

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03728

研究課題名(和文) 侵略的外来種におけるボトルネック後の遺伝的多様性維持と低温適応機構解明

研究課題名(英文) Maintenance of genetic diversity after bottleneck and understanding low temperature adaptation mechanism in invasive alien species

研究代表者

牧野 能士 (Makino, Takashi)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：20443442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、短期間で過酷な寒冷地にも侵入したアメリカザリガニの高い環境適応能力の遺伝的基盤を明らかにすることである。アメリカザリガニの低温適応に関わる遺伝子座を推定するため、札幌、青森、鎌倉から採取したアメリカザリガニのゲノムDNAを用いてゲノムリシーケンスを実施した。その結果、札幌集団において頻度の高いアリルの近隣に低温応答する遺伝子を複数見出した。このうちRho GTPase regulating proteinをコードする遺伝子が、低温条件下の札幌集団で急激に発現量が上昇していた。これらの結果は、本遺伝子に関わる分子経路が札幌集団の低温への適応に寄与している可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではアメリカザリガニの低温適応に関わる複数の遺伝子候補を見出した。温度への適応は他の外来種の侵入・分布拡大メカニズムと共通する可能性が高く、外来種全体の侵入メカニズムの理解に繋がると期待できる。注目度の高い外来種の侵略性に関わるメカニズムの解明に取り組んだ本研究の社会的な意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to understand the genetic basis of the high environmental adaptability of *Procambarus clarkii*, which has been invaded to cold regions in a short period of time. Genome resequencing was conducted using genomic DNA of *P. clarkii* collected from Sapporo, Aomori, and Kamakura to estimate the loci involved in low temperature adaptation of the crayfish. As a result, we found several genes that respond to low temperature neighboring alleles that are highly frequent in a genome of the Sapporo population. Among these genes, the gene encoding Rho GTPase regulating protein showed a rapid increase in expression in the Sapporo population under low temperature conditions. These results suggest that a molecular pathway involving this gene may contribute to the adaptation of the Sapporo population to low temperatures.

研究分野：進化ゲノミクス

キーワード：適応進化

1. 研究開始当初の背景

北米原産のアメリカザリガニ(*Procambarus clarkii*)は世界的な侵略的外来種であり、アメリカ大陸のみならず、アジア、ヨーロッパ、アフリカにおいても爆発的に生息範囲を広げている。日本では1927年に、わずか20個体のアメリカザリガニが神奈川県鎌倉郡岩瀬の蛙養殖場に餌として輸入された。そこから逃げ出した個体が野外で繁殖するようになり、1950年代までに全国に分布を拡大したことが分かっている。アメリカザリガニが世界各地で独立に何度も侵入・定着に成功している背景には、日本へ侵入したケースのように少数個体から新規環境に適応して分布拡大できる遺伝的基盤が存在するためだと考えられる。

申請者らは、近年、寒冷地に侵入したアメリカザリガニの適応進化に着目した。本種は寒冷な北海道に定着することができなかったが、2000年以降になると札幌の河川で定着が確認されるようになった。申請者はこれまでに、寒冷な札幌に生息するアメリカザリガニの低温適応の可能性を調査するため、仙台市と札幌市でアメリカザリガニを採取して飼育し、F1世代の個体を用いて低温環境下(1°C)における生存時間分析を実施した。その結果、札幌集団の個体は仙台集団の個体よりも有意に低温条件下の生存時間が長いことが分かった。また、低温環境に応答する遺伝子の集団間の相違を調査するため、札幌と仙台と集団のそれぞれの個体から1°C環境下に暴露前、暴露後7日目のRNAを抽出し、遺伝子発現解析(RNA-seq)により低温に応答する遺伝子の相違を調査した。その結果、札幌の個体では低温に応答する発現変動遺伝子がわずか41であったのに対し、仙台の個体では1000以上が検出された。このことは、仙台集団の個体と比較して札幌集団の個体は低温暴露によるストレスの程度が小さく、札幌集団が低温環境に適応進化した可能性を示唆している。申請者らは、こうした集団間の温度応答のことなる遺伝子の中に、低温適応に関わる遺伝子が存在するのではと考えた。

2. 研究の目的

短期間で過酷な寒冷地に侵入したアメリカザリガニの高い環境適応能力の遺伝的基盤を明らかにするため、国内集団の個体を用いた遺伝子発現解析を行い、低温に応答する遺伝子の相違を検出する。また、各集団のゲノムリシークエンスデータを用いて、寒冷地集団で特異的に自然選択の働いた領域を推定する。さらに、札幌集団(寒帯)と沖縄集団(亜熱帯)の個体を交配させてF2雑種を作出し、QTL解析による低温耐性責任遺伝子を推定する。こうして得られた候補遺伝子の機能を調査し、本種の低温適応の分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) QTL-seqによる低温適応に関わるゲノム領域の推定

