

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570101

研究課題名(和文)ハプロタイプ構造解析法による小型哺乳類の浸透交雑の解析

研究課題名(英文)Assessing evolutionary episodes of genetic hybridization in small mammals using the population haplotype structure analysis

研究代表者

鈴木 仁 (Suzuki, Hitoshi)

北海道大学・地球環境科学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40179239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、小型哺乳類においては頻りに観察される異なる地域系統間の二次的接触について、組換え現象に直目し、その時空間動態を把握するための手法の開発をめざした。特定の染色体領域で一定の間隔でマーカーを設置し、10 kb、200 kb、1 Mb、5 Mbの長さで対象領域をセットした。例えば200 kbの場合は20-30 kb間隔で計8個のマーカーをセットした。この異なる長さのハプロタイプ解析において、組換えサイトの間隔を推定した。これにより、数千年から数百年といった異なる時間スケールに応じて二次的接触のイベントの状況把握ができることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a new method to better understand spacial and temporal aspects for the secondary contact in which two distinct lineages of different geographic groups are mingled, focusing on recombination signals along a certain chromosome portion, such as 10 kb, 200 kb, 1 Mb, and 5 Mb. In a case of 200 kb segment, for example, we determined nucleotide sequences in eight gene region (~500 bp) being separated at 20-30 kb interval and assessed its haplotype structures. These methods allowed us to detect the secondary contact events of different time scales, such as several hundred years before present and several hundred thousand years ago. Further efforts would be needed to improve the method, aiming at establishment of ways to fully utilize the genetic information related to recombination events in molecular phylogeographic study.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物多様性・分類

キーワード：二次的接触 クロテン ハプロタイプ構造解析 毛色関連遺伝子 系統地理 浸透交雑 小型哺乳類 クマネズミ

1. 研究開始当初の背景

生物種は通常、複数の地域集団を有し、多様化の歴史は複雑である。特に、温帯・亜寒帯域に分布する種においては第四紀の環境変動が集団サイズの変動を誘起し、異なる地域系統の再会合(二次的接触)を引き起こしている。また時として現代の人間活動の中で外来の生物種が移入することで外来系統のゲノム断片が在来系統に組み込まれるという遺伝子汚染あるいは浸透交雑と称される現象も起きている。日本列島においてもハツカネズミ、クマネズミ、クロテン等で、このような異なる系統間の二次的接触や遺伝子汚染が起きていることが報告されている。しかしながら、このような異系統間の混合現象の時空間動態の詳細な実態把握は十分になされていない。

Koopman et al. (2007)は、栽培リンゴの遺伝子汚染の状況把握のために、野生リンゴのゲノムに浸透した栽培リンゴ系統のハプロタイプの大きさを解析した。その際、染色体上の位置の指標としてマイクロサテライトをマーカーとして用いた。移入したハプロタイプは世代が進むにつれ組換えによって短くなることをふまえ、移入ハプロタイプの長さから浸透後の世代数も推定された。しかし、マイクロサテライトでは適用種は限られ、1 cM 以上離れたマーカーを使うことが余儀なくされるので、十数世代前の事象しか把握できず、実際、この手法が他種に適用されることは今日までなかった。我々は、遺伝子が密に存在する染色体領域に着目し(染色体 8 番: 200 kb 内に 8 個のマーカーを設置)、イントロンの塩基配列をマーカーとして用い、ハプロタイプ構造解析法による二次的接触に関する研究を行った(Nunome et al. 2010)。すなわち、南アジア系統と北アジア系統が有史以前に混合していることが知られる日本産ハツカネズミにおいて、南北系統の組換え体ハプロタイプが存在することを示し、古い時代

の二次的接触の直接的証拠を得ることに成功した(Nunome et al. 2010)。さらに、西ヨーロッパ系統と南アジア系統長いハプロタイプの発見から、現代における遺伝子汚染の可能性を示唆した。以上のことをふまえ、個々の生物種において、ミトコンドリアDNA(mtDNA)等の従来の系統地理学的マーカーで自然史の把握を行うとともに、毛色関連遺伝子である Melanocortin 1 receptor 遺伝子(*Mclr*)および Agouti signaling protein gene(*Asip*)の 2 つの核の遺伝子と周辺の染色体領域を対象とし、ハプロタイプ構造の解析に基づき二次的接触に関する情報収集を行い、統合的に集団の進化的動態を把握することが重要であるとの認識に至った。

