

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291079

研究課題名(和文) 温帯古代湖・琵琶湖の魚類群集における湖沼適応の実態と遺伝基盤の解明

研究課題名(英文) Adaptation of fishes in Lake Biwa, an ancient temperate lake in Japan, and its genetic basis

研究代表者

渡辺 勝敏 (Watanabe, Katsutoshi)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00324955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：温帯古代湖である琵琶湖のユニークな魚類相における固有種の起源と適応進化の遺伝基盤を明らかにするために、複数の固有種群を対象に、形態分析や次世代シーケンサーを用いたミトゲノム、発現遺伝子解析、ゲノムワイド多型分析等を行った。それらにより、4つの柱で研究を展開し、琵琶湖固有種の適応進化に関する理解を深めた。(1)湖適応に関する形態および遺伝子発現を含む表現型を明確化した。(2)ミトゲノムや核ゲノムの遺伝変異を用いて強固な系統関係と人口学的歴史を推定した。(3)適応関連候補遺伝子のスクリーニングに基づき、種群間の共通性と多様性を明らかにした。(4)QTL分析に基づき、適応関連領域を検出した。

研究成果の概要(英文)：To clarify the origins and genetic basis of the adaptations of endemic species in the unique freshwater fish fauna of Lake Biwa, an ancient temperate lake, morphological comparisons and analyses of mitogenomes, gene expression, and genome-wide polymorphisms were conducted for several species groups. The study used four approaches to deepen our understanding of the adaptive evolution of the endemic fishes. (1) Phenotypes (morphology and gene expression) related to lake adaptation were clarified. (2) Robust phylogenetic relationships and demographic histories were estimated based on genetic variation in mitochondrial and nuclear genomes. (3) Screening for candidate genes for adaptation, the commonalities and diversity among species groups were clarified. (4) Genomic regions associated with adaptation were detected by quantitative trait locus analysis.

研究分野：進化生物学

キーワード：古代湖 琵琶湖 固有種 適応進化 遺伝基盤 人口統計学 分子系統 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

古代湖は「進化の実験場」として生物多様性の創出や多種共存の機構に関する至適な研究対象として注目され、多くの進化・生態学的研究が進められてきた。琵琶湖は、温帯域に位置する代表的な古代湖で、約500万年の歴史をもつ。琵琶湖には1000種以上の多様な水生生物が生息するが、そのうち固有種は数十種程度と、それが数百種にも及ぶ他の典型的な古代湖（バイカル湖やタンガニイカ湖など）と比べて格段に少なく、一部の貝類を除いて適応放散した species flock も存在しない。約70種が生息する魚類では、系統的に離れた6科からわずかずつ、計16種・亜種の固有群・準固有群が存在するのみである。この「非適応放散的固有性」は、現在のような深く広い琵琶湖が約40万年前に形成され始める前、またその後の地質学的・生物地理的歴史を反映するものと推察される。温帯古代湖におけるこういった進化の実態は、顕著な適応放散によらない、しかし明確な適応現象を含む、より一般的な群集の種多様化プロセスを理解する上で、格好の研究対象だと考えられた。

申請者らはこれまで、固有種を中心とする琵琶湖産魚類の起源と人口学的歴史を明らかにすべく、主にミトコンドリアDNA(mtDNA)の部分塩基配列情報を用いた分子遺伝解析を行ってきた。その結果、琵琶湖固有系列の分岐年代は、現琵琶湖の形成の以前と以降にわたり、種群によって大きなばらつきがあるが、一方、その起源の新旧にかかわらず、更新世中～後期の現琵琶湖において集団が拡大した痕跡が見いだされていた。これらの結果は、現琵琶湖という多様で大きな空きニッチにさまざまな系統が進出し、いくつかの環境軸に沿って適応的な収斂進化を示しながら、固有魚類群集が生み出されてきたことを示唆する。しかし、これまでの推察は、一部の種において母系遺伝性のmtDNAの一部から得られたものに過ぎず、また湖沼適応の実態も漠然としたままであった。そして湖沼適応の進化遺伝学的な基盤は明らかでなかった。そこで、琵琶湖魚類群集の非適応放散的多様化が、祖先的な河川種と湖沼適応種のペアによって作り出されているという利点を活かしながら、近年発達したゲノム科学的手法を有効に活用することによって、新規環境への侵入にともなう適応進化と固有群集形成史について追究することができると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、琵琶湖における固有魚類群集の進化的形成機構を明らかにすることを目指し、典型的な固有種を含む複数の種群を対象に、次の4つを柱として、湖沼適応における共通性と多様性を明らかにすることとした。

