

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07540

研究課題名(和文) 複数アプローチで挑むイモリ集団間の交雑帯を介した遺伝子浸透の要因と影響の総合解析

研究課題名(英文) Comprehensive analyses for factors and effects of gene introgression via hybrid zone between two diverged lineages of *Cynops pyrrhogaster* based on multiple approach

研究代表者

富永 篤 (Tominaga, Atsushi)

琉球大学・教育学部・准教授

研究者番号：60452968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アカハライモリ5遺伝集団の分類学的関係の解明のため、集団遺伝学的解析に加え、飼育下での配偶行動の観察と比較、性フェロモンの地理的変異の把握を行った。また、各系統の潜在的な生息適地を推定した。その結果、北日本と中部日本系統、中部日本と西日本系統は交雑帯を形成しつつも独自性を維持していること、北日本系統の東北集団と関東集団間には遺伝的にも形態的にも緩やかなクライン状の変異がみられることを確認した。系統間の分布境界では境界を挟んで配偶行動と性フェロモンの組成に明瞭な地理的変異がみられることを確認した。生息適地解析では、現在の交雑の実態と各系統の潜在的な生息適地に関連がありそうであることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、アカハライモリは3種に分けられるべき系統が存在することが明らかになった。そしてこれらは交雑帯を形成しつつも、Tension zone として、互いの遺伝的独自性が保たれており、それらは、性フェロモンや配偶行動の違いが関係しているらしいことが明らかとなった。こうした結果は、動物の種分化プロセスを理解するうえで重要な知見であると言える。また、このように広域分布種に含まれる複数の遺伝系統がそれぞれ独立した種とみなせるという結果は、本種の地域個体群ごとに保全を行う必要があることを示唆しており、環境行政や環境教育に関する資料としても価値があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We conducted population genetic analysis, comparison of mating behavior, and investigation of the geographical variation of sex pheromones to elucidate the taxonomic relationship among the 5 lineages of *Cynops pyrrhogaster*. We also estimated the potential suitable habitat for each lineage by Maxent. We confirmed the presence of the hybrid zones between Northern and Central Japan lineages, and between Central and West Japan lineages, however they are genetically independent from each other in both contact zones. Genetic and morphological analyses between the Tohoku and Kanto races in the Northern Japan lineages revealed that the clinal geographic patterns across their contact zones. We confirmed that the distinct geographical variations in the mating behavior and the composition of sex pheromones across the boundaries between lineages. Habitat analysis implied that there are some relationships between current hybridizing pattern and potential habitat preferences for each lineage.

研究分野：動物分類学

キーワード：生殖隔離 交雑帯 配偶行動 性フェロモン 生息適地

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アカハライモリには、遺伝的に 5 つの集団が含まれ、それぞれに外部形態や繁殖行動の面での違いが知られている。この 5 集団の分布は側所的で、その遺伝的な分化程度は別種にも相当するレベルであるが、5 集団の遺伝的交流の実態把握は研究開始時点では端緒についたところであった。また、アカハライモリ 5 集団の配偶行動や性フェロモンの違いも情報が不足しており、こうしたことがどの程度、生殖的隔離機構として、機能しているのかも不明であった。そこで、本研究では、集団遺伝学的解析に加えて、飼育下での配偶行動の観察と比較、分布境界付近での性フェロモンの地理的な変異を把握、さらに各系統の生息適地解析することで、これらの形質が生殖隔離に寄与しているのか、また隔離の強化といえるような事象がみられるのか調査した。

2. 研究の目的

本研究では、このアカハライモリ系統間の交雑帯(分布境界地域)でのサンプリングと、マイクロサテライトマーカー(SSR)、ミトコンドリア DNA (mtDNA) MIGseq 解析による集団遺伝学的解析で、系統間の遺伝子浸透や交雑の実態を把握することを目的とした。また、行動(交配)実験、種分化関連遺伝子(性フェロモン)であるソデフリン及びその類似ペプチドの個体群内の組成が交雑帯を跨いでどのように変化するのが調査した。さらに各系統の既知の生息地点を用いて、生息適地モデルを構築し、各系統の潜在的な生息適地と、実際の現在の分布の関係についても調査することを目的とした。

