアDNAの12Sおよび16S rRNA遺伝子の部分塩基配列を決定し、地域集團間の遺伝的分化について解析したのでここに報告する。

材料と方法

DNA 解析用の供試魚は、北海道函館市流溪川産（国立科学博物館登録標本 NSMT-P67462, $n=2$ ）、山形県温海町鼠ヶ関川産（NSMT-P67425, $n=1$ ）、新潟県村上市三面川産（NSMT-P67426, $n=1$ ）、岩手県釜石市地先産（ $n=1$ ）、神奈川県三浦市油壺産（NSMT-P67421, $n=1$ ）、静岡県静岡市波多打川産（ $n=1$ ）、和歌山県白浜町朝来帰川産（NSMT-P67428, $n=2$ ）、和歌山県印南町切目川産（NSMT-P67427, $n=1$ ）、和歌山県白浜町地先産（NSMT-P67423, $n=1$ ）、愛媛県松山市重信川産（NSMT-P67429, $n=1$ ）、長崎県瑞穂町地先産（NSMT-P67424, $n=1$ ）、鹿児島県佐多町間泊地先産（NSMT-P67430, $n=1$ ）、沖縄県東村慶佐次川（沖縄島）産（ $n=1$ ）、沖縄県本部町満名川（沖縄島）産（NSMT-P67431, $n=1$ ）、沖縄県西表島産（ $n=2$ ）の合計18個体を用いた。鹿児島県間泊産の個体は、Mukai et al. (2003)において塩基配列を公表済みである（DDBJアクセションナンバー AB108559 および AB108569）。操作上の外群および種間の遺伝的分化程度の比較として、オオミミズハゼ *L. grandis*（静岡県伊東市伊豆海洋公園産、NSMT-P67420, $n=1$ ）、ナガミミズハゼ *L. elongatus*（岩手県釜石市地先産, $n=1$ ）、イドミミズハゼ *L. pallidus*（和歌山県産、NSMT-P65157, $n=2$ ）、セジロハゼ *Clariger cosmurus*（神奈川県三浦市諸磯産, $n=1$ ）の塩基配列を決定した。ミミズハゼを含むこれら全ての種の同定は明仁ほか (2000) に従った。また、それらに加えて千葉県産ヒモハゼの塩基配列（DDBJアクセションナンバー AB108560 および AB108570）(Mukai et al., 2003) を用いた。

DNA の抽出は、氷上で低温麻酔した供試魚から切り出した体側筋を99%エタノールで保存した後、キアゲン社の DNeasy Tissue Kit を用いて行った。12S と 16S rRNA 遺伝子の部分領域それぞれ約 710 塩基対と 570 塩基対の増幅および塩基配列の決定は向井・西田 (2003) と同じ方法を用いた。得られた塩基配列は DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) に登録した（アクセションナンバー AB121978-AB122001）。

塩基配列の多重アライメントには CLUSTAL X (Thompson et al., 1997) を用いた。塩基置換率 (p-distance) とトランジション／トランスバージョン (Ti/Tv) 比の推定は PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002) によって行った。遺伝距離は PHYLIPver. 3.6 プログラムパッケージ (Felsenstein, 2002) を用いて木村の2変数モデル (Kimura, 1980) によって計算し、それに基づいて近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) による系統樹の推定を行った。最節約樹の探索は PAUP* 4.0b10 の Branch-and-bound search によって行った。系統樹の各枝における信頼性は、疑似データセットを1,000回作ることによるブーツストラップ確率として計算した。

結果と考察

本研究で得られたミミズハゼの 12S と 16S rRNA 遺伝子のギャップ挿入前の相同領域は、12S rRNA が 566–567 塩基対、16S rRNA が 480–482 塩基対であった。また、他の5種については、12S rRNA が 563–566 塩基対、16S rRNA が 481–483 塩基対であった。これらの塩基配列について多重アライメントを行った結果、567 塩基対と 486 塩基対の配列（合計 1,053 塩基対）として明瞭に整列することができた。ヒモハゼの塩基配列はセジロハゼおよびミミズハゼ属とは大きく異なっており（塩基置換率 9.2–9.8%），セジロハゼの塩基置換率はミミズハゼ属に対して 5.8–8.1% であった。ミミズハゼ属4種間の塩基置換率は 3.9–5.3% であった。また、ミミズハゼの種内で見つかった11種類のハプロタイプには大きく分化した2系統が見出され (mtDNA の I 群および II 群、後述)，それらの間の塩基置換率は 3.1–3.5%，それぞれの系統群内での塩基置換率は 0–1.1% であった (Table 1)。

