

## 特集

## 分子系統樹を用いた分岐年代推定と生物多様化プロセス解析の概要

昆 健志\*・井上 潤\*\*,\*\*\*

\*琉球大学研究企画室・\*\*沖縄科学技術大学院大学マリンゲノミクスユニット・\*\*\*国立遺伝学研究所集団遺伝研究室

## An outline of estimation of divergence time and diversification process based on the molecular phylogenetic tree

Takeshi Kon\* and Jun Inoue\*\*,\*\*\*

\*Research Planning Office, University of the Ryukyus, 1 Senbaru, Nishihara, Okinawa 903-0213, Japan (kontake@lab.u-ryukyuu.ac.jp);

\*\*Marine Genomics Unit, Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University, 1919-1 Tancha, Onna, Okinawa 904-0495, Japan (jun.inoue@oist.jp); \*\*\*National Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan (jun.inoue@nig.ac.jp)

**Abstract.** Understanding the process by which life diversifies is one of the central issues in biology. To clarify this process in focal taxa as well as to conduct phylogenetic analyses, a divergence time estimation—an important analysis to determine the timescale of a phylogenetic tree—must be performed. It is thought that the diversification process can be vividly reconstructed by estimating the diversification rate and ancestral geographic area, characterizing ancestral ecology, and mapping ancestral habitats according to a time-calibrated phylogenetic framework. Here we introduce a divergence time estimation method and various other methods for reconstructing the process of diversification based on the time-calibrated phylogenetic framework with some study examples of aquatic organisms, mainly fish.

**Keywords:** molecular phylogeny, divergence time, supermatrix, character evolution, diversification process, geographic range evolution

## はじめに

地球上の生物の多様化プロセスを理解することは、進化生物学における最大の問題の一つである。その解決のためには、生物を比較する際の進化的な基準を与える信頼度の高い系統関係を推定することが重要である。20世紀末になり、DNA塩基配列の解析技術が発展するにつれて、現生の生物において分子系統解析が広く普及してきた。従来、系統解析は形態などの表現型の比較に基づいていたが、分子系統解析はそれら表現型の元にあたる遺伝子型に基づいた解析であるため、表現型を比較するよりも、見た目の類似の影響を受けにくく、直接的な系統推定が可能だと考えられる。もちろん、古い化石などしか試料がない場合は、そこからDNA情報を得ることが難しく、分子系統解析が適用できないことも多い。しかしながら、近年、次世代シーケンサーを用いることにより、比較的新しい時代のネアンデルタール人などの化石では、分子系統解析も可能となる場合も生まれてきた。

このように普及してきた分子系統解析も、以前はDNAのごく短い配列のみが用いられてきた。しかしながら、今ではゲノム全体を使った研究も増え、私たちは膨大な

データを解析に用いることが可能になった。これに加えて、洗練された統計的方法やモデル、コンピューターの登場によって、信頼度の高い系統推定が日常的におこなえるようになった。

生物の多様化プロセスを明らかにするためには、その基盤となる系統樹の構築だけではなく、引き続いて、その系統樹に時間軸を与えるために分岐年代を推定することも重要な解析ステップの一つである。加えて、その時間軸付き系統樹上で、いつ多様化が起きたのかを知るための多様化速度の変化の検出、祖先がどのような形質を保持していたかの推定、そして祖先分布域変遷の推定などの様々な解析をおこなえば、より臨場感あふれる多様化プロセスの復元が可能となる。

DNAなどを用いた分子系統解析は主に現生種を対象とした分析ではあるが、過去を復元するための証拠として、化石は解析に地質学的な次元をもたらす。特に分岐年代推定の年代較正に化石は必要不可欠である。また、分子系統樹上に化石種をマッピングすれば、祖先形質やかつての分布域を推定する際の強力な証拠となりうる。本稿では、以上の点を踏まえながら、系統樹を基にした分岐年代推定とその他の様々な解析方法を、魚類を中心とし

た水圏生物の研究例とともに紹介する。

## 分子系統樹の構築

### 系統解析法の発展

生物の多様化プロセスを解明するための最初のステップは、系統樹の構築である。生物学的な比較をする上で、系統関係を明らかにするという点では、その比較に進化的な基準を与えるという点で不可欠なことである。現生種における系統解析では、この20～30年ほどの間におけるDNAシーケンサーとパーソナルコンピュータの発展と普及、統計的な手法の開発により、分子情報を用いた分析が生物学研究者の間に広く浸透してきた。クラリベイト・アナリティクス社の論文データベースであるWeb of Scienceにおいて「molecular phylogeny」でトピック検索すると、1995年におけるarticleの収録論文数が337編に対して、2018年は2870編という8.5倍増の結果が得られる(2019年5月15日に検索)。

分子系統解析の方法には、距離行列法と形質状態法という大きな2つの方法がある。前者には非加重結合法(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, UPGMA)と近隣結合法(Neighbor Joining, NJ)が含まれ、後者には最節約法(Maximum Parsimony, MP)、最尤法(Maximum Likelihood, ML)およびベイズ法(Bayesian method)などが含まれる。距離行列法は、例えば2本の配列を比較して変異を遺伝距離(最も単純だと変異の割合)に変換して計算する。一方の形質状態法は、座位ごとの状態(塩基やアミノ酸)の変異に基づいて計算する。計算速度が速いという利点のある距離行列法では、近隣結合法が昨今の分子系統解析で頻りに用いられる。形質状態法では、分子進化モデルが適用できる最尤法とベイズ法が良く使われている。分子系統解析の詳細な解説はYang(2006)などを参考にされたい。

### 大規模な系統樹の構築

多様化プロセスを解明するとき、なるべく対象とする分類群を網羅する必要があるため、大規模な系統解析となる場合も多い。本来なら、標本を収集して必要な分を揃えなければならないが、対象種が希少であったり、採集が困難であったりする場合には、既存のデータをNCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)などのDNAデータベースからダウンロードして利用することになる。その場合に利用するのが、supermatrix法かsupertree法(例えば、Sanderson *et al.*, 1998; Bininda-Emonds *et al.*, 2002)である。

supermatrix法は、ある分類群の大枠の系統樹(backbone tree)を長い配列データを用いて頑健に構築し、DNAデータベースに登録されている(短い)塩基配列データをその大枠の系統樹上に位置づける方法である。

ただし、大枠を構築せずに初めから様々な配列をひとつのマトリックスにまとめて一度に解析する場合もある。大枠ありの例では、Takada *et al.* (2010)は東アジアのフナ属魚類の分子系統をsupermatrix法で解析した。この論文では、はじめにミトコンドリアDNAのND4, ND5, *cytb*の3遺伝子に調節領域(control region)の塩基配列を加えたデータセットで日本産フナ属魚類の頑健な系統樹(backbone tree)を構築し、次に海外産のDNA登録データ(*cytb*, ND5またはCRのいずれか)をその系統樹に位置づけ、ヨーロッパ～中国産のデータを加えた網羅的な系統樹を作成している。系統解析は最尤法のソフトウェアであるRAxML(Stamatakis, 2006)でおこない、「-r」オプションを用いて樹型をbackbone treeに基づき制約して、登録データをそのbackbone treeに位置づけている。

一方のsupertree法は、既存の規模の小さな系統樹を統合して大規模な網羅的系統樹を構築するという方法であり、MRP(Matrix Representation using Parsimony)法などが代表的である。例えば、Davis *et al.* (2016)では1986年から2011年にかけて出版された40編の論文より60本の系統樹(ソースツリーと呼ぶ)を抽出し、これらをひとつの大きな系統樹に統合している(図1)。この方法は、短い時間で大規模な系統樹を構築できるという利点がある。しかし、その際に個々の系統樹(ソースツリー)に含まれていた系統情報を失ってしまう欠点もあることから(Bininda-Emonds *et al.*, 2002)、そこを留意しながらsupertreeを利用する必要があるだろう。supertree法の詳細な解説はBininda-Emonds *et al.* (2002)やBininda-Emonds(2004)などを参照されたい。

## 分岐年代推定

分岐年代推定は、生物の進化プロセスを検討する上で系統樹に時間軸を与えることができる重要な解析である。系統樹に時間軸を与えることによって、はじめて地質学的なイベントとの対比や他の分類群の進化プロセスと同じ土俵での比較が可能となる。しかしながら、その推定には困難が伴うことも多い。そもそも、もしタイムマシンがあったとしても、分岐年代を明らかにするには様々な時代に移動して大規模な生物相調査をしなければならず、解析は非常に難しいに違いない。とは言え、ある分類群の分岐年代推定に挑戦する研究が多いということは、分岐年代がその生物の進化プロセスを明らかにしたい場合の必要な基準だからであろう。そのような分岐年代推定ではあるが、少しでも信頼性を高めるために、多くの研究者によって解析方法の開発と改良がおこなわれてきた。

