

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06202

研究課題名(和文) 集団ゲノミクスで探るカレイ科姉妹種の集団構造と対照的な卵形質の遺伝的基盤

研究課題名(英文) Population genomics of two congeneric flatfish species having contrasting egg traits

研究代表者

池田 実 (Ikeda, Minoru)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：70232204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マコガレイとマガレイは同属だが、前者は粘着沈性卵、後者は分離浮性卵という対照的な卵形質を示す。この卵形質の差異は種内の集団構造に反映されているはずである。全国各地の標本集団についてミトゲノムの分析を行った結果、マコガレイでは15.8%もの遺伝的分化が認められ、7グループに分かれた。マガレイでは0.04%でほぼ均質であった。核ゲノム中の2万から3万個のSNPsを用いて集団構造を調べた結果、マコガレイはミトゲノムの分析結果と一致した。一方、マガレイにおいても海域ごとに有意な分化が検出されたが、程度は小さかった。以上の結果から、2種の卵形質の差異は集団構造によく反映されていると結論できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、同属ではあるが、粘着沈性卵を産むマコガレイと分離浮性卵を産むマガレイについて集団ゲノミクス解析(核DNAにおける大量のSNPs分析とミトコンドリアDNA分析)を行なった。その結果、マコガレイでは海域ごとに著しい遺伝的分化が認められ、7グループに分かれた。一方、マガレイではSNPs分析で微弱な遺伝的分化が検出されはしたもののほぼ均質であった。これらの結果は、卵形質の差異が集団構造に影響するという予測を支持するものであり、両種の資源管理に関して有用な情報を提示する。また、両種の参照ゲノム配列を構築中であり、卵形質の多様化に関する遺伝的基盤を探索する準備が整えられつつある。

研究成果の概要(英文)：Although marbled and yellow striped flounders belong to the same genus, the two species exhibit contrasting egg traits: adhesive demersal eggs in the former and isolated pelagic eggs in the latter. This difference in egg traits should be reflected in the population genetic structure within the species. To examine this prediction, population genomic analyses were conducted on both species sample populations collected from the coast of Japan. The mitogenomic analysis revealed that highly genetic differentiation occurred among marbled flounder populations, divided into seven local groups. In contrast, the populations of yellow striped flounder were homogeneous. The results of RAD-Seq analysis using more than 20,000 SNPs in the nuclear genome were consistent with those of the mitogenomic analysis, aside from the detection of weak differentiation among the yellow striped populations. These results support the prediction that differences in egg traits affect the genetic population structure.

研究分野：水産遺伝学

キーワード：マコガレイ マガレイ 卵形質 粘着沈性卵 分離浮性卵 ミトコンドリアDNA RAD-Seq 集団ゲノミクス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

マガレイ *Pseudoleuronectes herzensteini* とマコガレイ *P. yokohamae* は、日本列島沿岸に広く分布する沿岸漁業の重要種である。両種は同じマガレイ属のカレイ類であるが、両者間で際立って異なっているのは初期生態である。マガレイは殆どのマガレイ属のカレイ類と同様に分離浮性卵を産むのに対し、マコガレイは例外的に粘着沈性卵を産む。上記の予測に従えば、マガレイの海域間での遺伝的分化は低く、反対にマコガレイは高いことが予測される。しかしながら、両種とも集団構造に関する全国的な調査は今までに行われておらず、沿岸漁業の重要種でありながら、遺伝的多様性保全の観点に基づいた系群の設定や種苗放流の地理的許容範囲について明らかにされてこなかった。種内の遺伝的多様性に関する知見の乏しい2種であるが、実は「浮性卵」と「沈性卵」の遺伝的基盤を探索する上で非常に良い研究材料となりうる。「浮性卵」を産するイワシと「沈性卵」を産するニシンのゲノムを比較しても、両者は系統的に大きく離れており、種間差が大きすぎるために、どの領域が卵形質の多様化をもたらしているのか絞り込むことが困難である。一方、共通祖先から最近分かれた姉妹群であればゲノムの共通性が高く、差異の見られる領域は比較的少ないと考えられる。中立進化で想定されるよりも高い種間差が見られる領域の中から、卵形質の多様化をもたらす候補遺伝子(群)を特定できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は2つの目的を持つ。まず「浮性卵」と「沈性卵」という対照的な初期生態を持ち、沿岸漁業の重要種でもあるマガレイとマコガレイについて、ゲノムワイドなDNAマーカーを用いた集団遺伝学的調査により日本列島沿岸における集団構造を解明し、両種の資源管理に対して貢献可能なデータを提示する。次に、2種が同属の姉妹群で、対照的な形質の遺伝的基盤を明らかにする上で格好の研究材料となりうるという特性を活かし、2種のゲノム情報をベースとして、「浮性卵」と「沈性卵」の遺伝的基盤を探索し、魚類にあまねく見られる卵形質の多様化についての基礎的知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 標本集団