(1) 表現型適応の定量化

複数の環境軸に対する湖沼適応の実態を、形態学・生理学的観点から定量的に明らかにする。

(2) 系統推定と歴史人口学的解析

対象種の強固な系統関係と人口学的歴史を、ミトコンドリア全ゲノム(ミトゲノム)や核ゲノムの多数遺伝子座のSNPs(一塩基多型)を用いて推定する。

(3) 候補遺伝子の適応進化の探索

湖沼適応との関連が予想される遺伝子群におけるタンパク質構造(アミノ酸配列)の機能的な進化的変化をスクリーニングする。

(4) 湖沼適応ゲノム領域の網羅的探索

自然選択を受けたゲノム領域を量的形質遺伝子座(QTL)分析等に基づき網羅的に探索する。

3. 研究の方法

(1) 研究体制と全体の流れ

本研究は、京都大学、東京大学大気海洋研究所、福井県立大学、総合地球環境学研究所に属するメンバーで組織し、強い協力体制のもとで実施した。

東京大学・地球環境学研究所では、目的の(1)と(2)を、福井県立大学では(3)と(4)を、京都大学では(1)、(2)、(3)を重点的に担当した。実施に際しては、申請時の計画を尊重しながら、次世代シーケンサー(NGS)等を用いた新手法の導入や予備解析に基づく計画改変を適宜行った。

(2) 分析対象

起源の新旧を含む琵琶湖固有種・固有型およびその近縁種を、特徴的な湖沼適応傾向を示す次の3タイプに分けて選択し、各解析において対象種の追加も行った。

沖合遊泳適応：ホンモロコ、日本固有野生型コイ

深場適応：イサザ、ウツセミカジカ

岩礁適応：アブラヒガイ

(3) 研究方法

下記の4つのアプローチをそれぞれ複数の対象種について行った。

1. 表現型適応の定量化

1-1. 形態分析：魚体標本について、幾何学的形態計測分析等に基づき、近縁種からの形態変化、また種内の形態変異を定量化した。

1-2. トランスクリプトーム分析：RNA-seq法により、湖沼適応種と最近縁種の発現遺伝子の比較を行い、下記3の基礎情報とした。

2. 系統推定と歴史人口学的解析

ミトコンドリア全ゲノム（ミトゲノム）および核ゲノムの多数遺伝子座の多型（HapSTR、MIG-seq による SNPs；RNA-seq）を用いて、系統・年代推定（化石、地理的較正点に基づく緩和分子時計モデル）と人口学的解析（Bayesian Skyline Plots）を行い、各種群の分岐年代および湖での個体数変動の履歴を推定した。

3. 候補遺伝子の適応進化の探索

3-1. ミトゲノムにおける適応：呼吸や代謝に関する重要細胞内器官であるミトコンドリアのゲノムにおける自然選択の検出を、複数種の多数個体のミトゲノムデータを用いて行った。

