

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25840145

研究課題名(和文) 種間交雑が可能なタナゴ亜科魚類2種を用いた種分化の遺伝的メカニズムの解明

研究課題名(英文) Genetic mechanisms of speciation in two closely related bitterling fishes

研究代表者

橋口 康之 (HASHIGUCHI, Yasuyuki)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：70436517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：コイ科の小型魚類であるヤリタナゴとアブラボテは生殖隔離が不完全であり、野外で雑種が頻りに観察される。2種の種分化の機構を明らかにするため、系統解析および遺伝的解析を行った。RNA-Seqによる系統解析の結果、複数の遺伝子が過去の種間交雑の影響を受けていることが示唆された。SNPマーカーによる雑種判別から、地域集団ごとに種間交雑の生じる頻度が異なることがわかった。また人工授精により2種間のF2雑種を作成した。現在これらのF2をもとに連鎖地図の作成を進めている。

研究成果の概要(英文)：Reproductive isolation of two closely related bitterlings *Tanakia lanceolata* and *T. limbata*, small cyprinid fishes, is known to be incomplete and their hybrids are frequently observed in the wild. To understand the speciation mechanisms of these fishes, phylogenetic and evolutionary analyses were carried out. Phylogenetic analysis by RNA-Seq data suggested that many genes were affected by past hybridization events in these species. Hybrid discrimination analysis using divergent genetic markers showed that frequency of hybridization is highly different among regional populations. F2 hybrids of *T. lanceolata* and *T. limbata* have been generated by artificial fertilization. Construction of a linkage map in these F2 hybrids is now in progress.

研究分野：進化生物学

キーワード：魚類 タナゴ亜科 進化 種分化 生殖隔離 RNA-Seq ゲノム解析

## 1. 研究開始当初の背景

すべての生物種は、単一の共通祖先が種分岐を繰り返すことで生じてきたため、生物進化を考える上で、種分化メカニズムの解明はきわめて重要である。

異所的種分化において、交配前隔離の進化に自然選択がどの程度寄与しているのか、またどのような形質の変異が、生殖隔離の進化を促すのかといった問題は、様々な近縁種の系を用いて研究が進められているものの、まだ明確な結論は出されていない。そこで本研究では、西日本に同所的に広く分布するコイ科の淡水魚であるヤリタナゴ *Tanakia lanceolata* とアブラボテ *T. limbata* の2種を対象にして、交配前隔離の進化におけるこれらの問題にアプローチしたいと考え、研究を開始した。本研究の材料であるヤリタナゴとアブラボテは、種分化の研究を進める上で、以下のような興味深い特徴を備えている。

・ヤリタナゴ-アブラボテ間に生殖隔離は存在するが、不完全である

基本的に2種は自然界では別種として存在しており、生殖隔離が成立していると考えられる。しかし人工的に交雑すると生殖能力のあるF1, F2雑種を得ることが可能である (Kawamura and Hosoya 2000)。

・2種は形態的・遺伝的に大きく異なる

形態的特徴は、体色や体型など2種間で明確に違いがある。またミトコンドリアDNA解析から、2種間の分岐年代は1,000万年前後と推定されている (Hashiguchi et al. 2006)。

・2種は野外でしばしば交雑する

形態的・遺伝的な違いの大きさにも関わらず、2種の交雑個体は場所によってはかなり高頻度 (> 10%) 見つかる (Hashiguchi et al. 2006)。2種は繁殖基質の二枚貝を共有しており (Kitamura 2007)、またタナゴ類においては、二枚貝を介した多様なオスの繁殖戦略が見られることから (Kanoh 1996)、タナゴ類の生殖隔離には貝産卵が関係する可能性が高く、その点でも興味深い。