QTL-seqは、次世代シークエンサーを用いて量的遺伝子座位(QTL)を迅速に同定する手法である。低温耐性に関わる遺伝子領域を同定するため、低温適応集団(札幌)と低温非適応集団(沖縄)からアメリカザリガニのサンプリングを行った。飼育施設内において、札幌集団の個体と沖縄集団の個体を掛け合わせて、F1雑種を作出した。さらに、F1雑種(札幌 x 沖縄)を掛け合わせてF2雑種を得た。こうしてF1雑種の掛け合わせで得られたF2個体を低温1°C環境下に暴露して低温に対する耐性が弱いグループ(早期に死亡した25個体)、および、低温に対する耐性が強いグループ(長期間にわたり生存した25個体)のそれぞれからゲノムDNAを抽出してQTL-seqを実施する予定であった。しかしながら、低温耐性実験において全てのF2個体が長期間生存できず3日以内に死亡したため、計画していたQTL-seqを実施することができなかった。

(2) 低温適応に関わる自然選択の検出

各集団の遺伝的多様性調査、及び、寒冷地集団特異的に自然選択を受けたゲノム領域を検出するため、各集団のゲノムリシークエンスを実施する。リファレンスとなるアメリカザリガニの全ゲノム配列(ゲノムサイズ2.6Gb)は決定済である(牧野ら未発表)。札幌集団、青森集団、鎌倉集団の8個体からゲノムDNAを抽出し、等量のDNAをプールして150bp paired-endライブラリを作成した。DNAの配列には次世代シークエンサーIllumina HiSeqシリーズを用いて、各集団のゲノムカバレッジが10xとなるよう配列決定を行った。DNA配列決定後、BWAを用いてshort readをリファレンスとなるゲノム配列へのマッピングし、samtools、bcftoolsで多型座位(SNPs)を検出した。各集団のSNPsを用いて遺伝的多様性の指標となるFSTを計算し、PBSを推定した。こうして得られたPBSを解析し、札幌で特異的にアレル頻度の高い領域を探索した。

4. 研究成果

(1) QTL-seq による低温適応に関わるゲノム領域の推定

アメリカザリガニの低温応答に関わるゲノム領域の絞り込みのため QTL-seq を計画した。低温適応集団(札幌)と低温非適応集団(沖縄)を掛け合わせて F1 雑種を作成し、その F1 雑種を掛け合わせて F2 雑種を得た。1℃低温条件下に暴露した全ての F2 個体が 3 日以内に死亡した。温度に対する応答が異なる 2 集団を交配することで、多様な感受性を示す F2 が得られると期待したが、札幌集団で観察されたような強い低温耐性を示す個体は得られなかった。低温への適応に関わる遺伝子が複数存在しており、強い低温耐性を示す遺伝子型の組み合わせが本実験では得られなかった可能性がある。

(2) 低温適応に関わる自然選択の検出

アメリカザリガニの低温適応に関わる遺伝子座を推定するため、札幌、青森、鎌倉から採取したアメリカザリガニのゲノム DNA を 8 個体ずつをプールして次世代シーケンサーでリシーケンスを実施した。得られた SNP データを用いて PBS (population branch statistics) を計算し、札幌集団に特異的な遺伝子座の絞り込みを実施した。また、札幌集団と仙台集団の低温条件下で実施した RNA-seq 解析の結果と比較を行なった。PBS0.5 以上であった 29 万座位中トップ 10 に入る SNP の近隣に、札幌集団で特異的に低温応答する遺伝子 (PROCLA012775) が存在することを見出した。

