

学位論文題名

Phylogeography of the stonefly *Kamimuria tibialis*
(Plecoptera: Perlidae): distributional changes and
speciation in relation to the Quaternary environment
in the Japanese Archipelago

(カミムラカワゲラの系統地理学的研究：

日本列島の第四紀環境に関連した本種の分布の変遷と種分化)

学位論文内容の要旨

近年のDNA技術の発展に伴って、DNA情報を用いて、生物の分布の変遷過程を推定する系統地理学が急速に進展をとげた。第四紀氷期のヨーロッパや北米では、広い範囲が氷床で覆われたため、生物は限られた温暖な地域に隔離され(レフュージア; 避難場所)、間氷期に再び分布を拡張したことがDNA情報からも裏付けられている。氷期の間、複数のレフュージアに集団が分断されたために、急速な種分化が生じた例も報告されている。第四紀の氷期-間氷期のサイクルの過程で、生物の分布には大きな変動が生じた。系統地理学では、こうした分布の大変動が生物多様性にどのような影響を与えたかに注目した研究が盛んになりつつある。

日本列島は生物種数・固有種が非常に多く、生物多様性の高さは世界でも際立っている。しかし、その生物相の成立過程についてはほとんど明らかになっていない。日本列島は南北に長く地形も複雑で多くの気候帯を持つ。第四紀の氷期にも、日本のほとんどの地域は氷河に覆われることがなかった。このため、日本では温暖な第三紀由来の多くの種が第四紀の氷期を生き残ったと考えられる。さらに、氷期-間氷期のくり返しに伴う諸島(九州、本州、四国、北海道)の融合と分離が集団の分布拡散と分断を引き起こした可能性がある。

花粉化石記録から、氷期のあいだに、常緑広葉樹林帯は温暖な九州・四国・紀伊半島の太平洋沿岸に分布を縮小していたことが示唆されている。しかし動物種では、日本列島全体にわたる精密な化石記録が残ることはきわめて稀であるため、第四紀にどのような分布の変動があったかについて明確な結果は得られてこなかった。さらに、氷期-間氷期サイクルが日本の生物多様性の確立にどのような影響を与えたのか、種分化の原動力になり得たのかに関しては、ほとんど情報が得られていない。

本研究は、日本固有種であり国内の河川に広く分布するカミムラカワゲラ(*Kamimuria tibialis*)を材料にして、以下の項目について明らかにすることを目的とした。1) 生態調査により、本種の分布を左右する環境要因を解明する、2) DNA塩基配列情報を用いて、国内の地域集団の系統関係と遺伝構造を解明し、氷期に分布の変動はあったのか、日本に複数のレフュージアが形成されたのか、島間の移出入はあったのかを明らかにする、3) 種内系統樹と照らし合わせて、地域集団間の形態的・行動的分化と生殖隔離の有無を調べ、氷期の分布の細分化が本種の種分化を引き起こす具体的なメカニズムを解明する。これらの結果を合わせて、第四紀の気候変動が日本の生物多様性確立に寄与した可能

性について検討を行った。

生態調査の結果、本種は広食性であり、餌生物の有無によって分布域が強く制限される可能性は低いことが明らかになった。一方で、冬期には成長を停止しており、羽化にはある程度以上の年間積算水温が必要であることが示唆された。これにより、本種の分布は気温に左右されやすく、氷期-間氷期の気候変動に影響を受けたことが推察された。

ミトコンドリアDNA塩基配列型（ハプロタイプ）の系統解析から、3つの主要なクレード（対馬、九州、本州+四国+北海道）が見いだされた。分子時計に基づくと、対馬系統は最も古い時期(94-116万年前)に他の系統と分岐し、次に65-75万年前に九州系統が本州+四国+北海道系統と分岐したと推測された。中期更新世の氷期-間氷期サイクルは約10万年周期であるので、この結果は、これらの主要な系統が異なる地域で複数回の氷期を過ごしてきたこと、つまり氷期に複数のレフュージアが存在していたことを示している。

