

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82617

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650149

研究課題名(和文)ゲノムワイド解析で解き明かす浅海性魚類の系統地理仮説 大東諸島回廊仮説の検証

研究課題名(英文)Gain the insight into the phylogeographical hypothesis of coastal fishes based on genome-wide analysis -Verification of Daito Islands Corridor Hypothesis-

研究代表者

千葉 悟 (CHIBA, Satoru)

独立行政法人国立科学博物館・分子生物多様性研究資料センター・特定非常勤研究員

研究者番号：80599431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は南日本の浅海性魚類相の形成メカニズムを明らかにすることを目的として、「大東諸島回廊仮説」をゲノムワイド解析によって検証しようとするものである。ユウゼンを材料とした次世代シーケンサーによる一塩基多型(SNP)の探索とジェノタイピングをおこなった。その結果、ゲノムの広範囲に分布する2278 SNPsのジェノタイプが決定された。これらのSNPsに基づき遺伝的集団構造を解析したところ、大東諸島と小笠原諸島の間で遺伝的交流の存在が示唆され、仮説が支持された。また、本研究によって生物系統地理における小規模な研究プロジェクトでも実施可能なゲノムワイド解析の基盤が整った。

研究成果の概要(英文)：This study aims to verify a phylogeographical hypothesis of “Daito islands corridor hypothesis” which is a working hypothesis explaining construction mechanism of shallow water ichthyofauna in southern Japan, based on genome wide analyses. We surveyed ichthyofauna around the Daito and Ogasawara islands, and carried out single nucleotide polymorphism (SNP) detection and genotyping on the Wrong-iron butterflyfish by using massive parallel sequencing technologies. 2278 SNPs in the genomes were genotyped. Genetic population structure analyses based on newly identified SNPs revealed presence of gene flow between Daito and Ogasawara islands. This result supports “Daito islands corridor hypothesis”. In addition, we established the efficient procedures conducting genome wide analyses in a small-scale research project for the phylogeographic research.

研究分野：生物系統地理

キーワード：進化 集団 RAD 生物地理 SNP

1. 研究開始当初の背景

(1) 南日本における魚類相の形成

浅海性魚類の多くは生活史の初期に浮遊生活をおくり、海流などで運ばれることで分布拡大や個体群間の交流をおこなう。浅海性魚類相の比較から、南日本の魚類相の形成には黒潮が大きな影響を耐えていることが示唆されている。小笠原諸島と琉球列島の間には 1000km 以上にわたり目立った島がなく、安定した海流もないことから浅海性魚類の交流を妨げる空白の海域として知られている (図 1)。しかし、近年の生物系統地理学的研究によって小笠原諸島と琉球列島の間で浅海性魚類がダイレクトな交流を果たしたことを示唆する結果が得られた。そこで我々は両諸島間に位置する大東諸島に着目し、浅海性魚類において大東諸島が小笠原諸島と琉球列島を結ぶ回廊として機能する「大東諸島回廊仮説」を着想した。

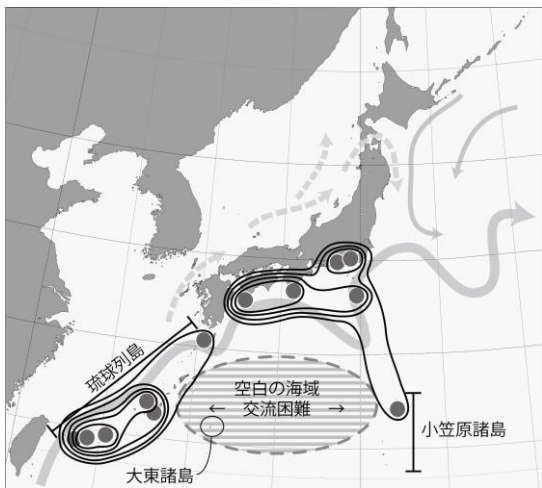


図 1 南日本の魚類相の類似度。黒丸は調査地点，黒囲み線は魚類相の類似関係，灰色の矢印は海流を示す。

(2) ゲノムワイド解析による生物系統地理

ミトコンドリア DNA やマイクロサテライト DNA マーカーを使用した生物系統地理研究は、生物多様性の解明に大きく貢献してきた。しかし、これらの少数の DNA マーカーによる解析は、使用するマーカーの選択によって結果に偏りが生じることがあるため、ゲノムの広範囲から検出した多数マーカーによる解析が理想的である。一方、次世代シーケンサーの普及による大量並列塩基配列決定技術の進歩は著しく、野外から採集された非モデル生物においてもゲノムワイド解析が可能な方法が開発されている。

