Aquatic Animals

水生動物 第 2023 巻
令和 5 年 10 月

コイ科カマツカ類の系統と分岐年代

Phylogenetic relationships and divergence time of gudgeon fishes (Gobioninae, Cypriniformes)

宮川　悟[1]・郡司吉秀[2]・小池里奈[3]・宮崎淳一[3]*
Satoru Miyagawa[1], Yoshihide Gunji[2], Rina Koike[3], Jun–Ichi Miyazaki[3]*

[1] 山梨大学生命環境学部，〒400–8510 山梨県甲府市武田 4 丁目 4–3–7
[2] 筑波大学生物科学系，〒305–0006 茨城県つくば市天王台 1–1–1
[3]山梨大学教育学部，〒400–8510 山梨県甲府市武田4丁目4–3–7
[1]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Yamanashi, Kofu, Yamanashi 400-8510, Japan.
[2]Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan. [3]Faculty of Education, University of Yamanashi, Kofu, Yamanashi 400-8510, Japan.

*Corresponding author, e-mail: miyazaki@yamanashi.ac.jp, Tel +81-55-220-8149.

Abstract

Phylogenetic analyses of primary freshwater fishes can elucidate their evolution and adaptive radiation as well as paleogeography from a biological viewpoint. In this study, we investigated phylogenetic relationships of all the Japanese gudgeon species including recently described species and intraspecific lineages by analyzing mitochondrial cytochrome *b* (Cyt*b*) and cytochrome *c* oxidase I (COI) and nuclear recombination activating gene 1 exon 3 (RAG1). Gudgeons were divided into five groups; Group 1 including *Hemibarbus* and *Squalidus*, Group 2 including *Pseudogobio, Biwia*, and *Abbottina*, Group 3 including *Gnathopogon*, Group 4 including *Sarcocheilichthys*, and Group 5 including *Pseudorasbora* and *Pungtungia*. We also showed that the large Cyt*b* sequence difference of *Gnathopogon elongatus* between Tang et al. (2011) and previous our study was ascribed to lineage divergence of this species. We presented divergence time of gudgeons. Gobioninae originated about 30 million years ago, supporting the estimate of Liu et al. (2010). We discussed relationships between the divergence time and paleogeography.

Key words: mitochondrial DNA, nuclear DNA, divergence time, biogeography, *Gnathopogon*, Gobioninae

緒言

コイ科魚類の多くは淡水中で生涯を過ごす純淡水魚である。そのため、コイ科魚類の種分化は主に水系の分断によって起こり、分散は連続する水系を介して行われる。河川などの水系の形状は土地の隆起・沈降や海水面の上昇・下降などの地理的要因によって変化するため、淡水魚が進化してきた道筋を解析することでその種分化や適応放散の過程のみならず、生物から観た古地理を解明することができる。特に日本の淡水魚は、ユーラシア大陸との接続と分離を繰り返した結果、大陸の淡水魚相と密接な関係を示している。例えば、ズナガニゴイ *Hemibarbus longirostris* は、大陸から陸橋などに伴う水系を介して日本に分布を拡大したことが示唆された（Taniguchi et al. 2021）。また、日本列島では、活発な地殻変動に起因して山地・山脈などによって複雑な地形が形成されているため、日本の淡水魚相は地理的に不均質である（Tominaga et al. 2016）。それゆえ純淡水魚の研究は、特に生物学的観点からの日本の古地理を研究する上で有用であると考えられる。

コイ科魚類の分類学的研究は、1817 年に Cuvier によってコイ科（Cyprinidae）が提唱されてから、多くの研究者によって様々な分野で行われてきた（例えば Kryzhanovsky 1947; Nikolskii 1954; Wu 1964 など）。 Nelson（1994）はいくつかの研究をまとめてコイ科を 8 亜科に分類した。斉藤（2014）は、 mtDNA の完全長塩基配列を用いて系統解析を行い、コイ科を 10 亜科に分類した。しかし、コイ科の分類は研究者によって異なっており、統

一された見解は示されていない。これは、コイ科魚類が世界に広く分布するとともに、種数が多く（約 3000 種を含む）多様な形態学的・生態学的性質を持ち（Nelson et al. 2016）、研究者によって用いる種や分析対象が異なり、網羅的な研究を行うことが難しいためである。この問題を克服し、コイ科魚類の系統関係を明らかにするには、コイ科の中の亜科や属などの小さなグループに焦点を当て、まずそのグループ内の系統関係を解析する必要がある。そこで本研究では、日本を含むアジアを中心に繁栄しているコイ科カマツカ類（Nelson et al. 2016）に研究対象を絞ることにした。

カマツカ類は世界中に約 200 種が存在し（Eschmeyer and Fong 2023）、ヨーロッパに分布する 2 属（ゴビオ属 *Gobio*・ロマノゴビオ属 *Romanogobio*）を除いて、中国、日本、韓国、ベトナムを中心とする東アジアに分布する（Yang et al. 2006）。カマツカ類の分類は Bleeker（1863）の提唱した、ゴビオ属とヒガイ属 *Sarcocheilichthys* の 2 属を含む Gobiones に始まる。Jordan and Fowler（1903）は Gobiones を Gobioninae とすることにより亜科の接尾辞を与えた。ニゴイ属 *Hemibarbus* はカマツカ亜科から除外されることが少なからずあったが（Chu 1935; Nikolskii 1954; Bănărescu and Nalbant 1965）、Bănărescu and Nalbant（1973）によりカマツカ亜科に編入されて以来、カマツカ亜科の属として扱われるようになった。Hosoya（1986）および細谷（1989）は骨学的特徴と頭部側線系の特徴に基づき、カマツカ類を狭義のカマツカ亜科、ヒガイ亜科、モロコ亜科（細谷 1989; 細谷 1996;ただし細谷 2001 ではバルブス亜科）の 3 亜科に分類した。さらに狭義のカマツカ亜科のうち、半底生生活を行うニゴイ属・スゴモロコ属 *Squalidus*・ゴビオ属・メソゴビオ属 *Mesogobio* をグループ 1、完全底生生活を行うカマツカ属 *Pseudogobio*・ゼゼラ属 *Biwia*・ツチフキ属 *Abbottina*・ドジョウカマツカ属 *Gobiobotia*・トカゲカマツカ属 *Saurogobio*・コブクロカマツカ属 *Microphysogobio* をグループ 2 に分類し、狭義のカマツカ亜科、ヒガイ亜科、モロコ亜科の全てを含む単系統群を広義のカマツカ亜科とした（本研究では、混乱を避けるために、広義のカマツカ亜科をカマツカ類とした）。

20 世紀末の分子生物学の発展に伴い、DNA による系統解析が行われるようになったが、DNA の系統解析が従来の形態などによる分類に関して問題を提起する例がしばしばみられる。カマツカ類は生態的・形態的に多様であるため、DNA の系統解析によって分類を検証することが必要であると思われる。しかし、初期の研究の多くはカマツカ類の系統関係に焦点を当てたものではなかった。例えば、Briolay et al.（1998）は、ミトコンドリアの Cyt*b* 遺伝子を用いてヨーロッパのコイ科魚類の系統解析を行ったが、カマツカ類はヨーロッパカマツカ *Gobio gobio* とモツゴ *Pseudorasbora parva* の 2 種だけを解析した。Cunha et al.（2002）は、Cyt*b* 遺伝子を用いてユーラシア大陸とアメリカ大陸のコイ科の系統解析を行ったが、カマツカ類はゴビオ属、モツゴ属、ツチフキ属、ドジョウカマツカ属の 4 属のみ解析した。このような状況の中で、Yang et al.（2006）は、Cyt*b* 遺伝子を用いて東アジアとヨーロッパのカマツカ類の系統解析を行い、ニゴイグループ、ゴビオグループ、カマツカグループ、ヒガイグループの 4 つのグループに分類した。Kim et al.（2009）は核 DNA を、Liu et al.（2010）は mtDNA を用いてカマツカ類に焦点を当てた系統解析を行い、Yang et al.（2006）と同様の結果を得た。Tang et al.（2011）は、ミトコンドリアの Cyt*b* 遺伝子と COI 遺伝子、核の RAG1 遺伝子の exon3 とロドプシン遺伝子を用いて中国、韓国、ロシア、日本のカマツカ類の系統解析を行い、ニゴイ・スゴモロコ群、カマツカ族、ヒガイ族の 3 つのグループに分類した。しかし、タモロコ *Gnathopogon elongatus* については、Tang et al.（2011）の決定した Cyt*b* 遺伝子（1045 bp）の塩基配列と当研究室で決定した茨城県産のそれとの間に約 10 %の違いがあった。同種において塩基配列の違いが 10 %もあることは淡水魚類のこれまでの研究から想定し難い。このような相違がなぜみられるのか疑問が生じた。

また、近年ではカマツカ類の新種や種内系統が

少なからず発見された。日本産ゼゼラ属は従来 1 種とみなされていたが、Watanabe et al.（2010）が淀川集団と琵琶湖集団の間に大きな遺伝的差異があることを示し、Kawase and Hosoya（2010）が淀川集団をヨドゼゼラ *B. yodoensis* として新種記載した。 タモロコは Kakioka et al.（2013）によって単系統群ではないことが示され、長野から本州西部・四国に分布する E1 グループ、伊勢湾・琵琶湖周辺に分布する E2 グループ、長野県伊那谷に分布する E3 グループの 3 つの種内系統の存在が示され、それらは別種である可能性が示唆された。Komiya et al.（2014）は、東海地方に棲息するカワヒガイ *Sarcocheilichthys variegatus variegatus* と滋賀県以西のカワヒガイおよびビワヒガイ *Sa. v. microoculus* の間に遺伝的差異があることを示し、それらは別種である可能性を示唆した。従来、ウシモツゴはシナイモツゴの未記載亜種として扱われていたが、 Kawase and Hosoya（2015）によってウシモツゴ *Pr. pugnax* が新種として記載され、シナイモツゴ *Pr. pumila* が再記載された。日本産カマツカ属魚類は従来 1 種とみなされていたが、Tominaga and Kawase（2019）によって、フォッサマグナ以西の本州・四国・九州に分布するカマツカ、フォッサマグナ以東の本州に分布するスナゴカマツカ *Pg. polystictus*、東海・近畿地方から広島県に分布するナガレカマツカ *Pg. agathonectris* に分けられた。ニゴイ属は mtDNA に基づく系統解析の結果、形態に基づき区別されていたニゴイ *H. barbus* とコウライニゴイ *H. labeo* に二分されるのではなく、天竜川を境として東日本と西日本の 2 つの系統に区別されることが示された（田畑他私信）。ツチフキは、Jang–Liaw et al.（2019）によって日本国内には 3 つの系統（JL1, JL2, SCL1）が分布することが示され、SCL1 は大陸から人為的に移入された可能性が高いことが示唆された。 また、分子系統解析の発展により、近年ではカマツカ類の分岐年代推定が行われるようになった。 Liu et al.（2010）は、2 つの化石記録を基準点として、Cyt*b* 遺伝子を用いてカマツカ類の起源が約 2900 万年前であると推定した。Zhao et al.（2016）は、8 つの化石記録と Near et al.（2012）が推定したコイ目の分岐年代に基づき、 mtDNA の完全長の塩基配列を用いてカマツカ類の起源が約 6400 万年前であると推定した。

このような背景から、本研究ではタモロコの大きな塩基配列の相違に関する疑問を解消し、新たに報告された種と種内系統を含めた日本産カマツカ類全種の系統関係を明らかにすること、分岐年代の推定が大きく異なるため、カマツカ類の進化過程をより明確に示すため、分岐年代を解明することを目的として研究を行った。

材料および方法

本研究では、Nelson et al.（2016）のカマツカ亜科に基づいて、ニゴイ属（ニゴイ・ズナガニゴイ・コウライニゴイ）、スゴモロコ属（スゴモロコ *Squalidus chankaensis biwae*・コウライモロコ *Sq. c. tsuchigae*・イトモロコ *Sq. gracilis gracilis*・デメモロコ *Sq. japonicus japonicus*）、カマツカ属（カマツカ・ナガレカマツカ・スナゴカマツカ）、ツチフキ属（ツチフキ）、ゼゼラ属（ゼゼラ・ヨドゼゼラ）、ヒガイ属（ビワヒガイ・カワヒガイ・アブラヒガイ *Sa. biwaensis*）、ムギツク属 *Pungtungia*（ムギツク *Pu. herzi*）、モツゴ属（モツゴ・シナイモツゴ・ウシモツゴ）、タモロコ属 *Gnathopogon*（タモロコ・ホンモロコ *G. caerulescens*）の 9 属 20 種 2 亜種の日本産全種を系統解析に用いた。この他にアウトグループとしてタナゴ亜科のアブラボテ *Tanakia limbata* を用いた（Table 1）。

塩基配列の決定

本研究では、魚類の遺伝学的解析において最もよく用いられている遺伝子領域の一つであるミトコンドリア Cyt*b* 遺伝子領域と DNA バーコーディングに用いられているミトコンドリア COI 遺伝子領域および核の RAG1 遺伝子領域を解析した。

各個体の鰭から、DNeasy®Blood&Tissue Kit（QIAGEN）を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA をテンプレートとして、KOD–Dash（東洋紡）を用いて PCR 法にて以下の条件で各々の

Table 1. List of fish samples used for nucleotide sequence analysis in this study.

