

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：35409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06395

研究課題名(和文)アカネズミゲノム情報から瀬戸内海の古代河川が残した足跡をたどる

研究課題名(英文) Exploring the effect of ancient rivers in the Seto Inland Sea on the wood mouse genome on islands

研究代表者

佐藤 淳 (Sato, Jun)

福山大学・生命工学部・教授

研究者番号：80399162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：瀬戸内海島嶼に生息するアカネズミを対象に、ミトコンドリアDNA Dloop領域およびシトクロームb遺伝子の塩基配列を決定し、類縁関係を推定したところ、各島嶼の個体は単系統を形成したが、島間の関係性は不明瞭であった。次に、MIGseq法とGRAS-Di法により得られたそれぞれ11,205 SNPsと94,142 SNPsに基づき類縁関係を推定したところ、高い信頼度で各島の個体の単系統性と島間の関係性が明らかとなった。この類縁関係は地理情報システムにより推定された瀬戸内海の古代河川と完全に一致した。このことは瀬戸内海島嶼のアカネズミの遺伝的分化は、古代河川により引き起こされたことを強く示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本最大の内海である瀬戸内海がどのように形成されてきたのかは地質学的な記録からだけでは明らかとされてこなかった。本研究は、島に生息する生物の遺伝的分化という観点から地史に迫ろうとした初めての研究である。本研究においては、過去に流れていた古代河川の一つである豊予川と、芸予諸島に生息するアカネズミの系統関係との間に極めて高い一致性が見られた。このことは他地域においてもアカネズミの類縁関係から過去の地史に迫ることが可能であることを示唆するとともに、アカネズミ以外の生物についても瀬戸内海島嶼を舞台としてゲノムレベルでの分析を行うことで、瀬戸内海の地史が解明されることにつながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We determined the mitochondrial Dloop and Cytochrome b gene sequences for individuals of the large Japanese wood mice that inhabits the Seto Inland Sea islands. Phylogenetic analysis of the mitochondrial markers revealed the monophyly of each island lineage. However, the interrelationships among island's haplotype were not clarified. On the other hand, Mig-seq and GRAS-Di methods could extract 11,205 SNPs and 94,142 SNPs, respectively. The phylogenetic analysis using these polymorphisms clarified the monophyly of each island lineage and provided strong support for the interrelationships among island's haplotypes. The GIS analyses for the Seto-Inland Sea revealed ancient rivers that are currently submerged under the sea. The inferred ancient rivers are completely consistent with the phylogenetic relationships among island wood mice. It suggests that the ancient rivers would have played an important role to shape the genetic differentiation of the wood mice among islands.

研究分野：進化生物学

キーワード：アカネズミ 瀬戸内海 島嶼 ミトコンドリアDNA MIGseq GRAS-Di GIS 古代河川

1. 研究開始当初の背景

本研究では、「島の生物の遺伝的類縁関係は古代の河川により説明できるか」という問いに答えることで、瀬戸内海の成立史の詳細を明らかにすることを目指した。これまでの研究においては、海底地質の研究により、瀬戸内海の海底には、氷期に形成された河川の河床が埋積されずに残った“くぼち(海釜)”が報告されており、それらは古代の河川と考えられている。東に紀淡川、西に豊予川の2大水系が知られ、それぞれ現在の1級河川とつながる。

最終氷期の終了後、地球の温暖化とともに急速に海水準が上昇したことで、これらの古代河川が海との連結路となり、瀬戸内海の形成を推し進めたと想定される。そこで、古代河川が残した足跡をたどることで、瀬戸内海の形成の歴史を探ることができると考えた。地質学の研究では、過去から現在にかけて起こる堆積作用や浸食作用の影響もあり、過去の海底地形を解明するには限界がある。実際に古代河川の証拠である海釜は現在の海況下で形成された浸食地形であるとの見方もある。したがって、瀬戸内海の形成史をより高解像度で理解するためには、地質以外の痕跡に基づく異なる視点でのアプローチが必要であった。

