

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19284

研究課題名（和文）ミュゼオミクスの挑戦：過去の個体数変動における進化的救助の貢献を推定する

研究課題名（英文）A challenge toward museomics for historical reconstruction of evolutionary rescue

研究代表者

内海 俊介（Utsumi, Shunsuke）

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授

研究者番号：10642019

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ゴミムシを対象に、2004年から2021年までに日本各地から採集された標本を用いて進化的救助に関する研究を行った。まず、形質の広域進化パターンとしての緯度勾配、18年間の形質の時間動態、形質の攪乱応答、を明らかにした。特に、形質の時間動態については、体サイズが広域で一貫した変動をし、18年間の前半は小型化が進行していたものが後半は大型化が進行しているといういずれも新規の現象を発見した。また、集団サイズとの関連性が示唆された。さらにゲノム分析を行い、標本からのDNA抽出の検討、ライブラリー調整の検討、ターゲットエンリッチメントの実施、リファレンスゲノムの作成を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、長期モニタリングによる標本を活用し、これまでに知られていなかった形質の時空間変動パターンを明らかにし、集団サイズや攪乱応答について明らかにした知見をあわせて、可塑性を含む適応と、進化的救助の実態に迫る可能性が示唆された。さらに、標本を活用したゲノミクスの実施が実現する目途がたち、ミュゼオミクスによる進化的救助の解明に迫るところまでに至った。進化的救助の実態解明は、進化を考慮したこれからの生態系管理や保全において急務となっており高い意義を持つ。また、使用した標本は標準的なモニタリング手法によって得られた標本であることから、本成果はさらなる波及効果が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted an evolutionary rescue research of the ground beetle *Synuchus cycloderus* using specimens collected from different regions of Japan from 2004 to 2021. First, we identified (1) latitudinal gradients as large-scale evolutionary patterns of traits, (2) temporal dynamics of traits over 18 years, and (3) disturbance responses of traits. In particular, with respect to the temporal dynamics of traits, we found that body size varied consistently across regions, and that the first half of the 18-year period was characterized by a progressive reduction in size, while the second half was characterized by a progressive increase in size, all of which are novel phenomena. A relationship with population size was also suggested. Further genomic analysis was performed to investigate DNA extraction from samples, library adaptation, target enrichment, and reference genome construction.

研究分野：生態学

キーワード：標本 生物多様性 形質 ゲノミクス 進化

1. 研究開始当初の背景

この40年間に保全生態学は大きく発展し、絶滅危惧種の保全だけでなく、種間相互作用を含めた生態系全体を持続的に保全・管理し、人間活動によって損なわれた自然環境を取り戻し、自然再生を行うための知見を蓄積しつつある。21世紀に入ると、長期的な展望を持った保全・管理を行う上で、進化的視点が重要であることが指摘されるようになり、進化の影響を考慮した保全や自然再生の枠組みが提案されるようになってきている。保全生態学において、生物多様性の保全のために考慮すべき要因として進化が重要であるという認識が広く受け入れられようになりつつある(門脇ら 2020)。

そもそも、気候変動・生息地断片化・外来種などの人間活動に関連する環境変化はますます深刻さを増している。そして、それによる生物の絶滅が急速に進行していることが最近も相次いで発表された(IPBES 2019)。このような状況だからこそ、上記のように進化や不適応を明示的に考慮した新しい保全・管理が求められているのである。この視点に立った時、環境ストレスに適応する、野外生物の迅速な進化によって絶滅が回避される進化的救助という新しい理論が注目を集めつつある。野外生物の絶滅を防ぐためには、これまでは新規個体導入による個体数回復(人口学的救助)や遺伝的多様性の回復で絶滅回避をはかる遺伝的救助の2つが主要なアプローチだった。対して進化的救助とは、環境ストレスに対する生物の迅速な適応進化のポテンシャルを予測し、自然生態系における適応進化を制御することを通して、野外生物の保全に繋げようというこれまでに人類が成したことの無い新しい挑戦である。しかし、理論的な提案や室内培養系での検証はあるものの、進化的救助の野外実証例はない。それが進化的救助の研究の進展を妨げており、生態系管理や保全へ実装への道筋も見えていないことにつながっている。

