

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440214

研究課題名(和文)ミトゲノム解析と核マーカータイピングによる日本産ハブ属3種の遺伝的集団構造の研究

研究課題名(英文) Genetic diversity and divergence of the Habu viper, *Protobothrops* among Japanese subtropical islands.

研究代表者

柴田 弘紀 (Shibata, Hiroki)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：80315093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：国内産ハブ3種(ハブ、トカラハブ、サキシマハブ)の遺伝的集団構造を詳細に検討するため、12の島から計44検体を収集し、ミトゲノム配列の決定を行った。最尤系統樹を構築したところ、ハブは沖縄クレードと現在のトカラハブを含む奄美クレードの間で大きく遺伝的に分化していた。また、トカラハブを独立種とする従来の考え方は、ミトゲノムデータからは支持されなかった。また奄美クレードと沖縄クレードの分岐年代は、600万年以上前と推定され、奄美群島と沖縄諸島の地理的な分断(150万年前)よりも古かった。さらに、沖縄クレードに比べて、奄美クレード内では遺伝的多様性が高く、島嶼集団ごとの遺伝的分化が顕著であった。

研究成果の概要(英文)：There are 3 Habu species currently recognized in Japan: *Protobothrops flavoviridis* from the Amami Islands and the Okinawa Islands, *P. tokarensis* from the Tokara Islands, and *P. elegans* from the Yaeyama Islands. To survey their genetic divergence and diversity, we determined the complete mitogenome sequence (approx. 17 kb) from 44 specimens collected from 12 islands. The maximum likelihood tree showed a significant divergence between the Amami Clade and the Okinawa Clade. The Amami Clade also includes all specimens from the Tokara Islands currently known as an independent species, *P. tokarensis*, suggesting the paraphyly of the taxon, *P. flavoviridis*. In contrast, the validity of the taxon, *P. elegans* as an independent species was supported. By MCMC method, we estimated the divergence time between the Amami Clade and the Okinawa Clade to be 6.5 MYA, indicating that the vicariance of the two clades preceded the geological separation of the Amami Islands and the Okinawa Islands (~1.5MYA).

研究分野：遺伝学

キーワード：遺伝的多様性 ハブ 系統地理学 ミトゲノム マイクロサテライトマーカー

1. 研究開始当初の背景

ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) は、日本固有の毒蛇で、その咬症による被害の重篤さは世界でも有数の毒蛇として知られる。その分布は、奄美群島から沖縄諸島までの 22 の島とされている。一方、奄美群島の北に位置するトカラ列島の宝島及び小宝島の個体群は、その特異な形態的特徴からトカラハブ (*P. tokarensis*) として別種とされている。同様に八重山諸島に分布する個体群は、サキシマハブ (*P. elegans*) として別種とされている (下図 1)。これらハブ属 3 種の分布は南西諸島の全 32 島に及ぶ。トカラハブやサキシマハブは形態的特徴だけでなく、毒性が弱いことや、性質が温和なことなどが、ホンハブとの違いとして知られている。一方ホンハブとされる中にも地域集団間の遺伝的変異が存在することが示唆されており、たとえば研究分担者の千々岩らは、奄美大島産個体に存在するいくつかの毒成分が、琉球本島産個体では欠失していることを見出していた (Chijiwa et al 2000 など)。

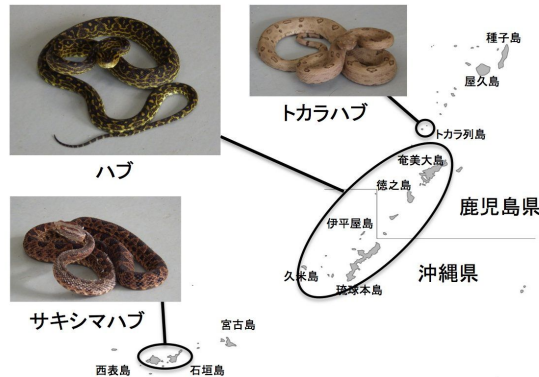


図1: 日本産ハブ属3種の分布

ハブ属は地理的には広く分布するものの、島間の行き来は海洋によって完全に遮断されている。各島の個体群は、異なった自然環境への適応進化だけでなく、移動能力に乏しいため島内でもさらに小さな集団に分断されている可能性も高く、遺伝的浮動の効果により集団間で著しい遺伝的分化が生じていることが期待された。