3. 研究の方法

分布境界の集団遺伝学的解析では、中国地方と中部地方の交雑帯で、マイクロサテライトマーカーと mtDNA の結果をアサイメント解析、クライン解析、移入率の推定により調査を進めた。また、関東種族と東北種族、南伊豆集団の形態差が遺伝学的にも支持されるのかを MIGseq と mtDNA 解析により調査した。

配偶行動の比較は、遺伝的な調査の結果、確実に群をなす中部日本、西日本系統の 2 群と、それらの間の交雑個体を野外から採集して、それぞれの繁殖行動の特性を記載することで行った。実験には中部日本系統、西日本系統、交雑帯の分布域から採集した計 108 個体を使用した。採集した個体はマイクロサテライト解析によって系統を確認した。個体識別には PIT タグと腹面の模様を使用した。繁殖行動の観察は室内で行ない、15 分の馴致のあと、60 分間連続して撮影した。実験は 2017 年 10~12 月と 2018 年 4~5 月に実施した。

さらに北日本系統と中部日本系統が境界を接する長野県を対象として、交配行動の地理的変異について検討した。北日本系統として木島平村、中部日本系統として辰野町の集団を用い、これに先行研究において両系統の交雑個体に由来することがわかっている長野市信更町の集団も加えて、様々な組み合わせの雌雄を実験水槽に入れ、交配行動をビデオカメラで撮影した。得られた結果に基づいていくつかのパラメーターについて GLMM モデルを構築し、AIC 値に基づいたモデル選択でベストモデルを選択した。

性フェロモンの解析に関しては、*Cynops* 属の 2 種のイモリ、アカハライモリ(*C. pyrrhogaster*: 14 地域 56 個体)とシリケンイモリ(*C. ensicauda*: 2 亜種 25 個体)の肛門腺から 663 クロウソンのソデフリン関連遺伝子を解析し、前駆体のアミノ酸配列多型と、メスに対する性フェロモン活性を調べた。ミトコンドリアゲノム DNA の解析によって区分されるアカハライモリの 4 つの系統(北日本系統、中部日本系統、西日本系統および南日本系統)に加えて、伊豆半島に分布する中部日本系統と南伊豆亜系統に属する個体群からソデフリン関連遺伝子をクローニングし、その遺伝子配列にコードされるフェロモン前駆体タンパク質の分子多型について調べた。

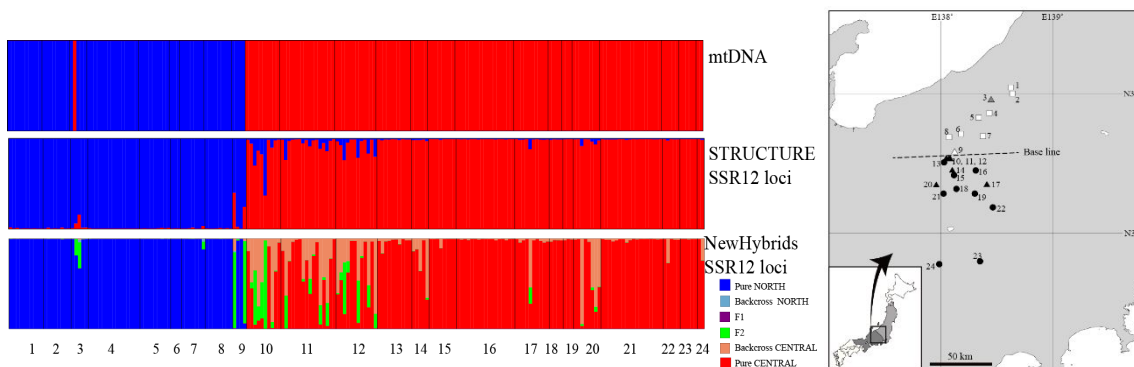
生息適地解析については、各系統の既知の生息地の地点情報を元に Maxent を用いて、各系統の潜在的な生息適地を推定し、現在の実際の分布との関係について調査した。