2. 研究の目的

(1) ハツカネズミの毛色関連遺伝子 *Mclr* の変異とハプロタイプ構造解析: 先の Nunome et al. (2010)において *Mclr* 周辺染色体領域で観察された、日本産ハツカネズミ(*Mus musculus*)の異なる系統の交雑の結果生じた組換え型ハプロタイプ構造を明らかにする。具体的には北海道、東北でみられる北東アジア型 *Mus musculus musculus* (MUS)と南アジア型 *M. m. castaneus* (CAS)間の組換え型、そして、釧路、共和町(北海道)および厚木でみられた MUS と西ヨーロッパ型 *M. m. domesticus* (DOM)間の組換え型ハプロタイプについて焦点をあて、断片長の長さの詳細について知ることによって雑種形成の時期を推定する。

(2) クマネズミの毛色関連遺伝子 *Asip* の変異とハプロタイプ構造解析: 小樽(北海道)には在来系統のアジア型(*Rattus tanezumi*)ではなく外来系統のインド・ヨーロッパ系統(*Rattus rattus*)が定着している。毛色関連遺伝子 *Mclr* (954 bp)の塩基配列の多型解析により小樽のクマネズミには低頻度でアジア型も含まれることが判明している。一方、沖縄島ヤンバル地域で全身黒色性のクマネズミ

の生息が近年確認され、予備的実験から *Mclr* がその責任遺伝子ではないことが判明している。そこで、候補遺伝子の *Asip* の全タンパク質コード領域を含む exon 2, 3, 4 の塩基配列を決定し、責任変異の探索を行うとともに、*Asip* の 3 つの exon 領域が 2-3 kb の長さで離れていることを利用し、数万年相当の古い時代の雑種形成の情報を得ることとした。

(3) 北海道産クロテンの毛色関連遺伝子 *Mclr* の変異とハプロタイプ構造解析: エゾクロテン (*Martes zibellina brachyura*) はユーラシア北東部に広く分布するクロテン *Martes zibellina* の 1 亜種として北海道に分布し、体サイズ、毛質、冬季の毛色において大陸産の系統とは異なることが知られている。これまでのミトコンドリア DNA (mtDNA) の解析からは、ロシア極東より北海道へ進化的に比較的近年に渡来したことが示唆されているが、エゾクロテンの形態学的独自性を説明する進化史の把握には至っていない。そこで本研究は、核遺伝子マーカーを用い、エゾクロテンの詳細な分子系統学的位置づけを行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ハツカネズミの毛色関連遺伝子 *Mclr* の変異とハプロタイプ構造解析: 北海道・東北を中心とした 19 地点の日本産野生ハツカネズミ 24 個体について、染色体 8 番上に、約 100 kb おきに 9 マーカー (1 Mb 連鎖群)、1 Mb おきに 6 マーカー (5 Mb 連鎖群) を解析した。

(2) クマネズミの毛色関連遺伝子 *Asip* の変異とハプロタイプ構造解析: アジアとオセアニアを中心に 10 カ国 25 地点より収集した 100 個体分について、*Asip* の coding exon 全長を含む、exon 2, 3, 4 に焦点をあて、近接するイントロン領域を含め塩基配列の解析を行った。

(3) 北海道産クロテンの毛色関連遺伝子 *Mclr* の変異とハプロタイプ構造解析: 北海

道とロシア極東地域よりクロテン計 68 個体の試料を収集し、mtDNA のチトクローム *b* 遺伝子 (*Cytb*; 638 bp) の解析を行った。また *Mclr* の塩基配列 (794 bp) と隣接する *Tcf25* 遺伝子 (305 bp) の解析も行い、北海道集団の 2 遺伝子間での組換え頻度を推定した。