2. 研究の目的

本研究では、浅海性魚類が小笠原諸島と琉球列島の間で交流する際に、両諸島間に位置する大東諸島が回廊として機能する「大東諸島回廊仮説」を最新のゲノムワイド解析によって検証することにより、小笠原諸島と琉球列島に生息する浅海性魚類の間で生じた交流の歴史を系統地理学的に明らかにする

ことを目的とする。また、当該研究分野におけるゲノムワイド解析の基盤を整備する。

3. 研究の方法

本研究では仮説検証の第一歩として、大東諸島と小笠原諸島の間における浅海魚類の交流の歴史に焦点を当てて下記の研究を実施した。

(1) フィールド調査

大東諸島と小笠原諸島において潜水採集を中心とした調査を実施し、ゲノムワイド解析の候補種として 5 種の採集および魚類相調査を実施した。

(2) ミトコンドリア DNA およびマイクロサテライトマーカーによる解析

ゲノムワイド解析と並行して、ミトコンドリア DNA とマイクロサテライトマーカーによる解析を実施した。マイクロサテライトは研究協力者が開発した魚類棘鱗上目の汎用マーカーを使用した。

(3) ゲノムワイド解析

ゲノムの広範囲から一塩基多型 (SNP) を検出する ddRAD-Sequencing を実施した。

(4) 集団構造解析

集団間の遺伝的分化の有無、遺伝的交流の規模や方向、祖先集団の数と遺伝的組成などを推定した。

4. 研究成果

(1) 2014 年 7 月に大東諸島、2015 年 7 月に小笠原諸島で浅海性魚類の採集及び魚類相の調査をおこなった。その結果、大東諸島から 180 種、小笠原諸島から 146 種の浅海性魚類を標本に基づき記録した。このうち大東諸島から記録した 2 種は日本初記録として和名をつけて学術誌で報告した。ゲノムワイド解析の候補種 5 種のうち、ユウゼンとコガネヤッコの 2 種について両諸島からの採集に成功した。

(2) ユウゼンについて、ミトコンドリア DNA の Cytochrome b 遺伝子領域の塩基配列を決定しマルチプルアライメントの結果 89 個体 1083 塩基対のデータを取得した。マイクロサテライトマーカーは魚類棘鱗上目の汎用マーカーを使用し、89 個体 11 マーカーのジェノタイピングに成功した。ddRAD-Sequencing では、12 種類のインナータグおよび 8 種類のインデックスプライマーによるタグ付加によって 96 個体のマルチプレックスを可能にし、自動 DNA 断片ゲル抽出装置をもちいた再現性の高いサイズセレクションによって効率的なシーケンシングを実施した。その結果、イルミナ社のデスクトップ型次世代シーケンサー MiSeq の 1 run で、93 個体分の ddRAD ライブラリをシーケンシングし、リード数が少ないサンプルを除外したところ、平均 depth 15.2 の冗長度で 81 個体 2278 SNPs のジェノタイピングに成功した (図 2)。

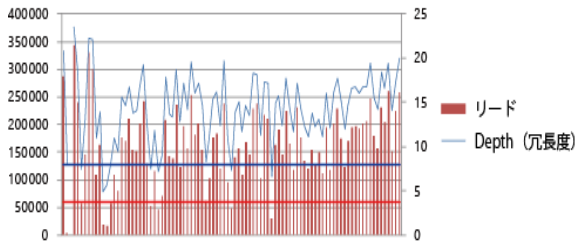


図2 各個体のリード数と冗長度

(3)ユウゼンのミトコンドリア DNA とマイクロサテライトマーカーに基づく集団構造解析の結果はどちらも有意な集団構造は認められず、大東諸島と小笠原諸島の間で遺伝的交流が生じていることが示唆された(図3, 4).

