

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14519

研究課題名(和文) 海洋性動物プランクトンの「真の種の境界」を明らかにする

研究課題名(英文) Delimiting species in marine zooplankton using a molecular approach

研究代表者

平井 惇也 (Hirai, Junya)

東京大学・大気海洋研究所・助教

研究者番号：30762554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：動物プランクトンではミトコンドリアDNAの解析により、形態種内で複数の遺伝子グループが検出されることが多くある。一方、生殖隔離を判別するために必要な核DNAでは、一般的な遺伝子マーカーの進化速度が遅く、正確な種の判定が困難であった。そこで、複数のミトコンドリアDNAグループを有するカイアシ類 *Pleuromamma abdominalis* を用い、MIG-seqおよびRAD-seqを行いゲノム内の一塩基多型を網羅的に検出したところ、より正確に種の境界が班別が可能となることが明らかとなった。また、MIG-seqはPCRを伴う手法であり、小型でDNA量も少ない動物プランクトンに最適であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物プランクトンは種ごとに異なる環境適応能力を有し、分布域の変化などの環境変化に対する応答も種毎で異なる。そのため、動物プランクトンの種の境界を適切に把握することは、生態系の変化を理解する上で重要である。従来の遺伝子解析は母性遺伝をするミトコンドリアDNAの解析が一般的であり、正確な種の境界の把握は困難であった。一方、本研究は次世代シーケンサーを使用し、ゲノム内の一塩基多型を網羅的に取得し、より正確に動物プランクトンの種の境界が把握可能であることを示した。この成果は動物プランクトンの分類学に貢献するだけでなく、今後の生物モニタリングにも有用な情報を提供できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Species complexes with multiple genetic clades are frequently observed using mitochondrial DNA (mtDNA) markers in marine zooplankton. However, reproductive isolation among clades is not fully understood because of low sequence variations in common nuclear markers. In this study, I obtained genome-wide single nucleotide polymorphisms (SNPs) for delimiting species in marine zooplankton with multiple mtDNA clades. For marine copepod *Pleuromamma abdominalis* with sympatric mtDNA clades, SNPs were obtained by two approaches of MIG-seq and RAD-seq. Both approaches clearly revealed mtDNA clades with reproductive isolations, supporting high cryptic diversity in *P. abdominalis*. Although both MIG-seq and RAD-seq are useful for delimiting species, MIG-seq uses PCR-based approaches, which can be effective even for small zooplankton with low DNA amounts. Thus, MIG-seq can lead to appropriate measurements of species diversity in the ocean for small zooplankton in the ocean.

研究分野：プランクトン学 生物海洋学

キーワード：動物プランクトン 種多様性 一塩基多型

1. 研究開始当初の背景

動物プランクトンは海洋で優占する生物群であり、魚類の仔稚魚期の餌としても重要である。また、環境応答に迅速に反応することから、その群集構造の把握は海洋のモニタリングとしても有用な情報をもたらす。そのため、動物プランクトンを種レベルで正確に把握することは生態系の構造や変化を理解する上で重要である。

動物プランクトンは形態的特徴により種分類がされてきたが、近年遺伝子解析も積極的に取り入れられ、多くの未記載種の発見につながっている。動物プランクトンでは一般的にミトコンドリア DNA の遺伝子マーカー (COI 領域等) が利用されているが、形態種内で複数の遺伝子グループが検出されることが多くある。一方、生殖隔離を判別するために必要な核 DNA では、一般的な遺伝子マーカー (ITS、28S 領域等) の進化速度が遅く、ミトコンドリアグループ間の正確な種 (生物学的な種) の判定が困難であった。

2. 研究の目的

動物プランクトンで見られるミトコンドリア DNA のグループ間の生殖隔離や交雑を正確に判定するため、新規的な手法の開発が望まれる。近年、遺伝子解析技術の発展は目覚ましく、次世代シーケンサーを利用した一塩基多型の解析は集団構造の解析に広く用いられるようになり、この手法は交雑の有無により種 (生物学的種) を判定する手法としても活用されている。そこで、次世代シーケンサーを用いた一塩基多型の網羅的解析を動物プランクトンに導入し、正確に種の境界を判別する手法の開発を試みた。

3. 研究の方法

複数のミトコンドリア DNA のグループを有するカイアシ類 *Pleuromamma abdominalis* を対象とし、ミトコンドリア DNA COI 領域および次世代シーケンサーを用いた一塩基多型の解析を行った。試料は白鳳丸 KH-16-7 次航海に乗船し、同所的に *Pleuromamma abdominalis* のミトコンドリア DNA グループが検出される黒潮域で採集した。採集にはノルパックネットを用い、採集後は遺伝子解析が可能なエタノールに試料を保存した。実験室では各個体から DNA 抽出後、COI 領域を PCR で増幅を行い、サンガーシーケンスで配列を取得した。一塩基多型の解析は RAD-seq および MIG-seq を行った。次世代シーケンサーは Illumina NextSeq500 を用い配列を網羅的に取得後、インフォマティクスにより一塩基多型の検出を行った。得られた COI 領域および一塩基多型は系統解析を行い、結果を比較することで COI 領域のグループ間の生殖隔離および交雑を検証した。一塩基多型は STRUCTURE 解析を行うことでグループ間の交雑・生殖隔離を検証した。

