

ひらせ しょうたろう

氏名（本籍地） 平瀬 祥太郎

学位の種類 博士（農学）

学位記番号 農博第1032号

学位授与年月日 平成24年3月27日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項

研究科，専攻 東北大学大学院（博士課程）農学研究科資源生物科学専攻

論文題目 日本列島沿岸におけるアゴハゼの分子系統地理

博士論文審査委員 （主査）准教授 池田 実

教授 木島 明博

教授 尾定 誠

准教授 陶山 佳久

論文内容要旨

緒言

日本列島沿岸の海洋生物の種多様性が、他の海域に比べて非常に高いことが最近明らかとなった。このことは、我が国が地球上の海洋生物の多様性保全に対して大きな責任を担っており、日本列島沿岸における生物多様性保全を戦略的に進めていく必要があることを意味している。種内における、遺伝的に分化した地域集団は、生物多様性の構成要素の一つであり、生物多様性の保全戦略を構築する際に考慮すべき対象である。また、これらの集団が分岐した年代を正確に求めることで、保全上の価値がより明確となる。地域集団を保全する理由としては、地域集団がそれぞれの環境に適応した性質を持ち、将来の環境変動に対しても地域集団レベルで適応していく可能性があることや、地域集団間に生殖隔離が成立しており、それぞれが異なる生物学的種である可能性があることが挙げられる。さらに、異なる多数の種に共通の地理的分化パターンが検出される場合には、それぞれの地域は別々の生物地理保護区と設定し、生息する生物群集そのものを保全していく必要がある。日本列島沿岸に生息するいくつかの海洋生物種では、日本海側と太平洋側とで大きな系統分岐が生じていることがミトコンドリア (mt) DNA 分析による系統地理学的アプローチにより報告されているが、研究例は多くなく、核 DNA マーカーを用いた研究はほとんど行われていない。また、これらの分岐年代は、他種で報告された分子進化速度の外挿によって、更新世の 130 万年前から 3 万年前であることが示唆されているが、適用した進化速度が正しいという保証はなく、日本海は複数回隔離されているため、求めた分岐年代とは大きく異なっていることも考えられる。そのため、他の外的基準により校正した進化速度を用いて分岐年代を推定することが望ましい。本研究は、潮間帯に生息するアゴハゼ (*Chaenogobius annularis*) を対象として、日本列島の日本海側と太平洋側とで遺伝的分化が生じているのかどうかを核とミトコンドリアの両 DNA マーカーによって検討した。その結果明らかとなった日本海と太平洋の 2 グループの分岐年代について、他種の進化速度を最初から外挿することなく、地史情報を用いて校正する方法によって求めた。また、2 グループの接触帯における集団を解析して、生殖隔離の有無を検証した。得られた結果をもとに本種を含んだ日本列島沿岸における沿岸性海洋生物の保全プランについて考察することを目的とした。

第 1 章 アゴハゼにおける DNA マーカーの開発と予備的解析

アゴハゼ集団間の移動交流の制限や日本海と太平洋に相当する地域集団が存在するかどうか明らかにするため、日本海側 2 地点と太平洋側 6 地点からアゴハゼを採集し (図 1)、本種用にプライマーを開発したマイクロサテライト (ms) DNA10 座および

mtDNA 調節領域 (381 塩基) を用いて予備的に検討した。その結果、どちらの DNA マーカーにおいても、牡鹿半島の 2 集団間 (10 km 圏内) で有意な遺伝的分化が世代を越えて検出され、本種の移動分散は小さいものであることが示された。また、太平洋側と日本海側の集団間では両マーカーにおいて非常に大きな遺伝的分化 ($F_{ST} (ms) = 0.466\sim 0.718$ および $F_{ST} (mt) = 0.840\sim 0.936$) が検出され、mtDNA の系統樹は日本海側と太平洋側の 2 クレードに分かれた (図 2)。さらに、アロザイム分析においても *Mdh-1* 遺伝子座で日本海側と太平洋側に共通の対立遺伝子が見られないことが示され (図 3)、本種にも遺伝的に大きく分化した日本海と太平洋の 2 グループが存在することが示唆された。

