

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03065

研究課題名（和文）ニホンウナギの生活史多型に關与する遺伝子の探索：集団ゲノム学的アプローチ

研究課題名（英文）In search of genes related to the life-history polymorphism in the Japanese eel *Anguilla japonica*: a population genomics approach

研究代表者

關野 正志（Sekino, Masashi）

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産資源研究所(横浜)・グループ長

研究者番号：90371799

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ニホンウナギの海ウナギと川ウナギというエコタイプについて、一塩基多型（SNP）マーカーによる集団ゲノム解析を行い、各エコタイプを特徴づける変異が存在するゲノム領域（遺伝子）の有無を明らかにすることを目的とした。両エコタイプを識別する上で重要度の高い1マーカーは、ナトリウム機械受容チャンネルの制御に關与する遺伝子および細胞内外間イオン輸送に關与する遺伝子など、浸透圧調整に關連する可能性がある遺伝子の近隣に位置していた。海水適応（塩分濃度適応）に關与する遺伝子の違いが、海ウナギと川ウナギというエコタイプを分ける要因の一つであるのかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、海域環境下の生存に適した遺伝子型を持つ個体が存在することが示唆された。こうした知見は、資源回復のための成育場保全策を考える上で重要である。さらに本種では、偶発的に来遊した東アジアの河川上流から内湾までの様々な水系に対する環境適応が、生活史戦略の根幹をなしている可能性がある。従って得られる成果は、海域と河川それぞれに適応的な遺伝子資源を保全し、本種の環境適応ポテンシャルの損失を防ぐことの必要性を示す根拠になる。

研究成果の概要（英文）：Based on population genomics with single nucleotide polymorphisms (SNPs), the present study aimed to identify genomic regions (genes) that distinguish between two ecotypes of Japanese eels *Anguilla japonica*, i.e., sea-resident and river-resident types. In the most informative SNP set (20 SNPs) in separating the two ecotypes, one SNP was located at the position near genes associated with the regulation of the mechanosensitive sodium channels and proton-activated chloride channel. Those genes that are potentially involved in adapting to differences in salinity (sea and river environments) may play an important role in the occurrence of the ecotypes.

研究分野：応用集団遺伝学

キーワード：自然選択 一塩基多型 集団ゲノミクス 集団遺伝学 分子生態学

1. 研究開始当初の背景

近年の DNA 解析技術の著しい進歩により、一塩基多型 (SNP; Single Nucleotide Polymorphism) マーカーを使ってゲノム中の DNA 多型情報を網羅的に調べる集団ゲノム解析が可能になった (Luikart *et al.* 2003). この手法を用いることにより、アメリカウナギ *Anguilla rostrata* やヨーロッパウナギ *Anguilla anguilla* において、地域環境に応じた自然選択を受ける遺伝子の存在が示されている (Gagnaire *et al.* 2012; Pujolar *et al.* 2014). 一方、両種とも後述のニホンウナギ *Anguilla japonica* と同様に単一の産卵場で繁殖を行うため、種全体で単一遺伝子プールを持つ。このため両種において、繁殖時に産卵場でゲノムがシャッフルされ、自然選択の影響は世代を超えず、地域個体群間の適応分化は生じないという「世代内自然選択説」が提唱されている。

西太平洋地域に分布するニホンウナギの産卵場は、西マリアナ海嶺付近にある (Tsukamoto 1992). そこで発生したレプトセファルスは、北赤道海流と黒潮の影響を受けて北上し、シラスウナギに変態して東アジアの沿岸域に來遊する (Aoyama 2009; Aoyama *et al.* 2014). 本種は來遊後に河川に遡上し、淡水域で成長して海域で産卵する降河性回遊魚とみなされてきた。しかし実際には、そのような河川に遡上して定着する個体 (川ウナギ) のほかに、沿岸に來遊した後にそのまま沿岸・内湾・汽水域に定着する個体 (海ウナギ) と海域と河川域を行き來する個体 (シフター) の存在が認められている (Tsukamoto 1998; Kotake *et al.* 2005). 世代内自然選択説を考慮すると、このような海域と河川域という大きく環境の異なる成育場の選択、すなわち生活史多型に、自然選択を通じて遺伝子が関与している可能性が考えられる。実際にアメリカウナギにおいて、海ウナギと川ウナギというエコタイプの違いには遺伝的基盤があると推察されている (Pavey *et al.* 2015)。

