

令和元年6月9日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04437

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを活用した流域生物の全種網羅的な遺伝的多様性評価法の開発

研究課題名(英文)Parallel Assessment of Genetic Diversity across Full Range of Species in Riverine Communities Using Next-Generation Sequencing

研究代表者

渡辺 幸三 (Watanabe, Kozo)

愛媛大学・理工学研究科(工学系)・教授

研究者番号：80634435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：従来的一种限定の評価から脱却し、全生息種を対象に、生息地分断化や環境選択の遺伝子レベルの生態影響を迅速かつ安価に評価する新規的技術を開発した。次世代DNAシーケンス解析技術とDNAバーコーディングを活用し、瀬切れ河川重信川における水生昆虫15種の流域内交流解析を同時に行った。その結果、多くの種は瀬切れによる流域内交流への影響がみられなかった一方で、*Baetis* sp. と *Chironomus kiiensis* は瀬切れによる移動分散阻害が発生していた。今後、NGS解析による多数種の移動分散パターン解析技術が実現することで、生態系に配慮した河川管理へ応用されることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来的一种限定の評価から脱却し、全生息種を対象に、生息地分断化や環境選択の遺伝子レベルの生態影響を迅速かつ安価に評価する新規的技術を開発した。この手法は、数多くの生息種の中から、特に生息地分断化による移動阻害や地球温暖化などの環境選択の影響を受けて遺伝子レベルの生物多様性が劣化している種を見つけ、それらの種を優先的に保全するなど、より高度な生態系保全に貢献する技術となる。

研究成果の概要(英文)：We developed a new method for parallel assessment of genetic diversity across multiple species in riverine invertebrate communities using next-generation sequencing technology. We applied the developed method to the Shigenobu River Basin and tested its utility and feasibility. In this case study, we investigated gene flow among localities in the basin for 15 species of aquatic insects (3 of Ephemeroptera species; 12 of Diptera, Chironomidae species) in parallel. Cytochrome Oxidase subunit I region in mitochondrial DNA were amplified with DNA tag for each sampling site and were genotyped using NGS amplicon analysis. Comparison of pairwise F_{st}s between fragmented sited and between non-flagmented sited by intermittent interval showed that most species were not interrupted by intermittent interval other than *Baetis* sp. and *Chironomus kiiensis*. Overall, we could demonstrate a high potential of the developed method in accelerating assessment of genetic diversity in wild populations.

研究分野：応用生態工学

キーワード：遺伝的多様性 生息地分断化 次世代シーケンシング 流域 自然選択

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

1. 研究開始当初の背景

近年、河川生態系保全への社会的要請を受けて、河川水辺の国勢調査や環境アセスメントなどで、生物多様性が活発に評価されている。しかし、種多様性に比べて、種内の個体間変異である遺伝的多様性はほとんど評価されていない。例えば、ダムや瀬切れ（干上がり）による河川分断化で地域間交流が阻害されると、地域個体群が遺伝的に孤立し、絶滅リスクが高まる。現状では、遺伝的多様性の実態が不明なまま、劣化が進行している恐れがある。

遺伝的多様性評価を加速させるには、膨大なサンプルの DNA 配列を高速に解読できる次世代シーケンサーの活用が効果的と考えられる。従来の遺伝的多様性評価では、サンガーシーケンサーで 1 個体ずつ DNA 配列を解読してきた。この手法で多くの個体の DNA 配列を解読するには、膨大な費用と時間が必要となるため、従来は、一種のみを対象に、限られた地点数と個体数で解析されてきた。次世代シーケンサーは、費用と時間を抑えて、多種・多地点から集めた全個体の DNA 配列を一度の解析で解読できる。得られた網羅的な DNA 配列データを種ごと・地点ごとに分割できれば、各種の地点内の遺伝的多様性や地点間の遺伝距離を評価できる。しかし、全個体をプールする次世代シーケンシング解析では、種ごと・地点ごとの遺伝子頻度（各対立遺伝子の地域個体群内の相対的頻度）を正しく推定できない恐れがあり、集団遺伝解析への適用は困難とされてきた。本研究は、この技術的ボトルネックを解決する新手法を開発する。

