

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：13902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770073

研究課題名(和文) ツチガエルのゲノムサイズに見られる種内多型の進化史に関する研究

研究課題名(英文) Studies of intraspecific variation in the genome size of Japanese wrinkled frogs,  
*Glandirana rugosa*

研究代表者

島田 知彦 (SHIMADA, Tomohiko)

愛知教育大学・教育学部・講師

研究者番号：30610638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ツチガエルには、性決定様式の異なる遺伝集団が複数認められており、その背景には、地域集団間の二次的な交雑を含む複雑な進化史の存在が示唆されている。本研究では本種のゲノムサイズに関する地理的変異を検討し、先行研究で祖先的な集団の1つとされた関東地方の集団において、他の地域に比べ大型のゲノムサイズを確認した。一方で、この差異は使用機種を検出限界に近く、計画段階で想定していたような詳細な比較はできなかった。また、本研究を通して収集した各地の標本に関して、形態的な比較を行い、その一部を公表した。

研究成果の概要(英文)：In *Glandirana rugosa*, several genetic groups which differ in the sex-determination systems have been recognized, and complicated evolutionary history containing the secondary hybridization of ancestral genetic groups was suggested in the previous studies. In this study, I examined geographic variation in the genome size of this species, and found that the genome size of the Kanto District, which had been suggested to be one of ancestral groups, was significantly larger than those of other groups. On the other hand, this variation was close to the limit of detection of the machine, and more detailed comparison which I assumed before starting the study was not possible. I also compared morphological characters of specimens collected through this study, and published a part of them.

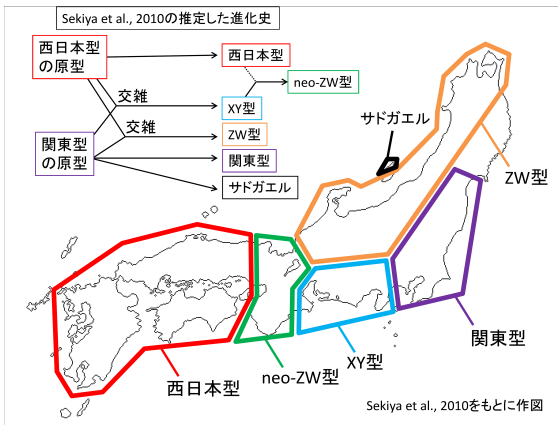
研究分野：系統分類学

キーワード：ゲノムサイズ ツチガエル 地理的変異

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本固有種であるツチガエルには、性決定様式の異なる複数の地域集団（関東型、ZW型、XY型、neo-ZW型、西日本型）が存在することが知られており、その背景には、地域集団間の二次的な交雑を含む複雑な進化史の存在が示唆されている（下図；Ogata et al., 2008; Sekiya et al., 2010）。

またこれらとは別に佐渡島には独自の鳴き声や形態的特徴を持った集団が生息しており、先年別種サドガエルとして記載された（Sekiya et al., 2011）。しかし、本種はミトコンドリアDNAの塩基配列に基づけば、ツチガエルの一部の地域集団（関東型、XY型、neo-ZW型）と近縁であることが知られており、本種の記載によりツチガエルは側系統と見なされるため、より詳細な種内多型の検討が必要とされている。



(2) 本研究の代表者は、フローサイトメーターを用いて予備的なゲノムサイズの計測を行い、ツチガエルの中でも先行研究で祖先的な集団とされた関東型と西日本型の各1地点でゲノムサイズが異なる（関東型 > 西日本型）ことを示唆する結果を得ており、さらに、それらの交雑個体由来する集団とされたXY型、ZW型、neo-ZW型の各1地点においては、その中間的な値が得られていた。ただ、ゲノムサイズの計測には誤差が伴うため、1集団あたり1地点の比較では議論が難しく、1地点あたりの個体数も少なかったため、より多くの地点、サンプルを用いた比較が必要であった。

(3) このようなゲノムサイズの変異は、近年分類学的な研究に用いられるケースも多くなっており（たとえばBorkin et al., 2001）、過去の地域個体群間の交雑が想定されているツチガエルのケースにはこうしたアプローチが有効であることが考えられた。

