琉球大学学術リポジトリ

空間系統学的アプローチによるPodisma属昆虫における染色体分化プロセスの解明

メタデータ	言語: 出版者: 立田晴記 公開日: 2010-08-09 キーワード (Ja): 種分化, 染色体多型, フキバッタ, 系統地理, 空間統計学, ベイズ, 分子マーカー, 地理的変異, 多変量統計学, 形態測定, 形質置換, 染色体, 生殖隔離, 空間遺伝 キーワード (En): Podisma 作成者: 立田, 晴記, Tatsuta, Haruki メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/17807

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成　22 年　6 月　4 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2009
課題番号：19570099
研究課題名（和文）　空間系統学的アプローチによる *Podisma* 属昆虫における染色体分化プロセスの解明

研究課題名（英文）　Studies on chromosomal speciation in *Podisma* species using spatial phylogenetic approaches

研究代表者
立田　晴記（TATSUTA HARUKI）
琉球大学・農学部・准教授
研究者番号：50370268

研究成果の概要（和文）：
染色体構造に多様な地域変異を有するフキバッタ亜科の 1 属である *Podisma* 属昆虫 2 種を材料に，染色体レースの空間分布状況の把握，地域集団が有する遺伝子型の特徴，また地域分化が生じた歴史的プロセスの解明を行った．北海道に分布するサッポロフキバッタでは，染色体レース間の交雑帯は存在したとしても非常に狭いこと（３ｋｍ以内），またクサツフキバッタの遺伝構造解析からは，地理的に近接していても遺伝子型の構成が類似していない場合があることが明らかになった．

研究成果の概要（英文）：
This study aimed to understand fine-scale spatial distributions of different chromosomal races and spatial variation of genetic structure in the two *Podisma* species distributed in Japan. As for the study of *P. sapporensis* in Hokkaido, intimate field studies have revealed that the envelope of the hybrid zone between different chromosomal races, if ever, will be so narrow (i.e. <3km). Landscape genetic studies on the populations of *P. kanoi* demonstrated that the degree of genetic differentiation between localities is not necessarily correlated with geographic distance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総　計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：進化生物学
科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類
キーワード：種分化，染色体多型，フキバッタ，系統地理，空間統計学

１．研究開始当初の背景

染色体構造に生じる変異が種分化の原動力となりうるとした定所的種分化の考えが提唱されて以来，様々な生物で核型変異と生殖的隔離との関係を探る研究が行われてきた．これらの研究では，核型に構造変異が生じる

ことで減数分裂時に複雑な多価染色体が構成され，それが染色体分離異常や不妊の原因となる事が指摘されている．一方で染色体レベルの変異が必ずしも集団の生存力低下に結びつかない知見も見受けられ，染色体がつかさどる種分化の一般性については議論が続いている．また染色体レベルの種分化の研究には，様々な染色体構造変異が同種内で存在する必要があることから，染色体変異が介在する種分化研究が進められている生物種は限定されているのが現状である．

これまで申請者らが調査を行ってきた極東地域に分布する直翅目バッタ科フキバッタ亜科(Orthoptera, Acrididae, Podisminae)に含まれる昆虫のうち，*Podisma* 属のバッタ 2 種で染色体レベルの種内変異が見出されている．とりわけ北海道，千島列島（国後島），サハリンに広く分布するサッポロフキバッタ *P. sapporensis* では常染色体と X 染色体が融合し，従来型(XO/XX タイプ)とは異なる性決定システム(XY/XX タイプ)を持つ集団が北海道東部および国後島の一部に存在することが明らかになっている(Bugrov et al. 2001 など)．ヨーロッパに分布する同属別種においても同様の染色体変異を持つ集団が見つかっており，それらの間には不完全な生殖隔離による交雑帯が存在している(Barton & Hewitt 1981)．サッポロフキバッタではヨーロッパの別種に見られるような交雑帯はこれまで見つかっていないが，他種の昆虫に見られないユニークな特徴として，それぞれの性決定システムにおいて染色体の逆位(inversion)による多型が存在しており，その存在比率は地域集団間で大きく異なっている事(Bugrov et al. 2001)が挙げられる．更にサッポロフキバッタでは余剰染色体(B 染色体)の数に顕著な種内変異が認められ(Warchalowska-Sliwa et al. 2001)，染色体レース間の交配実験からは一部の核型の組み合わせで受精率が大きく低下することが見いだされている(Bugrov et al. 2004)．これらの点からサッポロフキバッタでは核型変異と種分化の関係を探るための極めて興味深い知見が蓄積されつつあると言える．