分岐年代推定では、以前から化石よりも分子による推定の方が古い値を示すという結果の不一致が指摘されて

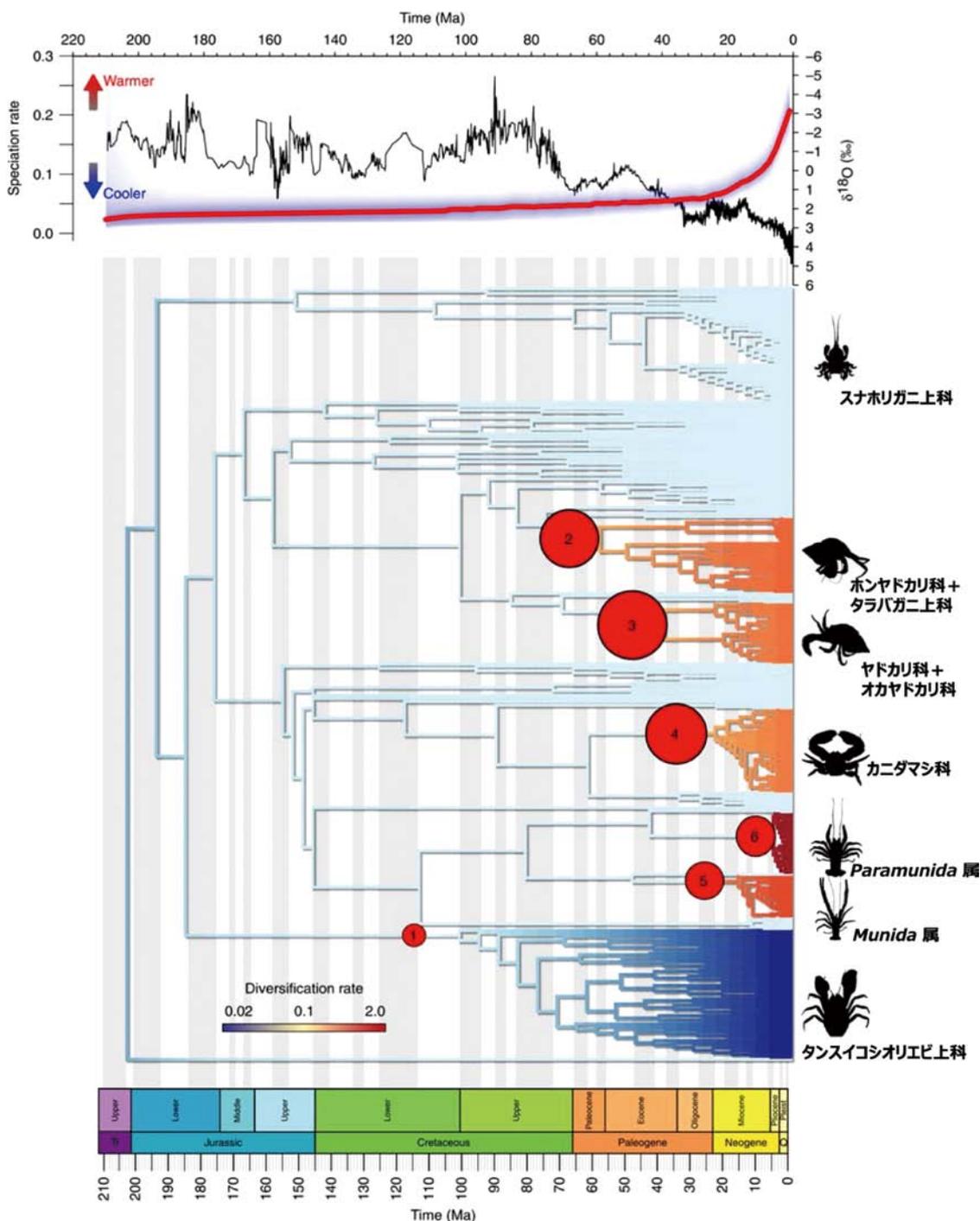


図1. 異尾下目における多様化率の変化したタイミングを示した系統樹 (Davis *et al.*, 2016 を改変, CCライセンス BY). 系統樹は既知の小規模な60本の系統樹 (ソースツリー) を supertree 法によって統合して構築された. 枝上の色は多様化率を示し (青が低く, 赤が高い), 赤い円は多様化率の変化が検出された枝を示し, その大きさは周辺確率の大きさに対応する. 上段のパネルは  $\delta^{18}\text{O}$  の変動を示す. Tr; Triassic, Pleist; Pleistocene, Q; Quaternary.

いた. その一因として, 化石データが不十分 (種の形態的特徴獲得より遺伝的な隔離の年代が先) であるということ, 分子による年代推定法に欠陥があることが考えられている (Yang, 2006).

かつて分岐年代推定をおこなうには, 分子時計や最尤法 (例えば, r8s ソフトウェア: Sanderson, 2003) を用いた

方法が一般的であった. しかし, 分子時計を用いた方法は, 系統によって配列の進化速度が異なるために適用できない場合が多い. また r8s など最尤法を用いた方法は, 事前の条件設定などが詳細にできない. そこで最近では, ベイズ法を用いた方法が主流となっている. ベイズ法を用いた年代推定は, 様々な情報 (特に分子と化石データ

の両方)を解析に用いることができ、化石情報が不確実であることを解析に反映できる唯一の方法とされている。ただし、上述したr8sやRパッケージのpaleotree (Bapst, 2012)は、樹長付き樹型ファイルと年代制約のみで塩基配列データを使わないため、supertreeやsupermatrix treeなどの統合型系統樹の分岐年代推定には有効である。

以下、本章の分岐年代推定に関しては第二著者の管理するウェブサイト (<http://fish-evol.org>) に掲載された解説文を基に再検討して記述した。

### 化石による制約の重要性

分岐年代推定に影響を及ぼす要因はいくつか存在する。要因としては、進化速度(塩基置換速度)の事前確率(任意に設定した条件)、進化速度の一定性(分子時計をどの程度緩くするか)、進化速度の分岐間の関連性、塩基置換モデル、分岐年代の制約、尤度の概算、などが考えられる。

Inoue *et al.* (2010a)は、年代推定には上述のような要因のうちどれが重要であるかを検討するために、2つのベイズMCMC解析プログラムであるMULTIDIVTIME (Thorne *et al.*, 1998) およびMCMCTREE (Yang and Rannala, 2006)を用いて、両生類、条鰭類(現生のいわゆる魚類の大部分を占めるグループ)、ネコ科のデータセットを解析した。その解析結果は次の通りであった。(1)系統間の進化速度が大きく異なったため、どのデータセットに対しても分子時計(進化速度が一定)を仮定することはできなかった。(2)進化速度が分岐間で関連があるとするモデルと独立しているとするモデルのどちらを用いても、結果に大きな違いは見られなかった。(3)化石記録に基づく年代の制約は、事後確率(推定年代)に最も大きな影響を及ぼした。

注目したいのは(3)の結果である。Inoue *et al.* (2010a)では、下限制約(対象とする分岐がその制約年代より古いとする制約)に施す事前確率(任意に設定した条件)を変化させると、これが年代推定に大きな影響を及ぼした。このことは、これまでに出版されている様々な分岐年代推定を扱う論文の結果は、それぞれの論文で採用されている下限制約の事前分布(あるいは制約に用いる化石の選択)に大きく依存していたことを意味する。

以上のように、当然ではあるが分子年代推定では化石制約が極めて重要である。種の分岐年代推定に利用可能な化石情報を統計的にまとめ、化石それぞれの信頼性を高めて利用可能にするには、化石がどのように堆積・保存され、そしてサンプリングされるのかを示した確率モデルが必要と考えられる。

### 制約の選び方

分岐年代推定では、主に化石記録に基づいていくつかの分岐に制約を設定(年代較正)する必要がある、上述

したようにその設定が分岐年代推定に極めて重要である。しかしながら、年代較正に有用な化石記録が都合良くそろっている場合は少ない。Benton and Donoghue (2007)は、少ない化石を有効に使えるような化石記録を用いた場合の制約設定について議論している。