4. 研究成果

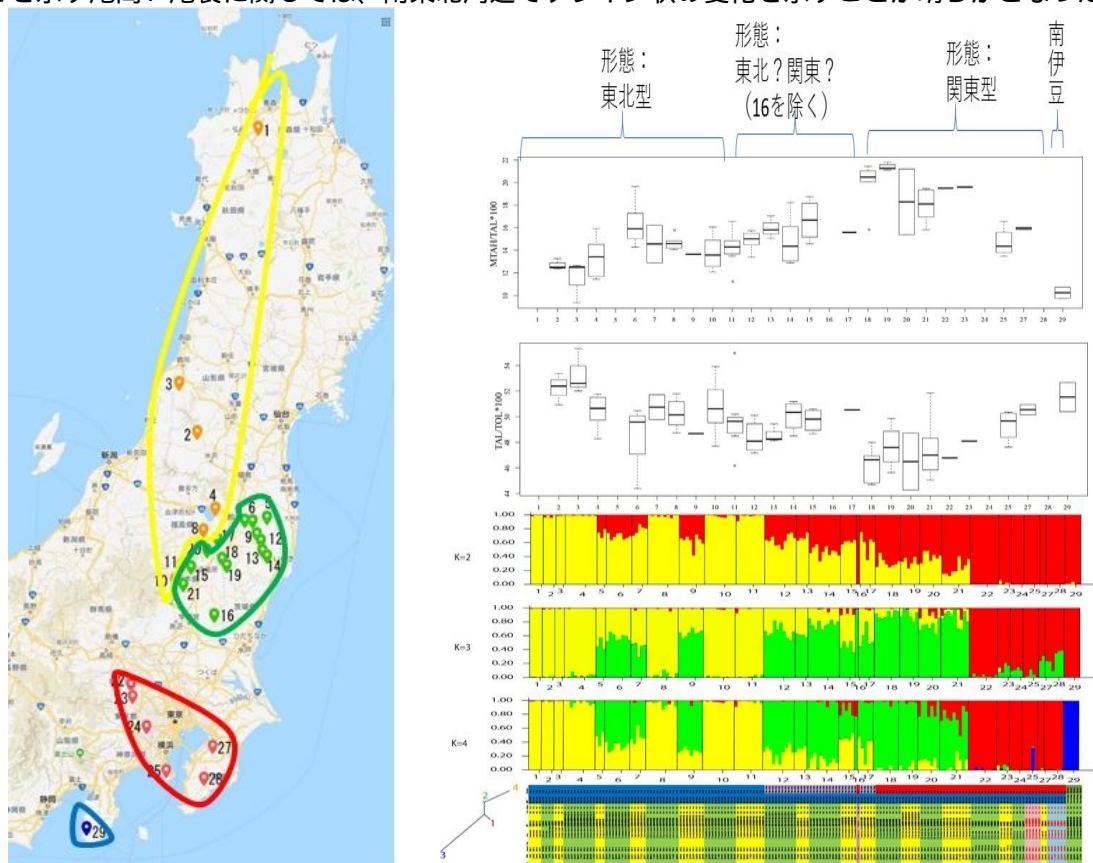
集団遺伝解析については、すでにデータを取り終えていた中国地方の中部日本系統と西日本系統のデータの解析を進め、結果を論文として公表した(Tominaga et al., 2018)。これまでの STRUCTURE、Newhybrids の解析結果から、交雑個体を割り出すための閾値をシミュレーションによって計算した。STRUCTURE により、99%以上の確率で中部日本系統と西日本系統のそれぞれの純系と判断される個体のデータをもとに、HYBRIDLAB software (Nielsen et al. 2006)で、仮想の純系 2 集団(各 100 個体)、F1、F2、2 系統への戻し交配個体を各 100 個体、合計 600 個体の仮想個体を作り、これらを再度 STRUCTURE、Newhybrids で解析することにより、もっとも多くの個体が正しく判定される帰属確率の閾値を割り出した。また、現実には存在するが Newhybrids 解析では考慮できない F3、F4 についてもどの群に帰属するのか調査した。その結果、STRUCTURE では、どちらかへの集団の帰属確率(Q 値)が 90%以上の場合、どちらかの純系とみなし、どちらの帰属確率も 90%未満の場合、交雑個体とみなしたとき、最も多くの個体で正確な判定ができることが分かった。同様の手法で Newhybrids についても閾値を 50%と定めた。F3、F4 については F2 に高確率で帰属することが明らかとなった。これらの閾値を基準に交雑個体の判定を行った結果、この地域の交雑個体には F1 雑種は見られず、また純系同士が共存する地域もないことから、現在純系同士での交雑は起きていないことが明らかとなった。このような状況は、イモリを含む有尾類の低い移動能力によりもたらされる可能性が高いと考えられる。また、移入率の

