

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15195

研究課題名(和文) 霊長類における交雑の進行過程とその表現型多様化への影響を探る進化生態学的研究

研究課題名(英文) The process of hybridization and its consequence on phenotypic diversity in primates

研究代表者

伊藤 毅 (Ito, Tsuyoshi)

京都大学・霊長類研究所・助教

研究者番号：20711485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ゲノムワイドな遺伝マーカーを用いることで、東南アジアにおけるアカゲザルとカニクイザルの自然交雑帯がいつ・どのように形成されたのかを推定した。結果、両種は共通祖先から分岐後、長期間の隔離を経て二次的に接触し交雑を起こした可能性が高いことが示された。多くの遺伝子座、とくにX染色体上の遺伝子座においては、従来認識されていた種の境界線付近で、急激にアレル頻度が変化していたが、一部の遺伝子座においては、アカゲザルタイプのアレルがクラ地峡を超えてカニクイザルの集団に広く浸透していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

交雑帯の多地域のサンプルを対象にゲノムレベルでの解析を達成した本研究は、従来研究よりも詳細にアカゲザルとカニクイザルの交雑過程と遺伝子浸透のパターンを推定することができた。この成果は、ヒトを含めた霊長類の交雑とその帰結、生殖隔離と種分化のメカニズムを理解する上で役に立つと期待される。また、本研究で明らかにしたインドシナ半島の地域集団の集団構造と遺伝的多様性は、それらの保全の上でも重要な情報となる。

研究成果の概要(英文)：This study performed population genomics to estimate when and how the hybrid zone between rhesus and long-tailed macaques has been formed in Southeast Asia. Results suggest that the two species recently contacted to each other and formed hybrid zone, after long-time isolation. Some loci, particularly on X-chromosome, show abrupt change in allele frequency at the traditionally recognized species boundary. In contrast, in a handful of loci, rhesus macaque-type alleles were likely introgressed widely into the long-tailed macaque populations across the Isthmus of Kra possibly because of natural selection.

研究分野：進化生物学

キーワード：遺伝子浸透 マカクザル 形態 東南アジア 生殖隔離 交雑帯 RAD-Seq エコゲノミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自然界において、種(集団)間の交雑や遺伝子浸透は決して例外的な現象ではないことが明らかにされつつある。つまり、生物の進化は、枝分かれだけではなく、異なる種(集団)の混じり合いの過程でもある。これまでの形態学や遺伝学の研究は、様々な分類群で交雑の痕跡を見つけている。霊長類もその例外ではなく、たとえば本研究の研究協力者らは、東南アジアにおいてアカゲザルとカニクイザルが広範囲にわたって交雑していることを突き止めてきた(Hamada et al. 2015, *Am J Phys Anthropol*; Bunlungsup et al. 2017, *Am J Primatol*)。近年のゲノム解析技術の発達には、単に交雑の痕跡を見つけるだけでなく、交雑がいつ・どのように起こったのか、どの遺伝子が選択的に浸透しているのか、どのような遺伝子の組み合わせが生殖隔離に関与しているのかにまで迫ることを可能にしている。このような、多様性が維持あるいは生成されるメカニズムを理解することは進化生態学の中心的研究課題の一つである。交雑のゲノミクス研究は、ここ 2、3 年で、モデル生物や小型生物を中心に飛躍的に進んできた(Mol Ecol 2016 の特集号“Genomics of hybridization”など)。

しかし、大型野生動物を対象にした研究は極めて限られており、多様な社会構造を示す霊長類の進化において交雑がどのように進んだのかについてはほとんど分かっていない。また、交雑は遺伝子構成の新しい組み合わせを生み出し表現型の多様性や新規性の創出に大きく貢献したと考えられるが、近年のゲノム研究の勃興の裏で表現型レベルの研究はなおざりにされがちな傾向にあり、ゲノムと表現型を結びつけた視点に立つ研究は少ない。

