

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04606

研究課題名(和文) 適応放散の分子機構解明に向けたビクトリア湖沼生物ゲノムの多様性の網羅比較

研究課題名(英文) Comparative genomic analyses of cichlids and other organisms in Lake Victoria to understand molecular mechanism of adaptive radiation

研究代表者

二階堂 雅人 (Nikaido, Masato)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：70432010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は東アフリカのビクトリア湖に生息するシクリッドの適応放散や平行進化が、祖先多型(SGV)由来のアリルに自然選択が働くことで達成されたとの仮説を提唱し、その検証をおこなった。計3回の野外調査により、ビクトリア湖、タンガニカ湖のシクリッド標本を約40種、500個体収集した。ビクトリア湖産シクリッド3種18個体について、DxyとFstに着目した全ゲノム解析の結果、種間で高度に分化した遺伝子を網羅的に単離することに成功し、その中にはSGV由来の遺伝子が数多く含まれることが分かった。本研究によりシクリッドの種分化や適応にはSGVに由来する遺伝子が数多く関与していることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

適応進化や平行進化のメカニズムについては、自然選択による斬新的なステップの積み重ねによって進化が達成されるとする既存のダーウィン進化論のみでの説明は難しく、それに加えて新たな進化理論による説明が必要であった。本研究は、祖先状態において存在する多型に自然選択が働くことで適応放散が達成される可能性を示した。このことは1800年代から続く進化論争に新しい概念を生み出すものであり、現在の地球上における生物多様性の理解にも大きな貢献をするものと考えており、その学術的・社会的な意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We proposed and examined the hypothesis that the adaptive radiation and parallel evolution of cichlids of Lake Victoria, was achieved through natural selection on alleles derived from standing genetic variation (SGV). During a total of three field surveys, we collected about 500 cichlid specimens for 40 species of Lake Victoria and Lake Tanganyika, some of which were used for whole genome analysis. We performed whole genome wide population genetic analyses on 18 cichlids (six individuals for three species each) by focusing on Dxy and Fst. As a result, we succeeded in isolating highly differentiated genes among Lake Victoria cichlid species, and found that many of them are derived from SGV. This study strongly suggests that a substantial number of SGV-derived genes are involved in the speciation and adaptation of cichlids.

研究分野：進化生物学

キーワード：シクリッド 適応放散 ゲノム比較 平行進化 集団遺伝 野外調査 ビクトリア湖 東アフリカ

## 1. 研究開始当初の背景

東アフリカのビクトリア湖に生息するシクリッドは、その適応放散からわずか 15000 年の間に、数百種を超え形態的・生態的にも莫大な多様性を獲得しており、これは適応放散の典型的な例として研究者に注目されている。また、ビクトリア湖産シクリッドは遺伝的に単一のグループであるにもかかわらず、他の東アフリカの湖(マラウィ湖、タンガニカ湖)に生息するシクリッドと極めて似た形質をもつ種が数多く存在しており、これは平行進化の典型的な例としても注目されている。一般に種の分化や新規形態の獲得には、いくつかの形質が同時に(複合的に)進化する必要があり、段階的な進化を仮定する既存のダーウィン進化論ではその説明が難しいと考えられている。つまり、1つの形質のみが進化しただけではその器官は不十分なものとなり個体の適応度が著しく低下し(適応度の谷と呼ばれる)、複数の形質が同時に進化することで初めてその個体が適応的になると予想される。この複数の形質が一度に進化することで起こる新規形態の獲得、ひいては種分化の分子機構を明らかにするのが、現代進化論に残されたもっとも大きな課題の1つとなっている。特に、急速な適応放散を遂げたビクトリア湖産シクリッドは過去にこのような適応度の谷を繰り返し乗り越えてきたと予想され、これがいかなる機構によって達成されたのかについては、様々な議論がなされているが、これまでに統一的な見解は得られないままである。我々はこれまでに、上記シクリッドを中心的な研究題材として用い、この問題解決に取り組んでいる。