本州+四国+北海道系統では、北海道のハプロタイプが単系統を形成し、本州と四国に分布するハプロタイプから分岐した時期は27万年前と推測された。一方、北海道内での分散が起こったのは約9万年前と推定された。これらの結果から、北海道の集団は約27万年前に本州から北海道に移入したのち、2-3回の氷期を北海道内の狭い地域で生き残り、氷期以後に北海道内に広く分散したものであることが示唆された。本州と四国ではハプロタイプの分布に地理的な傾向は見いだせず、島間での移出入が盛んに起こったことを示している。一方、九州では、約54万年前に分岐した2つの系統が各地域で混在していることが明らかになった。この結果は、異なるレフュージアで分化した2集団が2次的に接触し、融合した可能性を示唆している。さらにDNA塩基配列情報を用いた地域集団構造解析の結果、九州以外の地域では近年に集団が大幅に拡大した傾向があったことから、氷期には複数の狭いレフュージアに分布が縮小し、氷期以後にこれらのレフュージアから集団が拡散したことが示唆された。さらに地域ごとに細かく解析をした結果、黒潮の影響で氷期に温暖であった九州全域と、本州南西部太平洋側では、集団が比較的安定的に維持されていた傾向が見られた。一方、対馬、中国地方、東北、北海道の集団では、近年に集団サイズが急速に拡大したことが示された。こうした結果から、本種のレフュージアは日本南西部の太平洋側につくられたと推察された。

第四紀の集団の細分化が種分化を促進した可能性に対しては、これまで活発な議論が成されてきた。否定的な意見として、数十万年の隔離期間は集団間の生殖隔離が成立するほどの変異が蓄積するには不十分であり、間氷期に集団が分布を広げて融合することで、集団間の分化は打ち消されてしまうだろうとの見方がある。しかし交配に関わる形質は、性選択の作用により急速に進化し得ることが知られている。そこで主要な地域集団間での形態形質と行動形質の比較を行い、性選択が作用する形質であるかどうか注目した。行動形質としては、オスが配偶者探索に用いる種特異的な音（ドラミング）を定量化した。メスは同種のオスのドラミングパターンにのみ返答し、メスの返答によってオスはメスを見つけて交尾を行うことができる。このため、オスのドラミングパターンにはメスの強い選択が作用していると考えられる。形態と行動観察の結果、オスのドラミングパターンは集団間で大きく分化していた。一方、翅脈の分岐パターンなどの、選択に対して中立と思われる形質には、集団間の明瞭な分化は見いだされなかった。これらの結果は、性選択の作用によって、交配にかかわる形質が集団間で急速に分化したことを示している。

さらに対馬集団と九州集団間の交配実験では、メスは他集団のオスのドラミングにはほとんど返答をせず、オスのドラミングパターンの分化が集団間の交配前隔離を引き起こすことが示された。本種の地域集団はドラミングパターンが大きく分化していたことから、これらの集団間ではある程度の交配前隔離が成立していると予測され、種分化の初期段階にあると判断できる。

これら一連の研究結果から、カミムラカワゲラでは、第四紀の中期更新世に日本列島内に複数の

レフュージが形成されて分布域が分断された際に、交配に関わる形質に性選択の力が加わることで、急速に集団間の交配前隔離が確立したことが示唆された。この結果から、本種において、第四紀の気候変動が地域集団間の遺伝的分化および種分化を引き起こす原動力として大きく寄与していたと結論できる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 元 信 一
副 査 教 授 齋 藤 裕
副 査 准教授 長谷川 英 祐
副 査 助 教 吉 澤 和 徳

学 位 論 文 題 名

Phylogeography of the stonefly *Kamimuria tibialis* (Plecoptera: Perlidae): distributional changes and speciation in relation to the Quaternary environment in the Japanese Archipelago

(カミムラカワゲラの系統地理学的研究：

日本列島の第四紀環境に関連した本種の分布の変遷と種分化)

本論文は、図30、表4、引用文献86編からなる総頁82頁の英文論文である。参考論文2編が添えられている。

近年、DNA情報を用いて種の分布の変遷過程を推定する系統地理学が進展をとげている。第四紀の氷河期には、ヨーロッパや北米では、生物種は限られた温暖な地域（レフュージア；避難場所）に分布を縮小し、間氷期に再び分布を拡張したことがDNA情報から裏付けられてきた。さらに、氷期に複数のレフュージアに種の分布が分断されることで、隔離された集団間に分化が生じ、種分化が急速に進んだ例も報告されている。現在、こうした種の分布の大変動が生物多様性に与えた影響について、注目が集まりつつある。