制約として用いることができる化石は、かなりしっかりとした条件がそろったものとなる。その条件とは、(1)どのグループに属するか判明しているか(高い信頼度のある同定)、(2)グループがわかっている場合に系統樹上での位置が判明しているか、(3)現生種を含めた頑健な系統関係が得られているか(化石・形態データと分子データで樹形の整合性がとれているか)、(4)最古の化石であるか、などがあげられる。Benton and Donoghue (2007)では、これらの問題がクリアされている化石情報を、どのように分子データを用いた分岐年代推定に適用するかを検討している。

年代の較正に用いる制約には、下限制約(Lower constraint: minimum constraintあるいはminimum age)と上限制約(Upper constraint: maximum constraintあるいはmaximum age)の2つがある。下限制約は、対象とする分岐がその制約年代より古いとする制約(少なくとも××年前までに分岐したとする制約)で、一方の上限制約は、対象とする分岐がその制約年代より新しいという制約(少なくとも××年前より後に分岐したとする制約)を指す。

下限制約の選び方は上限制約ほど難しくないとと言える(図2)。対象とする分岐群に含まれる(分岐の後に派生したとされる)系統の最古の化石を下限制約として選ぶ(分岐はその化石よりも古いという制約)。厳密には対象とする分岐から派生した2系統ともに最古の化石が出そろった時点を下限制約とすべきかと考えられるが、これはよほど化石記録が充実している生物を扱っている場合に限られるだろう。

上限制約の設定は、下限制約に比べてより頑健な系統仮説が必要であり、化石記録が相当充実していないと難しい。以下に上限制約の例を3種類あげる(図2)。(例1:分岐A)対象としているクレードにおける最古の化石より一段階古い地層年代を制約とする。この上限制約は化石記録が充実しているグループに限られ、化石が無いということはまだそのグループが表れていない(分岐が生じていない)とする考え方である。図2では分岐Aのステム(根元)から化石が出ていないので、地層1の年代を分岐点Aの上限制約として用いる。

(例2:分岐B)姉妹群最古の化石を上限制約にする。姉妹群が出ているということは、すでに一つ上の分岐が終了しているので、この年代を上限制約にできるだろうと考える。図2では、分岐Bに与える上限制約を考えると、姉妹群であるClade aにつながる系統の最古の化石が地層2から出ているので、地層2の年代を分岐点Bの上限制約

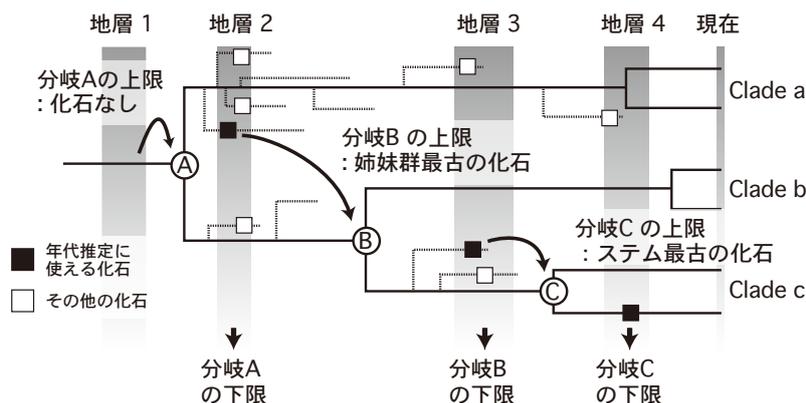


図2. 化石による制約設定の模式図 (Benton and Donoghue 2007 を改変).

に適用する。

(例3: 分岐C) stem group (対象としている分岐の直上の祖先種)の化石を制約とする。図ではClade cの根幹の分岐Cが例として考えられる。Clade cの根幹の分岐Cとその一つ前の分岐Bの間の枝上における最古の化石が地層3から出ていて、最古の化石が知られる地層3の年代を分岐点Cの上限制約に用いる。Stem groupの化石を制約として用いるには、特に化石記録の同定の信頼度が高くなければならない。実際には化石種の系統関係を推定することは困難を伴い、現生種の系統関係が頑健である場合すら少ないので、かなり限られた状況でしか使えないと考えられる。

以上のように上限制約の設定を例示したが、最古の化石年代をそのまま上限制約に適用するには、慎重になる必要があるだろう。例えば、(1) 定説に反して実際には化石があまり出ていない、(2) 同定を可能とする形質を持つ化石が分岐のずっと後からしか得られていない(例: ウナギ目魚類がウナギらしい形になったのは分岐よりもずっと後である)、(3) 分岐のずっと後になって化石として残るほど個体数が増え始めた、など (Hasegawa *et al.*, 2003), 考え出したらきりが無いほど不都合なケースがあるだろう。下限制約の場合は、化石年代が実際の分岐よりかなり若くてもただ単に緩い制約になるだけなので、推定値に悪影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

通常、上限制約の設定は疑問の余地が残るので、厳しい上限制約を設定する場合はsoft bound (上限制約を飛び越える推定値も認める)の設定が好ましいと考えられる。ベイズ法を用いた解析プログラムのBEAST (Bilderbeek and Etienne, 2018) やMCMCTREE (Yang and Rannala, 2006) などはsoft boundに対応している。

BEAST v.2ではMCMCTREEと異なって、化石出生死滅過程 (Fossilized Birth-Death Process) を用いて、分子系統樹に化石記録をマッピングすることによって分岐年代を推定する方法も選択できる (Heath *et al.*, 2014)。この方法では、化石種がどの現生種と近縁なグループを形

成するのかという詳細な情報か、または現生種と化石種をあわせた形態形質のマトリックスが事前に必要であり、実際に適用するには少々ハードルが高いかも知れない。

### 根幹の上限制約の設定例

分子データを用いて分岐年代の推定を行うには、下限制約の他にも、少なくとも根幹の分岐にしっかりとした上限制約が必要である。そのような分岐を見つけるのは通常困難だが、年代推定をおこなうには条鰭類を例にとると2つの戦略が考えられる。

(1) 化石の充実した分岐を解析に入れる。条鰭類の分岐年代推定では、上限制約を与えても良さそうな分岐は、条鰭類と肉鰭類 (シーラカンスなど) の分岐のみである可能性が指摘されている (Kumazawa *et al.*, 1999)。真骨類 (条鰭類に含まれる) など派生的なグループは、上限制約を考えるほどの化石記録が充実していないようである。従って、科の内部の分岐年代を推定する場合でも、条鰭類と肉鰭類の分岐を解析に含めるように分類群を選定する必要がある。例えば、Johnson *et al.* (2012) ではパラオから発見されたムカシウナギとその姉妹群 (ムカシウナギ以外のウナギ目魚類) の分岐年代を推定しているが、その際に条鰭類と肉鰭類の分岐した根幹の年代制約を4億4500万年前としている。その結果、ムカシウナギはその他のウナギ目魚類と約2億2000万年前に分岐したと推定された。

(2) これまで分子データに基づいて推定された根幹および主要な分岐の推定年代 (ベイズ法では95%信用区間も使える) を二次的に用いる。化石記録での年代較正が非常に難しい分類群での系統解析 (例えばナメクジウオなど, Kon *et al.*, 2007) や (1) で記したように科の内部の系統関係を解析する場合、さらには条鰭類と分岐の古い肉鰭類を含めることによって、信頼性の低い系統樹しか構築出来ないことがある場合には、この2次利用は有効である。ただし、推定に基づく推定になってしまうので、その点を十分に考慮する必要があるだろう。近年核

ゲノムから抽出したデータを用いた大規模な魚類全体の系統の分岐年代推定論文もいくつか出版されているので (Near *et al.*, 2012; Betancur-R. *et al.* 2013, 2017; Alfaro *et al.*, 2018; Hughes *et al.*, 2018), これらの論文で推定された分岐年代を2次利用することも可能である。ただし、ミトコンドリアゲノムでは問題にならないが、核ゲノムから得たデータでは、解析に用いる分子マーカーを注意深く選ぶ必要がある。オーソログ (種分化で生じた遺伝子の相同配列) ではなく種系統樹の推定に使えないパラログ (遺伝子重複によって生じた相同配列) が、相同性の判定が不十分だとデータセットに混入してしまう (Gabaldon and Koonin, 2013)。この問題を回避するために、2019年にタンパク質コード遺伝子についてオーソログの判定を高速かつ高精度で実行するウェブツール ORTHOSCOPE (<https://orthoscope.jp>) が開発・公開されており (Inoue and Satoh, 2019), 今後の核遺伝子データセットの信頼性向上が期待される。

