

令和元年6月12日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02522

研究課題名(和文) クローナル生物共存の生態機構解明と遺伝基盤：絶対単為生殖型ミジンコを用いた解析

研究課題名(英文) Ecological mechanisms and genetic base for the coexistence of multiple clonal populations: an analytical study with obligate parthenogenetic Daphnia species

研究代表者

占部 城太郎 (Jotaro, Urabe)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：50250163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,100,000円

研究成果の概要(和文)：生活空間や資源要求が良く似た生物が、潜在的に種間競争が強く働くにも関わらず、長期にわたって共存することは稀ではない。本研究は、日本に侵入した絶対単為生殖型ミジンコを対象に、侵入後に進化した遺伝子型(クローナル個体群)の多様性や生態特性を調べることで、競争にも関わらず多様なクローナル個体群が維持され共存している仕組みを解析した。遺伝子解析、形質解析及び個体群動態の解析から、本種の休眠卵生産は容易に変化しやすい形質であり、競争に劣位なクローナル個体群は、休眠卵生産を高めることで競争を避け、競争優位なクローナル個体群と共存していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

限られた資源や生息空間では、競争が激化するため、競争に優位な種だけが生残するようになり、結果として種多様性は減少する。しかし、野外個体群では、潜在的に競争関係にある種の共存は稀ではない。本研究では、多様な個体群が共存できる仕組みとして様々な説の中から、競争劣位種が休眠卵生産を高めることで絶滅を逃れ、長期共存を可能にし、集団の多様性を維持していることを明らかにした。この結果は、これまで多種共存について注目されてこなかったStorage仮説を支持するものであり、休眠ステージが競争回避や生息場所の種多様性維持に重要な機能を果たしていることを示している。

研究成果の概要(英文)：Competitive inferior species can be frequently found with competitively superior species. However, it is not necessarily clear why such a coexistence is possible. In this study, ecological mechanisms enabling the coexistence of competitive species were examined using genotypes in obligate parthenogenetic *Daphnia pulex* that were invaded from north America. Genetic analyses, common garden experiments and field observations showed that a number of heritable traits have been evolved in this species after the invasion into Japan. Among these, frequency of the resting egg production was one of the heritable traits that could be easily changed and was high in competitively inferior genotypes. In addition, it was revealed that competitively inferior genotypes could avoid competition with competitively superior genotypes by producing frequently the resting eggs. These results support an importance of storage hypothesis as a mechanism for the sympatric coexistence of competitive species.

研究分野：生態学

キーワード：ミジンコ 遺伝的多様性 多種共存機構 消費型競争 休眠卵 ニッチ分化 遺伝率 侵入種

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

種内競争は、短期的時間スケールでは個体群に有利に作用するが、遺伝的多様性の減少により長期的には環境変化に対して不利に作用すると推定されている。しかし、実際には種個体群の遺伝的多様性と種内競争との関係はよく分かっていない。日本の湖沼にはミジンコ属が広く分布しているが、そのうち平地湖沼には *Daphnia pulex* (以下ミジンコ) が広く分布している。申請者の調査により、我が国に分布するミジンコは北米の侵入種で、それぞれ独立に侵入した4クローン系統(1遺伝子型を起源とする系統)の遺伝子型で、いずれも有性生殖せずに休眠卵を産む絶対単為生殖型であることが判っている。その侵入年代は、ミトコンドリア塩基配列の変異から、古いものでは数百~数千年前と推定されている。申請者の野外調査によれば、複数の遺伝子型が同所的に分布する湖沼が散見され、中には長期間にわたって毎年観察される湖沼もある。これら遺伝子型は絶対単為生殖で交雑しないクローン集団である。この、独立した個体群(隠蔽個体群)の共存は、競争排除則に従えば謎である。同種であればニッチ重複度が他種間に比べて大きく、競争は強く作用するからである。その予見に反し、なぜ複数のクローナル個体群が同所的に維持されているのだろうか? 一般に、植物を対象にした研究では複数のクローナル個体群の同所的分布は、攪乱や空間異質性、稀な有性生殖などにより説明されてきたが、競争やその背後にあるニッチの類似性については多くの場合調べられていない。