サッポロフキバッタについてミトコンドリア DNA 配列に基づく系統解析をおこなったところ，染色体が転座している集団(XY/XX タイプ)の単系統性が支持されなかったことから，（１）染色体の転座が種内で複数回生じた，（２）XO/XX タイプと XY/XX タイプの間で浸透交雑が生じている可能性が示唆された(Tatsuta et al. 2006)．またミトコンドリア DNA の一部が核内へ転移している痕跡も確認された．これらの結果を踏まえ，緻密な空間スケールでの標本採集地点を増やし，浸透交雑の実態を核内の DNA マーカーを利用して調査すること，および核内に転移しているミトコンドリア DNA の詳細な実態を把握することで染色体構造の進化プロセスを解明するため本研究課題の申請を行うものである．

２．研究の目的

・核内共優性マーカー多型に基づく染色体レースの空間構造解析と染色体分化プロセスの推定

系統解析でしばしば用いられるミトコンドリアからは母性遺伝するため，個体の交雑に関する情報が得られない．本研究では核内に存在する短い反復配列で構成され，高い種内変異を示すマイクロサテライト遺伝子に着目した解析を実施する．すなわち対立遺伝子頻度に基づく集団間におけるヘテロ接合度の比較といった集団遺伝学的解析に加え，遺伝子交流集団を生物の生息場所の地理情報に基づいて空間明示的に表現することができるベイズ統計学を応用したクラスタリング手法を活用し，局所的空間スケールで観察される個体の移動，地域集団における遺伝構造や繁殖パターンを推定する．マイクロサテライト解析に用いた個体は以下に示すミトコンドリア DNA 配列を同時に調べ，改めて系統解析，クレード解析を実施し，分集団の形成過程を推定する．これらから先行研究で提案された染色体分化に関する仮説を検証する．

・核内に存在するミトコンドリア DNA 偽配列(Numt)の分化プロセスの推定

これまで様々な生物で核ゲノム内にミトコンドリア DNA の一部配列が組み込まれている現象が明らかになりつつある．核内に転移している多くのミトコンドリア遺伝子は open reading frame(ORF)の断片化により不活化していると報告されており(Pons & Vogler 2005)，またミトコンドリア DNA の一部が核内に移動した理由はわかっていない．これまでの研究から，フキバッタ亜科昆虫でも多くのミトコンドリア DNA 断片が核内に移動しており，移動した DNA 断片は元のミトコンドリア DNA とは異なる変異を蓄積していることが明らかになっている(Bensasson et al. 2000)．これまでの予備解析から，サッポロフキバッタおよびクサツフキバッタで核内ミトコンドリア DNA 配列(Numt)の存在が示唆されており，Numt を保持する個体の比率が地域集団間で異なっている可能性が考えられる．そこでミトコンドリア DNA そして核内のミトコンドリア DNA 配列をそれぞれ特異的に増幅させるプライマーを開発し，それぞれの遺伝子系統樹とハプロタイプネットワークを構築することで，ミトコンドリア DNA の配列が核へ転移した歴史的経緯を明らかにする．

３．研究の方法

１）*Podisma* 属昆虫の標本収集・地理情報の

取得・整理

これまでの調査で判明している異なる染色体レースの分布の境界地域（特に北海道東部～北部～中央部）を集中的にサンプリングする．採集された標本は精巣および受精卵の核を取り出し，海外共同研究者である A.G.Bugrov 教授（ノボシビルスク州立大，ロシア）および E. Warchalowska-Sliwa 博士（ポーランド科学アカデミー）に核型分析を依頼する．標本採集の際，採集地点の地理情報（緯度・経度等）を記録しておき，得られた個体の核型情報と合わせて地理情報システム (GIS)を用いた空間解析に活用する．