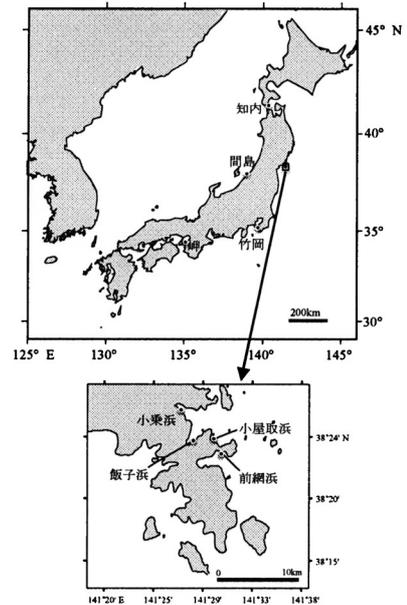


図 1. アゴハゼの採集地点

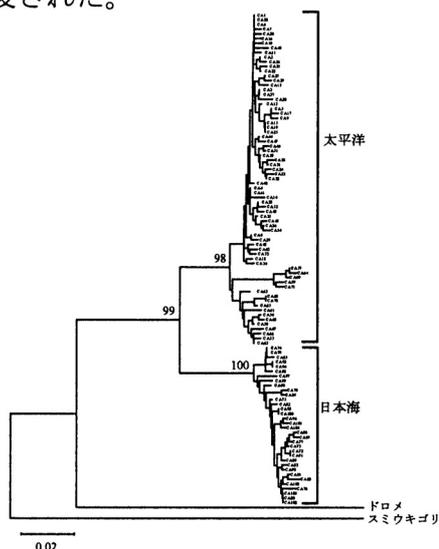


図 2. アゴハゼの 105 ハプロタイプ間の *p*-distance に基づいた近隣結合法による分子系統樹

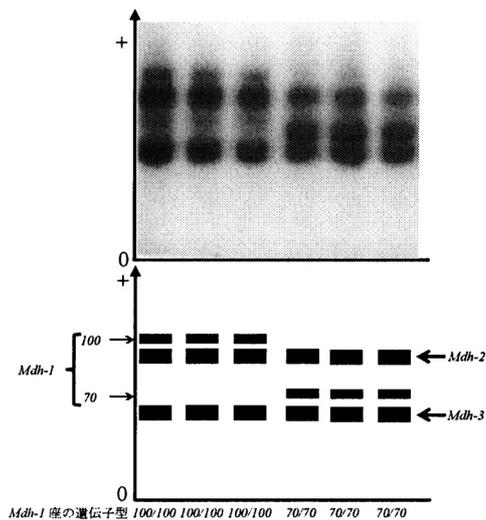


図 3. Malate Dehydrogenase (MDH) の電気泳動像と遺伝支配を示した模式図

第 2 章 地史情報に基づく 2 グループの分岐年代の推定とグループ内構造

第 1 章で存在が示唆された太平洋側と日本海側の 2 グループの分布域について詳細に検討するため、日本海側と太平洋側のそれぞれ 11 地点と 16 地点からアゴハゼを採集し (図 4)、mtDNA の $tRNA^{Thr}$ 、 $tRNA^{Trp}$ 、 $tRNA^{Ala}$ 、 $tRNA^{Asn}$ 、*cyt b* および ND2 遺伝子の計 2340 塩基の系統解析を行った。その結果、調節領域と同様に日本海と太平洋にほぼ対応する 2 クレードが形成され (図 5、6)、 $tRNA^{Trp}$

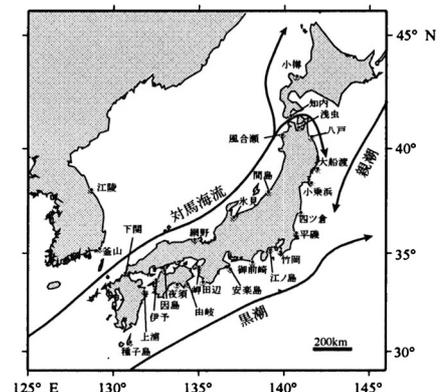


図 4. アゴハゼの採集地点

の 73 番目の塩基では日本海グループに特徴的な欠失が生じていることが示された。cyt *b* と ND2 の進化速度の一定性を検討したところ、ND2 では棄却されたため、2 グループの分岐年代を推定するには cyt *b* のデータを用いるのが適切と考えられた。各グループのミスマッチ分布 (図 7) を調べたところ、日本海グループは太平洋グループに比べて比較的新しい年代に日本海で集団拡大したことが示された。集団拡大をした時期が対馬海流が日本海に流入した時期 (間氷期) と同一と仮定すると、その時期は 8 千年前 (cyt *b* の進化速度: 61 %/百万年)、12 万年前 (3.4%/百万年)、22 万年前 (2.2%/百万年)、32 万年前 (1.5%/百万年) の 4 通りが考えられた。ハゼ科を含む他の魚類で報告されている cyt *b* の進化速度や、日本海