2. 研究の目的

そこで本研究は、ミュゼオミクスという新興アプローチからこの問題におけるブレイクスルーを起こそうというものである。博物館の自然史標本のあらゆる形質・生化学・分子情報を網羅的に抽出し、それによって進化史や、遺伝的多様性の歴史の変遷などを推定しようとするのがミュゼオミクスである。本研究は、日本国内において過去20年間に広域長期モニタリングによって集積された標本を対象として研究を進める。そうすることによって、集団という個体よりも上位の生物階層パラメータも紐付けた新規なミュゼオミクスに取り組む。すなわち、過去から現在までの地球気候変動(気温上昇)・広域での集団の形質の変化・集団サイズの変化の3つを関連付けて解析する。それによって、近過去から現在の気候変動化における野外生物集団の進化的救助の実態を探索的に調べていくことが本研究の目的である。さらに、標本からの適切なゲノムDNA抽出方法の検討を行う。そして、その(微量にしか得られない)標本DNAを対象にした次世代シーケンシングのため、ライブラリー調整およびターゲットエンリッチメントのためのハイブリダイゼーションの適用可能性を検討する。あわせて、対象種のロングリード・シーケンシングも実施し、これらのライブラリーの解析にむけたりファレンスゲノムの作成も行う。

3. 研究の方法

日本の森林生態系での代表的な生態系観測に、環境省モニタリングサイト1000プロジェクトがある。これに関わるサイト群では定量性の高い統一調査法で地上徘徊性昆虫が調査採集されており、提案者が所属する北海道大学に約20年分の標本が保存されている。この標本の中で、特に、オサムシ科ナガゴミムシ亜科クロツヤヒラタゴミムシ(*Synuchus cycloderus*)(以下、クロツヤ)を対照する。これは、本種が主として南方を分布の中心とし、近年の地球温暖化を背景に東北地方や北海道で個体数の増加傾向がみられることが指摘されているからである。

モニタリングサイト1000により採集されたクロツヤ標本を対象に乾燥重量を計測し、体サイズという形質の時空間変動パターンを明らかにする。気候変動との深い関連性のあるテーマに緯度勾配の問題がある。オサムシ科ではしばしば高緯度ほど体サイズが小さくなるという逆ベルクマン則のような関係が認められている。緯度との関係性が時間(年)とともにどのように変化するのかも明らかにする。また、各採集サイト内における体サイズの年変動パターンも調べ、緯度勾配パターンの生成と関連づけることにより、進化的応答の可能性や進化的救助の可能性を検討する。

さらに、現生のクロツヤ類の機能形質としての体サイズの意義とその環境応答性(特に温暖化だけでなく環境劣化因子への)について洞察を得るために、大規模攪乱(山腹崩壊)を模した野外実験地において、地上徘徊性昆虫群集の調査を実施し、機能形質としての体サイズの状態を明らかにする。

あわせて、モニタリングサイト1000におけるクロツヤ標本からゲノミクスを行っていくための条件や実施可能性を検討する。まず、これらの標本には酢酸エチルへの長時間暴露という薬剤処理と、オープンをもちいた高温乾燥など、DNAの保存にはあまり適さない処理がされている。まずゲノム分析のための最適な抽出法を検討する。次に、断片化酵素をもちいたライブラリー調整および、超保存エレメントを対象としたターゲットエンリッチメントによるライブラリー調整を検討する。最後に、ロングリード・シーケンシングによるリファレンスゲノム作成を進める。

4. 研究成果

(1) 体サイズの緯度勾配

クロツヤ形質における地理パターンを探索するために、メス成虫の体サイズ(乾燥重量)の分析を行った(2004年~2021年の毎年、破損なし個体のみ、 $n = 3274$)。体サイズには非常に大きな地理変異があり、特に高緯度に行くほど有意に体重が上昇することが分かった(図1左・緯度: $R^2 = 0.205$ 、 $P < 0.0001$)。緯度7.5度の間に体重は1.5倍も増加している。傾きについて年による有意な変動は検出されず、この正の関係性は一貫していた。その一方で、年の効果は有意であり(年: $P = 0.0002$)、体サイズ・緯度関係が維持されたまま、体サイズの年変動が国土スケールで生じていることが示唆された。