2007-2017年に上磯、陸奥湾、大槌湾、女川湾、仙台湾、茨城沖、銚子沖、東京湾、相模湾、浜名湖、伊勢・三河湾、大阪湾、播磨灘、燧灘、周防灘、新潟沖、能登島、若狭湾、鳥取沖、博多湾および有明海の計21地点において、漁獲または釣獲されたマコガレイの稚魚あるいは成魚の冷凍またはエタノール固定された標本1,000個体を対象とした。マガレイは2016-17年に枝幸沖、余市沖、厚岸沖、陸奥湾、仙台湾、新潟沖の6地点で漁獲された成魚の冷凍標本計277個体を対象とした。標本集団の一部には、DNAが断片化している場合もあり、このような標本はRAD-Seq分析には不適であるため、2021年度に同一地点の標本を適宜入手して分析を行なった。

(2) ミトコンドリアDNA分析

各個体の鱗を試料としてDNAを抽出し、mtDNAの調節領域前半部(378bp)、ND2前半部(750bp)およびCyt b前半部(750bp)の領域をPCR増幅したのちダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を取得した。

(3) RAD-Seq分析

RAD-seq分析は、制限酵素SpeIを用いて得られた各個体のDNA断片をNextSeq 500によりシーケンス(75bpのシングルリード、36個体/1ラン)により得られたリードをStacksのprocess_radtagsを用いて個体ごとにデータを分別した。FASTX-toolkitのFastq_quality_filterにより、Qスコア ≥ 20 を基準としてリードのベースコールクオリティが低いリードを除去した。その後、Stacksのdenovo_map.plにより、de novoジェノタイピングを行った。ジェノタイピングコールの際は、①全個体の75%以上の個体が存在すること、②遺伝子座のマイナーアレル頻度が5%以上であること、③1つのRAD-tag(=75bpのリード)に複数のSNPsが検出された場合、ランダムに1RAD-tagにつき1SNPに限定することを条件とした。また、Vcftoolsを用いて、座ごとのカバレッジを計算し、その平均を算出した。シーケンスエラーやPCR duplicateによるジェノタイピングエラーを除去するため、Vcftoolsにより各座のカバレッジを30以上95以下に限定し、それ以外の座をmissing-data扱いとした。なお、これらの分析および解析にあたっては山本佑樹氏(国立研究開発法人水産研究・教育機構水産資源研究所水産資源研究センター)の協力を得て実施した。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア DNA 分析

マコガレイについて、調べた 3 領域の塩基配列データを繋げてハプロタイプを分類し、標本集団間の遺伝的分化の程度を AMOVA 分析により算出したところ、15.8%と海産魚類としては極めて高い値が得られた。標本集団間の純塩基置換率 (d_A) を算出して、多次元尺度構成法 (MDS) により相互の遺伝的類縁関係について検討した結果を図 1 に示す。東京湾や相模湾、有明海と博多湾、伊勢・三河湾と浜名湖が他の 15 集団とは大きく離れた関係となった。他の 15 集団は相互に近い関係となったが、その配置関係は地理的位置の関係とよく一致した。

