

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850131

研究課題名(和文) 沿岸生物種において遺伝的攪乱は起こっているか：マハゼの大規模DNA分析からの解明

研究課題名(英文) Whether is genetic disturbance caused in coastal marine species?: Genome-wide population genetics of the yellowfin goby

研究代表者

平瀬 祥太郎 (Hirase, Shotaro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：90635559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：バラスト水を介した移動分散が懸念されるマハゼの集団構造を明らかにするため、ミトコンドリアDNA分析とRAD-seqによる解析を行った。ミトコンドリアDNA分析では、日本国内に軽微な遺伝的分化が生じていることが明らかとなった。海外侵入集団の解析では、北カリフォルニア侵入集団の起源が東京湾であることが示されたが、南カリフォルニアとメルボルンの侵入集団の起源を推測することはできなかった。RAD-seq解析では、太平洋側と日本海側に対応した遺伝的分化が検出された。このような地理的距離と関連した集団構造は、バラスト水による遺伝的攪乱が生じていないことを示唆している。

研究成果の概要(英文)：I performed mitochondrial DNA and RAD-seq analyses to investigate the population structure of *Acanthogobius flavimanus* which is expected to be transported by ballast water. Mitochondrial DNA analysis showed significant genetic differentiation among populations in the Japanese archipelago. This analysis also suggested that the origin of a northern California population is Tokyo Bay, but I was unable to identify the origin of a southern California population and a Melbourne population. RAD-seq analysis showed genetic differentiation between the Pacific Ocean and the Sea of Japan populations. The genetic structure related to geographic locations suggests that genetic disturbance has not been caused by ballast water in *Acanthogobius flavimanus* populations in the Japanese archipelago.

研究分野：水圏遺伝生態学

キーワード：マハゼ 分子系統地理 遺伝的攪乱 RAD-seq 次世代シーケンサー 侵入種 集団構造

1. 研究開始当初の背景

生物種の人為的な移動は地域における種構成を激変させるだけでなく、種内における遺伝的多様性をも大きく変化させる。遺伝的に分化した種あるいは集団が、意図的・偶発的に運搬された場合、移動先では遺伝的に分化した個体間の交雑が生じる危険が高い。そして、交雑が生じると地域集団の適応力の低下をもたらす危険性がある。このような「遺伝的攪乱」は生物の自然集団の存続を脅かす重大な問題として認識されている。

淡水生物を含む、陸上生物では、「遺伝的攪乱」の実態の解明が進んでいるものの、海洋生物における攪乱の実態はほとんど解明されていない。これは、移動分散能力が高いと考えられる海洋生物種では、分布域全体で遺伝的分化が小さいはず、と暗黙のうちに仮定されてきたことに起因する。一方で、申請者は、沿岸海洋域の生物種の集団構造に着目し、沿岸性ハゼ科魚類をモデルとして分子遺伝学的研究を行ってきた。ミトコンドリア (mt) DNA と核 DNA マーカーによる分析の結果から、日本列島沿岸のハゼ科魚類には、大きく分岐した太平洋と日本海のグループや、太平洋グループの中にも複数の地域クレードが存在し、明確な集団構造が存在することが明らかになった。日本列島沿岸の生物にも多数の地域集団が存在するという申請者の研究成果は、それらの遺伝的攪乱に注意を払うべきであることを浮き彫りにした。また、人類活動の影響から、既に沿岸生物種の遺伝的攪乱が起きている可能性もあり、その実態の解明は、早急に取り組むべき課題として位置づけられる。また、日本列島沿岸には、水産資源として重要な生物が多く含まれていることから、遺伝的攪乱の実態を正確に、積極的に把握しておくことで、それらの遺伝資源の管理方を立案する上でも考慮すべき要素を提示できる。