次世代シーケンシング解析のもう一つの利点として、膨大な長さのゲノム情報（約 1～10 億塩基長）を迅速に解読できる点が挙げられる。ゲノムには様々な環境因子の自然選択を受ける遺伝子群が点在する。これらの環境選択性遺伝子では、水質汚濁や地球温暖化等の環境悪化により遺伝子の選択的淘汰が起こり、遺伝的多様性が低下する可能性がある。従来の遺伝的多様性評価は、ゲノムの大半を占める自然選択を受けない中立遺伝子で行われてきた（Nosil et al., Mol Eco, 2009）。環境と遺伝的多様性の適応的関係を理解するには、ゲノム中から自然選択を受けた遺伝子やその機能を検索（ゲノムスキャン）する必要がある。

2. 研究の目的

1. 次世代シーケンシングを活用して数多くの流域生物の遺伝的多様性と遺伝的分化を並列的に評価する新技術を開発する。従来的一种限定の評価から脱却し、生息地分断化や環境選択の遺伝的影響を迅速かつ安価に評価する新規的技術を開発する。
2. 河川分断度（ダム規模・砂防ダム密度・瀬切れ頻度）ごとの交流阻害の違いを解明し、生態学的に許容できる（できない）分断度の基準を科学的に導く。
3. ゲノムから環境選択性遺伝子を検索して、河川環境が遺伝的多様性に及ぼす自然選択の影響を解明する。従来のような中立遺伝子だけではなく、選択的淘汰を受けている遺伝子の多様性も評価し、自然選択による遺伝的劣化を起こす可能性がある環境状態を解明する。

3. 研究の方法

課題 1 サンプリングと環境調査

重信川流域（愛媛県）および愛媛県内の貯水ダムの上下流河川地点で、河川底生動物のサンプリングと多項目におよぶ環境調査を実施した（図 1）。底生動物は D フレームネットおよびコロードネットにて採取した。採取標本は 99% エタノールに保存し、実態顕微鏡観察で形態分類を同定した。さらに、水中の栄養塩濃度や有機物濃度等の水質項目、流速や河床材料の粒径分布等の物理環境項目、粒状性有機物濃度や付着藻類量等の底生動物の餌環境項目など、幅広い環境項目を現地調査した。

課題 2 遺伝子頻度推定法の開発

先行研究をレビューして無脊椎動物種をより網羅的に増幅しやすい PCR プライマーとして BF2 と BR2 (Elbrecht and Steinke, 2019) を選定した。さらに、PCR 効率をより高める温度条件や試薬条件を選定した。次世代シーケンシングで解読される各 DNA 配列が、どの段階の サイクル数の PCR に由来するかわかるようにするために認識コードをプライマー配列に加えた。各領域の PCR プライマーには地点認識コードと共に、PCR サイクル数の認識コードのインデックス配列を付加した。PCR サイクル数は 20, 24, 28, …, 56, 60, 64 の 12 段階で行った。愛媛県・重信川流域から集めた水生昆虫サンプルを形態同定し、4 種を選定して、各種から複数個体を対象に個体ごとに DNA を抽出してからミトコンドリア DNA の COI 領域の塩基配列をサンガーシーケンシングで解読した。そして、