No.	Genus	Species*	Collection locality
1	*Squalidus*	*Sq. gracilis gracilis*	Hyakken R., Okayama Pref.
2		*Sq. chankaensis tsuchigae*	Asahi R., Okayama Pref.
3		*Sq. chankaensis biwae*	Lake Biwa, Shiga Pref.
4		*Sq. japonicus japonicus*	Lake Biwa, Shiga Pref.
5	*Hemibarbus*	*H. barbus*	Nigori R., Yamanashi Pref.
6		*H. labeo*	Sasagase R., Okayama Pref.
7			Kako R., Hyogo Pref.
8		*H. longirostris*	Kako R., Hyogo Pref.
9	*Pseudogobio*	*Pg. esocinus*	Ai R., Yamanashi Pref.
10			Fuefuki R., Yamanashi Pref.
11			Tasawa R., Nagano Pref.
12			Noda R., Aichi Pref.
13			Usuko R., Aichi Pref.
14			Sasagase R., Okayama Pref.
15		*Pg. agathonectris*	Toyo R., Aichi Pref.
16			Tomoe R., Aichi Pref.
17		*Pg. polystictus*	Sato R., Ibaraki Pref.
18	*Biwia*	*B. zezera*	Lake Biwa, Shiga Pref.
19		*B. yodoensis*	Yodo R., Osaka Pref.
20	*Abbottina*	*A. rivularis*	Asahi R., Okayama Pref.
21	*Pungtungia*	*Pu. herzi*	Asahi R., Okayama Pref.
22	*Pseudorasbora*	*Pr. parva*	Tasawa R., Nagano Pref.
23		*Pr. pumila*	Shinonoiutabi, Nagano Pref.
24		*Pr. pugnax*	Lake Biwa Mus., Shiga Pref.
25	*Sarcocheilichthys*	*Sa. biwaensis*	Lake Biwa Mus., Shiga Pref.
26		*Sa. variegatus microoculus*	Lake Biwa, Shiga Pref.
27		*Sa. variegatus variegatus*	Kako R., Hyogo Pref.
28			Kushida R., Mie Pref.
29	*Gnathopogon*	*G. elongatus*	Inawashiro, Fukushima Pref.
30			Daienji R., Ibaraki Pref.
31			Nobe R., Niigata Pref.
32			Lake Biwa, Shiga Pref.
33			Hyakken R., Okayama Pref.
34			Usuko R., Aichi Pref.
35			Ai R., Yamanashi Pref.
36			Kamanashi R., Yamanashi Pref.
37		*G. caerulescens*	Lake Biwa, Shiga Pref.
38	*Tanakia*	*T. limbata*	Sasagase R., Okayama Pref.

**Sq.*, *Squalidus*; *Sa.*, *Sarcocheilichthys*; *Pg.*, *Pseudogobio*; *Pu.*, *Pungtungia*; *Pr.*, *Pseudorasbora*.

遺伝子領域の増幅を行った。 Cyt*b* 遺伝子では、はじめに予備変性を 98 ºC で 4 分間行い、次に熱変性 98 ºC で 70 秒間・アニーリング 63–57 ºC で 50 秒間・伸長 72 ºC で 90 秒間の条件で 30 サイクル行い、最後に 72 ºC で 7 分間伸長を行った（Yang et al. 2006）。COI 遺伝子では、予備変性を 98 ºC で 4 分間行い、次に熱変性 98 ºC で 70 秒間・アニーリング 63–57 ºC で 50 秒間・伸長 72 ºC で 90 秒間の条件で 30 サイクル行い、最後に 72 ºC で 7 分間伸長を行った（Kochzius et al. 2010）。RAG1 遺伝子では、nested PCR を行った。1 回目の PCR では、プライマー（センス R21F とアンチセンス R21R）を用いて、予備変性を 98 ºC で 4 分間行い、次に熱変性 98 ºC で 70 秒間・アニーリング 55–52 ºC で 50 秒間・伸長 72 ºC で 3 分間の条件で 30 サイクル行い、最後に 72 ºC で 7 分間伸長を行った（Tang et al. 2010）。2 回目の PCR では、プライマー（センス NR13F とアンチセンス R13R）

Table 2. List of primers used for amplifying and sequencing of genes.

Gene	Name	Sequence (5' to 3')	Reference
Cyt*b*	L14724	GACTTGAAAAACCACCGTTG	Xiao et al. (2001)
	H15915	CTCCGATCTCCGGATTACAAGAC	Xiao et al. (2001)
COI	L5698–Asn	AGGCCTCGATCCTACAAAGKTTTAGTTAAC	Miya et al. (2000)
	HMiyaCOI*	GGTTCAATTCCTYCCTTTCTCG	this study
RAG1	R21F*	ARTTTGAATGGCAGCCAGC	this study
	R21R*	TCCGAAAACGTCTGAACAGC	this study
	NR13F*	AAAGAATCCTGTGATGG	this study
	R13R*	CTRTATYGRCAGAGTTGGTC	this study

*designed based on sequences of *Pseudogobio esocinus*, *Gnathopogon elongatus*, *Sarcocheilichthys variegatus variegatus*, and *Hemibarbus barbus*.

を用いて、予備変性を 98 ºC で 4 分間行い、次に熱変性 98 ºC で 70 秒間・アニーリング 67–63 ºC で 50 秒間・伸長 72 ºC で 90 秒間の条件で 30 サイクル行い、最後に 72 ºC で 7 分間伸長を行った。使用したプライマーを Table 2 に示す。

反応終了後は、1.4 %アガロースゲルを用いて、サイズマーカーである Marker4（Wako）と共に PCR 産物を電気泳動し、トランスイルミネーター上で PCR の成否を確認し、QIAquick®PCR Purification Kit（QIAGEN）を用いて PCR 産物を精製した。PCR 産物を送付し、株式会社マクロジェン・ジャパンに委託して塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、日本 DNA データバンク（DDBJ）に登録した（LC763283–LC763396）。

系統解析

得られた塩基配列のアライメントは DNASIS（Hitachi Software Engineering）および MEGA6.06（Tamura et al. 2013）を用いて行った。Cyt*b* 遺伝子（1045 bp）、COI 遺伝子（400 bp）、 RAG1 遺伝子（755 bp）の塩基配列の各々を基に、また、3 つの遺伝子の塩基配列を結合させて、MrBayes ver. 3.1.2（Huelsenbeck et al. 2001）を用いてベイズ、MEGA6.06 を用いて近隣結合（NJ）法、PAUP4.0（Swofford, 2002）を用いて最大節約（MP）法による系統樹を構築した。また、Tang et al.（2011）のカマツカ類の Cyt*b* 遺伝子（1045 bp）、COI 遺伝子（353 bp）、RAG1 遺伝子（755 bp）と Kim et al.（2013）のクロムギツク *Pseudopungtungia nigra* の RAG1 遺伝子（755 bp）の塩基配列を DNA データベースから引用し、本研究で得られたカマツカ類の塩基配列と合わせて、3 つの遺伝子の塩基配列を結合させてベイズ系統樹を構築した。さらに、Kakioka et al.（2013）のホンモロコ、タモロコの E1 グループ、E2 グループ、E3 グループ、Tang et al.（2011）のタモロコの Cyt*b* 遺伝子（1045 bp）の塩基配列を DNA データベースから引用し、本研究で得られたタモロコ属 9 個体の塩基配列と合わせてベイズ系統樹を構築した。

ベイズ系統樹の構築の際、Kakusan4（Tanabe 2011）によって選択されたモデルを Table 3 に示した。 BEAST ver. 2.6.6（Bouckaert et al. 2014）を用い、MCMC（マルコフ連鎖モンテカルロ法）解析を行った。MCMC の Chain Length は 100,000,000 世代とし、1000 世代毎にサンプリングを行い、TreeAnnotator にて Chain Length のうち 10 %にあたる最初の 10,000,000 世代を切り捨て、残りの世代から合意樹、枝長、事後確率を計算した。近隣結合系統樹の構築の際、NJ 法の遺伝的距離は木村の 2 パラメーター法（Kimura 1980）により算出した。最大節約系統樹は発見的探索法（Heuristic search）により構築した。また、NJ 法と MP 法による系統樹の樹形の信頼性を評価するために、1000 回の反復によるブートストラップ検定を行った。

分岐年代の推定

アウトグループとしてタナゴ亜科のアブラボテを用い、Kakioka et al.（2013）のホンモロコ、タモロコのE1グループ、E2グループ、 E3グルー

Table 3. Best model of nucleotide substitutions selected by Kakusan4.