ヤリタナゴとアブラボテの間に見られるこれらの性質は、2種が種分化の途上にあることを示唆しており、2種は生殖隔離の進化を研究する上で良いモデル系となることが期待される。しかし、研究開始時点において、これら2種の自然集団における種間交雑の遺伝的実態は不明であった。また、2種は非モデル生物であり、連鎖地図やドラフトゲノムなど、遺伝学的研究を行う上での基盤をまずは確立する必要があった。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヤリタナゴとアブラボテの交配前隔離の進化における自然選択の役割を、遺伝子レベルで解明することを目的に、以下の2点について研究を行った。

(1) 2種間の交配前隔離に関係する可能性がある種差の遺伝的基盤の特定

2種の交雑実験に基づく遺伝学的な解析 (QTL マッピングおよび遺伝子発現解析) を行い、繁殖や食性などに関わる形質の種差に関わる遺伝的変異の同定を目指す。

(2) 野外集団で2種間に生殖隔離が成立する条件の解明

複数の生息場所で2種の交雑が起こる頻度を、遺伝マーカーを用いて推定し、雑種のできやすさと相関を示す環境的・生物的要因を特定する。

## 3. 研究の方法

(1)-1. ヤリタナゴ-アブラボテの人工授精

2013年から2016年にかけて、2種の繁殖期である4-6月に福岡県柳川市の調査地で採集したヤリタナゴ、アブラボテを用いて人工授精を行った。同種間及び異種間 (雌雄逆の2通り) について、3-7組で人工授精を行い、孵化率・浮上までの生存率を測定した。

(1)-2. ヤリタナゴ-アブラボテ種間交雑第2世代 (F2) の作成

ヤリタナゴ (メス) とアブラボテ (オス) を人工授精して作成したF1雑種 (福岡県柳川市由来, 2013, 2014年) の雌雄複数個体で人工授精を行い、F2雑種を作成した。

(1)-3. RAD-Seqによる連鎖解析用SNPマーカーの作成

2014年度に作成したF2雑種88個体及び親種各1個体、F1雑種6個体について、RAD-Seq (Baird et al. 2008) により連鎖解析用のSNPマーカーの作成を試みた。

(1)-4. ヤリタナゴ・アブラボテ地域個体間の分子系統解析

2種が同所的に生息する西日本の4河川 (福岡、島根、愛媛、京都) で採集したヤリタナゴ・アブラボテ各1個体の脳からRNAを抽出し、Illumina MiSeqを用いてRNA-Seqを行った。また、別属のタナゴ類4種も、外群として使用した。

(2)-1. SNPマーカーを用いたヤリタナゴ・アブラボテ野外集団における交雑頻度の解析

RNA-Seqデータをもとに作成した6種の種判別SNPマーカーを用いて、西日本の11河川におけるヤリタナゴ・アブラボテの交雑頻度の推定及び交雑個体の雑種判別を行った。

(2)-2. アブラボテのドラフトゲノム解読

2015年に福岡県柳川市で採集したアブラボテのオス1個体について、ドラフトゲノム配列の解読を試みた。配列決定はHiSeq X Ten (125 bp paired end, データ量は約100 Gb) で行い、得られたデータをもとにPlatanus (Kajitani et al. 2014) で de novo assemble 及び scaffolding, gap closing を行った。

## 4. 研究成果

(1)-1. ヤリタナゴ-アブラボテの人工授精

2014-2016年に福岡県柳川市の水路で採集したヤリタナゴ、アブラボテについて、種内及び種間で人工授精を行い、孵化率及び仔魚の浮上までの生存率を測定した。その結果、

ヤリタナゴと比較してアブラボテの孵化・生存率が低いこと、2 種間の雑種では雌雄どちらの組み合わせでも、孵化・生存率はそれらの中間となることが明らかになった (図 1)。