ハブ属の遺伝的多様性に関するそれまでの研究としては、アロザイム解析や、少数の DNA マーカーを用いた解析があったが、いずれも近縁の他種との比較解析に重点を置いたもので、解析サンプル数は限定的で、ハブ属の遺伝的多様性の全体像は未解明であった。いずれの生息地でも捕食者として重要な生態的地位をしめる生物種であるが、琉球本島やトカラ列島などでは個体数が急激に減少しており、生態系への影響が危惧されている。公衆衛生の観点からも生態系保全の観点からも重要な生物種であるにも関わらず、ハブの遺伝的多様性に関する体系的研究の報

告は、研究開始当初 (2013 年 4 月) 全くなかった。

2. 研究の目的

(1) 日本固有のハブ属 3 種 (ハブ、トカラハブ、サキシマハブ) の全生息域にわたる遺伝的多様性のデータを系統的に取得する。

(2) 得られるデータを解析することで、集団間での遺伝的分化を定量化し、分岐年代推定などを行うことで、南西諸島におけるハブ属の現在のとびとびの分布が形成された歴史を集団遺伝学的に再構築する。

3. 研究の方法

(1) ハブ属の生息する国内全 32 島からの検体を収集する。その際、出来る限り GPS 情報も合わせて収集する。各検体の筋肉組織からゲノム DNA を抽出し、ハブ島嶼集団 DNA パネルとして整備する。

(2) 各島 3 検体以上の検体を用いて、ミトコンドリアゲノム配列決定を行う。得られた塩基配列情報を用いて系統樹を構築し、ハブ属 3 種の系統地理を包括的に解明する。また MCMC シミュレーションにより分岐年代の推定を行う。

(3) ゲノムショットガンデータから情報学的に抽出した繰り返し配列のうち、多型性の確認できたものを、マイクロサテライトマーカーとして確立する。島嶼集団パネルについて得られた核マーカーのジェノタイピングを行い、(2) と同様の分子集団遺伝学的解析を行うことで、ミトゲノムによる系統地理学的データの補完を図る。

4. 研究成果

(1) *Protobothrops* 属全体における国内産 3 種の系統的位置関係を奄美大島、沖縄本島、宝島、小宝島、石垣島、西表島の各 1 個体のミトゲノム配列 (約 17 kb) を決定し、近縁 11 種の配列データと合わせて最尤系統樹を構築した (図 2)。その結果、*Protobothrops* 属は少なくとも 4 つの種群を含み、ハブとトカラハブは独自の種群 (図中の Group II) を形成していることが示された。またサキシマハブは、台湾ハブ (*P. mucrosquamatus*) およびマオランハブ (*P. maolanensis*) とともに別の種群 (図中の Group III) を構成していることもわかった。さらに、他種と比較してもハブの遺伝的多様性は高く、奄美大島と沖縄のハブが遺伝的に分化していることや、トカラハブは奄美大島のハブに遺伝的に非常に近いことなどが示された。

