

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770080

研究課題名(和文) 日本列島産トカゲ属の複数交雑帯の比較解析に基づく生殖隔離進化プロセスの研究

研究課題名(英文) A research on evolutionary process of reproductive isolation based on comparative analysis between multiple hybrid zones among lineages of *Plestiodon* of the Japanese main islands

研究代表者

岡本 卓 (Okamoto, Taku)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80554815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本列島には、3種4系統のトカゲ属(*Plestiodon*, トカゲ科, 爬虫綱)が側所的に分布し、4箇所に接触帯を持つ。これらのうち未記載種だったものを新種として記載し、八丈島における外来・在来個体群の分布と交雑の状況を明らかにした。また、分子系統解析により各系統が約600～200万年前に分岐したと推定された。そして、新たに開発したマイクロサテライトマーカーと既知の遺伝子マーカーを使用した集団遺伝学的解析により、交雑帯によって遺伝構造が異なることが示された。これは、交雑帯の形成に関わる歴史の違いを反映した生殖隔離機構・強度の違いによるものと推測される。

研究成果の概要(英文)：Totally, four genetic lineages of three species of *Plestiodon* (Scincidae, Reptilia) occur in Japan mainland with parapatric distributions. At first, *P. finitimus* was described as a new species, and distribution and hybridization of native and non-native populations on Hachijojima Island were clarified. Next, molecular phylogenetic analyses suggested divergences of these lineages occurred in 6 to 2 MYA. Then, different genetic structure of the contact zones between these lineages were clarified by population genetic analyses using newly developed microsatellite markers in addition to known DNA markers. The differences in genetic structures could be interpreted as a results of differences in degree and mechanisms of reproductive isolation, reflecting differences among historical background of the contact zones.

研究分野：系統地理学

キーワード：交雑帯 集団遺伝学 系統地理学 生殖隔離 爬虫類

1. 研究開始当初の背景

生物多様性の主要な要素の一つである種多様性は、種分化によって形成される。種分化の主要な要素は生殖隔離の進化であり、そのプロセスの解明は、種多様性の成立・維持機構の理解に必須のテーマである。近縁種の二次的接触により生じる交雑帯は、生殖隔離が不完全であることにより形成されるため、種分化の途中段階が野外で観察できる「天然の実験室」として好適な題材として古くから注目されてきた。様々な生物の交雑帯の研究から、生殖隔離の強度や機構における多様性が明らかにされており、それは交雑帯の集団遺伝構造などに反映されると考えられている。よって、生殖隔離の進化の研究において、異なる交雑帯間における集団遺伝構造の比較研究が重要な役割を果たす。

しかし、異なる分類群の交雑帯を比較すると、交雑帯の性質に影響を与える種々のパラメータ（個体の移動性、世代時間など）に違いが多く、定量的な比較は困難である。そのため、種分化・生殖隔離の研究の多くは、少数の隔離機構に着目し、やや単純化された定性的議論に偏っていた。一方で、現実の種分化の大多数においては、不完全な生殖隔離機構が多数蓄積することにより成立していると考えられている。そのような多数の隔離機構の総体は一足飛びに獲得されるものではなく、長い時間をかけて漸進的に蓄積・強化されるものと考えられる。よって、現実的な種分化の理解のためには、ある特定の隔離機構の定性的な解析だけでなく、総体的な生殖隔離の強度と他の要因の関連を考慮した定量的な比較研究が必要となる。このような研究のためには、成因・遺伝構造が互いに異なる複数の交雑帯が近縁群内で複数独立に形成されており、かつ交雑帯を形成している系統間で生殖隔離に関わる形質以外の違いが少ない、という条件を満たすような題材が理想的である。それらについて、生殖隔離の強度を定量的に評価し、隔離機構・分岐年代・交雑帯の形成年代などとの関連を、複数の交雑帯の間で比較するというアプローチが有効と考えられる。

