

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：85502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440227

研究課題名(和文) 適応放散過程にあるトラフグ属魚類の集団・種多様性進化過程の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the evolutionary mechanisms involved in species diversification of Takifugu that have undergone explosive speciation

研究代表者

高橋 洋 (Takahashi, Hiroshi)

独立行政法人水産大学校・その他部局等・講師

研究者番号：90399650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は適応放散過程にあるトラフグ属魚類の多様性進化における種内変異と種間交雑の役割について、主に遺伝マーカーを用いて検証することを目的に実施した。トラフグ属魚類2種(A種とB種)において、自然下で大規模な交雑現象が起きていることが明らかになり、また交雑がB種雌とA種雄間の方向で偏って起きていることが明らかになった。雑種第一世代(F1)の多くはA種方向に戻し交雑していることが明らかになり、これら戻し交雑個体は両親種やF1よりも形態学的多様性に富むことが示された。これらの結果から、種間交雑を介したB種からA種への一方向的な遺伝子流動と、A種のもつ遺伝的・形態学的種内変異との関連性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the evolutionary role of intraspecific variation and natural hybridization in diversification of Takifugu that have undergone adaptive radiation, mainly based on genetic markers. Mass occurrences of natural hybridization between the two sibling species (A and B) were observed and analysis of mtDNA indicated that hybridization was highly directional in which the majority of the F1 hybrids were offspring of species B females and A males. In addition, most of the F1 hybrids backcrossed to species A and these backcross individuals had higher morphological variation than in both parental species and F1. These results suggest that interspecific gene flow has been highly asymmetrical toward A and this may explain in part the marked difference in intraspecific genetic and morphological diversity between the two species.

研究分野：集団遺伝学

キーワード：種間交雑 適応放散 異種間浸透 トラフグ属魚類

1. 研究開始当初の背景

トラフグ属魚類は、東アジア沿岸域に局所的に分布し約 20 種が知られている。近年、核遺伝子およびミトコンドリア DNA 全長配列を用いた分岐年代推定により、本属魚類が鮮新生以降に、東シナ海および日本周辺海域上記海域において、爆発的種分化をとげた単系統群であることが明らかになった。本属魚類の適応放散は、東アフリカの大地溝帯におけるシクリッド科魚類やバイカル湖のカジカ科魚類の例に匹敵するものであり、海洋における種分化研究のモデルシステムとなりうるということが指摘されている。

上に述べたシクリッド科魚類やガラパゴスフィンチなど、適応放散している分類群の中でも、ゲノムレベルの研究が進んでいる分類群では、その多様性進化過程に、種内変異や種間交雑が深く関わってきたことが明らかになりつつある。一方、トラフグ属魚類では、各種につき少数個体を用いた系統推定が行われているものの、定量的な試料採集に基づく種内変異や種間交雑に関する研究が進んでいない。

また、トラフグ属魚類は水産重要種を多く含み、種によって有毒部位が異なることから、種内変異や種間交雑個体を誤判別することは食中毒事故につながる。その一方で、トラフグ属魚類各種は互いに近縁であり、形態学的差違も小さい。特に雑種は、両種の間中間的な形態をもつことから、判別は極めて難しい。分子マーカーを用いた本属魚類の種内変異や種間交雑の詳細な研究は、上述の通り、海洋における多様性進化に関する理解を深めると共に、正確な種・雑種判別にも役立つため、水産業に対する貢献も大きい。

2. 研究の目的

本研究では、種内および近縁種間の核ゲノム全体にわたる遺伝的変異を効率よく捉えられる増幅断片長多型 (AFLP) および制限部位近傍 DNA (RAD) シーケンシングを分子マーカーとして用い、特に未解明な部分が多いトラフグ属魚類の種内変異・種間交雑に焦点を絞り、地理的分化や交雑を繰り返しつつ進化するトラフグ属魚類の適応放散過程を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、はじめに日本近海で漁獲される 11 種について、各種につき 8 個体を用いた予備実験を行い、AFLP 法に基づく種判別マーカーを開発した。そこで得られた 1 種あたり 13~36 座の種判別マーカー (特定の種の全個体で検出され、他種では全く検出されない座) を用い、定量的な種内変異・種間交雑分析を行う種を選択した。