2. 研究の目的

本研究では、ニホンウナギの海ウナギと川ウナギグループ間で集団ゲノム解析を行い、各グループを特徴づける変異が存在するゲノム領域 (遺伝子) の有無を明らかにすることを目的とした。生活史多型に特定の遺伝子が関与していれば、海域環境下の生存に適した遺伝子型を持つ個体が存在することになり、海域の成育場としての重要性が遺伝学的に裏付けられる。こうした知見は、資源回復のための成育場保全策を考える上で重要である。さらに本種では、偶発的に來遊した東アジアの河川上流から内湾までの様々な水系に対する環境適応が、生活史戦略の根幹をなしている可能性がある。従って得られる成果は、海域と河川それぞれに適応的な遺伝子資源を保全し、本種の環境適応ポテンシャルの損失を防ぐことの必要性を示す科学的根拠になる。

3. 研究の方法

3-1. ニホンウナギサンプル

本研究では、静岡県浜名湖 (地域略称: HM) および愛媛県西条市近辺 (EH) において採集された、産卵回遊中のウナギを解析の対象とした。HM と EH の総個体数は、それぞれ 201 と 100 であった。

3-2. Restriction site-associated DNA (RAD) シーケンシング

すべての個体からゲノム DNA を抽出し、Sekino *et al.* (2016) に準じて RAD ライブラリー (Baird *et al.* 2008) を作成した。ただし Sekino *et al.* は、8 塩基 (5'-CCTGCAGG-3') を認識してゲノムを消化する制限酵素 *Sbf* I を用いたが、本研究ではより多くの SNP を調べることができると期待される、6 塩基認識の制限酵素 *Spe* I を用いた (認識配列: 5'-ACTAGT-3')。超並列 DNA シーケンサーを用いて RAD ライブラリーのシーケンシングを行い、*Spe* I 認識配列近辺の 75 塩基分の塩基配列を得た。

3-3. 耳石微量元素組成に基づく生息履歴判定

電子線プローブマイクロアナライザー (EPMA) を用いて耳石のストロンチウム/カルシウム比を計測することにより、各個体の生息塩分履歴を調べた (Tsukamoto *et al.* 1998)。この解析により、各個体を海ウナギグループ、川ウナギグループおよびシフターグループに分類した。海ウナギはその生活史の中で河川に遡上した履歴のない個体、川ウナギは遡上後に海域に下った履歴のない個体、シフターは海域と河川域の両方において生息履歴があった個体である。

3-4. SNP サイト探索とフィルタリング

RAD シーケンシングで得られた塩基配列 (リード) のうち、低クオリティのリード (5% 以上の塩基でベースクオリティが 20 以下のリード) を除外した (FASTX-Toolkit; http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/download.html)。BWA-mem (Vasimuddin *et al.* 2019) を用いて、高クオリティリードを最近公表されたニホンウナギの染色体レベルのドラフトゲノム (Wang *et al.* 2022) にマッピングした。マッピングの過程で、SAMtools (Li *et al.* 2009) と UNIX の grep コマンドにより、マルチヒットリードおよびキメラリードを除外した。次に SAMtools のサブプログラム mpileup を用いて、マッピング後の塩基配列情報を mpileup フォーマットに変換した (最低マッピングクオリティおよび最低ベースクオリティはそれぞれ 40 と 30)。得られた mpileup データに基づき、VarScan2 (Koboldt *et al.* 2012) により SNP コールを行い、検出された SNP について、ジェノタイプ精度向上のためのフィルタリングを行った。SNP フィルタリングにあたり、EPMA の結果に基づいて、各個体を HM の海ウナギ (HMS) と川ウナギ (HMR) および EH の海ウナギ (EHS) と川ウナギ (EHR) の 4 グループに分類し、

シフターグループの個体は除外した。VCFtools (Danecek *et al.* 2011) を用いて、パイアレリック (サンプル中でアリルの種類が二つ) の SNP を選択した。さらに塩基の被覆度を ≥ 20 , MAF (Minor Allele Frequency) を ≥ 0.05 , SNP の共有率 (全グループおよび各グループ内) を ≥ 0.90 および各個体のジェノタイプ欠損率を < 0.1 に設定した。各グループにおいてハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE) の検定を行い, 全グループで HWE を満たさなかった SNP を除外した ($P < 0.05$)。連鎖不平衡 (LD) に基づくフィルタリングでは (BCFtools; Li 2011), 最も個体数が多かった HMR を対象とし, LD の指標となる統計値 r^2 の閾値を 0.3 とした (ウィンドウサイズ: 100 kb)。最後に, Sekino *et al.* (2023) の R スクリプトを用いて, SNP 間の物理距離が最低 1 kb になるように SNP の間引き処理を行った。