Gene	Phylogenetic tree	Sequence length	Partition	Substitution model
Cyt*b*	Fig. 1	1045 bp	1st codon	HKY85+I+G
	Fig. 4		2nd codon	KHY85+G
	Fig. 6		3rd codon	GTR+I+G
COI	Fig. 2	400 bp	1st codon	K80
	Fig. 4		2nd codon	HKY85+I+G
			3rd codon	HKY85+G
RAG1	Fig. 3	755 bp	1st codon	SYM+G
	Fig. 4		2nd codon	JC69
			3rd codon	K80
Cyt*b*	Fig. 5	1045 bp	1st codon	GTR+I+G
			2nd codon	HKY85+G
			3rd codon	GTR+I+G
COI	Fig. 5	353 bp	1st codon	HKY85+I+G
			2nd codon	SYM+G
			3rd codon	HKY85+I+G
RAG1	Fig. 5	755 bp	1st codon	K80
			2nd codon	JC69
			3rd codon	K80
Cyt*b*	Fig. 7	1045 bp	1st codon	GTR+I+G
			2nd codon	HKY85+G
			3rd codon	GTR+I+G

プとTang et al.（2011）のカマツカ類と、本研究で得られたカマツカ類37サンプルを用い、ミトコンドリアCyt*b*遺伝子の塩基配列1045 bpに基づき分岐年代推定を行った。Kakusan4を用いて選択した最適塩基置換モデルをTable 3に示した。BEAST ver. 2.6.6を用いてMCMC解析を行った。Clock modelはRelaxed Clock Log Normal、Clock rateはZardoya and Doadrio（1999）がヨーロッパ産コイ科魚類の研究から算出した値を用いて0.76 %/MYAとした。進化仮説は、Yule modelを採用した。MCMCのChain Lengthは100,000,000世代とし、1000世代毎にサンプリングを行い、TreeAnnotatorにてChain Lengthのうち10 %にあたる最初の10,000,000世代を切り捨て、残りの世代から分岐年代、合意樹、枝長、事後確率を計算した。

結果

カマツカ類の系統関係

Cyt*b* 遺伝子（1045 bp）、COI 遺伝子（400 bp）、RAG1 遺伝子（755 bp）の塩基配列を基に、アウトグループのアブラボテと日本産カマツカ類全種類を用いてベイズ法によって系統樹を構築した（Figs. 1, 2, 3）。系統関係の信頼性を表すために、系統樹の枝上にベイズ法の事後確率と NJ 法および MP 法のブートストラップ値を示した。ベイズ法で構築した系統樹と NJ 法および MP 法で構築した系統樹の間で樹形が一致しない箇所がみられた。NJ 法と MP 法では全体的に信頼性が低かった（ブートストラップ値 90 %以上の場合信頼性が高いとした）ため、以下では全体的に高い信頼性が得られた（事後確率 0.95 以上の場合信頼性が高いとした）ベイズ法の系統樹に基づき議論を進める。

日本に棲息するカマツカ属を除くカマツカ類は、各々が 0.95 以上の高い事後確率で単系統性を示した。複数の種を含むカマツカ属は、COI 系統樹でのみ事後確率が 0.88 であったが、Cyt*b* 系統樹と RAG1 系統樹、また、Cyt*b*+COI+RAG1 系統樹（下述）においては、いずれも 0.99 以上の高い事後確率で単系統性を示した。1 属 1 種のツチフキ属、ムギツク属を含め、日本産カマツカ類の各属の単系統性が支持された。

Cyt*b* 系統樹（Fig. 1）では、カマツカ類はグループ 1 から 5 の 5 グループに分かれた。グループ 1 はニゴイ属・スゴモロコ属、グループ 2 はカマ

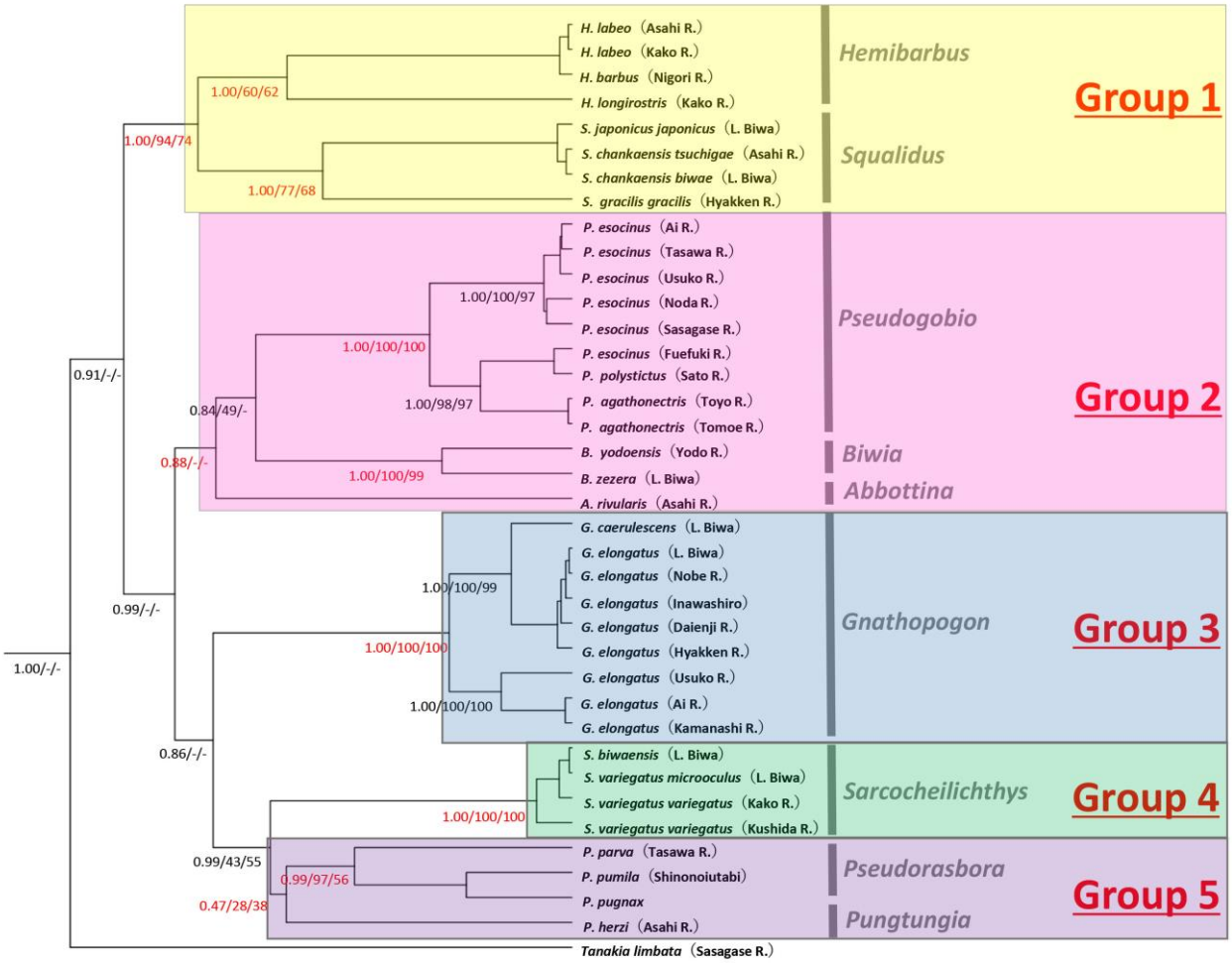

Fig. 1. Bayesian phylogenetic tree of Gobioninae based on mitochondrial Cyt*b* sequences (1045 bp). *Tanakia limbata* of Acheilognathinae was used as outgroup. Numbers at nodes correspond to Bayesian posterior probabilities on the left and NJ bootstrap probabilities on the center and MP bootstrap probabilities on the right.

ツカ属・ゼゼラ属・ツチフキ属、グループ 3 はタモロコ属、グループ 4 はヒガイ属、グループ 5 はモツゴ属・ムギツク属を含んでいた。このうち、グループ 1、グループ 3、グループ 4 は事後確率 1.00 で単系統性が支持された。

COI 系統樹（Fig. 2）では、Cyt*b* 系統樹（Fig. 1）のグループ 3、グループ 4、グループ 5 と同じ属を含むクラスターは各々0.99 以上の高い事後確率で単系統性が支持された。しかし、Cyt*b* 系統樹と異なり、ニゴイ属とスゴモロコ属が単系統群を形成しなかった。また、ツチフキ属はカマツカ属＋ゼゼラ属と単系統群を形成しなかった。RAG1 系統樹（Fig. 3）では、Cyt*b* 系統樹のグループ 1、グループ 2、グループ 3、グループ 4、グループ 5 と同じ属を含むクラスターは各々0.95 以上の高い事後確率で単系統性が支持された。Cyt*b* 系統樹と RAG1 系統樹では同じグループが支持されたが、グループ間の相互関係は異なった。Cyt*b* 系統樹では、グループ 4（ヒガイ属）とグループ 5（モツゴ属・ムギツク属）が最も近縁であり、グループ 3（タモロコ属）がこれらに近縁であった。グループ 3＋4＋5 はグループ 2（カマツカ属・ゼゼラ属・ツチフキ属）と単系統群を形成し、グループ 1（ニゴイ属・スゴモロコ属）は 1 番最初に他のグループから分岐した。一方、RAG1 系統樹では、グループ 3 とグループ 4 が最も近縁であり、グループ 5 がこれらに近縁であり、グループ 3＋4＋5 はグループ 1 と単系統群を形成し、グループ 2 は 1 番最初に他のグループから分岐した。このように各遺伝子の塩基配列を基に構築した

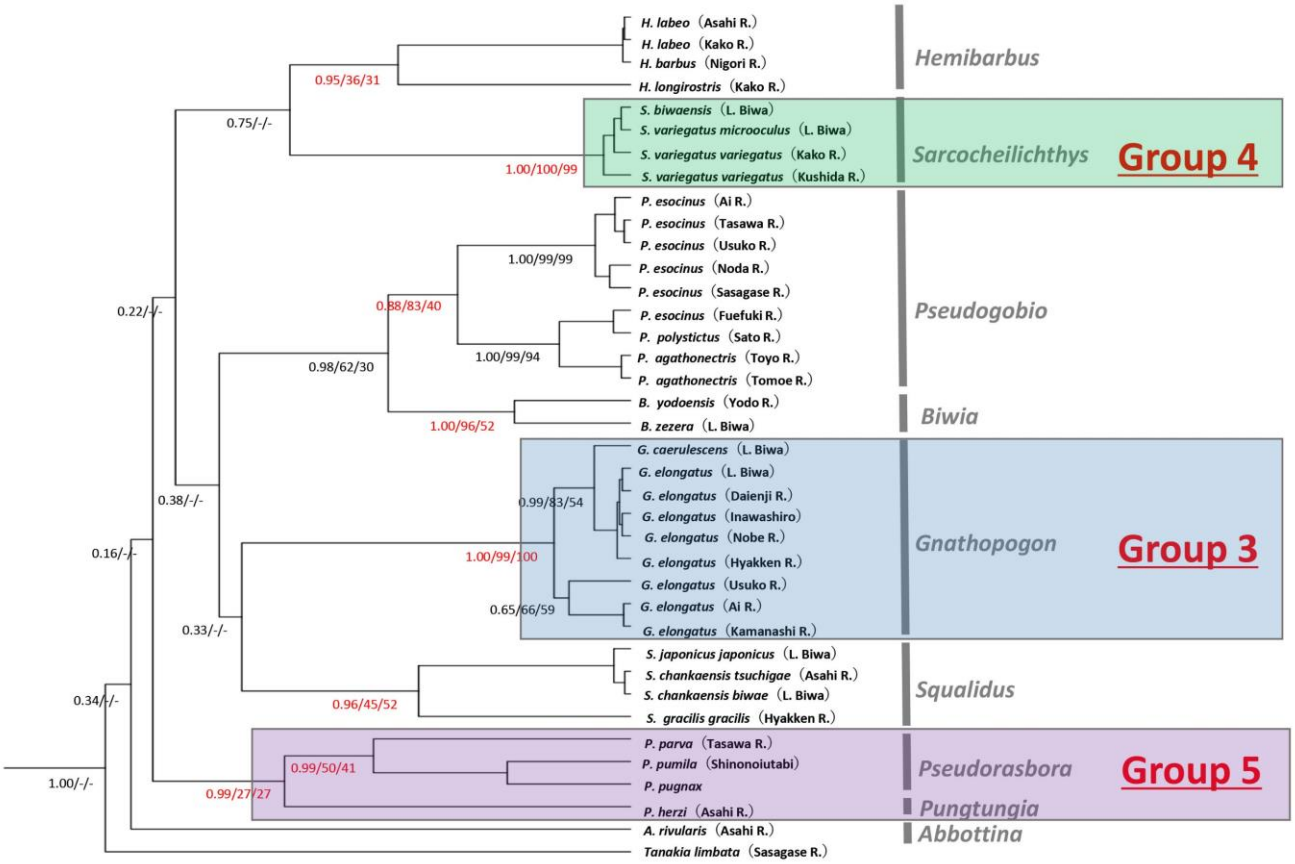

Fig. 2. Bayesian phylogenetic tree of Gobioninae based on mitochondrial COI sequences (400 bp). *Tanakia limbata* of Acheilognathinae was used as outgroup. Numbers at nodes correspond to Bayesian posterior probabilities on the left and NJ bootstrap probabilities on the center and MP bootstrap probabilities on the right.