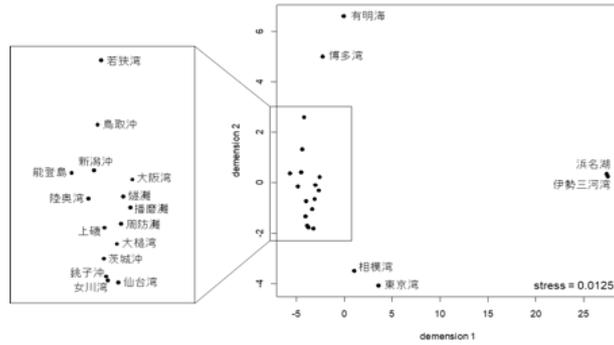


図 1. ミトコンドリア DNA 分析によるマコガレイ標本集団の遺伝的類縁関係

さらに、SAMOVA と Barrier 解析により、最適な遺伝的グループの数およびグループ間の遺伝子流動に関する障壁について検討した結果、全集団は 7 地域グループ (日本海北部、日本海南部、東北太平洋、関東、中部、瀬戸内海、九州) に分かれ、グループ間には顕著な遺伝子流動の制限が生じていることが明らかとなった。

一方、AMOVA によって算出されたマコガレイ標本集団間の遺伝的分化の程度は 0.04% で有意な値ではなく、広範な遺伝子流動が生じており、海域間の遺伝的均質性をもたらしているものと考えられた。

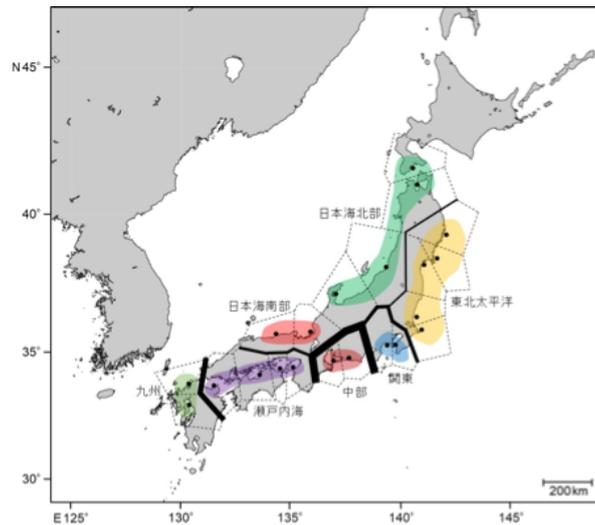


図 2. マコガレイの遺伝的グループと遺伝的障壁 (黒の実線)

(2) RAD-Seq 分析

マコガレイでは 29,849 個の SNPs を収集できた。PCA 解析を行なった結果、ミトコンドリア DNA 分析の場合とほぼ同様のグループ構造が検出された。個体間の遺伝的距離を算出し、NeighborNet 法によりネットワーク樹状図を作成した結果、グループごとのクラスターが形成された。グループ内では、同一の標本集団に属する個体が近縁である場合が多く、湾ごとに集団

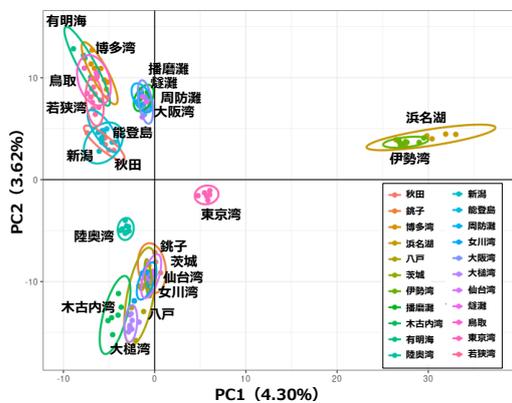


図 3. RAD-Seq データに基づくマコガレイ集団の PCA プロット

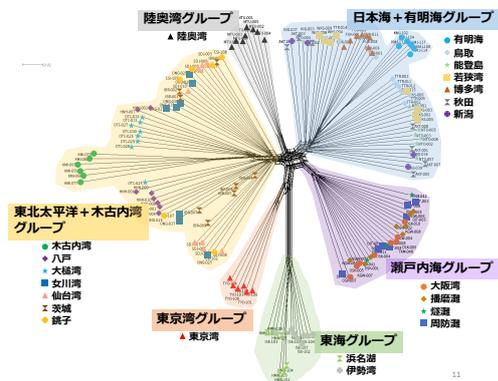


図 4. RAD-Seq データに基づくマコガレイ個体間の遺伝的類縁関係

形成がなされている可能性が示唆された (図 4)。また、ミトコンドリア DNA の結果では、陸奥湾の標本集団は日本海北部グループに属しており、同グループの他の標本集団の違いは必ずしも明確ではなかったが、RAD-Seq 分析の場合には、他の日本海北部の標本集団とは独立したクラスターを形成しており、陸奥湾のマコガレイ集団が遺伝的に独立していることが判明した。