4. 研究成果

(1) ハツカネズミのハプロタイプ構造解析: 主に MUS (韓国・日本系統) で構成される北海道産ハツカネズミの染色体中に 1 Mb レンジにおいて数百 kb の CAS (南・東南アジア系統)、5 Mb レンジにおいては 2 Mb 以上の DOM (西ヨーロッパ系統) のハプロタイプ断片が検出した。平均断片長から亜種間接触年代の推定をしたところ、CAS・MUS 間は約千年前、DOM・MUS 間は数十年以内に、それぞれ浸透交雑が生じたものと推察された。

(2) クマネズミの毛色関連遺伝子 *Asip* の変異とハプロタイプ構造解析: 沖縄の 42 サンプル、うち黒色性 4 サンプルにおいて調査した 3 つの exon 上に合計 7 つの変異サイトが認められた。黒色性に関連する変異サイトとして exon 4 の g.T462A の関与が示唆された。この変異は p.C124S のアミノ酸置換を伴い、ASIP の機能維持に必要な三次構造を崩壊させる。*Asip* の塩基配列の変異に基づく系統地理学的解析においては、地域独自の系統存在が示唆された。また今回塩基配列の解析を行った領域が互いに 2-3 kb 離れた 3 つの領域であったが、東・東南アジアに固有の系統間の組換え体ハプロタイプも観察された。従って、これらの地域で遺伝子流動が進化的時間の中で生じていることが示唆された。

(3) 北海道産クロテンの毛色関連遺伝子 *Mclr* の変異とハプロタイプ構造解析: エゾクロテン集団の塩基多様度はロシアの集団と比較し低く、mtDNA の系統は数十万年前に北海道に移入したとの従来の見解が支持

された。次に毛色関連遺伝子 *Mc1r* (794 bp) の解析を行ったところ、*Cytb* の結果とは対照的にエゾクロテン集団の多様性は高く、北海道には大陸と同一のハプログループ (I) と北海道独自のハプログループ (II) の2系統が存在することが明らかとなった。この傾向は、*Mc1r* の5 kb 上流に位置する *Tcf25* (305 bp) においても認められた。この2つの遺伝子マーカー間で明瞭な連鎖不平衡がみられたことから、ハプログループは異所的に生成されたものと推察された。両マーカー間で組換えも観察され、ここ数万年の交雑が示唆された。北海道には当初、全北区テン類の共通祖先が既存系統として分布し、そこに近年大陸からクロテンが移入した可能性が高いものと判断された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

Tomozawa T, Nunome M, Suzuki H, Ono H: Effects of founding events on the coat colour polymorphism of *Apodemus speciosus* on the Izu Islands. Biological Journal of the Linnean Society 2014 (in press) 査読有
Shinohara A, Kawada S-I, Son NT, Koshimoto C, Endo H, Can DN, Suzuki H: Molecular phylogeny of East and Southeast Asian fossorial moles (Lipotyphla, Talpidae). Journal of Mammalogy 2014:95 (in press) 査読有
Yasuda SP, Gamage CD, Koizumi N, Nishio S, Isozumi R, Shimizu K, Koma T, Amada T, Suzuki H, Yoshimatsu K, Arikawa: A distinct genetic characteristics of Sri Lankan *Rattus* and *Bandicota* (Murinae, Rodentia) inferred from mitochondrial and nuclear markers. Genes & Genetic Systems 2014 (in press) 査読有
Mitsuo Nunome, Gohta Kinoshita, Morihiko Tomozawa, Harumi Torii, Rikyu Matsuki,

Fumio Yamada, Yoichi Matsuda, Hitoshi Suzuki: Lack of association between winter coat colour and genetic population structure in the Japanese hare, *Lepus brachyurus* (*Lagomorpha: Leporidae*). Biological Journal of the Linnean Society 2014; 111: 461-776. 査読有10.1111/bij.12245

Vicki Thomson, Ken P Aplin, Alan Cooper, Susan Hisheh, Hitoshi Suzuki, Ibnu Maryanto, Grace Yap, Stephen C Donnellan: Molecular Genetic Evidence for the place of origin of the Pacific rat, *Rattus exulans*. PLoS ONE 01/2014; 9(3):e91356. 査読有10.1371/journal.pone.0091356

