

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25870572

研究課題名(和文)イモリの遺伝集団間の複数の分布境界での生殖隔離の実態とその成立プロセスの検討

研究課題名(英文)An investigation for degrees of reproductive isolation on the several contact zones among genetic lineages of *Cynops pyrrhogaster*

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アカハライモリのmtDNA系統のうち、いくつかの系統間には核ゲノムでも明瞭な違いが見られた。分布境界では様々な程度の交雑が生じており、中国地方の交雑帯では多くの交雑個体が見られるのに対し、中部地方の交雑帯では純系集団の中にまれに交雑個体が見られることなどが明らかになった。中国地方の2系統間には、交雑帯を介した非対称な遺伝子浸透が確認され、これにより交雑帯は徐々に西に移動しつつあるものと考えられる。一方、形態的な違いが指摘されてきた北日本集団の中の東北種族と関東種族の間、九州南西部の西日本集団と南日本集団の間では、明瞭な遺伝的差異はみられず、遺伝子頻度は緩やかに変化した。

研究成果の概要(英文)：We detected nuclear genome differences between the two mtDNA clades of *Cynops pyrrhogaster*. We found many hybrid individuals around the hybrid zone between the Central and the Western Japan groups in Chugoku district. On the contrary, we detected a few hybrid individuals around hybrid zone between the Northern and the Central Japan groups in Chubu district. The migration rate analysis revealed that an asymmetric gene introgression between two genetic groups in Chugoku district occurred, suggesting the possibility of range displacement of the two lineages as a consequence of the shift of their hybrid zone. On the contrary, we could not detect obvious nuclear genome differences based on microsatellite markers between the Tohoku and Kanto races in the Northern Japan group in Kanto district and between the Western and the Southern Japan groups in Kyushu district.

研究分野：分類学、集団遺伝学、両棲類学

キーワード：生殖隔離 交雑帯 遺伝子浸透 アカハライモリ

### 1. 研究開始当初の背景

本研究で扱うアカハライモリの分化は、もともとは地理的な障壁の成立に伴う異所的分化によってもたらされたことが、先行研究で明らかになっていた (Tomimaga et al., 2010; 2013)。主な分布境界は、中部地方、中国地方、九州西南部の 3 か所に形成されており、現在、各遺伝集団は地理的障壁によっては隔離されていない事が明らかになっている。これらの地域のうち、後者 2 境界域では mtDNA の 2 系統が同所的に分布している。中部地方の境界も両者の地理的距離は 30km に満たないほど接近しており、ほぼ同所的に 2 系統が分布する地域が見つかる可能性が考えられた。また、これらの分布境界のうち mtDNA の遺伝的分化の程度が大きい前者 2 境界域 (中部地方と中国地方の分布境界) に関しては、アロザイム、形態、配偶行動でも一致した境界が確認されており (Sawada, 1963; Hayashi and Matsui, 1988, 1990)、境界域で強い生殖隔離が生じているか、弱い隔離により集団間の遺伝子浸透がある程度妨げられていることが示唆されていた。

申請者の先行研究により、20 以上のマイクロサテライトマーカーをすでに開発済みで、中国地方のイモリを対象にした多型解析を行っている。また、イモリ類では生殖隔離に関連する可能性のあるペプチドやタンパク質がいくつか同定されている。これらの遺伝子として、オスの総排泄口付近から輩出されるペプチド性のメス誘引フェロモンであるソデフリンの遺伝子が良く知られている。

### 2. 研究の目的

本研究ではアカハライモリを例にして各境界領域での遺伝的分化の程度と、生殖隔離機構との関係を明らかにし、両生類での異所的種分化のプロセス理解のための知見を得ることを目的とした。

mtDNA、マイクロサテライトを用いて境界の集団の遺伝的特性を調査し、交雑の有無、交雑が確認された場合は、交雑が双方の遺伝集団の遺伝的特性に与える影響、交雑帯が維持されるメカニズムについて検討した。

### 3. 研究の方法

まず、マイクロサテライト、mtDNA の塩基配列に基づき各個体の遺伝子型を決定し、その個体がどのような遺伝的特性を持つのか明らかにした。STRUCTURE, NewHybrids, BayesAss などの集団遺伝解析プログラムにより、各個体のアサイメント解析や移入率の推定を行った。