2. 研究の目的

本研究では古代河川が生物集団に与えた影響に注目した。河川により生物の集団が分断化されることで、二つの集団の遺伝的特徴は異なるものになることが予想される。そして、その遺伝的な相違の程度は隔離の時間に比例する。古代河川は瀬戸内海の島々をすり抜けるように存在していたことから、島の生物間の類縁関係を明らかにすることで、古代河川がどのような順序で島の形成に関与したのかを知ることができる。すなわち、どのような海水の流入パターンを介して瀬戸内海が形成されたのかを生物の視点から解明できると考えた。

本研究では、瀬戸内海の各島嶼に生息するアカネズミに着目した。アカネズミは日本固有種であり、日本の哺乳類の中では最も古い系統の一つである(佐藤 2016)。また、日本固有の哺乳類の中で唯一ドラフトゲノムが利用可能というメリットを有する種でもある。さらに、アカネズミは、瀬戸内海の島間で人為的な移入の影響を示さないことが示唆されており(Sato et al. 2017)、人の移動の影響を受けずに地史を代弁する“生き証人”として注目に値する。本研究が始まるまでに、芸予諸島のアカネズミを対象に、ミトコンドリア DNA *Dloop* 領域(約 300 bp)を用いた分子系統解析を行った(Sato et al. 2017)。しかしながら、分析した領域の多型の数が少なく、島嶼間のアカネズミの類縁関係は信頼値の点から精度に問題点があった。

そこで、本研究では、より多くのゲノム領域の分析を可能とする次世代シーケンサーを用いて、島嶼間のアカネズミの類縁関係を解明し、瀬戸内海形成史の詳細を明らかにすることを目的とした。近年の次世代シーケンサー技術の著しい発展により、生物多様性研究の分野にブレークスルーが起きている。10 座位程度までの遺伝情報を分析する伝統的な手法から、数千座位の分析(従来の 100 倍以上)まで急速な技術の進歩がみられる。この技術を適用することで、瀬戸内海の島とその周辺のアカネズミの類縁関係を一気に解決できる可能性がある。当初は、ミトコンドリアゲノム全長と RAD-seq 法の解析を行うことを計画したが、より簡便で、多くの初期 DNA 量を必要としない MIG-seq 法と GRAS-Di 法で分析することに変更した。ミトコンドリア DNA については、新たにチトクローム *b* 遺伝子 1140 bp の分析を行った。これらの手法を用いたことで、以下で述べるように、上記の目的は達成されたと考えている。

参考文献:

佐藤淳(2016)日本のネズミ—多様性と進化(本川雅治 編). 東京大学出版会、pp. 25-43.
Sato et al. (2017) *Zoological Science* 34 (2): 112-121.

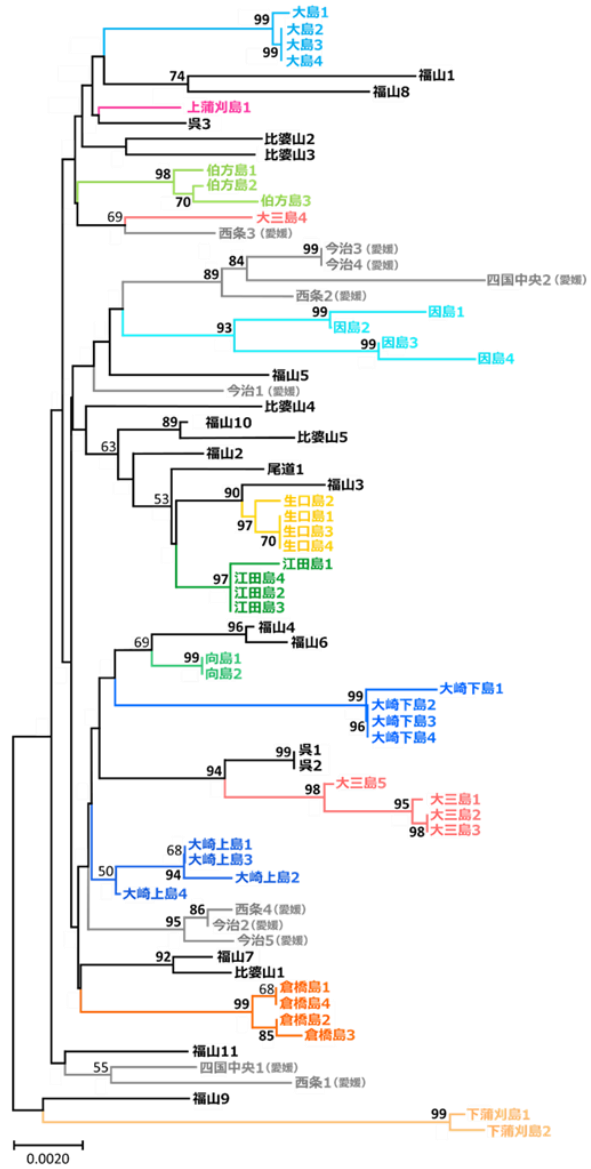
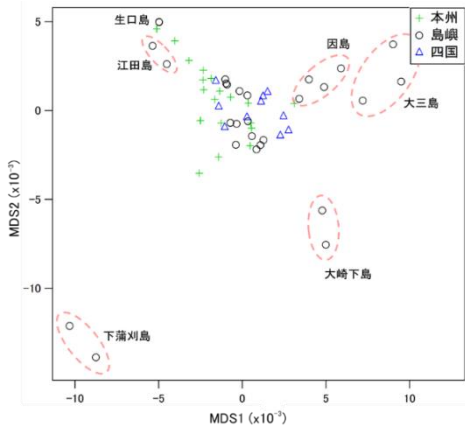
3. 研究の方法