神戸嘉一, 鈴木 莊介, 矢部辰男, 中田勝士, 前園泰徳, 阿部慎太郎, 石田健, 谷川力, 橋本琢磨, 武田美加子, 土屋公幸, 吉松組子, 鈴木 仁: *Mc1r* 変異に基づくクマネズミ外来系統の日本列島における移入と浸透交雑の把握. 哺乳類科学 2014;53(2): 289-299. 査読有10.11238/mammalianscience.53.289

Suzuki H, Nunome M (以下13名省略): Evolutionary and dispersal history of Eurasian house mice *Mus musculus* clarified by more extensive geographic sampling of mitochondrial DNA. Heredity 2013;111: 375-390; 査読有 doi:10.1038/hdy.2013.60;

Kirihara T, Shinohara A, Tsuchiya K, Harada M, Kryukov AP, Suzuki H: Spatial and temporal aspects of occurrence of *Mogera* species in the Japanese islands inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. ZOOLOGICAL SCIENCE 2013; 30(4):267-281. 査読有 10.2108/zsj.30.267

Kotaro Ishida, Jun J. Sato, Gohta Kinoshita, Tetsuji Hosoda, Alexey P. Kryukov, Hitoshi Suzuki: Evolutionary history of the sable

(*Martes zibellina brachyura*) on Hokkaido inferred from mitochondrial *Cytb* and nuclear *Mc1r* and *Tcf25* gene sequences. *Acta Theriologica* 2013;58:13-24. 査読有 10.1007/s13364-012-0103-z

Suzuki H: Evolutionary and phylogeographic views on *Mc1r* and *Asip* variation in mammals. *Genes & Genetic Systems* 2013;88:155-164. 査読有 10.1266/ggs.88.155

Gohta Kinoshita, Mitsuo Nunome, Sang-Hoon Han, Hirofumi Hirakawa, Hitoshi Suzuki: Ancient colonization and within-island vicariance revealed by mitochondrial DNA phylogeography of the mountain hare (*Lepus timidus*) in Hokkaido, Japan. *ZOOLOGICAL SCIENCE* 2012;29:776-785. 査読有 10.2108/zsj.29.776

桑山崇・布目三夫・鈴木仁: 組換現象に着目した集団ハプロタイプ構造解析法— 分かれと出会いの系統地理学— タクサ 2012;32:7-12 査読有 ISSN 13422367

Alexey Kryukov, Liudmila Spiridonova, Sumio Nakamura, Elisabeth Haring, Hitoshi Suzuki: Comparative phylogeography of two crow species: jungle crow *Corvus macrorhynchos* and carrion crow *Corvus corone*. *ZOOLOGICAL SCIENCE* 2012;29(8):484-492. 査読有 10.2108/zsj.29.484

Jun J Sato, Mieczyslaw Wolsan, Francisco J Prevosti, Guillermo D'Elía, Colleen Begg, Keith Begg, Tetsuji Hosoda, Kevin L Campbell, Hitoshi Suzuki: Evolutionary and biogeographic history of weasel-like carnivorans (*Musteloidea*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2012;

63:745-757. 査読有 10.1016/j.ympev.2012.02.025

Shumpei P Yasuda, Manami Iwabuchi, Haruka Aiba, Shusaku Minato, Kunihiro Mitsuishi, Kimiyuki Tsuchiya, Hitoshi Suzuki: Spatial framework of nine distinct local populations of the Japanese dormouse *Glirulus japonicus* based on matrilineal cytochrome *b* and patrilineal SRY gene sequences. *ZOOLOGICAL SCIENCE* 2012; 29(2):111-120. 査読有 10.2108/zsj.29.111

Kambe Y, Nakata K, Yasuda SP, Suzuki H: Genetic characterization of Okinawan black rats showing coat color polymorphisms of white spotting and melanism. *Genes & Genetic Systems* 2012;87(1):29-38. 査読有 10.1266/ggs.87.29

