

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2019～2022

課題番号：19KK0184

研究課題名（和文）アノールトカゲを用いた温度ニッチシフトの進化機構の解明

研究課題名（英文）Evolutionary mechanisms for thermal niche shift in Anolis lizards

研究代表者

河田 雅圭（Kawata, Masakado）

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：90204734

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,200,000円

研究成果の概要（和文）：アノールトカゲを用いて異なる温度環境へのニッチシフトに関連する遺伝的基盤の解明を目的とした。高温開放環境および森林低温環境に生息する6種のゲノム配列を決定し、ゲノム解析比較による温度適応に関わる遺伝子の検出を試みた。ゲノム解析の結果、高温環境に生息する種は、遺伝子重複率が高いことが示された。また、高温開放種および森林低温種において保存および加速進化しているゲノム領域を検出した。その結果、概日リズム、視覚形成に関わると予測される遺伝子、脂質代謝に関連する遺伝子が検出された。また、遺伝子発現解析から低温嗜好性を持つ種において、他種に比べて高いTRPV1発現量を維持していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温度ニッチシフト機構の解明は、温度環境への適応放散による種多様化機構と温度環境変化への生物の進化的反応の可能性を考える上で大きな意義を持つ。特に、近年温暖化の影響で、外温性脊椎動物である爬虫類の絶滅リスクの増大が危惧されている。本研究の成果は、温度適応に関わる遺伝的基盤を解明することで、どのような遺伝的基盤をもつ種が温度上昇に対して脆弱なのかを特定するための情報を提供する。それにより爬虫類の保全に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The present study aimed to elucidate the genetic basis associated with niche shifts to different temperature environments using Anolis lizards. The genomes of six species inhabiting hot-open and cool-forest habitats were sequenced to detect genes involved in temperature adaptation through genome analysis comparisons. The results of the genome analysis showed that species inhabiting hot-open habitat have higher rates of gene duplication. In addition, conserved and accelerated evolutionary genomic regions were detected in species with hot-open and cool-forest habitats. The results show that these genes predicted to be involved in circadian rhythms, visual development and genes related to lipid metabolism. The gene expression analysis indicated that high TRPV1 expression levels are maintained in lower temperature-preferring species compared to other species.

研究分野：進化学

キーワード：温度適応 アノールトカゲ ニッチシフト ゲノム

1. 研究開始当初の背景

アノールトカゲは、温度環境生息地を変更するような進化(温度ニッチシフト)が複数回独立に生じているが、どのような遺伝的变化を伴う進化によって達成されるのかは未解明である。温度ニッチシフト機構の解明は、温度環境への適応放散による種多様化機構と温度環境変化への生物の進化的反応の可能性を考える上で大きな意義を持つ。温度ニッチシフトにおける新規温度環境への進出を可能にするのは、少数の遺伝的变化や可塑的变化であると考えられる。申請者らの研究から日周活動などの概日リズムや温度感受性 TRPA1 に関わる変異変異である可能性が示唆されたが、確証されていない。研究当初の研究では、同種内で異なる温度ニッチに侵入している集団を用いることで、新規温度環境への進出を可能にした遺伝的・可塑的対応に関連する遺伝領域を検出し、さらに遺伝子編集により検出された遺伝子の機構解析することで、温度ニッチシフトの進化を可能にする遺伝的基盤を解明する予定であった。そのために、キューバにおいて開放高温環境に生息する種と森林内低温環境に生息しているアノールトカゲを用いて、異なる温度環境に生息する集団間で温度適応に関連して進化した遺伝子を特定する。さらに爬虫類ではじめて CRISPR-Cas9 による遺伝子編集を成功させた Menke 博士との共同で、遺伝子編集による候補遺伝子の機能解析技術を確立する。さらに Tulane 大学の Gunderson 博士との共同で、同種内で異なる温度環境に生息するプエルトリコのアノールトカゲを対象に、温度環境間の適応に関わる遺伝子を検出し、*A. sagrei* との比較を行う。これらを通して温度ニッチシフトを可能している遺伝的変異に関わる遺伝子を特定する。

2. 研究の目的

当初は、異なる温度生息環境への適応進化にどのような遺伝的変異が関与しているのかを調べるために、キューバにおいて同じ種内で高温開放環境と森林低温環境に生息している種を用いたゲノムおよび遺伝子発現比較によって温度適応に関わる候補遺伝子を検出し、さらに遺伝子編集によって、検出した遺伝子の機能解析を行う予定であった。しかし、研究開始後、すぐにコロナウイルス感染症が蔓延し、海外への渡航が困難になり、キューバで野外調査およびアメリカでの遺伝子編集が困難になった。そのため、(1)キューバの Luis Diaz 博士と協力してこれまでに遺伝子利用を含め許可(キューバ環境省 CICA)を得て採集していたアノールトカゲのサンプルを用いて、高温開放環境および森林低温環境に生息する種のゲノム解析比較による温度適応に関わる遺伝子の検出、(2)Tulane 大学の Gunderson 博士との協力でプエルトリコ産アノールトカゲをもちいた遺伝子発現比較解析、さらに、温度感受性との関連が示されている TRP 遺伝子に着目した比較解析を行った。それらの解析により、異なる温度環境へのニッチシフトに関連する遺伝的基盤の解明を目的とした。