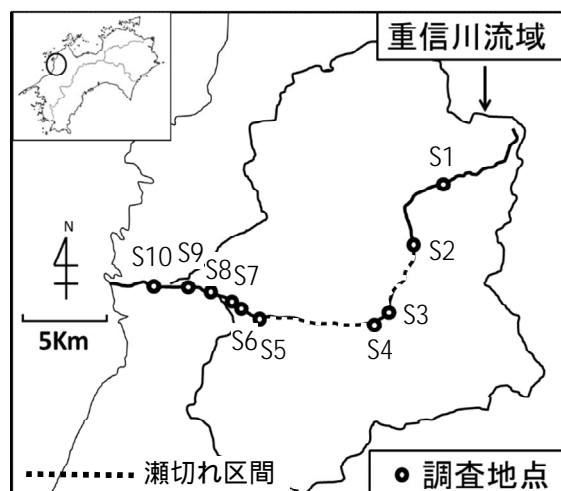


図 1 調査地点概要。地図中の○は調査地点、点線は瀬切れ区間を表す

これら配列既知の DNA サンプルを混合して、人工群集サンプルを作った。

課題3 環境選択性遺伝子の検索

環境勾配に応じて同種個体間の配列が顕著に変異している環境選択性遺伝子を検索した。日本広域から採取した28種の282個体から個体ごとに抽出したDNA試料に次世代シーケンシング解析を用いたDouble-digest restriction-associated DNA (ddRAD)解析を行い、ゲノムワイドのDNA配列を解読した。この際、RAD-PCRプライマーに個体認識インデックスコードを付加して、同時並行的に多個体のゲノムワイドのDNA配列データを得た。次に個体ベース進化モデルのモンテカルロシミュレーションにより、中立進化下で期待される各種の地点間の平均遺伝分化指数 F_{st} の理論出現分布を導き、ゲノム上で $P > 0.95$ 以上の外れ値の F_{st} の観測値を示したDNA領域を「環境選択性遺伝子」とした。環境勾配に応じて同種個体間の配列が顕著に変異している環境選択性遺伝子を検索した。

課題4 全種網羅的な遺伝的多様性と遺伝的分化の評価

課題1で採取した各地点の全採取個体のDNAをプールした。次にマルチプレックスPCRでmtDNA-COI領域を増幅した。各領域のPCRプライマーには地点認識コードと共に、PCRサイクル数の認識コードのインデックス配列を付加した。種・地点ごとに増幅したPCR産物の濃度を定量PCRで測り、等濃度で混合したライブラリーの全塩基配列を次世代シーケンサー (Miseq) で解読した。得られた網配列データは、クオリティコントロールをしてから、既知塩基配列との相同性に基づくバーコーディングで種ごと・遺伝子ごとに分割した。分割されたデータのアセンブルとマッピングをして、各種の各地点の対立遺伝子頻度を推定して、地点間の遺伝距離を評価した。

4. 研究成果

課題2 遺伝子頻度推定法の開発

配列既知の20ハプロタイプ(5種×4ハプロタイプ)を混合した人工群集サンプルのCOI領域のバーコーディングから計14,592,328配列が得られた。そこから11のハプロタイプが検出された。11ハプロタイプから、次世代シーケンシング(NGS)ライブラリー作成時のPCRサイクル数(X)の増加に伴う配列数(Y)の増加を説明する有意なロジスティックモデルを10ハプロタイプで推定することができた(図2)。このことから、当初の予定どおり、NGSライブラリーにおけるPCRサイクル数が最終的に得られる配列数に影響を及ぼすことが確かめられた。また、各ハプロタイプの鋳型DNA濃度(0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1.0 ng/ul)に応じて増殖曲線の形状が大きく異なることも確かめられた。このことは、PCRサイクル数が段階的に異なるNGSライブラリーを準備すれば、リアルタイムPCRの原理を応用して、PCRサイクル数と各ハプロタイプの配列数の定量関係から、鋳型DNA中の相対頻度をできる可能性を示唆しており、有意な結果を得ることができた。