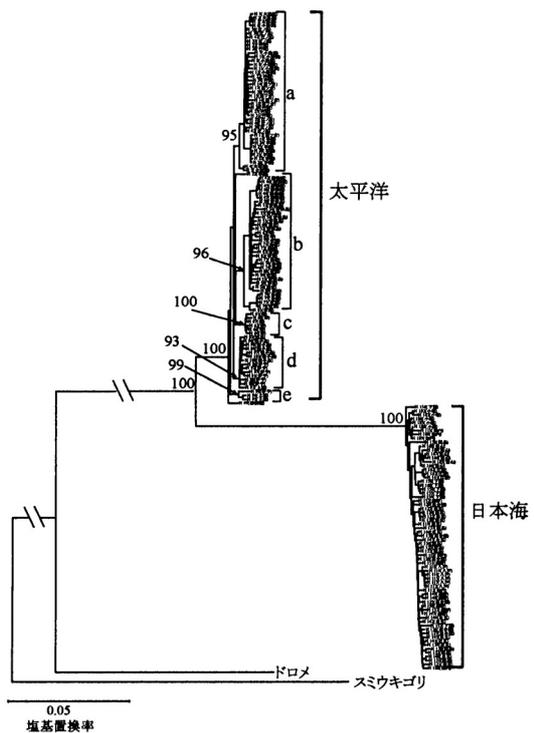


図 5. アゴハゼの cyt *b* + ND2 + tRNA の 169 ハプロタイプの GTR+I+G 分子進化モデルに基づいた近隣結合法による分子系統樹

の地史も考え合わせた結果、22 万年前が最も妥当であると考えられた。この値により

求めた 2 グループ間の分岐年代は 170 万年前となり、更新世初期における日本海の大規模な南方海峡の形成とその後の隔離が 2 グループの形成に大きく関与していると考えられた。AMOVA ならびに SAMOVA 分析を行った結果、

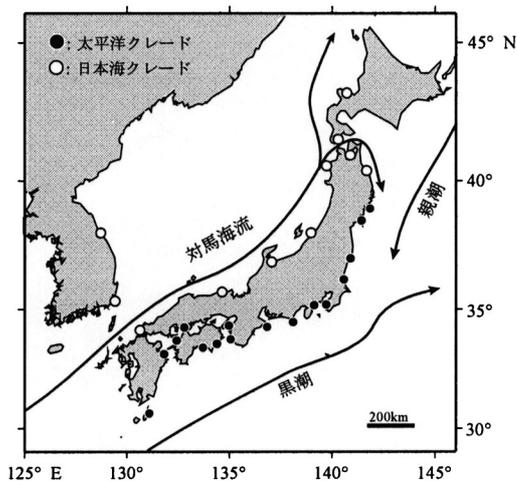


図 6. アゴハゼの太平洋グループと日本海グループのミスマッチ分布

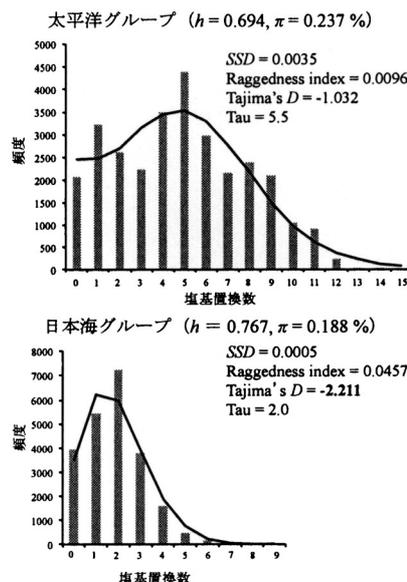


図 7. アゴハゼの太平洋クレードと日本海クレードの地理的分布

日本海には日本列島と朝鮮半島に対応した 2 サブグループ、太平洋には東北から関東、中部から中国、瀬戸内海から九州に対応した 3 サブグループがさらに存在することが示され、更新世中期以降の沿岸地形の変化がこれらのサブグループの形成に関与していると考えられた。