系統樹の推定にあたり、各ハプロタイプ間の Ti/Tv 比は 1.4–8.0 (12S は 1.1–7.5, 16S は 1.6–9.5) だったが、Ti/Tv 比が 2 と 10 のどちらで計算した場合でも同じ樹形が得られた (Fig. 1)。さらに、最節約的に得られた1本の最節約樹形（樹長 = 263, CI = 0.78, HI = 0.22, RI = 0.76）は近隣結合樹とほぼ一致したが、ミミズハゼの種内系統については、一つのハプロタイプ群 (IIB 群、後述) 内に2カ所の多分岐を含んでいた。種間の系統関係については、近隣結合法ではナガミミズハゼとイドミミズハゼが姉妹群であるのに対し、最節約法では、オオミミズハゼの次にイドミミズハゼが分岐し、ナガミミズハゼとミミズハゼが姉妹群となる樹形が

得られた。ただし、近隣結合法でナガミミズハゼとイドミミズハゼのグルーピングを再現するブーツストラップ確率は54%，最節約法でナガミミズハゼとミミズハゼが単系統となる確率は57%と、どちらも低い値であり、これらの分歧順序について明確な結果は得られなかった。

これらの解析で得られた樹形では、いずれもミミズハゼに大きく分化したミトコンドリアDNA(mtDNA)の2系統が存在することが示された(Fig. 1)。ここでは、それらをmtDNAのI群およびII群と呼ぶことにする。I群のmtDNAを持つミミズハゼは主として沿岸の潮間帯(静岡県の波多打川のみ河川の淡水域)で採集されており、II群のmtDNAを持つミミズハゼは河川の下流域から河口干潟でのみ採集されている。また、両系統群の分布域は地理的に大きく重複しており(Fig. 2)，遺伝的分化の程度は他のミミズハゼ属の種間の値に近いことから、これら2群が生態的に異なる別種である可能性が考えられる。外見的には、I群である神奈川県三浦市産の標本の体色は著しく黒く、尾鰭外縁が透明な特有の色彩をしていたが、他は両群共に同じ茶褐色であり、色斑による区別はできなかった。

また、II群のmtDNAは、北海道・山形・新潟・和歌山で得られたハプロタイプと、和歌山県以南で得られたハプロタイプ群との間で、やや分化しており(塩基置換率0.8–1.1%)、東北日本と西南日本という系統地理的な2群(IIA群とIIB群)(Fig. 1, 2)に分かれている可能性が示された。ただし、和歌山県の朝来帰川では、同じ石の下から得られた2個体が、それぞれのハプロタイプを保有しており、現在の時点において、両系統群が地理的に隔離されているわけではない。

また、ヒモハゼやゴマハゼのような汽水性の小型ハゼ類においては、本研究と同じ遺伝子領域の分析に基づいて日本列島と琉球列島間での遺伝的分化が示されている。その分歧年代を塩基置換率から推定した結果、ヒモハゼとゴマハゼの日本列島–琉球列島間での分歧年代はおよそ500万年前と推定されている(Mukai et al., 2003; Mukai et al., 2004)。同じ分子進化速度(100万年あたり0.6%の塩基置換率)をミミズハゼのmtDNAに適用すると、I群とII群の分歧がおよそ500万年前、IIA群とIIB群の分歧がおよそ100万年前という値になる。ミミズハゼのmtDNAのI群とII群の分布は日本列島で広く重複しており、どのような地域で地理的に隔離されて分化したものなのか判断することは困難である。ミミズハゼのmtDNAのIIA群とIIB群については、それぞれの分布が東北日本と西南日本に偏るために、それら2群が琉球列島と日本列島の間で分断されて生じた後、IIB群が黒潮によって分布を広げたという可能性はある。しかし、もしIIA群とIIB群が琉球列島と日本列島の間で分断されて生じたものだとしても、その時代はヒモハゼやゴマハゼの地域集団が分化した時代とは異なると考えられる。また、東北日本に分布するIIA群のmtDNAに変異が見られなかったことから、IIA群のmtDNAは本来西南日本に広く分布していたミミズハゼ(IIB群)の一部が、日本海側などの一部地域に小集団として隔離されて生じた系統である可能性もある。したがって、今後は、詳細な系統地理的解析や、隠蔽種を区別した上で形態形質の比較観察を行う必要がある。