系統樹の間には相違が見られ、また、事後確率も部分的に低かった。これは各々の遺伝子だけでは情報量が不足しているためだと考えられたので、Cyt*b* 遺伝子、COI 遺伝子、RAG1 遺伝子の塩基配列を結合して（2200 bp）ベイズ法によって系統樹を構築した（Fig. 4）。

Cyt*b*＋COI＋RAG1 系統樹は、Cyt*b* 系統樹のグループ 1、グループ 2、グループ 3、グループ 4、グループ 5 を支持した。いずれも 0.99 以上の高い事後確率で単系統性が支持された。グループ 4 とグループ 5 が事後確率 0.56 で単系統群を形成した。また、グループ 4+5 とグループ 3 が事後確率 0.99 で単系統群を形成した。さらにグループ 3+4+5 は事後確率 0.99 でグループ 2 と単系統群を形成した。グループ 1 は 1 番最初に他のグループから分岐した。

さらに、日本産カマツカ類と日本国外に棲息するカマツカ類の間の系統関係を確かめるために、Tang et al.（2011）のカマツカ類の Cyt*b* 遺伝子（1045 bp）、COI 遺伝子（353 bp）、RAG1 遺伝子（755 bp）の塩基配列と Kim et al.（2013）のクロムギツクの RAG1 遺伝子（755 bp）を DNA データベースから引用し、本研究で得られたカマツカ類の塩基配列と合わせて、3 つの遺伝子の塩基配列を結合させてベイズ法により系統樹を構築した（Fig. 5）。その結果、Cyt*b* 系統樹のグループ 1 から 5 が支持された。また、日本に棲息しない属として、グループ 2 はコブクロカマツカ属・トカゲカマツカ属・ゴビオ属・ロマノゴビオ属・*Platysmacheilus* 属、グループ 3 は *Rhinogobio* 属、グループ 5 は *Pseudopungtungia* 属を含んでいた。いずれのグループも事後確率 1.00 で単系統性が支持された。グループ 4 とグループ 5 が事後確率 1.00 で単系統群を形成した。また、グループ 4+5

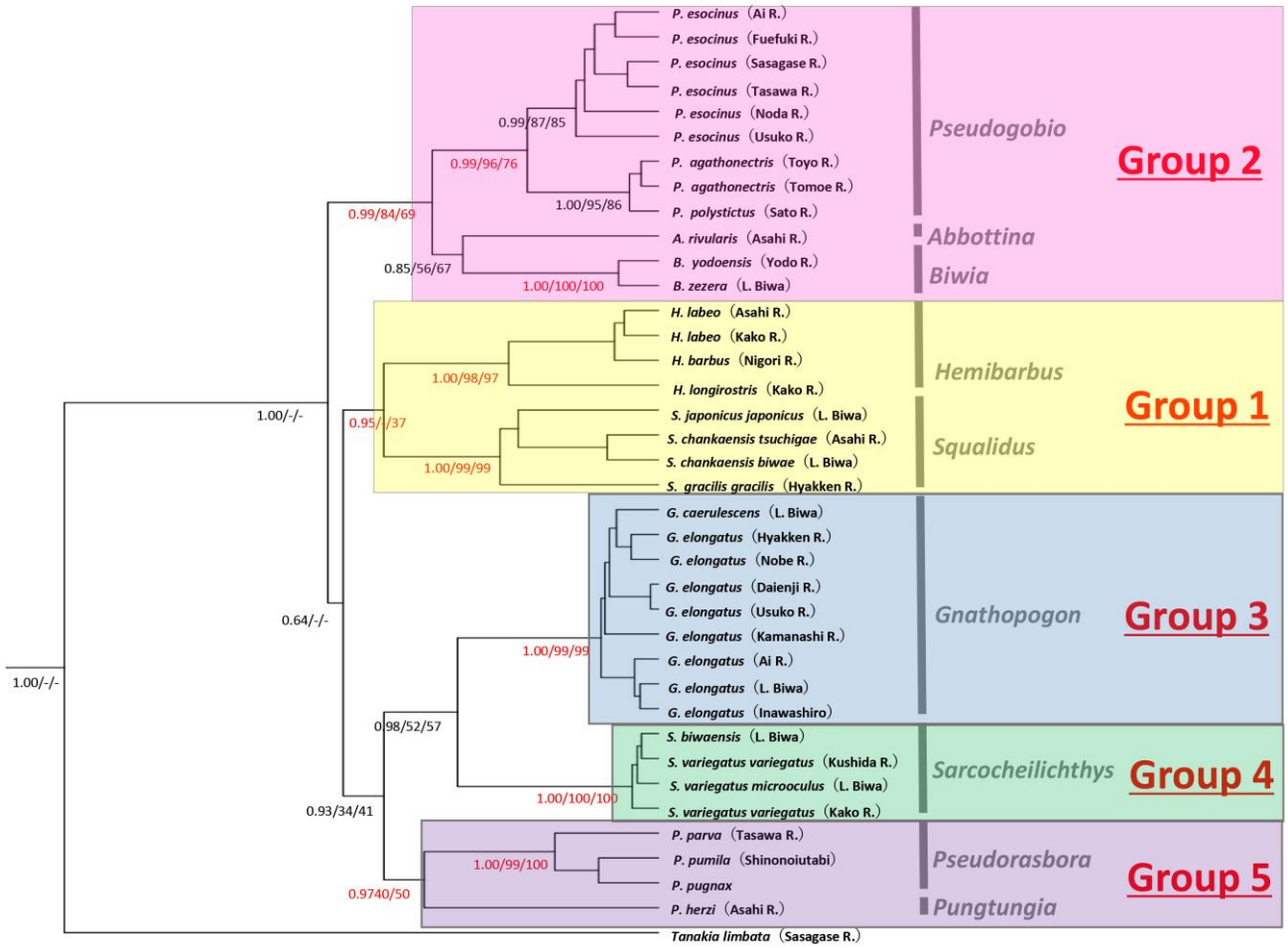

Fig. 3. Bayesian phylogenetic tree of Gobioninae based on nuclear RAG1 sequences (755 bp). *Tanakia limbata* of Acheilognathinae was used as outgroup. Numbers at nodes correspond to Bayesian posterior probabilities on the left and NJ bootstrap probabilities on the center and MP bootstrap probabilities on the right.

とグループ 3 が事後確率 0.93 で単系統群を形成した。さらにグループ 3+4+5 は事後確率 0.89 でグループ 2 と単系統群を形成した。グループ 1 は 1 番最初に他のグループから分岐した。

タモロコの種内系統

タモロコの種内系統を詳しく調べるために、モツゴ（長野県田沢川）をアウトグループとして、Kakioka et al.（2013）のホンモロコとタモロコの E1 グループ、E2 グループ、E3 グループと Tang et al.（2011）のタモロコと、本研究で解析したタモロコ属 9 個体の Cyt*b* 遺伝子の塩基配列（1045 bp）に基づいてベイズ法により系統樹を構築した（Fig. 6）。本研究において、滋賀県琵琶湖、福島県猪苗代、 新潟県野辺川、茨城県大円寺川、岡山県百間川で採集したタモロコは E1 グループ、愛知県臼子川で採集したタモロコは E2 グループ、山梨県相川と釜無川で採集したタモロコは E3 グループに属した。また、Kakioka et al.（2013）のホンモロコとタモロコの 3 グループ、Tang et al.（2011）のタモロコ、本研究で解析したタモロコ（茨城県大円寺川と山梨県相川および釜無川の 3 個体）の Cyt*b* 遺伝子の塩基配列間における一致率を示した（Table 4）。本研究で解析した茨城県のタモロコは Kakioka et al.（2013）の E1 グループのタモロコとの遺伝的一致率が 98.90 %となり、山梨県のタモロコは E3 グループのタモロコとの遺伝的一致率が 95.40 %であった。

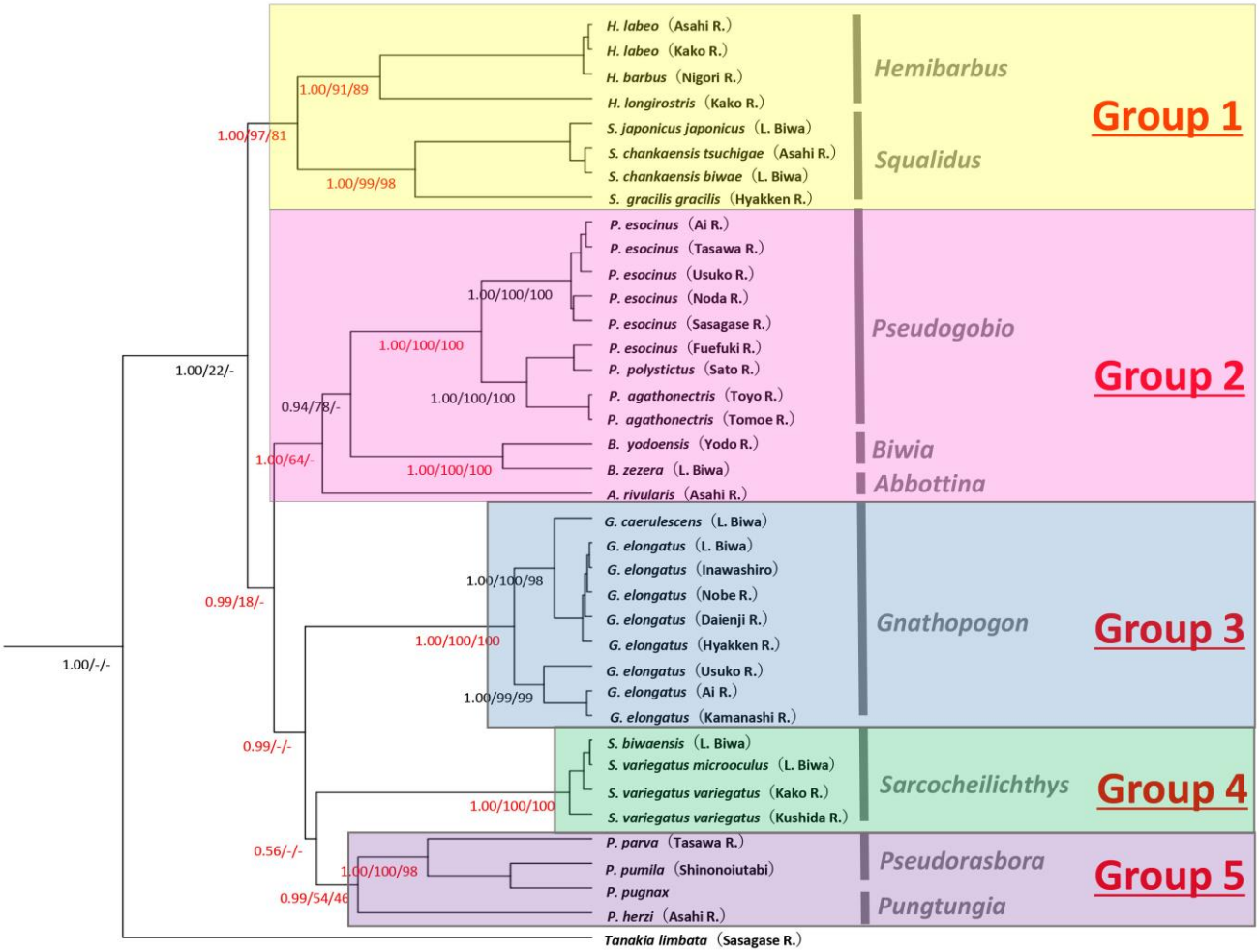

Fig. 4. Bayesian phylogenetic tree of Gobioninae based on concatenated sequences of three genes (Cyt*b*, COI, RAG1; 2200 bp). *Tanakia limbata* of Acheilognathinae was used as outgroup. Numbers at nodes correspond to Bayesian posterior probabilities on the left and NJ bootstrap probabilities on the center and MP bootstrap probabilities on the right.

