

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06831

研究課題名(和文) ゲノム情報で解き明かすジュズカケハゼ種群の多様性と進化プロセス

研究課題名(英文) Genomic Information reveals diversity and evolutionary processes of *Gymnogobius* species groups

研究代表者

千葉 悟 (Chiba, Satoru)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産資源研究所(釧路)・主任研究員

研究者番号：80599431

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)：これまでジュズカケハゼやシンジコハゼされてきたジュズカケハゼ種群は絶滅が危惧されているが、分類や種内の進化的重要単位などの多様性はまだ明らかにされていない。多様性を未だ明らかにできない原因のひとつは、ミトコンドリアゲノムの異種間浸透が生じていると考えられることである。本研究ではゲノム解析によって分類や進化的重要単位を明らかにすること、ミトコンドリアゲノムの異種間浸透の進化的意義を明らかにすることを目的とした。COVID-19の影響により研究計画の変更と遅れが生じ、異種間浸透の進化的意義を明らかにすることは出来なかったものの、種の輪郭や各種内の進化的重要単位が存在を明らかにすることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

絶滅が危惧される生物の保全措置を行政が実行する上で、関連する法律にも保護の対象が「種」と規定されていることから、多様性を明らかにして「種」を記載することは重要である。本研究では、これまで明らかにすることが出来なかったジュズカケハゼ種群各種の輪郭と種内の多様性をゲノム解析のよって明らかにした。今後、これらの成果に基づいて新種記載を含む分類の整理を行うことで、本種群は種の保護法における保護施策対象の候補になると考えられる。また、本研究で明らかにした各種内の多様性は保護施策を検討する上で重要な検討材料となる。

研究成果の概要(英文)： *Gymnogobius castaneus-taranetzi* species complex is threatened with extinction, but taxonomy and evolutionarily significant units within the species has not yet been clarified. One of the reasons for this lack of diversity is thought to be the result of interspecific introgression of mitochondrial genomes. The objectives of this study were to clarify taxonomic status, evolutionarily significant units, and the evolutionary significance of interspecific introgression of mitochondrial genomes by genome analysis. Although we were unable to clarify the evolutionary significance of interspecific penetration due to changes and delays in the research plan caused by COVID-19, taxonomic status of the species complex and evolutionarily significant units within each species were clarified.

研究分野：生物多様性

キーワード：希少種保全 分類 進化的重要単位 ゲノム 異種間浸透 交雑

### 1. 研究開始当初の背景

ジュズカケハゼ種群は、これまでジュズカケハゼやシンジコハゼと同定されてきた淡水性のハゼ科魚類の一群である。本種群はため池やその周辺の水路、河川の後背湿地などに生息することから人為的な影響を受けやすく絶滅が危惧されているが、分類や種内の進化的重要単位などの多様性はまだ明らかにされていない。この多様性を未だ明らかにできない原因のひとつは、ミトコンドリア DNA (mtDNA) から推定された種の輪郭 (Sota et al. Zool. Sci. 2005) が、遺伝子浸透によって、その他のアロザイム解析 (Aizawa et al. Zool. Sci. 1994; Shinozaki et al. Ichthyol. Res. 2006) や形態形質など (Stevenson et al. Species Diversity 2002) から推定される種の輪郭と一致しないことである (図 1)。本種群の多様性や遺伝子浸透の進化的意義を明らかにすることは、本種群の今後の保全措置に役立てられるのみならず、進化生態学におけるモデルケースになり得る。

