

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06296

研究課題名（和文）回遊パタンの進化の過程を探る：初期生活史と内分泌系からのアプローチ

研究課題名（英文）Exploring the evolutionary process of migration patterns: early life history and endocrine approach

研究代表者

前田 健（Maeda, Ken）

沖縄科学技術大学院大学・海洋生態進化発生生物学ユニット・スタッフサイエンティスト

研究者番号：20572829

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：回遊パタンの変化を伴う進化の要因を探るため、ヨシノボリ属魚類の遺伝子発現パターンと生活史を調べた。沖縄島に生息する両側回遊性（川と海の間を回遊する）と河川性（一生を川で過ごす）の姉妹種の比較から、河川性の種では変態を制御する甲状腺ホルモンの合成に関する遺伝子の発現レベルが低く、初期における形態変化が両側回遊性の種よりゆるやかに進行することが示唆された。また、フィリピンの熱帯島嶼とベトナムの大陸河川に生息する種の回遊パターンや卵サイズを明らかにし、温帯から亜熱帯の島嶼である日本の種と比較することにより、回遊パターンが進化する環境条件を議論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヨシノボリ属は、回遊パターンや生活史特性が多様であるため、回遊パタンの進化を研究するうえで優れた材料である。ヨシノボリ属について変態に関わる内分泌系の遺伝子発現を初めて明らかにしたことは、回遊パタンの進化機構の全貌解明に向けた大きな一歩である。生活史の面では、これまで知見が乏しかった大陸や熱帯島嶼に生息する種の回遊パターンや卵サイズを明らかにしたことに非常に大きな意義がある。これまで日本産の限られた種の知見に基づいて行われていた生活史進化の適応的意義に関する議論をより深めることができ、各地域の環境が独自の生活史特性を持つ種の進化に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Gene expression patterns and life histories of goby fishes of the genus *Rhinogobius* were examined to elucidate the evolutionary process of migration patterns. Comparison of multiple amphidromous (migrating between fresh water and the sea) and fluvial (freshwater resident) sister species pairs on Okinawa Island suggested that fluvial species have lower expression levels of genes related to thyroid hormone synthesis, which regulates metamorphosis, and that their morphological changes proceed more gradually than in amphidromous species. We also investigated the migration patterns and egg sizes of species inhabiting tropical islands in the Philippines and continental rivers in Vietnam, and discussed the environmental conditions under which migration patterns have evolved and maintained by comparing them with species from temperate and subtropical islands of Japan.

研究分野：魚類の生活史

キーワード：回遊 初期生活史 遺伝子発現 トランスクリプトーム 甲状腺ホルモン 卵サイズ 耳石 魚類

1. 研究開始当初の背景

回遊は、魚類をはじめとする水生生物に広く見られる。その中で川と海の間回遊を「通し回遊」と呼び、サケ、アユ、ウナギなど、発育段階ごとに全く異なる環境を行き来するダイナミックなその回遊は人々の注目を集めてきた。通し回遊は、産卵場所や仔稚魚の生息環境によって、遡河回遊、降河回遊、両側回遊の3つに大別されてきた。近年の研究により、通し回遊のパターンはさらに多様であり、これらは祖先種から回遊パターンの変化を伴って進化する過程の一場面であることが示唆されているが、その回遊パターンの進化がどのような生理機構の変化により起こるのか、またどのような適応上の理由で起こるのかはほとんど分かっていない。