ミジンコは世代時間が数週間と短く、個体群を対象にした飼育実験も容易である。また、ゲノム配列が判っており、形質発現など分子生物学的知見も増えつつある。したがって、絶対単為生殖型のミジンコは、生理・生態及び遺伝・分子の双方から、クローナル個体群の共存機構を調べる絶好の機会を提供する。

2. 研究の目的

本研究は、日本に侵入した絶対単為生殖型ミジンコ(*Daphnia pulex*)を対象に、異なる遺伝子型集団(クローナル個体群)間のニッチ分化と同所的共存機構を調べることで、遺伝的多様性の創出と維持に果たす競争の役割を明らかにすることを目的とする。具体的には、(1)日本に侵入したクローンの核ゲノムを調べ、各遺伝系統の侵入年代と侵入後に進化した遺伝子型の多様性を把握するとともに、(2)それら遺伝子型間での競争や成長に関する形質の違いや多様性、各形質の遺伝率等を測定することで遺伝子型間のニッチ分化を推定する。さらに、(3)クローナル個体群が分布している湖沼での継続調査と野外実験から、その共存に関する複数の仮説(Frozen Niche 仮説、Strong Similarity 仮説、Storage 仮説)を検証し、日本侵入後のミジンコの進化とクローナル個体群共存の生態機構を解明する。

3. 研究の方法

研究にあたっては、まず国内からミジンコを広く採集して継代飼育を確立するとともに、ミトコンドリアゲノムによる系統(JPN1~4)を同定し、各系統内での遺伝子型を把握する。また、各遺伝子型の核ゲノム解析を行うことで、日本侵入後に進化した遺伝子型の遺伝的多様性を調べる。次いで、各遺伝子型を対象に飼育実験を行い、Frozen Niche 仮説の検証に必要な、形態形質・生活史形質・栄養消化(消化酵素)形質の違いや各形質の遺伝率を測定する。さらに、各遺伝子型の生存に必要な閾値餌密度や繁殖速度及び休眠卵生産速度を調べることで、Strong Similarity 仮説や Storage 仮説の検証に必要なデータを取得する。また、これら室内実験と並行し、複数の遺伝子型が個体群を形成している山形県の畑谷大沼において継続的な経時調査を行い、室内実験結果と合わせて、ミジンコにおける複数クローナル個体群の共存機構について解析する。

4. 研究成果

(1)ゲノム解析:国内外各地より *Daphnia pulex* 遺伝子型を採集し、JPN1 系統7 遺伝子型、JPN2 系統5 遺伝子型、JPN3,4 各1 遺伝子型を含む19 遺伝子型の核ゲノムについて全塩基配列の7割に相当するDNAのシーケンス(1.3Gb)を行い、これら遺伝子型の系統関係を詳細に把握した(図1)。核ゲノムのペアワイズの比較を行ったら、JPN1 系統内では $1.8-8.7 \times 10^{-5}$ 、JPN2 系統内では $1.2-1.5 \times 10^{-5}$ の SNP が検出され、同じ系統内でも遺伝子型により異なる遺伝子で変異が多く生じていることが分かった。

これら遺伝解析の過程で核・ミトコンドリアともに塩基配列が大きく異なる遺伝子型が検出され、詳細な形態解析と従来知見との比較を行ったところ、約120年前に石川千代松博士が我が

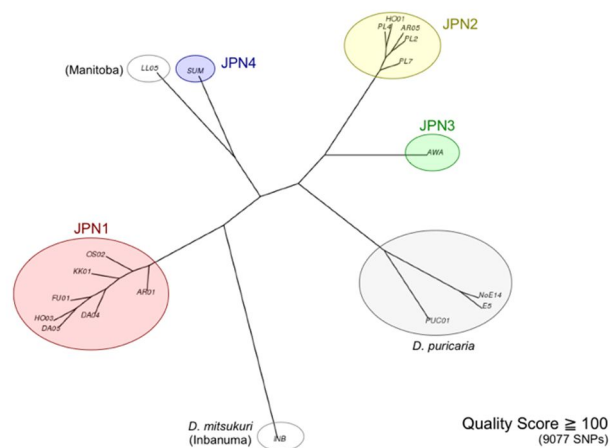


図1. 日本に侵入した *Daphnia pulex* の系統関係。

国で記載した *D. mitsukuri* と形態が一致することが分かった。DNA 塩基配列については従来知見がないことから、その種は *D. mitsukuri* とするのが妥当であると結論づけた(業績)。