## 2. 研究の目的

ビクトリア湖産シクリッドは極めて短期間で適応放散を遂げたことから、我々はそのシクリッド種間における DNA 配列にはほとんど差がないと予想し、その数少ない種分化候補遺伝子の探索を続けてきた。そして、我々はこれまでに、シクリッドの集団遺伝解析(Mzighani et al. 2010 *GENE*)、全ゲノム配列の決定(Brawand et al. 2014 *Nature*)、嗅覚・フェロモン受容体遺伝子解析(Nikaido et al. 2013 *GBE*, Nikaido et al. 2014 *GBE*)をおこなってきたところ、実はビクトリア湖産シクリッドの種や集団間においては、予想外に DNA 配列の差が大きいことが分かってきた。特に興味深いことには、ビクトリア湖内に生息する種間における DNA 多型が、1000 万年前に放散を遂げたタンガニカ湖のシクリッドとの共通祖先にまで遡ることも明らかにした(Nikaido et al. 2014 *GBE*)。以上のことから、ビクトリア湖産シクリッドの祖先集団ではすでに大きな遺伝的多型(Standing Genetic Variation: SGV)が存在し、その多型の中に含まれる機能的なサイトに自然選択が働き各種ゲノムに固定することで、急速な多様化が可能になったことが予想された。さらには、その多型がタンガニカ湖やマラウィ湖のシクリッドとの共通祖先の頃から維持されてきたことも予想されている。これを我々は適応放散における SGV 仮説と名付け、その検証をおこないたいと考えている。SGV が湖間で共有されていることは、各湖における似た表現型がこの SGV 由来である可能性も大きい。つまり、SGV 仮説は、適応放散と平行進化という二つの現象を、ゲノム中に存在する多型(および自然選択)で同時に説明できる点において優れている。我々はこの仮説をゲノムレベルで検証するために、まず適応放散を遂げたビクトリア湖産シクリッドの多くの種、個体についてそのゲノム配列を網羅的に比較することで、種間および集団間における多型がどれだけ存在するかを集団遺伝学的な解析によって推定する。さらには、ビクトリア湖産シクリッドにおいて見つかった多型サイトについて、他湖産および河川産シクリッド個体のゲノム配列と比較することで、ビクトリア湖産シクリッドのゲノム中に存在する多型の起源がどれだけ古くに遡るかを推定し、それと同時にその多型サイトに働く自然選択の痕跡の有無(選択的一掃、非同義置換率の上昇等)も検証していく。加えて、東アフリカ三大湖において適応放散を遂げていない湖沼生物種について、その SGV の有無や程度をシクリッドと比較することで、SGV と適応放散(平行進化)の相関性を見出す。

## 3. 研究の方法

上記目的を達成するために、まずは野外調査による網羅的なサンプリングをおこなった。まず、シクリッドの DNA 解析や生態調査に実績のある日本グループ(東京工業大、東京農業大、兵庫県立大)およびタンザニア水産研究所(TAFIRI)が協力体制を構築し、三大湖の湖沼生物群の採集調査を進め、さらには各生物群における生態形質データの収集をおこなった。野外調査はビクトリア湖畔に位置する TAFIRI ムワンザ支所を拠点としておこなった。タンザニア国内の移動については、現地旅行代理店 JATA Tours の協力を受けた。採集したシクリッドおよび湖沼生物種に関しては、次世代シーケンサーを用いたゲノム決定をおこない、ドラフトゲノム配列の構築、および mapping をおこなった後、SNPs 抽出から集団遺伝学的解析をおこなった。

## 4. 研究成果

### 野外調査

本研究に関わる野外調査を計 3 回、通算 66 日間行った。第 1 回野外調査は 2018 年 1 月から 2 月にかけて実施した。調査地はタンザニア連合共和国ムワンザ州で、本州に面するヴィクトリア湖より標本採集を行った。本湖に生息し爆発的適応放散を経験したシクリッドを約 30 種 300 個体、

同時期に湖に生息しながらも爆発的適応放散が起きなかったその他生物(トゲウナギ, ティラピア, ナマズなど魚類から4種、ヌマエビなど非脊椎動物から2種)、各種30個体を採集した。本調査は、研究協力者である相原光人(東京工業大学)により実施された。第2回野外調査は2018年8月に実施した。調査地はザンビア共和国ムプルング州で、本州に面するタンガニカ湖より標本採集を行った。本湖に生息するシクリッドで、ヴィクトリア湖産シクリッドの姉妹群とされる *Astatotilapia burtoni*、および、前回調査でヴィクトリア湖より採集された生物の同属種を各30個体採集した。本調査は、研究分担者である高橋鉄美(兵庫県立大学)により実施された。第3回野外調査は2019年12月に実施した。調査地は第1回同様ムワンザ州で行われた。第1回調査で個体数の不足していたシクリッドおよびティラピア、トゲウナギなどを重点的に採集し、それぞれ集団遺伝学的解析に十分な個体数の確保に成功した。本調査は、研究協力者である相原光人(東京工業大学)により実施された。

