

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06822

研究課題名(和文) 等脚目キクイムシ属の食性多様性と種分化および消化酵素系の適応

研究課題名(英文) Dietary diversity and speciation of Limnoria (Limnoriidae, Isopoda) and adaptation of digestive enzyme system

研究代表者

朝川 毅守 (Ohsawa A., Takeshi)

千葉大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：50213682

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)： 褐藻類から採集されたキクイムシの系統解析とSDAを行い、食性に対応した3つの系統に分かれ、各系統内で複数の系統に細分され、8 MOTUに分化していることが判明した。

祖先分岐点のホストと分布海域の推定を行い、太平洋にいたジェネラリストの祖先から、特定の科に特化した系統が分かれ、各系統の中で太平洋の東西や日本海で分化がおきていることが推定された。

消化酵素の解析の結果、ヘモシアニンが非常に高く発現し、糖質転運酵素ではGH7とGH16が多く発現していることが明らかになった。GH16には褐藻の同化産物であるラミナランを分解する酵素が含まれ、ラミナランの分解に適応して発現量が増大したと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

褐藻食キクイムシはこれまで1種しか知られていなかったが、本研究により新たに2種類が記載され、さらに6種が未記載である可能性が示された。これは海生等脚類の多様性の認識に大きく貢献できる。

また、特定の海藻への特化と、地理的隔離による褐藻食キクイムシの多様化の仕組みを明らかにしたことにより、海洋生物の進化要因の解明に大きく貢献した。

褐藻食キクイムシの消化酵素の解析は、食性転換の仕組みの解明に貢献し、バイオ燃料開発などの応用研究の基礎となることが期待される。

研究成果の概要(英文)： Limnoria (Isopoda) is one of the few metazoans that can decompose wood and cellulose using enzymes encoded by its own genes. In this study, I collected brown algae-eating Limnoria throughout Japan, and performed phylogenetic analysis, species delimitation analysis, ancestral distribution estimation, and RNA-seq of digestive enzymes.

Phylogenetic analysis and SDA revealed that they diverged into three clades corresponding to food habits and differentiated into 8 MOTUs. The algal host and the distribution area of the branch points were estimated. The common ancestor of brown algae-eating Limnoria was the generalist that live in the Pacific Ocean. The specialist clades feeding on the specific algae are diverged first. Then, diversification occurs by distribution area.

RNA-seq analysis of digestive enzymes clarified that hemocyanin is expressed very high, and that GH7 and GH16 were highly expressed among the CAZymes. High expression level of GH16 may be the adaptation to digest laminaran.

研究分野：多様性生物学

キーワード：Limnoria Limnoriidae Isopoda 食性転換 種分化 消化酵素

1. 研究開始当初の背景

節足動物、ワラジムシ目のキクイムシ属は、海洋中の材木の分解者として重要な生態的役割を持っていることや、自分の遺伝子にコードされた酵素を使って木材やセルロースを分解できる数少ない後生動物の一つであることから、植物遺体からのバイオ燃料の開発などの応用が期待されている分類群である。木材食種のリグニンやセルロースを分解する仕組みを解明する研究が進められており、リグニンの分解にヘモシアニンが関与すること、セルロースの分解に GH7 や GH9 などが深く関与していることが明らかになっている。

キクイムシ属の多くの種は木材食であるが、海草食や、海藻食の種も知られている。研究代表者は海草のスガモの根茎に住むキクイムシや、褐藻のアラメ属に住むキクイムシの解析を進め、ホストとなる海藻の種類や海域の違いにより、遺伝的分化が進んでいることを明らかにしてきた。

そこで、ホストの種類や海域による隔離によって多様な種が分化しているという仮説を考えた。さらに、褐藻食のキクイムシは、木材食のキクイムシと異なる糖質を利用しているため、異なる消化酵素を使っていると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、褐藻食のキクイムシに関して、日本全国で広く採集し、ホストとする海藻の種類や海域の違いに応じた遺伝的分化が進んでいるかどうかを明らかにし、ホストや海域の祖先状態を推定して種分化の要因を明らかにすることが一つの目的である。

さらに、褐藻食キクイムシの消化酵素の発現を解析し、糖質関連酵素の種類やヘモシアニンの発現量に変化がみられるかどうかを明らかにすることがもう一つの目的である。

3. 研究の方法

広く国内の海岸で褐藻類を採集し、その中に住むキクイムシを探索し、採集した。採集したサンプルについて、各採集地点の各ホスト海藻を網羅するように選んで、ミトコンドリアゲノムの COI および核ゲノムの 18SrDNA の配列を読み、系統解析と Species delimitation analysis (SDA) を行った。また、この系統樹に基づき sDIVA と BPM によって祖先分岐点のホストと分布海域の推定を行った。