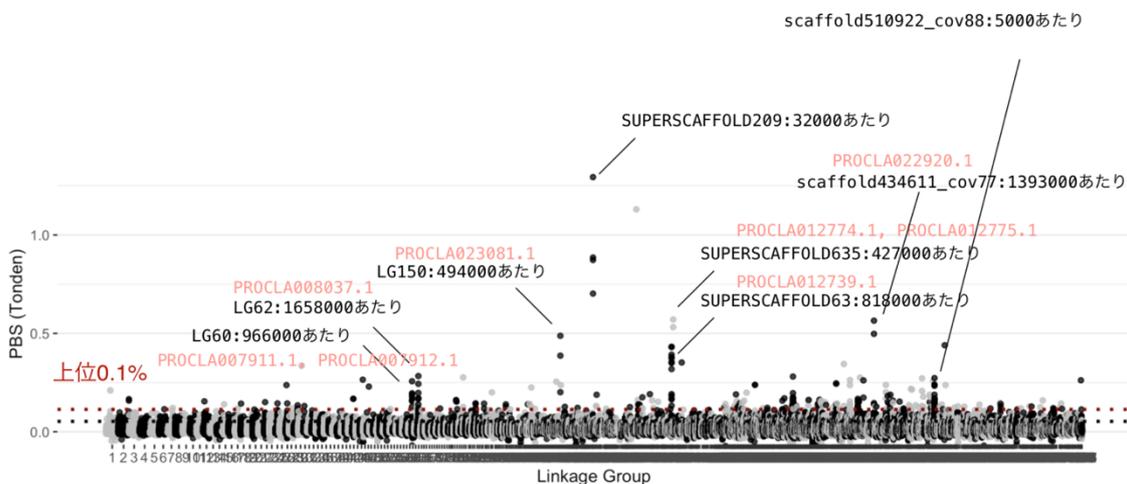


図 1. 札幌(屯田川)集団特異的にアレル頻度の高いゲノム領域

本遺伝子は 1℃という低温 1 週間の条件下において、仙台集団よりも札幌集団において統計的に有意に発現量が高かった。さらに低温条件下 1 ヶ月後において札幌集団で急激に発現量が上昇することが明らかとなった(図 2)。本遺伝子は、Rho GTPase regulating protein をコードしているため、本遺伝子が制御すると考えられる 2 つの Rho GTPase パラログの発現パターンを調査したところ、いずれも札幌集団特異的に低温に反応して発現量が上昇し、Rho GTPase regulating protein と似た発現パターンを示した。

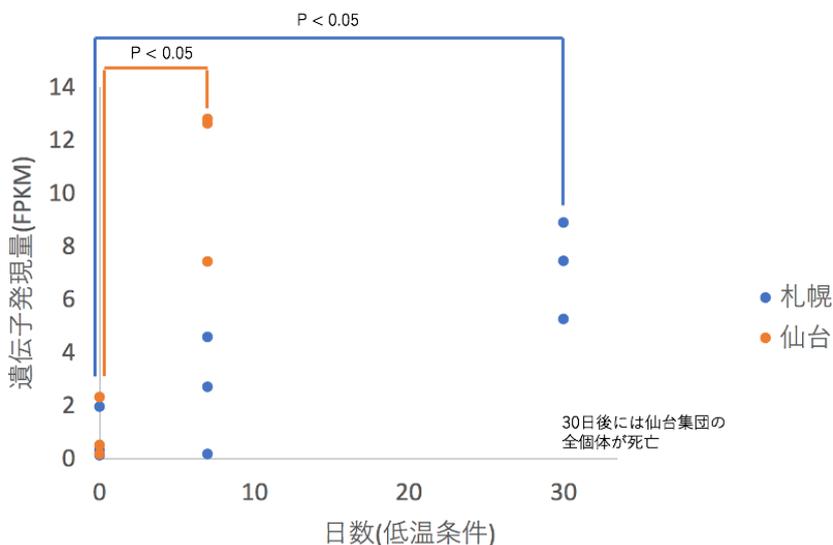


図 2. Rho GTPase regulating protein (PROCLA012775) の低温条件下における遺伝子発現変化

Rho GTPase は、細胞骨格の制御に関わる遺伝子である。Rho GTPase を制御する Rho GTPase regulating protein と温度適応との関連はこれまで報告されていないが、上述の結果は、本遺伝子群が関わる分子経路が札幌集団の低温への適応に寄与している可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Kouji Takeda, Yururi Manami, Jitsuno Masataka, Uchino Masataka, Furusho Tadasu, Takeuchi Masatoshi Komatsu Kenji, Makino Takashi and Asanuma Shigeru | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 An impact of biological pigments as teaching material | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Open Access Government | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yoshida K, Ravinet M, Makino T, Toyoda A, Fujiyama A, Kokita T, Mori S, and Kitano J. | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Accumulation of deleterious mutations in landlocked threespine stickleback populations | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Genome Biology and Evolution | 6. 最初と最後の頁 479-492 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/gbe/evaa065 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Yamasaki M, Makino T, Khor SS, Toyoda H, Miyagawa T, Liu X, Kuwabara H, Kano Y, Shimada T, Sugiyama T, Nishida H, Sugaya N, Tochigi M, Otowa T, Okazaki Y, Kaiya H, Kawamura Y, Miyashita A, Kuwano R, Kasai K, Tanii H, Sasaki T, Honda M, Tokunaga K | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Sensitivity to gene dosage and gene expression affects genes with copy number variants observed among neuropsychiatric diseases | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 BMC Medical Genomics | 6. 最初と最後の頁 55 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12920-020-0699-9 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Makino T and Kawata M | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 Invasive invertebrates associated with highly duplicated gene content | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Ecology | 6. 最初と最後の頁 1652-1663 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/MEC.15019 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Cao P, Kumagai N, Inoue T, Agata K and Makino T. | 4. 巻 11(2) |
| 2. 論文標題 JmjC domain-encoding genes are conserved in highly regenerative metazoans and are associated with planarian whole-body regeneration | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Genome Biology and Evolution | 6. 最初と最後の頁 552-564 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/gbe/evz021 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

| |
|--------------------------|
| 1. 発表者名 牧野能士 |
| 2. 発表標題 生態系が駆動するゲノム進化 |
| 3. 学会等名 日本生態学会(招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 牧野能士 |
| 2. 発表標題 Genome evolution of vertebrates after whole genome duplications |
| 3. 学会等名 日本分子生物学会(招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takashi Makino |
| 2. 発表標題 Invasive animal genomes with high duplicated gene content |
| 3. 学会等名 第6回生命医薬情報学連合大会(招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

進化ゲノミクス研究室
<https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/evolgenomics>

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|