

令和元年5月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05767

研究課題名(和文) キューバのアノールトカゲで複数回進化した開放高温環境への適応進化仮説の検討

研究課題名(英文) Multiple evolutionary adaptation to open-hot environments in Cuban Anolis lizards

研究代表者

河田 雅圭 (KAWATA, MASAKADO)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：90204734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、キューバに生息するアノールトカゲの系統関係から、独立に4回、森林低温環境から開放高温環境へ進化したと推定され、高温放環境に生息する2種について、正の自然選択を受けた遺伝子を推定した。その結果、コラーゲン産生に関わる *tgfb1* の配列が進化していることがわかった。また、*A. allogus* および *A. sagrei* について全ゲノム配列決定を行った。ゲノム全体での重複遺伝子率は、*A. sagrei* (81.0%) が *A. allogus* (45.4%) に比べて高い値を示した。このことは、高温開放環境への適応に遺伝子重複が重要であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、温暖化による温度上昇に生物がどのように進化的反応をするのかという問題は、多くの注目が集まっており、進化学および生態系保全において重要な問題である。アノールトカゲの異なる温度環境への適応分化を促進する進化機構の解明は、「適応放散による多様化」と「温度に対する進化的反応」という両者の問題を解明する上で貴重で重要な課題である。本研究の成果は、その進化機構の解明につながる重要な結果を提供した。

研究成果の概要(英文)：Anolis species has evolved from being a shade-adapted, forest species to an open-habitat species independently at least four times in Cuba. In this study, we estimate positively selected genes during the evolution of a shade-adapted, forest species to an open-habitat species (*A. sagrei* and *A. allisoni*) by using PALM and McDonald-Kreitman test. We detected three genes *tex28* and *tgfb1*, *leng8* were positively selected both lineage of *A. sagrei* and *A. allisoni*. In addition, we determined the whole genome sequences of *A. sagrei* and *A. allogus* (a shade-adapted, forest species) and compared gene duplication rates between species. The results showed that gene duplication rates in *A. sagrei* was higher than that in *A. allogus*. In addition, several genes related to thermal adaptation, the number of the copies were higher in *A. sagrei* than those in *A. allogus*. These suggest that increasing number of gene copies are related to adaptation to open and hot habitat in Anolis lizard.

研究分野：進化生態学

キーワード：温度適応 アノールトカゲ キューバ

1. 研究開始当初の背景

アノールトカゲは、幹・枝先・樹冠・草地などの生息地構造に異なる行動・形態 (エコモルフ) を進化させ、多様化するという適応放散進化のモデル生物として注目されてきた。また、同じエコモルフに属する種の間では、異なる温度環境へ適応分化することで、さらに多様化が促進されている。特定の生物群で適応放散が促進される現象は、重要な進化生態学の問題として研究されてきたが、どのような進化機構が適応放散を容易にしているのか依然不明である。また、近年では、温暖化による温度上昇に生物がどのように進化的反応をするのかに多くの注目が集まっている。アノールトカゲの異なる温度環境への適応分化を促進する機構の解明は、「適応放散による多様化」と「温度に対する進化的反応」という両者の問題を解明する上で貴重で重要な課題である。

これまで、ハバナ大学と提携し、キューバにおけるアノールトカゲについて共同研究を行ってきた。これまでの研究で、異なる温度環境への適応が局所群集の多様性増加に寄与していることを明らかにした。森林深部に生息する *A. allogus*、林縁に生息する *A. homolechis*、開放高温環境に生息する *A. sagrei* の3種に注目し、異なる温度(26°Cと33°C)で発現が変化する遺伝子(発現変動遺伝子)の違いを3種で検出した5。その結果、開放高温下に生息する *A. sagrei* では、概日リズムに関する遺伝子群が発現変動遺伝子として検出された。また、33°Cの高温下で、酸素輸送に関わるヘモグロビンの発現量が増加し、高温環境での代謝の維持が促進されていることが示唆された。また、*A. allogus* は、高温環境でタンパク質の折りたたみ機能の異常を示す遺伝子の発現上昇が示され、高温での活動が困難であることが示された。

キューバにおいて、森林内の低温環境から開けた高温環境への進化が複数回生じており、開放環境へ適応進化した、*A. sagrei* また、*A. porcatus* を祖先にもつ *A. carolinensis* は侵略的外来種へと進化している。これらのことから、森林内の低温環境から開けた高温環境への進化がどのような遺伝的機構で生じたのかを探ることは、温度環境の変化に対する進化的反応の機構を解明する上で重要である。