計算からこの交雑帯は、両方の純系の交雑帯への移入と、交雑個体の適応度の低下によって交雑帯が維持される Tension Zone に相当する事、この交雑帯を介した不均等な移入率により、交雑帯が西方向に移動しつつあることを明らかにした。

中部地方の北日本系統と中部日本系統でもさらに標本の収集をすすめてこれまでに 202 個体の解析を終えた。同様にシミュレーションによる閾値の推定を行い、STRUCTURE、Newhybrids の解析結果から交雑個体を検出した。その結果、この地域でも現在、F1 雑種は生じておらず、また移入率の計算からこの中部地方の北日本系統と中部日本系統の交雑帯も Tension Zone に相当する事がわかった。mtDNA は両系統が混在する地点はなく、また移入率からみても不均等な移入率が検出されるものの、その程度は中国地方の 2 系統ほど顕著ではないことから、中部地方の北日本系統と中部日本系統の交雑帯のシフトはそれほど顕著ではない可能性が考えられた。

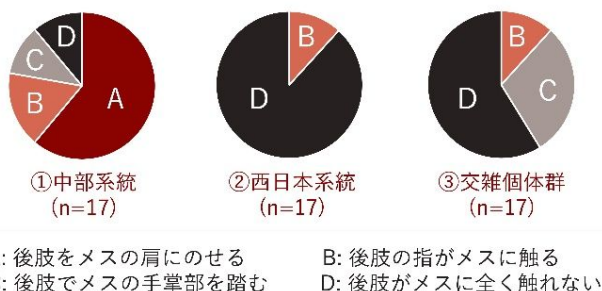


つぎに北日本系統内の形態やアロザイムで認識される関東集団、東北集団と北日本系統の姉妹群の南伊豆亜系統の核ゲノムレベルでの遺伝的関係を明らかにするため、MIG-seq 法による SNP 解析を行った。28 個体群から得られた 174 個体の抽出 DNA を鋳型とし、2 段階の PCR により増幅を行い、次世代シーケンサーにより解析を行った結果、欠損データが全個体の 20% 以下となる 1671 座の SNP 情報が得られた。これらの結果を STRUCTURE、PCoA、UPGMA により解析した。その結果、調査したサンプルは、北東北、南東北+北関東、南関東、南伊豆の 4 群に区分された。一方、形態学的に識別される関東集団と東北集団は遺伝的には明瞭に区別されず、遺伝的には北関東から南東北にかけてクライン状の変化が見られることが明らかとなった。さらに今回、遺伝解析に用いたサンプルに対応する標本を用いて、関東集団と東北集団の識別形質として有効とされる尾高/尾長と、尾長/全長の比較を行った。その結果、尾の相対的な長さを示す尾長/全長は、北関東と南東北の境界で急激な変化が見られることが明らかになったが、尾の相対的な高さを示す尾高/尾長に関しては、南東北周辺でクライン状の変化を示すことが明らかとなった。



交配行動の観察については、中国地方の中部日本系統純系、西日本系統純系、交雑集団の3者では、それぞれ異なる繁殖行動が観察されたが、交雑個体は他の2群の中間的な特徴を持つことが多かった。また、繁殖行動中にオスが後肢でメスの背中を踏みつける行動は中部日本に認められ、オスが後肢でメスの前肢を踏みつける行動も本研究で初めて確認された。このような行動特性の違いが、中部日本と西日本の群間での繁殖前生殖隔離をもたらしているものと考えられた。交雑個体は他の2群の中間的な特徴を持つことから、潜在的に2群の両方と低頻度ながら繁殖に至る可能性があり、現在野外で認められる交雑帯はその結果維持されてきている可能性が強く示唆された。