この他、各地で採集した枝角類や橈脚類についても DNA 解析を行い、分類及び地理分布の見直しを行い、報告した(業績)。

(2) 形質解析：上記遺伝子型について飼育成長実験(コモンガーデン実験)を行い、成熟齢などの生活史形質、卵サイズや最大体長などの形態形質、消化酵素などの生理形質を測定し、その遺伝率や分散について解析を行った。その結果、遺伝率は形態形質で最も高く、生活史形質や生理形質の分散には環境変化に伴う可塑性も関与していることが分かった。また、系統内での各形質の遺伝相関を調べたところ、多くの形質が3主成分(組み合わせ)に収束され、それぞれの成分が捕食者や餌環境と適応的に関係していること、すなわち捕食者や餌環境が形質変異の選択圧として働いており、JPN1系統、JPN2系統で独自に適応放散して来たことが示唆された(業績)。この結果は、遺伝子型によってニッチは多少とも異なること、よって異なる遺伝子型の同所的分布の説明として Strong Similarity 仮説よりも Frozen Niche 仮説が妥当であることを示唆するものとなった。

なお、系統間でこれら形質の分散の大きさを解析したところ(図3)、侵入年代の浅い JPN2 系統のほうが JPN1 系統よりも形質分散は大きく、さらに形質間の違いは遺伝距離とは相関しないことが分かった。よって、絶対単為生殖でありながら、JPN1 系統や JPN2 系統で適応的な組み合わせと考えられるような形質をもつ遺伝子型が数百年程度で進化してきたのは、そのような変異を生み出す遺伝構造が侵入以前にすでにあつたためではないかと考えられた(業績)。

各系統内と系統間での形質分散を比較したところ、進化しやすい形質としがたい形質があることが分かった。例えば、休眠卵生産については、系統間よりも系統内での遺伝分散が大きく、特に JPN2 系統では H001 遺伝子型で大きいことから、系統に関わらず容易に変化(進化)しやすい形質であることが分かった。

これら飼育・成長実験で得られた形質値や生活史パラメータは、生物多様性と餌環境との関係(業績)やプランクトン生物の温暖化応や環境応答(業績)の研究にも活用した。

(3) 野外調査：

山形県畑谷大沼には JPN1 系統の遺伝子型(H003)と JPN2 系統(H001)の遺伝子型が分布していることがわかった。そこで、本沼で調査を開始した 2009 年からのプランクトンサンプルを用いて遺伝解析し、各クローナル個体群の時空間変動を調べた。その結果、JPN1 個体群のほうが JPN2 個体群よりも常に出現密度は高いものの、両個体群はほぼ同じ季節的消長を示し、鉛直分布にも大きな違いはみられなかった。このことから、両クローナル個体群の局所的共存は Frozen Niche 仮説では説明出来ないことが判明した。

野外における両個体群を比較すると、単為生殖卵産卵数は JPN1-H003 のほうが大きいことから、JPN2-H001 のほうが競争に劣位であることが伺われた。実際、両遺伝子型個体について生存に必要な閾値餌密度を調べ、さらに競争実験を行ったところ、JPN2-H001 の個体群密度は JPN1-H003 に負の影響を受けることが示された。しかし、季節変動を詳細に調べたところ、JPN2-H001 は休眠卵頻度生産が高いこと、湖底に体積している休眠卵数には両クローナル個体群間で有意な差はみられないことが分かった。これら結果は、競争で劣位でありながらも、JPN2-H001 は高い頻度で休眠卵を生産することで JPN1-H003 と長期的な共存を可能にしていることが分かった。このようにクローナル個体群の局所共存に関する野外観察及び室内実験結果は、「Storage 仮説を強く支持するものであった。