2. 研究の目的

本研究は、低温森林環境と森林の外的高温開放環境に生息するキューバのアノールトカゲ5種を対象に、開放高温環境への進出に重要な遺伝子を推定することを目的とした。そのために、まず、高温開放環境への進出が起きた系統樹上の分岐点を探索し、さらに、その分岐点において正の自然選択を受けた遺伝子またはその変異箇所をトランスクリプトームの網羅的な配列比較解析によって推定することで、高温開放環境への進出に伴って進化した遺伝子配列とその変異を検出した。また、低温森林環境種である *A. allogus* と高温開放環境である *A. sagrei* の全ゲノム配列を Chromium により決定し、遺伝子重複数などを比較した。

3. 研究の方法

キューバアノールトカゲの系統樹は、Cádiz et al (2018) によって作成された58種の系統樹を参照した。この系統樹のトポロジーと系統樹に含まれる種の現在適応している温度環境の情報から、Mesquite 3.2 (Maddison and Maddison 2017) の最節約モデルによって推定し、祖先の形質及び異なる温度環境に生息する種の進化過程を推定した。

RNA-seq またはゲノムリシーケンスによって決定した5種 (*Anolis mesartrei*, *A. allisoni*, *A. isolepis*, *A. sagrei* と *A. allogus*) の配列をもとに、系統樹を最尤的に作成した。この系統樹をガイドツリーとし、5種のオーソログの塩基配列を PRANK (Loytynoja and Goldman 2005) によってマルチプルアライメントした。

正の自然選択下にある配列またはそのサイトの検出を、以下の2つの方法で行った(図1)。まず、正の自然選択を受けた遺伝子を PAML の codeml プログラム (Yang 2007) によって最尤的に検出した。高温開放環境に生息する *A. allisoni* と *A. sagrei* のそれぞれにおいて正の自然選択下にある遺伝子を推定するために、それぞれの系統樹上の枝を前景枝(正の自然選択が起きた枝)として仮定した2つの独立した解析を行った。また、*A. sagrei* (最高で n = 8) と *A. allogus* (最高で n = 8) のトランスクリプトーム配列を用いて、McDonald-Kreitman test を行った。

正の自然選択が検出された遺伝子については、Panther にアップロードし、それらの GO term の偏りを二項検定により検出した。この時、多重補正は Bonferroni 法によって行った。

A. allogus と *A. sagrei* の全ゲノム配列決定を行うために、Chromium による DNA のバーコーディングを行い、HiSeq X でシーケンス後、Supernova 2.1.1 による de novo アセンブリを実施した。アセンブルされた配列に対して、RepeatMasker でグリーンアノールの反復配列を探索、RepeatModeler での新規の反復配列を探索を実施した。また Augustus で遺伝子予測遺伝子の推定を実施し、BLAST で重複遺伝子をグループ化し、OrthoFinder で種特異的な重複遺伝子を探

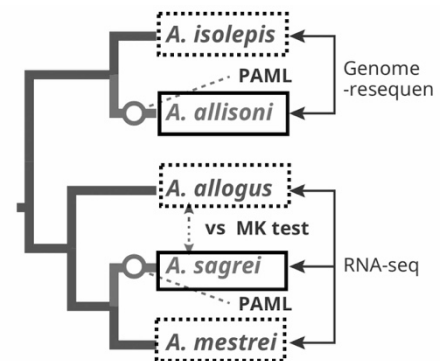


図1. 森林低温環境(□)から開放高温環境(□)に独立に進化した2種で正の選択を受けた遺伝子を検出する。

索した。

4. 研究成果

異なる温度環境に生息する種の進化過程の推定

高温開放環境、中温林縁環境、低温森林環境の進化過程を推定した結果、キューバアノールトカゲでは、5回独立して低温森林環境から高温開放環境への進出が起きていると推定された。その分岐点は、樹冠を利用する体サイズの最も大きなエコモルフである Crown-giant の系統が生まれた分岐点と木の幹と樹冠を利用するエコモルフである Trunk-crown の系統内の分岐点、木の幹と地面を利用するエコモルフである Trunk-ground の系統内の2つの分岐点、その他のエコモルフである Unique のうち、*A. pumilus* を含む系統が生まれた分岐点である。さらに、低温森林環境から中温林縁環境への進出は、*A. vermiculartus* が生まれた分岐点と *A. fugitives* が生まれた分岐点、木の枝先を利用するグループである Twig のうち、*A. angusticeps* を含む系統が生まれた分岐点、Trunk-ground の系統内の分岐点の合計で4回独立に起きていると推定された。