2. 研究の目的

(1) 予備実験の結果を受け、本研究では、まずツチガエルとサドガエルのゲノムサイズに関する全国的な地理的変異の概要を明らかにすることを目的とした。

(2) その上で、交雑由来とされる集団で、祖先集団同士の中間的なゲノムサイズが得られた場合には、祖先集団同士の人工交配を行って交雑個体のゲノムサイズを調べ、同じようなゲノムサイズの値が再現できるかを検討することにした。

(3) また従来の研究ではミトコンドリアDNAを用いた系統解析が行われてきたが、近年では核ゲノム中でも塩基配列ベースの系統解析に耐えうるレベルの変異を有する領域が様々な分類群で見ついているため、そのような領域を用いた分子系統学的な解析に関する検討も合わせて行うこととした。

3. 研究の方法

(1) ツチガエルの既知の5地域集団とサドガエルから、地域全体を網羅するように採集を行い、採取した血液をフローサイトメーターで解析して相対的なゲノムサイズを決定した。ゲノムサイズ決定のための内部標準には愛知県産のヌマガエルを使用した。染色には当初、変異原性の比較的少ないDAPI染色を使用した。解像度の向上を図るため、エチジウムブロマイド染色に変更した（後述）。

(2) また先行研究において祖先的な集団とされている関東型と西日本型のツチガエルを交雑させ、得られた幼生の尾の鰭の細胞を用いて、ゲノムサイズの測定を試みた。

(3) さらに、核ゲノム中の遺伝子のイントロン領域を用いて塩基配列ベースの分子系統樹を構築するために、各地域の代表的な個体を用いて、POMC、NCX、Rhodopsin等の領域の塩基配列を決定した。

4. 研究成果

(1) 28地点172個体のツチガエル・サドガエルから採取した血液試料を用いてゲノムサイズの推定を行ったところ、関東型のゲノムサイズが、その他のツチガエルの各系統のゲノムサイズと比べて有意に大きいことが示された（下図）。またサドガエルに関して

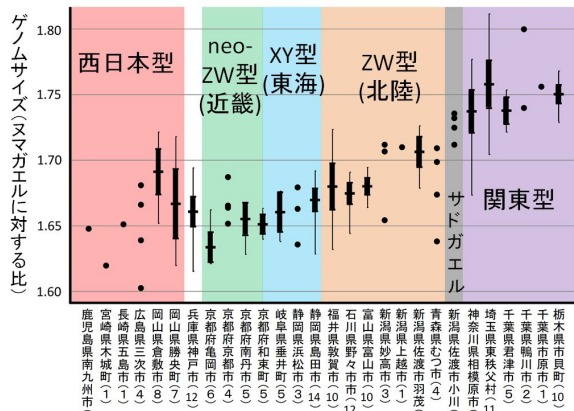


図. 各地点のツチガエルのゲノムサイズ。5個体以上の試料が得られた地点については、平均値とその95%信頼区間、最小、最大値を示す箱ヒゲ図で表した。

も、関東型に準ずる程度の大型のゲノムサイズが検出された。どの系統においてもゲノムサイズに雌雄差は認められず、また一般線形化モデルを利用したモデル選択の結果、採集地点の緯度、経度、年平均気温とゲノムサイズとの間に相関は検出できなかった。6系統の中で最小のゲノムサイズ平均値を示す西日本型(ヌマガエルの1.657倍)に比べて、関東型のゲノムサイズ平均値(ヌマガエルの1.748倍)は5.5%ほど大きな値を示すが、この値はBorkin et al. (2001)によって報告された *Pelobates f. fuscus* の2タイプ間に見られる値(5.9%)に匹敵するものであり、種内の地理的変異としては比較的大きなものであった。

(2) 先行研究において関東型と西日本型の祖形間の交雑に由来することが示唆されているXY型、ZW型、neo-ZW型は、予備実験の際には祖先型の中間的なゲノムサイズを呈していたが、標本数と地点を増やしてゆくとそのような傾向が薄れ、基本的に西日本型に近いゲノムサイズを呈した。これらのうちXY型とneo-ZW型は、ミトコンドリアDNAの塩基配列では関東型やサドガエルに比較的近縁であるが、ゲノムサイズではいずれも西日本型に似た特徴を持っていることになる。