また、外部形態についても詳しく調査するため、各地点からのイモリを液浸標本として保存し、外部形態計量形質、計数形質について調査を行った。

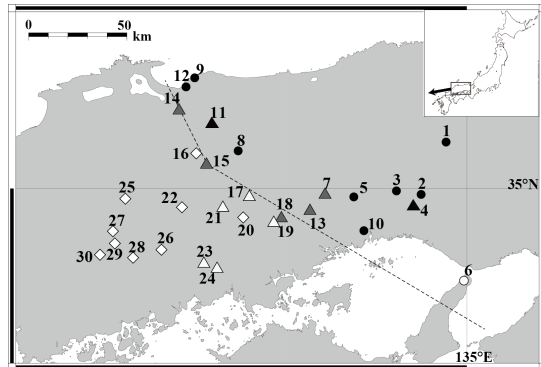
また、ソデフリンの遺伝子などの生殖隔離

に関わる遺伝子については、境界付近で分化がみられるのか検討した

### 4. 研究成果

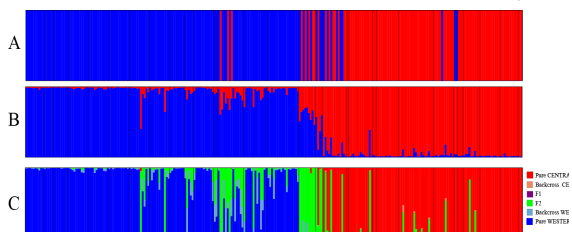
サンプリング収集は、関東、東北地方、中国地方の分布境界、中部地方の分布境界、九州南部の分布境界で行った。各地で十分な数のサンプルを得ることができた。これを用いて、先に開発したマイクロサテライトマーカーを用いた多型解析を開始した。

まず、ミトコンドリア (mt) DNA に基づく系統解析で明らかになったアカハライモリの 5 集団のうち、中国地方で分布を接する中部日本集団と西日本集団の分布境界での両者の遺伝的關係を mtDNA、マイクロサテライトを用いて調査した。その結果、30 地点から得られた 269 サンプルを調査した結果、両者の分布の境界付近の 5 地点で mtDNA の中部日本集団と西日本集団が同地的に見られることが明らかになった。



今回のサンプリング地点。黒は中部日本系統 mtDNA だけを含む集団。灰色は両系統 mtDNA を含む集団。白は西日本系統 mtDNA だけを含む集団。丸は SSR で中部日本純系だけを含むとされた集団。三角は SSR で雑種と判断された個体を含む集団。菱形は SSR で西日本純系だけを含むとされた集団。

2 つの mtDNA 系統は、同所的に見られる地域を挟んで基本的には側所的に分布していた。マイクロサテライトの解析の結果でも、この地域のアカハライモリは中部日本集団と西日本集団の 2 集団に大まかに区分され、mtDNA の境界と同じ地域に両者の境界が見られることが明らかになった。

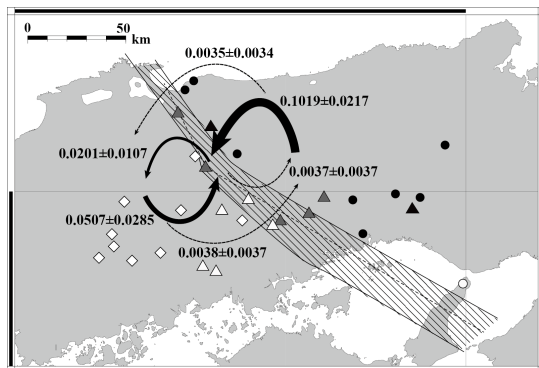


各個体の遺伝的組成。A: mtDNA の系統、赤：中部日本集団、青：西日本集団。B: Structure での解析結果、赤：中部日本集団、青：西日本集団 C: 、赤：中部日本純系、青：西日本純系。紫+緑+水色+肌色：雑種個体。

mtDNA の 2 系統が同地的に見られた 5 地点のうち 2 地点の個体はマイクロサテライトでは中部日本の純系と判断される個体が多数を占めわずかに雑種が見られ、1 点