正の自然選択を受けた遺伝子の検出

高温開放環境に生息する2種 (*A. allisoni* と *A. sagrei*) について、正の自然選択を受けた遺伝子を PAML の codeml プログラムを用いて最尤的に、2種において独立に調べた結果、危険率5%以下で優位に正の自然選択下にある遺伝子として、*A. allisoni* と *A. sagrei* ではそれぞれ順に、101と207の遺伝子が検出された。多重補正を行った結果、*A. sagrei* では38の遺伝子について補正後の p 値が5%以下であったが、*A. allisoni* では多重補正後、そのような遺伝子はなかった。多重補正前の p 値が5%以下であった遺伝子の内、*A. allisoni* と *A. sagrei* の両種で正の自然選択が検出された遺伝子は、*tex28* と *tgfb1*、*leng8* の3つの遺伝子であった。*tgfb1* では、*A. allisoni* で4つ、*A. sagrei* で2つのアミノ酸サイトにおいて正の自然選択を受けたと推定されたが、この2種で共通して正の自然選択が検出されたアミノ酸サイトはなかった。*leng8* では、*A. allisoni* で6つ、*A. sagrei* で4つのアミノ酸サイトにおいて、正の自然選択を受けたと推定されたが、この2種で共通して正の自然選択が検出されたアミノ酸サイトはなかった。*tex28* では、正の自然選択が検出された特定のアミノ酸サイトはなかった。

A. sagrei と *A. alligulus* の2種間において、McDonald-Kreitman test を行った結果、多重補正後の危険率が5%以下で、種内よりも種間で優位に同義置換に対する非同義置換の割合が高い遺伝子として、90の遺伝子が推定された。*A. sagrei* において、PAMLによって正の自然選択下にあると推定され、かつ、*A. sagrei* と *A. alligulus* において、McDonald-Kreitman test によって正の自然選択下にあると推定された遺伝子は、*pzp* と *cbarp*、*tgfb1*、*supt16h* であった。

A. allisoni と *A. sagrei* で共通

して、コラーゲン産生に関わる *tgfb1* の配列が進化していることがわかった。さらに、TGF-β/Smad シグナル伝達経路に関わる複数の遺伝子と、コラーゲンをコードする遺伝子においても、*A. sagrei* でのみであるが、正の自然選択が検出された。これらの結果は、キューバアノールトカゲにおいて高温開放環境への適応に、コラーゲン産生に関わる遺伝子の進化が重要であったことを示唆している。

全ゲノム配列を用いた重複遺伝子率の推定

A. alligulus および *A. sagrei* について全ゲノム配列決定を行い、Scaffold N50 が共に10Mbを超え、BUSCOs の網羅性が約85%の質の高いアセンブリが得られた。ゲノム全体での重複遺伝子率は、*A. sagrei* が81.0%が *A. alligulus*(45.4%)に比べ高い値をしめした。*A. sagrei* でコピー数が多い遺伝子の内、*A. sagrei* で正の自然選択が検出された遺伝子が6個、*A. sagrei* だけで高温下で発現が上昇する遺伝子と共通するものを5個の遺伝子が特定された。その中には温度適応との関連が示唆されている 血液の酸素運搬に関わる遺伝子も含まれていた。このことは、高温開放環境への適応に遺伝子重複が重要であることを示唆している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Cádiz, A., N. Nagata, L. Díaz, Y. Suzuki-Ohno, L. Echenique-Díaz, H. Akashi, T. Makino and M. Kawata (2018) *Zoological Letters* 4:21 doi: 10.1186/s40851-018-0107-x (査読あり)