２）ミトコンドリア，核 DNA プライマーの作製

開発済のクサツフキバッタ用のマイクロサテライトプライマー６座分の有効性を試すと共に，サッポロフキバッタ向けのマイクロサテライトプライマーを新たに開発する．またミトコンドリア DNA および核内のミトコンドリア DNA 配列を特異的に増幅させるプライマーの開発のため，アルカリ沈殿法，Long-PCR 法，逆転写 PCR 法を用いてミトコンドリア DNA を分離して解読する．またミトコンドリア DNA および核 DNA 上のミトコンドリア DNA 配列断片を同時に PCR で増幅させ，各配列をクローニングしてダイレクトシークエンス法で解読した塩基配列を比較することで核 DNA 上のミトコンドリア DNA 配列を判別し，ミトコンドリア，核 DNA 上の配列をそれぞれ特異的に増幅するプライマーを設計する．これまでの予備検討から，新鮮な組織からは上記いずれの手法を用いても成功するが，これまでの調査で蓄積された液浸標本からミトコンドリアと核 DNA を分離する技術は十分に検討されていないため技術上の困難が予想される．その場合には新鮮な標本を出来る限り多く集めるという作業に加え，予め解読に成功した配列を参照型とし，クローニング産物の配列を相同性検索アルゴリズムに従って分類する等の既存技術を改良することで，これまで蓄積されてきた標本を出来る限り活用していく．

３）染色体レースの空間構造解析

同定された核型と標本採集地点との対応関係を把握するため，GIS ソフトウエアを用いて各標本の核型を地図上にマッピングする．染色体レースの分布の境界をスプライン関数および Kriging の手法を用いて推定する．

４．研究成果

１）染色体レースの空間分布情報の把握

サッポロフキバッタ *P. sapporensis* の染色体レースの交雑帯が野外で生じているか否かの調査を北海道で引き続き実施した．これまでの情報に基づけば，北海道上川郡上川町と北海道河東郡上士幌町を結ぶ三国峠付近で XO/XX レースがロバートソン転座型の XY/XX レースに置き換わると考えられてきたが，転座型の XY/XX レースは三国峠より北方の上川町南東部まで広がっていることが明らかになった．また国道 273 号沿いを調査し，南方の糠平付近まで XY/XX レースが分布していることが明らかになった．糠平の南西に位置する幌加峠では XO/XX レースが分布していることがわかっており，２つのレースが接触する地域は幌加峠と糠平を結ぶ約 3km の地域内に存在する可能性が高くなった．現在採集した個体については，Numt の分布パターンおよび集団間の遺伝構造比較についての解析を継続中である．また今後は異なる染色体レースの交配実験を実施することで，交尾器接合以前に配偶相手を認識し，適応度低下を避けるための配偶行動が認められるかといった，生殖隔離に関する実験を新たに実施する必要がある．適応度低下を防ぐための交配前生殖隔離成立に至るプロセスを明らかにすることは，世界的に異論が唱えられている強化(reinforcement)による種の多様化を検証する上で極めて重要なデータを提供することができる．

２）地域集団間の遺伝構造解析

クサツフキバッタ *P. kanoi* の地域集団間の派生順序を推定するため，ミトコンドリア COI 領域約 1.2kbp をダイレクトシークエンス法にて解読し，データのアラインメントを実施した．またこれまで得られているマイクロサテライトデータについて，読み取り精度の検証を行うと共に空間遺伝学的解析を実施した．その結果 20～50 キロ離れた集団間で遺伝的類似性に明瞭な地理的傾斜が認められることがわかった．また遺伝的差異と集団間の地理的距離との間には有意な正の相関が認められたことから，観察された遺伝構造の相違は地域集団の成立過程を概ね反映していると解釈された．またこれまで調査例が無かった鳥甲山頂付近で H21 年度に採集した標本について，６つのマイクロサテライト遺伝子多型を調査した．その結果鳥甲山に近接する地域で見つかっている遺伝子型とは異なるタイプを持つ個体が生息していることが新たに判明し，集団間の地理的距離が離れるにつれ，遺伝構造が徐々に異なると言った「距離による隔離」モデルでは本種の遺伝変異を説明出来ないことがわかった．これは最終氷期以降に遺存集団の分布の押し上げが生じた際，距離による隔離の効果のみで現存集団が成立した訳では無く，押し上げが生じる以前に固有の遺伝構造を持つ集団が隣接する地域があった可能性を示唆している．1 部地域の集団の標本数が充分ではないこと