求愛時の肢乗せ

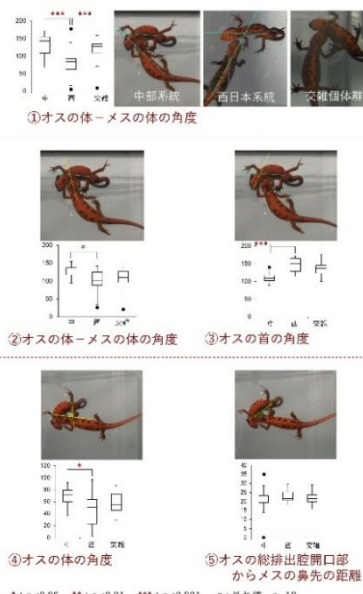


中部地方の2系統間では雄が求愛行動を行う頻度は、異地点の雌ほど低くなる傾向が認められた。求愛中の肢乗せ行動は北日本系統ではほとんど見られなかったが、中部日本系統、及び両者の交雑集団では頻繁に見られた。求愛中の雌雄の姿勢を解析したところ、北日本系統の雄は雌に対してより垂直に近い姿勢を取ったのに対し、中部日本系統の雄はより並行に近い位置で求愛をしていることが示された。また中部日本系統の雄は首をより屈曲して求愛することも明らかになった。これらの形質については、交雑集団は両者の中間的な値を取った。以上の知見は、アカハライモリに地理的な変異をもたらした要因の1つと考えられてきた行動学的隔離を直接的に解明したものであり、本種の進化史を考察するうえで重要な知見となるものである。

ソデフリン関連遺伝子の解析に関しては、これまでに、分子系統解析の結果、ソデフリン関連遺伝子はソデフリンとその相同ペプチドをコードする遺伝子群と、ソデフリン前駆体と高い相同性を持つがソデフリンペプチドとの相同領域を欠くタンパク質をコードするソデフリン前駆体様因子 (SPF) と呼ばれる遺伝子群とに大別され、その発現レパトリーは種・地域で異なっていることが見出されてきた。本研究ではミトコンドリアゲノム DNA の解析によって区分されるアカハライモリの4つの系統(北日本系統、中部日本系統、西日本系統および南日本系統)に加えて、伊豆半島に分布する中部日本系統と南伊豆亜系統に属す個体群からソデフリン関連遺伝子をクローニングし、その遺伝子配列にコードされるフェロモン前駆体タンパク質の分子多型について調査した。その結果、中部日本系統に属する伊豆半島産のイモリ肛門腺からは同じく中部日本系統に属する奈良県産のイモリから見出されたその地域のメスに対してのみ有効な性フェロモンであるアオニリン (ソデフリンペプチドの8番目のアミノ酸残基がバリン残基に置換したもの) の遺伝子が検出されるなど、ミトコンドリアゲノム DNA 解析の結果と一致する性フェロモンの分化が観察される一方で、南伊豆亜系統に属するイモリでは、西日本系統にみられるソデフリン関連連遺伝子が観察された。現在のところ、この南伊豆亜系統群と西日本系統のイモリの性フェロモンの類似性が如何なる生物地理学的要因に拠っているのかは不明であり、今後の研究課題となった。さらに、当該研究を通じ、ソデフリンに加えて、これまで活性の示されていないソデフリンの10残基目のリジン残基がアスパラギンに置換したペプチド ([Asn10]ソデフリン) や、特定のタンパク質サブグループに属す SPF (ソデフリン前駆体様因子) をコードする遺伝子の発現が全てのアカハライモリ個体群において確認されたことから、この2つのペプチドおよびタンパク質がアカハライモリにおいて必要な役割を担っていることが推測された。今後その生理活性について研究を進めることで、生殖に関連するコミュニケーション因子としての性フェロモンの多様性と普遍性が、種の存続や種分化へ与える影響が明らかになることを期待している。