その結果、近年東日本沿岸域で外部形態より種が判別できない種類不明フグとして大量に混獲され、流通から排除されているショウサイフグとゴマフグの雑種に着目し、その定量的な試料採集を行った。

東日本沿岸域より、ショウサイフグ、ゴマ

フグ、および両種の間中間的な外部形態を示す種類不明フグを約 300 個体採集し、市販の DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出した。それらについて、定法に従い AFLP 分析を行った。AFLP 分析では、11 通りの Eco RI/Mse I selective primer を用い、フラグメントの検出には ABI 3130 Genetic Analyzer および GeneMapper software を用いた。

得られたデータに基づき、各個体の雑種クラス判別を行った。雑種クラス判別には、STRUCTURE, NewHybrids, および DAPC の 3 つの手法を用いた。NewHybrids では、純粋な両親種, F1 雑種, F2 雑種, ショウサイフグ方向への戻し交配第一世代, ゴマフグ方向への戻し交配第一世代の 6 つの雑種クラスを仮定した。また、各個体の mtDNA の塩基配列を調べ、その母系推定を行った。最後に、両親種の遺伝的多様性を比較するために、AFLP データに基づき、多型アリル頻度、ヘテロ接合度、塩基多様度をそれぞれ推定した。

雑種クラス判別の結果分けられた個体を外部形態から判別できるかどうかを検討するために、両眼間隔や体高などの 8 定点間距離、および背鰭軟条数などの 3 計数形質を計測した。外部形態データは、形質ごとに分散分析を行った後、DAPC により判別率を計算した。

4. 研究成果

解析した約 300 個体うちの 131 個体が雑種 F1 であり、17 個体がショウサイフグ方向への戻し交配第一世代、1 個体がゴマフグ方向への戻し交配第一世代だった (図 1)。また、131 個体の F1 のうち、75.6% がゴマフグ雌とショウサイフグ雄間の子であり、交雑には方向性が見られた。

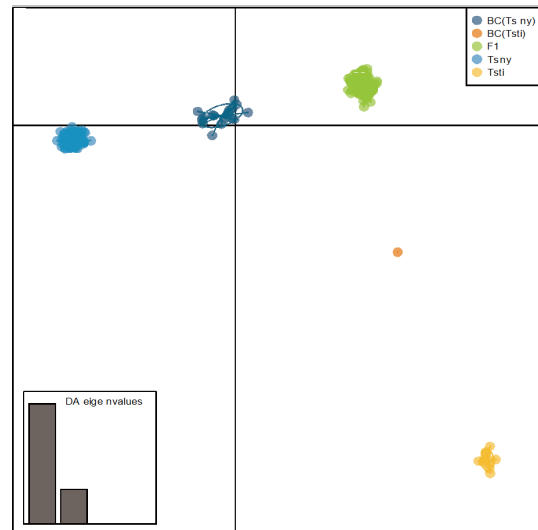


図 1. AFLP データに基づく DAPC の結果

1 個体を除き全ての戻し交配個体がショウサイフグ方向への戻し交配だったこと、遺伝的に純粋だと判別されたショウサイフグにゴマフグ由来の mtDNA を持つ個体が含まれていたことなどから、両種間の遺伝子流動は、ゴマフグからショウサイフグ方向へ、一方向的に起きていることが推察された。AFLP に基

づく遺伝的多様性の比較では，多型アリル頻度，ヘテロ接合度，塩基多様度の全てにおいてショウサイフグの方がゴマフグよりも統計学的に有意に高く，両種間の遺伝子流動の方向性はその傾向に一致する。

外部形態に基づく DAPC では，遺伝的に純粋なショウサイフグ，ゴマフグ，雑種 F1 の判別率は 100% に近かったが，戻し交配個体の判別率は極めて低かった（図 2）。戻し交配個体の外部形態のばらつきは非常に大きく，超越分離によって形態の多様性もたらされている可能性が示唆された。

