

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：18001
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K06321
研究課題名（和文）複数の小規模・大規模交雑がもたらすイモリの網状進化とモザイク的な集団構造の検証

研究課題名（英文）Reticulated evolution and mosaic-like population genetic structure of red-bellied newts by multiple small- and large-scale hybridizations

研究代表者
富永 篤（Tominaga, Atsushi）
琉球大学・教育学部・教授

研究者番号：60452968
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アカハライモリの分布域全域での核ゲノムに見られる遺伝的変異を調査するために、全国から得られた130個体のDNAを用いて、ddRAD-seqによるSNP解析を行った。Admixtureと主成分分析の結果、本種は、大まかに北日本、中部日本、西日本の3グループに区分され、さらにそれぞれのグループ内にもサブグループが見られることが分かった。f4-testの結果、中部日本グループは北日本と西日本グループの双方から遺伝子浸透の影響を受けていることが確認された。このほか、RNA-seqを行い、適応的遺伝子が交雑帯を超えて、遺伝子浸透して、広がっているか否かの検証を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義
近年のゲノム解析技術の発展に伴い、多くの生物が過去に交雑に伴う網状進化を経験して、それが現在の種や集団の遺伝的組成にも影響していることが明らかになっている。本研究では、アカハライモリの分布域全体で、初めてゲノムワイドなSNP解析とRNA-seq解析を行うことにより、本種でも過去の系統間の交雑とそれに伴う遺伝子浸透により、集団間の網状進化が起きたことが明らかとなった。これらの結果は、本種の進化プロセスだけの知見にとどまらず、多くの野生動物でも実際にはこれまで考えられてきた以上に複雑な進化プロセスを経て、現在の集団構造が形成されてきたことを示唆しており、この点に学術的意義や社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：To investigate genetic variation in the nuclear genome of the red-bellied newt throughout its distribution range, we performed SNP analysis by ddRAD-seq using DNA from 130 individuals obtained from all over Japan. Admixture and principal component analyses revealed that the species is roughly divided into three groups, northern Japan, central Japan, and western Japan, with subgroups within each group. The f4-test results confirmed that the Central Japan group was affected by introgression from both the Northern and Western Japan groups. In addition, RNA-seq was conducted to verify whether adaptive genes are spreading beyond the hybrid zone by introgression.

研究分野：生物多様性・分類学

キーワード：アカハライモリ 網状進化 交雑 遺伝子浸透 ゲノムワイド解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、野生動物のゲノム解析技術と関連する解析手法の発展で、ゲノム全体の情報から種の系統樹を推定する研究が多く展開されている。そうした研究の成果により、多くの動物が過去に種間交雑に伴う網状進化を経験しており、それが現在の種や集団の遺伝的組成にも影響していることが明らかになっている。こうした集団間の交雑は、超越分離などで交雑個体が新たな表現型を獲得し、新たなニッチを占める種となる雑種分化や、交雑帯の移動に伴う劣勢集団の分布縮小から絶滅につながることもあり、種の多様化や絶滅のプロセスを考えるうえでも興味深い。網状進化につながる交雑には、交雑帯の移動を伴い、分布拡大する優勢集団のゲノムに劣勢集団由来のゲノムの一部が浸透する中立的な浸透プロセスを主要な要因として浸透が進む大規模交雑（以後“中立的プロセス中心の大規模交雑”と呼ぶ）と、必ずしも交雑帯の移動を伴わずに適応的遺伝子やその近傍領域が浸透する選択的プロセス（Adaptive introgression）中心に遺伝子浸透が進む小規模交雑（以後“選択的プロセス中心の小規模交雑”とする）の二つに大別できる。前者は、劣勢集団の分布縮小 >> 絶滅と、分布拡大する優勢集団への遺伝子浸透と網状進化をもたらす。後者は適応的遺伝子とその近傍領域の浸透が進み、双方またはどちらかの集団の網状進化をもたらす。本研究では、研究課題の核心をなす学術的「問い」を、現在や過去の複数回の交雑とそれによる遺伝子浸透が、どのように集団の遺伝的組成に影響するのかとして、上述の両タイプの複数の集団間の交雑が起きている可能性の高いアカハライモリを調査した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、過去と現在のアカハライモリの集団間の様々な形の交雑が、集団の遺伝的組成にどのように影響しているかを“リアルタイム”で明らかにすることとした。このように種分化の途上にあるともいえる動物を扱うことが本研究の独自性の一つである。