### 分岐年代を推定する上での留意点

上述したように分岐年代推定は解析に用いるプログラムや計算する上での条件設定を変えると推定値が大きく変わることがある。実際、これまでに出版された生物の推定分岐年代をまとめているデータベースである TIMETREE (<http://www.timetree.org>) によって対象とする分岐年代を調べると、論文によって推定値が大きく異なることがわかる。このような状況から、条件設定が煩雑で解析速度が遅いベイズ推定を避け、より簡潔に分岐年代を推定する方法を採用する MEGA (Kumar *et al.*, 2018) のようなソフトウェアも存在する (<https://www.megaasoftware.net>)。

分岐年代推定は解析上の注意も必要だが、推定結果の数値の取扱いにも注意が必要である。ベイズ法で推定された分岐年代には必ず95%信用区間 (95% HPD) が示される。これは95%の確率でその区間内に分岐年代値が存在することを意味している。従って、平均の年代値だけでなく信用区間も考慮して数値を扱うべきである。例えば、推定値が25 Mya (HPD: 10–50 Mya) だった場合、分岐年代をピンポイントで25 Myaとするのではなく、10–50 Myaの幅があるものとして扱う。年代の制約が緩い場合には、しばしばこの区間が長くなるが、無視して考察に用いることは避けるべきである。

現在の年代推定は、事前条件によって変わることもあり、計算された数値にも幅があることから、多くの人が期待するよりは大まかなものかも知れない。しかしながら、これまで利用がかなわなかった「系統樹に時間軸を入れる」ということを可能にし、地質イベントや他の生物群の分岐年代との対比のような考察への糸口となるという点で、進化を研究する上で有用なものであると言える。

### 祖先形質の推定

限られた条件の中で分岐年代を推定したあと、その構築された時間軸付き系統樹を用いて、対象となる分類群の進化・多様化プロセスを推定することが可能である。ここでは、構成する種が備える多様な形質がどのように進化してきたか、つまり祖先形質の変遷を推定する方法を紹介する。

### 推定に用いるプログラム

系統学的研究では、形態のおよび生態的な多様性に富む分類群を系統解析の対象とすることも多い。それらの系統関係を明らかにしたあと、対象とする生物がどのように進化してきたかを明らかにするためには、各分岐の時点で祖先種がどのような形質状態だったかを推定する必要がある。そのような祖先形質を推定する代表的なプログラムとしては、Mesquite (Maddison and Maddison, 2018) や BayesTraits (Pagel and Meade, 2016) などが良く知られていて、プログラムによって最節約法、最尤法およびベイズ法の何れかを選択することができる。

Mesquiteは祖先形質の推定のほか、系統解析に用いる塩基配列ファイルの編集などもおこなうことができるプログラムである。祖先形質の推定には、最節約法および最尤法が選択できる。最節約法を選択した場合には、ある形質が系統樹の枝上でどのような状態にあったかを迅速に推定できるが、形質数が多い解析には不向きである。最尤法を選択した場合には、2つの形質進化モデル (Mk1モデルと AsymmMkモデル) の何れかを選択することができる。Mk1モデル (Markov k-state 1 parameter model) は、形質の変化が起きる確率が双方向とも同じとするモデルであり、一方の AsymmMkモデル (Asymmetrical Markov k-state 2 parameter model) は、形質の変化が起きる確率を方向によって異なるとするモデルである。最尤法を選択すると、系統樹の分岐ごとに祖先形質の確からしさを尤度のパイグラフによって表すことができる。

一方の BayesTraits は最尤法とベイズ法に対応し、そのうちのベイズ法に特化していて、分岐ごとに祖先形質の事後確率が出せる点が優れている。形質が独立した場合 (Multistate)、形質同士が相関している場合 (Discrete)、連続的な形質の場合 (Continuous) などの解析が可能である。BayesTraitsはパラメーターの設定が柔軟に設計されていて、複数の形質間で変化の方向を制限することもできる。またオプションの Fossil コマンドを使用することで、ある分岐の形質状態を予め固定することができ、化石による形質情報を取り込むことが可能となっている。

以上のように両者を比較すると、より簡便に推定できるのが Mesquite で、より厳密な推定をするならば BayesTraits ということが言えそうである。この他、ベイズ法によるプログラムの SIMMAP (Bollback, 2006) が

良く利用されていたが、現在、プログラムのホームページ (<http://www.simmap.com>) にアクセスできないようである (2018年10月確認)。

### ウナギの大回遊の研究例

祖先形質を明らかにした研究例として、Inoue *et al.* (2010b) によるウナギの大回遊の起源を明らかにした論文がある。淡水域に生息するニホンウナギ (ウナギ科・ウナギ属) は、日本の淡水域から3000km以上離れたグアム島沖まで大回遊して産卵する。産卵場と想定される海域の表層での徹底した調査をおこなっても親ウナギが発見されないことから、彼らが表層域以外の深海域で産卵している可能性が90年代後半から疑われるようになった。2009年には、ついにマリアナ海嶺の海山域から卵が採集され産卵場は水深150–200mとほぼ特定された (Tsukamoto *et al.*, 2011)。

Inoue *et al.* (2010b) は、世界のウナギ科全16種3亜種とウナギ目全19科を網羅したサンプル (全56種) を基にミトコンドリア全長配列を用いて最尤法による系統解析をおこなった。そして、その構築した系統樹上にウナギの着底後の成育環境を4つ (浅海/大陸棚・斜面/外洋中・深層/淡水) に分けてマッピングし、Mesquiteを用いて祖先形質を推定した。その結果、ウナギ科魚類は外洋中・深層に生息するフウセンウナギ類、シギウナギ科、ノコバウナギ科からなるクレード内部に分岐することが、高い統計的値で支持された。そして、ウナギ科全種の祖先にあたる分岐の成育環境が淡水であると推定されたため、ウナギ科の進化的起源が深海にあり、祖先が餌の豊富な淡水域にたどりつき、そこで成長するように進化したことが示唆された。Inoue *et al.* (2010b) では分岐年代の推定はされていなかったが、別の研究で現生するウナギ科魚類は2000万年前に分化し始めたことと推定されているので (Johnson *et al.*, 2012; Minegishi *et al.*, 2005), ウナギはその頃より前に淡水へ進出し、そして大陸の移動とともに世界の海へ分散したと考えられている (Aoyama *et al.*, 2001)。

### 化石データを加えた祖先ハビタット推定の研究例

魚類は淡水から海まで生息しているが、一部の種は海と川を行き来するので、魚類のハビタットの起源については未解明な部分も多かった。そこでBetancur-R *et al.* (2015) は現生魚類1,582種で分子系統解析をおこない、さらに240種の化石種を加えて、条鰭類の祖先がどのような環境に生息していたか推定した。

彼らは、条鰭類の系統樹に、海/淡水/汽水などハビタットをマッピングし、祖先の生息域を推定した。その結果、条鰭類の祖先種のハビタットは、現生種のみ解析だと淡水域と推定され、化石種を入れると海域となることがわかった。このことは、アミアアアロワナの現生

種は淡水性であるが、それらの化石種には、海水に生育する種が存在した事実を思い起こさせる。ただし、一般には淡水より海水の生物の方が化石になりやすいことが知られており (例えば、Shipman, 1993), 化石種を入れた解析は海起源になりやすい可能性もある (Betancur-R *et al.*, 2015)。数々の魚類学者を惹きつけるこの問題は、現段階でも解決が困難である。

Betancur-R *et al.* (2015) は、海域は淡水域よりも種の入替わりが激しいため、海域はスズキ類など派生的なグループにとってかわられる一方で、淡水域は根幹から分岐する古代魚などのrefugia (退避地) となったということも指摘している。

## 多様化率の変化

### 多様化率の変化を可視化する

ある分類群の系統解析により系統樹を構築したとき、多くの研究者は、その系統樹の中に分岐が密になっているところとそうでないところがあることに気付くかも知れない。これは、分岐が短時間に繰り返された (多様化率が上がった) ところと、そうではなかったところを反映した結果だろうと、直感的に捉えるに違いない。系統解析において、進化速度が系統間で一定であるか、または補正されていて、しかも網羅した種数がより完全であれば、その系統樹上で多様化率 (種分化率-絶滅率) が変化したタイミングを推定できる。多様化プロセスを明らかにする上で、著しく多様化率の変化したタイミングを知ることは、多様化の要因や原動力を知る上で重要である。哺乳類の大規模な適応放散とK/Pg境界における急激な環境変化の関係が、その良い例だろう。