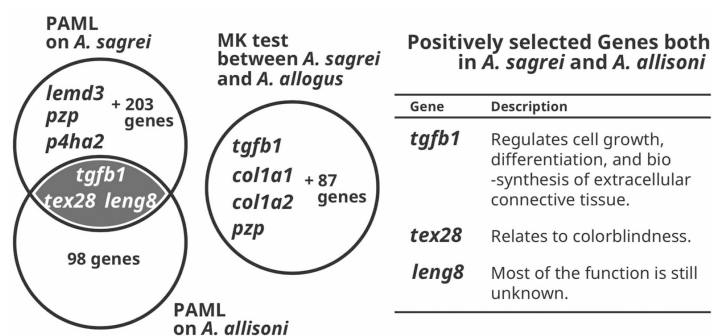


図2. 森林低温環境から開放高温環境への進化の過程で正の選択を受けた遺伝子。

2. Akashi, H., S. Saito, A. Cádiz, T. Makino, M. Tominaga, M. Kawata (2018) **Molecular Ecology** 27:2234–2242. doi: 10.1111/mec.14572 (査読あり)
3. Tamate, S, W. M. Iwasaki., K. L. Krysko, B. J. Camposano, H. Mori., R. Funayama., K. Nakayama., T. Makino and M. Kawata. (2017) **Scientific Reports**, 7: 18008 doi: 10.1038/s41598-017-17852-7 (査読あり)
4. Suzuki-Ohno, Y., K. Morita, N. Nagata, H. Mori, S. Abe, T. Makino, and M. Kawata (2017) Factors restricting the range expansion of the invasive green anole *Anolis carolinensis* on Okinawa Island, Japan. **Ecology and Evolution**, 7: 4357–4366. doi: 10.1002/ece3.3002 (査読あり)
5. Akashi, H. D., A. Cadiz, S. Shigenobu, T. Makino and M. Kawata (2016) **Molecular Ecology**, 25:2273-2285. doi: 10.1111/mec.13625 (査読あり)

[学会発表] (計 11 件) 発表者*

1. 金森駿介*・Luis M. Díaz・Antonio Cádiz・石井悠・山口勝司・重信秀治・河田雅圭:「キューバアノールトカゲにおける開放高温環境への適応進化のゲノム基盤」生態学会第 66 回大会, 2019 年
2. 鈴木卓真*・金森駿介・Antonio Cádiz・Luis M. Díaz・石井悠・河田雅圭:「アノールトカゲの幹地上型から草地型エコモルフへの進化の過程で選択を受けた遺伝子」生態学会第 66 回大会, 2019 年
3. 金森駿介*・石井悠・山口勝司・重信秀治・牧野能士・河田雅圭:「生息温度環境の分化したアノールトカゲ近縁 2 種の Chromium システムによるゲノム配列決定」日本進化学会第 20 回大会, 2018 年
4. Shunsuke Kanamori* Hiroshi D. Akashi, Antonio Cádiz, Luis M. Díaz, Daiki X Sato and Masakado Kawata. Detection of genes involved in adaptive evolution to hot-open habitat in Cuban *Anolis* lizards. *SMBE* 2018, 2018 年
5. Shunsuke Kanamori*, Hiroshi D. Akashi, Antonio Cádiz, Luis M. Díaz, Daiki X Sato and Masakado Kawata: Detection of genes involved in adaptive evolution to hot-open habitat in Cuban *Anolis* lizards. The 8th EAFES International Congress. 2018 年
6. 金森駿介*, 赤司寛志, Antonio Cadiz, Luis M. Díaz, 佐藤大気, 牧野能士, 河田雅圭:「キューバアノールトカゲにおける高温環境への適応進化に関わる遺伝子の探索」第 65 回日本生態学会大会, 2018 年
7. 金森駿介*, Antonio Cádiz, L. M. Díaz, 河田雅圭:「異なる温度環境に生息するアノールトカゲにおける概日リズム」日本進化学会第 19 回大会, 2017 年
8. 赤司寛志*, Antonio Cádiz Díaz, 齋藤茂, 富永真琴, 牧野能士, 河田雅圭:「キューバのアノールトカゲにおける異なる温度への適応と温度感受性の関連」日本進化学会第 19 回大会, 2017 年
9. 石井 悠*・Antonio Cádiz・Luis M. Díaz・Karolis Janusevicius・赤司寛志・丸山真一朗・河田雅圭:「アノールトカゲの高温乾燥地帯への適応機構:自然選択の検出と発現変動遺伝子から」NGS 現場の会 第五回研究会, 2017 年
10. 石井 悠*・Antonio Cádiz・Luis M. Díaz・Karolis Janusevicius・赤司寛志・丸山真一朗・河田雅圭:「森林から半砂漠環境への適応進化の遺伝的基盤の解明:キューバアノールトカゲを用いて」日本生態学会第 64 回全国大会, 2017 年
11. 金森駿介*・赤司寛志・Antonio Cádiz・Luis M. Díaz・佐藤大気・牧野能士・河田雅圭:「開放高温環境へ適応進化したキューバのアノールトカゲにおいて正の選択を受けた遺伝子の検出」第 18 回日本進化学会, 2016 年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：牧野能士

ローマ字氏名：Makino, Takashi

研究協力者氏名：丸山真一郎

ローマ字氏名：Maruyama, Shinichiro

研究協力者氏名：寺井洋平

ローマ字氏名：Terai, Yohei

※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。