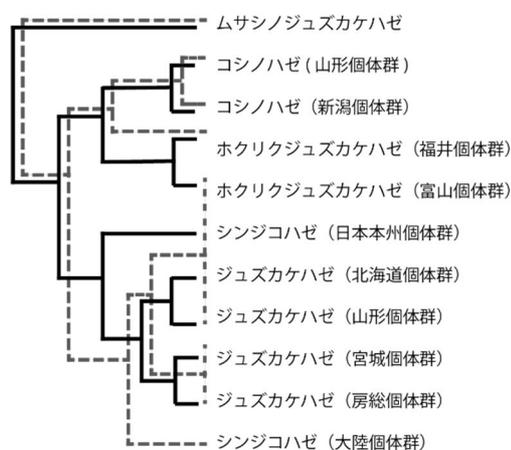


図 1 予備解析の結果、実線は核の多数遺伝子、破線はミトゲノムに基づいて推定されたジュズカケハゼ種群の系統関係

### 2. 研究の目的

本研究は、ジュズカケハゼ種群の分類と進化的重要単位を明らかにして今後の保全措置に役立てること、種群内で生じているミトコンドリアゲノム (ミトゲノム) の遺伝子浸透の適応的意義と、ミトゲノムと核のミトコンドリア関連遺伝子 (N-mt 遺伝子) の不和合を解消するための共進化プロセスを明らかにすることを目的として、下記 2 つの課題に取り組む。

(1) ゲノムワイドな中立的核 DNA 情報に基づいて頑健な系統関係と集団構造を推定することで多様性を明らかにし、新種記載を含む分類学的再検討を実施する。

(2) ミトゲノムと核ゲノムのミトコンドリア関連遺伝子の DNA 情報を取得し、ミトゲノムの遺伝子浸透における適応的意義とそれに伴う核ゲノムの共進化プロセスを解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試料採集調査

本研究では、これまでに調査を十分に実施出来ていない北陸地方及び中国地方の日本海側で採集調査を実施し、全ゲノム解析に使用するための高品質な DNA サンプルを入手する予定であったが、COVID-19 の影響により、出張が困難な状況が続き事業期間中に試料採集調査を実施出来なかった。これによって、全ゲノム解析に必要な DNA が分解していない高品質なサンプルを入手出来なかったため、既存のサンプルから比較的状态の良いサンプルを見つけ出して全ゲノム解析に供することとした。

#### (2) 系統解析

遺伝子浸透が生じている場合、図 2 のようにミトコンドリアゲノムや核のミトコンドリア関連遺伝子に基づく系統推定は誤った結果を導くため、ゲノムワイドな核遺伝子の配列情報に基づいて系統や集団構造を推定する必要がある。本研究では、少数サンプルの全ゲノムリシーケンス解析に加え、本種群の分布をカバーする約 960 サンプルを MIG-seq 法 (Suyama & Matsuki Scientific Reports 2015) を改良した方法を用いて縮約ゲノム解析を実施した。こうして取得した配列情報に基づいて系統樹や集団構造を推定して系統地理学的考察をおこなった。

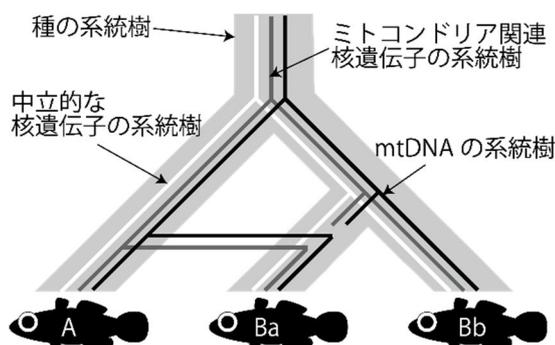


図 2 種 A および種 B の個体群 a と b の真の系統と各遺伝子から推定される系統関係。種 B の個体群 a には種 A のミトゲノムが浸透している。ミトコンドリア関連の核遺伝子はミトゲノムの浸透のあと母系アリ