Table 1. Pairwise sequence differences (%: *p*-distance) of partial 12S and 16S rRNA genes among species and haplotype groups of gobies

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>E. gilli</i>	—							
2 <i>C. cosmurus</i>	9.8	—						
3 <i>L. grandis</i>	9.5	5.8	—					
4 <i>L. elongatus</i>	9.8	7.5	4.9	—				
5 <i>L. pallidus</i>	9.7–9.8	7.7–7.8	4.7–4.8	4.1–4.2	0.1			
6 <i>L. guttatus</i> (I)*	9.3–9.4	6.9–7.0	5.0–5.1	4.6–4.7	5.0–5.2	0.1		
7 <i>L. guttatus</i> (IIA)	9.4	7.6	4.5	4.2	3.9–4.0	3.2–3.3	—	
8 <i>L. guttatus</i> (IIB)	9.2–9.5	7.6–8.1	4.7–5.2	4.2–4.6	3.9–4.3	3.1–3.4	0.8–1.1	0.1–0.8

* I, II A and II B are three phylogenetic groups of mtDNA in *L. guttatus* (see Fig. 1).

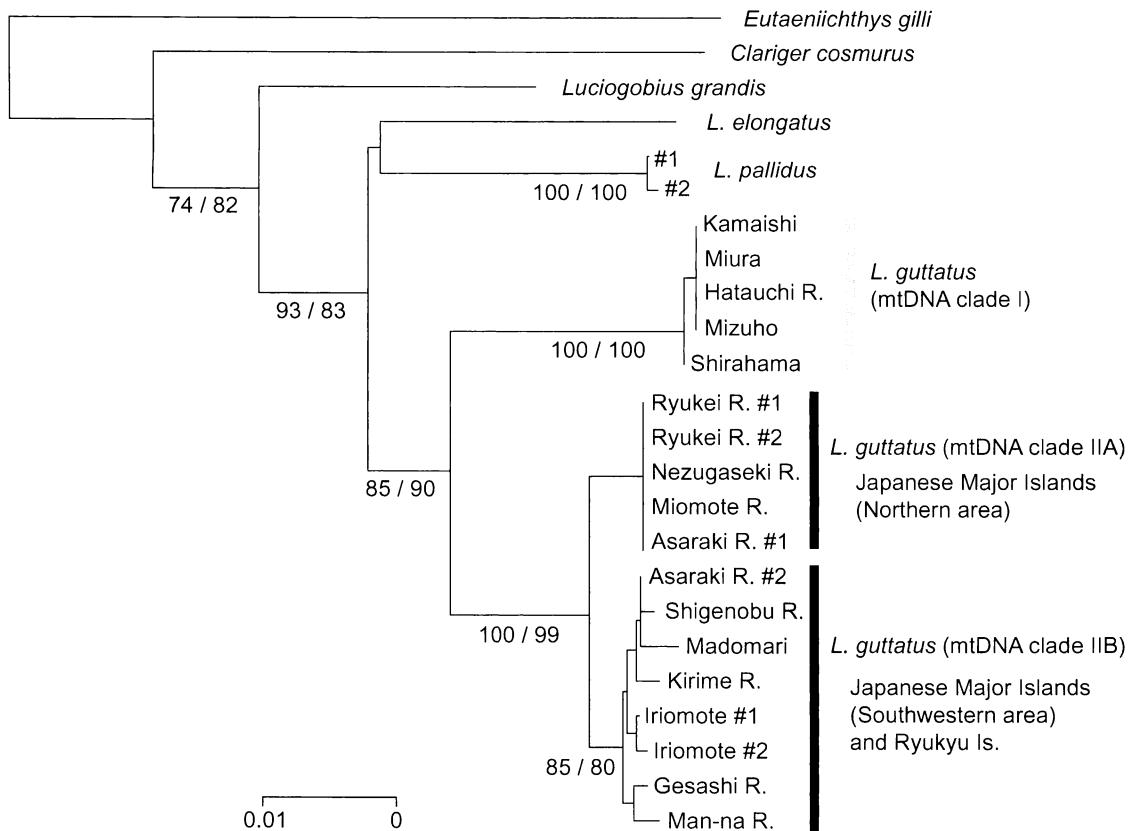


Fig. 1. Neighboring-joining tree based on genetic distances estimated from the partial mitochondrial 12S and 16S rRNA gene sequences (total 1,053 bp) of *Luciogobius* gobies and two outgroup taxa. Distances estimated based on Kimura's two parameter model ($T_i/T_v=2.0$). Numbers beside internal branches indicate bootstrap probabilities ($>80\%$) of NJ (above) and MP (below) trees based on 1,000 pseudoreplicates.