消化酵素の解析では、褐藻のウミウチワをホストとする *Limnoria furca* をもちいて、30 個体を集積した全個体から RNA を抽出して RNA-seq 解析を行い、アセンブルと発現量解析ののち、BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) や dbCAN (<https://ccb.unl.edu/dbCAN/>) によりアノテーションを行い、ヘモシアニンおよび糖質関連酵素の種類や発現量を調べた。

4. 研究成果

(1)キクイムシの採集された地点および海藻：採集の初期段階で、アラメ属、カジメ属、コンブ属、ワカメ属、ウミウチワ属、ホンダワラ属の海藻に生息することが分かったため、各地でこれらの海藻を中心に採集し、キクイムシを探した結果、北海道から西表島に至る 34 箇所で見つけることができた (図 1)。一方海藻からキクイムシが見つけられなかった場所も多かった。

(2)系統解析：キクイムシは各地点・各海藻種から複数個体から DNA を抽出し解析に使用した。最終的に各地点で 1 から 18 個体を系統解析に使用した。COI 配列は合計 204 個体のキクイムシから得られ、配列長は 539bp であった。18S rDNA 配列は 144 個体から得られ、配列長は 1408bp であった。どちらの配列も得られたサンプルは 142 個体で、結合配列長は 1947bp だった。結合配列に関しては事前に行った Partition-homogeneity test において、 p value=0.001 (<0.01) であったため適切に両配列を結合した。結合データに基づく系統樹では、3 つの単系統群に大きく分かれ、それぞれの単系統群は *L. nagatai*, *L. furca*, および本課題で記載された *L. aspera* を含む (図 2)。それぞれの単系統群は、さらにいくつかの単系統群に分かれている。

(3)Species delimitation analysis (SDA)：動物の SDA で一般的に使用される、COI 配列による解析により、8~9 の MOTU に分割された (図 3)。単一閾値モデル GMYC 解析では、9 つの MOTU が示唆された。bPTP 法を用いて推定した MOTU の数は 6 から 26 個であったが、その中から BS 値が最も高いものは 8 群であった。mPTP においても、同様に 8 の MOTU が示された。ABGD 解析では最大の種間分岐の初期分割に基づいて、合計 8 種の種が示唆された。コンセンサスとして 8MOTU に分割することが適切と考え、以下の解析はここで示された 8MOTU に基づいて解析を行っている。

各 MOTU に関して、分布域と採集された海藻種を図 4 と図 5 に示す。各 MOTU 分布域は、以下のようである。*L. nagatai* と 1-1, 1-2 を含む系統は太平洋側に限られ、*L. nagatai* は九州の東海岸。1-1 は伊豆半島から東北南部、1-2 は四国と紀伊半島の南東部の海岸で確認された。*L. furca* は九州から京都府にかけての日本海沿岸で確認された。*L. furca* と単系統群を形成する 2-1 と 2-2 について、2-1 は北海道の日本海側と太平洋側で確認され、2-2 は本州、四国、九州の太平洋沿岸から広く確認された。*L. aspera* は関東から九州にかけての太平洋側から確認され、*L. aspera* の姉妹群である 3-1 は日本海全域に加え、北海道の太平洋側と西表島で確認された。採集された海藻種を見ると MOTU ごとに海藻種に偏りがあるように見える。*L. nagatai* と 1-1, 1-2 はいずれもほとんどのサンプルがレソニア科から採集された。*L. aspera* と姉妹群であ

る 3-1 はいずれもほとんどのサンプルがホンダワラ科から採集された。 *L. furca* および近縁な 2-1 と 2-2 については、特定の科に偏る傾向が少なく、 *L. furca* はレソニア科とアミジグサ科とホンダワラ科から、 2-1 はチガイソ科とコンブ科から、 2-2 はアミジグサ科とチガイソ科とホンダワラ科から採集された。各 MOTU の分布と生息する海藻には偏りがあり、海域や海藻の棲み分けが種分化や多様性の維持に貢献している可能性が示唆される。