日本列島のトカゲ属 (*Plestiodon*, トカゲ科, 爬虫綱) は、日本列島内で側所的に分布する近縁な 3 種 4 系統を含み (伊豆半島: オカダトカゲ, 東日本: ヒガシニホントカゲ (研究開始当初は未記載種) 東北日本系統, 中部日本: ヒガシニホントカゲ中部系統, 西日本: ニホントカゲ), それらの間の 3 箇所 (伊豆半島周辺・中部地方・近畿地方) に遺伝構造の異なる自然交雑帯が形成されていることが、我々の研究によって明らかになっている。また、伊豆諸島八丈島においてオカダトカゲ自然個体群とニホントカゲ人為移入個体群の間にも交雑が生じている可能性が示唆されている。これらは生態的・形態的に酷似し、一方で各交雑帯の間で成因や遺伝構造に違いが見られる。よって、上で論じたよう

な交雑帯の詳細な比較研究には、好適な題材と考えられる。このような研究に先立ち、未記載種ヒガシニホントカゲの分類学的記載、八丈島の在来・外来両種個体群の分布と交雑状況の解明を、予め行う必要もある。

2. 研究の目的

日本列島のトカゲ属に含まれる 4 系統間の 4 箇所の交雑帯について、系統間の遺伝子流動速度などの集団遺伝構造を明らかにし、遺伝構造に影響を与える可能性のある要因 (各系統間の分岐年代・交雑帯の形成年代・隔離機構など) の推定を行い、これらの要因と遺伝構造の関連に基づいて生殖隔離の進化プロセスについて考察することを目的とした。このために必要な高精度 DNA マーカーとして、種間交雑の解析に利用可能なマイクロサテライト遺伝子座の探索も行う。また、開始時点で未記載種だったヒガシニホントカゲの分類学的記載、島内の詳細な分布など基礎情報の不足していた八丈島の交雑状況の解明も早期に行う。

3. 研究の方法

当初未記載種だったヒガシニホントカゲを新種として記載する。その際、日本列島全域にわたる約 40 地点で採集された数百点の標本の形態学的解析、および数十点の標本の DNA 解析に基づき、側所的に分布するこれら 3 種の識別形質を明らかにする。また、八丈島のオカダトカゲ在来個体群・ニホントカゲ外来個体群の島内分布と交雑状況については、形態形質および既知の遺伝子マーカーに基づいて明らかにする。

詳細な集団遺伝構造の解明のための高精度遺伝子マーカーとして、マイクロサテライト遺伝子座の探索とマーカーとしての確立を行う。これは、ヒガシニホントカゲのゲノム DNA を対象とし、次世代シーケンサーによるホールゲノムショットガンシーケンシングを行い、そのリードデータの中から、PCR プライマーの設計が可能なマイクロサテライト遺伝子座を探索するという手順で遂行する。

各交雑帯における集団遺伝構造の解明のため、各交雑帯とその周辺地域における集中的な標本採集を行い、その標本を対象として、マイクロサテライトおよび既知の DNA マーカーを用いた遺伝解析を行う。また、交雑帯の遺伝構造に影響を与える可能性のある要因として、各系統の分岐年代と二次的接触の生じた年代の推定も可能な限り行う。ヒガシニホントカゲ・ニホントカゲが単系統群であり、オカダトカゲと約 600 万年前に分岐した姉妹群であることは、先行研究によりすでに明らかにされている (Brandley et al. 2011, 2012)。本研究では、ヒガシニホントカゲ種内 2 系統とニホントカゲについて、より詳細な分子系統解析を行う。これは、交雑帯周辺の標本を含む多数地点多数個体を対象とし

た分子系統解析により遂行する。

最後に、生殖隔離強度と分岐年代、生殖隔離強度と交雑帯の形成年代の関連を、交雑帯間の比較により解明を試みる。これらの関連性に基づいて、生殖隔離の進化プロセスを考察する。

4. 研究成果

当初未記載種だったヒガシニホントカゲを、*Plestiodon finitimus* Okamoto et Hikida, 2012 として記載した。また、本種とニホントカゲ・オカダトカゲが、いくつかの形態形質および DNA バーコードによってほぼ識別可能であることを明らかにし、ニホントカゲ・オカダトカゲの再定義も行った。加えて、極東ロシア沿岸部の個体群が、ヒガシニホントカゲに属することも明らかにした。