カマツカ類の分岐年代の推定

タナゴ亜科のアブラボテをアウトグループとして、Kakioka et al.（2013）のホンモロコとタモロコの E1 グループ、E2 グループ、E3 グループと Tang et al.（2011）のカマツカ類と、本研究で解析したカマツカ類の Cyt*b* 遺伝子の塩基配列（1045 bp）に基づき分岐年代推定を行った（Fig. 7）。カマツカ亜科の多様化の始まり（グループ 1 とグループ 2+3+4+5 の分岐）は約 2700 万年前、グループ 2 とグループ 3+4+5 との分岐は約 2600 万年前、グループ 3 とグループ 4+5 の分岐は約 2300 万年前、グループ 4 と 5 の分岐は約 2100 万年前であると推定された（Table 5）。

考察

Cyt*b*＋COI＋RAG1 系統樹（2200 bp）の樹形（Figs. 4, 5）は、Cyt*b* 系統樹（1045 bp）のそれ（Fig. 1）に一致した。Cyt*b* 遺伝子は、魚類の系統解析で最もよく用いられてきた遺伝子の一つであり、本研究でも 3 つの遺伝子の中で最も長い配列を決定したが、Cyt*b*＋COI＋RAG1 系統樹と同じ樹形が得られたことから系統解析には非常に有用であると考えられた（Fig. 1）。RAG1 遺伝子（755 bp）は、グループに関しては Cyt*b*＋COI＋RAG1 系統樹と Cyt*b* 系統樹に一致した結果を与えたが、グループ間の関係については一致しなかった（Fig. 3）。COI 遺伝子は DNA バーコーディングに用いられる遺伝子であるが、その系統樹

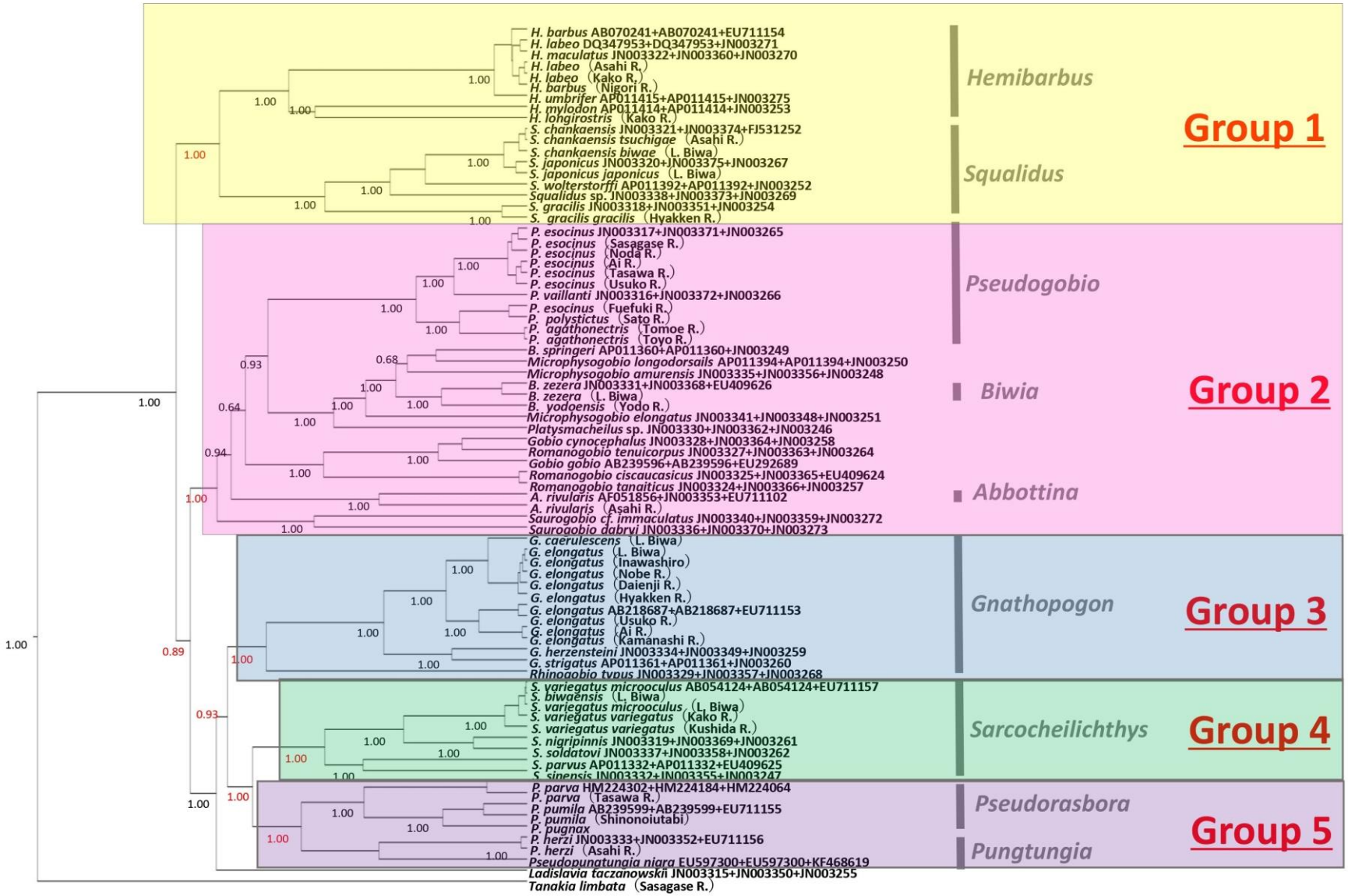

Fig. 5. Bayesian phylogenetic tree of Gobioninae based on concatenated sequences of three genes (Cyt*b*, COI, RAG1; 2153 bp) including data from Tang et al. (2011) and Kim et al. (2013). *Tanakia limbata* of Acheilognathinae was used as outgroup. Numbers at nodes correspond to Bayesian posterior probabilities.

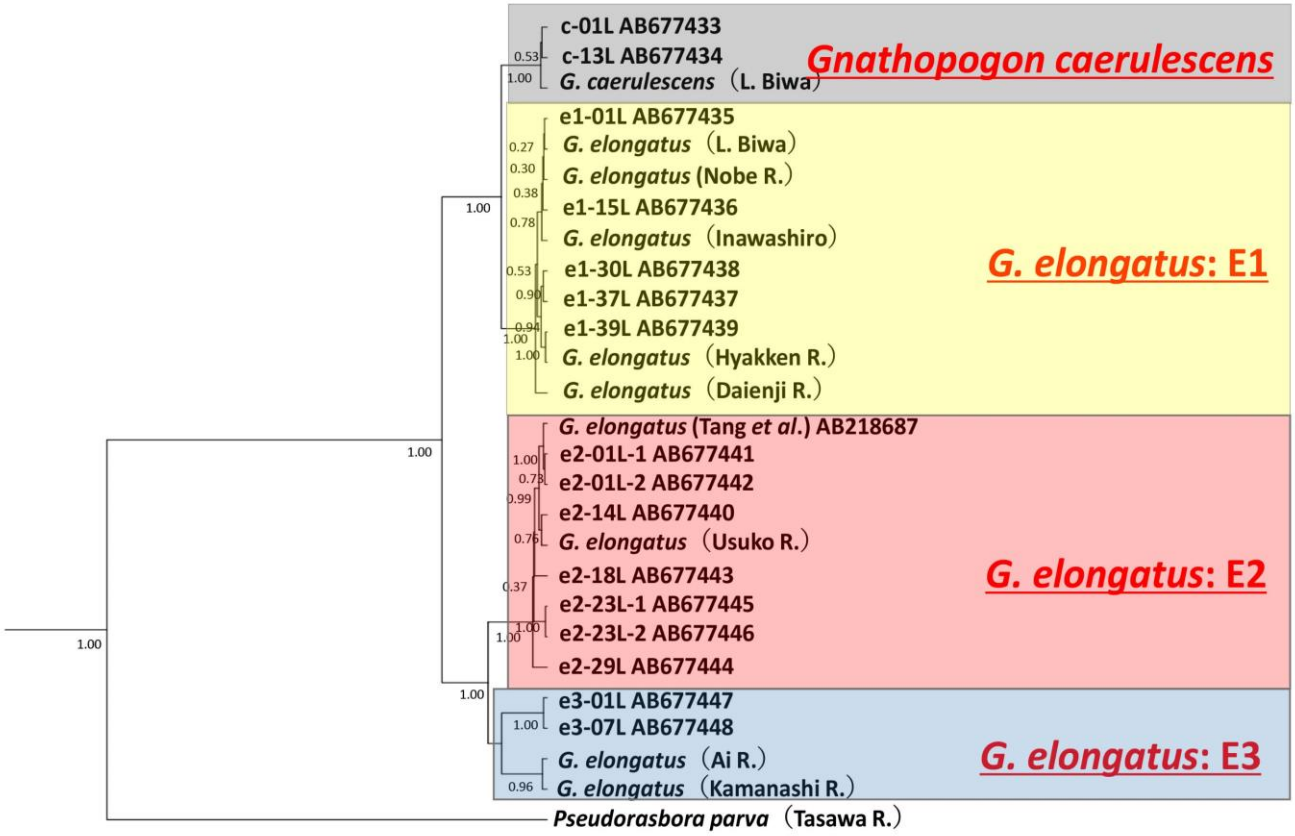

Fig. 6. Bayesian phylogenetic tree of *Gnathopogon* based on mitochondrial Cyt*b* sequences (1045 bp) including data from Kakioka et al. (2013) and Tang et al. (2011). *Pseudorasbora parva* was used as outgroup. Numbers at nodes correspond to Bayesian posterior probabilities.

Table 4. Sequence identity of mitochondrial Cyt*b* (1045 bp) among *Gnathopogon* fishes.

	1)	2)	3)	4)	5)	6)	7)
1) *G. caerulescens*	99.53						
2) E1	96.30	99.50					
3) E2	92.30	91.10	99.00				
4) E3	91.60	91.30	95.10	94.70			
5) Ibaraki	95.60	98.90	90.40	90.60	*		
6) Tang	92.10	90.40	98.80	94.50	89.60	*	
7) Yamanashi	91.60	91.30	94.20	95.40	90.80	93.90	99.50

*not calculated because only one individual was analyzed. Average sequence identities within items are shown above diagonal and those among items are shown below diagonal; *G. caerulescens*, E1, E2, and E3, cited from Kakioka et al. (2013); Ibaraki, *G. elongatus* from Ibaraki Prefecture; Tang, cited from Tang et al. (2011); Yamanashi, *G. elongatus* from Yamanashi Prefecture.