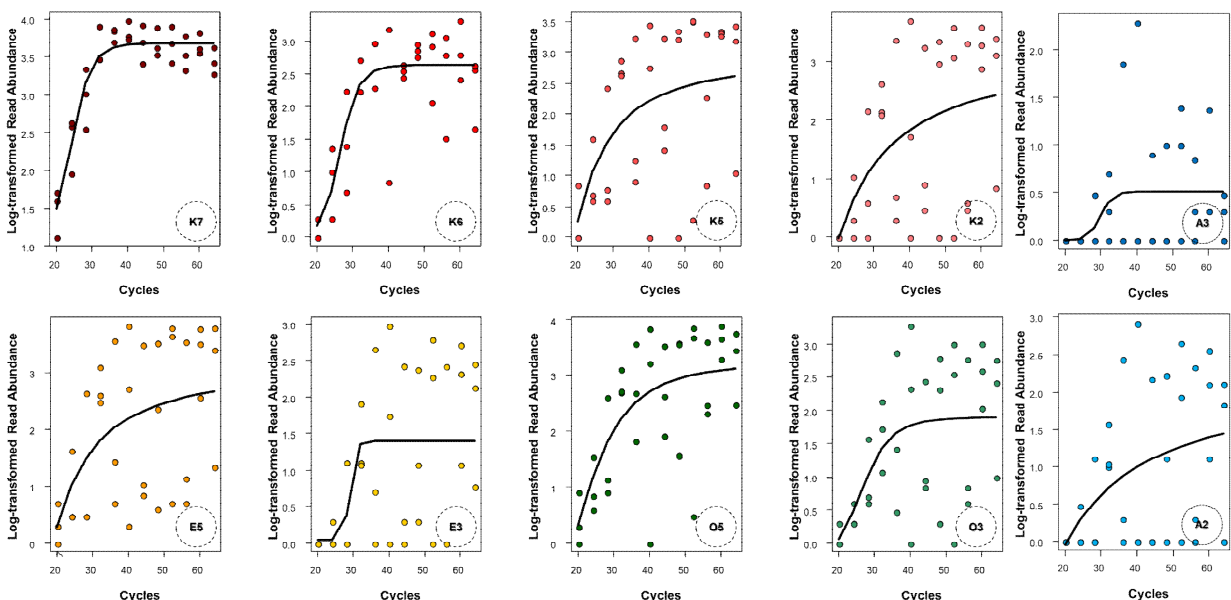


図2 NGSライブラリー作成時のPCRサイクル数(X)の増加に伴う配列数(Y)の増加を説明する有意なロジスティックモデルが推定された10ハプロタイプ。各PCRサイクル数ごとに3回繰り返し。

課題3 環境選択性遺伝子の検索

次世代シーケンス解析から、ゲノム上に分布する一塩基多型(SNP)が6409サイト発見された。latent factor mixed modelにより、1,181サイトが環境選択性遺伝子として推定された

353,352 配列が得られた。その内、BLAST 検索でヒットしたのは 1732 配列、411 個の遺伝子がアノテーションされた。地域間において共通の遺伝子領域は 1 つのみだったが、特異な遺伝子領域は 390 個とはるかに多かった。Distance-based redundancy analysis により、気温、降水量、水深などの環境変数と関連性が高い環境選択性遺伝子を検索した結果、ゲノム上の 58 遺伝子が環境変数と特に強い連関を示すことが明らかになった。

課題 4 全種網羅的な遺伝的多様性と遺伝的分化の評価

重信川の全 10 地点から計 165,508 配列が得られ、BLAST の結果、参照配列との一致率が 95% 未満である配列を削除した後に複数の遺伝子型が見られた種が 34 種であった。そのうち、1 地点あたり 6 配列以上得られ、多様な遺伝子型が見られた種は 24 種で、そのうち複数の地点からデータが得られた種は 20 種であった。さらに、瀬切れ区間を跨いだ 2 地点以上と瀬切れを跨がない 2 地点以上から配列が得られた種は 15 種（カゲロウ目 3 種、ハエ目ユスリカ科 12 種）であった。この 15 種を集団遺伝解析の対象種とした。解析に使用した配列数は平均 2,163 配列/種（154-5,120 配列/種）、解析地点数の平均は 5 地点（3-8 地点）、遺伝子型数の平均は 33 遺伝子型/種（2-111 遺伝子型/種）となった。