Yoshikazu Kambe, Tsutomu Tanikawa, Yasuharu Matsumoto, Morihiko Tomozawa, Ken P Aplin, Hitoshi Suzuki: Origin of agouti-melanistic polymorphism in Wild Black Rats (*Rattus rattus*) inferred from *Mc1r* gene sequences. *ZOOLOGICAL SCIENCE*; 2011;28(8):560-567. 査読有 10.2108/zsj.28.560

T. Hosoda, J.J. Sato, L.-K. Lin, Y.-J. Chen, M. Harada, H. Suzuki: Phylogenetic history of mustelid fauna in Taiwan inferred from mitochondrial genetic loci. *Canadian Journal of Zoology* 2011;89(6):559-569. 査読有 10.1139/z11-029

〔学会発表〕(計11件)

鈴木仁 ヒトが関わるハツカネズミの東アジアにおける分散 日本変異原学会第85回大会 招待講演:望月喜多司記念シンポジウム 変異と進化を考える:我々はどこから来たのか、どこへ行くのか 2013年11月29日岡山コンベンションセンター

(岡山市)
笹森翔一・中田勝士・鈴木仁 *Asip* 遺伝子の変異に基づく沖縄産クマネズミの系統地理学的位置づけ 第 29 回日本霊長類学会・日本哺乳類学会 2013 年度合同大会 2013 年 9 月 6 日 岡山理科大学(岡山市)
高梨脩・土屋公幸・Ken Aplin・鈴木仁 クマネズミ類における環境適応に関連する遺伝子の進化的動態 第 29 回日本霊長類学会・日本哺乳類学会 2013 年度合同大会 2013 年 9 月 6 日 岡山理科大学(岡山市)
鈴木仁・Saw Bown・片倉賢 ミャンマー産ネズミ亜科 4 種の分子系統学的把握 第 29 回日本霊長類学会・日本哺乳類学会 2013 年度合同大会 2013 年 9 月 6 日 岡山理科大学(岡山市)
Hitoshi Suzuki, Shoichi Sasamori, Daisuke Nomi, Katsushi Nakata: Origin of coat color variation in the black rats in the Japanese Islands. Second International Symposium on East Asian Vertebrate Species 2012 年 9 月 28 日京都大学(京都市)
鈴木仁・笹森翔一・桐原崇・橋本琢磨 小笠原諸島弟島産クマネズミの毛色と *Mclr* 遺伝子の変異 日本哺乳類学会 2012 年度大会 2012 年 9 月 21 日 麻布大学(相模原市)
笹森翔一・中田勝士・鈴木仁 沖縄産全身黒色性クマネズミにおける Agouti Signaling Protein 遺伝子(*Asip*)変異の解析 第 83 回日本動物学会 2012 年 9 月 13 日 大阪大学(大阪市)
小川耕平, 細田徹治, 佐藤淳, 木下豪太, 安生浩太, 鈴木仁 北海道産クロテン (*Martes zibellina brachyura*) の毛色多型に関する責任遺伝子の解析 第 83 回日本動物学会 2012 年 9 月 13 日大阪大学(大阪市)
安生浩太・佐藤淳・細田徹治・木下豪太・鈴木仁 ニホンテン紀伊集団における毛

色関連遺伝子 *ASIP* の遺伝的分化 第 82 回日本動物学会 2011 年 9 月 22 日大雪アリーナ(旭川市)

鈴木仁 機能遺伝子周辺ハプロタイプ構造解析法による浸透交雑と自然選択の検出 第 82 回日本動物学会 2011 年 9 月 21 日 大雪アリーナ(旭川市)

鈴木仁・乃美大祐・神戸嘉一・安田俊平・中田勝士 沖縄島北部地域で捕獲された全身黒色型クマネズミの系統学的背景 日本哺乳類学会 2011 年度大会 2011 年 9 月 9 日宮崎観光ホテル(宮崎)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 仁 (SUZUKI, Hitoshi)

北海道大学・地球環境科学研究院・准教授

研究者番号: 40179239