八丈島のトカゲについては、ニホントカゲ外来個体群は島の北東部のみに、一方でオカダトカゲ在来個体群は島西部一帯に、その中間に位置する島北部・中部には交雑集団が分布することを明らかにした。これは、八丈島においてこれら 2 種が交雑帯を介した側所的分布を形成しつつあることを意味する。また、環境省レッドデータブックで絶滅のおそれのある地域個体群とされている八丈島のオカダトカゲが、従来考えられていたより広く分布していたこと、一方でニホントカゲ外来個体群との交雑という新たなリスクが生じつつあることも示している。尚、これは環境省が 2014 年に発表した改訂版レッドデータブック、2015 年に発表した「生態系被害防止外来種リスト」にも反映されている。

ミトコンドリア DNA の 3 遺伝子座約 1,800 塩基のデータに基づく分子系統解析により、ヒガシニホントカゲ・ニホントカゲの種内および種間変異を明らかにし、ヒガシニホントカゲ・ニホントカゲの分岐が約 400 万年前、ヒガシニホントカゲ種内の 2 系統の分岐が約 200 万年前、ヒガシニホントカゲ 2 系統の二次的接触が約 30 万年前に生じたという推定結果を得た。また、東北～北海道のヒガシニホントカゲの遺伝的・形態的変異パターンから、第四紀の気候変動によって東北・北海道の大部分の地域で絶滅し、後氷期に再侵入したことで現在の分布・変異パターンが成立した可能性が示唆された。

ヒガシニホントカゲを対象に次世代シーケンサーを用いたホールゲノムショットガンシーケンシングを行った結果、約 61,000 リード 2,100 万塩基のデータを得た。これは、本種の全ゲノム（近縁種のゲノムサイズから、半数体ゲノムサイズは約 26 億塩基と推定される）の 1%弱と考えられる。このデータから、約 7000 のマイクロサテライトの可能性のある領域（2～6 塩基モチーフの反復配列）が特定され、このうち約 2,700 が PCR プライマー設計可能な潜在的マーカー領域として特定された。潜在的マーカー領域のうち 37 領域についてプライマーを作成し、ヒガシニホ

トカゲ個体群について PCR テストを行った結果、27 領域で増幅が確認され、18 領域で多型が認められた。また、各潜在的マーカーについて、オカダトカゲ、ニホントカゲでの PCR テストを行った結果、ヒガシニホントカゲとは異なる結果が得られた。各種内に多型の見られない領域において種間変異が認められる遺伝子座なども含め、各交雑帯について 20 領域前後を、交雑帯の遺伝構造を明らかにするための DNA マーカー候補として特定した。

既知の遺伝子マーカーおよび上記のマイクロサテライトマーカーを利用し、各交雑帯における遺伝子流動の速度・方向性について、現在解析を進めている。約 70 万年前から交雑帯が維持されていると考えられる伊豆半島周辺交雑帯（オカダトカゲ vs ヒガシニホントカゲ）では、交雑帯各地の遺伝的組成から、種間交雑が比較的制限されていることが示唆された。一方、ごく最近形成されたと考えられる八丈島交雑帯（オカダトカゲ vs ニホントカゲ）では、比較的遺伝的交流が活発であり、ニホントカゲ・オカダトカゲという方向にやや偏った非対称的な遺伝子流動が示唆された。この違いは、生殖隔離の機構・強度の違いに起因するものと考えられる。これらの交雑帯に關与する系統間の分岐年代がほぼ同じ（約 600 万年前）であることから、生殖隔離の機構・強度の違いは、交雑帯の形成年代の違いが影響している可能性がある。すなわち、交雑個体の適応度が何らかの理由で下がり、生殖隔離（特に接合前生殖隔離）が強くなる方向に選択圧がかかる（いわゆる強化）が生じる結果、より古い交雑帯においてより強い生殖隔離がみられているという可能性を示唆する。今後、より多くの遺伝マーカーを使用してより詳細な遺伝構造を解明するとともに、他の交雑帯との比較を通じて、生殖隔離の進化プロセスの一端が明らかになると予想される。