#### ゲノム配列の決定、集団遺伝学解析

生息域の異なる野生ビクトリア湖産シクリッド3種 (*Haplochromis chilotes*, *H. sauvagei*, *Lithochromis rufus*) 各6個体・計18個体について、次世代シーケンサーを用いた全ゲノムDNA配列の取得をおこなった。*H. chilotes* に関してはドラフトゲノム配列を構築した (Total length: 798Mbp, Scaffold N<sub>50</sub>: 1.5Mbp)。そのドラフトゲノム配列に対して、各18個体の short read data を mapping することで SNPs を抽出し、それらを集団遺伝学解析に用いた。まず種間の分化度を示す *Fst* を算出したところ、全ゲノム平均で 0.1-0.2 程度にとどまり、ゲノム配列の分化度は極めて低いことが明らかとなった。また、これら3種の SNPs を指標に PCA 解析をおこなったところ、3種はそれぞれのクラスターにまとまることがわかった。続いて、smc++ プログラムを用いた集団サイズ推定をおこなったところ、*H. chilotes* および *H. sauvagei* 共に2万年前に集団の縮小を経験して2000年前にそれらが回復したの対し、*L. rufus* においては集団縮小は検出されず、集団サイズが他2種と比較して大きかったことがわかった。この解析により、それぞれの種は異なる集団動態の経験していると推定される。続いて、本研究の主題とも言える SGV 遺伝子探索をおこなった。具体的には、全ゲノム配列をスキャンして、*Fst* を算出し、その上位0.5%に入る領域、つまりは種間でゲノムが分化している領域を探索した。同時に配列の相違度に基づく指標 *Dxy* も算出し、*Fst* と *Dxy* のどちらも高い領域 (highly differentiated region: HDR) を探索した。この手法により、ビクトリア湖内において種の分化に関わり、さらには SGV 由来である遺伝領域が効率的に抽出できることになる。上位0.5%の *Fst* は、0.6-0.7 であり、全体平均とは有意に高い。この解析により、全ゲノム中において、計678個の HDR gene を単離することに成功した。これにより取れてきた遺伝子の中には、過去に他グループが QTL mapping により単離に成功した縞模様形成遺伝子 (*asip2b*) も含まれており、我々のゲノムワイド解析がこれらの適応遺伝子を探査する上で感度や正確性において優れていることが示された。この遺伝子以外にも、細胞外マトリクスの再構築に関わる *Cathepsin L*、概日リズムを調整する *Period 3*、フェロモン受容体候補の *TAAR*、血液の凝集に関わる *fibrinogen* などが種間での分化度が高く、シクリッドの適応に関与した可能性が強く示唆された。種間での分化度が高かったもので、かつ *Dxy* 値も高かったものも数多く単離されたが、中でも collagen A6a, A6b 遺伝子に関しては、典型的な SGV 由来であることが明らかとなった。この遺伝子領域は約50kbpの領域において種間で分化しており、強い positive selection を受けていると推察される。さらにこの遺伝子領域に関して、ビクトリア湖に加えてマラウイ湖、タンガニカ湖のシクリッドを含めて系統樹を作成したところ、それらの種の系統樹とは大きく矛盾しており、これは collagen A6a, A6b アリルが SGV として維持されてきたことを示している。