第 3 章 核 DNA 分析による集団構造解析

mtDNA 分析で示された 2 グループの分布域が核 DNA で調べた場合と一致するかどうか明らかにするため、太平洋側の 8 標本集団と日本海側の 7 標本集団について (図 8)、第 1 章で開発した 10 msDNA マーカーのうち 8 msDNA マーカーを用いて検討した。Nei の標準遺伝距離と近隣結合法により標本集団間の類縁図を作成した結果、mtDNA 分析と同様にそれぞれの海域と一致する 2 グループに分かれた (図 9)。個体ベースのアサインメントを行った結果においても、調べ

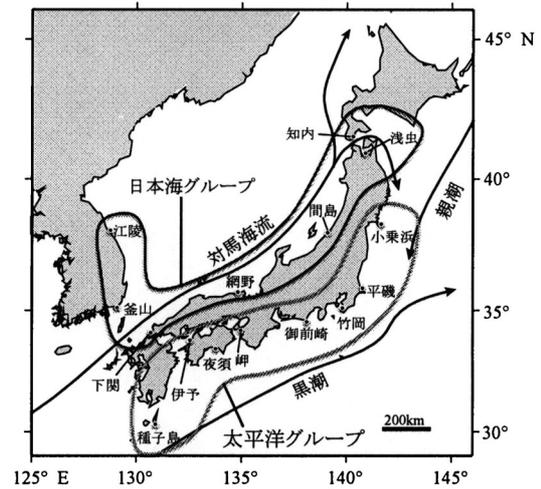


図 8. アゴハゼの採集地点

た全ての個体は日本海側と太平洋側で説明できる 2 クラスターに帰属した (図 10)。以上の結果から、核 DNA レベルにおいても 2 グループが存在することが明確となり、それぞれの分布域も mtDNA 分析の場合とほぼ一致した (図 8)。AMOVA ならびに SAMOVA 分析を行った結果、日本海グループ内では、mtDNA 分析と同様に日本と朝鮮半島にほぼ対応した 2 つのサブグループが存在することが示された。一方、太平洋グループ内では標本集団間に有意な遺伝的分化はみられるものの、mtDNA 分析で示されたサブグループの存在は認められなかった。

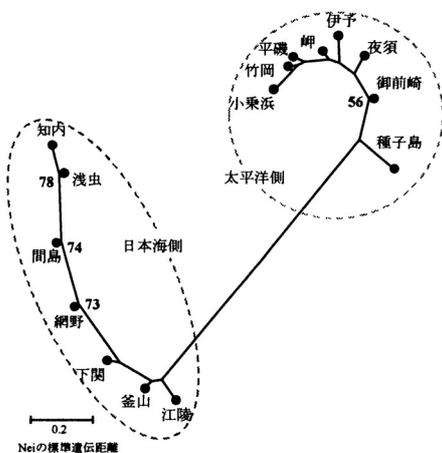


図 9. アゴハゼの 15 標本集団の近隣結合法による類縁図

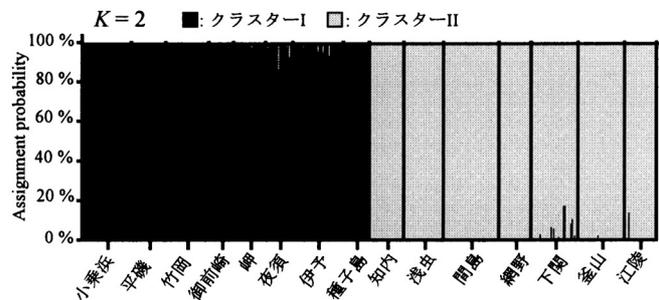


図 10. アゴハゼの 15 標本集団を用いた Bayesian clustering 分析によって得られたアサインメントプロット (K=2)

第4章 2グループの接触帯における遺伝解析

170万年前に分岐したアゴハゼの2グループ間において生殖隔離が成立していた場合には、それぞれのグループは異なる生物学的種として捉えられ、太平洋側と日本海側を別々の生物地理区とする根拠をさらに強固なものにすると考えられる。また、2グループ間に生殖隔離が成立しているかどうか検討することは、種分化とそのタイムスケールを考察する上で興味深い。これまでの分布域調査から2グループの接触帯は三陸海岸北部であると考えられたため、この地域のアゴハゼを対象としてアロザイムと msDNA、mtDNA マーカーによる遺伝解析を行い、交雑が生じているかを検討した。その結果、接触帯の中心である田老では F1 や F2 または戻し交雑と考えられる個体が高頻度で検出された (図 12, 13)。したがって、2グループ間には生殖隔離は成立していないことが明らかになった。また、交雑個体は太平洋と日本海に特徴的なハプロタイプをそれぞれ有していたため、2グループの交雑に方向性はないと考えられた。アロザイムと msDNA の遺伝子型に基づいたアサインメントテストの結果、接触帯縁部の集団にも低頻度ながら交雑個体が検出され、狭い交雑帯を介して2グループが相互浸透しつづくと考えられた (図 14)。