クロツヤと近縁なゴミムシ類では、体サイズと緯度に負の関係がみられ(高緯度ほど体サイズが小さい)逆ベルクマン則のようなパターンとなっている。その他の昆虫類でもその傾向がよく知られている。この違いが生じる理由は明らかではないが、一つの原因として考えられるのはクロツヤの生活史における夏眠という特性である。クロツヤにおいては越冬幼虫が春に羽化するが、春から夏のほとんどの時期は夏眠という休眠に入り、秋に活発な活動を開始して繁殖活動を行うという生活史をもつ。低緯度高温地域ほど、この夏眠は長いと考えられる。羽化は早いために早く夏眠に入り、冷涼になるのが遅いため夏眠解除が遅いからである。そのため、幼虫の発育期間が短くなり、その結果、体サイズは低緯度ほど小さくなることが考えられる。

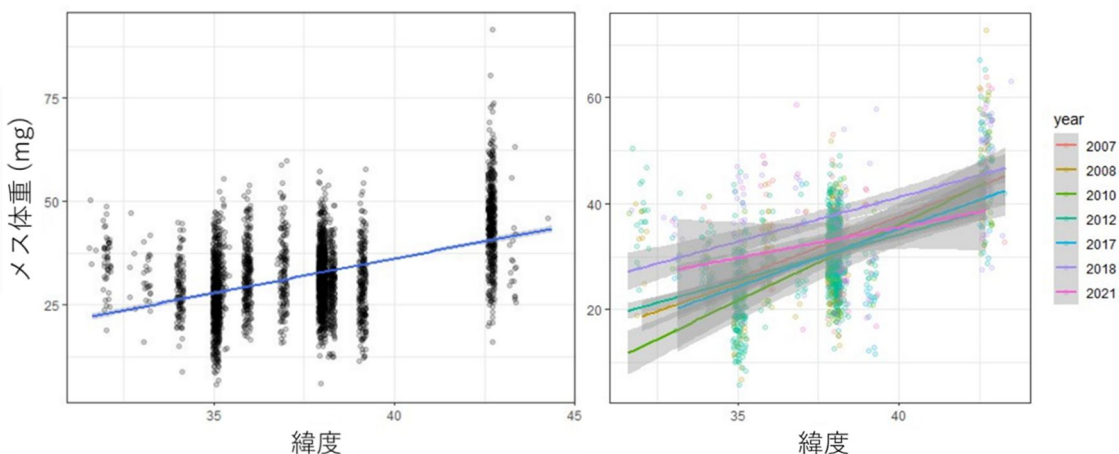


図1. クロツヤメス成虫の体サイズ緯度勾配。左) 2004年~2021年において九州から北海道に至る日本各地からモニタリングで採集されたメス個体。右) 勾配の傾きは変わらないが切片に年変動がある。

(2) 体サイズの長期変動

前述のとおり、体サイズ・緯度関係は、傾きが一定のまま上下に変動することが示唆される。それについて図示したものが図1右である。見やすさのために一部の年についてのみ抜粋した。ここから、00年代から10年代はじめにかけて全体として体サイズが減少し、10年代末に再び元のレベルに戻るといった傾向が見てとることができる。

この関係をサイトごとに分けて示したものが図2である。このグラフからも、2004年~2021年の期間において、前半は体サイズが減少していたのが後半は増加に転じたことがわかる。実際に、全データを対象に、年の二次の項も含むモデルを作成したところ、一次の項のみを含むモデルより二次の項を含むモデルのほうが当てはまりの良いモデルであることが支持された(最小AIC)。さらに、二次の係数推定値は正值で下に凸、一次の係数推定値は負値で(ともに有意)ちょうど期間の中間ごろに頂点がくるモデルであった。つまり、国土の広域スケールで、2000年代の約20年の間に体サイズの減少期(小型化)から増加期(大型化)へという過程が生じていたということである。