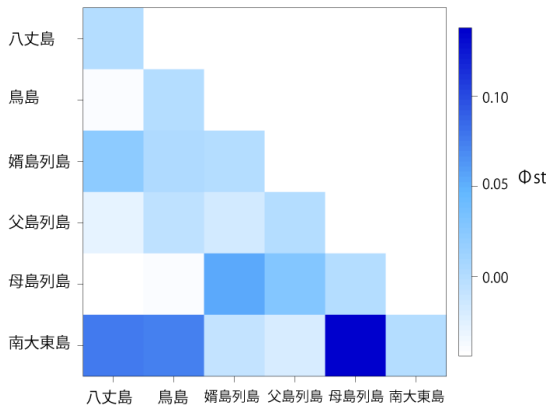


図3 ミトコンドリア DNA に基づくペアワイズ Φ_{st} ($p > 0.05$) (産地間の遺伝的分化の検定)

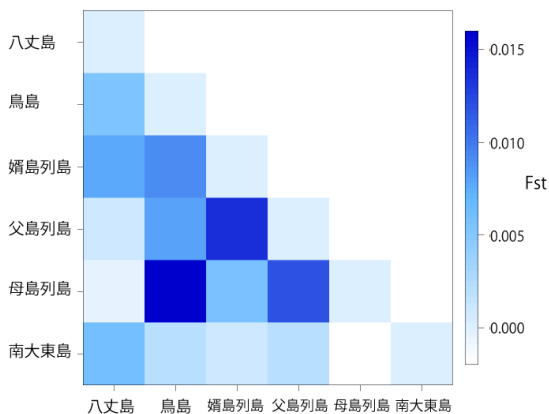


図4 マイクロサテライトマーカーに基づくペアワイズ F_{st} ($p > 0.05$) (産地間の遺伝的分化の検定)

次に、ddRAD-sequencing でジェノタイプングした SNPs に基づく集団構造解析の結果を示す。2278 SNPs の中で変異が適応度に影響

しない中立であると推定された 1947 SNPs に基づき集団構造の有無を検定したところ、有意な集団構造は認められなかった(図5)。

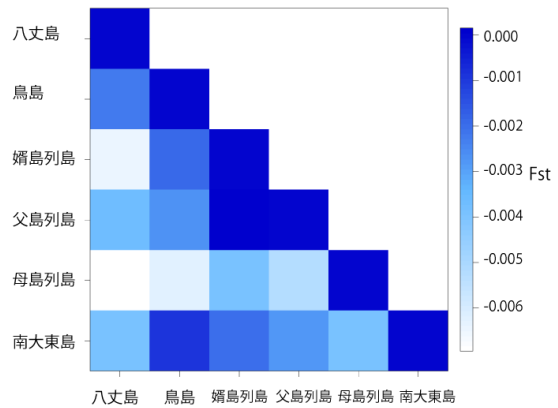


図5 中立 SNPs に基づくペアワイズ F_{st} ($p > 0.05$)

一方、分断性選択を受けていると推定された 42 SNPs に基づいて集団構造の有無を検定したところ有意ではあるが弱い集団構造が示された(図6)。

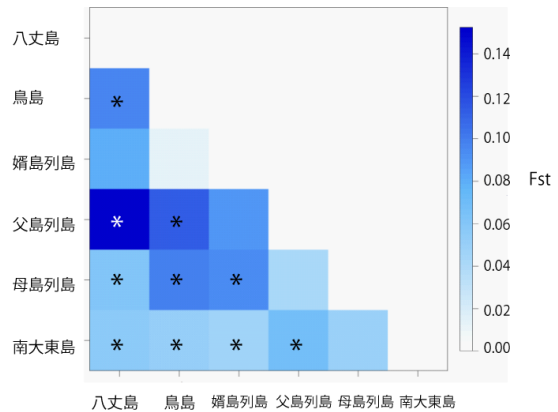


図6 分断性選択 SNPs に基づくペアワイズ F_{st} ($*p < 0.05$)

同じデータセットに基づき、祖先集団の数を推定し各個体の遺伝的組成を推定したところ、祖先集団の数(K)は2~4で尤度が高かった。K=3 や 4 の場合は明確に遺伝的組成の異なる個体が存在するものの、同じ祖先集団に由来する遺伝的組成をもつ個体の地理的なまとまりは見出されなかった。

これらの事から、ユウゼンは分布域の広範囲で遺伝的交流が生じている事が示唆され、本研究の作業仮説を支持した。

大東諸島と小笠原諸島の間は、1000km 以上にわたり島がないことから浅海性魚類の交流が困難であると考えられていた。しかし、本研究のこれまでの結果は、この間で浅海性魚類の交流が生じている事を示唆しており、「大東諸島回廊仮説」の一部を支持す