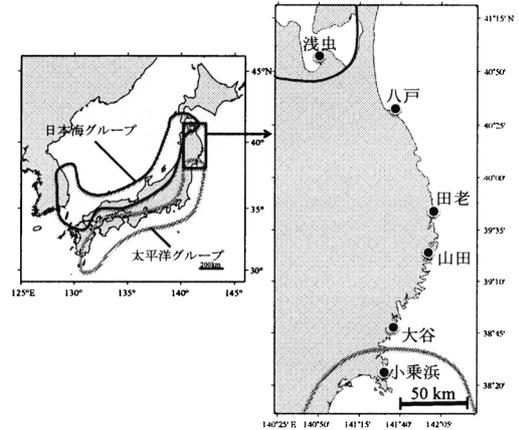


図 11. アゴハゼの採集地点

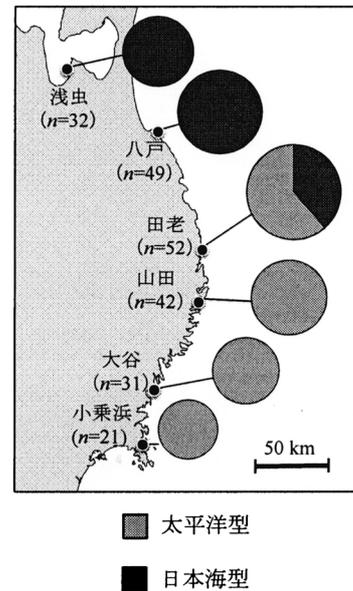


図 12. 三陸海岸周辺の6標本集団における mtDNA の太平洋型と日本海型の割合

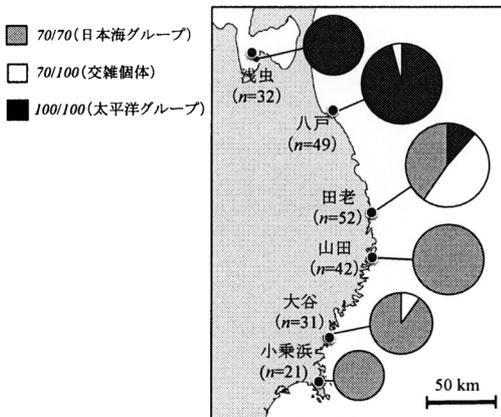


図 13. 三陸海岸周辺の6標本集団における *Mdh-1* 座の遺伝子型の割合

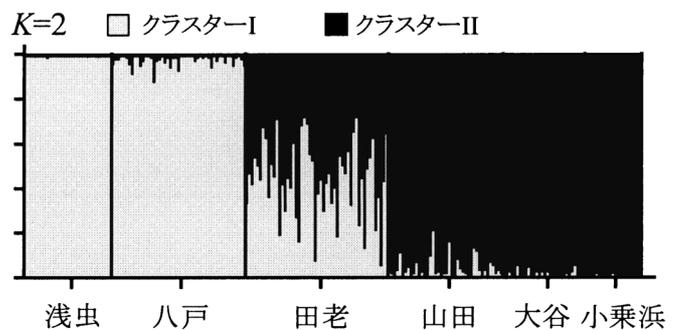


図 14. 三陸海岸周辺の6標本集団を用いた Bayesian clustering 分析によって得られたアサインメントプロット ($K=2$) (MDH の 2 遺伝子座と 8msDNA 座)

