

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：85502

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22687006

研究課題名（和文）トミヨ属魚類における生殖隔離強化の集団ゲノム学的検証

研究課題名（英文）Population genomics of reinforcement and speciation in ninespine sticklebacks

研究代表者

高橋 洋（TAKAHASHI HIROSHI）

（独）水産大学校・生物生産学科・助教

研究者番号：90399650

研究成果の概要（和文）：生殖隔離の強化がトミヨ属魚類近縁 2 種（キタノトミヨとトミヨ）の種分化に果たした役割を実証的に検証するために、AFLP マーカーを用いた集団ゲノミクスを同所的・異所的集団間で行おうと試みた。雌の同種認知に重要であると思われる巣の構造の異なる同所的集団間で交配実験を行い、BC1 の 15 家系に基づき QTL 分析を行った。その結果、236 の AFLP マーカーが 21 の連鎖群に位置づけられ、連鎖地図の全長は 1885cM（マーカー間の平均距離は 8.0cM）だった。巣の構造の違いを生み出す 2 つの行動要素のうち、1 つは有意な QTL が検出されたものの、より重要なもう一つの行動要素については有意な QTL が検出されなかった。

研究成果の概要（英文）：To examine the role of reinforcement in ninespine sticklebacks speciation, this project was going to adopt the population genomics approach using the AFLP markers. A QTL analysis was carried out with 15 lines BC1 from the cross of sympatric populations differing in nest shape putatively important in female conspecific recognition. 236 AFLP markers were placed into 21 linkage groups spanning 1885 cM with an average marker distance of 8.0 cM. Although highly significant QTL was observed in one of two behavioral components by which the difference in nest shape arise, significant QTL for the remaining more important component was not observed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
23 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
24 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	18,000,000	5,400,000	23,400,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：種分化

1. 研究開始当初の背景

近年、脊椎動物の種分化研究においても、生殖的隔離形質の遺伝的基盤を交雑実験によって解明し、ゲノム科学的手法を通じてその進化プロセスを明らかにしようという研

究が本格的に行われるようになってきた。代表的な研究例として、トゲウオ科の小型魚類であるイトヨの交配前隔離形質（雄の求愛行動）において、その違いを生み出す遺伝子が染色体融合によって生じた新規性染色体上

に存在するということが明らかになり、性染色体の種分化に果たす役割が注目されている。一方、このような生殖的隔離に関与する遺伝子座が、中立的な遺伝的浮動により姉妹種の集団中に固定したのか、あるいは何らかの淘汰圧によって集団中に固定したのかについては、一部のモデル種を除いて、実証的研究はほとんど行われていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、同所的生息地において、交配後隔離機構などにより、適応度の低い雑種に対する自然淘汰が交配前隔離機構を進化させるという隔離の強化 (reinforcement) について、トミヨ属魚類の近縁 2 種の研究対象としての優れた特徴を活かして検証することを目的とした。トミヨ属魚類は他のトゲウオ科魚類同様、繁殖期に雄が縄張り内に水草片などの巢材と腎臓より分泌される糊状物質を組み合わせて巣を作る。近縁属のイトヨ属やスピナキア属では、巣の形状が雌性配偶者選択における重要な cue であることが示されている。これら 2 種 (キタノトミヨとトミヨ) の雑種雄は不稔であり、同所的生息地において雌性選択において重要と考えられる巣の構造が異なる。

近年、進化生態学研究において、環境勾配に沿ったクラインや、同様な環境に対する平行進化などの適応的分化を、ゲノム科学と集団遺伝学を結びつけた集団ゲノム学的手法によって解明する研究が盛んに行われている。本手法は、表現型に関わる候補遺伝子に連鎖した遺伝マーカーと、多数の中立的遺伝マーカーとの間で、集団間の遺伝分散を比較することにより、候補遺伝子に対する淘汰圧を測定し、環境要因との相関を調べる。本研究では、キタノトミヨに対する生物的環境要因としてトミヨを仮定し、交配前隔離機構に関与する QTL に同所的生息地に特異的な淘汰圧が見られるかどうかを、AFLP 法を用いた集団ゲノム学的分析によって、全研究期間中に明らかにすることを当初の目的とした。