るものである。現在、遺伝的交流の方向や量についての推定を進めており、結果が得られ次第より詳細に仮説の検証をおこなう予定である。

(4)以上のように、本研究によって生物系統地理の研究分野における小規模な研究プロジェクトでも実施可能なゲノムワイド解析の基盤が整った。また、コガネヤッコについてもこの実験系でゲノムワイド解析を進めており、各種の集団構造解析を実施し「大東諸島回廊仮説」の検証を進めていく予定である。

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 3 件)

- ① Koeda K, Kuriiwa K, Chiba SN (2016) Records of piebald individuals of *Zebrasoma flavescens* from the Ogasawara Islands. OGASAWARA RESEARCH. 42 : 1-8 (査読有り)
- ② Koeda K, Chiba SN, Motomura H (2015) First Japanese Specimen-based Record of *Liopropoma tonstrinum* (Teleostei: Serranidae), from Minami-daito Island, Daito Islands, southern Japan. Species Diversity 20:19-22 (査読有り)
- ③ 鈴木寿之, 渋川浩一, I-Shiung Chen, 矢野維幾, 千葉 悟, 内野啓道, 高橋 歩, 瀬能 宏 (2015) 琉球列島から得られた日本初記録のハゼ亜目魚類 8 種. Fauna Ryukyuana. 18 : 9-38 (査読有り)

〔学会発表〕 (計 5 件)

- ① 千葉 悟, 谷藤吾朗, 村田智慧, 後藤 亮, 栗岩 薫, 松浦啓一 RAD-sequence データによるユウゼン(チョウチョウウオ科)の系統地理. 2015年度日本魚類学会年会. 近畿大学(奈良市) 2015年9月5-6日
- ② 松浦啓一, 瀬能 宏, 本村浩之, 遠藤広光, 栗岩 薫, 千葉 悟 南日本の沿岸性魚類の戦略的調査と魚類データベースが展望する動物地理学の新たな地平. 2015年度日本魚類学会年会. 近畿大学(奈良市) 2015年9月5-6日
- ③ 千葉 悟 RAD-Sequenceによる沿岸性魚類の系統地理学的研究. 魚類集団遺伝学若手の会研究発表会. 東海大学(静岡市) 2015年8月28-29日
- ④ 千葉 悟 (2015) 浅海性魚類の遺伝的集団構造が示す海流の機能. 分類研究会. 国立科学博物館(東京都台東区) 2015年1月19日

- ⑤ 千葉 悟 海を隔て、海をつなぐ海流-タイ科魚類の系統地理と南大東島の魚類相から. 公開シンポジウム: 黒潮と南日本の魚たち-黒潮はベルトコンベヤーか障壁か?. 高知大学浅倉キャンパス(高知市) 2014年11月29日

⑥

〔その他〕

アウトリーチ活動

公開シンポジウム: 黒潮と南日本の魚たち-黒潮はベルトコンベヤーか障壁か?. 平成26年11月29日. 高知大学浅倉キャンパス(高知市). 共催

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 悟 (CHIBA, Satoru)
国立科学博物館・分子生物多様性研究資料センター・特定非常勤研究員
研究者番号: 80599431

(2) 研究分担者

栗岩 薫 (KURIIWA, Kaoru)
国立科学博物館・動物研究部・短時間非常勤研究員
研究者番号: 50470026

谷藤 吾朗 (TANIFUJI, Goro)
筑波大学・生命環境科学研究科(系)・特任助教
研究者番号: 70438480

(3) 研究協力者

後藤 亮 (GOTOH, Ryo)
千葉県立中央博物館・企画調整課・研究員

村田 知慧 (MURATA, Chie)
徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

片山 英里 (KATAYAMA, Eri)
国立科学博物館・動物研究部・支援研究員

小枝 圭太 (KOEDA, Keita)
鹿児島大学総合研究博物館・特別研究員(PD)

吉田 朋弘 (YOSHIDA, Tomohiro)
鹿児島大学大学院連合農学研究科・博士後期課程

田代 郷国 (TASHIRO, Satokuni)
鹿児島大学大学院連合農学研究科・博士後期課程

小濱 久男 (KOHAMA, Hisao)
ダイビングサービス・ボロジノアイランド

小濱 伸也 (KOHAMA, Shinya)

ダイビングサービス・ボロジノアイランド

山田 捷夫 (YAMADA, Shobu)

小笠原海洋開発株式会社

山田 鉄也 (YAMADA, Testuya)

小笠原海洋開発株式会社