日本列島は生物の多様性に富み、固有種が非常に多いが、その生物多様性の成立過程はほとんど明らかになっていない。日本固有の生物種について、第四紀の分布変動の過程を詳細に調べた例はこれまでなかった。さらに、第四紀の分布域の分断が種分化の原動力になり得たかに関する検証例は、世界的に見てもほとんどない。氷期の日本列島に関して重要なのは、日本列島に複数のレフュージアが形成されたか否かという点である。複数のレフュージアが形成された場合には、遺伝的分化が進行する可能性があるが、単一のレフュージアが形成された場合には、分布域の減少にともなって地理的変異が消失し、遺伝的多様性が減少すると予想される。

こうした状況のもとで、本論文は日本固有種であり国内に広く分布するカミムラカワゲラ (*Kamimuria tibialis*) を材料にして、以下の点を検討した。1) DNA情報を用いて国内の地域集団の系統関係と遺伝構造を解明し、氷期にどのように分布が変動したのか、日本に複数のレフュージアが形成されたか否かを解明した。2) 種内系統間の形態的・行動的分化と生殖隔離の有無を調べ、分布域の分断が本種の種分化を引き起こす具体的なメカニズムを推測した。これらの結

果を合わせて、第四紀の気候変動が日本の生物多様性成立に寄与した可能性について検討を行った。

ミトコンドリアDNA塩基配列型（ハプロタイプ）の系統解析から、3つの主要な系統群（対馬、九州、本州+四国+北海道）が見いだされた。分子時計に基づくと、対馬系統は最も古い時期(94-116万年前)に他の系統と分岐し、次に65-75万年前に九州系統が本州+四国+北海道系統と分岐したと推測された。中期更新世の氷期-間氷期サイクルは約10万年周期であるので、この結果は、これらの主要な系統群が分岐以降、接触・融合することなく、異なる地域で複数回の氷期を過ごしてきたことを示している。すなわち、氷期に複数のレフュージアが存在していたことが示された。さらにDNA塩基配列情報を用いた集団解析の結果、九州以外の地域では、氷期以後、それぞれのレフュージアからの分布の拡散が生じたことが示唆された。地域ごとに細かく解析をした結果、本種のレフュージアは主に、黒潮の影響で氷期に温暖であった九州全域と、本州南西部太平洋側、および対馬に形成されたことが明らかになった。

次に、氷期の集団の細分化が種分化を促進した可能性を検証するために、主要な地域集団間で形態形質と行動形質の比較、および交配実験を行った。行動形質として、オスが配偶者探索に用いる種特異的な音（ドラミング）のパターンを定量化した。形態と行動観察の結果、メスの強い選択が作用していると考えられるオスのドラミングパターンは、集団間で大きく分化していた。一方、強い選択が作用していないと考えられる形質には、集団間の明瞭な分化は見いだされなかった。これらの結果は、交配にかかわる形質が、性選択の作用により集団間で急速に分化したことを示している。さらに対馬集団と九州集団間の交配実験では、メスは他集団のオスのドラミングにはほとんど反応しなかったことから、オスのドラミングパターンの分化が集団間の強い交配前隔離を引き起こすことが示された。本種の多くの地域集団間でドラミングパターンは大きく分化しており、これらの集団は種分化の初期段階にあると考えられた。

以上の一連の研究結果から、カミムラカワゲラでは、第四紀の中期更新世に日本列島内に複数のレフュージアが形成されることで遺伝分化が促進されたこと、交配に関わる形質に性選択が作用することで、急速に集団間の交配前隔離が確立しうることが示された。この結果は第四紀の分布変動が、地域集団間の遺伝的分化および種分化を引き起こす原動力となった可能性を支持するものである。このような包括的な研究は、日本はもとより世界的にも希少であり、本研究の成果は、日本列島固有の生物の分布変遷と種分化に関して、今後の研究のモデルケースになると考えられる。よって、審査員一同は、大槻章子が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。