はじめに、すでに生化学的な至近要因が解明されている交配前生殖隔離形質である巣作り行動要素の違いについて、量的形質遺伝子座 (QTL) マッピングを行い、つぎに異所的生息地との比較を通じて、交配前隔離形質に関与する QTL に、同所的集団に特異的な方向性淘汰がみられるかどうかを検証しようとした。

3. 研究の方法

(1) 交配家系の作成

トミヨ属魚類 2 種間にみられる生殖的隔離機構の遺伝的基盤を解明するために、緻密な計画に沿った分離世代の作成を行った。研究に先立って、同所的集団間のトミヨ雌とイバ

ラトミヨ雄間で F1 雑種を作成し、その雌をイバラトミヨに戻し交配して BC1 (戻し交配第 1 世代) を 15 家系作成した。また、これら BC1 家系のうち、トミヨに特異的な行動要素を示した雄をイバラトミヨ雌に 2 度戻し交配を繰り返した BC3 (戻し交配第 3 世代) を 4 家系作成した。なお、戻し交配の繰り返しによる置換系統の作成は研究最終年度以降も継続している。

(2) 異所的生息地におけるサンプリング

トミヨおよびイバラトミヨの異所的集団を、前者については北海道および富山県において、後者についてはデンマーク、ロシア、およびウズベキスタンよりそれぞれ採集した。また、これらの採集集団を既存の系統地理データに加え、遺伝的分化程度を樹状図分析により把握した (図 1)。樹状図より、富山県庄川水系のトミヨとデンマーク淡水性集団をそれぞれ異所的集団の代表とし、雄の巣作り行動の観察を行った。

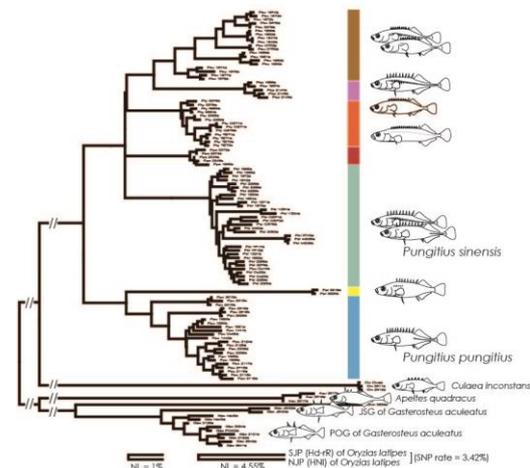


図 1 本研究で採集されたトミヨ属魚類同所のおよび異所的集団を加えた、トミヨ属魚類全体の樹状図。AFLP 法に基づく 1193 座の多型情報に基づく遺伝距離に基づき近隣結合法により樹状図を構築した。

(3) 行動観察

同所的生息地と異所的生息地の野生集団、雑種 F1、および各分離世代家系において、巣作り行動をビデオ観察し、行動要素の形質値を得た (図 2)。注目した行動要素は、同所的生息地における両種間の巣の構造の違いを生み出す糊付け行動 (SG) および巣の位置である。なお、キタノトミヨの同所的集団において、SG は完全に欠落しており、巣の構造の違いを生み出している。

(4) AFLP 法による QTL マッピング

BC1 世代の 15 家系の計 137 個体からゲノム DNA を抽出し、AFLP 法による連鎖地図作成に用いた。なお、行動形質の形質値が得られたのは雄のうち 83 個体だった。AFLP 法では 48 セレクティブプライマーペアを用