2. 研究の目的

既に海外への移出が確認されている沿岸生物種は、国内においても人為的な移動が生じている可能性が高く、遺伝的攪乱の実態を把握する上で適したモデルを提供する。日本列島沿岸に生息するハゼ科魚類、マハゼはアメリカやオーストラリアに船舶のバラスト水を介して侵入し、1960年代以降に分布を拡大させたことが報告されている。1) マハゼはバラスト水によって運ばれること、2) 東京港や名古屋港などの大型港では、年間20,000隻超の国内船舶が入港していること、3) ハゼ科魚類では明確な集団構造の存在が多く報告されていること、以上の3つを合わせて考えると、本種ではバラスト水による遺伝的攪乱が生じている可能性が高い。本研究では、マハゼにおける遺伝的攪乱の実態を解明するために、mtDNA と RAD-seq (Restriction Associated DNA tag sequencing) データを用いた集団遺伝学的解析を行う。また、他のハゼ科魚類 (アゴハゼとシロウオ) の集団遺伝学的解析を RAD-seq データを用いて行い、RAD-seq の有効性を検証する。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア DNA

在来地域である日本列島と朝鮮半島沿岸の18地点でマハゼを採集した。また、メルボルン大学との共同研究により、侵入地域であるオーストラリア・メルボルン沿岸で新たにマハゼを採集した。mtDNA のコントロール領域 (mtCR) の塩基配列を決定し、データベースに登録されているマハゼ集団の塩基配列 (東京、福島、宮城、北カリフォルニア集団、南カリフォルニア集団) も含めて集団遺伝学的解析を行った。

(2) RAD-seq

日本列島沿岸の12地点で採集した計90個体について RAD-seq を行った。2種類の制限酵素でゲノム DNA を切断する ddRAD 法を用いてライブラリを作成し、イルミナ社の

HiSeq でシーケンスを行った。SNP マーカーの探索は、Stacks ソフトウェアのパイプライン(ustacks, cstacks, stacks, populations)を用いて行った。得られた SNP マーカーを用いて集団遺伝学的解析を行った。また、沿岸性のハゼ科魚類であるアゴハゼとシロウオについても RAD-seq による集団遺伝学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア DNA による在来地域と侵入地域の分子系統地理

261 個体から 72 ハプロタイプが新たに検出された。在来集団の塩基多様度は 0.08%~0.62%、ハプロタイプ多様度は 0.35~1.00 であり、集団間で異なっていた。他の沿岸性のハゼ科魚類のような地域系統の存在は示されなかったが、東北・北海道の集団と他の集団間に有意な遺伝的分化が生じていた ($F_{CT} = 0.42$; $P < 0.01$)。また、それぞれのグループ内においても有意な遺伝的分化が検出され ($F_{ST} = 0.08, 0.10$; $P < 0.01$)、在来地域内で分集団化していることが示唆された。これらの解析で、マハゼにおける遺伝的分化の存在が明らかとなったが、その分化の程度は低く、mtDNA で本種の遺伝的攪乱の実態を把握するのは困難であると考えられた。

侵入集団の起源について検討した結果、北カリフォルニア集団の起源が東京湾である可能性が示された。しかし、南カリフォルニアとメルボルンの侵入集団の起源を mtCR によって特定することはできず、他の分子マーカーが必要であると考えられた。また、メルボルンの侵入集団では、一つのハプロタイプしか検出されず、侵入のプロセスにおいて強い遺伝的浮動を経験したと考えられた。

(2) RAD-seq によるマハゼの集団構造解析

HiSeq によるシーケンスの結果、個体あたり約 40 万から 600 万リードのシーケンスデータが得られた。SNP マーカーの探索を行っ

たところ、2876 個の SNP マーカーが得られた。これらの SNP マーカーを元に算出した距離行列から、近隣結合法によって標本集団間の類縁関係を推定した結果、それらの類縁関係は地理的距離と関連していた。さらに、ADMIXTURE ソフトウェアによるクラスタリング分析を行ったところ、標本集団が異なるクラスターに振り分けられる傾向が観察され、mtDNA よりも高精度に遺伝的分化を捉えることができた。2 つのクラスターを想定した場合、おおよそ太平洋側と日本海側の標本集団に対応するクラスターに振り分けられ、日本海南部と関門海峡、瀬戸内海周辺の標本集団でこれらのクラスターの混合が観察された。

