

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07212

研究課題名(和文)3世代にわたる悉皆調査で明らかにする絶滅危惧種ヒョウモンモドキの繁殖生態

研究課題名(英文) Study of breeding system of an endangered butterfly using a complete set of samples over three generations.

研究代表者

玉手 英利 (Tamate, Hidetoshi)

山形大学・理学部・教授

研究者番号：90163675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：絶滅危惧種ヒョウモンモドキの遺伝的多様性や分集団間のgene flowを把握することを研究目的として、部分ゲノム解析を行なった。日本チョウ類保全協会が保存している野生集団及び飼育集団(ハウスサンプル)のサンプルを材料として、近縁種のショットガン配列との相同性が高い領域の一塩基多型が1388座位、得られた。この遺伝マーカーを用いて集団構造解析を行ったところ、ハウスサンプル毎に遺伝的分化が進んでいることが示された。飼育繁殖個体の野外放蝶では、特定のハウスから大量の個体を導入するよりも、各ハウスから一定数の個体を導入するほうが、野外集団の遺伝的多様性を維持するうえで望ましいと結論づけられた。

研究成果の概要(英文)：A genome-wide analysis was carried out to investigate the level of genetic diversity and gene flow between populations of an endangered butterfly *Melitaea scotocia*. Using samples of wild and captive (house) populations had been preserved by the Japan Butterfly Conservation Society, 1388 SNP sites that are highly homologous to *Glanville fritillaria* butterfly shot-gun sequences were identified. Genetic analyses revealed that house populations were genetically differentiated each other. Therefore, it is desirable to introduce a certain number of individuals from each house rather than introducing a large number of individuals from a specific house in outdoor butterflies of breeding breeders to maintain genetic diversity of wild populations.

研究分野：分子生態学

キーワード：遺伝的多様性 絶滅危惧種 集団構造 遺伝的分化 保全

1. 研究開始当初の背景

ヒョウモンモドキ(鱗翅目タテハチョウ科、学名 *Melitaea scotocia*)は、おもに小規模な湿地に生息する蝶で、かつては関東・中部・東海地方と中国地方の広い範囲の本州に広く分布していた。しかし、昭和の中ごろから土地開発や乱獲などで局所的絶滅が進み、環境省の第4次レッドリスト(2012)において“絶滅の危険が極めて高い”とされる「絶滅危惧 A類」に選定された。2000年以降では広島県の世羅台地・賀茂台地及び芸北町でのみ生息が確認されており、国内で最後の生息地となった広島県では、本種の保全活動が行われている。

ヒョウモンモドキは、主に貧栄養湿地に生息するキク科のキセルアザミや草地のタムラソウなどを幼虫時の食草としており、その食草が生息する山間の貧栄養湿地を生息域としている。その生息域の中に繁殖場所が点在して存在しており、全体として地域個体群を形成している。また年ごとに繁殖場所は生息域内で移動することがあり、この場所を生息パッチと呼ぶ。生息パッチは池や林などに囲まれているために明確な境界線が確認でき、各生息パッチにはサイズや生息環境の質に差がある。本種は、アザミ類などの食草が生育する湿地や休耕田などを生息パッチとして、世代ごとにパッチ間を移動しながら個体群を維持していることがフィールド観察で確認されている。

ヒョウモンモドキは1-4齢幼虫の間、卵塊ごとのグループ同士で集まり、糸で周辺の葉を括り、巣を形成(幼虫巣)し、その卵塊ごとのグループで集団行動を取っている。絶滅が危惧される広島個体群では、局所的な生息パッチの消滅や新たなパッチへの移住が見られ、小規模だが典型的なメタ個体群を構成していると考えられている。

最後の生息地となった広島では、地域住民・保護団体・自治体が連携して、生息環境の整備、飼育繁殖、繁殖個体の野外への再導入などの保護活動が行われている。しかし、生息パッチの復元や再導入が、個体群に及ぼす中・長期的影響については明らかでなく、継続的な調査・研究が求められている。

2. 研究の目的

日本チョウ類保全協会は、2002~2004年までの3年間に生息地で確認されたヒョウモンモドキの全ての幼虫巣から数個体ずつサンプルを採取して、アルコール保存した。このサンプルは単一個体群の三世代にわたる繁殖状況を網羅的に把握することができる貴重な研究材料となっている。そこで、本研究ではこのサンプルと、その後に現地で飼育繁殖が行われている個体群から得たサンプル

をもとに、ヒョウモンモドキのメタ個体群の時空間的変動を明らかにすることを目的とした。ヒョウモンモドキではメタ個体群の遺伝的多様性の変動や、生息パッチ間の gene flow を把握するための遺伝マーカーがないという問題があったので、本研究ではまず、遺伝マーカーの新規開発を行うこととした。