このような広域同調的な形質変化はどのようにして生じているのか。資源をめぐる種内/種間競争などの生物間相互作用は局所的には体サイズに影響を与えうるが、このような広域的な変化を説明することは難しいと思われる。図1で示したように、クロツヤには低緯度ほど体サイズが小さいというマクロ・パターンが存在する。それから考えると、小型化については、地球温暖化による気温上昇

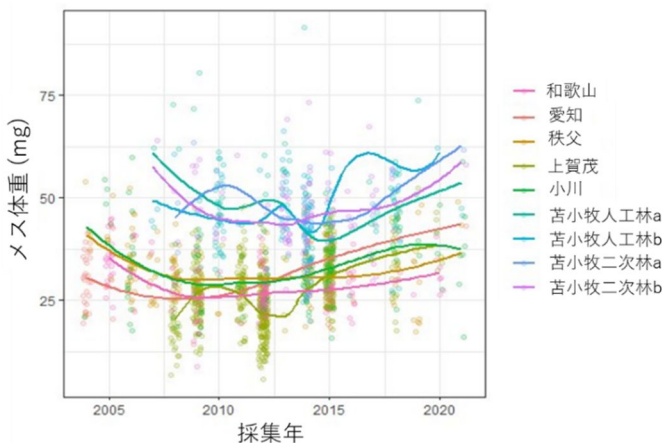


図2. 体サイズの時間変動。広域で一貫した形質変動がある。18年間のうち前半期は小型化が進行し、後半期は再び大型化。

に対する可塑的応答ではないかと推測される。その一方、後半の大型化については、気温上昇は一貫して続いているため同様に説明することはできない。ここで二つの進化モデルを考える。可塑性による応答とは独立に高温ストレス耐性が適応進化することによって、可塑性による短期応答からタイムラグを伴ってそれぞれの緯度地域における最適体サイズに戻るモデル。小型化が気温とは別の環境劣化因子(森林の大規模攪乱など)により適応度上の不利益を被るようになり、高温ストレス耐性の適応進化によって大型化に転じるモデル。この二つのモデルを検証するためには適応遺伝子の動態を今後明らかにしていく必要がある。

同時に集団の個体数の解析も行った。その結果、ちょうど小型化の進行時には個体数の増加傾向がみられ、大型化に転じて以降は集団サイズが減少している傾向がみられた。元来南方系とされるクロツヤは、温暖化への可塑的応答の段階ではより利益を受け取りやすく、個体数も増加するのかもしれない。逆に、大型化が進む時期に集団サイズが減少しているのは、近年特に問題視されるシカ食害による森林環境の劣化という攪乱との関係で強い自然選択を受けているためなのかもしれない。

(3) 大規模攪乱に対する機能形質の応答

上記の進化モデルのうちの可能性を探索するために、実験的に大規模な森林攪乱を起こし(皆伐+強度の地剥ぎによる山腹崩壊を模した処理)それへのクロツヤを含む徘徊性昆虫群集の機能形質レベルの応答を明らかにした(Furusawa et al. 2023)。その結果、大規模攪乱に対しては、群集レベルでの機能形質は体長が有意に小さくなる小型化を示すことが明らかになった(図3左、 $P = 0.01$)。全個体の計測をしているため、種別個体数分布は考慮されている。これは、小型の種ほど移動分散能力が高いことにより、攪乱環境に移入しやすいからだと考えられる。また、群集の種組成は、攪乱処理区と非攪乱森林で明確に異なっていた(Furusawa et al. 2023)。その逆に、クロツヤとごく近縁なコクロツヤの種内にも限定した場合においては、攪乱環境にいる個体は体サイズがより大型であった(図3右、 $P < 0.05$)。このことの適応的意義は不明であるが、攪乱処理区は日照、乾燥、気温などさまざまな点で高ストレス条件のもとにあることから、種内レベルではこれらの高ストレス耐性には大型の体サイズが相関しているかもしれない。