総合考察

アゴハゼにおける太平洋グループと日本海グループの存在が、核とミトコンドリアの両 DNA マーカーによって明確になったことにより、日本列島沿岸の海洋生物種内に太平洋側と日本海側とで大きな遺伝的分化が生じている例がさらに増えた。本研究の結果は、日本列島沿岸の海洋生物の保全を進めていく上で、太平洋沿岸と日本海沿岸を別々の生物地理保護区とみなす方策の妥当性をより強固なものにすると考えられる。日本海グループの過去の集団動態と地史情報を照合して分子進化速度を校正する本研究の方法は、他の沿岸性の種の分岐年代推定にも応用可能と考えられる。したがって、他種における日本海グループと太平洋グループの分岐年代を、この方法を用いて検討または再検討することによって、両海域の海洋生物群集の成立過程が再現でき、保全上の価値をより明確に示すことができると考えられる。2グループの接触帯の遺伝解析により、分岐してから 170 万年経過していても 2 グループ間には生殖隔離が成立しておらず、交雑帯が形成されていることが示された。今後は、田老周辺の集団の遺伝的組成について調査地点を増やして、また、世代を越えて調べることにより、交雑帯の維持機構あるいは隔離強化のプロセスを明らかにできるかもしれない。アゴハゼの太平洋グループと日本海グループ間の適応的差異については、今回明らかにすることができなかったが、今後アゴハゼの生態学的な知見が蓄積されることにより、本種をモデルケースとして太平洋側と日本海側の集団間における適応的分化についてアプローチできる可能性もある。

論文審査結果要旨

種内における遺伝的に分化した地域集団は、生物多様性の構成要素の一つであり、生物多様性の保全戦略を構築する際に最初に考慮すべき対象である。また、これらの集団が分岐した年代を正確に求め、生殖隔離の有無について検討することにより保全上の価値と今後の保全プランを明確にすることができる。本論文は、潮間帯に生息するアゴハゼ (*Chaenogobius annularis*) に日本海と太平洋の2グループが存在することを発見し、分子進化学的手法と地史情報から2グループの分岐年代を求め、接触帯における生殖隔離の有無について検証し、得られた結果をもとに本種を含んだ日本列島沿岸における沿岸性海洋生物の保全プランについて考察したものである。

第1章では、アゴハゼ用に開発したマイクロサテライト DNA ならびにミトコンドリア DNA マーカーを用いて、10 km 圏内でも有意な遺伝的分化が検出されることを見だし、本種の移動分散が小さいものであることを示した。また、太平洋側と日本海側の集団間では大きな遺伝的分化が検出され、本種にも遺伝的に大きく分化した日本海と太平洋の2グループが存在することを示した。

第2章では、他種の進化速度を最初から外挿することなく、ミトコンドリア DNA の分子進化学的解析と地史情報によって、2グループの分岐年代を170万年前と算出し、更新世初期における日本海の大規模な南方海峡の形成とその後の隔離が2グループの形成に大きく関与していることを指摘した。また、各グループ内の集団構造についても検討を行った結果、日本海には日本列島と朝鮮半島に対応した2サブグループ、太平洋には東北から関東、中部から中国、瀬戸内海から九州に対応した3サブグループが存在することを示し、更新世中期以降の沿岸地形の変化がこれらのサブグループの形成に関与していることを指摘した。

第3章では、核 DNA であるマイクロサテライト DNA 分析によって、ミトコンドリア DNA の場合と同様の分化パターンが検出されるかどうかについて検討を行った。その結果、核 DNA レベルにおいても2グループが存在すること、日本海グループ内でも同様に日本と朝鮮半島にほぼ対応した2つのサブグループが存在することを示した。一方、太平洋グループ内では標本集団間に有意な遺伝的分化はみられないものの、mtDNA 分析で示されたサブグループの存在は認められないことを明らかにした。

第4章では、2グループの接触帯である三陸海岸北部において遺伝解析を行い、交雑が生じているかを検討した。その結果、接触帯の中心である田老では F1 や F2 またはバッククロスと考えられる個体が高頻度で検出され、2グループ間には生殖隔離は成立していないことを明らかにした。また、接触帯縁辺部の集団にも低頻度ながら交雑個体が検出され、狭い交雑帯を介して2グループが相互浸透しつつある状況にあることも明らかにし、集団分岐の時間的スケールと生殖隔離の程度について論議を行っている。

以上の結果は、日本列島沿岸の海洋生物の保全を進めていく上での重要な基礎的情報と示唆を含んでおり、将来の保全方策に向けたリファレンスとなり得ると考えられた。また、本論文における分岐年代推定の手法は他の日本沿岸の海洋生物にも応用可能であり、斬新な方法論を提示している。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位を授与するにふさわしいと判断した。