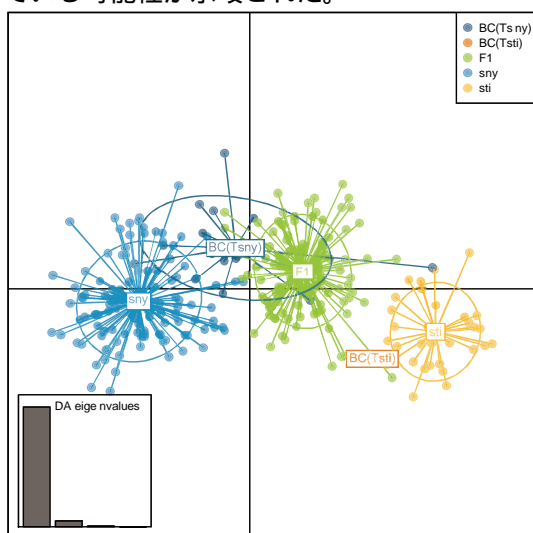


図 2. 外部形態に基づく DAPC の結果

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 8 件）

Asano Ishikawa, Naoko Takeuchi, Makoto Kusakabe, Manabu Kume, Seiichi Mori, Hiroshi Takahashi, Jun Kitano. 2013. Speciation in ninespine stickleback: reproductive isolation and phenotypic divergence among cryptic species of Japanese ninespine stickleback. *Journal of Evolutionary Biology*. 26: 1417-1430.
DOI: 10.1111/jeb.12146

Masato Uehara, Yoshinao Z. Hosaka¹, Hiroyuki Doi, Harumi Sakai. 2014. The shortened spinal cord in tetraodontiform fishes. *Journal of Morphology*. 276: 290-300.
DOI: 10.1002/jmor.20338

Hiroyuki Doi, Yutaro Zenke, Hiroshi Takahashi, Harumi Sakai, Toshiaki Ishibashi. 2015. Hybridization of burrfish between *Chilomycterus antillarum* and *Chilomycterus schoepfii* in captivity revealed by AFLP and mtDNA sequence analyses. *Ichthyological Research*. 62: 516-518.
DOI: 10.1007/s10228-015-0460-0

Hiroshi Takahashi, Naohiko Takeshita, Hideaki Tanoue, Shusaku Ueda, Hirohiko Takeshima, Teruhisa Komatsu, Izumi Kinoshita, Mutsumi Nishida. 2015. Severely depleted genetic diversity and population structure of a large predatory marine fish (Lates japonicus) endemic to Japan. *Conservation Genetics*. 16:1155-1165.
DOI:10.1007/s10592-015-0729-x

Keisuke Kimoto, Tohru Mekata, Hiroshi Takahashi, Kazuya Nagasawa. 2015. Genetic structure of populations of the red-spotted masu salmon (*Oncorhynchus masou ishikawae*) including two forms, amago and iwame, in a Mountain River, Northeastern Kyushu, Southern Japan. *Aquaculture Science*. 63: 299-309.

Hiroyuki Doi, Harumi Sakai, Yusuke Yamanoue, Takayuki Sonoyama, Toshiaki Ishibashi. 2015. Spawning of eight Southeast Asian brackish and freshwater puffers of the genera *Tetraodon* and *Carinotetraodon* in captivity. *Fisheries Science*. 81: 291-299.
DOI: 10.1007/s12562-014-0842-7

Hiroshi Takahashi, Takuya Kondou, Naohiko Takeshita, Te-Hua Hsu, Mutsumi Nishida. 2016. Evolutionary process of iwame, a markless form of the red-spotted masu salmon *Oncorhynchus masou ishikawae*, in the Ôno River, Kyushu. *Ichthyological Research*. 63:132-144.
DOI: 10.1007/s10228-015-0482-7

Hiroshi Takahashi, Peter R. Møller, Sergei V. Shedko, Temirbekov Ramatulla, Sang-Rin Joen, Chun-Guang Zhang, Valentina G. Sideleva, Keisuke Takata, Harumi Sakai, Akira Goto, Mutsumi Nishida. 2016. Species phylogeny and diversification process of Northeast Asian *Pungitius* revealed by AFLP and mtDNA markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 99: 44-52.
DOI: 10.1016/j.ympev.2016.03.022