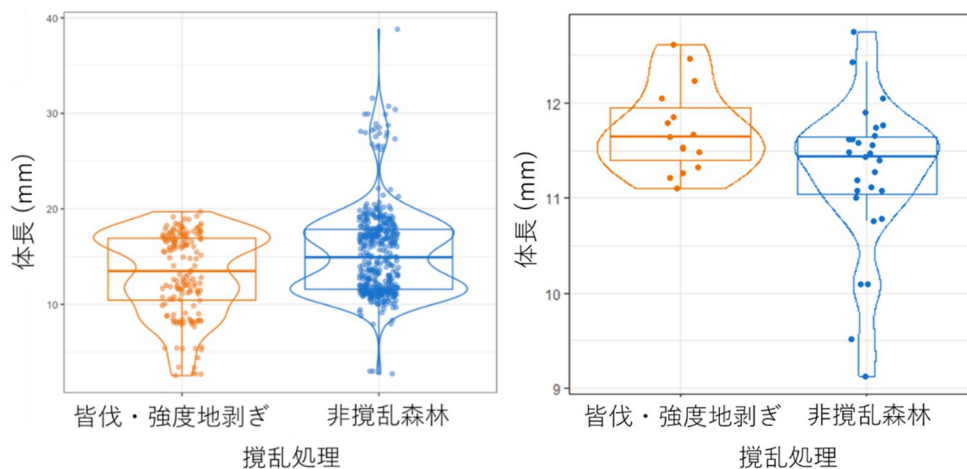


図3. 大規模攪乱に対する機能形質の応答。左) 徘徊性甲虫の体サイズの応答、右) コクロツヤにおける体サイズの応答。

(4) 標本からのDNA抽出

モニタリングサイト1000によって採集され保管されているクロツヤの標本のうち、同一サイトで一採集期において十分な個体数の標本があるという条件で抽出し、そのうちの30%未満の標本から雄雌同数になるようにして個体をランダムに選択した。DNA抽出試験に供したサイトと標本数のリストは表1の通りである。この標本から左後肢1本のみを切除し、その組織片のみを抽出に使用し、元の標本は元の保管状態に戻した。

表1. DNA抽出を行った標本リスト

サイト	2005	2006	2009	2012	2014	2015	2018	2019	2021	総計
青葉山		8	13	13		13	13		15	75
上賀茂		2	11	13		12				38
カヌマ沢	5			11		13		5	5	39
苫小牧			8		13		12			33
総計	5	10	32	37	13	38	25	5	20	185

まず、非侵襲法を行った。CTAB 溶液に後肢を 24 時間浸したのち、後肢を取り出して十分にふきとりエッペンチューブに保管した。その後、CTAB 法により DNA 抽出を行った。この方法により、2021 年に札幌にて採集して乾燥のみで作成したクロツヤ標本からは、十分な DNA 抽出ができた。しかし、モニタリングサイト 1000 の標本からはごく微量しか抽出できなかった。これは、酢酸エチルによる暴露時間が長い、オープンで乾燥させている、という前処理が入っているためだと思われる。

次に、保管していた左後肢を液体窒素で粉碎し、キアゲン社の Blood and Tissue Mini kit により標準プロトコルにしたがって抽出処理を行った。それにより、図 4 の抽出結果が得られ、非侵襲法に比べて結果が改善した。

また、1 年前と 2 年前の標本からは比較的効率よく DNA が回収できるが、3 年目以降では回収量が下がってしまうことが分かった。しかし、3 年目以降に単調に減少するのではなく、ほぼ一定の収量となった。この収量があれば NGS ライブラリーの作成も可能である。