Table 5. Estimated divergence time in the evolutionary process of Gobioninae

	Mean (MYA)	95 % upper	95 % lower
Divergence between Gobioninae and outgroup	30	37	25
Divergence between Group 1 and Group 2+3+4+5	27	30	24
Divergence between Group 2 and Group 3+4+5	26	28	23
Divergence between Group 3 and Group 4+5	23	26	20
Divergence between Group 4 and Group 5	21	24	17

（400 bp）は、他の遺伝子や Cyt*b*＋COI＋RAG1 の系統樹とはかなり異なる樹形を示した（Fig. 2）。これは本研究で決定した配列が短かったためであると思われる。

カマツカ類の進化

本研究のミトコンドリア Cyt*b* 遺伝子に基づく分岐年代推定ではカマツカ類とタナゴ亜科の分岐は 3000 万年前であるという結果が得られた。化石からカマツカ類の起源は始新世であると提唱された（Zhou 1990）が、想定されていたよりも最近に起源を持つことが示された（Table 5, Fig. 7）。Liu et al.（2010）は、2 つの化石記録を基準点として、Cyt*b* 遺伝子を解析して、カマツカ類の起源が約 2900 万年前であると推定した。これは本研究で得られた推定値にほぼ一致する。一方、Zhao et al.（2016）は、8 つの化石記録と Near et al.（2012）が推定したコイ目の分岐年代に基づき、mtDNA の完全長の塩基配列を解析して、カマツカ類の起源が約 6400 万年前であると推定した。

この推定結果の違いの理由として、分岐年代推定に使用したカマツカ類は、本研究では 54 サンプル、Liu et al.（2010）では 59 サンプルであるのに対して、Zhao et al.（2016）では 27 サンプルと少ないことが考えられる。また、Zhao et al.（2016）が基準点として使用した化石記録も推定結果の違いの原因であると考えられる。例えば、Zhao et al.（2016）はニゴイとコウライニゴイの分岐を基準点として使用しているが、両種は現生のものにおいても判別が困難であるため（田畑他私信）、化石からの判別はより困難であると考えられる。Zhao et al.（2016）は、Zhou（1990）を引用して漸新世の *Palaeogobio zhongyuanensis* の化石を基準点に用いているが、引用した Zhou（1990）ではこの化石は始新世の地層から産出したと報告されている。さらに、Zhao et al.（2016）は、カマツカ類の特徴である底生生活への移行が K–Pg 境界（6550 万年前）の後のモンスーン気候の発達に起因するとしているが、著者らが知る限りこの時期にモンスーン気候が発達した証拠はなく、他のコイ科魚類にそのような底生生活への移行はみられない。このようなことから Zhao et al.（2016）の分岐年代推定には疑問が残る。今後の研究で分岐年代の推定値が改められる可能性はあるが、本研究では Liu et al.（2010）の結果にほぼ一致する結果が得られていること、Zhao et al.（2016）の結果には疑問が残ること、後述するようにこれまでに発表された各々の系統の分年代推定値に大まかに一致する結果が得られていることから、本研究の結果を基にカマツカ類の進化と分岐年代について論じることを試みる。

日本に棲息するカマツカ類の進化の様式は大きく 2 種類に分けられると考えられる：①大陸で分岐した後に、後期中新世（1162–533 万年前）において対馬海峡に形成された陸橋などに伴う水系（米倉ほか 2001）を介して大陸から日本に渡ってきたもの、②後期中新世において対馬海峡に形成された陸橋などに伴う水系を介して祖先が大陸から日本に渡ってから、日本で分岐したもの。①のようなカマツカ類として日本と大陸に共通して分布する種/亜種が考えられる。細谷（2019）によると日本と大陸に共通して分布するカマツカ類の種/亜種は、ズナガニゴイ・カマツカ・ツチフキ・モツゴ・ムギツク・コウライニゴイ・コウライモロコである。本研究でも、ズナガニゴイ（コウライニゴイとニゴイの共通祖先からの分岐、約

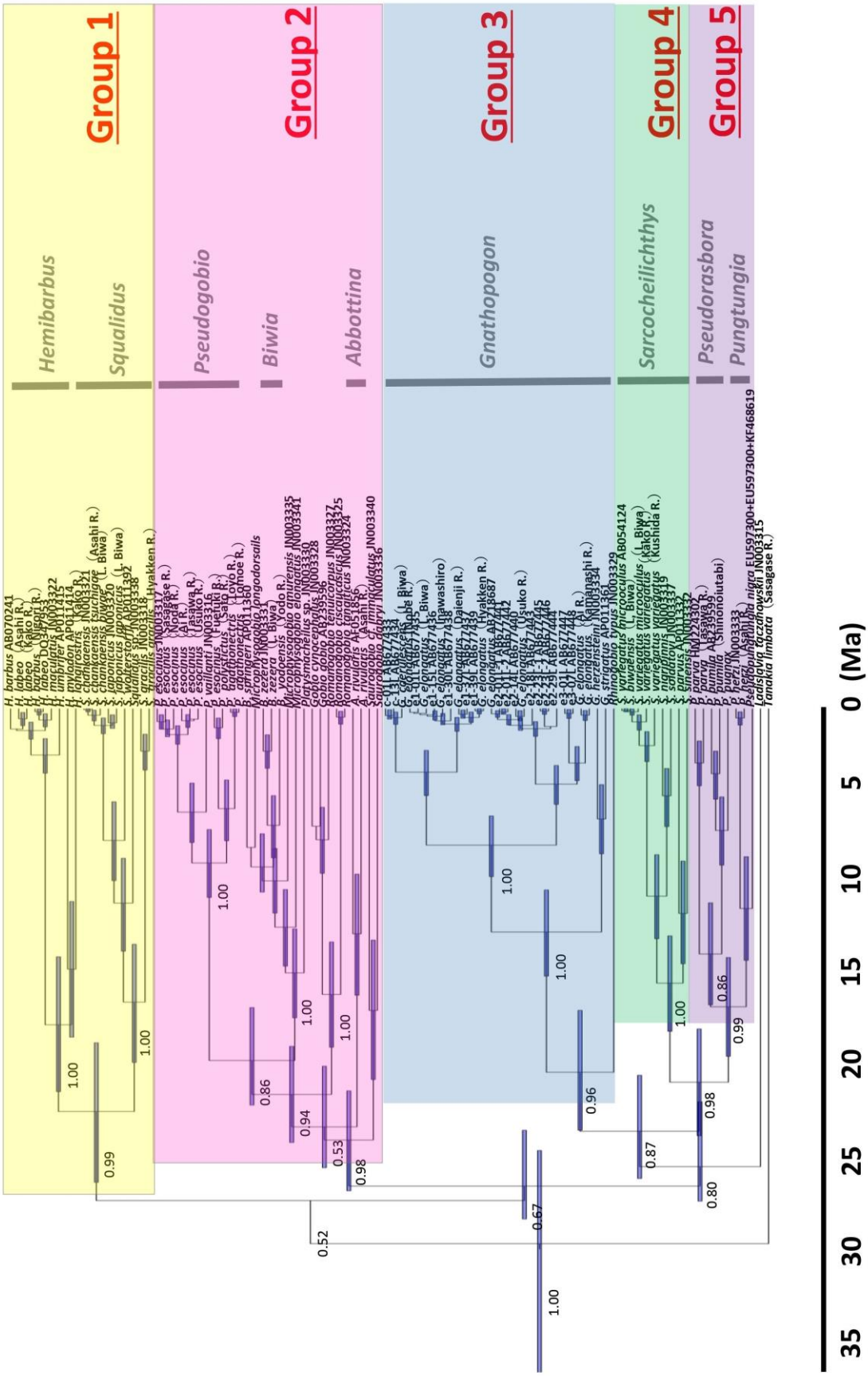

Fig. 7. Time–calibrated Bayesian phylogenetic tree of Gobioninae based on mitochondrial Cyt*b* sequences (1045 bp) including data from Tang et al. (2011). *Tanakia limbata* of Acheilognathinae was used as outgroup. Bars indicate the 95% highest probability density interval. Numbers at nodes correspond to Bayesian posterior probabilities.

1770 万年前)、カマツカ（ゼゼラ属との分岐、約 1940 万年前)、ツチフキ（グループ 2 の他のメンバーからの分岐、約 2280 万年前)、モツゴ（シナイモツゴとウシモツゴの共通祖先からの分岐、約 1360 万年前)、ムギツク（モツゴ属との分岐、約 1660 万年前）は後期中新世より以前に分岐したことが示された（Fig. 7)。例えば、ズナガニゴイは大陸で種分化して陸橋などに伴う水系を介して大陸から日本に渡ってきたという見解が示されている（Taniguchi et al. 2021)。②のようなカマツカ類として日本固有種/亜種が考えられる。細谷（2019）によると日本固有種/亜種は、ニゴイ・スゴモロコ・デメモロコ・ナガレカマツカ・スナゴカマツカ・ゼゼラ・ヨドゼゼラ・ホンモロコ・タモロコ・カワヒガイ・ビワヒガイ・アブラヒガイ・シナイモツゴ・ウシモツゴ・イトモロコである。ニゴイ（コウライニゴイとの分岐、約 60 万年前)、スゴモロコ（コウライモロコとの分岐、約 30 万年前)、デメモロコ（スゴモロコとコウライモロコの共通祖先からの分岐、約 90 万年前)、ナガレカマツカとスナゴカマツカ（約 560 万年前)、ゼゼラとヨドゼゼラ（約 650 万年前)、ホンモロコとタモロコの E1 グループ(約 350 万年前)、タモロコの E2 グループと E3 グループ（約 420 万年前)、カワヒガイ（ビワヒガイとアブラヒガイの共通祖先からの分岐、約 70 万年前)、ビワヒガイとアブラヒガイ（約 16 万年前)、シナイモツゴとウシモツゴ（約 680 万年前）は後期中新世の開始より後に分岐したことが示された（Fig. 7)。例えば、ナガレカマツカとスナゴカマツカはその共通祖先が陸橋などに伴う水系を介して大陸から日本に渡った後に、日本アルプス（中央高地）の形成によって分岐したという見解が示されている（Tominaga et al. 2016)。

ニゴイ属については、ニゴイとコウライニゴイは唇の厚さ等で判別されるが、本研究で解析したニゴイ（山梨県濁川）とコウライニゴイ（兵庫県加古川および岡山県旭川）は若魚であったため形態での判別が困難であり、細谷（2019）の示した分布も考慮して判別を行った。DNA による系統解析の結果、西日本の岡山県旭川と兵庫県加古川のコウライニゴイは山梨県濁川のニゴイと区別された（Figs. 1, 2, 3, 4, 5)。mtDNA による系統解析によって、ニゴイ属魚類は天竜川を境として東日本と西日本の 2 つの系統に区別され、ニゴイとコウライニゴイの形態学的な区別に一致しないという報告がある（田畑他私信)。いずれの区別にしても 2 者の遺伝的距離は小さい。本研究で用いたニゴイ属のサンプル数は少ないため、ニゴイとコウライニゴイ間の区別と西日本・東日本間の区別のどちらが正しいのか明言することはできない。より多くの地点で採集されたサンプルの分析を行う必要があると考えられる。

ヒガイ属については、滋賀県琵琶湖のビワヒガイは、兵庫県加古川の同種別亜種のカワヒガイよりも別種のアブラヒガイと近縁であったが (Figs. 1, 2, 4, 5)、3 者の遺伝的距離は小さかった。一方、三重県櫛田川のカワヒガイと、滋賀県以西のカワヒガイとの間の遺伝的距離は大きかった (Figs. 1, 2, 4, 5)。これは、東海地方に棲息するカワヒガイが別種である可能性を示した Komiya et al. (2014) の報告と一致する。また、Komiya et al.（2014）は、その遺伝的差異が 150–100 万年前の鈴鹿山脈の隆起（川辺 1994; 太田ほか 2004）によるという見解を示した。本研究において、三重県櫛田川のカワヒガイと滋賀県以西のヒガイ属の分岐は約 200 万年前であると推定され、鈴鹿山脈の隆起以前に既に分岐していることが示された（Fig. 7)。