多様化率の変化を可視化する基本的な方法は、系統数を時間軸に沿ってプロットするLTT (Lineage through time) プロットの作成である (図3)。この図では縦軸が系統数を対数で表し、横軸が過去から現在への時間を表す。図のプロットを結んだ線が凸であれば、多様化率が過去に上昇してから現在に近づくにつれ下降したことを示し、凹であれば過去よりも現在に向かって上昇していることを示す。

Nee *et al.* (1992) は、分子系統樹を基にしたLTTプロットをはじめとする数理解析を試み、絶滅種を除いた現生種のみを系統樹であっても、古生物学的な方法とは異なるアプローチで過去のプロセスを推定できることを示した。この論文を契機に分子系統樹による多様化プロセスを推定する研究が展開され、最近ではバイズ法による解析も発展している (例えば、Rabosky *et al.*, 2014)。

### 不完全な系統樹の補正

多様化率の変化を明らかにしようとするとき、全ての種を網羅した完全な系統樹であることが重要である。し

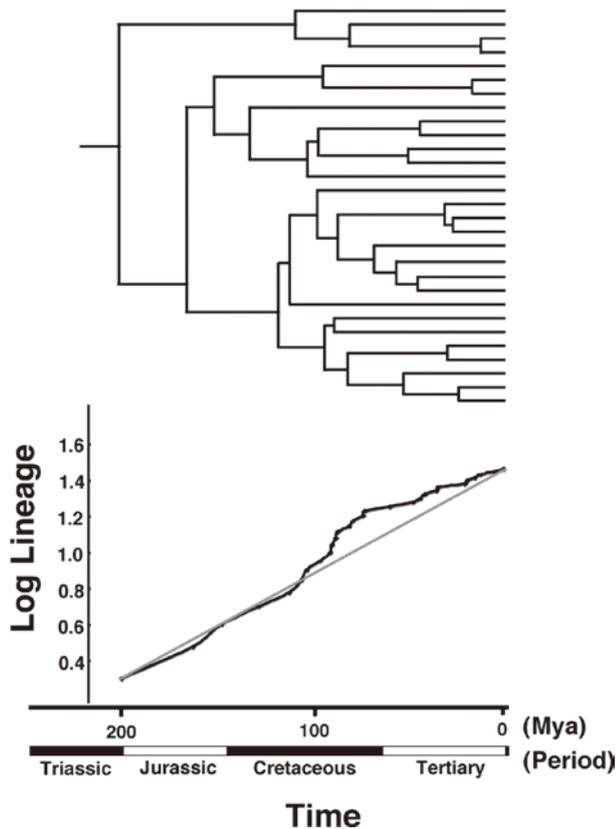


図3. 系統樹(上)と累積種数(下)の模式図。下図のグレーの直線は多様化率が一定な場合の累積種数を示す。

かしながら、そのような完全な系統樹を構築することは多くの場合難しい。例えば、比較的短時間に分化した種が非常に多くありながら、系統樹に含まれる種が実際より少数であれば、多様化率は過小に推定されるであろう。また別の例では、各属から5種ずつ解析に用いたが、実際にはある属には20種が存在し、別の属には50種が存在するとすれば、その構築された系統樹は実際の多様性を反映していない樹型である。

これら不完全な系統樹は多様化率を計算する場合の克服すべき問題の一つであったが、長らく対処法が提示されてこなかった。しかしながら、ベイズ法を用いたプログラム BAMB (Bayesian Analysis of Macroevolutionary Mixtures) では、不完全な系統樹の補正(偏りの補正)が簡単にできるようになり、系統樹上に信頼度の高い多様化率の変化をマッピングすることができるようになった (Rabosky *et al.*, 2014)。このようなプロットを「phylorate plot」と呼んでいる(図1および4)。このBAMBソフトウェアは登場以来、多くの論文で利用されている。また、別のアプローチとしては、RパッケージのPASTISプログラム (Thomas *et al.*, 2013) によって系統樹上に欠けている種を確率的に位置づけて補正する方法もある。いずれにしても、これらの方法によって不完全な系統樹による偏った推定ではなく、より良い多様化プロセスの推定

結果が得られる。ただし、BAMBのマニュアルによれば、解析した種(サンプル)が実際の種数をカバーした割合が10%以下と極端に低い場合には効果が弱いとされ、その場合には解析種数を増やすことを目指すべきである。

### 古気候との比較例

生物の多様化プロセスを明らかにするとき、地質学的なイベントと比較してその要因を検討することは多い。Davis *et al.* (2016) は上述のBAMBソフトウェアを用いて異尾下目の甲殻類(ヤドカリ、タラバガニ、オオコシオリエビなど)の多様化の時期と古気候との関連性を過去2億年に渡って解析した(図1)。彼らは1986年から2011年までに出版された40編の論文による60の系統樹をデータとして、それらを supertree 法によって統合して、異尾下目の372種を網羅した大きな系統樹を構築した。さらに、分岐年代推定をおこなって得られた時間軸付き系統樹から、著しく種分化率が上がった分岐・時代をBAMBソフトウェアを用いて推定した。本論文では372種を網羅しているが、異尾下目約2,500種の6分の1以下なので、海洋生物の学名と分類学的情報を集積したデータベースであるWoRMS (World Register of Marine Species: <http://www.marinespecies.org/>) のリストを用いてサンプリングバイアス(系統間での解析に用いた種の偏り)を補正している。

Davis *et al.* (2016) が $\delta^{18}\text{O}$ をもちいて算出した過去の水温と異尾下目の多様化との相関を統計解析した結果、次のようなことが明らかになった。(1) 異尾下目は全球的に寒冷化した時期に種分化率が増した。(2) 種分化率の顕著な変化が起きたのが過去1億年間に限定されていた。(3) 海洋クレードの種分化率は気温と負の相関関係にあった。(4) 異尾下目内の淡水クレードは気温が上昇すると種分化率も上昇していた。つまり、同じ異尾下目であっても、海に生息する分類群と淡水に生息する分類群とでは、気温の変動に伴う種分化の応答が異なることが本論文で示唆されている。

### 獲得形質との比較例

多様化率の変動要因として、上述した地質学的イベントの他に特徴的な形質の獲得に着目する場合もある。例えば、Helmstetter *et al.* (2016) は、胎生のカダヤシ目魚類を材料として多様化率の変化と形質の獲得との関係を明らかにした(図4)。研究の対象としたカダヤシ目魚類(胎生メダカ、モーリー、グッピーなどを含む)は約1,250種で構成され、多くの魚類と同様の卵生以外にも仔魚を産む胎生の種も含む多様な分類群である。

Helmstetter *et al.* (2016) では、カダヤシ目魚類を広く網羅できるように、カダヤシ目全属のうちの85%にあたる12属(107種)を用いて分子系統解析をおこなっている。この論文では、続いてその系統樹に時間軸をつけ、