(1)では、6種のアノールトカゲの全ゲノム配列を決定し、開放高温環境に生息している種で選択を受けた遺伝子およびゲノム領域の検出、遺伝子重複との関連などなどを調べた。(2)では、プエルトリコ産アノールトカゲ(*A. cristatellus* と *A. krugi*)を用いた RNA-seq を実施し、キューバ産アノールトカゲの RNA-seq (Akashi et al., 2016) の結果と統合して解析を実施した。

3. 研究の方法

キューバのアノリストカゲ6種(*Anolis isolepis*, *Anolis allisoni*, *Anolis porcatus*, *Anolis allogus*, *Anolis homolechis*, *Anolis sagrei*)について 10x Genomics のリンクリードを用いて *de novo* ボゲノムアセ

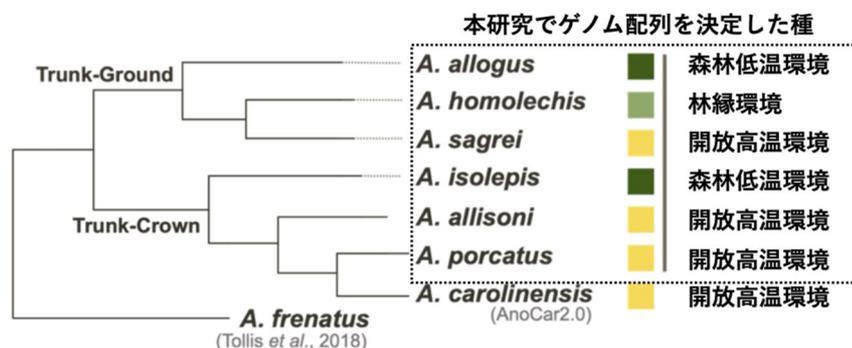


図1. 本研究で用いたアノールトカゲの系統関係

ンブリを実施した(図 1)。決定したゲノム配列をもとに、重複遺伝子数、遺伝子数の拡大・縮小の推定を行った。また、RepeatModeler を用いて、本研究に含まれるすべての Anolis ゲノムのリピート要素を *de novo* 検索した。またキューバ産アノールトカゲ 6 種に加え、*A. carolinensis*、外群として *A. frenatus* を加えて、開放高温環境および森林低温環境に生息する種において、加速進化および保存的進化をしているゲノム領域の検出を行った。検出には、コドンバイアスのない 4 degeneration sites を用いて中立進化速度を推定し、phyloP を用いて保存・加速領域を推定した。(2) ブエルトリコ産アノールトカゲ(*A. cristatellus* と *A. krugi*)を用いて、RNA-seq により 26°C と 33°C という温度処理のもとで変動した遺伝子 (DEG; すなわち発現量に温度感受性がある遺伝子) を検出した。さらにこれまで同様の方法で調べられている *A. sagire*, *A. homolechis*, *A. allogus* のデータを統合し、Expression Variance and Evolution モデル (Phylogenetic ANOVA; 系統特異的に発現量のベースが変化している遺伝子) によって検出した遺伝子を比較した。

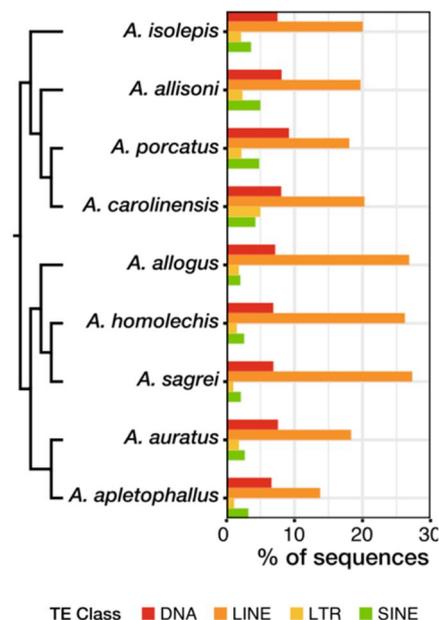


図2. Repeat elementsの割合

4. 研究成果

(1) 全ゲノム配列決定:

A. isolepis, *A. allisoni*, *A. porcatus*, *A. allogus*, *A. homolechis*, *A. sagrei* のゲノムは 47.26-63.30 × coverage で配列決定した。推定したゲノムサイズは 2.05-2.66 Gb であった。これらのゲノムアセンブリのスカフールド N50 は、*A. carolinensis* の染色体レベルのゲノムアセンブリ(AnoCar2.0)より短い、*A. frenatus* (Afren1.0), *A. auratus* (Aaur1.0), *A. apletophallus* (Aapl1.0) のドラフトゲノムアセンブリよりかなり長い配列が得られた。さらに、BUSCO のカバレッジは、*A. carolinensis* ゲノム (Anocar2.0) と同等であった。

(2) 繰り返し要素:

Repeat element の長さの割合は、キューバ産アノールトカゲ 6 種で 36-41% とほぼ同じだった。その結果、キューバの幹地 3 種 (*A. allogus*, *A. homolechis*, *A. sagrei*) のゲノムは、他の種に比べて LINE が多いことがわかった (図 2)。さらに、*A. carolinensis* のゲノムは、9 種の中で最も多くの LTR 型転移因子を含んでいた。

(3) 重複遺伝子率:

A. isolepis, *A. allisoni*, *A. porcatus*, *A. allogus*, *A. homolechis*, *A. sagrei* の重複遺伝子の割合 (PD : 重複遺伝子数/全遺伝子数) は 30.8-39.4% であった(表 1)。樹冠に生息する種のクレード内では、高温環境に生息する種 (*A. allisoni*, *A. porcatus*)の方が、森林内低温環境に生息する種より(*A. isolepis*)も重複遺伝子数の割合が高かった。同様に、樹幹から地上に生息する種のクレード内でも、温環境に生息する種(*A. homolechis*, *A. sagrei*)の方が、森林内低温環境に生息する種より(*A. allogus*)も重複遺伝子数の割合が高かった(表 1)。

表1. 重複遺伝子率

Trunk-Crown	<i>A. porcatus</i>	<i>A. allisoni</i>	<i>A. isolepis</i>
重複遺伝子数	8,867	8,344	6,670
シングル遺伝子数	15,233	15,159	15,018
重複遺伝子率	36.8	35.5	30.8
Trunk-Ground	<i>A. homolechis</i>	<i>A. sagrei</i>	<i>A. allogus</i>
重複遺伝子数	10,191	8,835	8,255
シングル遺伝子数	15,648	14,984	14,977
重複遺伝子率	39.4	37.1	35.5

(4) 保存・加速遺伝子:

開放高温環境に生息する種で共通に加速進化したゲノム領域を推定し、その近傍に存在する遺伝子を検出した。コード領域で 14 遺伝子、イントロンで 3 遺伝子、遺伝子間領

域で3遺伝子が検出された。検出された遺伝子には、概日リズムに関する遺伝子(*ALK*)や網膜で発現し、視覚形成に関わると予測される遺伝子(*GRIK4*, *POU6F2*)が検出された。また、同様に森林低温環境に生息する系統で共通に加速進化したゲノム領域を推定し、その近傍に存在する遺伝子を検出した。コード領域で26遺伝子、イントロンで15遺伝子、遺伝子間領域で39遺伝子が検出された。概日リズムに関する遺伝子(*KMT2C*, *FTO*, *KCNC2*)や網膜で発現し、資格形成に関わると予測される遺伝子(*PRDM1*, *ADGRV1*)が検出された。これらのことから、光環境や蛾日周活動が、温度環境への適応に関連していると考えられた。さらに脂質代謝に関与する遺伝子(*ABCA12*, *TAF5*, *CADM2*, *VGLL3*)が検出された。脂質代謝は、これまで温度選好性の違いに影響することが知られている。

(5) 発現変動解析：

プエルトリコ産アノールトカゲ(*A. cristatellus*, *A. krugi*)とキューバ産アノールトカゲ(*A. sagire*, *A. homolechis*, *A. allogus*)において26°Cと33°Cという温度処理のもとで変動した遺伝子(DEG; すなわち発現量に温度感受性がある遺伝子)を解析したところ、系統特異的に発現量に変化している遺伝子として、プエルトリコ産アノールトカゲにおいて、高温刺激によって活性化されるTRPV1チャンネルを検出した。本種は低温嗜好性をもつことから、他種に比べて高いTRPV1発現量を維持し、高温刺激を敏感に感知することで、自身にとって危険な高温環境を避けていることが示唆された。