本研究ではハゼ科のヨシノボリ属に着目する。ヨシノボリ属は、東アジアからインドシナ半島にいたる大陸と日本、台湾、フィリピンなどの島嶼に分布し、非常に多くの種に分化している。興味深いことに、多様な回遊パターンの種が含まれ、その違いに応じて卵サイズや個体発生の過程が異なる(図1)。例えば、日本のヨシノボリ属の約半数の種は両側回遊性(海と川の両方で成長する回遊パターン)。両側回遊性のヨシノボリ属は、川で産卵し、孵化した仔魚が海へ流下してそこで浮遊期を過ごす。その後河川に加入してさらに成長し、成熟すると産卵する)だが、沖縄島のアオバラヨシノボリとキバラヨシノボリは河川性で、浮遊仔魚期も河川上流部に留まり、一生を川で過ごす。両種の卵は両側回遊性の種より大きく、中卵型と呼ばれる。日本本土に分布するカワヨシノボリも河川性であるが、中卵型よりさらに大きい卵を産み(大卵型と呼ばれる)孵化後に浮遊期を経ず底生生活をする直達発生を行う。また、日本本土の平野部には、湖沼や氾濫原の湿地で浮遊期を過ごす湖沼性の種が生息する。

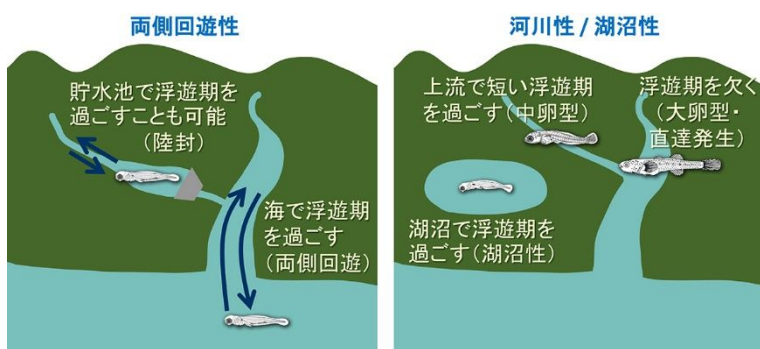


図1. 日本のヨシノボリ属魚類のさまざまな回遊パターン

このような生活史特性の多

様性からヨシノボリ属は注目を集め、日本では卵サイズや仔魚の形態、回遊生態、系統などの研究が積極的に行われ、多くの知見が蓄積されてきた。しかし、回遊パターン進化の鍵と予想される部分、すなわち個体発生の過程を制御する内分泌系や遺伝子発現は全く研究されていない。

一方で海外に目を向けると、ヨシノボリ属の卵サイズ等生活史に関する知見は非常に乏しく、回遊パターンに関する情報もほとんどない。なぜ回遊パターンの進化が生じるのか、その適応的理由を解明するためには、回遊パターンと生息環境の対応関係をさまざまな種間で比較する必要がある。ヨシノボリ属はフィリピンの熱帯島嶼や大河川が多い大陸にも分布する。日本とは異なる環境におけるこれらの生活史の知見は、回遊の進化を考える上で非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究では、回遊パターンの変化を伴う適応進化の至近要因(生理機構)と究極要因(適応的意義)の両面の解明を目的とし、2つの問いを追求する。

①生息環境や生活史の劇的な変化を伴う回遊パターンの進化は、どのような生理機構の変化によって起こるのか? 私たちは、回遊パターンの異なる姉妹種間において生活史初期の遺伝子発現を比較し、回遊パターン多様化の鍵となった変化を特定したいと考えた。

②各回遊パターンが進化し、維持される環境条件はどのようなものか? 大陸と熱帯島嶼におけるヨシノボリ属の生活史、特に回遊パターンと卵サイズを調べ、温帯から亜熱帯の島嶼である日本の種と比較する。

3. 研究の方法

(1) 生理機構: 回遊型の異なる近縁種間の比較

沖縄島には、一生を上流部で過ごす河川性のアオバラヨシノボリとキバラヨシノボリが生息し、それぞれ海で仔魚期を過ごす両側回遊性のアヤヨシノボリ、クロヨシノボリとの共通祖先から進化したことが示されている。本研究では、これら回遊パターンの異なる近縁種2組、および河川性の近縁種を持たない両側回遊性のシマヨシノボリを対象とし、仔稚魚期を通じた形態変化および遺伝子発現の変化を明らかにし、比較した。

沖縄島の河川および海で、プランクトンネット、小型曳網、たも網を用いて、孵化直後から浮遊期を経て着底後まで、さまざまな発育段階の仔稚魚を採集し、これらを8つの発育段階(Stage