本研究機関において、新たに江田島(広島)、倉橋島(広島)、呉市(広島)、比婆(広島)、西条市(愛媛)、四国中央市(愛媛)からサンプリングを行い、過去に収集したサンプルに加えて、新たに捕獲した 23 個体を分析に用いた。遺伝分析としてはまず、ミトコンドリア DNA チトクローム *b* 遺伝子 1140 bp の塩基配列を従来の DNA 分析手法であるサンガー法を用いて決定した。その後、既報の *Dloop* のデータを連結し、1439 bp を用いて分子系統解析を行った。

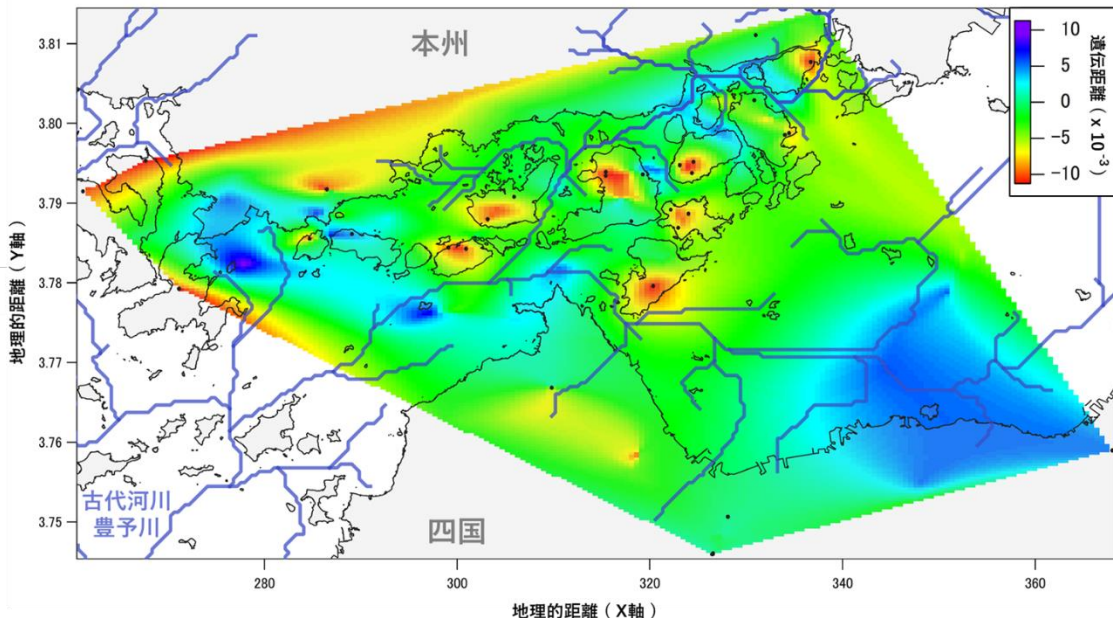
4. 研究成果

ミトコンドリア DNA *Dloop* 領域とチトクローム *b* 遺伝子の連結データ 1439 bp を用いて近隣結合法で推定した系統樹を右図に示す(図中の数値は信頼値を表すブートストラップ値である。