この結果をそのまま解釈すると、各交雑由来集団は、2つの祖先型のうち西日本型のゲノムサイズの特徴を受け継いでいると考えることができる。ただその一方で、関東型の大型のゲノムサイズが、一連の地域集団の成立後、比較的最近生じた形質である可能性も否定できず、上記のような結果が生じた要因を1つに絞ることはできなかった。

(3) 一方、各々の地域で得られたゲノムサイズにはある程度の幅が見られ、同一個体から採取したサンプルであっても、解析時期により異なる結果が得られる場合があった。この点を改善すべく、当初行っていたDAPI染色から、より精度の高いエチジウムブロマイド染色への変更を試みた。また実験室の室温や照明光量、血液採取時の温度や所要時間、内部標準の採取方法等の諸条件の徹底的な統一をはかり、液体窒素と超低温フリーザーを用いた血液の冷凍を行って、解析条件の統一を試みるなど、実験条件の統一や効率の向上を目指して様々な試行錯誤を行った。しかし結果的には、ある程度以上に再現性を向上させることはできなかった。もともとフローサイトメーターによって算出されるゲノムサイズには一定程度の誤差が認められる。本研究で使用している機種の場合、最大3%程度の誤差が生じてしまうため、その程度の幅が検出限界であると考えられた。

(4) (1)で述べたように本研究で対象としているツチガエルのゲノムサイズの地域間差は最大で5.5%程度あり、この程度の差

であれば、機械側にある程度誤差があっても地域間差として検出できる。しかし、計画段階で予定していた、異なるゲノムサイズを持つ地域間の交雑個体の検討となると、取り扱う変異の量が検出限界を下回ってしまうため、正確な比較が難しくなる。実際、人為的に作出した交雑個体のゲノムサイズの検討を試験的に行ったが、値のばらつきが大きく、詳細な議論は難しかった。またこれに関しては、試料として成体では血液、幼生では鱗を使っており、サンプル調整の方法が異なることも、ばらつきが大きくなった理由として考えられた。そのため、交雑個体を飼育してある程度成長したところで血液を採取する方法も検討したが、変態した幼生を、血液が十分採取できるサイズにまで成長させることができず、実験を試みることができなかった。

(5) (2)で述べた交雑由来個体群において、核ゲノムの塩基配列の観点から議論を深めるために、各地点を代表する個体を用いて配列決定を行った。各領域ともある程度の変異は認められたが、系統関係の推定に十分な情報量は得られなかった。

(6) 本研究のサンプリングを通して各地のツチガエルの成体・幼生の標本を収集したため、予備的に形態的な比較を行った。その結果、幼生の形態的特徴に地理的変異が認められた(未発表)他、ツチガエルとサドガエルの成体の虹彩の色に関して、未報告の識別形質を発見したため、これについて報告した(Shimada, 2015)。

#### <引用文献>

- Borkin et al. (2001) Cryptic speciation in *Pelobates fuscus* (Anura, Pelobatidae): evidence from DNA flow cytometry. *Amphibia-Reptilia* 22: 387-396.
- Ogata et al. (2008) The ZZ/ZW sex-determining mechanism originated twice and independently during evolution of the frog, *Rana rugosa*. *Heredity* 100:92-99.
- Sekiya et al. (2010) Phyletic diversity in the frog *Rana rugosa* (Anura: Ranidae) with special reference to a unique morphotype found from Sado Island, Japan. *Current Herpetology* 29: 69-78.
- Sekiya et al. (2012) A new frog species of the genus *Rugosa* from Sado Island, Japan. *Zootaxa* 3575: 49-62.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Shimada, T. 2015. A comparison of iris color pattern between

*Glandirana susurra* and *G. rugosa*  
(Amphibia, Anura, Ranidae).  
Current Herpetology (査読あり) 34  
巻1号: 80-84

Doi:

<http://dx.doi.org/10.5358/hsj.34.80>

[学会発表](計 1件)

島田知彦・青木友紀・加藤淳太郎・ツチガ  
エルのゲノムサイズに見られる地理的  
変異 第51回日本爬虫両棲類学会大会・  
愛知学泉大学 .2012年11月(ポスター)

6. 研究組織

(1)研究代表者

島田 知彦 (SHIMADA, Tomohiko)

愛知教育大学・教育学部・講師

研究者番号: 30610638