3-2. 生態関連候補遺伝子：深場適応したイサザのヘモグロビン遺伝子変異の特徴付け、岩礁適応したアブラヒガイの体色関連遺伝子の特定と変異を調べた。

3-3. RNA-seq 法による網羅的探索：近縁種とともに定性 RNA-seq を行い（1-2）、非同義・同義置換比に関わる各種解析を行った。

4. 湖沼適応ゲノム領域の網羅的探索

家系を作成し、連鎖地図の作成、RAD-seq 法を用いた適応関連形質の QTL 分析を行った。

4. 研究成果

(1) 表現型適応の定量化

(1-1) いくつかの典型的グループにおいて、琵琶湖への表現型適応を定量化し、議論した。

ホンモロコ・タモロコ種群における河川および湖での形態変異パターンから、湖沼で細長い体形などの特徴が見られ、それは琵琶湖で特に極端であることがわかった。

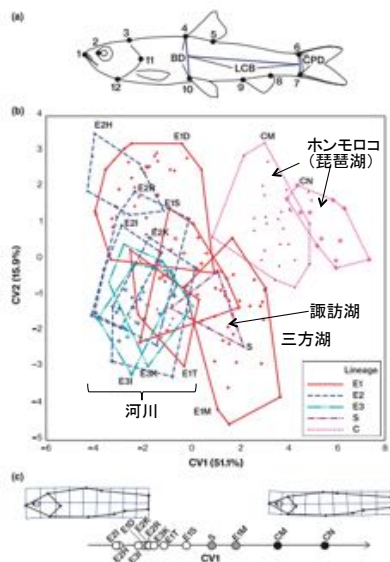


図 1. ホンモロコ・タモロコ種群の河川-湖環境における形態変異パターン（GMに基づく正準判別分析）（Kakioka et al. 2015 より）。

純系に近いものとしてはほぼ琵琶湖のみに生き残っている日本在来型のコイの形態的特徴（細長い体型、短く少ない鰓耙、等）を明らかにし、また交雑の程度に応じた移植系統との連続的な類似傾向が明らかとなった。カマツカにおいては、口器・頭部形状に局所集団間および集団内で大きな変異が認められた。

以上の種間・種内変異は、利用餌資源等を通じて生態系機能に変化を生じていることを強く示唆する。

(1-2) RNA-seq 法によるトランスクリプトーム比較分析をホンモロコ、イサザ、ウツセミカジカとそれぞれの近縁種について行い、アミノ酸配列変異パターンを明らかにした上で、自然選択シグナルの検出を行った（下記(3)）。

(2) 系統推定と歴史人口学的解析

固有種ほぼ全種の系統的位置と分岐年代を、mtDNA 部分配列（約 5 kbp）を用いて明らかにし、固有系統分岐の新旧を網羅的に明らかにした。多くの固有種系統の分岐が現琵琶湖の形成開始以前に遡ることが明らかになった。

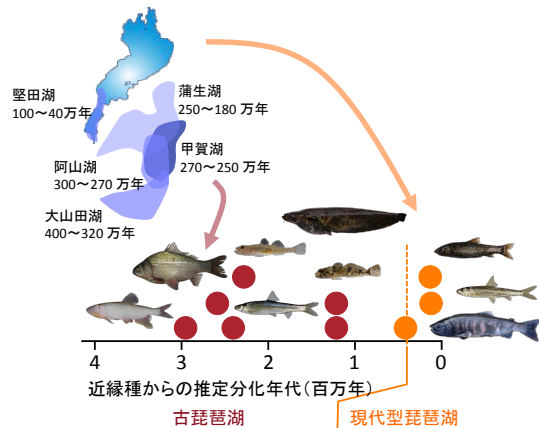


図 2. 琵琶湖の地質学的歴史と琵琶湖固有種系統の分岐年代（Tabata et al. 2016 の結果に基づく）。

RNA-seq データを用いた 1 万座を超える塩基配列データを用いて、ホンモロコ、イサザ、ウツセミカジカの系統的位置と分岐年代推定を行った。イサザでは遺伝子浸透により、mtDNA による系統が種の系統を反映しないこと、また全種群において分岐年代が mtDNA からの推定よりも古い可能性などが示された。

短い塩基配列において、多くの固有・非固有系統の集団拡大が現琵琶湖の形成以降に生じたことが示唆されたが、このパターンをミトゲノム全体および核ゲノムデータにより検証した。その結果、ミトゲノムはさらに詳細な集団拡大パターンを検出し、MIG-seq 法による SNP データからも集団拡大パターンは支持された。

なお、当初計画していた HapSTR では十分な多型が得られず、NGS を用いた簡易な SNP 検出法である MIG-seq 法を採用したが、

MIG-seq データでは人口学的分析に十分な多型情報は得られなかった。

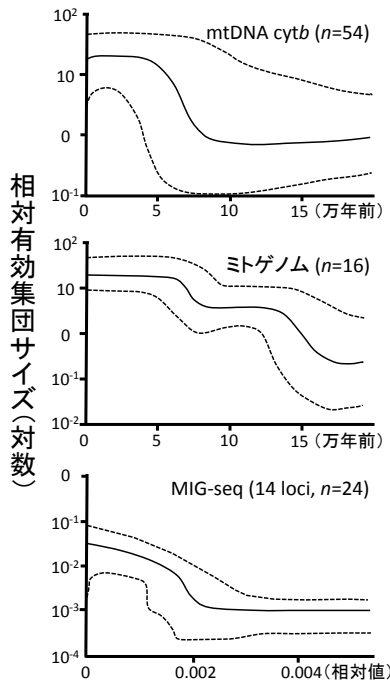


図 3. 典型的琵琶湖適応種（ホンモロコ）における 3 つのデータセットに基づく歴史人口学的解析結果の一例 (Tabata et al. 未発表データ)