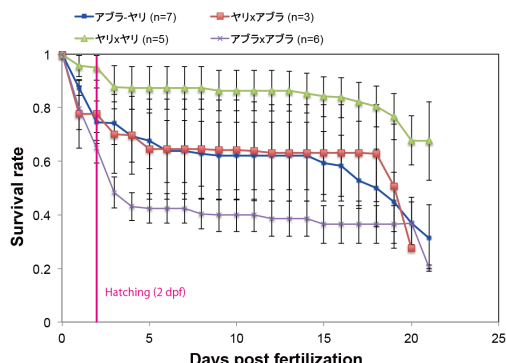


図 1. ヤリタナゴ、アブラボテ及び種間雑種(ヤリタナゴ × アブラボテ 及びアブラボテ × ヤリタナゴ)の孵化率、生存率

また、ヤリタナゴ(メス)とアブラボテ(オス)に由来する F1 雑種同士の交配において得られた F2 の受精卵・仔魚では、孵化率 92.2%, 受精後 19 日目の生存率 56.5%であり、F1 の孵化率・生存率とほぼ同等であった。

#### (1)-2. ヤリタナゴ-アブラボテ F2 の作出

2013 年 4 月に採集したヤリタナゴ(メス)とアブラボテ(オス)の人工授精で作出した F1 雑種 11 個体をもとに、F2 雑種 88 個体を得た(2014-F2)。また、2014 年 4 月に採集したヤリタナゴ(メス)とアブラボテ(オス)の F1 雑種をもとに、F2 雑種 77 個体を得た(2015-F2)。いずれの家系についても、鰭からゲノム DNA を抽出し、また各個体はホルマリンで固定後、70%エタノールの液浸標本として保存している。

#### (1)-3. RAD-Seq

連鎖地図作成及び QTL マッピングに用いる多型(SNP + INDEL)マーカーを得るため、2014-F2 の 88 個体及び柳川のヤリタナゴ・アブラボテ各 1 個体、F1 雑種 6 個体の計 96 個体について、RAD-Seq を実施した。各個体は 2 通りのアダプター配列(24 x 4 = 96 通り)で区別した。制限酵素には SbfI を使用し、作成した RAD ライブラリを Illumina HiSeq 2500 の 50 bp single end で配列を決定した。STACKS

(<http://catchenlab.life.illinois.edu/stacks/>)を用いて個体毎のデータを分離したところ、個体あたりのリード数は 16.4-78.2 万程度(平均: 498,194)であった。この結果をもとにアブラボテのドラフトゲノム配列(後述)をリファレンスにして、88 個体すべての F2 個体に共有される多型を探索したところ、そのような多型は全く得られなかった。そこで、リード数が少ない個体(< 300,000)のデータを除いた 81 個体で再度解析を行ったが、それでも全個体に共有される多型はわずか 4 個であった。このように F2 個体間に共有される多型

が非常に少なかった 1 つの原因として、2 種の遺伝的差異が大きいために、制限酵素の認識サイトに頻繁に変異が生じてしまっていることが推察される。しかし今回の解析において、親種のヤリタナゴ・アブラボテ各 1 個体の間には十分な数の(5,060, SNPs + INDELS)多型が見つかったことから、上記の可能性は低いと考えられる。別の要因として、単に個体あたりのリード数が少ない可能性もある。今後はさらに多くのリードを読んで解析に加えることで、得られる多型の数が改善する可能性を探る予定である。また、多型を抽出する際のデータ解析の手法も最適化する必要があると考えている。

#### (1)-4. ヤリタナゴ・アブラボテ地域個体間の分子系統解析

RNA-Seq により得られた 6,832 の contig (合計 6,411,313 bp) を用いて分子系統解析を行い、ヤリタナゴ・アブラボテそれぞれの地域個体間の分岐を明らかにした(図 2)。また、contig ごとで系統樹を作成し、2 種の種間交雑の影響を受けた可能性の高い遺伝子を特定した。その中には、いくつかの異なる peptidylprolyl isomerase 遺伝子や、複数のプロテアソームサブユニット遺伝子などが含まれていた。