1-8)に区分した。両側回遊性の3種の仔魚は形態による種同定が困難であるため、抽出したRNAのRAG2遺伝子のシーケンスを行い、種を特定した。各種、発育段階ごとに1-6個体のRNAをIllumina社のシーケンサーNova-seq 6000でシーケンスし、解析した。魚類の形態や生態の変化には内分泌系の遺伝子発現変化、特に甲状腺ホルモンの合成が大きく影響することが知られているため、特にこの合成に関与する遺伝子発現の変化に着目した。

(2) 生活史：生息環境による違い

生息環境への適応が回遊パタンの進化に与える影響を検討するために、環境が異なる日本(温帯・亜熱帯の島嶼)、フィリピンのパラワン島(熱帯島嶼)、ベトナム中部および北部(大陸河川)に分布する種の分布パターンと生活史を比較した。

分類、分布と系統

パラワン島とベトナム中部のヨシノボリ属は分類が行われていないため、他地域の種を含めた標本の形態観察を行い、これらの分類を確立し、各種の分布パターンを明らかにした。また、ミトコンドリアゲノムとddRAD-seqの解析を行い、各種の系統関係を明らかにした。

回遊履歴

パラワン島およびベトナムで採集されたヨシノボリ属の標本から耳石を摘出し、樹脂に包埋して研磨し、電子線マイクロプローブアナライザによりストロンチウム・カルシウム比(Sr:Ca比)を分析した。通常Sr濃度は淡水より海水で高いことから、耳石の核から縁辺までのSr:Ca比の変動により個体の海水-淡水間の回遊履歴を推定した。

卵サイズ

10%ホルマリンで固定され、70%エタノールで保存された成熟雌の標本から卵巣を摘出し、卵母細胞の径を計測した。1個体あたり10-20個の卵母細胞の長径と短径を計測し、平均した。

また、これまで卵サイズが未知であったケムンヒラヨシノボリ(沖縄島産)とヤイマヒラヨシノボリ(西表島産)の産着卵のサンプルを得ることができたため、卵の長径と短径を計測し、既知の種と比較した。

