

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 14 日現在

機関番号：82503

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291083

研究課題名(和文) データ主導型・発見探索型アプローチによる中・深層性魚類の起源と多様化の解明

研究課題名(英文) A data-driven approach for analysis of evolutionary origin and diversification of meso- and bathypelagic fishes

研究代表者

宮 正樹 (Miya, Masaki)

千葉県立中央博物館・その他部局等・研究員

研究者番号：30250137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、記載的研究が主流であった生物多様性研究の世界に新たな遺伝子分析法を用いて技術革新を興し、データ主導型・発見探索型の研究基盤を形成しようと試みた。太平洋を南北縦断する研究航海で採集された魚類1,164個体をメタバーコーディング(多種同時検出法)により遺伝子分析したところ、深海性ヒカリデメニギス属魚類に2新種を発見することができた。また、最新の手法を用いることにより魚類ミトゲノム全長配列高速決定法を確立し、192種もの魚類の配列をわずか数日で決定することに成功した。これらの配列は、今後集団レベルと種レベルでの系統解析を行い、深海性魚類の進化的起源を明らかにする。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to develop a novel, data-driven approach for biodiversity research, where descriptive studies have still been dominated. Our approach is based on massive genetic data derived from metabarcoding (simultaneous multispecies detection system) and genomic sequencing. By metabarcoding DNA from 1,164 fishes taken from midwater trawls across the North and South Pacific, we discovered two new species of deep-sea barrel eyes. We also developed a new method for sequencing whole mitogenome sequences from nearly 100 fish species in a single experiment and those data will be subjected to phylogenetic analysis to elucidate evolutionary origin of those fishes.

研究分野：分子生態・系統進化学

キーワード：次世代シーケンサ メタバーコーディング 系統 進化 集団構造 起源 深海

1. 研究開始当初の背景

ゲノム時代の到来によってもたらされた技術革新により、大量の DNA データが短期間で得られるようになった。一方、生物多様性研究では未だに記載的研究が主流で、一部でようやく問題解決型・仮説検証型のアプローチが出てきたにすぎない。したがって、ゲノム時代のメリットを活かしたデータ主導型・発見探索型の研究基盤（網羅的に集められた大量データの解析に基づく新たな問題の発見や既存の問題の解決を導くアプローチ）は皆無に等しい。

我々はサンガー法に基づく効率的なミトゲノム全長配列決定法を世界に先んじて開発し、魚類の系統解明に多大な貢献を果たしてきた (Miya & Nishida 2015)。これらの研究成果は国際的にも高い評価を得ており、論文の被引用数は全体で 9,097 件に達している (Google Scholar My Citations 2017 年 5 月 14 日調べ)。一方、DNA による種判別 (Barcode of Life) には全長約 16,500 bp のミトゲノムの部分配列である COI 遺伝子の部分配列 (648 bp) が慣習的に用いられているが、全長配列に比べて 25 分の 1 未満と短く、系統解明には有用ではないことが申請者の研究により判明している。

これら二つの問題（系統解明 vs 種判別）は相互に排他的なものではなく、単に分類群サンプリングの階層（目～種 vs 種～集団）と形質サンプリングの規模（全長配列 vs 部分配列）に違いがあるにすぎない。形質サンプリングをミトゲノム全長配列に揃え、分類群サンプリングを網羅的に行うことにより、二つの問題を一気に（しかも効率良く）解決することが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、最新のパーソナル型次世代シーケンサ（イルミナ社 MiSeq）とバイオインフォマティクスの技術を駆使し、中・深層性魚類の起源と多様性の包括的解明をターゲットに、生物多様性研究における新たな研究基盤を確立することを目的とする。

具体的には、分野横断的な研究チームを組織し、これまで別個のテーマであった系統解明 (Tree of Life) と種判別 (Barcode of Life) に、申請者が魚類の系統解明で多大な成果を上げてきたミトゲノム全長配列（約 16,500 bp）を共通のマーカーとして適用することにより、両分野におけるさまざまな既知の未解決問題を同時並行的かつ包括的に解明する。

さらに、大量データのバイオインフォマティックな解析に基づく未知の問題発見のためのパイプラインを確立し、生物多様性研究の飛躍的な発展の基礎をつくる。

3. 研究の方法

本研究は、上記の研究目的を達成するために次の 5 つの課題を並行的に進めてきた。1) ミトゲノム全長配列の大量並列シーケンシング技法の確立；2) 大量データ処理・解析のパイプラインの確立；3) 主要分類群のミトゲノム全長配列の網羅的決定および系統解明；4) 北西太平洋における優占種集団のミトゲノム全長配列の決定および種内集団構造の解明；5) 魚類全体における中・深層性魚類の起源と進化に関する全体像の提示。

1) に関してはロング PCR 法によりミトゲノム全長配列を増幅し、増幅産物を市販のキットで断片化し、アダプター配列とインデクス配列を付加して次世代シーケンサで解析した。2) については、市販のソフトとフリーソフトを組み合わせることによりアセンブルを行い、新たに開発した MitoAnnotator によりアノテーションを行った (Iwasaki *et al.* 2013)。また、メタゲノム解析で出てきた次世代シーケンサの大量データについても、解析パイプラインをスクリプトにより作成した。3) についてはミトゲノム全長配列を網羅的に決定できた分類群から逐次系統解析を行った。4) については太平洋を縦断する研究航海においてサンプルを採集し、全個体から DNA を抽出することによりメタバーコーディング解析を行った。5) については 3) のデータが網羅的になった段階で逐次系統解析を始めることとした。