瀬切れによる分断の影響を受けている地点間および影響を受けていない地点間の遺伝距離 Pairwise Fst を比較した結果、*Baetis* sp. MK-2015d と *Chironomus kiiensis* で両地点間の Pairwise Fst に有意な差が見られた（表 1）。瀬切れ分断区間と分断無し区間の Pairwise Fst に有意な差の見られた 2 種は、大きく分化している地点が見られた。一方で、瀬切れで分断された地点間と分断されていない地点間の遺伝距離 Pairwise Fst の差が最も小さかったのは *Dicrotendipes inouei* と *Tanytarsus takahashii* であった。両種の Pairwise Fst は低く、流域内で分化が見られなかった。AMOVA 解析の結果、*Baetis* sp. MK-2015d 瀬切れで分断されたグループ間で有意な遺伝的な分化が見られた ($p < 0.05$)。

多くの種で瀬切れ分断区間と分断なし区間で遺伝距離の間に有意な差が見られなかった。重信川流域では古くから瀬切れが発生している。そのため多くの種が、瀬切れ期間中の羽化や、瀬切れ解消時の個体群間交流といった、瀬切れに適応した生活史を持っていた可能性がある。その一方で、カゲロウ目 1 種とユスリカ科 1 種では瀬切れ分断区間と分断なし区間で遺伝距離の間に有意な差が見られた。これらの種は、瀬切れ区間の中でも支流の合流により一時的に瀬切れが解消する地点（S3, S4）で特殊な系統が存在した。したがって、支流の存在がこの特殊な系統を支えていることが予想される。この 2 種では将来の気候変動や水需要の変化により、瀬切れ区間が支流にも拡大することで、流域内の遺伝的多様性が低下する可能性がある。

本研究で対象となった 15 種のうち 12 種はハエ目ユスリカ科であった。これまで行われたユスリカ科の DNA 多型解析は、系統学的研究を目的としたものであった。本研究で始めて明らかにされたユスリカ科 12 種の移動分散パターンは、9 種は平均の遺伝距離が 0.05 よりも小さく、積極的な交流が行われていることが示唆された。本研究では解析対象は 15 種に限られたが、今後、DNA データベースが拡充することで、解析可能な種が増えると考えられる。さらに NGS 解析による多数種の移動分散パターン解析技術が実現することで、生態系に配慮した河川管理へ応用されることが期待される。

表 1 解析対象種一覧。解析に使用した配列数、解析地点数、遺伝子配列型（ハプロタイプ）数、分断なし地点間、分断された地点間の遺伝距離 Pairwise Fst。Nは遺伝距離を算出した区間数

種名	配列数	地点数	遺伝子型数	Pairwise Fst					
				平均	分断なし	<i>n</i>	分断あり	<i>n</i>	<i>p</i>
カゲロウ目									
<i>Baetis</i> sp. MK-2015d	5,120	8	111	0.043	0.007	16	0.091	12	**
<i>Afronurus yoshidae</i>	1,108	5	9	0.097	0.081	4	0.107	6	NS
<i>Epeorus latifolium</i>	2,654	7	33	0.467	0.365	6	0.508	15	NS
ハエ目ユスリカ科									
<i>Chironomus kiiensis</i>	4,669	5	85	0.401	0.062	2	0.486	8	*
<i>Dicrotendipes inouei</i>	1,037	5	7	0.005	0.005	2	0.005	8	NS
<i>Polypedilum nubifer</i>	3,627	5	64	0.002	0.000	2	0.003	8	NS
<i>Tanytarsus oscillans</i>	154	3	2	-0.025	0.000	1	-0.037	2	-
<i>Tanytarsus oyamai</i>	849	4	11	0.026	0.008	1	0.030	5	-
<i>Tanytarsus</i> sp. 7XL	1,568	7	12	-0.006	-0.017	7	-0.001	14	NS
<i>Tanytarsus</i> sp. ent03	2,975	4	34	0.059	0.049	1	0.061	5	-
<i>Tanytarsus</i> sp. 'yoni'	311	5	5	0.076	0.071	2	0.078	8	NS
<i>Tanytarsus takahashii</i>	2,081	4	17	0.008	0.009	1	0.008	5	-
<i>Cricotopus bicinctus</i>	1,072	6	30	0.038	0.036	7	0.039	8	NS
<i>Cricotopus bimaculatus</i>	3,736	7	54	0.038	0.030	10	0.045	11	NS
<i>Cricotopus triannulatus</i>	1,478	7	14	-0.008	-0.010	7	-0.007	14	NS