3-5. SNP ジェノタイプに基づく統計解析

上記 4 グループ間の遺伝的分化を調べるため, FinePop2 (Nakamichi *et al.* 2020; <https://CRAN.R-project.org/package=FinePop2>) を用いて, グループ間のペアワイズ F_{ST} を求めた。また遺伝的集団構造と個体間の遺伝的類似度を視覚化するため, Adegenet (Jombart 2008) により主成分分析 (PCA) を行い, 2 次元平面状に各個体をプロットした。

集団間で表現型が異なるある形質に対して, 効果の弱い複数の遺伝子が相乗的に関与している場合, 個々の遺伝子に連鎖している SNP の集団間の遺伝的差異は顕著ではないと予想される。そのような SNPs を, 集団間で大きな遺伝的差異のあるマーカーを抽出する Outlier テスト (例えば Whitlock and Lotterhos 2015 や Luu *et al.* 2017) で検出することは困難であるため, 本研究では R パッケージの randomForest を用いて, 機械学習の一つであるランダムフォレスト解析 (Breiman 2001) を行った。この方法では, 集団を識別する上で重要な SNP をランク付けして重要度の高い“SNP セット”を見つけることができるため, 前記のような効果の弱い遺伝子に連鎖する SNP を検出する上で適した方法と言える。ランダムフォレスト解析においては, HM と EH それぞれの地域における海ウナギ・川ウナギグループ間でアリル頻度の差が 0.1 以上の SNP のみを用いた。また randomForest の設定パラメーターである *mtry* (1 つの決定木あたりに選ばれる SNP の個数) を, 各地域サンプルにおける SNP 数の約 10% とし (Goldstein *et al.* 2010), *ntree* (作成する決定木の個数) を両地域サンプルとも 50,000 に設定した。また randomForest のサブプログラム rflmpute を用いて, 欠損ジェノタイプを補完した。

4. 研究成果

4-1. 海ウナギ・川ウナギの分類

EPMA の結果, 採集された銀ウナギ 301 個体のうち, 海ウナギは 107 個体, 川ウナギは 132 個体で, 残りはシフターであった。各グループの個体数は HMS が 78, HMR が 89, EHS が 29 および EHR が 43 であった。

4-2. SNP マーカー

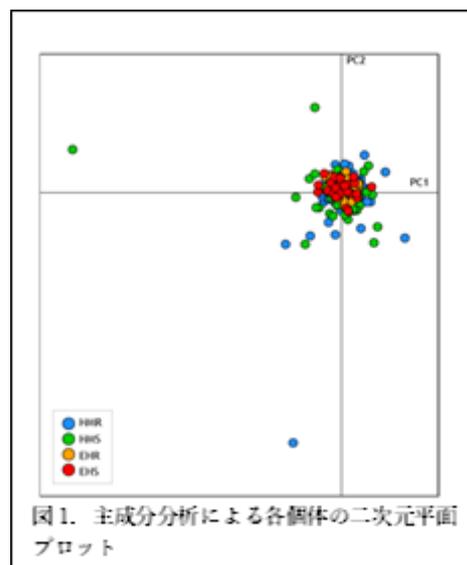
SNP コールの結果, 3,998,182 個の SNP が検出されたが, 上記フィルタリング後に得られた SNP 数は 48,374 であった。また, HMR の 3 個体では欠損率が閾値以上であったため, 以降の解析からは除外した。さらに EHR の 1 個体では, ヘテロ接合率の観察値が 0.403 と, 他個体の値 (0.200–0.240) と比較して異常に高く, コンタミネーションあるいはシーケンスエラーが疑われた。このためこの個体も以降の解析から除外した。したがって統計解析に用いた最終的な個体数は HMS が 78, HMR が 86, EHS が 29, EHR が 42 であった。

4-3. グループ間の遺伝的差異

グループ間の F_{ST} 値は 0.00036 から 0.00053 と極めて低く, 実質ゼロであった。また PCA プロットでもクラスター分離は認められなかった (図 1)。これらの結果は, これまでの多くの研究で立証されてきたニホンウナギの単一集団 (Panmixia) 説を支持する。

4-4. ランダムフォレスト解析: エコタイプを分ける遺伝子は存在するか?