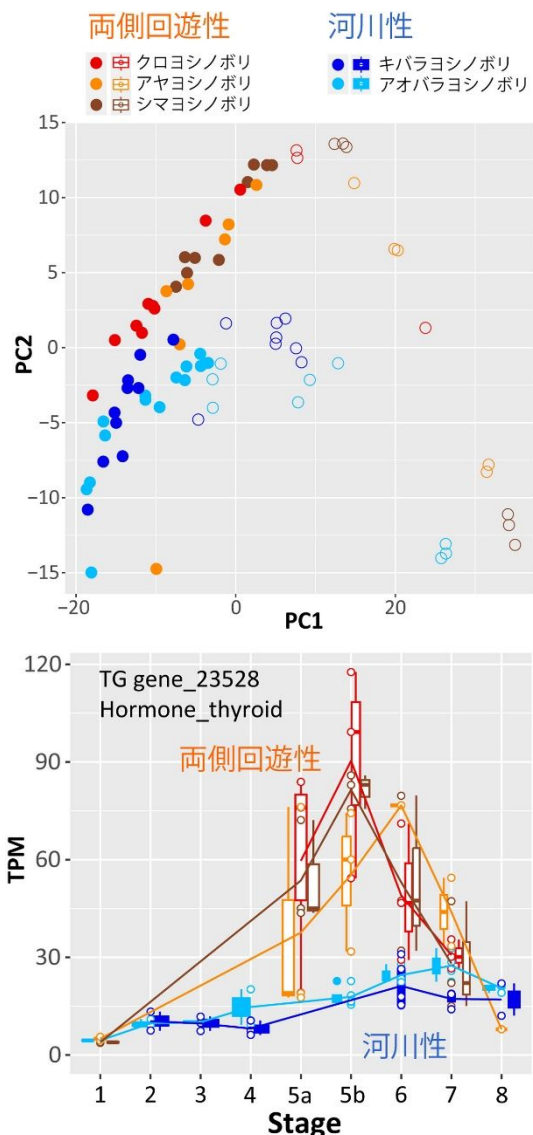
4. 研究成果

(1) 生理機構：回遊型の異なる近縁種間の比較

河川性の2種のRNA発現パターンは両側回遊性の3種とは異なった(図2上)。両側回遊性の種では、海から川に移動し変態する時に甲状腺ホルモン関連の遺伝子の発現がピークとなるが、河川性の種では、より遅い発育段階でピークを示した。また発現量自体も大きく異なり、河川性種は両側回遊性種に比べてStage5-7における発現レベルが低かった(図2下)。

系統が異なる両側回遊性と河川性の種の組み合わせでRNA発現パターンが共通していたことから、両側回遊性種から河川性種への進化の過程において生理機構が同様の方向に収斂進化したと考えられる。両側回遊性の3種は、浮遊期を終えて河川に加入する際に体表面の着色が始まり、変態が進むが、河川性の2種では体表面の色素胞が早い段階から徐々に発達した。甲状腺ホルモンは、多くの魚で変態をコントロールすることが知られている。両側回遊性の種は、生息環境が変わる時に速やかに変態を進める必要があり、甲状腺ホルモンが重要な働きをしていることが示唆される。一方、環境の変化を経験しない河川性の種は、急激な変態を必要としない。そのために河川性の2種では甲状腺ホルモンにより変態を制御するシステムの発現レベルが低下していると考えられた。

図2. 大きな変動を示した上位500遺伝子の発現に基づく主成分分析(上)と、tg遺伝子の発現ダイナミクス(下)。上の図では、stage 5aまでの個体を中抜き丸、それより発育が進んだ個体を塗りつぶした丸で示した。()



(2) 生活史：生息環境による違い

分類、分布と系統

パラワン島で発見されたヨシノボリ属 2 種を新種 *Rhinogobius estrellae*、*Rhinogobius tandikan* として記載した (図 3)。これまでパラワン島以南において本属の分布は知られていなかったことから、ヨシノボリ属の中で最も南の熱帯島嶼に分布する種として報告した。環境条件と生活史の



図 3. パラワン島の新種 *Rhinogobius estrellae*

関係を調べる本研究にとって非常に興味深い材料といえる。また、ベトナムの北部および中部に生息する種の種類を研究し、それぞれ 6 種および 5 種の分布を明らかにした (2 種は北部と中部に共通して分布)。これらの分類について、ベトナム中部の 2 新種の記載を含む論文を投稿した。

ミトコンドリアゲノムと ddRAD-seq の解析により、パラワン島の 2 新種は、日本からベトナムに広く分布するゴクラクハゼと近縁であり、これら 3 種はヨシノボリ属の中で最も古く

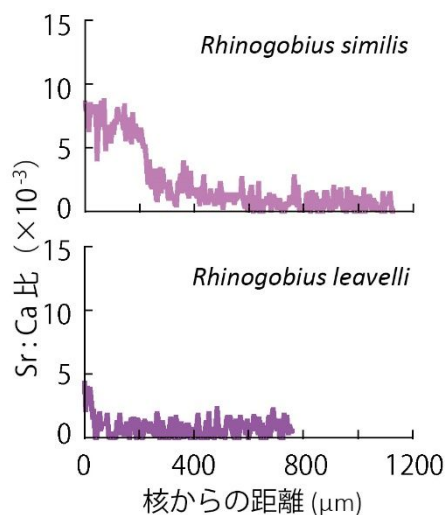
分岐した系統を構成することが明らかになった。またベトナムでは、分布が限られる種が多いが、複数の地点、河川で見つかった種であっても、地域間、河川間で遺伝的な交流を持たない種が多いことが示唆された。