3. 研究の方法

2003年広島県野生集団及び2013年広島県飼育集団(ハウスサンプル)から採取した幼虫96個体をサンプルとした。DNAの抽出にはDNA Extractor FM Kit(和光純薬工業)を用いた。まず、ヒョウモンモドキのDNAのみを抽出するために実体顕微鏡を用いて幼虫の消化管から内容物をピンセットで取り除いた。その後、RADseq法で部分ゲノムデータを取得して、一塩基多型(SNP)の領域を探索した。Radseq法は次世代シーケンサーを用い、ゲノム未決定種において大量にSNP(1塩基多型)を所得することが出来る方法である。初めに各個体ゲノムを制限酵素により処理し大量の断片を作る。その後、その断片にタグとなる塩基配列を接合し個体ごとに識別できるようにし、タグを付けたDNAをすべてプールして、DNA複製をおこないライブラリーを作成する。このライブラリーを用いて次世代シーケンサーでDNA断片の塩基配列を決定する。

Radseq法によって得られたSNPデータの中にはヒョウモンモドキのものでは無く胃の内容物のDNAが混ざっている可能性がある。そこでSNPが得られた領域(record)を、近縁種であり全ゲノムデータが公開されている *Melitaea cinxia* との相同性をNCBIのBLAST検索によって確かめることでデータの選別を行った。

RADseq解析と並行して、データベース情報をもとにミトコンドリアDNAマーカーと系統的に保存されているSNPマーカーの新規開発を行った。

開発された遺伝マーカーを使用して、最尤法と最節約法にもとづく分子系統解析、ベイズ法による集団構造解析、地理・遺伝的距離の相関解析、血縁解析を行った。

4. 研究成果

1) ゲノム情報の取得

抽出したDNAの蛍光定量を行い、DNA濃度を測定した。その結果、野外サンプルにおいてもハウスサンプルと同等程度のDNA量が得られた。しかし、アガロースゲル電気泳動でサイズを調べたところ、野外サンプルは断片化が著しいことがわかった。RADseq解析の結果、ハウスサンプルでは配列データ(record)が得られたが、野外集団サンプルはDNAの分解が著しいために2個体を除き配列データ

(record) が得られなかった。record 総数は 42940 個であり、その中で全個体について SNP が得られたのは 3188 record で、平均長は 82bp だった。これらの record について近縁種である *Melitaea cinxia* との相同性を確かめ、High (80%以上)、Medium (60%以上)、Low (60%未満) の 3 段階とそれぞれで一致した塩基長の長さを 80bp 以上、60bp 以上、60bp 未満の 3 段階で評価したところ、80%以上の相同性があり 80bp 以上の長さの record が 1388 個あった。これらの配列は、ヒョウモンモドキ自体に由来するものと判断して、以降の分析に使用した。

野外集団のサンプルについては、長年、常温で保存されてきたために、DNA の断片化が進行しており、次世代シーケンサーによって得られる record 数が極めて少なかった。そのため、野外個体を利用して数世代にわたる gene flow を調査するためには Radseq 法を用いることは出来ないと判断した。そこで、RADseq で得られた SNP 領域について、新たにプライマーを作成して、部分塩基配列の決定を試みたが十分なデータを得ることができなかった。

次の手段として、SNP を検出する別な方法として、鱗翅目タテハチョウ科 3 種の全ゲノムデータから科内の保存性が高い繰り返し配列を探索し、プライマーを作成して多型性を調べた。その結果、変異性が高いマイクロサテライトと SNP を 19 座位、ミトコンドリア DNA の SNP を 2 座位、得た。

2) 集団構造解析

RADseq 等で得られた SNP マーカーを用いて、野外集団サンプルの一部とハウスサンプルを対象とした集団構造解析を行った。5 か所に配置されたハウスで飼育されている集団間の遺伝的分化を調べるためにアサインメントテストを行ったところ、ハウス毎に遺伝子組成が大きく異なり、遺伝的分化が進んでいることが示された(図 1)。さらに、2 か所のハウスでは遺伝的多様性が相対的に低下していることが明らかになった。

一方、野外集団では 2002 年から 2004 年までの 3 世代で、遺伝的変異の分布に地理的な偏りはないことが示された。

さらに、ミトコンドリア DNA のハプロタイプの組成は大きく変化しておらず、世代交代によって生息パッチの数と分布が変化しても、メタ個体群としての遺伝的多様性は維持されていることが明らかになった。一方、飼育集団では、野外集団で見られたハプロタイプのうち 1 種類が確認されなかった。このことは、野外に存在した遺伝的変異が、飼育繁殖では保全されていないことを示している。