(4) 祖先分岐点のホストおよび海域の推定：各サンプルが採集された海藻をホスト海藻と考え、生物地理学的解析を行った結果 (図 6a), 8MOTU の共通祖先の段階 (I) では、色々なホストに生息するジェネラリストである可能性が高く推定された。(I) から二つの系統に分かれるが、 *L. aspera* と 3-1 の共通祖先 (VII) はホンダワラ科をホストとする可能性が高く推定され、その他の共通祖先 (II) はジェネラリストである可能性が高く推定された。(II) から二つの系統に分かれるが、 *L. nagatai*. 1-1, 1-2 の共通祖先はレソニア科をホストとする可能性が高く推定され、残りの共通祖先 (V) はジェネラリストである可能性が高く推定された。(V) のなかは、 *L. furca* の共通祖先と 2-1 の共通祖先は複数の海藻をホストとし、 2-2 はアミジグサ科をホストとする可能性が高く推定された。全体的に系統分化の流れを追うと、ジェネラリストの祖先から、ホンダワラ科をホストとする系統、レソニア科をホストとする系統、アミジグサ科をホストとする系統が順番に分かれたと推測される。

各サンプルの分布海域について生物地理学的解析を行った結果 (図 6b), 系統樹の基部近くの祖先分岐点 (I, II, III) はいずれも太平洋の可能性が高く推定された。 *L. nagatai*. 1-1, 1-2 の共通祖先 (III) は、太平洋全域と推定され、この系統の中で太平洋東部の 1-1 と西部の *L. nagatai*. および 1-2 の系統に分かれる。 *L. furca*, 2-1, 2-2 の共通祖先は太平洋と日本海を含む広い海域が高く推定された。この系統の中で、 *L. furca* と 2-1 の共通祖先は日本海から北海道の海域が、 2-2 は太平洋に分布する可能性が高く推定された。 *L. aspera* と 3-1 の共通祖先は太平洋の可能性が高く推定された。この中で *L. aspera* は太平洋のまま、 3-1 は沖縄から日本海に広がり、沖縄の系統と日本海の系統に分かれた可能性が高く推定された。

祖先ホスト推定と海域推定を合わせると、大きな 3 系統の分化はジェネラリストからホンダワラ科およびレソニア科のスペシャリストへの分化が大きく寄与し、3 系統内は太平洋から他海域への分散や太平洋内での東西の棲み分けが主に寄与していると推定される。

(5) 消化酵素の解析：キクイムシ属は内在性の酵素でセルロースや木材を分解することが知られており、木材食の種において、ヘモシアニンがリグニンの分解に、糖質関連酵素の GH7, GH9 がセルロースの分解に関与し、高発現していることが知られている。本研究では褐藻を食べている *L. furca* を用いて解析を行った。ヘモシアニンの発現量を糖質関連酵素の発現量を見ると (図 7), ヘモシアニンが非常に高く発現していることがわかる。木材食のキクイムシではヘモシアニンがリグニンをはがして、糖質関連酵素がセルロースにアクセスしやすくなると考えられているが、 *L. furca* が食べている褐藻類ではリグニンの含有量は少なく、リグニンに対する重要な働きを行っているとは考えにくい。しかしヘモシアニンの発現量は木材食キクイムシと比較してもより多いとみられ、何らかの重要な働きをしているものと考えられる。

糖質関連酵素では GH (glycoside hydrolase) が高く発現し、他はあまり発現していない (図 7)。GH の内訳をみると (図 8), GH7 の発現量が圧倒的に多く、次いで GH16 が多く発現している。木材食のキクイムシで最も高発現している GH9 はほとんど発現しておらず、グラフのその他に含まれる。木材の分解では、GH7 と GH9 により、セルロースが分解される。褐藻にはほとんどセルロースは含まれないため、GH9 がほとんど発現しないことは説明しやすいが、GH7 が高発現する理由は説明しにくい。GH7 のみでわずかにあるセルロースを分解しているか、もしくは他の糖質を分解しているものと考えられる。次いで発現量の多い GH16 は、木材食のキクイムシではほとんど発現していない。GH16 には褐藻の同化産物であるラミナランを分解する酵素が含まれ、ラミナランの分解に適応して発現量を増大させたと考えられる。

木材食と海藻食のキクイムシでは消化酵素の発現量に違いが見られるが、持っている酵素自体にはあまり差が無い様である。食物の変化への適応は新たな酵素の獲得などではなく、既存の酵素の発現量の変化で対応している可能性が高く、比較的簡単に適応できる可能性が示唆された。木材食や海藻食や海草食のキクイムシは世界中で観察されており、それぞれの食性が一回進化したか多数回進化したかわかっていない。既存の遺伝子の発現量の変化で適応できるなら、食性が並行的に進化することも容易であると推測される。キクイムシの食性の進化と適応を明らかにするためには、世界各地のサンプリングによる系統解析と、消化酵素の解析が必要である。