(3) 候補遺伝子の適応進化の探索

(3-1) 近縁種との系統関係に基づくミトゲノムにおけるアミノ酸置換パターンを 7 種群について明らかにした。その結果、固有系統間でアミノ酸置換パターン（変異の集中する遺伝子座等）に共通性と異質性が見られた。生理特性への強い変化をもたらすアミノ酸置換 (PCAA) が各系統において多く認められ、系統内における再置換や、系統間における収斂進化も認められた。これらの結果は、ミトゲノムの適応進化を強く示唆し、今後、ミトゲノムおよび核ゲノムのミトコンドリア関連遺伝子の変異に注目して適応的機能変化の実態を明らかにする必要がある。

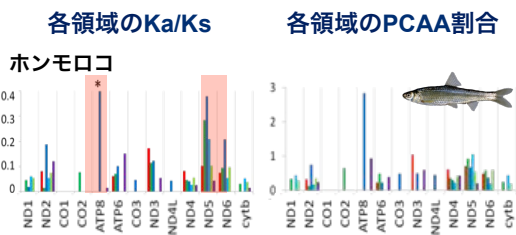


図 4. 典型的琵琶湖適応種におけるミトゲノムのアミノ酸変異パターンの一例（ホンモロコ、沖合適応）

(3-2) 2 つの候補遺伝子に関して、遺伝的変異を調べた。

イサザ-ウキゴリペア種間で、ヘモグロビンを構成するグロビン遺伝子群の構造進化と発現レパートリーを探索した結果、 α グロビン遺伝子で顕著なアミノ酸配列の差異が、また β グロビン遺伝子では発現するパラログの使い分けが存在することなどが判明し、深場適応への関連が示唆された。

アブラヒガイ（黒色型）を含むヒガイ類の色彩多型について、家系作成とコモンガーデン実験を行い、色彩多型が体側下部と腹側の黑色素胞の密度によることを明らかにした。黑色素胞関連遺伝子群の発現量解析もこれを支持した。交配実験から、黒色型が通常型の体色に対して劣性の 1 遺伝子 2 対立遺伝子型の遺伝様式をもつことが明らかとなり、現在その遺伝子座の特定を進めている。

(3-3) 近縁種とともに定性 RNA-seq を行い、非同義・同義置換比に関わる各種解析により、自然選択がかかったと推定される遺伝子やパスウェイの比較を行った。ホンモロコ、イサザ、カジカについてそれぞれ約 1 万座の非同義・同義アミノ酸置換の解析を行った結果、正の自然選択がかかった遺伝子座が 11~88 座検出され、その中には、呼吸、浸透圧調節、遊泳機能との関連が示唆される遺伝子が複数含まれていた。一方、これら遠縁のグループの間には、検出遺伝子やパスウェイに共通性は認められず、少なくともタンパク質構造変化のレベルでは、異なる方法で適応を達成していることが示唆された。

4. 湖沼適応ゲノム領域の網羅的探索

先行プロジェクトから継続して、ホンモロコの家系作成と連鎖地図解析、および適応関連形質の QTL 分析を実施した。その結果、本種と最近縁種との形態変異はゲノム上に散在する小~中程度の効果をもつ多くの遺伝子座に支配されていたが、低い体高や尾柄高といったホンモロコの沖合適応との関係が示唆される形質に関与する領域は、ゲノム上で局在していた。またホンモロコがもつ QTL アリルは同方向に形態を変化させる傾向を示し、沖合適応に関連した方向性選択の存在が支持された。