〔学会発表〕（計 10 件）

Katsutoshi Watanabe, Hiroshi Takahashi, Takahiko Mukai, Yuichi Kano, Ryoichi Tabata, Koji Tominaga, Ryo Kakioka, Jang-Liaw Nian-Hong and Takefumi Komiya. Formation of freshwater fish fauna in western Japan. 9th Indo-Pacific Fish Conference (IPFC9). Okinawa Convention Center, Okinawa. June, 2013.

Izumi Kinoshita, Akira Goto, Harumi Sakai, Hiroshi Takahashi, Ryota Yokoyama and Valentina G. Sideleva. Larval distribution of pelagic sculpines, *Comephorus* and *Cottocomephorus* in Lake Baikal. II International Scientific Conference "Topical issues of natural science museums" dedicated 20-years anniversary of organization of Baikal Museum, Irkutsk. August, 2013.

上田修作・武島弘彦・高橋 洋・田上英明・中山耕至・小松輝久. マイクロサテライトDNA分析からみた高知県産アカメの遺伝的集団構造. 日本魚類学会年会. 宮崎観光ホテル, 2013年10月.

高橋 洋・豊田愛莉・益子 剛・山崎幸夫. AFLP法によるショウサイフグとゴマフグの雑種判別. 日本魚類学会年会. 宮崎観光ホテル, 2013年10月.

上田修作・武島弘彦・高橋 洋・田上英明・中山耕至・小松輝久. マイクロサテライトDNA分析から見たアカメの遺伝的集団構造. 第61回日本生態学会全国大会. 広島国際会議場, 2014年3月.

高橋 洋・鶴田哲也・後藤 晃. 雄物川水系におけるトミヨ属雄物型2地域集団の二次的接触. 日本魚類学会年会. 神奈川県立 生命の星・地球博物館, 2014年11月.

高橋 洋・成田周作・山崎 拓・益子 剛・山崎幸夫. 東日本沿岸におけるショウサイフグ・ゴマフグ雑種の高頻度の出現. 日本魚類学会年会. 近畿大学奈良キャンパス, 2015年9月.

成田周作・高橋 洋. トミヨ属魚類2種の営巣行動の違いに關与する量的形質遺伝子座の特定. 日本魚類学会年会. 近畿大学奈良キャンパス, 2015年9月. Hiroshi Takahashi, Naohiko Takeshita. Evolutionary process of iwame, a markless form of the red-spotted masu salmon *Oncorhynchus masou ishikawae*, in the Ôno River, Kyushu. 2015 Joint International Symposium between Pukyong National University and National Fisheries University. Pukyong National University, Busan, South Korea. December, 2015.

Shusaku Narita, Hiroshi Takahashi. The genetic basis of divergent nest-construction behavior between two ninespine sticklebacks species. 2015 Joint International Symposium between Pukyong National University and National Fisheries University. Pukyong National University, Busan, South Korea. December, 2015.

〔その他〕

一般向け講演

高橋 洋. 東日本太平洋岸におけるショウサイフグ・ゴマフグ雑種の大量出現. 第26回西日本フグ研究会(主催:西日本フグ研究会). 下関市唐戸魚市場(株)活魚センター, 2016年5月.

報告書など

田上英明・藤原恭司・中原高志・小川真拓・秦 一浩・江野島岳友・後藤洋史・小勝正貴・伊藤貴史・高橋 洋・小松輝久・毛利雅彦. 山口県萩市見島沖合における表中層トロール(天鷹丸232次航海)漁獲物の多様性. 水産大学校研究報告. 64: 241-248. 2016年3月.

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 洋 (TAKAHASHI, Hiroshi)
国立研究開発法人・水産研究・教育機構・水産大学校・生物生産学科・講師
研究者番号: 90399650

(2)研究分担者

酒井治己 (SAKAI, Harumi)
国立研究開発法人・水産研究・教育機構・水産大学校・生物生産学科・教授
研究者番号: 80399659