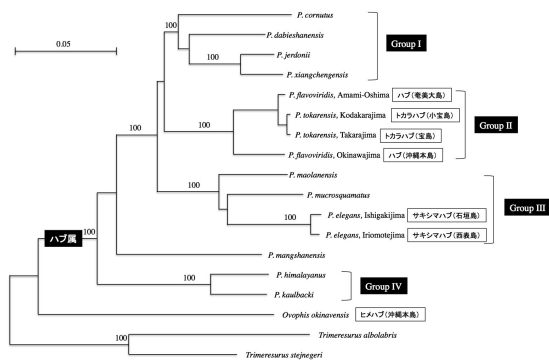


図2:ミトゲノム解析によるハブ属内の分子系統解析

(2) 上の結果を受けて、ハブの遺伝的集団構造を詳細に検討するため、以下の12の島から計44検体(上の種間比較で用いられた6検体を含む)を収集し、さらなるミトゲノム配列の決定を行った:奄美大島(5検体) 加計呂麻島(4) 徳之島(4) 沖縄本島(4) 伊平屋島(4) 伊江島(4) 渡嘉敷島(4) 久米島(3) 宝島(トカラハブ)(4) 小宝島(トカラハブ)(4) 石垣島(サキシマハブ)(1) 西表島(サキシマハブ)(1) ヒメハブ(沖縄本島)(1) 得られた塩基配列を用いて最尤系統樹(図3)を構築したところ、ハブは沖縄クレードと現在のトカラハブを含む奄美クレードに大別されることがわかった。また、ハブの島集団間の遺伝的多様性は大きい、従来のトカラハブを独立種とする考え方は、ミトゲノムのデータからは支持されないことがわかった。さらに、沖縄クレードに比べて、奄美クレード内では遺伝的多様性が高く、島嶼集団ごとの遺伝的分化が顕著であった。さらに、奄美クレードと沖縄クレードの分岐年代は、MCMCシミュレーションにより651万年前と推定された。このことは、2つのクレードの分岐は、奄美諸島と沖縄諸島の地理的分岐(150万年前)にかなり先立っていたことが示された。

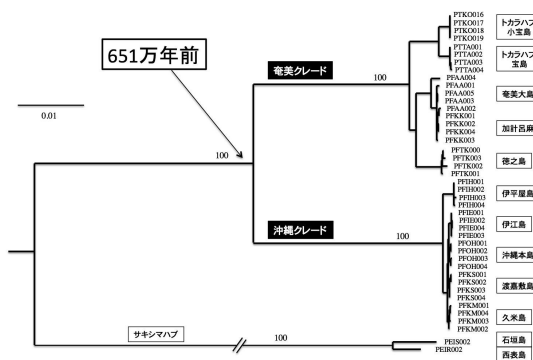


図3:ミトゲノム解析による島嶼集団間の多様性解析

(3) マイクロサテライトマーカー収集
ハブのゲノムショットガンリード10 Gbから、情報学的手法により、マイクロサテライトの候補となる配列を合計1万本以上同定した。ここから十分な多型性を示すマイクロサテライトの単離を進めた。M13配列を5'端に付

加した特異的プライマーと蛍光標識済のM13プライマーを共存させてPCRを行うことで標識の効率化を量り、十分な多型性を示すマイクロサテライトマーカーを30個単離した。

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 2 件)

①Shibata H, Chijiwa T, Hattori S, Terada K, Ohno M, Fukumaki Y. The taxonomic position and the unexpected divergence of the Habu viper, *Protobothrops* among Japanese subtropical islands. Mol Phylogenet Evol. 2016. Aug; 101: 91-100.

②Yamaguchi K, Chijiwa T, Ikeda N, Shibata H, Fukumaki Y, Oda-Ueda N, Hattori S, Ohno M. The finding of a group IIE phospholipase A2 gene in a specified segment of *Protobothrops flavoviridis* genome and its possible evolutionary relationship to group IIA phospholipase A2 genes. Toxins 2014 6(12): 3471-3487.

〔学会発表〕(計 11 件)

①柴田弘紀、千々岩崇仁、上田直子、中村仁美、服部正策、松原和純、松田洋一、森一樹、田代康介、久原哲、山崎慎一、藤江学、後藤大輝、将口栄一、久田香奈子、小柳亮、佐藤矩行、大野素徳、服巻保幸、小川智久
日本固有の毒蛇ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) の全ゲノム配列決定と遺伝子モデルの作製

2015年12月5-6日

第54回日本爬虫両棲類学会大会、千葉、東邦大学習志野キャンパス

②柴田弘紀、千々岩崇仁、上田直子、中村仁美、服部正策、松原和純、松田洋一、森一樹、田代康介、久原哲、山崎慎一、藤江学、後藤大輝、将口栄一、久田香奈子、小柳亮、佐藤矩行、大野素徳、服巻保幸、小川智久
日本固有の毒蛇ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) の全ゲノム配列決定と遺伝子モデルの作製