以上のとおり、本プロジェクトでは、ゲノム科学的手法を中心に据えながら、多角的なアプローチによって、琵琶湖のユニークな魚類相の成立に関わる固有種の起源と適応について、これまでにない量と質のデータを取得しつつ研究を展開した。それらの成果はまた、今後の発展的研究の礎となるものであり、現在、ゲノム配列決定を含め、さらなるデータ収集や解析を進めながら、研究を継続的に発展させている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Atsumi K, Song HY, Senou H, Inoue K, Mabuchi K (2017) Morphological features of an endangered Japanese strain of *Cyprinus carpio*: reconstruction based on seven SNP markers. J Fish Biol 9:936-953 【査読有】
DOI : 10.1111/jfb.13213
- ② Takeshima H, Muto N, Sakai Y, Ishiguro N, Iguchi K, Ishikawa S, Nishida M (2017) Rapid and effective isolation of candidate sequences for development of microsatellite markers in 30 fish species by using kit-based target capture and multiplexed parallel sequencing. Conserv Genet Resour (online): 1-12 【査読有】
DOI: 10.1007/s12686-017-0699-z
- ③ Tabata R, Kakioka R, Tominaga K, Komiya T, Watanabe K (2016) Phylogeny and historical demography of endemic fishes in Lake Biwa: the ancient lake as a promoter of evolution and diversification of freshwater fishes in western Japan. Ecol Evol 6: 2601-2623 【査読有】
DOI: 10.1002/ece3.2070
- ④ Tominaga K, Nakajima J, Watanabe K (2016) Cryptic divergence and phylogeography of the pike gudgeon *Pseudogobio esocinus* (Teleostei: Cyprinidae): a comprehensive case of freshwater phylogeography in Japan. Ichthyol Res 63: 79-93 【査読有】
DOI: 10.1007/s10228-015-0478-3
- ⑤ Mabuchi K (2016) Complete mitochondrial genomes of five introduced strains of common carp (*Cyprinus carpio*) in Japan with 29 diagnostic SNPs distinguishable by restriction enzyme analysis. Mitochondrial DNA B 1:261-263 【査読有】
DOI: 10.1080/23802359.2016.1159931
- ⑥ Kakioka R, Kokita T, Kumada H, Watanabe K, Okuda N (2015) Genomic architecture of habitat-related divergence and signature of directional selection in the body

shapes of *Gnathopogon* fishes. Mol Ecol 24: 4159-4174 【査読有】
DOI: 10.1111/mec.13309

- ⑦ Yamasaki YY, Nishida M, Suzuki T, Mukai T, Watanabe K (2015) Phylogeny, hybridization, and life history evolution of *Rhinogobius* gobies in Japan, inferred from multiple nuclear gene sequences. Mol Phylogenet Evol 90: 20-33 【査読有】
Doi: 10.1016/j.ympev.2015.04.012
- ⑧ 小北智之・渡辺勝敏 (2015) 2014 年度日本魚類学会シンポジウム「魚類における適応と種分化の進化遺伝機構: 研究最前線と今後の展望」の開催報告. 魚類学雑誌 62: 93-96 【査読無】
http://bunken.org/pdf_store/isj/publication/pdf/62/6201_77.pdf

[学会発表] (計 30 件)

- ① 伊藤僚祐・三品達平・田畑諒一・小北智之・武島弘彦・橋口康之・渡辺勝敏 (2017/3/15) RNA-seq に基づく琵琶湖固有魚種の分岐年代と適応進化. 第 64 回日本生態学会大会 (早稲田大学・東京都新宿区).
- ② 渡辺勝敏 (2016/10/22) 琵琶湖の成り立ちと固有魚類の進化. 琵琶湖博物館開館 20 周年国際シンポジウム: 古代湖の魅力～琵琶湖と世界の古代湖(滋賀県立琵琶湖博物館・滋賀県草津市).
- ③ 田畑諒一・武島弘彦・平瀬祥太郎・西田睦・渡辺勝敏 (2016/9/25) ミトコンドリア全ゲノム情報に基づく琵琶湖産魚類の高精度な人口学的歴史の推定. 第 49 回日本魚類学会年会 (岐阜大学・岐阜県岐阜市).
- ④ 上野浩太郎・木下直樹・松田征也・渡辺勝敏・小北智之 (2016/9/25) 琵琶湖産ヒガイ類の色彩変異に関する形質遺伝学的解析. 第 49 回日本魚類学会年会 (岐阜大学・岐阜県岐阜市).
- ⑤ 柿岡 諒・近藤剛毅・永野 惇・手塚あゆみ・奥田 昇・小北智之 (2016/9/25) 日本産タモロコ属魚類におけるゲノムワイドな遺伝的変異. 第 49 回日本魚類学会年会 (岐阜大学・岐阜県岐阜市).
- ⑥ 伊藤僚祐・三品達平・橋口康之・小北智之・武島弘彦・渡辺勝敏 (2016/8/25-27) 定性トランスクリプトーム解析を用いた琵琶湖固有魚種の湖沼適応遺伝子の探索. 日本進化学会第 18 回東京大会 (東

京工業大学・東京都目黒区).