(6) TRPA1の忌避温度のメタ解析：

また、異なる体温を維持するキューバ産アノールトカゲ3種において、高温感受性TRPA1の活性化温度が種間で変化することで、熱刺激に対する忌避行動が変化していることが示唆されている(Akashi et al., 2018)。本研究では、TRPA1活性化温度と忌避体温の関連を解析するため、外温性動物においてこれらのパラメータを報告している文献を調査し、メタ解析を実施した。ハエやカエル、トカゲ、そしてヘビという幅広い分類群を含む解析によると、アノールトカゲと同様の傾向を検出した。すなわち、TRPA1活性化温度が高い種は、熱刺激に対する忌避体温も高く、分子と行動の両面から熱に対する感受性が低いことを見出した。

<引用文献>

Akashi, H., S. Saito, A. Cádiz, T. Makino, M. Tominaga, M. Kawata. (2018) Comparisons of behavioral and TRPA1 heat sensitivities in three sympatric Cuban Anolis lizards. *Molecular Ecology*, 27:2234-2242.

Akashi, H. D., A. Cadiz, S. Shigenobu, T. Makino and M. Kawata (2016) Differentially expressed genes associated with adaptation to different thermal environments in three sympatric Cuban Anolis lizards. *Molecular Ecology* 25:2273-2285

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 Hiroshi Akashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Thermal Sensitivity of Heat Sensor TRPA1 Correlates With Temperatures Inducing Heat Avoidance Behavior in Terrestrial Ectotherms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 frontiers in Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 583837
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fevo.2021.583837	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 -
1. 著者名 Shunsuke Kanamori Antonio Cadiz Luis M. Diaz Yuu Ishii Takuro Nakayama Masakado Kawata	4. 巻 11
2. 論文標題 Detection of genes positively selected in Cuban Anolis lizards that naturally inhabit hot and open areas and currently thrive in urban areas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 1719-1728
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ece3.7161	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 Kanamori, S., Luis M. Diaz, A. Cadiz, K. Yamaguchi, S. Shigenobu, M. Kawata	4. 巻 22
2. 論文標題 Draft genome of six Cuban Anolis lizards and insights into genetic changes during their diversification.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12862-022-02086-7	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 Akashi, H., M. Kubota, H. Yamamoto, K. Miyaoku, G. Yamagishi, and S. Miyagawa	4. 巻 12
2. 論文標題 Chronology of embryonic and gonadal development in the Reeves' turtle, <i>Mauremys reevesii</i> .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-15515-w	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Fuku Sakamoto, Shunsuke Kanamori, Luis M. Diaz, Antonio Cadiz, Yuu Ishii, Takuro Nakayama, Katsushi Yamaguchi, Shuji Shigenobu, and Masakado Kawata
2. 発表標題 etection and comparison of codon bias in eight Anolis species
3. 学会等名 The 2nd AsiaEvo Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金森駿介、Luis M. Diaz、Antonio Cadiz、山口勝司、重信秀治、河田雅圭
2. 発表標題 Chromiumシステムを用いたキューバアノールトカゲ6種の新規ドラフトゲノムの構築と適応進化過程で起きた遺伝的変異の推定
3. 学会等名 日本進化学会第22回会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本 芙久・金森 駿介・Luis M. Diaz・Antonio Cadiz・石井 悠・山口 勝司・重信 秀治・河田 雅圭
2. 発表標題 アノールトカゲの温度適応に関わるゲノム内加速領域の検出
3. 学会等名 日本生態学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本芙久・金森駿介・Luis M Diaz・Antonio Cadiz・石井悠・山口勝司・重信秀治・河田雅圭
2. 発表標題 侵略的外来種グリーンアノールとその近縁 3 種の全ゲノム比較
3. 学会等名 日本生態学会第67回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金森駿介・河田雅圭
2. 発表標題 アノールトカゲの遺伝子発現の温度順化の進化と 転移因子による HSE の拡大との関連
3. 学会等名 第23回日本進化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本美久・金森駿介・ Luis M. Diaz・ Antonio Cidiz・ 石井悠・ 山口勝司・ 重信秀治・ 河田雅圭
2. 発表標題 アノールトカゲの温度適応進化に関わるゲノム内保存・加速領域の検出
3. 学会等名 第23回日本進化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤司寛志
2. 発表標題 動物の温度耐性は温度センサーTRPA1の温度活性から推定できるか?
3. 学会等名 日本進化学会第23回東京大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤司寛志, 宮川信一, 河田雅圭, Alex Gunderson.
2. 発表標題 キューバ産およびプエルトリコ産アノールトカゲにおける温度適応に伴う遺伝子発現量進化
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会
4. 発表年 2022年

〔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	赤司 寛志 (Akashi Hiroshi) (00808644)	東京理科大学・基礎工学部生物工学科・研究員 (32660)	
研究 分担者	牧野 能士 (Makino Takashi) (20443442)	東北大学・生命科学研究科・教授 (11301)	

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			
キューバ	キューバ自然史博物館	ハバナ大学		
米国	University of Georgia	Tulane University		