HM と EH における海ウナギ・川ウナギグループ間でアリル頻度の差が 0.100 以上あった SNP の数は, それぞれ 1,133 と 5,172 であったため, ランダムフォレスト解析におけるパラメーター *mtry* は, HM サンプルでは 115, EH サンプルでは 510 に設定した。この条件での OOB (out-of-bag) エラー率は, HM サンプルでは 0.018, EH サンプルでは 0.338 であった。それぞれの地域において, 海ウナギと川ウナギグループを識別する上で重要な SNP を, 重要度 (mean decrease in accuracy) を指標として調べた (図 2)。これらの結果をもとに, HM と EH サンプルそれぞれについて, 重要度の高い上位 20 個の SNP をリストアップした (表 1)。これらの SNP を用いて, それぞれの地域サンプルについて Structure パッケージ (Pritchard *et al.* 2000) により各個体のグループ分けを行った。その結果, 当該の SNP においては, 個体のジェノタイプ組



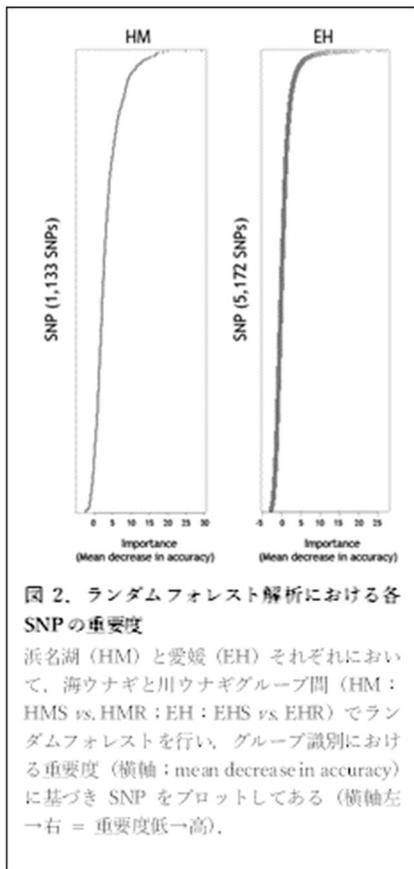
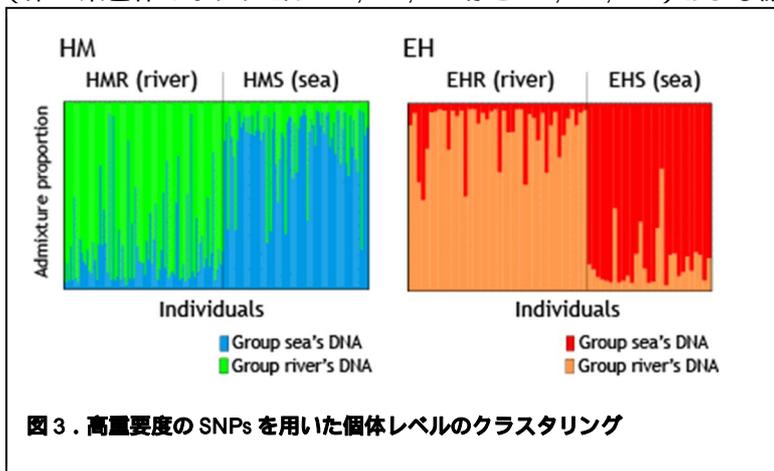


表1. ランダムフォレストにおける高重要度のSNP (上位20個)

HM		EH		
Imp_rank	Chr	Pos	Chr	Pos
1	Chr. 11	5,626,139	Chr. 3	52,491,357
2	Chr. 9	3,422,148	Chr. 10	50,340,728
3	Chr. 8	20,672,335	Chr. 4	52,148,200
4	Chr. 4	24,734,295	Chr. 5	40,818,729
5	Chr. 12	33,039,278	Chr. 6	10,729,727
6	Chr. 9	2,868,871	Chr. 4	35,226,854
7	Chr. 12	15,335,682	Chr. 6	1,575,067
8	Chr. 9	27,144,960	Chr. 9	28,764,536
9	Chr. 6	19,843,133	Chr. 5	63,964,961
10	Chr. 19	8,462,435	Chr. 14	34,921,104
11	Chr. 2	79,043,490	Chr. 1	64,957,718
12	Chr. 19	8,464,565	Chr. 7	49,102,756
13	Chr. 10	10,452,486	Chr. 8	3,964,487
14	Chr. 13	18,044,873	Chr. 1	46,223,255
15	Chr. 14	12,987,279	Chr. 7	16,292,626
16	Chr. 3	15,264,517	Chr. 1	25,376,759
17	Chr. 2	40,140,495	Chr. 13	3,856,434
18	Chr. 1	25,547,394	Chr. 15	29,905,329
19	Chr. 17	30,633,798	Chr. 16	23,056,926
20	Chr. 1	42,124,530	Chr. 13	40,320,327