### 4. 研究成果

#### (1) ジュズカケハゼ種群の系統関係

レファレンスゲノムを構築するための高品質な DNA サンプルを入手出来なかったため、比較

的狀態の良いサンプルを使用したショートリードのデータと近縁種のゲノム情報を用いた Reference-guided assembly によって本種群のレファレンスゲノムを構築した。このレファレンスゲノムに全ゲノムリシーケンスデータを整列させた後、一塩基多型を抽出して最尤法による系統樹を構築した。また、リシーケンスデータからミトコンドリアゲノムの全塩基配列を抽出・再構築して最尤法による系統樹を構築した。その結果、ミトコンドリアゲノムの全塩基配列に基づく最尤系統樹では、予備解析で得られていたのと同様に、ジュズカケハゼ、シンジコハゼ、ホクリクジュズカケハゼは単系統群にはならなかった。本州のシンジコハゼはホクリクジュズカケハゼの富山個体群と共に単系統を形成した。ジュズカケハゼは日本海側個体群と太平洋側個体群はそれぞれ単系統群を形成するものの、種としては側系統群を形成した。また、シンジコハゼの大陸個体群は日本の個体群とは遺伝的に大きく分化した個体群である事も確認された(図3)。一方、核ゲノムの一塩基多型情報に基づいた最尤系統樹では、ホクリクジュズカケハゼは単系統を形成し、富山個体群と福井個体群もそれぞれ単系統群を形成した。シンジコハゼとジュズカケハゼは核ゲノムの解析結果からも単系統にならなかった。

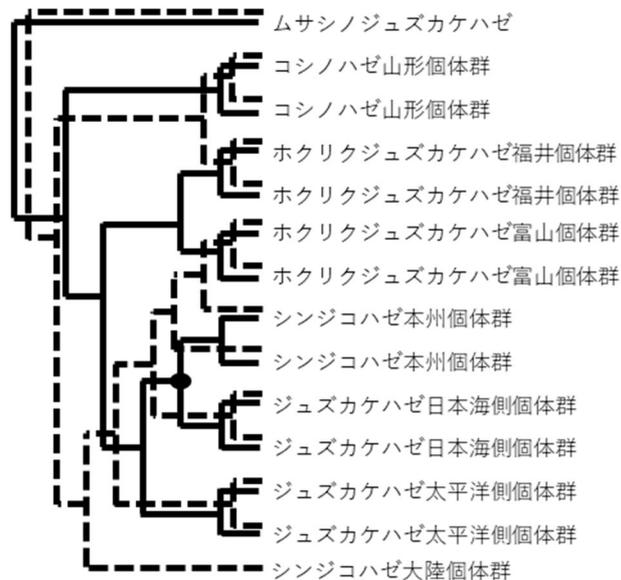


図3 最尤法による系統解析の結果  
実線は核ゲノムの一塩基多型、破線はミトコンドリアゲノムの全塩基配列に基づいて推定されたジュズカケハゼ種群の系統関係。示した分岐は中程度のブートストラップ値(62)、それ以外の分岐は高いブートストラップ値(96以上)で支持された。

以上のことから、ジュズカケハゼとシンジコハゼはそれぞれ単系統群を形成せず、ジュズカケハゼとシンジコハゼの大陸個体群、太平洋側個体群、日本海側個体群がそれぞれ単系統群を形成すると考えられる。一方、作業仮説の通りホクリクジュズカケハゼの富山個体群は核ゲノムの情報からは同種の福井個体群に近縁であるものの、ミトコンドリアゲノムの情報からはシンジコハゼと非常に近縁であることが示されたことから、ホクリクジュズカケハゼの富山個体群にはシンジコハゼのミトコンドリアゲノムが異種間浸透していることが明らかになった。現在、これらの成果を踏まえた新種記載も含む本種群の分類学的な再検討を進めている。

### (3) 集団構造解析

系統解析で認識された各グループについて、改良した MIG-seq 法により多数のサンプルから取得した縮約ゲノムの一塩基多型情報に基づいて遺伝的集団構造を解析した。本解析に際して、小型のシーケンサーの利用を前提に開発されている MIG-seq 法のライブラリ作製プロトコルを、大型のシーケンサーに対応させるため、プライマー配列を改変して解析に必要な配列を付加すると共に、サンプル識別のための Dual index に加えてインサート配列内にサンプル識別の index を付加することで、大型のシーケンサーに対応した効率的なプロトコルに改良した。この改良によってシーケンシングコストを1サンプル当たり250円程度にまでコストダウンすることができた。一塩基多型情報の主成分解析の結果、ジュズカケハゼ-シンジコハゼグループでは、太平洋の個体群が密集してプロットされた(図4)。日本海側と大陸の個体群はPC1およびPC2軸上で大きく散らばってプロットされ、その中で各地域個体群はまとまってプロットされる傾向にあった。また、大陸産サンプルのプロットは日本海側個体群のプロットに内包されたが、ミトコンドリアゲノムの分化の大きさから考えると、主成分分析に使用した一塩基多型マーカーの数が少ないことによる解像度の不足によるものと考えられる。シンジコハゼとされているサンプルのみを抜き出して