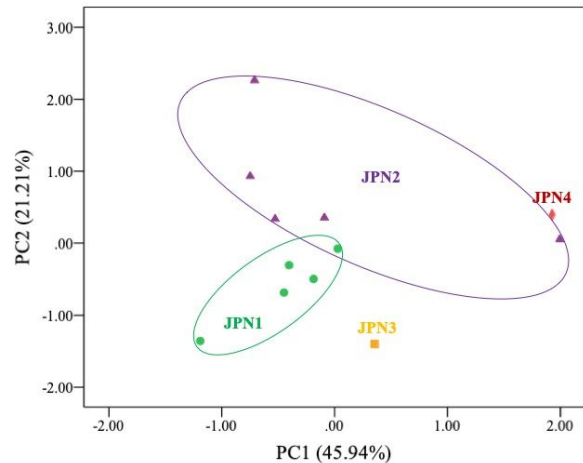


図 2. *Daphnia pulex* 遺伝子型の形質全体の違いを要約した主成分分析の結果。各遺伝子型のスコアは系統ごとに異なる色で示している。

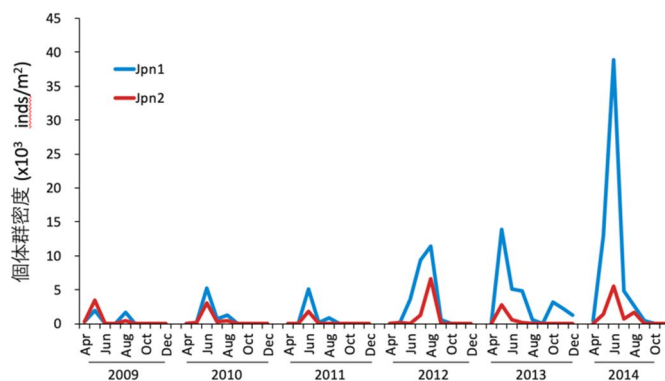


図 3. 畑谷大沼における JPN1-H001 と JPN2-H003 遺伝子型の個体群密度の長期変動。

以上のように、本研究が当初目的としていた研究成果をあげることができた。なお、本報告までに公表出来なかった結果は逐次論文として発表する予定である。本研究で明らかとなった、JPN2-H001 遺伝子型の高い頻度での休眠卵生産は、具体的にどのような遺伝子(群)が関与しているのかを調べる絶好の機会を提供する。そこで、本研究を更に発展させるため、ゲノム解析とともに、分子実験などにより休眠卵生産に関与している分子機構と野外環境や個体群動態とを結びつける研究を行う予定である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

- Tian X., H. Ohtsuki, J. Urabe. (2019). Evolution of asexual *Daphnia pulex* in Japan: variations and covariations of the digestive, morphological and life history traits. BMC Evolutionary Biology, in press (accepted 6th June 2019). (査読有)
- Yamada, S., R. Tsujino, Y. Takemon, J. Urabe. (2019) The role of spatial and temporal variations in habitat uses and food habits of larvae in persistent occurrence of multiple odonate species in Mizorogaike Pond, Kyoto, Japan. Limnology 20, 181-190. (査読有)
- Maruoka, N., Ohtsuki, H., Makino, W., J. Urabe. (2018) Rediscovery after almost 120 years: morphological and genetic evidence supporting the validity of *Daphnia mitsukuri* (Crustacea: Cladocera). Zoological Science 35 468-475. (査読有)
- Yamamichi, M., T. Kazama, K. Tokita, I. Katano, H. Doi, T. Yoshida, N. Hairstorn Jr., J. Urabe. (2018) A shady phytoplankton paradox: When phytoplankton increases under low light. Proceedings of the Royal Society B. 285, 20181067. (査読有)
- Makino, W., A. Tanabe, J. Urabe. (2018) Distribution of freshwater calanoid copepods in Japan in the early decades of the 21st Century: implications for the assessment and conservation of biodiversity. Limnology and Oceanography 63:758-772. (査読有)
- Urabe, J., Y. Shimizu, T. Yamaguchi. (2018) Understanding the stoichiometric limitation of herbivore growth: the importance of feeding and assimilation flexibilities. Ecology Letter, 21:197-206. (査読有)
- Anderson, T.R., D. O. Hessen, M. Boersma, J. Urabe, D. J. Mayor. (2017) Will Invertebrates Require Increasingly Carbon-Rich Food in a Warming World? The American Naturalist 190 : 725-742. (査読有)
- Chen, I.-C., C. Hsieh, M. Kondoh, H.-J. Lin, T. Miki, M. Nakamura, T. Ohgushi, J. Urabe, T. Yoshida. (2017) Filling the gaps in ecological studies of socio-ecological systems. Ecological Research, 32: 873-885. (査読有)
- Lewandowska, A.M., . . . , J. Urabe (他 34 名). (2016) The influence of balanced and imbalanced resource supply on biodiversity functioning relationship across ecosystems. Philosophical Transactions B. 371: 20150283. (査読有)
- Iwabuchi, T., H. Togachi, S. Okubo, Y. Tsuchiyama, H. Yamaguchi, J. Hidema, J. Urabe. (2016) pH as a key factor defining the niche space of the alpine crustacean species *Daphnia tanakai*. Limnology and Oceanography 62, 189-199. (査読有)