回遊履歴

耳石の Sr:Ca 比から、ベトナム産 9 種のうちの 2 種が典型的な両側回遊性で仔魚期に海で成長した履歴を持ち、7 種はほぼ淡水域に留まることが示唆された (図 4)。ただし、孵化直後にやや高い Sr:Ca 比を示した個体があり、汽水域を含む下流域に短期間の回遊をする可能性も示唆された。

パラワン島の 2 種は、一生を通して Sr:Ca 比が低く、海への回遊は行わないことが示された。

図 4. ベトナム産ヨシノボリ属の耳石の核から縁辺までの Sr:Ca 比の変動。上は両側回遊性、下は河川性の例。()



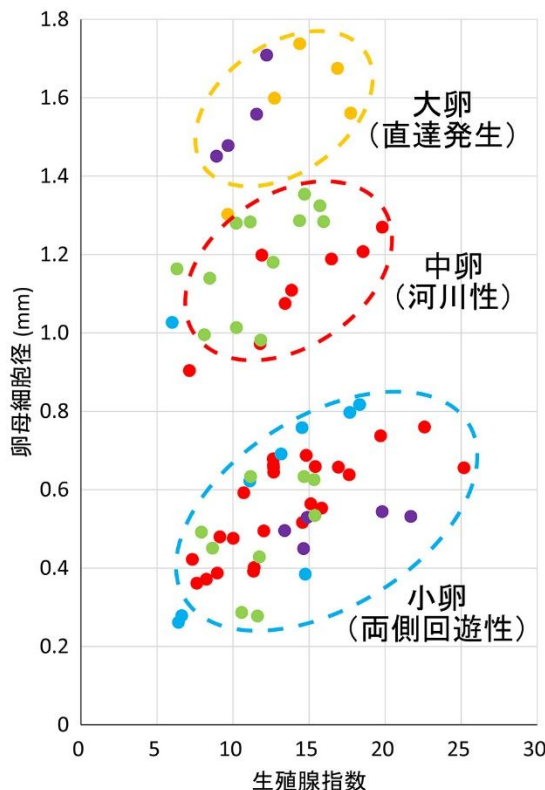
卵サイズ

日本本土の 2 種、沖縄島の 7 種、パラワン島の 1 種、ベトナムの 6 種について、それぞれ 1-6 個体から成熟卵を含む卵巣のサンプルを得た。パラワン島の *R. estrellae* は日本本土のカワヨシノボリ同様の大型卵であり、川で一生を過ごす直達発生種であることが示唆された (もう 1 種の *R. tandikan* は成熟した卵巣サンプルが得られなかったため不明)。ベトナムでは大型卵の種はなく、沖縄島のアオバラヨシノボリ、キバラヨシノボリに相当する中卵の種と両側回遊性の種に相当する小卵の種が含まれた。小卵の種の中でもゴクラクハゼは特に卵が小さく、一方、ベトナムの *R. leavelli* は比較的大きかった (図 5)。

ケムンヒラヨシノボリとヤイマヒラヨシノボリの産着卵は、長径 1.9-2.4 mm、短径 0.6-0.8 mm で、ゴクラクハゼを除く両側回遊性のヨシノボリ属の卵の中では比較的小さかった (図 6)。

図 5. ヨシノボリ属の卵巣内卵サイズ。各個体の卵母細胞 10-20 個の径の平均を 1 つの丸で示す。赤は沖縄島、紫は日本本土、黄色はパラワン島、水色はベトナム北部、緑はベトナム中部の標本。生活史が知られている日本の種の卵径に基づいて大卵、中卵、小卵に区分し、回遊パターンを推測した。生殖腺指数は、生殖腺重量の体重に対する割合で、一般に卵巣が発達しているほど大きくなる。

(→)



ケンムンヒラヨシノボリとヤイマヒラヨシノボリは、ヨシノボリ属の中で唯一海洋島(小笠原諸島)に分布するオガサワラヨシノボリに近縁であることが知られている。これらの祖先の卵は比較的小さく、未発達な仔魚が流されやすかったために分散の機会を持ち、海洋島への移住が可能であったと考えられた。