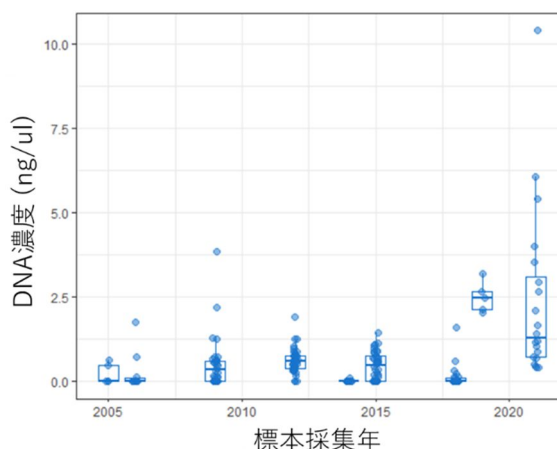


図 4 . 標本からの DNA の収量

(5) ライブラリー調整・ターゲットエンリッチメント

上述の DNA のうち 2006 年から 2021 年までのサンプルを 96 個選び、NGS ライブラリーの調整を行った。New England 社の NEBNext Ultra II FS DNA Library Prep Kit for Illumina を使用した。これには断片化酵素が含まれており、100pg の DNA から高収量でライブラリーを調整できるとされる。これにより、高品質なライブラリーが調整できた。

さらに、このライブラリーを用いて、ターゲットエンリッチメントによるライブラリー調整も行った。これは特定プローブ群によるハイブリダイゼーションにより、特定領域の断片のみを選択的に取り出して濃縮する方法である。本研究では、甲虫目用に開発された超保存エレメント (UCE) のプローブ群をターゲットエンリッチメントに用いた (myBaits UCE Coleoptera 1.1kv1)。こちらにおいてもライブラリー調整が完了した。この二つのライブラリーのシーケンスを現在受託業者に委託しているところでまだ結果が得られていないが、十分な品質のライブラリーが調整できていると思われる。

(6) ロングリード・シーケンス

札幌の手稲山にて 2021 年、2022 年の秋にピットフォールトラップにてクロツヤの採集を行った。新鮮な個体を超低温で実験まで保存した。ゲノム DNA の抽出には、キアゲン社の Blood & Cell Culture DNA Midi Kit と Genomic-tip 100/G を使用した。それにより、1 個体から 75ng/ul の高品質な DNA を高い収量で得ることであった。Nanopore 社の MinION を用いて、Rapid Sequencing Kit によるシーケンスを行った。その結果の要約は以下の通りである。一回目、スループット：2.22 Gb、リード数：820.84 k、N50：6.47 kb。二回目、スループット：1.16 Gb、リード数：448.56 k、N50：6.01 kb。

また、この DNA を上記の NEB ライブラリー調整キットによりライブラリー作成を行い、ショートリードのシーケンシングも行った。これらから得られたデータをアセンブルし、リファレンス・ゲノムデータを得た。今後、このリファレンスを用いて、(5) で得られたデータの解析を行う予定である。

今後、標本を活用した時空間分析から得られた広域で一貫した形質変化パターンと集団サイズ分析、そしてゲノミクス解析で得られた成果を統合し、ミュゼオミクスによる進化的救助のさらなる解明につなげていく。

< 引用文献 >

門脇 浩明, 山道 真人, 深野 祐也, 石塚 航, 三村 真紀子, 西廣 淳, 横溝 裕行, 内海 俊介 (2020) 進化を考慮した保全生態学の確立と生態系管理に向けて, 保全生態学研究, 2020, 25 巻, 2 号, <https://doi.org/10.18960/hozen.1933>

Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services (2019) Global assessment report on biodiversity and ecosystem services. IPBES
Furusawa J, Makoto K, Utsumi S. (2023) A large-scale field experiment of artificially caused landslides with replications revealed the response of the ground-dwelling beetle community to landslides. Ecology and Evolution 13: e9939. <https://doi.org/10.1002/ece3.9939>

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Furusawa Jumpei, Makoto Kobayashi, Utsumi Shunsuke	4. 巻 13
2. 論文標題 A large scale field experiment of artificially caused landslides with replications revealed the response of the ground dwelling beetle community to landslides	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ece3.9939	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古澤惇平、小林真、内海俊介
2. 発表標題 山腹崩壊に対する徘徊性甲虫群集の応答～大規模実験で明らかにする～
3. 学会等名 第38回個体群生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古澤惇平、小林真、内海俊介
2. 発表標題 山腹崩壊が起きたとき徘徊性昆虫はどう応答するのか？大規模野外実験で明らかにする
3. 学会等名 第70回日本生態学会大会
4. 発表年 2023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	日浦 勉 (Hiura Tsutomu) (70250496)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授 (12601)	

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