4. 研究成果

COI 解析の結果、*Pleuromamma abdominalis* 32 個体から 6 つの遺伝子グループが検出された (図 1)。一方、一塩基多型の解析では RAD-seq、MIG-seq とともに 5 つの遺伝子グループが検出された。この結果、COI のグループ間で交雑および生殖隔離が存在することが示唆され、この結果は STRUCTURE 解析でも確かめられ、一塩基多型の網羅的解析はミトコンドリア DNA グループ間の生殖隔離や交雑を判定するのに有用であることがわかった。また、系統解析でグループを支持する Bootstrap 値も COI 領域に比べ、一塩基多型の解析のほうが高い値を示した。

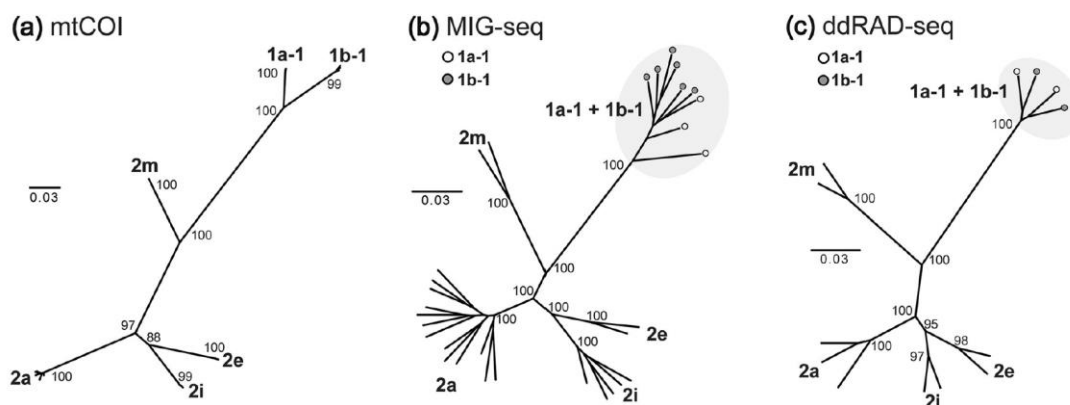


図 1. (a)COI 領域、(b)MIG-seq、(c)RAD-seq から得られた *Pleuromamma abdominalis* の系統解析結果。図は Hirai(2020)より引用。

COI 領域の遺伝的距離は種の境界の一つの指標となっているが、本研究により *Pleuromamma abdominalis* からは同レベル (COI の変異で約 7%) の遺伝的距離を示すグループ間で交雑、生殖隔離ともに検出された (図 2)。一方、十分な COI の遺伝的距離 (約 10%以上) を有するグループ間ではすべて生殖隔離が認められた。そのため、COI 領域の遺伝的距離が十分でない場合、COI の配列のみでは種の正確な班別は出来ず、本研究で用いたような一塩基多型の解析が有用であることが明らかとなった。また、RAD-seq は一塩基多型の検出で最も一般的に用いられており一塩基多型の検出率も高いが、RAD-seq には大きな DNA 量を要する。一方、MIG-seq は PCR を行う手法であり、DNA 濃度が低い小型の動物プランクトンにも問題なく適用可能であった。一塩基多型の検出も種の境界を判別するには十分な量が MIG-seq から検出されており、MIG-seq は動物プランクトンで特に有用な手法であると考えられた。実際、一塩基多型の解析は小型種 (*Acartia* 属および *Paracalanus* 属カイアシ類) にも適用されており、良好な結果が得られている。これらの結果から一塩基多型の網羅的解析、特に MIG-seq は将来的に動物プランクトンの種の境界を正確に把握する手法として活用可能であり、動物プランクトンの分類学や生態学に大きく貢献できると考えられる。また、動物プランクトンは種ごとに環境適応能力が異なり、正確な種の把握は海洋の生物モニタリングの高精度化にもつながると予想される。