[学会発表](計 12 件)

- 市毛峻太郎・張璇・大槻朝・占部城太郎 (2019) ミジンコの任意共生微生物は垂直伝播しているか? 日本生態学会第 66 回全国大会 (神戸)
- 乗松大智・占部城太郎・大槻朝 (2019) ミジンコの微胞子虫感染率とその致命率は栄養条件に依存するか. 日本生態学会第 66 回全国大会(神戸)
- 豊田真樹・田晁飛・占部城太郎 (2019) 生活史形質の分散・共分散からみた外来ミジンコの侵入後の放散と進化. 日本生態学会第 66 回全国大会(神戸)
- 大槻朝・乗松大智・牧野能士・牧野渡・占部城太郎(2018) 全ゲノム比較解析によるミジンコ *Daphnia pulex* 日本集団の遺伝的特性. 日本分子生物学会 第 41 回年会(横浜)
- 丸岡奈津美・占部城太郎 (2017) 日本における *D. pulex* のクローン分布を決める要因: 種内競争能力からの考察. 日本陸水学会仙北市田沢湖大会(秋田)
- Perera, I.U., J. Urabe, W. Makino, N. Maruoka (2017) Phenology of zooplankton: Relative importance of temporal scales in the variation. 日本陸水学会仙北市田沢湖大会(秋田)
- 大竹裕里恵・大槻朝・占部城太郎・木村成子・山田和芳・吉田丈人 (2017) 長野県深見池における長期環境変動と枝角類群集の形成過程: 年縞堆積物による長期動態の解明. 日本陸水学会仙北市田沢湖大会(秋田)

張セン・占部城太郎・牧野渡・大槻朝 (2017) ミジンコの適応度に及ぼす腸内細菌 日本陸水学会仙北市田沢湖大会(秋田)
丸岡奈津美・占部城太郎 (2017) ミジンコのクローン分布の広さは競争能力を反映しているのか? 日本生態学会第64回全国大会(東京)
柳沼康平, 八巻圭佑, 熊谷仁志, 牧野渡, 占部城太郎 (2017) 小湖沼におけるハリナガミジンコ個体群の長期的変動: 遺伝構造の季節性はなぜ年により異なるのか? 日本生態学会第64回全国大会(東京)
丸岡奈津美・大槻朝・牧野渡・鏡味麻衣子・占部城太郎 (2016) 遺伝解析より明らかとなった日本に産する *Daphnia obtusa* の正体. 日本陸水学会 81 回大会(沖縄)
柳沼康平・八巻圭佑・熊谷仁志・牧野渡・占部城太郎 (2016) 小湖沼の *Daphnia dentifera* 個体群における遺伝構造の経年変化; 優占クローンはなぜ毎年交代しないのか. 日本陸水学会 81 回大会(沖縄)

ホームページ等

<http://tohokuecology.jp/urabe/Project5.html>

研究成果のプレスリリース

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2018/07/press20180725-01-mijinko.html>

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2017/12/press20171219-01.html>

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2018/07/press20180704-01.html>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 占部 城太郎

ローマ字氏名: Jotaro Urabe

所属研究機関名: 東北大学

部局名: 生命科学研究科

職名: 教授

研究者番号(8桁): 50250163