- ⑦ 三品達平・橋口康之・武島弘彦・川原玲香・佐々木 剛・遠藤未来美・西田 睦・渡辺勝敏 (2016/8/25-27) 交雑起源の無性生殖種のゲノムワイドなアレル発現パターン: 遺伝的不和合の補償との関連性. 日本進化学会第 18 回東京大会 (東京工業大学・東京都目黒区).
- ⑧ 渥美圭佑・馬淵浩司・瀬能 宏・井上広滋 (2016/3/24) 琵琶湖内にみられるコイの体型の地域間変異. 日本生態学会第 63 回大会 (仙台市国際センター・宮城県仙台市).
- ⑨ 伊藤僚祐・原田慈雄・田畑諒一・渡辺勝敏 (2015/9/6) ウキゴリ属魚類のロドプシン進化パターン. 第 48 回日本魚類学会年会 (近畿大学・奈良県奈良市).
- ⑩ 遠藤千晴・富永浩史・三品達平・山崎曜・武島弘彦・渡辺勝敏 (2015/9/6) 琵琶湖水系における底生魚カマツカの形態的多様性と遺伝的集団構造. 第 48 回日本魚類学会年会 (近畿大学・奈良県奈良市).
- ⑪ 近藤剛毅・小北智之 (2015/9/5-6) 琵琶湖水系のタモロコ属ペア種における OXPHOS 関連遺伝子群の共適応の可能性. 第 48 回日本魚類学会年会 (近畿大学・奈良県奈良市).
- ⑫ Tabata R, Takeshima H, Hirase S, Nishida M, Watanabe K (2015/8/17) Comparative mitogenomics of endemic fishes in Lake Biwa: evidence of natural selection and adaptation to lake environments. Speciation in Ancient Lakes 7. Great Lakes Institute for Environmental Research, Windsor (Canada).
- ⑬ Mabuchi K (2015/1/18) Japanese native strain of common carp (*Cyprinus carpio*) and Lake Biwa as a refuge from biological invasion of introduced "Eurasian" strains. International Sancheoneo Symposium in Hwacheon, Hwacheon (Korea).
- ⑭ 田畑諒一・武島弘彦・平瀬祥太郎・西田睦・渡辺勝敏. 2014 (11/15-16). 琵琶湖固有魚類の比較ミトゲノミクス: 自然淘汰の痕跡と琵琶湖環境への適応. 第 47 回日本魚類学会年会 (神奈川県立生命の星・地球館, 神奈川県小田原市).
- ⑮ 渡辺勝敏 (2014/11/17) 日本の古代湖

「琵琶湖」における固有魚類群集の起源と適応. シンポジウム「魚類における適応と種分化の進化遺伝機構: 研究最前線と今後の展望」(オーガナイザー: 小北智之・渡辺勝敏). 第 47 回日本魚類学会年会 (神奈川県立生命の星・地球館, 神奈川県小田原市).

[図書] (計 1 件)

- ① Watanabe K, Tominaga K, Nakajima J, Kakioka R, Tabata R (2016) Chapter 7. Japanese freshwater fishes: biogeography and cryptic diversity. In: M. Motokawa and H. Kajihara (eds.) Species Diversity of Animals in Japan, Diversity and Commonality in Animals. Springer
DOI: 10.1007/978-4-431-56432-4_7

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ウェブデータベース GEDIMAP:
<http://gedimap.zool.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 勝敏 (WATANABE, Katsutoshi)
京都大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 00324955

(2) 研究分担者

馬淵 浩司 (MABUCHI, Kohji)
東京大学・大気海洋研究所・助教
研究者番号: 50401295

小北 智之 (KOKITA, Tomoyuki)

福井県立大学・海洋生物資源学部・助教授
研究者番号: 60372835

(3) 連携研究者

武島 弘彦 (TAKESHIMA, Hirohiko)
総合地球環境学研究所・特任助教
研究者番号: 50573086