数値のない関係性はブートストラップ値が 50%以下であることを示す。)。この図に見られるように各島嶼個体群は高い信頼値で単系統を形成した。その一方で、本州や四国、そして島間のアカネズミの関係性については高い信頼値で支持されず、明瞭な結果は示されなかった。

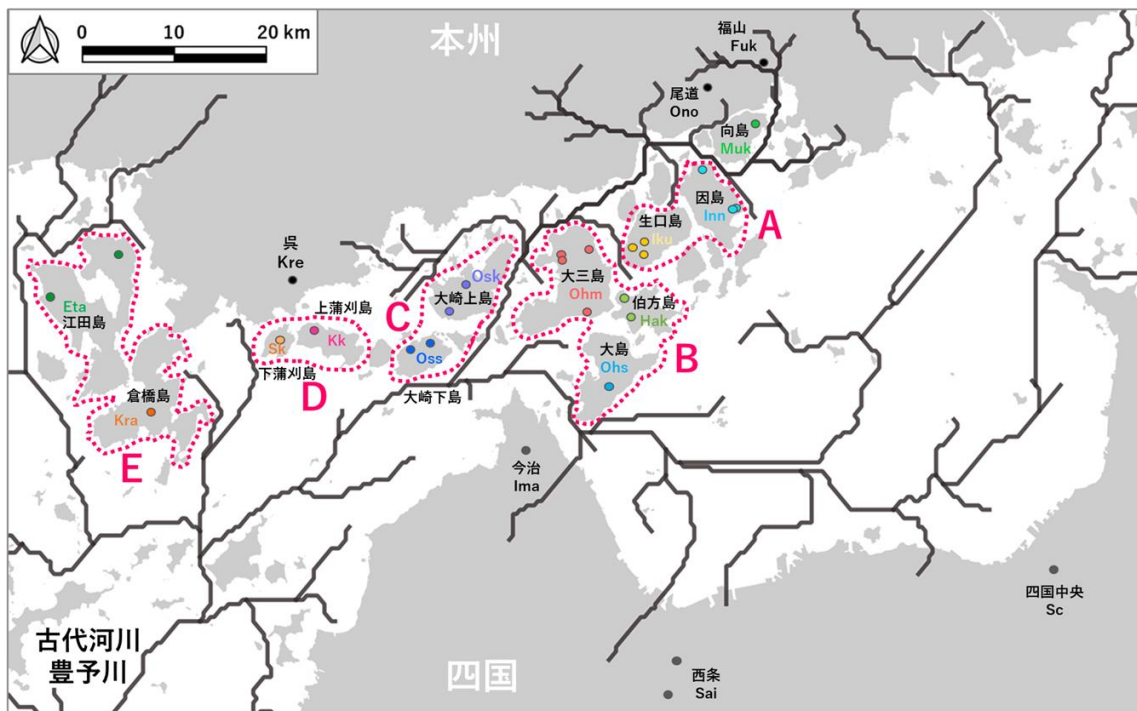
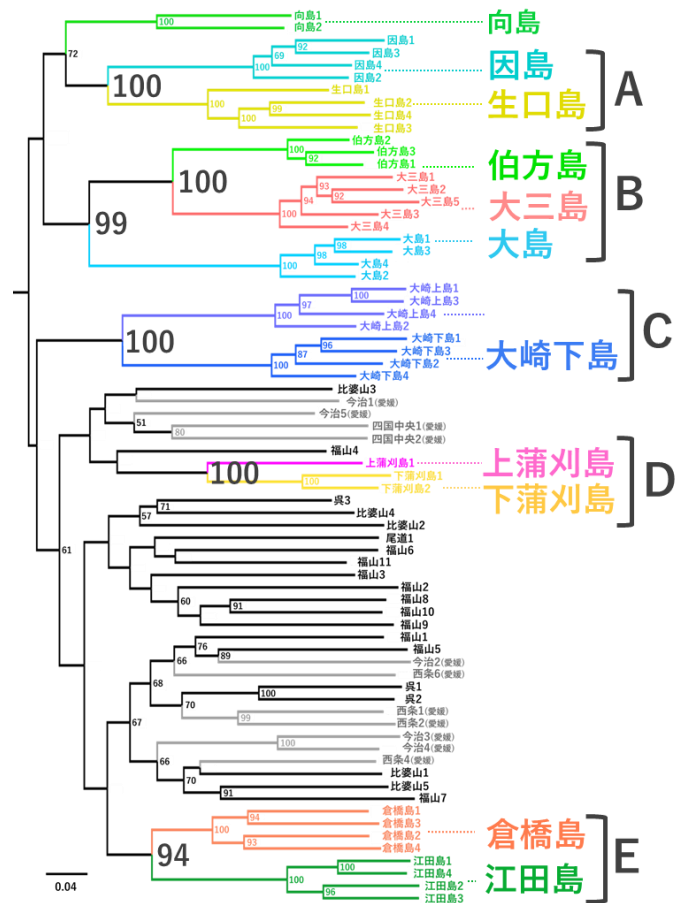
これらのアカネズミについてペアワイズで遺伝距離を算出し、多次元尺度法 (MDS) により、個体間の近縁性を 2 次元にプロットした(下図)。その結果、本州と四国のプロットは比較的集合する一方で、島の個体はそれぞれの島で集合し、本州や四国とは異なる独自のクラスターを形成した。このことは、それぞれの島では遺伝的浮動の影響を受け、独自の進化が起きたことを示唆する。