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

Serrana, J. M., Y. Miyake, M. Gamboa and K. Watanabe, Comparison of DNA Metabarcoding and Morphological Identification for Stream Macroinvertebrate Biodiversity Assessment and Monitoring, *Ecological Indicators*, 101, 963-972, 2019, doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.02.008

Gamboa, M. and K. Watanabe, Genome-wide Signatures of Local Adaptation among Seven Stoneflies Species along a Nationwide Latitudinal Gradient in Japan, *BMC Genomics*, 20, 84, 2019, doi.org/10.1186/s12864-019-5453-3

Gamboa, M., D. Muranyi, S. Kanmori, and K. Watanabe, Molecular phylogeny and diversification timing of the Nemouridae family (Insecta, Plecoptera) in the Japanese Archipelago, *PLoS ONE*, 14(1), e0210269, 2019, doi.org/10.1371/journal.pone.0210269

Serrana, J., S. Yaegashi, S. Kondoh, B. Li, C. T. Robinson and K. Watanabe, Ecological Influence of Sediment Bypass Tunnels on Macroinvertebrates in Dam-Fragmented Rivers by DNA Metabarcoding, *Scientific Reports*, 8, 10185, 2018, doi.org/10.1038/s41598-018-28624-2

Maribet Gamboa, Maria Claret Tsuchiya, Suguru Matsumoto, Hisato Iwata, and Kozo Watanabe, Differences in Protein Expression among Five Species of Stream Stonefly (Plecoptera) along a Latitudinal Gradient in Japan, *Archives of Insect Biochemistry & Physiology*, 96 (3), e21422, 2017, doi.org/10.1002/arch.21422

Kozo Watanabe and Michael T Monaghan, Comparative Tests of Species-Genetic Diversity Correlations in Neutral and Nonneutral Loci in Four Species of Stream Insect, *Evolution*, 71 (7), 1755-1764, 2017, doi.org/10.1111/evo.13261

Kei Nukazawa, So Kazama, and Kozo Watanabe, Catchment Scale Modeling of Riverine Species Diversity Using Hydrological Simulation: Application to Tests of Species-Genetic Diversity Correlation, *Ecohydrology*, 10, e1778, 2017, doi.org/10.1002/eco.1778

八重樫咲子, 泉昂佑, 三宅洋, 渡辺幸三, 次世代シーケンス解析による瀬切れ河川の水生昆虫複数種を対象とした流域内交流パターンの網羅的評価, *土木学会論文集 G (環境)*, 72(7), III_489-III_496, 2016, doi.org/10.2208/jscej.72.III_489

[学会発表] (計 20 件)

Maribet Gamboa, Kozo Watanabe: Genome-wide RAD-seq reveals adaptive divergence among seven stream stoneflies along a nationwide latitudinal gradient in Japan, 12th International Symposium on Ecohydraulics (ISE 2018), Tokyo (Japan), 2018.8.20

Joelle Serrana, Sakiko Yaegashi, Shunsuke Kondoh, Bin Li, Christopher T. Robinson and Kozo Watanabe: Assessment of The Ecological Influence of Sediment Bypass Tunnels On the Species Diversity of Macroinvertebrate Communities in Dam-Fragmented Rivers Using Dna Metabarcoding, 12th International Symposium on Ecohydraulics (ISE 2018), Tokyo (Japan), 2018.8.20