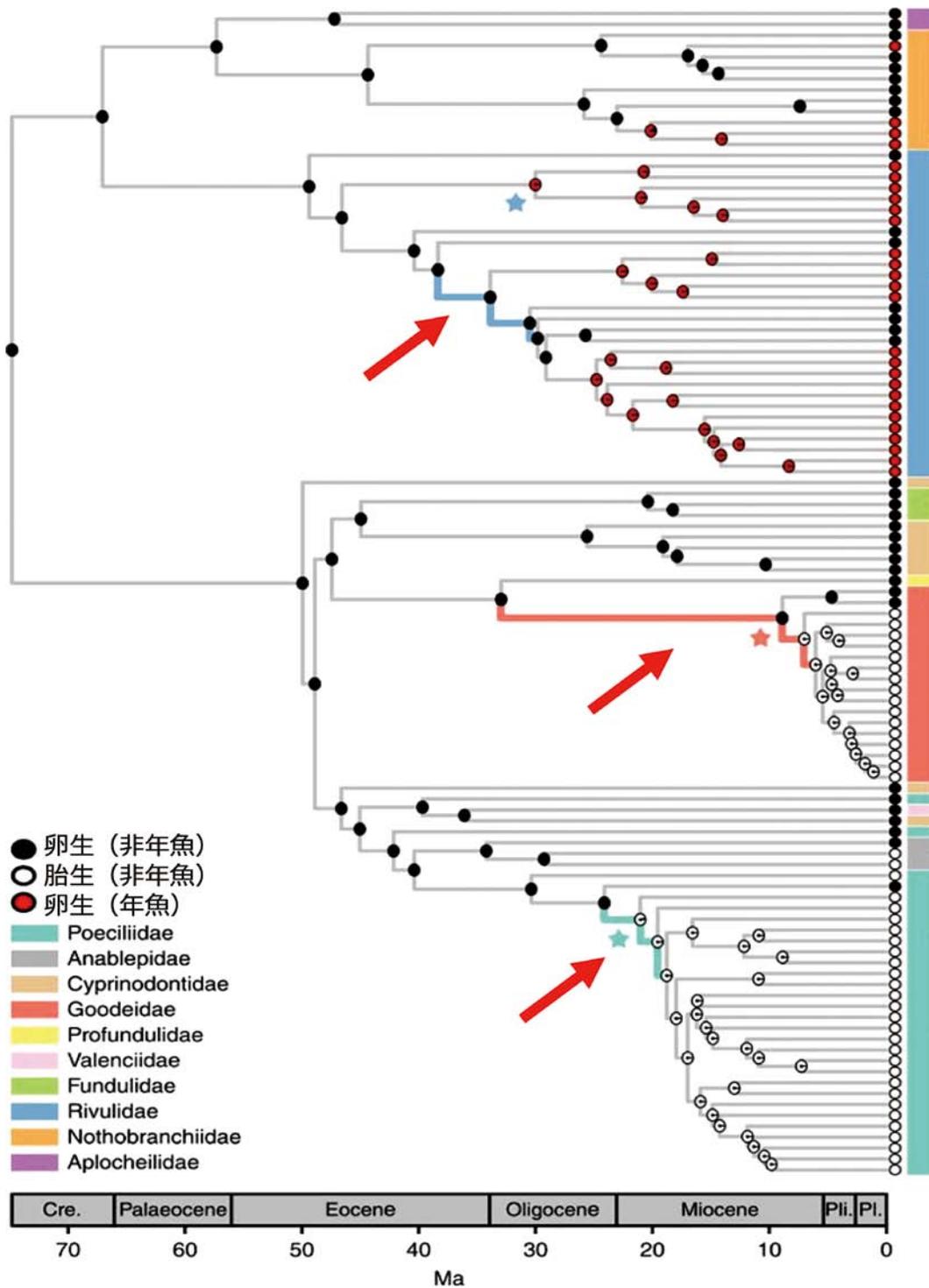


図4. カダヤシ目における多様化率の変化したタイミングを示した系統樹 (Helmstetter *et al.*, 2016を改変, CCライセンス BY). 赤い矢印が指す枝で変化が検出された. Cre.; Cretaceous, Pli.; Pliocene, Pl.; Pleistocene.

上述したBAMMソフトウェアによって多様化率の変化を系統樹上にプロットした. また, 多様化率のプロットと並行して, 「年魚 (生まれて1年で死亡) で卵生」, 「非年魚で卵生」および「非年魚で胎生」という3タイプの繁殖様式も系統樹上にマッピングした.

これらの解析の結果, カダヤシ目において「年魚で卵

生」と「非年魚で胎生」が, 祖先的である「非年魚で卵生」から, それぞれに独立して複数回出現したことが明らかになった. さらに, それぞれの形質を備える系統間で多様化率を比較したところ, 「非年魚で胎生」の系統のみ多様化率が上昇していたことが明らかになった. つまり, カダヤシ目魚類においては, 胎生という形質が多様

化の原動力になっていることが示された。

このように、時間軸付き系統樹上で、多様化率の変化や形質の獲得タイミング、地質学的なイベントなどを組み合わせて比較することで、多様化プロセスの推定がより鮮明になるといえる。

## 祖先分布域の推定

### 生物地理

生物多様化プロセスを解明するときに、それら生物の地理的な分布パターンを明らかにし、その分布要因との関連性を明らかにするという生物地理学的な解析も、上述したものと同様に重要な解析の一つである。生物地理学では、幅広い分類群を含む生物相全体を地域間で比較するといった、一般的に大きな枠組みで解析される。しかしながら、その生物地理学の一つの分野として、この30年間で発展してきた生物系統地理学 (phylogeography) では、対象のある分類群に絞って、その分類群を構成する種や地域個体群間における系統に基づいて解析される。生物系統地理学は、生物地理学にDNA塩基配列などの分子情報を用いた集団遺伝学と分子系統学の解析手法を導入したものであり、それらの分子生物学的な解析技術とともに発展してきた (Avice, 2000; 太田, 2002)。ただし、分子生物学的手法が導入される以前も、歴史的生物地理学として、多くの研究がなされている。

分子系統樹に基づいた生物地理学的な解析では、ある分類群において時間軸付き系統樹が構築されたあと、その樹型を基にして現生種の分布域の変遷を推定する。以前の研究では、その推定方法として最節約法が用いられることが多かった。分類群を構成する種が少ないような比較的小さな系統樹などの場合では、最節約法でも推定が容易にできるが、最近扱われるような大規模な系統樹や複雑な地理的分布パターンでは、最節約法による解析では対応が困難だと考えられる。近年、そのような解析の難しい複雑な条件でも、より信頼度の高い推定を可能にする最尤法やベイズ法を用いた方法が開発されてきた。以下にそのような方法を用いた研究例を紹介する。

### 分布域変遷過程の推定

地理的な分布は形質とみなせるため、上述した祖先形質の推定と類似した解析だと言える。しかし、分布地域が隣り合っているかどうかで、その地域間の移動のしやすさも変わり、時代によっては様々な障壁によって分断されていることもあるので、分布の有無を単純な形質と見なして解析することは避けた方が良いだろう。祖先分布域の推定にはいくつかのモデルが提案されているが、詳細な条件を設定できるモデルとして、LAGRANGEソフトウェア (Ree *et al.*, 2005; Ree and Smith, 2008) で実行できる「分散・絶滅・分岐進化モデル (DEC : Dispersal,

Extinction, and Cladogenesis)」(Ree and Smith, 2008) がよく利用されている。

このDECモデルでは、過去の地質イベントを反映するために、任意に区分した年代ごとに地域間の分散の確率 (0-1: 分散しないが0) を設定することができる。例えば、東太平洋を例にあげると、6500万年前から1600万年前までは西大西洋とは十分に分散可能 (確率1) で、インド太平洋とはわずかに可能 (0.05)、その他の海域とは可能性なし (0) といった設定である。さらに時間を進めた310万年前から現在までの年代区分では、東太平洋と以前は分散のあった西大西洋とはパナマ地峡があるために可能性なし (0) となり、西太平洋とはわずかに可能 (0.05)、その他とは可能性なし (0) といった詳細な設定をすることができる。

Dornburg *et al.* (2015) は、このDECモデルを基に、世界中の熱帯・亜熱帯海域に分布するキンメダイ目イトウダイ科魚類を用いて地理的分布の変遷を推定した (図5)。この論文では、世界のイトウダイ科魚類86種のうち43種と化石種4種を用いて系統解析および分岐年代推定をおこない、その時間軸付き系統樹上にそれぞれの種の分布域をマッピングして地理的分布の変遷を推定している。この解析では、化石種を含めているので、塩基配列データセットと形態形質データセットの2つのデータセットを用いている。解析に用いられた保存の良いイトウダイ科化石は、*Berybolcensis*, *Tenuicentrum*, *Eoholocentrum* (以上、始新世後期、西テチス海)、および *Holocentrites* (漸新世、西大西洋) の4種である。

解析した結果、*Berybolcensis* と *Tenuicentrum* は、イトウダイ科の最も根幹に位置づけられた。現生イトウダイ科はアカマツカサ亜科とイトウダイ亜科の大きく2つの亜科に分かれるが、化石種の残り2種のうち *Holocentrites* はアカマツカサ亜科全体との姉妹群に、*Eoholocentrum* はイトウダイ亜科全体との姉妹群に位置づけられた。この化石種を含む系統樹で地理的分布の変遷を推定したところ、現生イトウダイ科魚類ではフィリピンやインドネシアを含むインド-オーストラリア列島 (Indo-Australian Archipelago) 海域を中心に種多様性が高いが、地理的な起源は約6500万年前 (白亜紀/暁新世の境界) の地中海 (始新世の西テチス海の名残り) と推定されている。