(3) 回遊パタンの進化

日本では、約半分の種が両側回遊性であり、それに加えて温帯で島の規模が大きい本州周辺には大卵で直達発生のカワヨシノボリと湖沼性の種、亜熱帯で小規模島嶼が連なる琉球列島には中卵で河川性のアオバラヨシノボリ、キバラヨシノボリが分布する。本研究の結果、熱帯島嶼のパラワン島やベトナムの大陸河川では状況が異なることが分かった。

大陸には環境が安定した大川が多いため、カワヨシノボリのような大卵の種が多いだろうと予想していたが、調べたベトナム産の種は全て中卵または小卵であった。海に降りることが物理的に不可能と考えられるメコン川の上流

(河口から 1,000 km 以上) に分布する種であっても中卵であり、浮遊期を持つと考えられた。*R. leavelli* の卵は日本の両側回遊性の種に近いサイズであったが、耳石の微量元素分析は海に降りないことを示したことから、大きな川では小卵であっても海には出ず、淡水域の下流部に留まることが示唆された。

これまで中卵型は琉球列島の 2 種しか知られていなかったことから、私たちは日本本土とは異なりコイ目等の遊泳魚がいない島嶼上流部の環境が中卵型の進化の条件と考えていたが、本研究により、大陸の河川にも中卵型に相当する卵サイズを持つ種が多く生息することが明らかになった。ベトナムの河川にはコイ目魚類等多数の純淡水魚が生息し、ヨシノボリ属の仔魚はそれらの住む環境で発育していると考えられる。

ベトナムでは、ゴクラクハゼと 1 未記載種のみが両側回遊性で、それらの卵サイズは小卵の中でも比較的小さかった。特にゴクラクハゼの卵サイズは本種の沖縄島の個体群よりさらに小さく、ヨシノボリ属の中で最小であった。これらはいずれも沿岸部に分布し、比較的分布範囲が広がった。大陸では、沿岸部に両側回遊性の種が分布するものの、その種多様性は日本と比べて低いようであった。

パラワン島の *R. estrellae* は、カワヨシノボリに匹敵する大卵であり、小河川で一生涯を過ごすと考えられた。パラワン島ではヨシノボリ属の分布が局限され、2 種がそれぞれ別の 1 河川で見つかっているのみである。多くの種が普遍的に分布する日本やベトナムとは生息状況が全く異なる。*R. estrellae* の生息地は高い山の麓にあり、周辺の河川と比べて水温が低い。本種は、両側回遊性のゴクラクハゼとの共通祖先が、現在のゴクラクハゼより広く分布していた時にパラワン島に分布を広げ、条件の合う少数の川に取り残され、河川性の種へと進化したのだろう。卵径が最も小さいゴクラクハゼの系統から大卵の *R. estrellae* が進化したことは、卵径の変化を伴う進化が環境の変化に伴ってフレキシブルに起こりうることを示す。今後、より多くの種で卵サイズと回遊パタン、およびそれらの系統関係が明らかになれば、卵サイズや回遊パタンの変化する条件がさらに深く理解できるだろう。

本研究では、両側回遊性から河川性に進化する過程で甲状腺ホルモンによる変態の制御機構の役割が低下する方向に進化している可能性が示唆された。そうだとするならば、その逆の河川性から両側回遊性への進化はより起こりにくい可能性がある。実際にヨシノボリ属においては、両側回遊性から河川性へ進化したと考えられる種はいくつかあるが、河川性から両側回遊性へ進化した事例は今のところ知られていない。

本研究では、ヨシノボリ属の回遊パタンの進化についての理解をかなり深めることができたが、現段階では説明が難しい新たな疑問も多数生じた。例えば、甲状腺ホルモン合成に関与する遺伝子発現の低下は、大卵の種や湖沼性の種にも共通して見られるのだろうか？ベトナムのヨシノボリ属はなぜ大卵ではなく中卵なのか？パラワン島のヨシノボリ属はなぜ中卵ではなく大卵なのか？これらの疑問に答えるためには、各種の RNA 発現パタン、仔稚魚の生息環境、形態変化、行動を解明する必要があるだろう。