4. 研究成果

初年度は、中・深層性魚類サンプルの網羅的収集を行い、これまでに太平洋を北から南まで縦断する計 21 測点において、中層トロールにより計 1,164 個体の魚類を採集した。これらの魚類全個体から DNA 抽出を行い、魚類環境 DNA で開発した MiFish プライマーを用いたメタバーコーディング解析 (Miya *et al.* 2015) を行った。その結果、21 サンプルから計 106 種が検出された。その中から、ヒカリデメニギス属 2 種の未記載種をニュージーランド沖から発見し、新種として論文発表した (Poulsen *et al.* 2016；下図)。

ハイロヒカリデメニギス (新種その 1)



クロヒカリデメニギス (新種その 2)



Miya *et al.* (2015) で開発した上記解析パイプラインは、分担研究者が管理運営してい

るデータベース MitoFish にてオンライン版を公開した。今後、さまざまな機能を付加することにより一般の利用に供する。

計 192 種のミトゲノム全長配列のロング PCR による増幅に成功した。これらの増幅産物を断片化すると共に、アダプターとインデックスの付加を行い 2 回に分けて並列シーケンスを行った。その結果、数種を除いてミトゲノム全長配列の決定に成功した。新たに開発した MitoAnnotator によりアノテーションを行い系統解析を行い成果を論文発表した (Campbell *et al.* 2014, 2017; Lavoué *et al.* 2017)。

この大規模シーケンスで得られたミトゲノム全長配列は、現在データベースへの登録作業が進められている。それと並行して、北西太平洋における優占種の種内集団構造を解明し、魚類全体における中・深層性魚類の起源と進化に関する全体像を提示するために予備的な系統解析を行っている。

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 9 件; すべて査読有り)

- ① Campbell, M.A., Nielsen, J.G., Sado, T., Shinzato, C., Kanda, M., Satoh, T.P., & Miya, M. 2017. Evolutionary affinities of the unfathomable Parabrotulidae: molecular data indicate placement of *Parabrotula* within the family Bythitidae, Ophidiiformes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 109:337–342.
- ② Miya, M., Minamoto, T., Yamanaka, H., Oka, S., Sato, K., Yamamoto, S., Sado, T. & Doi, H. 2016. Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA. *Journal of Visualized Experiments*, (117):e54741.
- ③ Lavoué, S., Bertrand, J., Chen, W.J., Motomura, H., and Miya, M. 2017. Phylogenetic position of the rainbow sardine *Dussumieria* (Dussumieriidae) and its bearing on the early evolution of the Clupeoidei. *Gene* 623:41–47.
- ④ Satoh, T.P., Miya, M., Mabuchi, K. & Nishida, M. 2016. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes. *BMC Genomics*, 17:719.
- ⑤ Poulsen, J.Y., Sado, T., Hahn, C., Byrkjedal, I., Moku, M. and Miya, M. 2016. Preservation obscures pelagic deep-sea fish diversity: doubling the number of sole-bearing opisthoproctids and resurrection of the genus *Monacoa* (Opisthoproctidae, Argentiniformes). *PLOS ONE*, 11 (8), e0159762.
- ⑥ Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T.,

Sado, T., Poulsen, J.Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, T., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M. & Iwasaki, W. 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science* 2:150088.

⑦ Miya, M. & Nishida, M. 2015. The mitogenomic contributions to molecular phylogenetics and evolution of fishes: a 15-year retrospect. *Ichthyological Research* 62: 29–71

⑧ Campbell, M.A., López, J.A., Satoh, T.P., Chen, W.-J. & Miya, M. 2014. Mitochondrial genomic investigation of flatfish monophyly. *Gene* 551:176–182.

⑨ Song, H.Y., Mabuchi, K., Satoh, T.P., Moore, J.A., Yamanoue, Y., Miya, M. & Nishida, M. 2014. Mitogenomic circumscription of a novel percomorph fish clade mainly comprising “Syngnathoidei” (Teleostei). *Gene* 542:146–155.

[学会発表] (計 2 件)

① Miya, M. 2016. Environmental DNA metabarcoding from fishes (and other vertebrates) using universal primers MiFish: A data-driven approach for fish community research. 2016 The North Pacific Marine Science Organization (PICES) Annual Meeting, Omni Hotel, San Diego, CA, USA, November 12, 2016 (招待講演)

② Ortí, G., R. Betancur-R., E.O. Wiley & M. Miya. Revised classification of bony fishes based on molecular data (version 3). Joint Meeting of Ichthyology and Herpetology, Chattanooga Convention Center, Tennessee, USA, August 3, 2014.

[図書] (計 1 件)

① 宮 正樹, 慶應義塾大学出版会, 新たな魚類大系統 - 遺伝子で解き明かす魚類 3 万種の由来と現在, 2016, 217 ページ.

[その他]

Masaki Miya Lab

<https://sites.google.com/site/masakimiyalab/home>

MitoFish

<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp>

Google Scholar My Citations

<http://scholar.google.com/citations?user=aTG4wPQAAAAJ&hl=en>

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮 正樹 (MIYA, Masaki)
千葉県立中央博物館 生態・環境部長
研究者番号：30250137

(2) 研究分担者

岩崎 渉 (IWASAKI, Wataru)
東京大学大学院理学系研究科 准教授
研究者番号：50545019
柰 雅利 (MOKU, Masatoshi)
東京大学大気海洋研究所 技術専門職員
研究者番号：30416466

(3) 連携研究者

佐藤行人 (SATO, Yukuto)
琉球大学 特任講師
研究者番号：20566418