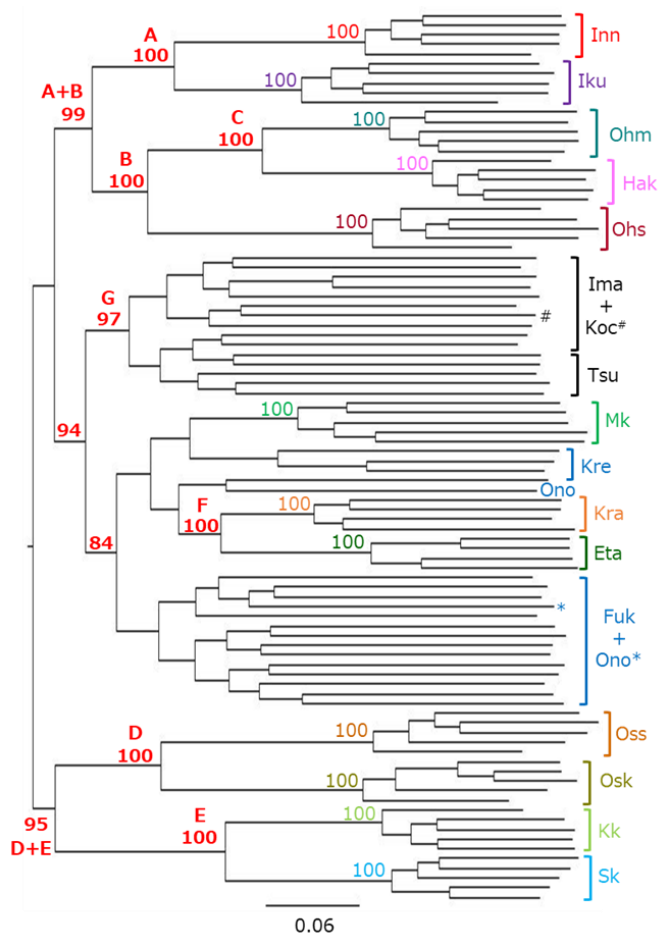
さらに、Alleles in Space 法を用いて、個体間の遺伝距離をそれらの個体の採集地点の中心に算出することで、地図上に遺伝距離を可視化した。QGIS を用いて、標高データと深度データから古代河川を推定し、遺伝距離と比較したところ、遺伝距離が遠いポイント(下図の青色)と古代河川の間整合性が見られた。このことは、古代河川がアカネズミのミトコンドリア DNA の遺伝的分化に影響したことを示唆する。