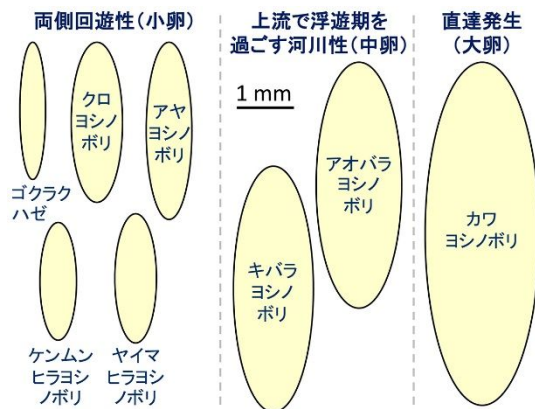


図 6. 本研究で明らかになったケンムンヒラヨシノボリとヤイマヒラヨシノボリを含むヨシノボリ属の産着卵のサイズ。卵母細胞は球形に近いが、生み出された卵は吸水し、細長い形になる。実際には弱いくびれを持つことが多いが、ここではサイズ比較を容易にするため、長径と短径を元に楕円体の断面として表現した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ken Maeda, Chuya Shinzato, Ryo Koyanagi, Taiga Kunishima, Hirozumi Kobayashi, Noriyuki Satoh, Herminie P. Palla	4. 巻 5068
2. 論文標題 Two new species of Rhinogobius (Gobiiformes: Oxudercidae) from Palawan, Philippines, with their phylogenetic placement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zootaxa	6. 最初と最後の頁 81～98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11646/zootaxa.5068.1.3	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

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 5件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ken Maeda, Midori Iida, Hirozumi Kobayashi, Kotaro Shirai, Herminie P. Palla, Hau Duc Tran
2. 発表標題 Migration and distribution patterns of freshwater gobies of the genus Rhinogobius in continental rivers and tropical island's streams
3. 学会等名 The 11th Indo-Pacific Fish Conference（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飯田碧
2. 発表標題 鳥の淡水性回遊魚の分散と生態：佐渡と沖縄の例から
3. 学会等名 第55回種生物学シンポジウム 古くて新しい鳥の生物学：鳥に生きる動植物の織りなす物語を読み解く（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前田健・山崎曜
2. 発表標題 ケムンヒラヨシノポリとヤイマヒラヨシノポリの卵サイズ
3. 学会等名 2022年度ゴリ研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前田健
2. 発表標題 海を渡る淡水魚
3. 学会等名 第38回 国際生物学賞記念シンポジウム "魚の生物学：その生態、進化と発生" (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田健
2. 発表標題 沖縄の川の魚の多様性
3. 学会等名 沖縄生物教育研究会創立70周年記念講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Midori Iida, Hirozumi Kobayashi, Hau Duc Tran, Ken Maeda
2. 発表標題 Diadromous migration of gobies in Vietnam in comparison with other Asian regions
3. 学会等名 The 2nd National Conference on Ichthyology in Vietnam (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯田碧
2. 発表標題 通し回遊性魚類の幼生の分散と滞留
3. 学会等名 2021年日本ベントス学会・日本プランクトン学会 合同大会シンポジウム 分野横断で挑む海洋幼生生態学 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

フィリピンの川から2つのハゼの新種を発見
<https://www.oist.jp/ja/news-center/press-releases/36830>

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	飯田 碧 (Iida Midori) (30745328)	新潟大学・佐渡自然共生科学センター・准教授 (13101)	
研究分担者	山崎 曜 (Yamasaki Yo) (40816021)	国立遺伝学研究所・ゲノム・進化研究系・助教 (63801)	

	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	Palla Herminie P. (Palla Herminie P.)	ウェスタン・フィリピン大学	
研究協力者	Tran Hau Duc (Tran Hau Duc)	ハノイ国立教育大学	

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			
フィリピン	Western Philippines University			
ベトナム	Hanoi National University of Education			