い、トミヨに特異的なマーカーについて遺伝子型を特定した。連鎖地図作成には JoinMap v4.1 を用い、行動形質の QTL 分析には R/qtl を用いた。

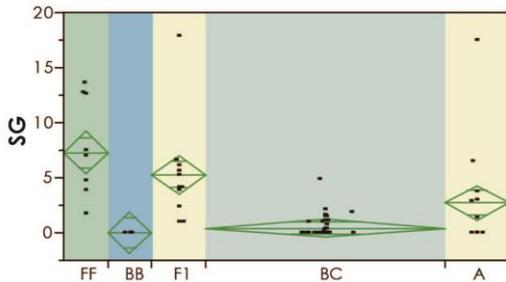


図2 巣作り行動要素の一つである SG の変異。同所的集団間 (FF と BB) 間で差は明瞭であり、F1 および異所的集団 (A) においては中間的な形質値を示す。分離世代である BC1 では SG は減少する。

(5) 集団ゲノミクス

集団サンプリングによって得られた複数の同所的・異所的集団について、各々約 50 個体からゲノム DNA を抽出し、AFLP 法により遺伝的変異の検出を行う。はじめに多数の AFLP マーカーによって得られた集団間の遺伝的分化 (FST) と遺伝的多様性 (ヘテロ接合度) の差異のベースラインを算出し、中立予測から有意に逸脱した遺伝子座 (アウトライアー: その近傍のゲノム領域を含めて、自然淘汰の影響を受けた可能性のある遺伝子座) を検出する。つぎに、QTL マッピングによって探索した、交配前隔離機構に関与する遺伝子座に連鎖したマーカー (QTL 連鎖マーカー) を、先に作成した中立マーカーによるベースラインに組み込んで、アウトライアーとなるかどうか、さらには同所的生息地特異的に QST が増加しているかどうかを測定する。

4. 研究成果

同所的集団間で交配実験を行い、BC1 の 15 家系 137 個体に基づき連鎖地図作成を行った。236 の多型 AFLP マーカーが 21 の連鎖群に位置づけられた (全長 1885cM, マーカー間平均距離は 8.0cM) (図 3)。

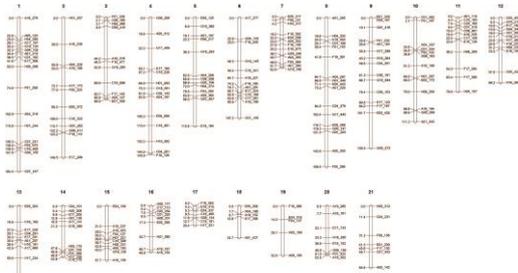


図3 236 座の多型 AFLP マーカーに基づく連鎖地図。

BC1世代の15家系において婚姻色を呈した雄83個体について巣作り行動および生殖腺の観察を行い、交配前隔離機構である巣の位置とSG、および交配後隔離機構である不稔現象について分離様式と形質値を得た。各生殖隔離形質についてQTLマッピングを行ったところ、巣の位置に関してLG10に有意なQTLが見出されたものの (LOD > 4.0, p < 0.005), SGと不稔に関しては主要なQTLを見出すことができなかった (図4)。BC1世代における雄の分析個体数を増やすことが困難であることと、巣の違いを生み出す主要な行動要素であるSGにおいて有意なQTLが見出できなかったことから、SGに関連するゲノム領域を絞り込むために、戻し交配の繰り返しを行った。分離家系においてSGを発現した雄をキタノトミヨ野生集団雌に戻し交配し、研究期間中BC3まで育成を行った。

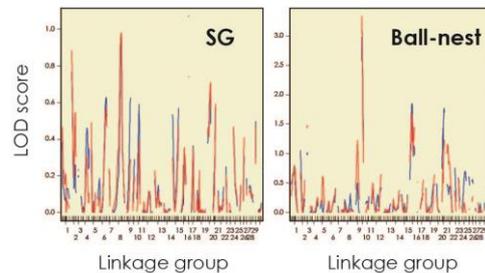


図4 巣作り行動の QTL 分析。巣作り行動要素の一つである SG においては主要な QTL は見出されなかった (左)。一方、巣の位置については、LG10 に主要な QTL が見出された。