次に、核 DNA 多型をゲノムワイドで分析することを目的に二つの縮約ゲノム分析（MIG-seq 法と GRAS-Di 法）を行った。MIG-seq 法については反復配列を対象にデザインされたプライマーにより PCR を行った。GRAS-Di 法については、ランダムな 3-bp を持つプライマーで PCR を行った。いずれも開発者の方法に従い、次世代シーケンサーの試料（ライブラリ）を調製した。その後、次世代シーケンサーを用いて塩基配列を決定し、その後、バイオインフォマティクス分析により多型を検出した。多型を検出する際には、既報のアカネズミのゲノム（NCBI: Aspe_assembly01）を参照ゲノム配列として利用することで、より多くの多型を検出することを試みた。分析の結果、MIG-seq 法では 11,205 SNPs が検出された。これらの多型を用いて、最尤法により系統推定したものが右図である。それぞれの島の個体群の単系統性に加えて、A から E までの島間の近縁性が明らかになった。これらの近縁性を古代河川とともに地図上に描くと下図のようになり、古代河川と一致した類縁関係が得られたことがわかる。

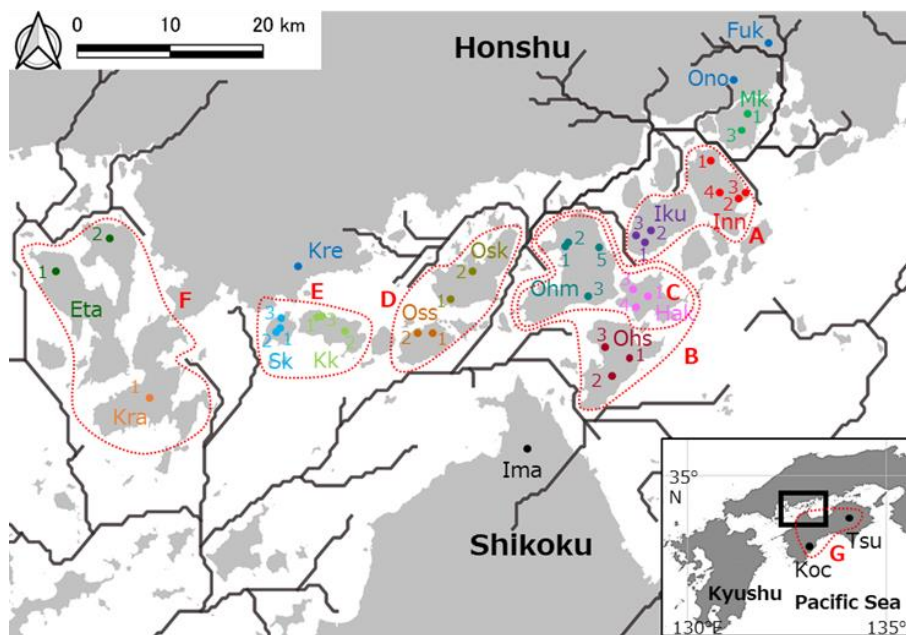


一方で、GRAS-Di 法による分析の結果、94,142 SNPs を検出することができた。上と同様に最尤法により系統樹を推定したところ、次ページの左上図のようになった。MIG-seq 法と比較して、多型の数が 8.4 倍に増加したことで、推定された系統関係も解像度のより高いものとなった。たとえば、MIG-seq 法で支持された因島-生口島クレードと大三島-伯方島-大島クレードが近縁となり、大崎上島-大崎下島クレードと神蒲刈島-下蒲刈島クレードが近縁となった。これらは次ページ下図に示すように古代河川と一致した関係性であり、古代河川である豊予川の本流によりその遺伝的分化を説明することができる。さらに、向島や江田島、倉橋島と本州との間には、古代河川が推定されていないが、これと一致して、系統関係においても、これらの島のアカネズミは本州の個体と近縁性を示した。四国については、愛媛、高知、徳島と広い範囲から収集