先行研究による遺伝解析で、本種には側所的に分布する北日本、中部日本、西南日本、南伊豆の4集団がみられ、一部組み合わせは別種レベルまで分化している。そのうちの中部日本 VS 西南日本と、北日本 VS 中部日本の2つの分布境界では、交雑個体に対する負の選択圧と両純系個体の交雑帯への侵入のバランスで維持される Tension zone model (Barton & Hewitt, 1985) にあてはまる交雑帯が形成されている。この2つの交雑帯のうち、中国地方の交雑帯では中立的プロセス中心の大規模交雑が生じている可能性が高いのに対し、中部地方の交雑帯は、地理的に安定でクラインに非対称性はなく、選択的プロセス中心の小規模交雑が生じている可能性がある。また、南伊豆集団は伊豆半島先端部のみに隔離分布し、近縁の北日本集団との間には中部日本集団が分布することから、過去に中部日本集団が分布拡大し、南伊豆集団は分布縮小した可能性があり、ここでも中部日本集団への中立的プロセス中心の大規模交雑が生じた可能性がある。したがって、本研究では、他の3集団との複数の交雑帯で、異なるパターンの遺伝子浸透の影響を受け、他の3集団の特徴をモザイク的にもつ可能性のある中部日本集団を中心としたアカハライモリの進化史を解明することを目標においた。

3. 研究の方法

有尾類であるアカハライモリのゲノムサイズは20-30Gbpと極めて大きく、現状では全ゲノム配列の決定やそれに続く大量 SNP データの取得、ゲノムワイド関連解析は困難である。そこで、まず、本研究では ddRAD-seq で SNP データを得て集団遺伝解析を行った。核ゲノムだけの情報だけでなく、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の系統を調べるために、mtDNA の Cytochrome *b* 遺伝子 (cytb) 領域の 684bp も解読した。

アカハライモリの分布域全域をカバーする日本列島の28地点から、計130個体をサンプリングして、遺伝解析に使用した（平均個体数4.6、各地点3~5個体）。各個体のDNAを抽出し、DNAの純度は Nanodrop 2000C を用いて測定し、260/280の値が1.80-2.00の範囲だった不純物の少ないDNAサンプルを使用した。制限酵素処理には *ecoRI* および *bgIII* を用いた。Depthを深く読むために Illumina HiSeqX の2レーンを使用し、フラグメントの両端 (R1 および R2) の150bpのペアエンドシーケンスで解読した。R1 リードおよび R2 リードの生データは、FastQC v0.10.1 を用いてシーケンスの品質をチェックし、trimmomatic を用いてアダプターおよび低品質なリードを除去した。フィルタリングされた R1 および R2 リードを Stacks v. 2.2 を用いて解析し、de novo で SNP を決定した。さらに出力されたデータを PLINK1.90 (Purcell et al. 2007) を用いて解析し、欠損値などをフィルタリングした。PLINK でフィルタリングされたデータセットのペアワイズ AMOVA F_{ST} は、stacks の populations で計算された。ペアワイズ F_{ST} から計算した個体群間のユークリッド距離を dist 関数を用いて計算し、hclust 関数を用いて最遠隣法による階層的クラスタリングを行った。さらにペアワイズ F_{ST} による個体群間のヒートマップ作成は R v. 4.2.0 の heatmap2 関数を使用した。