Sakiko Yaegashi, Kozo Watanabe, Michael T. Monaghan, Tatsuo Omura: Genetic Structure and Gene Flow Between Altitudinally Isolated Populations of *Stenopsychemarmorata*, 12th International Symposium on Ecohydraulics (ISE 2018), Tokyo (Japan), 2018.8.20

Maribet Gamboa, Kozo Watanabe: Genome-wide RAD-seq reveals adaptive divergence among seven stream stoneflies along a nationwide latitudinal gradient in Japan, Society of Molecular Biology and Evolution meeting, Yokohama (Japan), 2018.7.14

Maribet GAMBOA, Kozo WATANABE: Genome-wide RAD-Seq Reveals Adaptive Divergence among Seven Stream Stoneflies along Nationwide Latitudinal Gradient in Japan, Water and Environment Technology Conference 2018 (WET2018), Matsuyama (Japan), 2018.7.14

Joelle SERRANA, Sakiko YAEGASHI, Shunsuke KONDOH, Bin LI, Christopher ROBINSON, and Kozo WATANABE: Ecological Influence of Sediment Bypass Tunnels on Macroinvertebrates in Dam-fragmented Rivers by DNA Metabarcoding, 50th Anniversary of the Neutral Theory of Molecular Evolution of the Society of Molecular Biology and Evolution (SMBE), Yokohama (Japan), 2018.7.9

Maribet Gamboa, Kozo Watanabe: De novo draft genome of the stonefly *Siphonoperla torrentium* (Pictet, 1842), XIX International symposium on Plecoptera, Aracruz (Brazil), 2018.6.3

Joelle SERRANA, Sakiko YAEGASHI, Shunsuke KONDOH, Bin LI, Christopher ROBINSON, and Kozo WATANABE: Ecological Influence of Sediment Bypass Tunnels on Macroinvertebrates in Dam-fragmented Rivers by DNA Metabarcoding, Pest Management Council of the Philippines 50th Anniversary and Annual Scientific Conference, Iloilo

(Philippines), 2018.5.11

Sakiko Yaegashi, Kozo Watanabe: Metabarcoding Analysis of Water Environmental DNA To Reveal Species Diversity Of Aquatic Insects Using Next Generation Sequencing, The Association for the Sciences of Limnology and Oceanography (ASLO) 2017 Aquatic Science Meeting, Honolulu, Hawaii, March 1, 2017

Nukazawa, K., Kazama, S., Watanabe, K.: Adaptive genetic consequences of climate change for stream insects: a hydrothermal simulation approach, 20th Congress of the Asia and Pacific Division of the International Association for Hydro-Environment Engineering and Research (IAHR-APD), Colombo, SriLanka, August 30, 2016

Sakiko YAEHASHI, Kozo WATANABE: Multispecies assessments of effects of habitat fragmentations on population genetic structures of stream invertebrates using next-generation sequencing, 20th Congress of the Asia Pacific Division of the International Association for Hydro Environment Engineering & Research, Colombo, Sri Lanka, August 29, 2016

Maribet Gamboa, Kozo Watanabe: Gene-environmental association of stoneflies across environmental gradients in Japan, 3rd International symposium of Benthological Society of Asia, Vladivostok, Russia, August 4, 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：加藤 幹男

ローマ字氏名：(KATO, mikio)

所属研究機関名：大阪府立大学

部局名：高等教育推進機構

職名：教授

研究者番号(8桁)：30204499

研究分担者氏名：八重樫 咲子

ローマ字氏名：(YAEHASHI, sakiko)

所属研究機関名：山梨大学

部局名：大学院総合研究部

職名：助教

研究者番号(8桁)：30756648

研究分担者氏名：竹門 康弘

ローマ字氏名：(TAKEMON, yasuhiro)

所属研究機関名：京都大学

部局名：防災研究所

職名：准教授

研究者番号(8桁)：50222104

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。