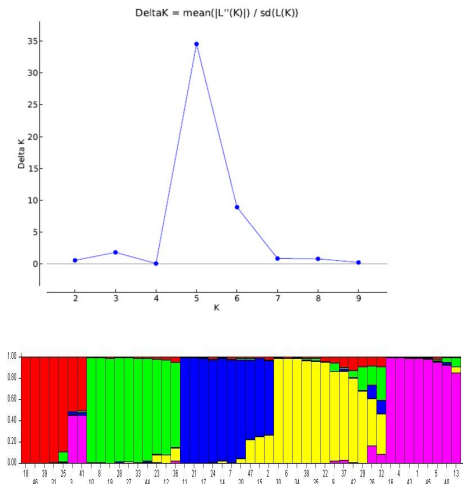


図 1 ハウス集団のアサインメントテストの結果

分集団の数は 5 となった(上図)。各ハウスの個体は、それぞれ異なる分集団(赤、緑、青、黄、桃で示す)に帰属する確率が高く、ハウスごとの遺伝的分化が著しいことが示された(下図)

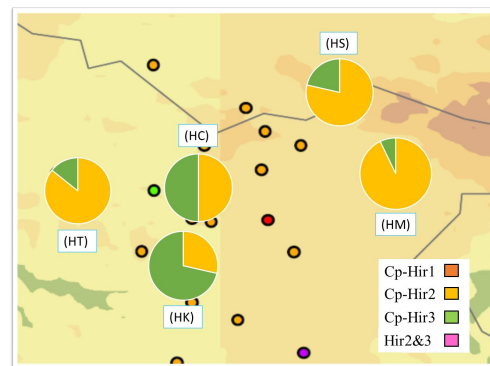


図 2 遺伝的変異の地理的分布

飼育ハウスの地理的位置と各ハウスの遺伝的変異(ミトコンドリア DNA の SNP)の頻度を円グラフで示す。小さい点は野外集団の生息パッチとそこで見られた遺伝的変異を表す。

核遺伝子(SNP)とは異なり、ミトコンドリア DNA ではハウス間で異なる変異は検出されなかったが、ハプロタイプの頻度は大きく異なっていた(図 2)。また、ハウスとハウスの周辺の生息パッチでは、観察されるハプロタイプが必ずしも同じでなかった。

一部の SNP を使用して野外集団の同じ生息パッチ内の個体間血縁度を、同一幼虫巢内、異なる幼虫巢内で比較した。その結果、予想に反して、両者間での有意差はみられなかった。さらに、同一幼虫巢内の個体間血縁度が大きく異なり、同一幼虫巢であっても非血縁個体が同居している可能性が示された(図 3)。以上の結果から、幼虫巢内の個体が必ずしも同一両親由来の血縁集団で形成されるわけではなく、幼虫巢形成は非血縁者との協力によって天敵によるリスクを低減する適応的意義があることが示唆された。

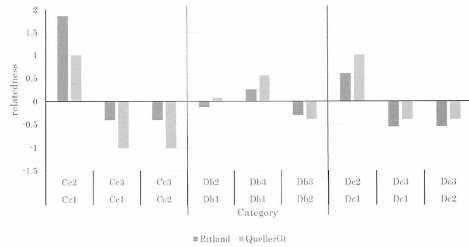


図3 幼虫巢内の個体間血縁度の比較

生息パッチ内の異なる幼虫巢から各3個体をサンプリングして、個体間の血縁度を Ritland と QuellerGt の指標で測定した。

一方、生息パッチ内の個体間血縁度と、異なる生息パッチに属する個体間の血縁度を比較したところ、異なる生息パッチに属する個体間の血縁度が有意に高かった。さらに、生息パッチ間の地理的距離と遺伝的距離には弱い相関がみられ、距離による隔離が生じていることが示された。以上から、繁殖個体の移動距離は短いために、生息パッチ間での gene flow が地理的条件で制限されていることが推察される。

3) 距離による隔離

次に生息パッチ間の gene flow の有無を調べるために、2003年の野外集団サンプルを対象として、6か所の生息パッチの遺伝的多様性を調査した。その結果、アリル多様度とヘテロ接合度については、パッチ間での有意な違いは見られなかったが、特定のパッチ(29A)では遺伝的多様性が他に比べて低い傾向が見られた(図3)。