アカハライモリの集団遺伝構造を明らかにするため、ddRAD-seq で得られた SNP データを

用いて Admixture 1.30 による解析を行った。TASSEL5.0 による主成分分析 (PCA) を行い、Admixture 解析の結果と比較した。さらに、各個体群間の遺伝的交流や、群間の交雑状況を把握するため、SplitsTree 4 ソフトウェアを用いて HKY85 モデルでの遺伝距離を計算し、Neighbor-Net ネットワークを作成した。Admixture 解析と PCA 解析から識別された 3 群 (北日本群、中部日本群、西日本群) について、特に中部日本群の個体群ごとの他群からの遺伝子浸透を調べるため、ADMIXTOOLS v7.0.2 に実装されている qpDstat プログラムの f_4 mode を実行して 4 集団統計 (f_4) を計算した。また、 f_4 ratio test も行った。

さらにアカハライモリの北日本系統と中部日本系統間で遺伝子浸透が生じている適応的遺伝子を明らかにするために北日本系統と中部日本系統の純系個体および分布境界周辺の個体を採集して、RNA-seq を行った。両系統それぞれから長野県信更町の交雑帯に近い地点 (中部日本系統: 長野県松本市、北日本系統: 長野県木島平村) と遠い地点 (中部日本系統: 滋賀県高島市、北日本系統: 山形県長井市) の、4 地点からそれぞれ 10 個体、合計 40 個体の繁殖期のオスの組織 (脳、肝臓、精巣、腹線) から RNA を抽出し、NovaSeq_X_Plus により、RNA 配列を解読した。Fastp 0.21.0 によるクオリティチェック、アダプター配列の除去のあと、Trinity を用いて、アセンブルを行った。

4. 研究成果

Stacks の populations プログラムと PLINK1.90 を用いたフィルタリングにより、28 集団 124 サンプルの 16,273 SNP のデータセットが得られた。

このデータセットを用いて、Admixture 解析でクラスタリングを行った。クロスバリデーションエラー (CV) は $K = 11$ で最も小さく (CV=0.21817)、次に $K = 13$ が小さい値 (CV= 0.21880) だった。 $K = 2$ で最も大きい値 (CV= 0.36172) になった。 $K = 2$ では北日本と西日本の 2 群に分かれ、 $K = 3$ で 3 群 (北日本群、中部日本群、西日本群) となり、 $K = 4$ では北日本群がさらに東北と南関東に区分され、両者の地理的な境界に位置する個体群は東北と南関東の交雑個体群となった (図 1)。さらに、既知の交雑帯の他に、新たに静岡県河津町と兵庫県淡路市も交雑集団であることが明らかになった。

Neighbour-Net 解析の結果、Admixture 解析や PCA と同様に北日本群、中部日本群、西日本群の大まかに 3 グループが識別され、さらにそれぞれの交雑個体群が見られた (図 2)。中部日本群は北日本群と西日本群の中間的な遺伝的特徴をもつことが判明した。中部日本群の中では愛知知多サブグループと和歌山サブグループは枝が長いことから、他個体群との間の遺伝距離が離れていることが示された。

中部日本群の各個体群が、西日本群や北日本群からの遺伝子浸透が生じているか調べるために 4 集団検定 (f_4 -test) を行った。4 集団検定 (f_4 test) の結果、兵庫県福崎以西の中部日本群は西日本群から、愛知県知多半島以東の中部日本群は北日本