カマツカ属については、本研究で用いたカマツカ属は 3 つのグループに分かれた（Figs. 1, 2, 3, 4, 5)。形態的・生態的特徴から長野県田沢川・山梨県相川と笛吹川・愛知県臼子川と野田川・岡山県笹ケ瀬川の個体はカマツカ、愛知県豊川と巴川の個体はナガレカマツカ、茨城県里川の個体はスナゴカマツカと同定された。山梨県笛吹川と相川のカマツカは RAG1 系統樹（Fig. 3）では近縁であったが、Cyt*b* 系統樹と COI 系統樹では山梨県笛吹川のカマツカは茨城県里川のスナゴカマツカと近縁であった (Figs. 1, 2)。Tominaga et al. (2016) においても同様の現象が報告されており、これは山梨県在来のスナゴカマツカと移植されたカマツカが交雑した結果、ミトコンドリア DNA の遺

伝子浸透が生じたためであると考えられる（向井, 2001）。ナガレカマツカとスナゴカマツカの分岐は日本アルプス（中央高地）の形成によると考えられている（Tominaga et al. 2016）。本研究において、ナガレカマツカとスナゴカマツカの分岐が約560 万年前であると推定され、Tominaga et al.（2016）が推定した分岐年代（約 490 万年前）に近い結果が得られた（Fig. 7）。日本アルプスの中で隆起の始まりが最も早かったのは飛騨山脈（北アルプス）で約 300 万年前であり、最も遅かったのは木曽山脈で約 70 万年前（中央アルプス）であるので（町田ほか 2006）、これらは日本アルプスの形成以前に分岐したと考えられた。

モツゴ属については、シナイモツゴとウシモツゴの分岐は約680万年前であると推定された（Fig. 7）。 シナイモツゴとウシモツゴの分岐は日本アルプス（中央高地）の形成によると考えられている（川瀬私信）。これらも日本アルプスの形成以前に分岐したと考えられた。

上述した東海地方のカワヒガイと滋賀県以西のカワヒガイの分岐やナガレカマツカとスナゴカマツカ、シナイモツゴとウシモツゴの分岐は、遺伝的交流の阻害を引き起こしたと推定される山地・山脈の隆起開始以前に起こったと推定された（Fig. 7）。当然ながら山地・山脈の隆起開始より遥か以前に淡水魚類が分散できないような高地が既に形成されていた可能性も考えられる。一方、本研究では Zardoya and Doadrio（1999）がヨーロッパ産コイ科魚類の研究から得た Cyt*b* 遺伝子の進化速度 0.76 %/MYA を用いたが、日本においては Cyt*b* 遺伝子の進化速度が異なる可能性もある。仮に、ナガレカマツカとスナゴカマツカの分岐が飛騨山脈の隆起の始まった 300 万年前であったとすると、東海地方のカワヒガイと滋賀県以西のカワヒガイの分岐は 107 万年前となり、鈴鹿山脈の隆起した 150–100 万年前との整合性も得られる。この場合、Cyt*b* 遺伝子の進化速度は 1.41 %/MYA となる。今後多くの魚類のデータを用いて日本における遺伝子の進化速度を基に分岐年代を推定する必要があると思われる。

Hosoya（1986）および細谷（1989）は主に骨学的特徴に基づき、カマツカ類を狭義のカマツカ亜科、ヒガイ亜科、モロコ亜科（細谷 1989; 細谷 1996、ただし、細谷 2001 ではバルブス亜科）の 3 亜科に分類した。さらに狭義のカマツカ亜科のうち、半底生生活を行うグループ 1、完全底生生活を行うグループ 2 に分類し、狭義のカマツカ亜科、ヒガイ亜科、モロコ亜科の全てを含む単系統群を広義のカマツカ亜科とした。本研究の Cyt*b*+COI+RAG1 系統樹（Figs. 4, 5）において、グループ 1 と 2 は各々Hosoya（1986）の狭義のカマツカ亜科グループ 1 と 2 と、グループ 3 はモロコ亜科、グループ 4+5 はヒガイ亜科と同じ属を含んでいた。狭義のカマツカ亜科のグループ 1 と 2 の各々は単系統群を形成したものの、グループ 2 がグループ 1 よりもヒガイ亜科+モロコ亜科と近縁であった。Liu et al.（2010）はミトコンドリアの Cyt*b* 遺伝子を用いて分子系統解析を行い、カマツカ類をニゴイグループ（ニゴイ属・スゴモロコ属）、ゴビオグループ（ゴビオ属・ロマノゴビオ属・メソゴビオ属）、カマツカグループ（カマツカ属・ゼゼラ属・ツチフキ属・ドジョウカマツカ属・トカゲカマツカ属・コブクロカマツカ属）、ヒガイグループ（ヒガイ属・ムギツク属・モツゴ属・タモロコ属）に分類し、カマツカグループはニゴイグループよりもヒガイグループと近縁であることを示した。Tang et al.（2011）は 4 つの遺伝子を用いて中国、韓国、ロシア、日本のカマツカ類の系統解析を行い、カマツカ類をニゴイ・スゴモロコ群（ニゴイ属・スゴモロコ属）、カマツカ族（カマツカ属・ゼゼラ属・ツチフキ属・ドジョウカマツカ属・トカゲカマツカ属・コブクロカマツカ属・ゴビオ属・ロマノゴビオ属）、ヒガイ族（ヒガイ属・ムギツク属・モツゴ属・タモロコ属）に分類し、カマツカ族はニゴイ・スゴモロコ群よりもヒガイ族と近縁であることを示した。さらに Zhao et al.（2016）は mtDNA の完全長の塩基配列を用いて、カマツカ類をクレード A（ニゴイ属）、クレード B （*Coreius* 属）、クレード C（カマツカ属・ゼゼラ属・ツチフキ属・ドジョウカマツカ属・コブクロカマツカ属・ゴビオ属）、クレード D（ヒガイ属・ムギツク属・モツゴ属・タモ

ロコ属）に分類し、カマツカ属を含むクレードCはニゴイ属を含むクレード A よりもヒガイ属を含むクレード D と近縁であることを示した。このことは、分子系統学的な研究が本研究と同様に、狭義のカマツカ亜科の単系統性を支持しなかったことを示しているが、系統関係については今後核DNA の網羅的な解析や、形態学、生態学、その他の分野からの詳細な検討が必要と思われる。

タモロコの塩基配列における先行研究との矛盾

茨城県のタモロコと Tang et al.（2011）の琵琶湖のタモロコの塩基配列を比較したところ、両者の一致率は 89.60 %であり、10.40 %という大きな遺伝的な違いがみられた。本研究で解析された茨城県と山梨県のタモロコと、Tang et al.（2011）のタモロコと Kakioka et al.（2013）のホンモロコとタモロコの E1、E2、E3 各グループとの間で Cyt*b* 遺伝子の塩基配列（1045 bp）の比較を行ったところ、茨城県のタモロコは E1 に属し、Tang et al.（2011）のタモロコは E2 に属した（Table 4）。それゆえ、塩基配列の相違は解析したサンプルが異なる種内系統に属していたためであることが明らかとなった。E1 と E2 の間には約 10 %もの塩基配列の違いがあるため、別種である可能性が高いと思われるが、現時点ではそれを裏付けるほどの形態学的・生態学的差異は見出されていない（Kakioka et al. 2015）。今後の分類学的な研究が期待される。

また、Kakioka et al.（2013）は長野県よりも東に棲息するタモロコの解析は行っていないが、本研究では茨城県（大円寺川）・福島県（猪苗代）・新潟県（野辺川）・山梨県（相川、釜無川）のタモロコを解析した（Fig. 6）。茨城県・福島県・新潟県のタモロコは E1、山梨県のタモロコは E3 に属し、新たな系統はみられなかった。東日本のタモロコは西日本からの移植によるものとされているが、茨城県・福島県・新潟県の E1 のタモロコは、ゲンゴロウブナ *Carassius cuvieri* やコイ *Cyprinus carpio* に伴い移植されたと考えられる (Kakioka et al. 2013)。

Kakioka et al.（2013)は、タモロコの E3 は絶滅した諏訪湖固有亜種であるスワモロコ（*G. elongatus suwae*）に関連したグループである可能性を示唆し、長野県の天竜川水系にのみ分布するとした。本研究の山梨県のタモロコの 2 個体も E3 に属したが（Fig. 6）、山梨県富士川水系（相川、釜無川）と長野県天竜川水系のタモロコの Cyt*b* 遺伝子の塩基配列（1045 bp）の間には、4.60 %の違いがみられた（Table 4）。このことから、山梨県と長野県のタモロコは嘗て同じ水系に棲息していたが、地質学的イベントによって水系が分断されて変異が蓄積したと考えられる。Shimizu et al.（1993）は、カワヨシノボリ *Rhinogobius flumineus* についてアロザイム分析を行い、富士川と天竜川の個体群は遺伝的な相違は大きいものの、同じグループに属することを示したが、このことも嘗て富士川水系と天竜川水系の間に交流があったことを裏付けていると考えられる。分散を阻害した地質学的イベントとして、富士川水系と諏訪湖（天竜川水系）とを分断した八ヶ岳の噴火による韮崎岩屑流が想定されたが、山梨県と長野県のタモロコの分岐は約 300 万年前であり（Fig. 7）、富士川水系と天竜川水系（の前身）は韮崎岩屑流（約 20 万年前）や諏訪湖の形成（150～120 万年前）より遥か以前に分断されていた可能性が示唆された（藤森 1991; 熊井 1997）。

本研究では、近年報告された種や種内系統を含めたカマツカ類の系統関係を示し、それらのカマツカ亜科内での系統分類学的位置を明らかにした。また、カマツカ類の分岐年代を示し、これまでの研究によって得られた大きく異なる推定値の問題を解決し、カマツカ亜科におけるより信頼性のある進化史を明らかにした。

謝辞

本論文の研究、執筆にあたり、サンプルを提供してくださった滋賀県立琵琶湖博物館の松田征也氏、川瀬成吾氏、カマツカ類の棲息情報を提供してくださった加地弘一氏、加地奈々氏、浅香智也氏、稲葉　修氏、井藤大樹氏、系統解析をサポートしていただいた飛弾聖也氏、村田賢哉氏、佐野　勲氏に謹んで感謝の意を申し上げます。

引用文献

Bănărescu, P. M., Nalbant, T. T. (1965). Studies on the systematics of Gobioinae (Pisces, Cyprinidae). Rev. Roum. Biol. Zool. 10: 219–229.

Bănărescu, P. M., Nalbant, T. T. (1973). Pisces, Teleostei. Cyprinidae (Gobioninae). Das Tierreich 93: 1–304.

Bleeker, P. (1863). Systema cyprinoideorum revisum. Ned. Tijdschr. Dierk. 1: 187–218.

Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C. H., Xie, D., Suchard, M. A., Rambaut, A., Drummond, A. J. (2014). BEAST 2: A software platform for Bayesian evolutionary analysis. PLOS Comput. Biol. 10: e1003537.

Briolay, J., Brito, N., Brito, R. M., Bouver, Y. (1998). Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome *b* DNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 9:100–108.

Chu, Y.-T. (1935). Comparative studies on the scales and on the pharyngeals and their teeth in Chinese cyprinids, with particular reference to taxonomy and evolution. Biol. Bull. St. John's Univ. 2: 1–225.

Cunha, C., Mesquita, N., Dowling, T. E., Gilles, A., Coelho, M. M. (2002). Phylogenetic relationships of Eurasian and American cyprinids using cytochrome *b* sequences. J. Fish Biol. 61: 929–944.

Eschmeyer, W. N., Fong., J. D. (2023). Eschmeyer's catalog of fishes: Genera/species by Family/Subfamily. http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp. (accessed on 13 January 2023).

藤森孝俊 (1991). 活断層からみたプルアパートベイズンとしての諏訪盆地の形成．地理学評論 64: 665–696.