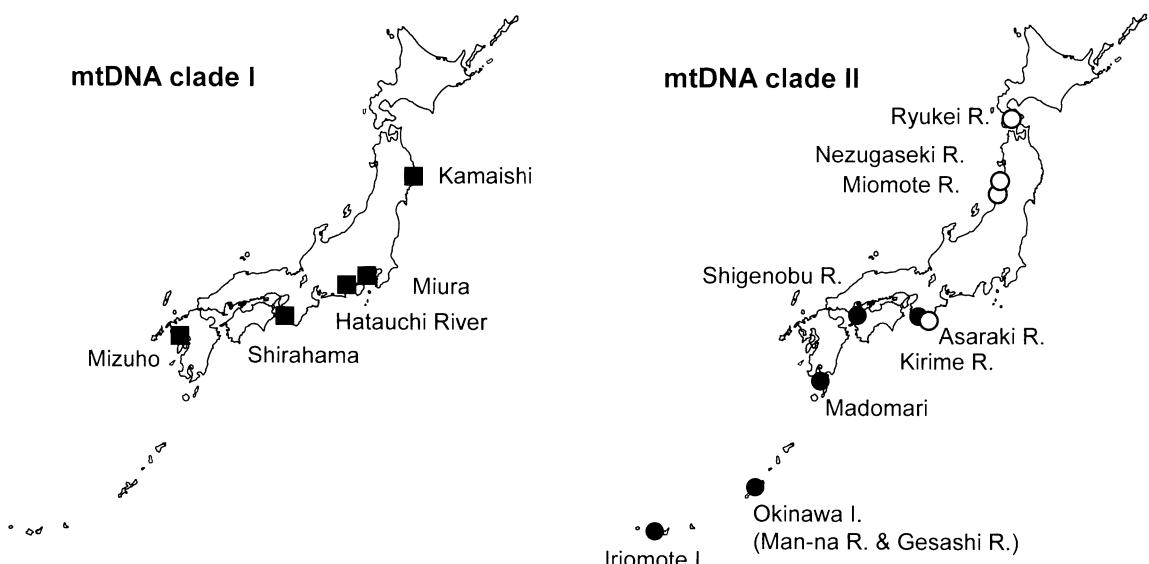


Fig. 2. Distribution of the mtDNA haplotypes of clade I (closed square) and II (IIA: open circle, IIB: closed circle).

謝 辞

本研究を行うにあたり、標本の採集と提供にご助力いただいた横須賀市自然人文博物館の萩原清司氏、兵庫県立尼崎北高等学校の鈴木寿之氏、和歌山県立自然博物館の平嶋健太郎氏、奈良県在住の篠崎敏彦氏、東京大学海洋研究所の東陽一郎氏、栗岩薰氏、神前悠治氏、武島弘彦氏、仲村将藏氏、琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底実験所および西表実験所の皆様、標本の登録にさまざまな便宜を図ってくださった国立科学博物館の篠原現人博士に厚く御礼申し上げる。

引 用 文 献

- 明仁・坂本勝一・池田祐二・岩田明久. 2000. ハゼ亜目. 中坊徹次(編), pp. 1139–1310, 1606–1628. 日本産魚類検索: 全種の同定. 第2版. 東海大学出版会, 東京.
- Felsenstein, J. 2002. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) ver. 3.6. University of Washington, Seattle.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 111–120.
- 向井貴彦・西田陸. 2003. 日本産ドンコにおけるミトコンドリアDNAの系統と関東地方への人為移植の分子的証拠. *魚類学雑誌*, 50: 71–76.
- Mukai, T., T. Suzuki and M. Nishida. 2003. Genetic differentiation of the brackish water goby, *Eutaeniichthys gilli* (Perciformes, Gobiidae), between the Japanese and the Ryukyu Archipelagos. *Biogeography*, 5: 49–53.
- Mukai, T., T. Suzuki and M. Nishida. Genetic and geographical differentiation of *Pandaka gobies* in Japan. *Ichthyol. Res.*, 51: 222–227.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406–425.
- Sakai, H., M. Sato and M. Nakamura. 2001. Annotated checklist of the fishes collected from the rivers in the Ryukyu Archipelago. *Bull. Nat. Sci. Mus., Tokyo, Ser. A*, 27: 81–139.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (beta test version). Smithsonian Institute, Washington.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876–4882.