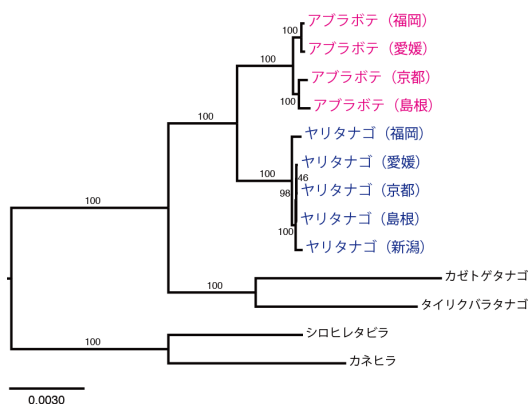


図 2. ヤリタナゴ、アブラボテ地域個体間の系統樹

#### (2)-1. SNP マーカーを用いた 2 種の野外集団における交雑頻度の解析

解析結果の一部を図 3(次頁)に示す。ヤリタナゴ・アブラボテの 2 種では、地域集団ごとに交雑頻度が大きく異なっていた。九州の集団では比較的高い頻度で交雑が確認された一方で、岡山や京都の集団では交雑は確認されなかった。また形態的に判別される自然雑種個体では、その多くが F1 雑種であった。交雑の痕跡がみられる個体では、形態的にはアブラボテの個体がヤリタナゴの遺伝子型を示すケースが多く、このことは野外集団において F1 雑種はアブラボテと戻し交配をする、つまりアブラボテの繁殖集団に吸収されることを示唆していると考えられた。今後は RAD-Seq などでマーカー数を増やし、種間交雑の実態のさらなる解明を目指す。

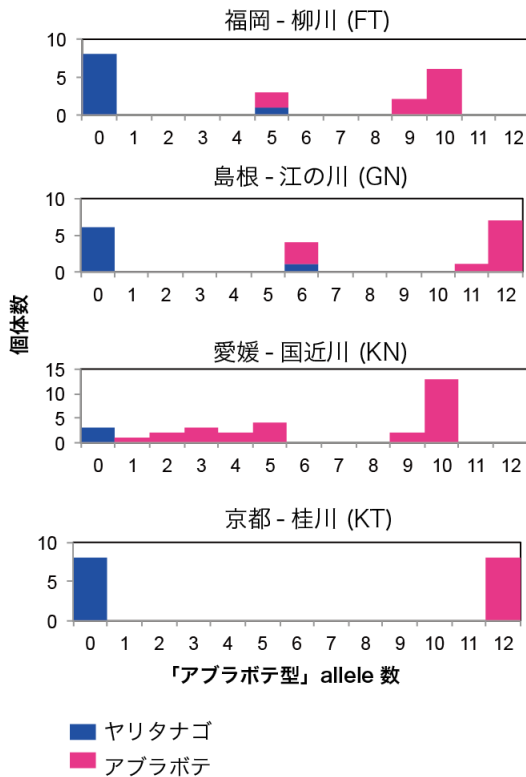


図 3. ヤリタナゴ-アブラボテの同所的な 4 地域集団における種間交雑の状態。横軸は「アブラボテ型」SNP allele の個数 (0-12)、縦軸は個体数を示す。グラフの色は、mtDNA の haplotype がどちらの種由来かを示す。

#### (2)-2. アブラボテのドラフトゲノム解読

得られたアブラボテのドラフトゲノム配列についてアセンブルを行ったところ、全塩基数は約 677 Mb、scaffold の数は 57,975、N50 は 30,005 bp であった。ドラフトゲノム解析については、現在まだソフトウェアの条件を検討中であり、今後さらに解析を進める予定である。

#### < 引用文献 >

- Baird NA et al. (2008) Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. **PLoS One** 3: e3376.
- Hashiguchi Y, Kado T, Kimura S, Tachida H (2006) Comparative phylogeography of two bitterlings, *Tanakia lanceolata* and *T. limbata* (Teleostei, Cyprinidae) in Kyushu and adjacent districts of western Japan, based on mitochondrial DNA analysis. **Zool. Sci.** 23: 309-312.
- Kajitani R et al. (2014) Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. **Genome Res.** 24: 1384-1395.
- Kanoh Y (1996) Pre-oviposition ejaculation in externally fertilizing fish: how sneaker male rose bitterlings contrive to mate. **Ethology** 102: 883-899.
- Kawamura K and Hosoya K (2000)

Masculinization mechanism of hybrids in bitterlings (Teleostei: Cyprinidae). **J. Hered.** 91: 464-473.