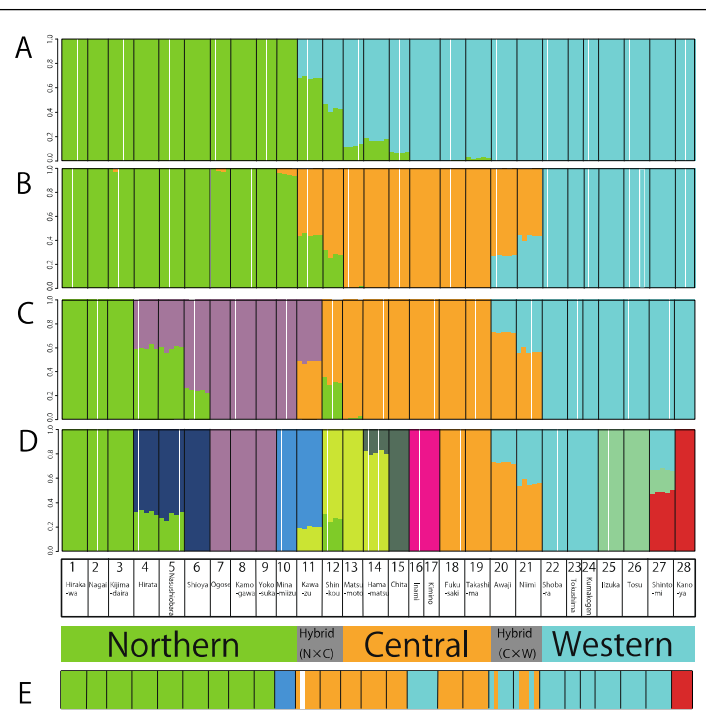


図 1 . Admixture と mtDNA の解析結果。A : $K=2$ 、B : $K=3$ 、C : $K=4$ 、D : $K=11$ での SNP データによるクラスタリング、E : ミトコンドリア DNA の系統区分を示す。

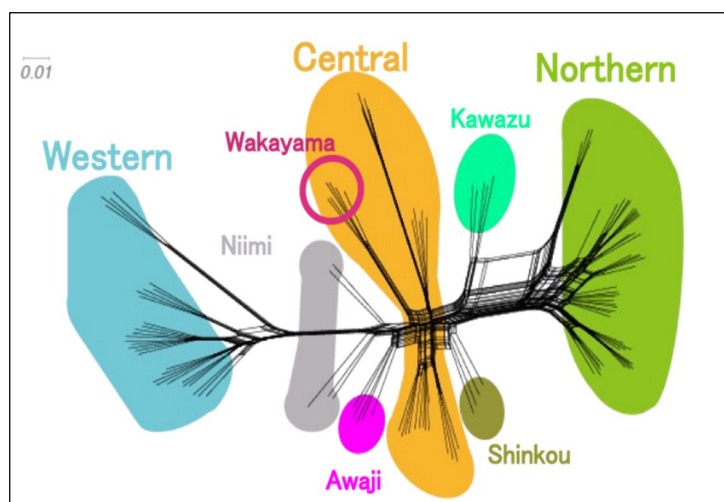


図 2 . Neighbour-Net 解析の結果。

群からの遺伝子浸透が相対的に多いことが判明し、中部日本群と他群との間の過去の交雑が示唆された。 f_4 ratio test の結果、中部日本群の西側地域では交雑帯からの距離が離れるほど西日本群の遺伝的寄与率が減少したが、東側地域では交雑帯からの距離に関係なく北日本群からの遺伝的寄与率が同程度だった。これらの結果から、中部日本群と西日本群の交雑帯は西日本群から中部日本群への集団の置き換わりにより西へと移動し、それに伴い中立的プロセスを中心とした遺伝子浸透が生じていると考えられた。一方、中部日本群の東側地域において、北日本群からの遺伝的寄与率が交雑帯からの距離によらず同程度であったことから、中部日本群と北日本群の交雑帯では、自然選択の結果、適応的遺伝子が固定される adaptive introgression が生じていることが示唆された。

特に西日本系統の mtDNA をもつ和歌山サブグループは、核ゲノムでは中部日本群に含まれ、核-mtDNA 間に不一致が見られたことから、過去の交雑帯の移動の痕跡であると考えられた。ネットワーク解析の結果、和歌山サブグループは長期間、他個体群との間に遺伝的交流がなく隔離されており、過去に交雑の影響を受けた後、長期間孤立することで、独自の核ゲノムをもつ系統に進化してきた可能性が示唆された。これらの結果は、複数の交雑帯を介した遺伝子浸透が、中部日本群の多様なサブグループの形成に影響を与えたこと示す。