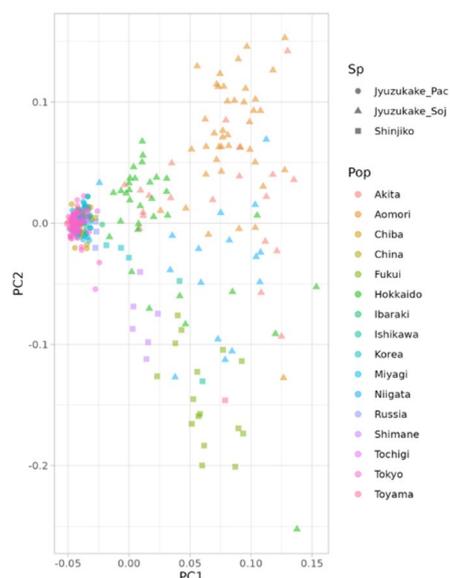


図4 左はジュズカケハゼ-シンジコハゼグループの一塩基多型情報に基づく主成分分析の結果。はジュズカケハゼ太平洋側個体群、はジュズカケハゼ日本海側個体群、はシンジコハゼのサンプルのプロット。色は産地の違いを表わす。

はジュズカケハゼ太平洋側個体群、はジュズカケハゼ日本海側個体群、はシンジコハゼのサンプルのプロットに内包されたが、ミトコンドリアゲノムの分化の大きさから考えると、主成分分析に使用した一塩基多型マーカーの数が少ないことによる解像度の不足によるものと考えられる。シンジコハゼとされているサンプルのみを抜き出して

主成分分析を行うと、日本産と大陸産のサンプルは明瞭に識別され、さらに北陸地方と中国地方のシンジコハゼは分離してプロットされた(図 5A)。同様に、太平洋側個体群を抜き出した場合は、東京、千葉、宮城のサンプルが主要な構成要素となる 3 つのグループが識別された(図 5B)。ジュズカケハゼとシンジコハゼの日本海側個体群を抜き出した場合は、不明瞭ながら PC2 軸上でジュズカケハゼとシンジコハゼが分離されるものの、その他の地域個体群のプロットはある程度まとまりを持ちながらも入り交じってプロットされた(図 5C)。ホクリクジュズカケハゼを抜き出した場合は、福井と富山の個体群が明瞭に識別され、富山個体群は PC2 軸上に広がりをもってプロットされたが、福井個体群は密集してプロットされた(図 5D)。コシノハゼを抜き出した場合は、山形個体群と新潟個体群が明瞭に識別された(図 5E)。ムサシノジュズカケハゼの場合は、地理的に近い少数サンプルのみの解析となったためか特別な構造は見つからなかった(図 5F)。以上のことから、本種群の各種内には遺伝的に分化した複数の地域個体群が存在しており、各個体群の遺伝的多様性も様々なレベルにある事が示唆された。本種群は一生を淡水域で過ごす純淡水魚であるため海を経由した水系間の分散が生じないため、現在の分布や集団構造は河川争奪や海水面の低下による水系間の連絡によって形成されたと考えられる。このように長い時間によって形成されてきた遺伝的集団構造、すなわち地域個体群はそれぞれが独自の進化を遂げている進化的重要単位として保全の対象とすべきと考えられた。また、ホクリクジュズカケハゼでは、ミトコンドリアゲノムが他種から浸透したと考えられる富山個体群では福井個体群に比べて多様性が高い傾向にある事から、過去の異種間交雑によって多様度が高く維持されている可能性が考えられた。