生息適地解析では各系統の潜在的な生息適地が明らかになった。北日本系統と中部日本系統の潜在的な生息適地は側所的になっており、おおよそ現在の分布と一致するようであった。中部日本系統と西日本系統の潜在的な生息適地は、ずれているものの一部重なっており、その部分がちょうど交雑帯が形成されている地域に相当するものと考えられた。西日本系統と南日本系統の生息適地は大部分が重なり合っており、これはマイクロサテライトで予備的に解析した結果、両系統の分化が明瞭でないことと符合するよう思われた。

求愛時のオスのメスに対する位置取りの比較



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomimaga Atsushi, Matsui Masafumi, Yoshikawa Natsuhiko, Eto Koshiro, Nishikawa Kanto	4. 巻 109
2. 論文標題 Genomic Displacement and Shift of the Hybrid Zone in the Japanese Fire-Bellied Newt	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Heredity	6. 最初と最後の頁 232 ~ 242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1093/jhered/esx085	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 富永篤	4. 巻 10
2. 論文標題 アカハライモリを対象とした地理的分化と系統の置き換わりに注目した両生類の種分化研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 九州両生爬虫類研究会誌	6. 最初と最後の頁 24-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 吉川夏彦, 富永篤	4. 巻 2019(2)
2. 論文標題 2013年以降の日本産有尾両生類の分類について	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 爬虫両棲類学会報	6. 最初と最後の頁 177-194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富永篤・吉川夏彦・松井正文・長太伸章・佐藤行人
2. 発表標題 MIG-seq法に基づくアカハライモリの関東集団、東北集団、南伊豆 亜系統の遺伝的關係
3. 学会等名 日本爬虫両棲類学会第57回相模原大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五十嵐萌詩・西川完途・富永篤
2. 発表標題 アカハライモリ2系統における繁殖行動の比較
3. 学会等名 日本爬虫両棲類学会第57回相模原大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 富永篤
2. 発表標題 アカハライモリなどを対象とした地理的分化と系統の置き換わりに着目した両生類の種分化研究
3. 学会等名 九州両生爬虫類研究会第10回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富永 篤 , 松井 正文 , 吉川 夏彦 , 江頭 幸士郎 , 西川 完途
2. 発表標題 中部日本におけるアカハラ イモリ2 系統の接触帯周辺 での遺伝的關係
3. 学会等名 日本動物学会 第88回 富山大会 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中田 友明 , 豊田 ふみよ , 持田 浩治 , 富永 篤 , 菊山 榮
2. 発表標題 同属イモリ間における性 フェロモンの変異と反応性 の検討
3. 学会等名 日本動物学会 第88回 富山大会 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 富永篤・松井正文・西川完途
2. 発表標題 中部地方におけるアカハライモリ2系統の交雑帯の動態
3. 学会等名 日本爬虫両棲類学会第56回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 富永篤
2. 発表標題 アカハライモリ系統間の分布境界に着目した両生類の種分化研究
3. 学会等名 日本動物学会 第90回 大阪大会 2019 シンポジウム 両生類はワンダーランド(6)(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中田 友明・富永 篤・持田 浩治・豊田 ふみよ・菊山 榮
2. 発表標題 伊豆半島に生息するイモリ性フェロモン遺伝子の地域多様性
3. 学会等名 日本動物学会 第90回 大阪大会 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川合恵・富永篤・島田知彦
2. 発表標題 中部地方におけるアカハライモリ2系統の交配行動の比較
3. 学会等名 日本爬虫両棲類学会 第58回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 九州両生爬虫類研究会(編)/47名分担執筆/富永篤他	4. 発行年 2019年
2. 出版社 東海大学出版部	5. 総ページ数 251
3. 書名 九州・奄美・沖縄の両生爬虫類 カエルやヘビのことをもっと知ろう	

1. 著者名 関慎太郎・井上大輔編/富永篤(分担)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北九州魚部	5. 総ページ数 205
3. 書名 ギョブマガジンぎょぶる 特別編集 特盛山椒魚本	

〔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	西川 完途 (Nishikawa Kanto) (10335292)	京都大学・地球環境学堂・准教授 (14301)	
研究 分担者	中田 友明 (Nakada Tomoaki) (50549566)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師 (32669)	
研究 分担者	島田 知彦 (Shimada Tomohiko) (30610638)	愛知教育大学・教育学部・准教授 (13902)	