RNA-seq については、NovaSeq_X_Plus により、RNA 配列を解読したところ、各個体平均 7.6Gbp、5 千万 read が得られた。クオリティチェック、アダプター配列の除去のあと、アセンブルした結果、contig 中央値長 376bp、平均 784bp で合計 371,491 遺伝子数、合計 548,462 転写産物 (transcripts) のデータが得られた。今後、遺伝子のアノテーションを進めて、集団間の発現量比較、各遺伝子での系統地理解析、クライン解析等を行うことで、交雑帯を超えて、適応的な遺伝子の遺伝子浸透が実際に生じているか検証する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tominaga Atsushi, Yoshikawa Natsuhiko, Matsui Masafumi, Nagata Nobuaki, Sato Yukuto	4. 巻 137
2. 論文標題 The emergence of a cryptic lineage and cytonuclear discordance through past hybridization in the Japanese fire-bellied newt, <i>Cynops pyrrhogaster</i> (Amphibia: Urodela)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological Journal of the Linnean Society	6. 最初と最後の頁 651 ~ 666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolinnean/blac120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 NISHIKAWA KANTO, MATSUI MASAFUMI, TOMINAGA ATSUSHI	4. 巻 5196
2. 論文標題 Morphological and taxonomic reexamination on a crocodile newt recently described from Japan (Urodela, Salamandridae, Echinotriton)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zootaxa	6. 最初と最後の頁 223 ~ 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11646/ZOOTAXA.5196.2.4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tran Dung Van, Tominaga Atsushi, Pham Lam Thi, Nishikawa Kanto	4. 巻 79
2. 論文標題 Ecological niche modeling shed light on new insights of the speciation processes and historical distribution of Japanese fire-bellied newt <i>Cynops pyrrhogaster</i> (Amphibia: Urodela)	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Ecological Informatics	6. 最初と最後の頁 102443 ~ 102443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ecoinf.2023.102443	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shiroma Hiroki, Tokuda Tatsuhiko, Tokuda Ai, Kamimura Ryo, Takenaka Sen, Tominaga Atsushi	4. 巻 42
2. 論文標題 Long-Term Rearing of Two <i>Cynops</i> Species and Fertility of Old <i>Cynops ensicauda popei</i> (Amphibia: Urodela)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Herpetology	6. 最初と最後の頁 210 ~ 218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5358/hsj.42.210	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富永篤
2. 発表標題 アカハライモリに見られる様々なタイプの交雑帯または交雑集団の状況
3. 学会等名 日本爬虫両棲類学会 第61回大会（沖縄大会）企画集会（交雑から考える種境界のサイエンス）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島田知彦・田上正隆・藤谷武史・富永篤・伊藤玄・山田紗友美・出口太一・山中裕樹
2. 発表標題 アカハライモリ渥美種族は生き残れるか？
3. 学会等名 日本爬虫両棲類学会 第61回大会（沖縄大会）企画集会（絶滅危惧種保全のための調査や対策の実践事例：我々に何ができるのかを改めて考える）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 城間大輝・松波雅俊・島田知・松井正・永野惇・富永篤
2. 発表標題 ゲノムワイド解析から判明したアカハライモリの複雑な進化
3. 学会等名 日本爬虫両棲類学会 第61回大会（沖縄大会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 城間大輝，松波雅俊，島田知彦，松井正文，永野惇，富永篤
2. 発表標題 ゲノムワイド解析による日本列島のアカハライモリの集団遺伝構造の解明
3. 学会等名 日本進化学会年大会 第24回沼津大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 城間大輝, 徳田龍弘, 徳田愛, 上村亮, 竹中践, 富永篤
2. 発表標題 オキナワシリケンイモリとアカハライモリの長期飼育及び高齢のシリケンイモリのオスによる繁殖事例
3. 学会等名 沖縄生物学会第59回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 城間大輝, 富永 篤
2. 発表標題 マイクロサテライト分析に基づく伊豆半島のアカ ハライモリ 2 系統の遺伝的關係
3. 学会等名 日本爬虫両棲類学会 第60回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	松波 雅俊 (Matsunami Masatoshi) (60632635)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (18001)	データ解析のサポート

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------