図1, サンプルング地点 (近接する地点は省略している)

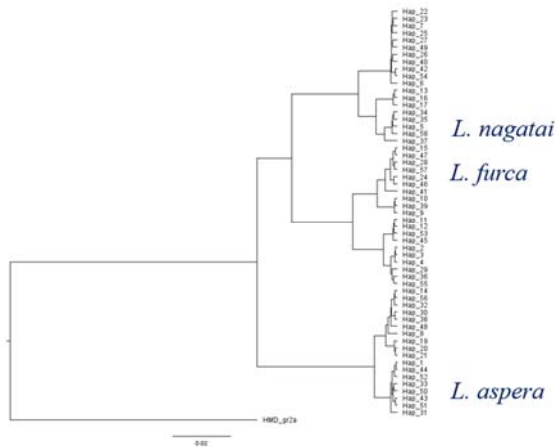


図2, 結合配列データに基づく系統樹

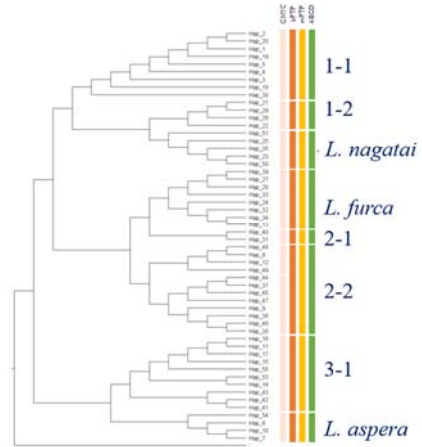


図3 COI 配列に基づく SDA 解析結果

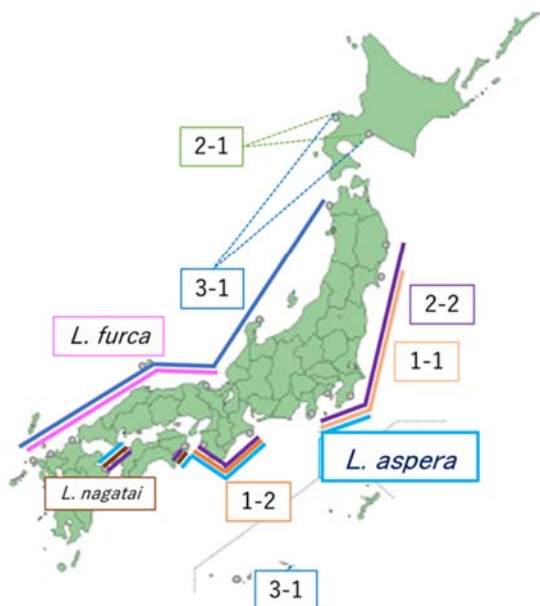


図4 各 MOTU の分布域



図5 各 MOTU が採集された海藻

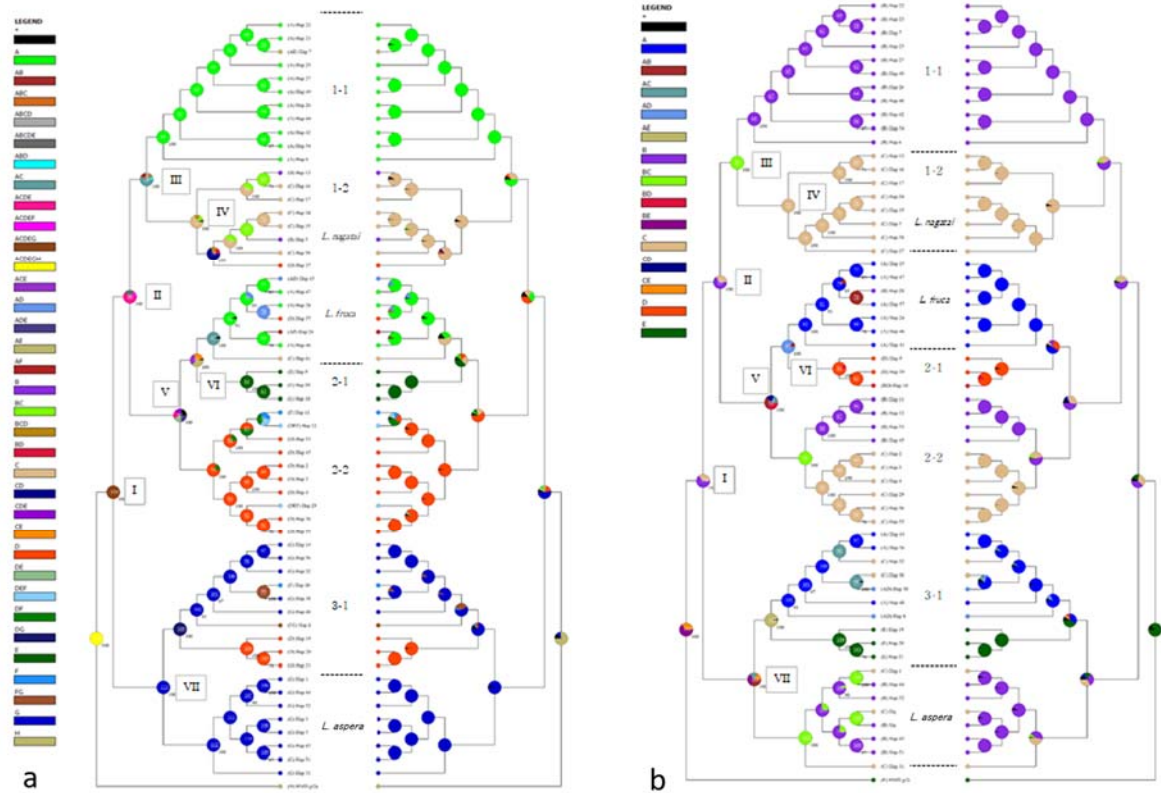


図6 祖先ホスト(a)および祖先海域の(b)の推定

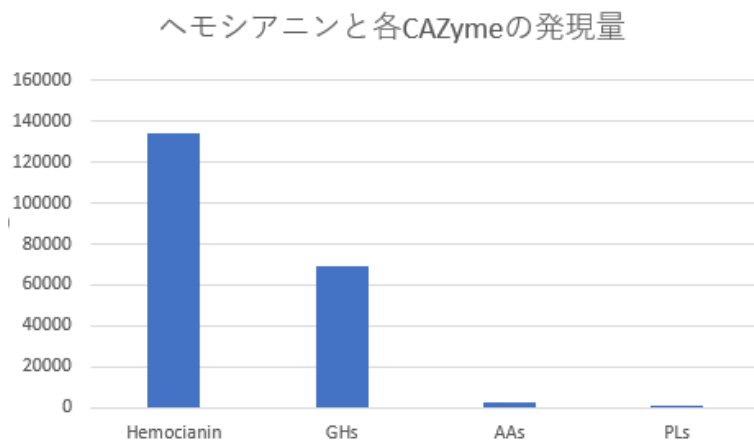


図7 ヘモシアニンと各 CAZyme の発現量

Glycoside Hydrolase の発現量

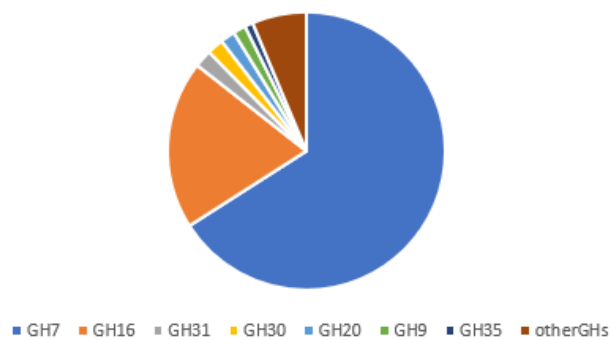


図8 主なGHの発現量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 YOSHINO HIROKI, KAMBARA YURIKO, KAJIWARA SHOTA, OHSAWA TAKESHI A.	4. 巻 4970
2. 論文標題 New species of Sargassum-boring Limnoria Leach, 1814 (Crustacea, Isopoda, Limnoriidae) from Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zootaxa	6. 最初と最後の頁 119 ~ 130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11646/ZOOTAXA.4970.1.4	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉野広軌・朝川毅守
2. 発表標題 千葉県沿岸に生息するキクイムシ（等脚目・キクイムシ科）の多様性
3. 学会等名 千葉県生物学会
4. 発表年 2022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
---------	---------