この論文では、現生種のみでも地理的分布の変遷を推定しているが、その地理的な起源は5200万年前の当時の東大西洋と推定され (ただし信頼度は高くない)、上述した化石を用いた結果とは異なっていた (図5A)。これは、特に化石種が系統樹の根幹に位置づけられたことが、祖先分布域の推定に大きな影響を与えたためと考えられる (図5B)。以上のように、祖先分布域推定の信頼度を高めるためにも化石種のデータを解析に加えることが必要不可欠である。

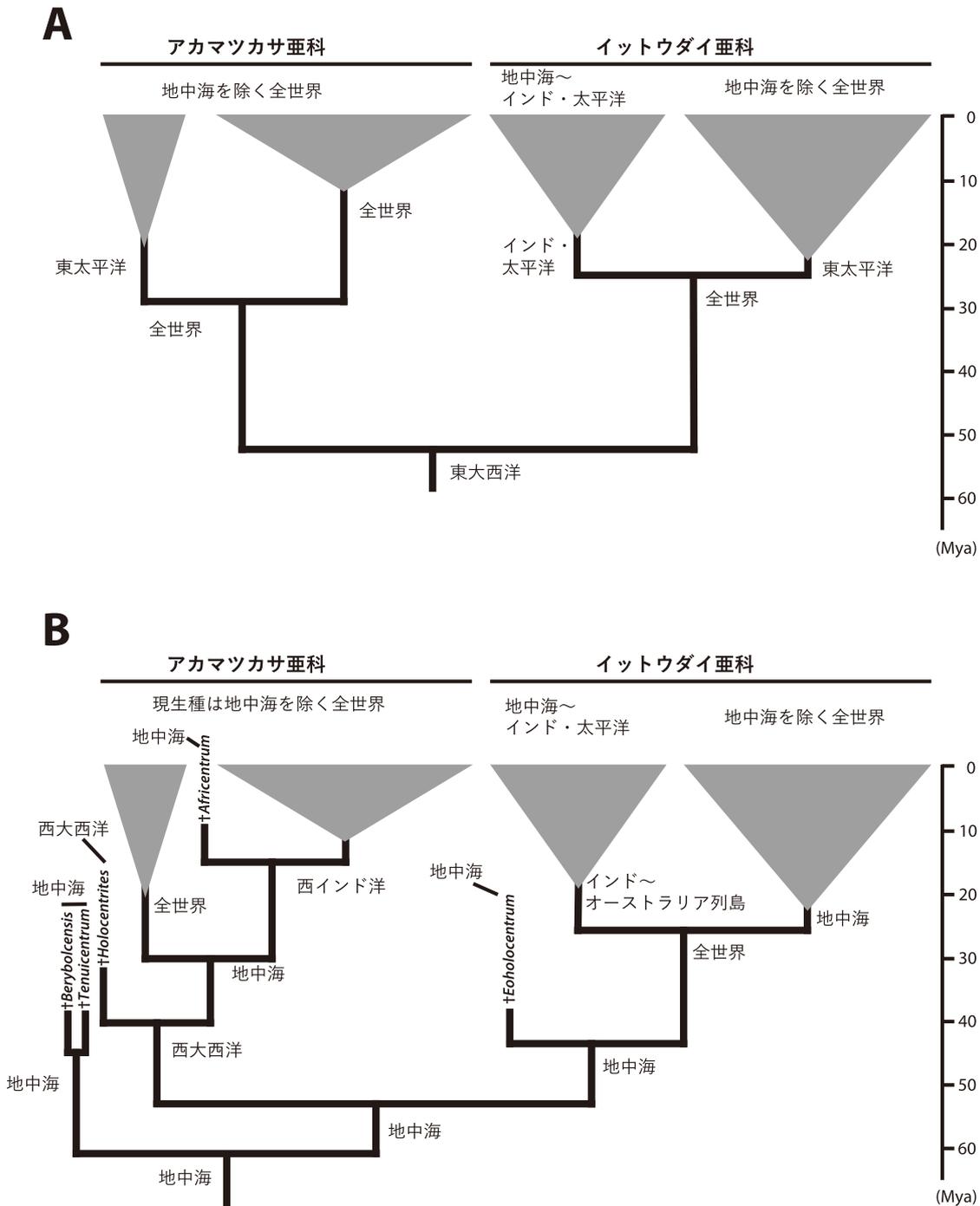


図5. イットウダイ科魚類の祖先分布域の再構築。現生種のみ推定 (A) および化石種を加えた推定 (B)。枝の側の海域名は推定された祖先分布域を示す。Dornburg *et al.* (2015) を基に簡略化して作成した。

### おわりに

過去を復元するという事は、太古の世界に思いを馳せる浪漫だけではなく、今ある生物多様性を理解する上でも必要であり、未来の地球を保全するためにも大切なことである。本稿では、現生生物はDNAなどの分子によって網羅的に過去の情報を収集できる材料であるということ、化石は保存状態が良好なものは稀で断片的な

ものが多いものの、過去の状態を知るための強力な手がかりとなることを改めて示した。

魚類で保存状態の良好な化石がいくつも報告されているが、世界的な魚類データベース FishBase (<https://www.fishbase.org/>) での登録種数が34,000種 (2018年11月現在) にもなる現生魚類の多様性と比べればその割合は低く、研究者が解析に有用な化石に巡り会える機会もなかなかないだろう。また、良好な化石と出会えたとしても、

系統解析によって系統樹上に位置づけるためには、現生種の骨格との比較が必要であり、そのためには新しく多数の骨格標本の作成が必須となる。これは、分子系統学を主な分野としている研究者にとってハードルが高く、有用な化石があっても無視してしまうことがあるかも知れない。しかしながら、もし解析に有用な標本がある場合には、分子系統学と古生物学や分類学を専門とする研究者が共同で研究することができれば、より信頼性の高い研究を進められるようになるだろう。さらには、逆に保存が良好な化石を基にして、その化石を含む分類群を対象とした多様化プロセス解析を古生物学者が分子系統学者に提案して進めるのも良いだろう。

多様化プロセス解析は過去を鮮明に復元する可能性をもつ反面、推定に推定を重ねる解析でもあるので、一歩間違えると砂上の楼閣になってしまう危険性がある。このことを踏まえた上で、一つ一つの解析を丁寧におこなって過去を復元することが大切である。

## 謝辞

本論文は2017年に北九州市立自然史・歴史博物館（通称：いのちのたび博物館）で開催された古生物学会シンポジウム「魚類化石研究の現状と可能性」で講演した内容の一部をまとめたものである。シンポジウムのコンピナーとしてご尽力いただいた同博物館の藪本美孝博士ならびに高栗祐司博士に感謝する。また、東京大学海洋研究所（現大気海洋研究所）の西田 睦博士を中心とした研究グループでの熱い議論が大変参考になったので当時のメンバーに深く感謝する。最後に2名の匿名の査読者にこの場を借りて厚く御礼申し上げる。