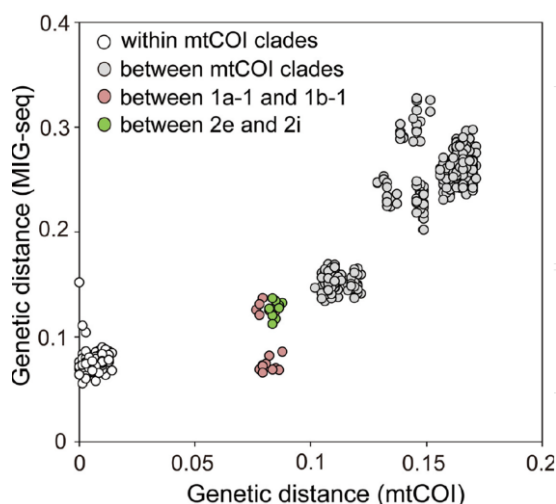


図 2. COI 領域および MIG-seq で得られた一塩基多型の遺伝的距離の比較。交雑が見られたグループ間の遺伝的距離がピンクで、生殖隔離が見られたグループ間の遺伝的距離はグレーまたは緑色で示されている。グループ内の遺伝的距離は白色で示されている。図は Hirai(2020)より引用。

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 2件）

1. 著者名 Junya Hirai	4. 巻 167
2. 論文標題 Insights into reproductive isolation within the pelagic copepod <i>Pleuromamma abdominalis</i> with high genetic diversity using genome-wide SNP data	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Biology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00227-019-3618-x	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 -

1. 著者名 Junya Hirai, Yoko Hamamoto, Daisuke Honda, Kiyotaka Hidaka	4. 巻 13
2. 論文標題 Possible aplanochytrid (Labyrinthulea) prey detected using 18S metagenetic diet analysis in the key copepod species <i>Calanus sinicus</i> in the coastal waters of the subtropical western North Pacific	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plankton and Benthos Research	6. 最初と最後の頁 75-82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3800/pbr.13.75	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 Hirai Junya, Tachibana Aiko, Tsuda Atsushi	4. 巻 15
2. 論文標題 Large-scale metabarcoding analysis of epipelagic and mesopelagic copepods in the Pacific	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0233189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0233189	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Junya Hirai
2. 発表標題 Insights into reproductive isolation within highly divergent copepod <i>Pleuromamma abdominalis</i> using genome-wide SNP data
3. 学会等名 Ocean Science Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirai J
2. 発表標題 Reproductive isolation in oceanic copepods revealed by genome-wide SNP data
3. 学会等名 PICES Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kodama T, Tawa A, Ishihara T, Hirai J, Oshimo S
2. 発表標題 Feeding habits and diet composition of the larval Pacific Bluefin tuna larvae in the two nursery grounds
3. 学会等名 4th CLIO TOP Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kume G, Kobari T, Ichinomiya M, Komorita T, Hirai J, Aita-Noguchi M, Hyodo F, Takeda T, Shigemura T, Kuroda H, Yoshinaga S, Nakaya K, Narumi A
2. 発表標題 The importance of the north Satsunan area, southern Japan as the spawning and nursery ground for small pelagic fish
3. 学会等名 PICES Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshinaga S, Kume G, Yamanoue K, Tanonaka N, Kobari T, Hirai J, Aita-Noguchi M, Hyodo F
2. 発表標題 The assemblages and feeding habits of larval fish in the Kuroshio and the adjacent waters, southern Japan
3. 学会等名 PICES Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sato I, Kobari T, Yoshinaga S, Kume G, Hirai J
2. 発表標題 Trophic sources and linkages of mesozooplankton and fish larvae in the Kuroshio based on metabarcoding analysis
3. 学会等名 PICES Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuroda H, Kume G, Kobari T, Takeda T, Ichinomiya M, Komorita T, Hirai J, Aita-Noguchi M, Hyodo F
2. 発表標題 Feeding habits of larval fish in the mouth of Kagoshima Bay, southern Japan
3. 学会等名 PICES Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagatomo Y, Takahashi K, Sado T, Miya M, Hashihama F, Horii S, Hirai J
2. 発表標題 Transpacific distribution of micronektonic fish community in the subtropical open water
3. 学会等名 PICES Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田大海・久米元・小針統・竹田力・一宮睦雄・小森田智大・平井惇也・相田真希・兵藤不二夫
2. 発表標題 鹿児島湾湾口部における魚類仔魚の摂餌生態
3. 学会等名 日本海洋学会秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉永尚平・久米元・山之上香織・田野中里佳・小針統・平井惇也・相田真希・兵藤不二夫
2. 発表標題 鹿児島県南部の黒潮周辺海域における魚類仔魚の群集構造と摂餌生態
3. 学会等名 日本海洋学会秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久米元・小針統・一宮睦雄・小森田智大・平井惇也・相田真希・兵藤不二夫・竹田力・重村太一・黒田大海・吉永尚平・中屋慧・鳴海敦
2. 発表標題 小型浮魚類の産卵場及び成育場としての北部薩南海域の重要性について
3. 学会等名 日本海洋学会秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日高清隆・平井惇也・鈴木光次
2. 発表標題 メタ18S解析による黒潮周辺海域表層の尾虫類の食性分析
3. 学会等名 日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------