Kitamura J (2007) Reproductive ecology and host utilization of four sympatric bitterling (Acheilognathinae, Cyprinidae) in a lowland reach of the Harai River in Mie, Japan. **Env. Biol. Fish.** 78: 37-55.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Kun Chen, Yuki Tsutsumi, Shuhei Yoshitake, Xuchun Qiu, Hai Xu, Yasuyuki Hashiguchi, Masato Honda, Kosuke Tashiro, Kei Nakayama, Takeshi Hano, Nobuo Suzuki, Kazuichi Hayakawa, Yohei Shimasaki, Yuji Oshima. 2017. Alteration of development and gene expression induced by in ovo-nano-injection of 3-hydroxybenzo[c]phenanthrene into Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos. **Aquatic Toxicology** 182: 194-204. [査読有]
2. Hirohiko Takeshima, Kei'ichiro Iguchi, Yasuyuki Hashiguchi, Mutsumi Nishida. 2016. Using dense locality sampling resolves the subtle genetic population structure of the dispersive fish species *Plecoglossus altivelis*. **Molecular Ecology** 25: 3048-3064. [査読有]
3. Yasuyuki Hashiguchi, Jae Man Lee, Makoto Shiraishi, Shoji Komatsu, Shizuho Miki, Yohei Shimasaki, Noritaka Mochioka, Takahiro Kusakabe, Yuji Oshima. 2015. Characterization and evolutionary analysis of tributyltin-binding protein and pufferfish saxitoxin and tetrodotoxin binding protein genes in toxic and non-toxic pufferfishes. **Journal of Evolutionary Biology** 28: 1103-1118. [査読有]
4. Yoshinori Kumazawa, Saaya Miura, Chiemi Yamada, Yasuyuki Hashiguchi. 2014. Gene rearrangements in gekkonid mitochondrial genomes with shuffling, loss, and reassignment of tRNA genes. **BMC Genomics** 15: 930. [査読有]
5. 橋口康之・熊澤慶伯. 2013. 脊椎動物嗅覚受容体遺伝子ファミリーの進化研究における次世代シーケンサーの活用. **生物科学** 64(3): 131-140.

[学会発表] (計 3 件)

1. 橋口康之・中島 淳. ヤリタナゴ-アブラボテ交雑個体の遺伝的特徴と、種間交雑が各種のゲノムに与える非対称な影響. 平成 27 年度 第 48 回日本魚類学会, 近畿大学 (奈良キャンパス), 2015 年 9 月 6 日.
2. 橋口康之. RNA-Seq データによるタナゴ亜科魚類の分子系統解析: *Tanakia* 属 2 種を中心として. 第 16 回日本進化学会, 高槻現代劇場, 2014 年 8 月 21-24 日.

〔図書〕(計1件)

1. Yasuyuki Hashiguchi, 2016. Chapter 4: The origin and evolution of the trace amine-associated receptor family in vertebrates. In **"Trace amines and neurological disorders: potential mechanisms and risk factors (T. Farooqui and AA Farooqui eds.)"**, 45-62. Elsevier, Academic Press.

〔その他〕

ホームページ：<http://hashiyuki.hatenablog.com>

社会活動：

1. 高槻中学・高等学校 進路講演会「遺伝子から探る魚類の進化」2016.11.26
2. 第84回中崎北天満サイエンスカフェ「フグはなぜ毒を持つのか?～身近な魚から考える生物進化～」. 2015. 5.17. 中崎北天満商工倶楽部・北天満ユニオン連携事業.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋口 康之 (HASHIGUCHI, Yasuyuki)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：70436517

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし