

学 位 論 文 題 名

Evolutionary process and introgression
of mitochondrial DNA in threespine stickleback,
Gasterosteus aculeatus, around Japan

(日本周辺におけるイトヨの進化過程とミトコンドリア DNA の遺伝子浸透)

学位論文内容の要旨

自然界において、種間では基本的に生殖的隔離機構が働いているため、雑種が生じることは珍しい(Dobzhansky, 1951)。しかし、交雑現象は古くから、数多く報告されているのも事実である(Hubbs, 1955; Harriason, 1990 など)。種間の交雑は、2種の融合、安定した交雑帯の形成、または遺伝子浸透を伴いながらも種間の相違を維持するという、いずれかの帰結に至ると考えられる。遺伝子浸透は、突然変異よりも集団内の遺伝的多様性の増加に大きく寄与する可能性もある。このため、種分化機構と関連して交雑現象や遺伝子浸透について、近年、関心が高まっている。

イトヨ属 (*Gasterosteus*) 魚類は、北半球北部に広く周極的に分布する小型の冷水性魚類であり、形態的、生態的、遺伝的形質に高い多様性を示す(Haglund et al., 1992; McPhail, 1994; Ortí et al., 1994; Reimchen, 1994)。近年のアロザイム解析結果から、日本周辺のイトヨ (*G. aculeatus*) には遺伝的に高い分化を遂げた2型（太平洋型と日本海型）の存在が示されている (Haglund et al., 1992; Higuchi and Goto, 1996)。しかし、mtDNA 解析によると、日本列島周辺のイトヨ集団は一つの単系統群を構成する (Ortí et al., 1994)。すなわち、2つの遺伝子マーカー間でイトヨにおける系統関係の結果に不一致が存在する。

そこで、本研究では初めに、mtDNA を遺伝的指標に用い、日本列島周辺におけるイトヨの詳細な遺伝的集団構造を明らかにすることを試みた。イトヨ2型と淡水陸封性であるハリヨ (*G. a. leirus*)を含む15集団を用い mtDNA の NADH dehydrogenase 5 and 6 (ND5/6) 領域 (約 2600 塩基対) について、制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析を行った。その結果、日本の集団は、ハリヨ集団とイトヨ集団に分けられたが、イトヨ集団中の太平洋型と日本海型は型ごとでグループを形成することなく、また2型間に遺伝的分岐は認められなかった。従って、イトヨ2型は核ゲノムでは高い分化を示しているが、mtDNA では大規模な遺伝子

浸透が生じていることが示唆された。この浸透方向には潜在的に太平洋型から日本海型への浸透、およびその逆方向の可能性がある。しかし、各集団の遺伝子型組成と動物地理学的見解から、その方向は太平洋型から日本海型へ浸透した可能性が高いと考えられた。

イトヨ2型を生活史のタイプから区分すると、日本海型は遼河回遊性のみからなるのに対し、太平洋型は遼河回遊性と淡水性の集団から構成される (Higuchi and Goto, 1996)。淡水性集団は、生態的、形態的に変異に富むことから、その形成過程を捉えることは、種分化機構を考えるうえで重要である。そこで、日本におけるイトヨ淡水性集団の形成過程を解明するため、mtDNA 調節領域前半部分(242塩基対)について塩基配列を決定し、遼河回遊性集団と淡水性集団間で比較した。淡水性5集団の遺伝的特徴と分化年代から、2つの形成過程が推測された。ひとつは、更新世後期の氷期と間氷期の影響による形成で、本州中央部に位置する集団がこれに相当する。もうひとつは、完新世に入ってから形成で、東北や北海道に位置する集団がこれに相当すると考えられた。従って、日本におけるイトヨ淡水性集団は太平洋型の遼河回遊性集団から多所的、多時的に形成されたことが示唆された。

上述したように、日本海型には淡水性集団が存在しない。その原因を究明する目的で、2型の稚魚について淡水に対する耐性を比較した。2型の遼河回遊性の稚魚を継続的に淡水飼育したところ、太平洋型に比べ日本海型の稚魚は、孵化後2~3ヶ月にかけて高い死亡率を示した。さらに淡水飼育を続けると、日本海型の稚魚では下顎部位に著しい腫れが現れ、孵化後12ヶ月の個体では組織学的観察によって甲状腺腫瘍が認められた。従って、日本海型の稚魚は降海時期を過ぎると淡水に対する耐性の低下が生じ、それが日本海型に淡水性集団が存在しない一つの要因であると推測された。

イトヨ太平洋型は太平洋沿岸に広く分布するが、日本海型は主に日本海とオホーツク海沿岸、そして太平洋沿岸の一部に限られている。北海道では2型の同所的生息域が認められ、雑種が低頻度で存在する (Higuchi and Goto, 1996)。MtDNA は母系遺伝することから、2型間の遺伝子浸透の機構と方向性を解き明かすうえで、自然条件下における交雑の組み合わせや、戻し交配の方向性が重要となる。そこで、イトヨ2型とその雑種について、北海道における分布パターン、雑種頻度、およびF1雑種と戻し交配の交配パターンをアロザイム解析により調査した。その結果、分布パターンは既往の報告とほぼ一致した。次に雑種が多く見られた北海道東部の3地点について集団構成の経年的な変化を調査した。その結果、2型の同所的生息地では雑種が低頻度でここ数年間、継続して出現していることが示された。さらに、2型の同所的な4地点から採集された6サンプルでは、F1雑種の出現頻度はランダム交配からの期待値よりも低かったことから、同型交配の存在が示唆された。また、交雑は両方

向で生じていたが、多くの F1 雑種個体は太平洋型と戻し交配することが示された。しかし、この結果は 2 型の集団構成の偏りに起因している可能性もある。

一般的に、異種間の遺伝子浸透は雑種を介して生じる。イトヨの人為交配実験では、淡水性の太平洋型メスと遡河回遊性の日本海型オス間の雑種メス個体は不妊になる (Honma and Tamura, 1984)。この結果によると、「太平洋型から日本海型へ遺伝子浸透が生じた」という仮説は成り立たない。そこで、雑種の妊性について再検討する目的で、2 型の遡河回遊性個体を用いて交配実験を試みた。その結果、正逆交配ともに、F1 雑種の受精率・孵化率は、同型交配と同様に高い値を示した。また、F1 雑種個体を両方の型へ戻し交配した結果、F1 雑種メス個体では、正逆の戻し交配とも受精率・孵化率は高い値を示した。従って、上述した「太平洋型から日本海型への浸透」仮説は、細胞遺伝学的側面からも支持された。一方、F1 雑種オス個体の戻し交配では、太平洋型(P)メスと日本海型(J)オス間の F1 雑種(PJ)は受精率・孵化率ともに高い値を示したが、その逆の交配による F1 雑種(JP)では受精率・孵化率ともに低い値を示した。従って、F1 雑種が一部不妊であることが、2 型の核ゲノムの融合に対する部分的障壁として働いていると考えられる。

以上のことから、日本周辺のイトヨの進化プロセスは次のように考えられる。イトヨ 2 型は洪積世後期に地理的隔離 (日本海湖の成立) によって形成された後、太平洋型では、遡河回遊性集団から淡水性集団が多系統的に生じた。一方、日本海型ではそのような生活史の分岐は生じなかった。その後、物理的障壁の消滅によって、2 型が二次的接触した際に、交雑を介して太平洋型から日本海型への mtDNA 遺伝子浸透が生じたと推測される。従って、現在、イトヨ 2 型は核ゲノムで高い分化を保ちつつも、mtDNA は太平洋型から日本海型への浸透によって完全に置き換えられている。このような高度に分化した分類群間の大規模な遺伝子浸透は極めて稀な現象である。また、同所的生息地では生殖的隔離機構がよく発達していることから、現在の環境条件が続く限り、2 型は将来においても融合することなく、異なる分類群として維持されると推測される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 荒 井 克 俊
副 査 教 授 仲 谷 一 宏
副 査 助 教 授 後 藤 晃

学 位 論 文 題 名

Evolutionary process and introgression of mitochondrial DNA in threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, around Japan

(日本周辺におけるイトヨの進化過程とミトコンドリア DNA の遺伝子浸透)

申請者は、北半球の高緯度地方に周極的に分布し、形態・生態・遺伝的に極めて高い変異性を有するトゲウオ科の複合種イトヨを対象に、アロザイムとミトコンドリア DNA (mtDNA) を遺伝マーカーに用いて日本列島周辺に生息する2つの遺伝的系統(太平洋型と日本海型)の集団遺伝学的解析、淡水適応能の2型間比較実験、および交配実験などを行うことを通して、イトヨ太平洋型と日本海型の進化プロセスと mtDNA の異型間遺伝子浸透のメカニズムに関する研究を行い、以下の評価すべき結果を得た。