Imp_rank: ランダムフォレストにおけるSNPの重要度のランクづけ、各SNPのドラフトゲノム上の位置を、染色体番号 (Chr) と各染色体におけるポジション (Pos) で示してある。例えば浜名湖 (HM) の海ウナギ (HMS) と川ウナギ (HMR) グループを識別する上で最も重要なSNP (Imp_rank = 1) は、ドラフトゲノムの第11番染色体の5,626,139番目の塩基に相当する場所にある。

成が海ウナギと川ウナギで異なり、不完全ではあるものの両エコタイプを分けることができた (図 3)。一方、海ウナギと川ウナギの識別において重要度の高い SNPs は、地域間で共有されていなかった。ただし、HM サンプルにおける第一染色体のポジション 25,547,394 (表 1: HM の Imp_rank 18) と EH サンプルにおける第一染色体のポジション 25,376,759 (EH の Imp_rank 16) の二つの SNPs は、物理距離約 170 kb と比較的近いところに位置していた。遺伝子アノテーションに基づくと、これらの SNPs の近隣に位置する遺伝子の一つとして、Ezrin- Radixin- Moesin (ERM) ファミリーが挙げられる (遺伝子領域は第一染色体のポジション 25,373,227 から 25,381,373)。ERM タンパクは、細胞の形態維持や構造変化に関与するが (Tsukita and Yonemura 1999)、アメリカウナギの海ウナギ・川ウナギ間でも、細胞構造の維持に重要な細胞骨格 (細胞で細胞の形や代謝を制御しているタンパク質線維) 結合タンパクをコードする遺伝子が、エコタイプを分ける遺伝子の一つと推測されている (Pavey *et al.* 2015)。また興味深いことに、ナトリウム機械受容チャンネルの制御に関与する Syntrophin gamma 2 (Ou *et al.* 2003) をコードする遺伝子 (第一染色体のポジション 25,201,554 から 25,230,458) および細胞内外間イオン輸送に関与する Transmembrane protein 206 (Yang *et al.* 2019) をコードする遺伝子 (第一染色体のポジション 25,389,996 から 25,394,218) という、浸透圧調整に関連する可能性がある遺伝子も、上記の SNPs の近隣に存在する。このため、海水適応 (塩分濃度適応) に関与する遺伝子の違いが、海ウナギと川ウナギというエコタイプを分ける要因の一つであるのかもしれない。



一方、重要度の高い SNPs は地域によって異なっており、地域間においてほとんどが異なる染色体上に存在していたか、同じ染色体上にあっても物理的に大きく離れて位置していた。このことは、エコタイプの違いは、各地域特有の環境下における自然選択の影響を強く受けており、海域と河川域の塩分濃度の違いのみが環境要因ではないことを示唆する。