仮にバラスト水による遺伝的攪乱がマハゼの在来地域において生じていた場合、このような地理的距離と明確に関連した集団構造は観察されないと考えられる。したがって、本研究の結果は、バラスト水による遺伝的攪乱がマハゼにおいて生じていないことを示唆している。

(3) ハゼ科魚類 2 種の RAD-seq

アゴハゼとシロウオの RAD-seq データを解析したところ、mtDNA やマイクロサテライト DNA などの分子マーカーによるこれまでの解析と同様に、高いレベルの遺伝的分化が検出された。さらに、より高い解像度で集団構造を明らかにすることができた。したがって、RAD-seq は低レベルから高レベルまで、さまざまな集団構造を持つ海洋生物種に適用可能であることが確かめられた。

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 4 件)

1. Hirase S, Chambers S, Hassell K, Carew M, Pettigrove V, Soyano K, Nagae M, Iwasaki W. (2017) Phylogeography of the yellowfin goby *Acanthogobius flavimanus* in native and non-native distributions. *Marine Biology* 164: 106. (査読有)
2. Hirase S, Ikeda M, Hayasaka S, Iwasaki W, Kijima A. (2016) Stability of genetic

diversity in an intertidal goby against tsunami disturbances. *Marine Ecology* 37: 1161-1167. (査読有)

3. Hirase S, Takeshima H, Nishida M, Iwasaki W. (2016) Parallel mitogenome sequencing alleviates random rooting effect in phylogeography. *Genome Biology and Evolution* 8: 1267-1278. (査読有)

4. Hirase S, Ikeda M. (2015) Hybrid population of highly divergent groups of the intertidal goby *Chaenogobius annularis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 473: 121-128. (査読有)

〔学会発表〕(計 7件)

1. 平瀬祥太郎, 小北智之, 永野 惇, 菊池 潔, RAD-seq によるシロウオ太平洋型と日本海型の交雑集団の遺伝解析. 平成 29 年度日本水産学会春季大会. 東京海洋大学品川キャンパス, 東京. 2017 年 3 月.

2. 平瀬祥太郎, 手塚あゆみ, 永野惇, 岩崎 渉. 新たなゲノム構成を有する交雑集団の形成: アゴハゼの RAD-seq 解析. 日本進化学会第 18 回大会. 東京工業大学大岡山キャンパス. 東京, 2016 年 8 月.

3. Hirase S, Tezuka A, Nagano A, Iwasaki W. RAD-Seq analysis of an intertidal goby *Chaenogobius annularis* uncovered stable hybrid population with novel genomic composition. The 2016 annual meeting of the Society for the Study of Evolution, the Society of Systematic Biologists, and the American Society of Naturalists (Evolution 2016), Austin, June 17-21, 2016.

4. 平瀬祥太郎, 手塚あゆみ, 永野惇, 岩崎 渉. How is a novel genetic group generated through hybridization? A RAD-seq analysis of an intertidal goby *Chaenogobius annularis* (Agohaze). 第 16 回東京大学生命科学シンポジウム. 東京大学駒場キャンパス, 東京, 2016 年 4 月.

5. 平瀬祥太郎, Sherrie Chambers, Kathryn Hassell, Melissa Carew, Vincent Pettigrove, 征矢野清, 長江真樹, 岩崎 渉. マハゼ在来地域および侵入地域の分子系統地理. 平成 28 年度日本水産学会春季大会. 東京海洋大学品川キャンパス, 東京. 2016 年 3 月.

6. 平瀬祥太郎, 手塚あゆみ, 永野惇, 岩崎 渉. 更新世の日本海隔離で生じたアゴハゼ 2 グループの交雑帯の RAD-seq 解析. 日本生態学会第 63 回全国大会, 仙台, 2016 年 3 月.

7. 平瀬祥太郎, 池田実. アゴハゼの太平洋グループと日本海グループの交雑集団の発見. 日本進化学会第 16 回大会, 高槻現代劇場, 高槻, 2014 年 8 月.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0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 0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〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
平瀬 祥太郎 (HIRASE, Shotaro)
東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号: 90635559

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号:

(4) 研究協力者
()