本研究では、野外調査によって採集した野生個体のシクリッドに関して、我々が新たに開発した *Fst* と *Dxy* の2つを指標にした全ゲノム配列の網羅的比較により、東アフリカ産シクリッドには多くの SGV が存在し、それらは極めて近縁なはずのビクトリア湖産シクリッドの種間において、遺伝的多様性の付与に貢献していることがわかった。さらには、この SGV 由来のサイトに自然選択が働くことで種分化・適応が起きたことが推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Takuno S, Miyagi R, Onami J, Takahashi-Kariyazono S, Sato A, Tichy H, Nikaido M, Aibara M, Mizoiri S, Mrosso DJH, Mzighani S, Okada N, Terai Y.	4. 巻 19
2. 論文標題 Patterns of genomic differentiation between two Lake Victoria cichlid species, <i>Haplochromis pyrrhocephalus</i> and <i>H. sp. 'macula'</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Evolutionary Biology	6. 最初と最後の頁 68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1186/s12862-019-1387-2	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 Nozaki H, Matsuzaki R, Kashindye BB, Ezakiel CN, Kawachi M, Aibara M, Nikaido M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Morphology, phylogeny, and taxonomy of two species of colonial volvocine green algae from Lake Victoria, Tanzania.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0224269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1371/journal.pone.0224269	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 Nikaido, M.	4. 巻 94
2. 論文標題 Evolution of V1R pheromone receptor genes in vertebrates: diversity and commonality.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 141, 149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1266/ggs.19-00009	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20件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 河村理輝, 二階堂雅人
2. 発表標題 シクリッドのフェロモン受容体候補V1R2の機能解明
3. 学会等名 第6回 ケモビ研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村遥奈、畑島諒、相原光人、二階堂雅人
2. 発表標題 全ゲノム配列解析によるヴィクトリア湖産シクリッド3種の適応機構の解明
3. 学会等名 第1回遺伝学会分科会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 樋口拓人、西原秀典、梶谷嶺、伊藤武彦、二階堂雅人
2. 発表標題 東アフリカシクリッドゲノムにおける祖先多型遺伝子座の起源
3. 学会等名 第1回遺伝学会分科会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二階堂雅人
2. 発表標題 シクリッド(熱帯魚)の唇肥大化に関わる遺伝子メカニズム
3. 学会等名 第1回再生学異分野融合研究会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 樋口拓人、西原秀典、梶谷嶺、伊藤武彦、二階堂雅人
2. 発表標題 東アフリカ産シクリッドの全ゲノムを対象にした祖先多型遺伝子座の網羅的探索
3. 学会等名 日本進化学会第20回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水翔子、河村理輝、二階堂雅人
2. 発表標題 シクリッドにおけるフェロモン受容体候補 V1R2遺伝子の発現解析
3. 学会等名 日本進化学会第19回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 二階堂雅人
2. 発表標題 アフリカの湖で起きた適応放散 シクリッド進化の分子基盤に迫る
3. 学会等名 第70回 日本動物学会関東支部会 公開シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村遥奈、相原光人、豊田敦、伊藤武彦、二階堂雅人
2. 発表標題 全ゲノム配列解析による異なる湖底環境に生息するヴィクトリア湖産シクリッド3種の適応過程の解明
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 畑島諒、豊田敦、梶谷嶺、伊藤武彦、二階堂雅人
2. 発表標題 シクリッドにおける唇肥大化の平行進化メカニズム
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村遥奈、相原光人、豊田敦、伊藤武彦、二階堂雅人
2. 発表標題 全ゲノム配列解析による異なる湖底環境に生息するヴィクトリア湖産シクリッド3種の適応過程の解明
3. 学会等名 第2回日本遺伝学会春季分科会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 二階堂雅人
2. 発表標題 ゲノム比較から迫るビクトリア湖産シクリッドの適応放散のメカニズム
3. 学会等名 日本魚類学会年会シンポジウム「古代湖における魚類の適応進化と種多様性創出」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 樋口拓人、西原秀典、梶谷嶺、豊田敦、伊藤武彦、岡田典弘、二階堂雅
2. 発表標題 東アフリカ産淡水魚シクリッドゲノムにおける祖先多型遺伝子座の起源
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 畑島諒、鈴木健太、豊田敦、梶谷嶺、伊藤武彦、二階堂雅人
2. 発表標題 シクリッドの唇肥大化における平行進化の遺伝的メカニズム解明
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤崎花美、小郷卓博、鈴木彦有、二階堂雅人
2. 発表標題 糸鱸類の全ゲノム重複に伴うOMP遺伝子の進化多様性について
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 樋口拓人, 西原秀典, 梶谷嶺, 豊田敦, 伊藤武彦, 岡田典弘, 二階堂雅人
2. 発表標題 Persistence of massive standing genetic variation in East African cichlids illuminated by genome-wide SINE insertion analyses
3. 学会等名 日本進化学会第21回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村遥奈, 畑島諒, 豊田敦, 伊藤武彦, 二階堂雅人
2. 発表標題 Genomic signatures for distinct adaptation processes among three cichlid species of Lake Victoria
3. 学会等名 日本進化学会第21回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二階堂雅人
2. 発表標題 ゲノム比較解析から迫るシクリッドの適応放散のメカニズム
3. 学会等名 遺伝学研究所進化セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 野崎久義、松崎令、Benedicto B. Kashindyе、Charles N. Ezekiel、河地正伸、相原光人、二階堂雅人
2. 発表標題 タンザニア・ヴィクトリア湖産群体性ボルボックス目
3. 学会等名 第43回 日本藻類学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hisayoshi Nozaki, Ryo Matsuzaki, Benedicto Boniphace Kashindyе, Charles Nyarongo Ezekiel, Masanobu Kawachi, Mitsuto Aibara, and Masato Nikaido
2. 発表標題 Colonial volvocines from Lake Victoria, Tanzania
3. 学会等名 Volvox 2019 in Tokyo (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河村理輝, 二階堂雅人
2. 発表標題 シクリッドのフェロモン受容体候補V1R2の機能解明
3. 学会等名 第6回 ケモビ研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 二階堂雅人	4. 発行年 2019年
2. 出版社 一色出版社	5. 総ページ数 34
3. 書名 閉ざされた湖で起こった進化：アフリカンシクリッドの世界「遺伝子から解き明かす魚の不思議な世界」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

三階堂研究室

<http://www.nikaido.bio.titech.ac.jp/>

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
研究分担者	佐々木 剛  (Sasaki Takeshi)  (00581844)	東京農業大学・農学部・教授   (32658)	
研究分担者	高橋 鉄美  (Takahashi Tetsumi)  (70432359)	兵庫県立大学・自然・環境科学研究所・教授   (24506)	
研究協力者	相原 光人  (Aihara Mitsuto)	東京工業大学・生命理工学院・特別研究員   (12608)	