Hosoya, K. (1986). Interrelationships of the Gobioninae (Cyprinidae). In: T. Uyeno, R. Arai, T. Taniuchi, K. Matsuura (Eds.) Indo–Pacific Fish Biology. Proceedings of the Second International Conference on Indo–Pacific Fishes, Ichthyological Society of Japan, Tokyo, 484–501.

細谷和海 (1989). 山渓カラー名鑑 日本の淡水魚 初版. （編・監）川那部浩哉・水野信彦．山と渓谷社, 東京, p.297-301, 310-327.

細谷和海 (1996). 山渓カラー名鑑 日本の淡水魚 2 版. （編・監）川那部浩哉・水野信彦. 山と渓谷社, 東京, p.297-301, 310-327.

細谷和海 (2001). 山渓カラー名鑑 日本の淡水魚 3 版. （編・監）川那部浩哉・水野信彦. 山と渓谷社, 東京, p.297-301, 310-327.

細谷和海 (2019).山渓ハンディ図鑑 15 増補改訂 日本の淡水魚. 山と渓谷社, 東京.

Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R., Bollback, J. P. (2001). Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. Science 294: 2310–2314.

Jang-Liaw, N., Tominaga, K., Zhang, C., Zhao, Y., Nakajima, J., Onikura, N., Watanabe, K. (2019). Phylogeography of the Chinese false gudgeon, *Abbottina rivularis,* in East Asia, with special reference to the origin and artifcial disturbance of Japanese populations. Ichthyol. Res. 66: 460–478.

Jordan, D. S., Fowler, H. W. (1903). A review of the cyprinoid fishes of Japan. Proc. US Natl. Mus. 26: 811–862.

Kakioka, R., Kokita, T., Tabata, R., Mori, S., Watanabe, K. (2013). The origins of limnetic forms and cryptic divergence in *Gnathopogon* fishes (Cyprinidae) in Japan. Environ. Biol. Fish. 96: 631–644.

Kakioka, R., Kokita, T., Kumada, H., Watanabe, K., Okuda, N. (2015). Genomic architecture of habitat–related divergence and signature of directional selection in the body shapes of *Gnathopogon* fishes. Mol. Ecol. 24: 4159–4174.

川辺孝幸 (1994). 琵琶湖のおいたち．琵琶湖の自然史 琵琶湖とその生物のおいたち．（編）琵琶湖自然史研究会．八坂書房, 東京, p. 25–72.

Kawase, S., Hosoya, K. (2010). *Biwia yodoensis*, a new species from the Lake Biwa/Yodo River Basin, Japan (Teleostei: Cyprinidae). Ichthyol. Explor. Freshw. 21:1–7.

Kawase, S., Hosoya, K. (2015). *Pseudorasbora pugnax*, a new species of minnow from Japan, and redescription of *P. pumila* (Teleostei: Cyprinidae). Ichthyol. Explor. Freshw. 25: 289–298.

Kim, K. Y., Lim, Y. H., Bang, I. C., Nam, Y. K. (2009). Phylogenetic relationships among three new *Hemibarbus* mitogenome sequences belonging to the subfamily Gobioninae (Teleostei, Cypriniformes, and Cyprinidae). Mitochondrial DNA 20: 119–125.

Kim, K., Ko, M., Liu, H., Tang, Q., Chen, X., Miyazaki, J.–I., Bang, I. (2013). Phylogenetic relationships of *Pseudorasbora*, *Pseudopungtungia*, and *Pungtungia* (Teleostei; Cypriniformes; Gobioninae) inferred from multiple nuclear gene sequences. BioMed. Res. Int. 2013: 1–6.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16: 111–120.

Kochzius, M., Seidel, C., Antoniou, A., Botla, S. K., Campo, D., Cariani, A., Vazquez, E. G., Hauschild, J., Hervet, C., Hjörleifsdottir, S., Hreggvidsson, G., Kappel, K., Landi, M., Magoulas, A., Marteinsson, V., Nölte, M., Planes, S., Tinti, F., Turan, C., Venugopal, M. N,, Weber, H., Blohm, D. (2010). Identifying fishes through

DNA barcodes and microarrays. PLOS ONE 5: e12620.
Komiya, T., Fujita-Yanagibayashi, S., Watanabe, K. (2014). Multiple colonizations of Lake Biwa by *Sarcocheilichthys* fishes and their population history. Environ. Biol. Fish. 97: 741–755.
Kryzhanovsky, S. G. (1947). Sistema semeistva karpovych ryb (Cyprinidae). Zool. Zh. 26: 53–64.
熊井久雄 (1997). 諏訪湖のおいたち–諏訪盆地とその周辺地域の地史の概要 特集 「諏訪湖」. URBAN KUBOTA 36: 2–11.
Liu, H. Z., Yang, J. Q., Tang, Q. Y. (2010). Estimated evolutionary tempo of East Asian gobionid fishes (Teleostei: Cyprinidae) from mitochondrial DNA sequence data. Chin. Sci. Bull. 55: 1501–1510.
町田洋・松田時彦・海津正倫・小泉武栄 (2006). 中部の地形発達史. 日本の地形 5 中部.（編）町田洋・松田時彦・海津正倫・小泉武栄. 東京大学出版会, 東京, p.323–349.
Miya, M., Nishida, M. (2000). Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: a tree–based exploration under the maximum–parsimony optimality criterion. Mol. Phylogenet. Evol. 17: 437–455.
向井貴彦 (2001). 魚類の種分化プロセスにおける交雑と遺伝子浸透. 魚類学雑誌 48: 1–18.
Near, T. J., Eytan, R. I., Dornburg, A., Kuhn, K. L., Moore, J. A., Davis, M. P., Wainwright, P. C., Friedman, M., Smith, W. L. (2012). Resolution of ray–finned fish phylogeny and timing of diversification. Proc. Natl. Acad. Sci. 109: 13698–13703.
Nelson, J. S. (1994). Fishes of the world Third edition. John Wiley & Sons Inc., New York.
Nelson, J. S., Grande, T. C., Wilson, M. V. (2016). Fishes of the World Fifth edition. John Wiley & Sons. Inc., New York.
Nikolskii, G. V. (1954). Chastnaya Ikhtiologiya. Sovetskaya Nauka, Moscow (originally in Russian, but translated in English by Lengy, J.I., Krauthamer, Z., 1961. Special Ichthyology. Israeli Program for Scientific Translations, Jerusalem).
太田陽子・成瀬敏郎・田中眞吾・岡田篤正 (2004). 近畿・中国・四国の地形発達史. 日本の地形 6 近畿・中国・四国. （編）太田陽子・成瀬敏郎・田中眞吾・岡田篤正. 東京大学出版会, 東京, p. 329–351.
斉藤憲治 (2014). コイ科魚類の系統と分類. 海洋と生物 36: 116–124.
Shimizu, T., Taniguchi, N., Mizuno, N. (1993). An electrophoretic study of genetic differentiation of a Japanese freshwater goby, *Rhinogobius flumineus*. Jpn. J. Ichthyol. 39: 329–343.
Swofford, D. L. (2002). PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0 beta 10. Sinauer Associates, Sunderland.
Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30: 2725–2729.
Tanabe, A. S. (2011). Kakusan4 and Aminosan: two programs for comparing nonpartitioned, proportional and separate models for combined molecular phylogenetic analyses of multilocus sequence data. Mol. Ecol. Res. 11: 914–921.
Tang, K. L., Agnew, M. K., Hirt, M. V., Sado, T., Schneider, L. M., Freyhof, J., Sulaiman, Z., Swartz, E., Vidthayanon, C., Miya, M., Saitoh, K., Simons, A. M., Wood, R. M., Mayden, R. L. (2010). Systematics of the subfamily Danioninae (Teleostei: Cypriniformes: Cyprinidae). Mol. Phylogenet. Evol. 57: 189–214.
Tang, K. L., Agnew, M. K., Chen, W.-J., Vincent, M., Raley, M. E., Sado, T., Schneider, L. M., Yang, L., Bart, H. L., He, S., Liu, H., Miya, M., Saitoh, K., Simons, A. M., Wood, R. M., Mayden, R. L. (2011). Phylogeny of the gudgeons (Teleostei: Cyprinidae: Gobioninae). Mol. Phylogenet. Evol. 61: 103–124.
Taniguchi, S., Bertl, J., Futschik, A., Kishino, H., Okazaki, T. (2021). Waves out of the Korean Peninsula and inter- and intra-species replacements in freshwater fishes in Japan. Genes 12: 303.
Tominaga, K., Nakajima, J., Watanabe, K. (2016). Cryptic divergence and phylogeography of the pike gudgeon *Pseudogobio esocinus* (Teleostei: Cyprinidae): a comprehensive case of freshwater phylogeography in Japan. Ichthyol. Res. 63: 79–93.
Tominaga, K., Kawase, S. (2019). Two new species of *Pseudogobio* pike gudgeon (Cypriniformes: Cyprinidae: Gobioninae) from Japan, and redescription of *P. esocinus* (Temminck and Schlegel 1846). Ichthyol. Res. 66: 488–508.
Watanabe, K., Kawase, S., Mukai, T., Kakioka, R., Miyazaki, J.–I., Hosoya, K. (2010). Population divergence of *Biwia zezera* (Cyprinidae: Gobioninae) and the discovery of a cryptic species, based on mitochondrial and nuclear DNA sequence analyses. Zool. Sci. 27: 647–655.
Wu, X. W. (1964). The Cyprinidae fishes of China, Part I (in Chinese). Shanghai Scientific and Technical Publishers, Shanghai.
Xiao, W., Zhang, Y., Liu, H. (2001). Molecular systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia. Mol. Phylogenet. Evol. 18: 163–173.
Yang, J., He, S., Freyhof, J., Witte, K.–E., Liu, H. (2006). The phylogenetic relationships of the Gobioninae (Teleostei: Cyprinidae) inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene

sequences. Hydrobiologia 553: 255–266.
米倉伸之・貝塚爽平・野上道男・鎮西清高 (2001). 日本の地形発達史. 日本の地形 1 総説. （編）米倉伸之・貝塚爽平・野上道男・鎮西清高. 東京大学出版会, 東京, p. 297–322.
Zardoya, R., Doadrio, I. (1999). Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. J. Mol. Evol. 49: 227–237.
Zhao, J., Xu, D., Zhao, K., Diogo, R., Yang, J., Peng, Z. (2016). The origin and divergence of Gobioninae fishes (Teleostei: Cyprinidae) based on complete mitochondrial genome sequences. J. Appl. Ichthyol. 32: 32–39.
Zhou, J. J. (1990). The Cyprinidae fossil from middle Miocene of Shanwang Basin. Vertebr. Palasiatic. 28: 95–127.

和文要旨

本研究では、日本を含むアジアを中心に繁栄しているコイ科カマツカ類の信頼性の高い系統関係を示すために、近年報告された新種や新たな種内系統を含めた日本産カマツカ類全種を用いて、ミトコンドリアの Cyt*b* 遺伝子と COI 遺伝子及び核の RAG1 遺伝子の塩基配列を決定して系統解析を行った。また、先行研究と当研究室の研究の間でみられたタモロコの Cyt*b* 遺伝子の塩基配列の相違について、その矛盾を解決するために系統解析を行った。その結果、カマツカ類の属の分類は支持され、属間の関係もこれまでの分子系統解析の結果に概ね一致した。カマツカ類の起源は約 3000 万年前と推定され、Liu et al.（2010）の分岐年代推定の結果（約 2900 万年前）にほぼ一致した。タモロコの塩基配列の 10 %の相違は、各々の研究で用いたタモロコが、別種の可能性が高い異なる種内系統に属していたためであることが明らかになった。

Received: 18 August 2023 | Accepted: 16 October 2023 | Published: 24 October 2023