2015年12月01-04日

第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会、神戸、神戸ポートアイランド

③山口和晃、千々岩崇仁、池田直樹、林みず紀、柴田弘紀、上田・小田直子、服巻保幸、服部正策、大野素徳
クサリヘビ科ヘビの毒ホスホリパーゼ A2 遺伝子の形成と起源

2015年12月01-04日

第38回日本分子生物学会年会、第88回日本

生化学会大会合同大会、神戸、神戸ポートアイランド

④柴田弘紀、千々岩崇仁、上田直子、服部正策、小柳亮、久田香奈子、佐藤矩行、大野素徳、服巻保幸、小川智久
日本固有の毒蛇ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) の全ゲノム配列決定と遺伝子モデルの作製
2015年9月24-26日
第87回日本遺伝学会大会、仙台、東北大学

⑤山口和晃、千々岩崇仁、池田直樹、柴田弘紀、上田直子、服巻保幸、服部正策、大野素徳
クサリヘビ科ヘビの分泌型ホスホリパーゼ A2 遺伝子クラスターの起源と分子進化
2014年11月25-27日
第37回日本分子生物学会年会、横浜、パシフィコ横浜

⑥柴田弘紀、山本真由美、タケット奈々、小川智久、森一樹、千々岩崇仁、服部正策、上田直子、久原哲、大野素徳、服巻保幸
ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) の全ゲノム配列決定の現状と展望
2014年5月24-25日
日本動物学会九州支部 (第67回)、九州沖縄植物学会 (第64回)、日本生態学会九州地区会 (第59回)、沖縄生物学会 (第51回) 合同沖縄大会、沖縄県西原町、琉球大学

⑦柴田弘紀、山本真由美、タケット奈々、小川智久、森一樹、千々岩崇仁、服部正策、上田直子、久原哲、大野素徳、服巻保幸
日本固有の毒蛇ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) の全ゲノムシーケンスと繰り返し配列の解析
2013年12月3-6日
第36回日本分子生物学会年会、神戸、神戸ポートアイランド

⑧山口和晃、千々岩崇仁、柴田弘紀、上田直子、服部正策、大野素徳
クサリヘビ科グループ IIE ホスホリパーゼ A2 の発見と、ホンハブのグループ IIA 毒性ホスホリパーゼ A2 との進化的関与
2013年12月3-6日
第36回日本分子生物学会年会、神戸、神戸ポートアイランド

⑨柴田弘紀、山本真由美、タケット奈々、小川智久、森一樹、千々岩崇仁、服部正策、上田直子、久原哲、大野素徳、服巻保幸
日本固有の毒蛇ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) の全ゲノムシーケンスと繰り返し配列の解析
2013年11月2-3日
第52回日本爬虫両棲類学会大会、札幌、東海大学札幌校舎

⑩柴田弘紀、山本真由美、タケット奈々、小川智久、森一樹、千々岩崇仁、服部正策、上田直子、久原哲、大野素徳、服巻保幸
日本固有の毒蛇ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) の全ゲノムシーケンスと繰り返し配列の解析
2013年9月19-21日
第85回日本遺伝学会大会、横浜、慶応大学日吉キャンパス

⑪柴田弘紀、山本真由美、タケット奈々、小川智久、森一樹、千々岩崇仁、服部正策、上田直子、久原哲、大野素徳、服巻保幸
日本固有の毒蛇ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) の全ゲノムシーケンスと繰り返し配列の解析
2013年8月28-31日
第15回日本進化学会大会、筑波、筑波大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 弘紀 (SHIBATA HIROKI)
九州大学・生体防御医学研究所・准教授
研究者番号：80315093

(2) 研究分担者

千々岩 崇仁 (CHIJIWA TAKAHITO)
崇城大学・生物生命学部・教授
研究者番号：30331060

(3) 連携研究者

服部 正策 (HATTORI SHOSAKU)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：30134620

(4)連携研究者

熊澤 慶伯 (KUMAZAWA YOSHINORI)

名古屋市立大学・システム自然科学研究
科・教授

研究者番号：60221941