異所的生息地の集団サンプリングに関しては、デンマークよりキタノトミヨの淡水性集団と汽水性集団、それぞれ2集団ずつを採集し、DNA標本を持ち帰るとともに、受精卵を持ち帰り同一環境で成魚まで育てた。これら飼育集団について巣作り行動を同所的2種と比較したところ、両者の中間的な巣作り行動を示し、同行動に生態的形質置換が起きていることが推定された (図2)。今後は、異所的集団と同所的集団間で交配家系 (F2世代) を用いて、両者間の巣作り行動の違いにかかわるQTL分析を行う予定である。

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 5 件)

- ① Ishikawa A, Takeuchi N, Kusakabe M, Kume M, Mori S, Takahashi H, Kitano J. Speciation in ninespine stickleback: reproductive isolation and phenotypic

divergence among cryptic species of Japanese ninespine stickleback. J. Evol. Biol. Online First.

- ② Kawaguchi M, Takahashi H, Takehana Y, Naruse K, Nishida M, Yasumasu S. Sub-functionalization of duplicated genes in the evolution of nine-spined stickleback hatching enzyme. J. Exp. Zool. B: Mol. Dev. Evol. 320: 140-150. (2013).
- ③ Kuwahara M, Takahashi H, Kikko T, Kurumi S, Iguchi K. Introgression of *Oncorhynchus masou* subsp. (Biwa salmon) genome into lake-run *O. m. ishikawae* (Amago salmon) introduced into Lake Biwa, Japan. Ichthol. Res. 59: 195-201 (2012).
- ④ Watanabe K, Kano Y, Takahashi H, Mukai T, Kakioka R, Tominaga H. GEDIMAP: a database of genetic diversity for Japanese freshwater fishes. Ichthyol. Res. 57: 107-109 (2010).

[学会発表] (計 17 件)

- ① 高橋 洋・Ramatulla T. アムダリアデルタのアラルトミヨ *Pungitius platygaster aralensis* の遺伝的特徴. 日本魚類学会年会. 水産大学校キャンパス, 2012 年 9 月.
- ② 高橋 洋. 半遊泳性カジカ類の適応放散と種分化: コットコメフォルス属. 日本魚類学会年会シンポジウム, バイカル湖におけるカジカ類の起源, 適応放散と種分化. 水産大学校キャンパス, 2012 年 9 月.
- ③ 川口真理・高橋 洋・西田 睦・安増茂樹. トミヨ孵化酵素 LCE の卵膜分解における機能分化. 第 14 回日本進化学会, 首都大学東京南大沢キャンパス, 2012 年 8 月.
- ④ Kawaguchi M, Takahashi H, Yasumasu S. Sub-functionalization of duplicated genes during evolution. Seventh International Conference on Sctickleback Behaviour and Evolution. Islandwood on Bainbridge Island, Seattle, Washington, July, 2012.
- ⑤ 高橋 洋. 同所的トミヨ属 2 種の巣作り行動の遺伝様式. 日本魚類学会年会. 弘前大学文京町キャンパス, 2011 年 9 月.
- ⑥ Hiroshi Takahashi. Biological Assessment in Area Capability Project - Plan of the specimen collection and DNA analysis. Internationl Workshop on Area Capability Approach in the Philippines. GCEP Building, University of the Philippines Visayas (UPV), Iloilo City, Philippines. November, 2011.

[図書] (計 2 件)

- ① 高橋 洋. イトヨ・オヤニラミ. 鳥取県生物学会 (編), p. 76. レッドデータ

ブックとつとり 改訂版-鳥取県の絶滅のおそれのある野生動植物-. 鳥取県生活環境部公園自然課, 鳥取. 337 pp. (2012).

- ② 渡辺勝敏・高橋 洋. 日本の淡水魚類相とその成立過程のより深い理解に向けて. 渡辺勝敏・高橋 洋 (編・著), pp. 29-46. 淡水魚類地理の自然史【多様性と分化をめぐる】. 北海道大学出版会, 札幌. 283 pp. (2010).

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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]

市立しものせき水族館 (海響館) において研究成果の一部を父の日に合わせて一般向けに特別展示した。

(<http://www.kaikyokan.com/blog-event/post-277.php>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 洋 (TAKAHASHI HIROSHI)

(独) 水産大学校・生物生産学科・助教

研究者番号 : 90399650

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