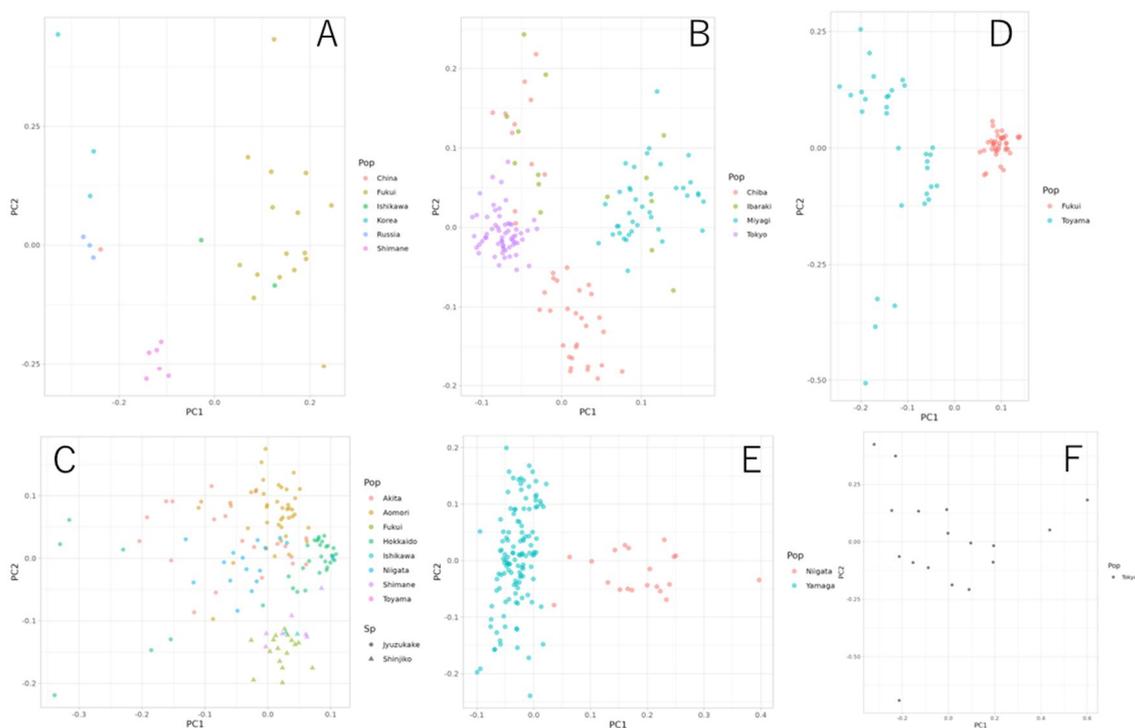


図 5 一塩基多型情報に基づく主成分分析の結果

A はシンジコハゼ、B はジュズカケハゼ太平洋個体群、C はジュズカケハゼおよびシンジコハゼの日本海個体群、D はホクリクジュズカケハゼ、E はコシノハゼ、F はムサシノジュズカケハゼの各サンプルの PC1 および PC2 スコアの散布図。

#### (4) ホクリクジュズカケハゼに認められたミトコンドリアゲノムの異種間浸透の進化的意義

これまでにホクリクジュズカケハゼには富山、石川、福井の少なくとも 3 つの個体群が確認されており、このうち富山個体群にのみシンジコハゼのミトコンドリアゲノムが浸透していることが明らかとなった(本研究; Chiba et al. Ichthyol. Res. 2019)。研究計画では、新たに採集する高品質な DNA サンプルを使用してレファレンスゲノムを構築することで、核ゲノムのミトコンドリア関連遺伝子を同定してミトコンドリアゲノムとの共進化を解析する予定であったが、COVID-19 の影響によって高品質な DNA サンプルを採集することが出来なかった。そのため、本事業期間を延長して最終年度に既存のサンプルから比較的状态の良いサンプルを選んで全ゲノムリシーケンスを実施したが、現在のところ共進化プロセスの解析には至っておらず、これらの解析には今後取り組む予定である。

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
研究分担者	田畑 諒一  (Tabata Ryoichi)  (00793308)	滋賀県立琵琶湖博物館・研究部・学芸員    (84202)	
研究分担者	渋川 浩一  (Shibukawa Koishi)  (30435739)	ふじのくに地球環境史ミュージアム・学芸課・教授    (83811)	
研究分担者	向井 貴彦  (Mukai Takahiko)  (80377697)	岐阜大学・地域科学部・教授    (13701)	

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
---------	---------