こうした現状を打開すべく、申請者らは、外来種タイワンザルと在来種ニホンザルの交雑群を対象に、集団ゲノミクスと形態学的アプローチとを組み合わせた研究を進めてきた。これまでの研究で、ニホンザルのオスの一方的な移入によって交雑群が形成されたこと、頭部形態の部位によって遺伝の仕方が異なり、その組み合わせによって新しいタイプの形態が生まれうること、などの重要な発見があった(Ito et al. 2015, *Biol J Linn Soc*)。こうした研究により、交雑に伴った形態の多様化や生殖隔離機構のゲノム基盤に迫ることが可能になってきた。

ただしこの研究は、外来種が侵入してから数十年の交雑動態しか追えないという制約がある。そこで本研究は、数千〜数万年の単位で形成されてきたと考えられるアカゲザルとカニクイザルの自然交雑帯に着目した。交雑が進んだ自然交雑帯は、組み替えによって染色体が細く分断化されていると期待されるため、表現型や生殖隔離に関連する責任遺伝子の同定がしやすくなる。また、数世代の交雑では検出できなかった遺伝子に働く選択圧(適応的な遺伝子浸透や生殖隔離など)がはっきり現れることが期待できる。

<引用文献>

- (1) Hamada, Y., San, A. M., & Malaivijitnond, S. (2015). Assessment of the hybridization between rhesus (*Macaca mulatta*) and long-tailed macaques (*M. fascicularis*) based on morphological characters. *American Journal of Physical Anthropology*, 159(2), 189-198. doi:10.1002/ajpa.22862
- (2) Bunlungsup, S., Kanthaswamy, S., Oldt, R. F., Smith, D. G., Houghton, P., Hamada, Y., & Malaivijitnond, S. (2017). Genetic analysis of samples from wild populations opens new perspectives on hybridization between long-tailed (*Macaca fascicularis*) and rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *American Journal of Primatology*, 79(12), e22726. doi:10.1002/ajp.22726.
- (3) Ito, T., Kawamoto, Y., Hamada, Y., & Nishimura, T. D. (2015). Maxillary sinus variation in hybrid macaques: implications for the genetic basis of craniofacial pneumatization. *Biological Journal of the Linnean Society*, 115(2), 333-347. doi:10.1111/bij.12528

2. 研究の目的

- (1) アカゲザルとカニクイザルの交雑帯がいつ・どのように形成されたのかを推定する。
- (2) 形態と交雑度の関連を評価する。形態に関連する遺伝子多型を見つける。
- (3) それらの遺伝子が交雑の過程でどのような選択を受けたのかを推定する。

3. 研究の方法

(1) 交雑帯の歴史を推定する。研究協力者の協力のもと、タイ王国の 20 地点・約 200 個体に由来する遺伝子試料・生体計測形態データを用いる。RAD-Seq という手法を用いて、ゲノムワイド一塩基多型(SNP)を探索する。これは、制限酵素認識部位の近傍の領域のみを次世代シーケンサー(NGS)で読む方法で、比較的低コストに多検体を解析することができる。本研究では、これまで申請者らが進めてきたタイワンザルとニホンザルの RAD-Seq の結果を参照にしながら、数万個の SNP の探索を目標にシミュレーションを行い、最適な制限酵素の組み合わせ、リード断片サイズ、NGS 1 レーンあたりの検体数などを検討する(これらの設定は SNP の頻度や信頼性に影響する)。NGS (Illumina HiSeq) によるシーケンスは、受託業者に外注する。得られたシーケンスデータをもとに、クオリティのチェック、参照ゲノム配列へのマッピング、遺伝子型の判定、フィルタリングを行い、ゲノムワイド SNP データを作成する。ゲノムワイド SNP データを用いて、各地点における集団構造を推定する。また、両親種間で顕著に分化した座位を探索する。これに基づきヘテロ座位(interspecific heterozygosity)の割合や座位毎の交雑

率 (local ancestry) を算出し、組み替えによる染色体の分断化の程度を評価することで、交雑の世代数や移入率を推定する。

(2) 形態とゲノムとの関連を評価する。形態データは、一般的な身体計測項目 (頭胴長, 尾の長さなど) を含み、アカゲザルとカニクイザルの違いをよく反映している。ゲノムワイド SNP データからゲノム平均交雑率 (global ancestry) を算出し、形態変異との関連を評価する。global ancestry と local ancestry を用いた線形モデルにより、形態に関連する遺伝子多型を探索する。単一の遺伝子座の効果だけでなく、複数の遺伝子が連動して形態に関与する可能性も考慮する。形態に関連する遺伝子多型が見つからない場合 (交雑のパターンによってはその可能性も想定される) (3) の解析で見つかった座位の近傍の遺伝子の機能 (形態あるいはその他の表現型との関連) をゲノムデータベースから調べるというアプローチをとる。