から，更なるサンプリングを継続し，成果を論文にまとめていく．また *Podisma* と近縁な *Parapodisma* 属に含まれるミヤマフキバッタ種群において，近縁種と同所的に分布する地域で生殖的形質置換と思われる変異が交尾器に観察されること，また生殖的形質置換を引き起こすとされる同類交配が認められるか否かを確かめる交配実験を実施したデータを論文にまとめ，海外専門誌に投稿，受理された．遺伝情報を加味した空間統計学的解析からは地域集団間の遺伝学的連結性に関する有益な情報を得ることができた．本研究で用いた解析アプローチは様々な野生生物の保全遺伝学的解析にも有効と考えられる．

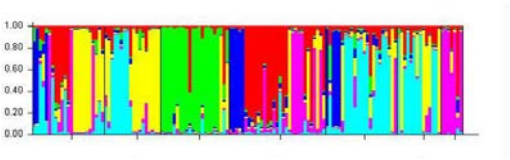

図１．ベイジアンクラスタリングによる各地域個体群における遺伝構造

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６件）

① Kawakami, Y., and H. Tatsuta. Variation in the shape of genital appendages along transect of sympatric and allopatric area of two brachypterous grasshoppers, *Parapodisma setouchiensis* and *P. subastris* (Orthoptera: Podisminae). ***Annals of the Entomological Society of America*** in press. 査読有
② Tatsuta, H. and Takano-Shimizu, T. High genetic differentiation between an African and a non-African strain of *Drosophila simulans* revealed by segregation distortion and reduced crossover frequency. ***Genetica*** 137: 165-171, 2009. 査読有
③ Tatsuta H., I. Yao, and Y. Tanaka. Isolation of eight microsatellite markers from *Moina macrocopa* for assessing cryptic genetic structure in the wild. ***Molecular Ecology Resources*** 9, 904-906, 2009. 査読有
④ Kowalczyk, M., H. Tatsuta, B. Grzywacz, and E. Warchalowska-Sliwa. Relationship between chromosomal races/subraces in the brachypterous grasshopper *Podisma sapporensis* Shiraki (Orthoptera: Acrididae) inferred from mitochondrial ND2 and COI gene sequences. ***Annals of the Entomological Society of America*** 101, 837-844, 2008 査読有
⑤ Warchalowska-Sliwa E., Tatsuta H., Akimoto S., Mayanska-Nadachowska A., Kowalczyk M., and Bugrov A.G. Geographic patterns of chromosomal differentiation in brachypterous grasshopper *Podisma sapporensis* Shiraki (Orthoptera: Acrididae). ***European Journal of Entomology*** 105, 185-196. 2008 査読有
⑥ Bugrov, A.G., T. V. Karamysheva, E. A. Perepelov, E. A. Elisaphenko, D.N. Rubtsov, E. Warchalowska-Sliwa, H. Tatsuta, N. B. Rubtsov. DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi* Storozh. (Orthoptera, Acrididae). ***Chromosome Research*** 15, 315-325. 2007 査読有

〔学会発表〕（計２件）

① 立田晴記・八尾泉・秋元信一．景観遺伝学的解析に基づくクサツフキバッタ *Podisma kanoi* に見られる遺伝構造．第69回日本昆虫学会大会，三重大学，2009.10.12
② Haruki Tatsuta, Izumi Yao, and Shin-ichi Akimoto. 2009. Phylogeography and fine-scale genetic structure in *Podisma kanoi*: insights from landscape genetic approaches. 10th International Congress of Orthopterists' Society, Antalya, Turkey (Oral) 2009/6/24

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）

○取得状況（計０件）

〔その他〕
ホームページ等
http://w3.u-ryukyu.ac.jp/konken/member/ap.html

６．研究組織
(1)研究代表者
立田　晴記（TATSUTA HARUKI）
琉球大学・農学部・准教授
研究者番号：19570099

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
秋元　信一（AKIMOTO SHIN-ICHI）
北海道大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：30175161

八尾　泉（YAO IZUMI）
北海道大学・大学院農学研究院・博士研究員
研究者番号：70374204