## 文献

- Alfaro, M. E., Faircloth, B. C., Harrington, R. C., Sorenson, L., Friedman, M., Thacker, C. E., Oliveros, C. H., Černý, D. and Near, T. J., 2018. Explosive diversification of marine fishes at the Cretaceous-Paleogene boundary. *Nature Ecology and Evolution*, **2**, 688–696.
- Aoyama, J., Nishida, M. and Tsukamoto, K., 2001. Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eel, genus *Anguilla*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **20**, 450–459.
- Avise, J. C., 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. 464p., Harvard University Press, Cambridge.
- Bapst, D. W., 2012. paleotree: an R package for paleontological and phylogenetic analyses of evolution. *Methods in Ecology and Evolution*, **3**, 803–807.
- Benton, M. J. and Donoghue, P. C., 2007. Paleontological evidence to date the tree of life. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 26–53.
- Betancur-R., R., Broughton, R. E., Wiley, E. O., Carpenter, K., López, J. A., Li, C., Holcroft, N. I., Arcila, D., Sanciangco, M., Cureton Ii, J. C., Zhang, F., Buser, T., Campbell, M. A., Ballesteros, J. A., Roa-Varon, A., Willis, S., Borden, W. C., Rowley, T., Reneau, P. C., Hough, D. J., Lu, G., Grande, T., Arratia, G. and Ortí, G., 2013. The tree of life and a new classification of bony fishes. *PLoS currents*, **5**, DOI:10.1371/currents.tol.53ba26640df0ccae75bb165c8c26288.
- Bininda-Emonds, O. R. P., 2004. The evolution of supertrees. *Trends in Ecology and Evolution*, **19**, 315–322.
- Bininda-Emonds, O. R. P., Gittleman, J. L. and Steel, M. A., 2002. The (super) tree of life: procedures, problems, and respects. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**, 265–289.
- Betancur-R., R., Ortí, G. and Pyron, R. A., 2015. Fossil-based comparative analyses reveal ancient marine ancestry erased by extinction in ray-finned fishes. *Ecology Letters*, **18**, 441–450.
- Betancur-R., R., Wiley, E. O., Arratia, G., Acero P A., Bailly, N., Miya, M., Lecointre, G. and Ortí, G., 2017. Phylogenetic classification of bony fishes. *BMC Evolutionary Biology*, **17**, 1–42.
- Bilderbeek, R. J. C. and Etienne, R. S., 2018. babette: BEAUti 2, BEAST2 and Tracer for R. *Methods in Ecology and Evolution*, **9**, 2034–2040.
- Bollback, J. P., 2006. SIMMAP: Stochastic character mapping of discrete traits on phylogenies. *BMC Bioinformatics*, **7**, 88.
- Davis, K. E., Hill, J., Astrop, T. I. and Wills, M. A., 2016. Global cooling as a driver of diversification in a major marine clade. *Nature Communications*, **7**, 13003.
- Dornburg, A., Moore, J., Beaulieu, J. M., Eytan, R. I. and Near, T. J., 2015. The impact of shifts in marine biodiversity hotspots on patterns of range evolution: Evidence from the Holocentridae (squirrelfishes and soldierfishes). *Evolution*, **69**, 146–161.
- Gabalton, T. and Koonin, E. V., 2013. Functional and evolutionary implications of gene orthology. *Nature Reviews Genetics*, **14**, 360–366.
- Hasegawa, M., Thorne, J.L. and Kishino, H., 2003. Time scale of eutherian evolution estimated without assuming a constant rate of molecular evolution. *Genes & Genetic Systems*, **78**, 267–283.
- Heath, T. A., Huelsenbeck, J. P. and Stadler, T., 2014. The fossilized birth-death process for coherent calibration of divergence-time estimates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, E2957–E2966.
- Helmstetter, A. J., Papadopulos, A. S. T., Igea, J., Van Dooren, T. J. M., Leroi, A. M. and Savolainen, V., 2016. Viviparity stimulates diversification in an order of fish. *Nature Communications*, **7**, 11271.
- Hughes, Lily C., Ortí, G., Huang, Y., Sun, Y., Baldwin, C. C., Thompson, A. W., Arcila, D., Betancur-R., R., Li, C., Becker, L., Bellora, N., Zhao, X., Li, X., Wang, M., Fang, C., Xie, B., Zhou, Z., Huang, H., Chen, S., Venkatesh, B. and Shi, Q., 2018. Comprehensive phylogeny of ray-finned fishes (Actinopterygii) based on transcriptomic and genomic data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **115**, 6249–6254.
- Inoue, J., Donoghue, P. C. J. and Yang, Z., 2010a. The impact of the representation of fossil calibration on Bayesian estimation of species divergence times. *Systematic Biology*, **59**, 74–89.
- Inoue, J.G., Miya, M., Miller, M.J., Sado, T., Hanel, R., Hatooka, K., Aoyama, J., Minegishi, M., Nishida, M. and Tsukamoto, K., 2010b. Deep-ocean origin of the freshwater eels. *Biology Letters*, **6**, 363–366.
- Inoue, G. and Satoh, N., 2019. ORTHOSCOPE: An automatic web tool for phylogenetically inferring Bilaterian orthogroups with user-selected taxa. *Molecular Biology and Evolution*, **36**, 621–631.
- Johnson, G. D., Ida, H., Sakaue, J., Sado, T., Asahida, T. and Miya, M., 2012. A 'living fossil' eel (Anguilliformes: Protanguillidae, fam. nov.) from an undersea cave in Palau. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **279**, 934–943.
- Kon, T., Nohara, M., Yamanoue, Y., Fujiwara, Y., Nishida, M. and Nishikawa, T., 2007. Phylogenetic position of a whale-fall lancelet (Cephalochordata) inferred from whole mitochondrial genome sequences. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 127.

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, T., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, **35**, 1547–1549.
- Kumazawa, Y., Yamaguchi, M. and Nishida, M., 1999. Mitochondrial molecular clocks and the origin of euteleostean biodiversity: familial radiation of perciforms may have predated the Cretaceous/Tertiary boundary. In Kato, M. ed., *The Biology of Biodiversity*. 35–52. Springer-Verlag, Tokyo.
- Maddison, W. P. and Maddison, D. R., 2018. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.5. <http://www.mesquiteproject.org>
- Minegishi, Y., Aoyama, J., Inoue, J. G., Miya, M., Nishida, M. and Tsukamoto, K., 2005. Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eels genus *Anguilla* based on the whole mitochondrial genome sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **34**, 134–146.
- Near, T. J., Eytan, R. I., Dornburg, A., Kuhn, K. L., Moore, J. A., Davis, M. P., Wainwright, P. C., Friedman, M. and Smith, W. L., 2012. Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 13698–13703.
- Nee, S., Mooers, A. O. and Harvey, P. H. 1992. Tempo and mode of evolution revealed from molecular phylogenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 8322–8326.
- 太田英利, 2002. 生物地理学, 分子生物学と出会う——特集にあたって (特集 生物地理学, 分子生物学と出会う——生物地理学の新展開). *遺伝*, **56**, 31–34.
- Pagel, M. and Meade, A., 2016. BayesTraits version 3.0.1. Available from [www.evolution.rdg.ac.uk/BayesTraitsV3.0.1.html](http://www.evolution.rdg.ac.uk/BayesTraitsV3.0.1.html) [accessed October 2018].
- Rabosky, D. L., Grudler, M., Anderson, C., Title, P., Shi, J. J., Brown, J. W., Huang, H. and Larson, J. G., 2014. BAMMtools: an R package for the analysis of evolutionary dynamics. *Methods in Ecology and Evolution*, **5**, 701–707.
- Ree, R. H., Moore, B. R., Webb, C. O. and Donoghue, M. J., 2005. A likelihood framework for inferring the evolution of geographic range on phylogenetic trees. *Evolution*, **59**, 2299–2311.
- Ree, R. H. and Smith, S. A., 2008. Maximum likelihood inference of geographic range evolution by dispersal, local extinction, and cladogenesis. *Systematic Biology*, **57**, 4–14.
- Sanderson, M. J., Purvis, A. and Henze, C., 1998. Phylogenetic supertrees: assembling the trees of life. *Trends in Ecology and Evolution*, **13**, 105–109.
- Sanderson, M. J., 2003. r8s: inferring absolute rates of molecular evolution and divergence times in the absence of a molecular clock. *Bioinformatics*, **19**, 301–302.
- Shipman, P., 1993. *Life History of a Fossil: An Introduction to Taphonomy and Paleoecology*. 232p., Harvard University Press, Cambridge.
- Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, **20**, 2688–2690.
- Takada, M., Tachihara, K., Kon, T., Yamamoto, G., Iguchi, K., Miya, M. and Nishida, M., 2010. Biogeography and evolution of the *Carassius auratus*-complex in East Asia. *BMC Evolutionary Biology*, **10**, 7.
- Thomas, G. H., Hartmann, K., Jetz, W., Joy, J. B., Mimoto, A. and Mooers, A. O., 2013. PASTIS: an R package to facilitate phylogenetic assembly with soft taxonomic inferences. *Methods in Ecology and Evolution*, **4**, 1011–1017.
- Thorne, J. L., Kishino, H., Painter, I. S., 1998. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **15**, 1647–1657.
- Tsukamoto, K., Chow, S., Otake, T., Kurogi, H., Mochioka, N., Miller, M. J., Aoyama, J., Kimura, S., Watanabe, S., Yoshinaga T., Shinoda, A., Kuroki, M., Oya, M., Watanabe, T., Hata, K., Ijiri, S., Kazeto, Y., Nomura, K. and Tanaka, H., 2011. Oceanic spawning ecology of freshwater eels in the western North Pacific. *Nature Communications*, **2**, 179.
- Yang, Z., 2006. *Computational Molecular Evolution*. 374p., Oxford University Press, Oxford.
- Yang, Z. and Rannala, B., 2006. Bayesian estimation of species divergence times under a molecular clock using multiple fossil calibrations with soft bounds. *Molecular Biology and Evolution*, **23**, 212–226.
- 昆 健志と井上 潤の両者とも、過去の文献調査と論文の執筆を担当した。

(2018年11月7日受付, 2019年6月3日受理)