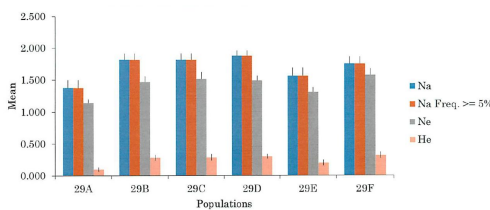


図3 野外集団の生息パッチの遺伝的多様性

Na はアリル数、Ne はサンプル数で標準化したアリル多様度、He はヘテロ接合度期待値。29A ~ 29F はパッチ番号

続いて、パッチ間の遺伝的距離と地理的距離の相関分析を行ったところ、有意な距離による隔離の効果が認められた(図4)。

4) 遺伝的多様性の時間的変化

2003年と2012年の集団の遺伝的多様性を比較した結果、アリル数とヘテロ接合度に有意な違いは見られなかった(図5)

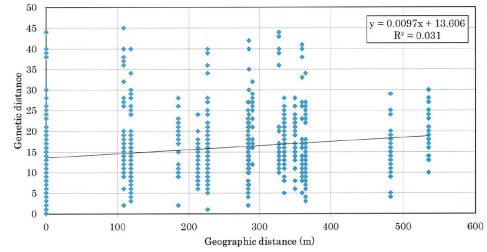


図4 距離による隔離の効果

縦軸はパッチ間の遺伝的距離、横軸は地理的距離(m)、有意な相関(P<0.01)が見られる。

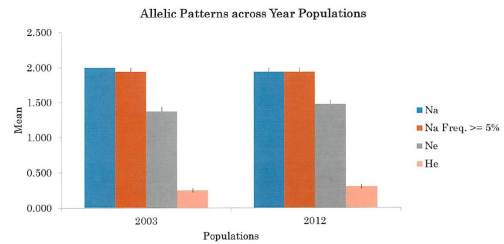


図5 2003年集団と2012年集団の遺伝的多様性比較

5) 自然選択の有無

RAD-seqで得られた1388recordのSNPについてヘテロ接合度の分布を調べたところ、特にヘテロ接合度が高く、正の選択が生じている可能性のある座位が全体の約2%見つかった。

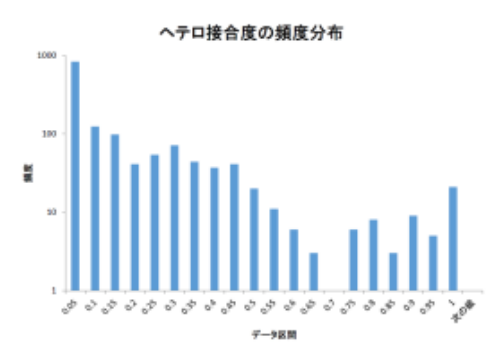


図4 ヘテロ接合度の頻度分布。縦軸は対数目盛で示した出現頻度。横軸はSNPサイトのヘテロ接合度

これらの座位について、鱗翅目のゲノムデータと比較したところ、変異性の高い座位が存在するタンパク質のコード領域が数か所、確認された。これらのタンパク質はボトルネックにおいて変異性が維持される選択が生じた可能性が考えられる。

6) 種の保全に資する成果

本研究で開発したSNP等の遺伝マーカーは、今後、飼育繁殖個体の再導入などで予想されるヒョウモンモドキ個体群の遺伝的多様性

の変化をモニタリングするために活用されることが期待される。一方、本研究で当初の目標とした 2002～2004 年の過去サンプルについては保存状態が悪いため、次世代シーケンサーで網羅的解析を行うために必要となる良質な DNA を得ることができなかった。今後は、LAMP 法など別の手法で解析を進めることを計画している。

ヒョウモンモドキの保全事業では、飼育繁殖が大きな役割を果たしている。本研究の結果から、飼育繁殖個体の野外放蝶では、特定のハウスから大量の個体を導入するよりも、各ハウスから一定数の個体を導入するほうが、野外集団の遺伝的多様性を維持するうえで望ましいと結論づけられた。3 か所の飼育ハウス（K、M、S）では、ある程度の遺伝的多様性が保たれていることが確認できた。しかし、残り 2 か所のハウス（C、T）では多様性がかなり下がっていた。しかし、ハウス間で異なる遺伝的変異が存在することから、ヒョウモンモドキの遺伝的多様性を維持するためには、今後も 5 つのハウスを維持することが望ましいと考えられる。また、野外への再導入にあたっては、野外集団の遺伝的多様性の変化を中・長期的にモニタリングすることが必要で、本研究で開発した遺伝マーカーが役立つものと考えている。

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

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

玉手英利 (TAMATE HIDETOSHI)

山形大学・理学部・教授

研究者番号： 90163675

(2)研究分担者

半澤直人 (HANZAWA NAOTO)

山形大学・理学部・教授

研究者番号： 40292411

(3)連携研究者

(4)研究協力者