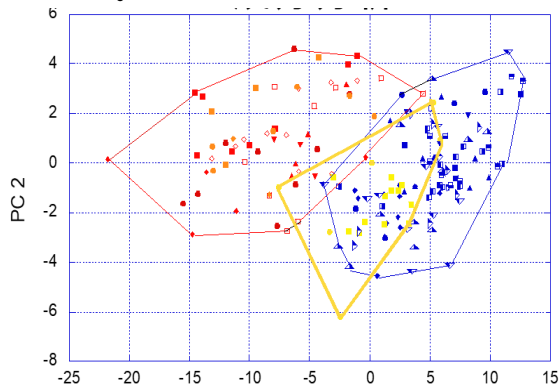
の個体の多くが西日本集団で一部雑種が見られた。残りの2地点のすべての個体は両者の中間的特徴（雑種の特徴）を示した。その他にも mtDNA ではどちらかの系統のみからなる集団中にも雑種由来と判断される個体が見られた。

次に両集団と交雑集団間の移入率の計算をした結果、2系統は交雑帯を挟んで、非対称な遺伝子浸透が生じているらしいことが明らかとなった。こうした非対称な遺伝子浸透により、交雑帯は少しずつ東から西方向へ移動しつつあると考えられ、それにより中部日本系統は分布を拡大し、西日本系統は分布を縮小しつつあることが明らかとなった。



中部日本純系、交雑集団、西日本純系間の移入率

また両者の外部形態の比較の結果、中部日本集団と西日本集団は多変量解析で区分され、その区分はマイクロサテライトの結果と一致した。マイクロサテライトで中間的特徴を示した集団は、外部形態も中間的特徴を示し、両者の雑種集団であると考えられた。

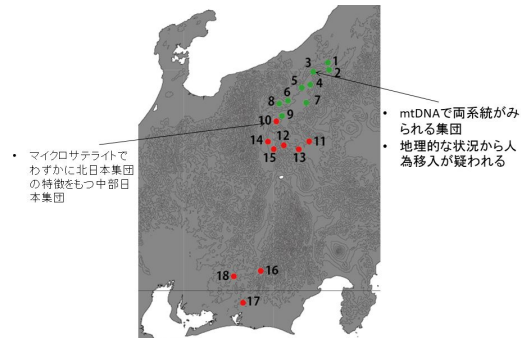


外部形態形質 24 計量形質に基づく主成分分析の結果。青：西日本集団、赤+橙：中部日本集団、黄色：雑種集団

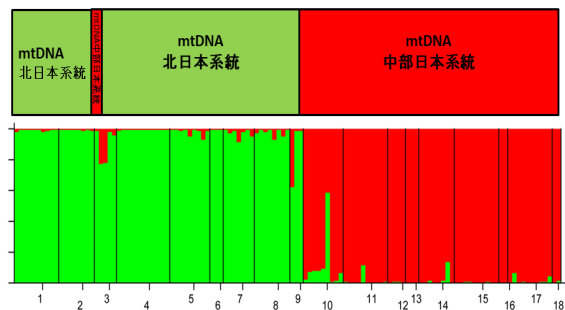
次に中部地方で分布を接する北日本集団と中部日本集団についても同様の調査を行った。これまでに 17 地点から得られた約 100 個体のサンプルの解析をおえており、この地域で分布域が接する北日本集団と中部日本集団間にも狭い交雑帯がみられることが分かった。しかし、交雑個体は、交雑帯の内部でも多くは見つからず、中国地方の分布境界にみられる交雑帯とは異なり、

2 集団間の交雑はまれに生じていることが示唆され、北日本集団と中部日本集団の生殖隔離の程度は、中部日本集団と西日本集団間の間にみられる生殖隔離の程度よりも強いことが示唆された。