<引用文献>

- Aoyama J (2009) Life history and evolution of migration in catadromous eels (Genus *Anguilla*). *Aqua-BioScience Monographs* 2: 1–42.
- Aoyama J, Watanabe S, Miller MJ, Mochioka N, Otake T, Yoshinaga T, Tsukamoto K (2014) *PLoS ONE* 9: e88759
- Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, Lewis ZA, Selker EU *et al.* (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE* 3: e3376.
- Breiman L (2001) Random forests. *Machine Learning* 45: 5–32.
- Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, MA DP, Handsaker RE *et al.* (2011) The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* 27: 2156–2158.
- Gagnaire PA, Normandeau E, Caroline Côté, Hansen MM, Bernatchez L (2012) The genetic consequences of spatially varying selection in the panmictic American eel (*Anguilla rostrata*). *Genetics* 190: 725–736.
- Goldstein BA, Hubbard AE, Cutler A, Barcellos LF (2010) An application of random forests to a genome-wide association dataset: methodological considerations and new findings. *BMC Genetics* 11: 49.
- Jombart T (2008) ADEGENET: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24: 1403–1405.
- Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, Miller CA *et al.* (2012) VarScan2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Research* 22: 568–576.
- Kotake A, Okamura A, Yamada Y, Utoh T, Arai T, Miller MJ, Oka HP, Tsukamoto K (2005) Seasonal variation in the migratory history of the Japanese eel *Anguilla japonica* in Mikawa Bay, Japan. *Marine Ecology Progress Series* 293: 213–221.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G *et al.* (2009) The sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078–2079.
- Li H (2011) A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetic parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* 27: 2987–2993.
- Luikart G, England PR, Tallmon D, Jordan S, Taberlet P (2003) The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Review Genetics* 4: 981–994.
- Luu K, Bazin E, Blum MGB (2017) *pcadapt*: an R package to perform genome scans for selection based on principal component analysis. *Molecular Ecology Resources* 17: 67–77.
- Pavey SA, Gaudin J, Normandeau E, Dionne M, Castonguay M, Audet C, Bernatchez L (2015) RAD sequencing highlights polygenic discrimination of habitat ecotypes in the panmictic American eel. *Current Biology* 25:1666–1671.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Pujolar JM, Jacobsen MW, Als TD, Frydenberg J, Munch K, Jónsson B, Jian JB, Cheng L, Maes GE, Bernatchez L, Hansen MM (2014) Genome-wide single-generation signatures of local selection in the panmictic European eel. *Molecular Ecology* 23: 2514–2528.
- Sekino M, Nakamichi R, Iwasaki Y, Tanabe AS, Fujiwara A, Yasuike M, Shiraishi M, Saitoh K (2016) A new resource of single nucleotide polymorphisms in the Japanese eel *Anguilla japonica* derived from restriction site-associated DNA. *Ichthyological Research* 63: 496–504.
- Sekino M, Hashimoto K, Nakamichi R, Yamamoto M, Fujinami Y, Sasaki T (2023) Introgressive hybridization in the west Pacific pen shells (genus *Atrina*): Restricted interspecies gene flow within the genome. *Molecular Ecology* 32: 2945–2963.
- Ou Y, Strege P, Miller SM, Makielski J, Ackerman M, Gibbons SJ, Farrugia G (2003) Syntrophin gamma 2 regulates SCN5A gating by a PDZ domain-mediated interaction. *Journal of Biological Chemistry* 278: 1915–1923.
- Tsukamoto K (1992) Discovery of the spawning area for Japanese eel. *Nature* 356: 789–791.
- Tsukamoto K, Nakai I, Tesch WV (1998) Do all freshwater eels migrate? *Nature* 396: 635–636.
- Tsukita S, Yonemura S (1999) Cortical actin organization: Lessons from ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) protein. *Journal of Biological Chemistry* 274: 34507–34510.
- Vasimuddin M, Misra S, Li H, Aluru S (2019) Efficient architecture-aware acceleration of BWA-MEM for multicore systems. *2019 IEEE International Parallel and Distributed Processing Symposium*, Rio de Janeiro, Brazil. pp. 314–324.
- Wang H, Wan HT, Wu B, Jian J, Ng AHM, Chung CYL, Chow EYC *et al.* (2022) A Chromosome-level assembly of the Japanese eel genome, insights into gene duplication and chromosomal reorganization. *Gigascience* 11: giac120
- Whitlock MC, Lotterhos KE (2015) Reliable detection of loci responsible for local adaptation: Inference of a null model through trimming the distribution of F_{ST} . *The American Naturalist* 186: S24–S36.
- Yang J, Chen J, Del Carmen Vitery M, Osei-Owusu J, Chu J, Yu H, Sun S, Qiu Z (2019) PAC, an evolutionarily conserved membrane protein, is a proton-activated chloride channel. *Science* 364: 395–399.

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	山本 佑樹 (Yamamoto Yuki) (10881980)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産資源研究所(横浜)・研究員 (82708)	
研究分担者	横内 一樹 (Yokouchi Kazuki) (50723839)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産資源研究所(横浜)・主任研究員 (82708)	
研究分担者	中道 礼一郎 (Nakamichi Reiichiro) (70401255)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産資源研究所(横浜)・主任研究員 (82708)	
研究分担者	白井 厚太郎 (Shirai Kotaro) (70463908)	東京大学・大気海洋研究所・准教授 (12601)	
研究分担者	中村 洋路 (Nakamura Yoji) (90463182)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産資源研究所(横浜)・主任研究員 (82708)	

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