マガレイでは 34,595 個の SNPs を収集できた。PCA 解析を行なったところ、ミトコンドリア DNA の解析結果とは異なり、同一の標本集団中の個体は近い関係にあり、海域ごとにまとまっている傾向が検出された (図 5)。個体間の遺伝的距離を算出し、NeighborNet 法によりネットワーク樹状図を作成した結果、マコガレイほど顕著ではないが、地理的に近い標本集団の個体がクラスターを形成した (図 6)。一方、仙台湾の個体から構成されるクラスター中に厚岸の個体が混じる場合もあり、限定的ではあるが広範囲の移動をしている個体も存在していることが示唆された。

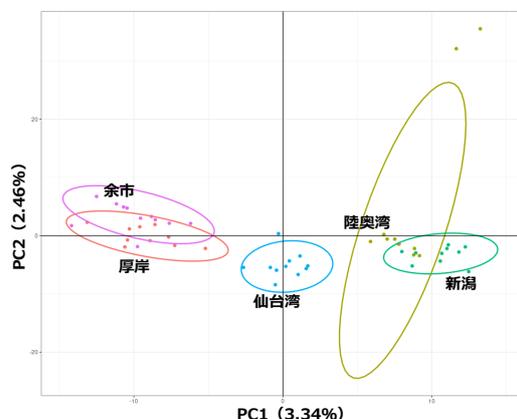


図 5. RAD-Seq データに基づくマガレイ集団の PCA プロット

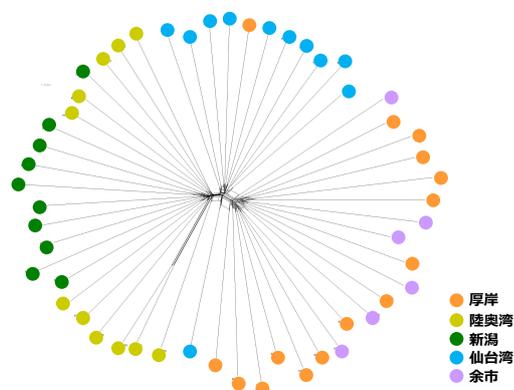


図 6. RAD-Seq データに基づくマガレイ個体間の遺伝的類縁関係

まとめ

マコガレイの粘着沈性卵、マガレイの分離浮性卵という対照的な卵形質の違いが、両種の遺伝的集団構造にも影響しているという仮説について、ミトコンドリア DNA のシーケンスと RAD-Seq による核 DNA の SNPs 解析により検討した結果、マコガレイでは標本集団間の遺伝的分化が著しく高く、一方、マガレイでは分化の程度は非常に低いことがわかった。これらの結果から、卵形質の違いは遺伝的集団構造に大きく影響していると結論づけることができた。マコガレイでは海域や湾内での遺伝的分化が顕著であったが、このことは各地域のマコガレイ集団が独立した個体群動態を持つことを意味しており、水産資源を管理するための系群の設定に関して有用な情報となりうる。また、遺伝的分化の高いマコガレイは地域でブランド化される傾向にあるが (例：大分県の「城下がれい」や北海道の「天下一品まこがれい」、ミトコンドリア DNA の塩基配列や大量の SNPs データを利用することで、ブランド化されたマコガレイを守るための遺伝的タグを付加することが可能となる。一方、分離浮性卵を産むマガレイの RAD-Seq 分析において、海域ごとに違いが見られたことは注目に値する。この結果も将来のマガレイの資源管理方策に関して有益な情報の提示が可能である。今回は、対照的な卵形質をもたらす遺伝的基盤について検討することが叶わなかったが、現在両種のドラフトゲノムを構築中であり、今回の RAD-Seq データも含めて卵形質の多様化に関する遺伝的基盤を探索する準備が整えられつつある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|-------|------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 山本 佑樹 (Yuki Yamamoto) | | |

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 |
|---------|---------|
| | |