(3) ゲノムワイド SNP データを用いて、他の座位 (ゲノム平均) とは違った挙動を示す座位 (これらは交雑の過程で選択を受けた可能性がある) を探索する。とくに、他の座位より強く浸透しているものや、しないもの、あるいは他の座位と連動して変化しているものを探索する。これらの座位の多型が形態に関連しているか、もしくはその近傍の遺伝子がどんな働きを持っているのかを、(2) の結果およびアカゲザルゲノムデータベースから調べる。

4. 研究成果

(1) RAD-Seq によりゲノムワイド SNP を取得し、アカゲザルとカニクイザルの集団構造、系統関係、集団史を推定した。タイ王国の研究協力者と事前に協議の上で使用することになっていたサンプルは、本研究に必要となる程度の残量が残っていないことが判明したため、米国の研究者にも協力を求め、タイ王国とその周辺地域に由来する 8 集団 (スマトラ半島と中国、ならびにインドシナ半島の交雑帯付近に位置する 6 つの地域集団) のサンプルを利用することにした。RAD-Seq は受託サービス業者に依頼し、2 つの制限酵素 (NlaIII と MluCI) を使用して作成されたライブラリを、イルミナ HiSeq4000 の 2 × 150 ペアエンドシーケンスにかけて配列を読んだ。得られた配列を用いて、多型の探索とフィルタリングを行ったところ、約 16 万の SNP を得た。このゲノムワイド SNP データに基づき、ADMIXTURE と fastSTRUCTURE による集団構造推定を行ったところ、今回解析した集団は 3 から 6 つのクラスターに分かれる可能性が高いことが示された。アカゲザルとカニクイザルの種間の遺伝子流動の痕跡も見つかったが、その程度は小さかった。主成分分析および固定指数に基づく主座標分析を行ったところ、両種間の明瞭な差異が検出され、またアカゲザルの分布域に近い地域のカニクイザルの 1 集団は、同種の他の集団から遺伝的に大きく異なっていることが示された。系統ネットワーク分析でも同様の傾向が観察された。次に、遺伝子頻度スペクトラムを指標としたプログラム (fastsimcoal2) を用いて、集団史の推定を行った。分岐のみを仮定した isolation モデル、分岐後の遺伝的交流を仮定した isolation and migration モデル、分岐後の過去の遺伝的交流を仮定した isolation and ancient migration モデル、分岐後の最近の遺伝的交流を仮定した isolation and recent migration モデルを作成し、赤池情報量基準を指標にモデルの良さを評価したところ、isolation and recent migration モデルが強く支持された。さらに、このモデルにおける集団史パラメータを推定したところ、約 3 万世代前にアカゲザルとカニクイザルが分岐し、その後長期間の隔離を経て約 8 千世代前に再接触し、交雑が進行した可能性が高いことが示された。また、アカゲザルからカニクイザルへの移入率が、その逆方向の移入率よりも大きいことが示された。ただし、これらの集団史パラメータの絶対的な数値は、事前に設定したアカゲザルの集団サイズ等の仮定に依存しており、その信頼性の評価のためには、SNP だけではなく配列を利用した推定を行うなどの検討が必要である。

(2) 中間的な交雑率を持つ個体がほとんど観察されなかったため、形態形質に関連する遺伝子多型の探索はできなかった。そこで、形態のうち最も顕著な種間差が観察された相対尾長の地理的クラインを明らかにし、ゲノムの地理的クラインとの関連を調べた。相対尾長は、従来観察された種の境界付近で非連続的に変化しており、ADMIXTURE 解析で示された global ancestry のクラインと類似した様相を示した。したがって、形態的な特徴は、種間で遺伝子浸透を起こした遺伝子によってはあまり影響されないと考えられた。