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 2 件)

Okamoto T, Kuriyama T, Goka K (2013) An impact assessment of the alien lizard *Plestiodon japonicus* (Scincidae, Reptilia) on a threatened island population of the native lizard *P. latiscutatus* at an early phase of the biological invasion. *Biological Invasions* 査読有, 15(9), pp. 2029-2037 DOI: 10.1007/s10530-013-0429-8
Okamoto T, Hikida T (2012) A new cryptic species allied to *Plestiodon japonicus* (Peters, 1864) (Squamata: Scincidae) from eastern Japan, and diagnoses of the new species and two parapatric congeners based on

morphology and DNA barcode. *Zootaxa*
査読有, 3436, pp. 1-23
[http://www.mapress.com/zootaxa/2012/
f/z03436p023f.pdf](http://www.mapress.com/zootaxa/2012/f/z03436p023f.pdf)

〔学会発表〕(計 8 件)

Okamoto T, Kuriyama T, and Hikida, T
(2014) Genetic variation and historical
biogeography of *Plestiodon finitimus*
(Scincidae, Squamata) in northern part
of the Japanese main islands. 4th
International Symposium on Asian
Vertebrate Species Diversity (査読あり.
Institute of Biological Sciences, Faculty
of Science, University of Malaya.
2014/12/18-20. ポスター発表)

岡本 卓・栗山武夫・疋田 努 (2014) 北
日本のヒガシニホントカゲ(トカゲ科,
爬虫綱)の地理的変異と歴史生物地理.
日本爬虫両棲類学会 第 53 回大会(査読
なし. 神戸山手大学. 2014/11/8-9. 口頭
発表)

岡本 卓・栗田和紀・早野あづさ・村山美
穂(2013) ホールゲノムショットガンシ
ーケンシングを用いたヒガシニホントカ
ゲ・オキナワトカゲ(トカゲ科, 有鱗目)
のマイクロサテライトマーカー開発. 日
本爬虫両棲類学会 第 52 回大会(査読な
し. 東海大学札幌キャンパス.
2013/11/2-3. 口頭発表)

Okamoto T and Hikida T (2013) A
cryptic species of Japanese skink of the
genus *Plestiodon* (Scincidae,
Squamata) and its contact zones with
closely related species. 3rd
International Symposium on East
Asian Vertebrate Species Diversity (査
読あり. Vietnam Academy of Science and
Technology, Hanoi, Vietnam.
2013/9/13-14. 口頭発表)

岡本 卓・疋田 努 (2013) 日本列島に分
布するトカゲ属 (*Plestiodon*, 爬虫綱
有鱗目) の分類学的再検討, 分布, 識別
形質. 日本動物分類学会 第 49 回大会(査
読なし. 宮城教育大学. 2012/6/8-9. ポ
スター発表)

岡本 卓・疋田 努 (2013) ニホントカ
ゲ・ヒガシニホントカゲの地理的変異と
歴史生物地理.(査読なし. 日本生物地理
学会 第 68 回大会. 立教大学.
2012/4/13-14. 口頭発表)

岡本 卓・栗山武夫・五箇公一 (2012) 八
丈島における外来種ニホントカゲとの交
雑による在来種オカダトカゲの絶滅リス
ク評価.(査読なし. 日本動物学会 第 83
回大会. 大阪大学豊中キャンパス.
2012/9/13-15. 口頭発表)

Okamoto T and Hikida T (2012) Recent
taxonomic changes of the common
skinks of genus *Plestiodon* on the

Japanese main islands, the Izu Islands,
and far eastern Russia. (査読あり. the
7th World Congress of Herpetology.
British Columbia University, Canada.
2012/08/09-13. 口頭発表)

〔図書〕(計 件)

〔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:
出願年月日:
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

岡本 卓 (OKAMOTO, Taku)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号: 24770080