した個体の分析であったが、本州とは異なり、芸予諸島の島々の個体との近縁関係は示さず、四国の個体のみによる単系統を示した。以上の結果は、瀬戸内海西部を流れていた豊予川が島嶼域に生息しているアカネズミの遺伝的分化の形成に大きな役割を果たしたことを示唆する。

日本最大の内海である瀬戸内海がどのように形成されてきたのかは地質学的な記録からだけでは明らかとされてこなかった。本研究は、島に生息する生物の遺伝的分化という観点から地史に迫ろうとした初めての研究である。本研究においては、過去に流れていた古代河川の一つである豊予川と、芸予諸島に生息するアカネズミの系統関係との間に極めて高い一致性が見られた。このことは他地域においてもアカネズミの類縁関係から過去の地史に迫ることが可能であることを示唆するとともに、アカネズミ以外の生物についても瀬戸内海島嶼を舞台としてゲノムレベルでの分析を行うことで、瀬戸内海の地史が解明されることにつながることを期待される。



成果：

【学術論文】佐藤淳、木下豪太 (2020) 次世代シーケンズ時代の哺乳類学～初学者への誘い～. 哺乳類科学 60 (2): 307-318.

【学術論文】Sato JJ, Yasuda K (2022) Ancient rivers shaped the current genetic diversity of the wood mouse (*Apodemus speciosus*) on the islands of the Seto Inland Sea, Japan. Zoological Letters (in press).

【著書】佐藤淳 (2022) 第 I 部 進化. 哺乳類学 (小池伸介、佐藤淳、佐々木基樹、江成広斗 著). 東京大学出版会.

【学会】安田皓輝、森田奈々、大久保慎人、佐藤淳 (2021) 瀬戸内海島嶼におけるアカネズミの地理的遺伝構造. 日本哺乳類学会 2021 年度大会 (8 月 28 日、オンライン開催). 要旨集 p. 96.

【研究集会】佐藤淳 (2022) R3 年度 福山大学グリーンサイエンス研究センター成果発表会「第 2 世代シーケンサーで探る生態系・進化・健康」(福山大学、Zoom、2022 年 3 月 22 日)

【研究集会】安田皓輝、佐藤淳 (2022) MIGseq 法で探る瀬戸内海島嶼アカネズミの遺伝的分化. R3 年度 福山大学グリーンサイエンス研究センター成果発表会「第 2 世代シーケンサーで探る生態系・進化・健康」(福山大学、Zoom、2022 年 3 月 22 日、演者：佐藤淳)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato JJ, Yasuda K	4. 巻 in press
2. 論文標題 Ancient rivers shaped the current genetic diversity of the wood mouse (<i>Apodemus speciosus</i>) on the islands of the Seto Inland Sea, Japan.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 佐藤淳、木下豪太	4. 巻 60 (2)
2. 論文標題 次世代シーケンス時代の哺乳類学～初学者への誘い～	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 哺乳類科学	6. 最初と最後の頁 307-318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3106/ms2020-0033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安田皓輝、森田奈々、大久保禎人、佐藤淳
2. 発表標題 瀬戸内海島嶼におけるアカネズミの地理的遺伝構造
3. 学会等名 日本哺乳類学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小池伸介、佐藤淳、佐々木基樹、江成広斗	4. 発行年 2022年
2. 出版社 東京大学出版会	5. 総ページ数 402
3. 書名 哺乳類学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

佐藤淳（2022）R3年度 福山大学グリーンサイエンス研究センター成果発表会（第4回 NGSを学ぶ会）「第2世代シーケンサーで探る生態系・進化・健康」（福山大学、Zoom、2022年3月22日）

安田皓輝、佐藤淳（2022）MIGseq法で探る瀬戸内海島嶼アカネズミの遺伝的分化．R3年度 福山大学グリーンサイエンス研究センター成果発表会（第4回 NGSを学ぶ会）「第2世代シーケンサーで探る生態系・進化・健康」（福山大学、Zoom、2022年3月22日、演者：佐藤淳）

6．研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------