(3) 種間でアリル頻度が顕著に分化していた遺伝子座において、アリル頻度の地理的変遷を遺伝子座ごとに評価した。一部の遺伝子座、とくに X 染色体上の遺伝子座は高頻度で、種の境界付近で急激にアリルの頻度が変化していた。一方、多くの遺伝子座は、緩やかなアリル頻度の地理的变化を示し、アカゲザルに由来するアリルがクラ地峡以北のカニクイザルの集団に広く浸透していることが示された。また、ごく一部の遺伝子座においては、アカゲザルに由来するアリルがクラ地峡を超えて浸透していることが示された。種の境界では、強い生殖隔離が働いており、とくに X 染色体上位に位置する一部の遺伝子がそれに関与していると考えられる。その他の多くの遺伝子は、中立的にアカゲザルからカニクイザルの方向に浸透し、一方で、クラ地峡を超えるほどの浸透を示した遺伝子は、自然選択の影響を受けた可能性がある。これらの SNP の近傍にある遺伝子について Gene Ontology 解析を行ったが、GO term の出現頻度に有意差は検出されなかった。(1) ~ (3) の成果を取りまとめ、国際誌への投稿の準備を進めた。

(4) 種内の地域集団間の遺伝的交流とその影響を理解するために、ゲノムワイド SNP を用いたニホンザルの集団史の推定も行った。結果、ニホンザルがアカゲザルとタイワンザルの共通祖先から分岐したことが、種内では東日本と西日本のクラスターに分かれることがわかった。東西

クラスターの境界線は、核ゲノム（本研究）とミトコンドリア DNA（Kawamoto et al.2007）とでは異なっていた。東西クラスターの分岐後に、西クラスターに含まれる滋賀県周辺の系統に東クラスターの集団からの遺伝子浸透があった可能性が高いことが示された。この成果を、研究会で発表し、国際誌への投稿の準備を進めた。

(5)クラ地峡が哺乳類の地理的隔離と形態の多様化に与える影響を評価するために、ダスキーリーフモンキーの頭蓋形態の研究も行った。幾何学的形態測定という手法を用いて、頭蓋の形状とサイズを定量化し、気候環境やアロメトリー（サイズに依存した形状の変化の法則性）の影響を考慮に入れながら、クラ地峡の南北間の形態差を統計的に評価した。結果、頭蓋の形状は南北間でわずかに異なっていたものの、その差は極めて小さいことがわかった。少なくとも現在は、クラ地峡が霊長類にとっての強い生物地理学的障壁にはなっていない可能性を示し、その成果を学術国際誌に投稿し掲載された。

<引用文献>

(1) Kawamoto, Y., Shotake, T., Nozawa, K., Kawamoto, S., Tomari, K. ichiro, Kawai, S., ... Hayaishi, S. (2007). Postglacial population expansion of Japanese macaques (*Macaca fuscata*) inferred from mitochondrial DNA phylogeography. *Primates*, 48(1), 27-40. doi:10.1007/s10329-006-0013-2

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

(1) Ito T, Koyabu D. (2018) Biogeographic variation in skull morphology across the Kra Isthmus in dusky leaf monkeys. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 56: 599-610.

〔学会発表〕(計1件)

(2) Ito T, Hayakawa T, Suzuki-Hashido N, Hamada Y, Kurihara Y, Hanya G, Kaneko A, Natsume T, Aisu S, Honda T, Yachimori S, Anezaki T, Shintaku Y, Omi T, Hayama S-I, Imai H, Wakamori H, Tanaka M, Kawamoto Y. (2019) Incongruence between nuclear genome phylogeny and morphological diversity in Japanese macaques. The 63rd Primates Conference (2019/1, Inuyama).

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：Suchinda Malaivijitnond
ローマ字氏名：(MALAIVIJITNOND, Suchinda)

研究協力者氏名：Sreetharan Kanthaswamy
ローマ字氏名：(KANTHASWAMY, Sreetharan)

研究協力者氏名：Srichan Bunlungsup
ローマ字氏名：(BUNLUNGSUP, Srichan)

研究協力者氏名：Robert Oldt
ローマ字氏名：(OLDT, Robert)

研究協力者氏名：濱田 穰
ローマ字氏名：(HAMADA, Yuzuru)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。