今後、北日本集団と中部日本集団についてはさらに調査地点を増やして、交雑の実態に迫る予定である。



中部地方でのサンプリング地点と結果の要約。緑が北日本集団、赤が中部日本集団。地点 3, 9, 10 で雑種がみられる。



各個体の遺伝的組成。上：mtDNA での解析結果。下：SSR での解析結果 (STRUCTURE)。

一方で、西日本集団と南日本集団間や、外部形態に違いがみられる北日本集団の中の東北種族と関東種族の間では、マイクロサテライトでは明瞭な遺伝的分化は見られず、ゆるやかな対立遺伝子頻度のクラインがみられるのみであった。これらの地域については今後次世代シーケンサーを用いたより多くの核遺伝子マーカーを用いた調査を予定している。

生殖隔離に関係する遺伝子として、ソデフリンの解析を共同研究者に依頼した。その結果、中国地方の分布境界では、境界を挟んでその組成に違いがみられることが分かった。今後、サンプルの追加を行い、順次結果をまとめていく。

そのほか、本研究を通して、伊豆半島の南部に北日本集団と類縁性の高い集団が中部日本集団の分布域に阻まれた形で地理的に隔離された状態で分布すること、伊八丈島の移入集団がおそらく四国の個体群に由来し、遺伝的な多様性が非常に低いことなども新たに分かった。これらの成果の一部を学術雑誌、学会発表を通して発表した。

## 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3件)

1. Tominaga, A., Meyer-Rochow, V. B., Okamoto, T., Kuriyama, T., Nishikawa, K., Matsui, M. Origin and genetic uniformity of introduced population of *Cynops pyrrhogaster* (Amphibia: Urodela) on Hachijojima Island. *Current Herpetology*, 35, 64-68 2016. (査読有)
2. Tominaga, A., Matsui, M., Kokuryo, Y. Occurrence and evolutionary history of two *Cynops pyrrhogaster* lineages in the Izu Peninsula. *Current Herpetology*, 34(1):19-27, 2015. (査読有)
3. Tominaga, A., Matsui, M., Yoshikawa, N., Hayano, A., Inoue-Murayama, M. Characterization of fifteen microsatellite markers for the Japanese fire-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Conservation Genetics Resources*, 6:405-407, 2014. (査読有)

[学会発表](計7件)

1. 富永 篤・松井 正文・吉川 夏彦・江頭 幸士郎・西川 完途. 中国地方におけるアカハライモリ2系統間の非対称な遺伝子浸透とそれに伴う交雑帯の移動. 日本爬虫両棲類学会第55回大会 2016年11月25-26日, 琉球大学(沖縄県中頭郡西原町).
2. 砂辺 真之輔・富永 篤. マイクロサテライト法によるシリケンイモリの親子判定の検討及びそれを用いた生活史の研究. 日本爬虫両棲類学会第55回大会 2016年11月25-26日, 琉球大学(沖縄県中頭郡西原町).
3. Atsushi Tominaga, Masafumi Matsui, Natsuhiko Yoshikawa, Koshiro Eto, Kanto Nishikawa. Natural hybridization between two lineages of Japanese fire-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster* in their contact zone. *Zoological Society of Japan, Joint Event: The 22nd International Congress of Zoology and the 89th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan* 2016年11月17-19日, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市).
4. 富永 篤・松井 正文・西川 完途・吉川 夏彦・江頭 幸士郎. 分布境界におけるアカハライモリ系統間の遺伝関係. 日本動物学会第86回新潟大会 2015年9月17-19日, 朱鷺メッセ: 新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市).

5. 富永 篤・松井 正文・国領 康弘. 伊豆半島産のアカハライモリについて. 日本爬虫両棲類学会第53回大会, 2014年11月8-9日, 神戸山手大学(兵庫県神戸市).
6. 富永 篤・松井 正文・吉川 夏彦. 中国地方で側所的に分布するアカハライモリ2遺伝集団の遺伝的、形態学的比較. 日本爬虫両棲類学会第52回大会 2013年11月2-3日, 東海大学札幌キャンパス(北海道札幌市).
7. 富永 篤・松井 正文. 中国地方に側所的に分布するアカハライモリ2遺伝集団の形態学的比較. 日本動物学会第84回岡山大会 2013年9月26-28日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等:

<http://kenkyushadb.lab.u-ryukyu.ac.jp/profile/ja.WC6JJ3jHaZcGESQ5odDdcQ==.html>

## 6. 研究組織

(1)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