- 1) 日本、ロシアおよび北米から得られたイトヨ 15 集団を対象に、mtDNA の NADH dehydrogenase 5 and 6 領域(約 2600 塩基対)の制限酵素断片長多型(RFLP)解析を行った結果、日本の集団はイトヨ集団とハリヨ集団の2つの単系統群に分けられた。これは、アロザイム解析によって得られた太平洋型と日本海型の分岐という既往の結果と異なったことから、イトヨ2型は核ゲノムでは高度な分化を示すが、mtDNA では2型間で遺伝子浸透が生じていることを示唆する。
- 2) この2型間での遺伝子浸透は、太平洋型から日本海型へ、およびその逆方向で生じる可能性がある。しかし、2型が日本海湖を介して二次的接触した時期における有効集団サイズは太平洋型で著しく大きかったと推定されることから、その浸透方向は太平洋型から日本海型への方で起きたと推察される。
- 3) イトヨ日本海型は遼河回遊性集団のみから成るのに対し、太平洋型は遼河回遊性と淡水性の2つの生活史集団から構成される。後者の淡水性集団化形成されるプロセスを明らかにするため、mtDNA 調節領域前半部(242 塩基対)の塩基配列を決定し、5つの淡水性集団について遼河回遊性集団からの分化程度を推定した。その結果、福井県大野と福島県会津の淡水性集団は高い分化を示し、更新世後期に形成

されたものであるのに対し、岩手県大槌、北海道の錦多峰、大沼の淡水性集団は分化の程度が低く、完新世に形成されたものであると推察された。このことは、日本におけるイトヨの淡水性集団は太平洋型の遡河回遊性集団から多所的、多時的に起源したことを示す。

- 4) イトヨ日本海型に淡水性集団が派生していない原因を究明する一環として、飼育実験によって稚魚の淡水耐性を日本海型と太平洋型で比較した。その結果、淡水に長期間飼育された日本海型の稚魚では高い死亡率を示し、また甲状腺腫瘍を誘発することが観察された。この結果は、日本海型の稚魚は降海期にあたる時期を過ぎると淡水環境に対する適応能が著しく低下し淡水域に残留することが困難であることを示唆する。
- 5) イトヨ太平洋型と日本海型の同所的生息河川において、アロザイム遺伝子マーカーを用いて、2型間での雑種の出現頻度およびF₁雑種個体と戻し交配個体の交配パターンを調査した結果、両交雑個体とも経年的に低頻度で出現していることが明らかになった。しかし、F₁雑種の出現頻度は2型の親魚のランダム交配から求められる期待値より有意に低い値を示したため、2型間には同類交配を介した生殖的隔離が働いていると考えられる。また、F₁交雑と戻し交配における雌雄の型の組み合わせは、一方向的ではなく、双方向的であることが示された。この結果は、現在生息するイトヨ2型の同所的集団間で生じるmtDNAの異型間浸透は双方向的に起こっている可能性が高いことを示唆する。
- 6) 既往の報告では、淡水性の太平洋型雌と日本海型雄間の人為交配実験において、F₁雑種雌個体が不妊になることが示されている。もしこのことが正しければ、「太平洋型から日本海型への遺伝子浸透」という本研究での仮説が成り立たない。そこで、雑種の妊性を再検討するために、2型の遡河回遊性個体を用いて人為交配を行い、その妊性について調査した。その結果、正逆交配ともにF₁雑種の受精率・孵化率は同型交配と同様の高い値を示すことが明らかになった。また、F₁雑種個体を両型に戻し交配した場合、F₁雑種雌個体では戻し交配において高い受精率・孵化率を示した。一方、F₁雑種雄個体では戻し交配において日本海型雌と太平洋型雄のF₁雑種でのみ低い受精率・孵化率を持つことが明らかになった。このことから、2型間でのmtDNAの異型間浸透は「太平洋型から日本海型への方向で浸透した」とする仮説が細胞遺伝学的側面からも成り立つことが示された。

申請者による以上の研究成果は、水圏生物の多様性の実態とその起源の解明に大きく寄与するものであり、審査員一同は博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。