

平成22年6月15日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20780139

研究課題名（和文）魚類資源における日本海—太平洋間の適応的分化の検出：エコゲノミクス解析

研究課題名（英文）Detection of adaptive divergence between the Japan Sea and Pacific Ocean lineages for a fish: ecological genomic analysis

研究代表者

小北 智之（KOKITA TOMOYUKI）

公立大学法人福井県立大学・海洋生物資源学部・講師

研究者番号：60372835

研究成果の概要（和文）：海洋環境における種内の適応的分化を検出することを目的に、日本列島に広く分布する遡河回遊魚シロウオをモデル系とした集団ゲノム学的解析を行った。本種には、日本海集団と太平洋集団の間に対照的な表現型分化が存在するが、多数のマイクロサテライトマーカーと形質変異の候補遺伝子マーカーを用いたゲノムスキャンを実施したところ、日本海集団のゲノム中に正の自然選択の痕跡が存在することが強く示唆され、両集団の間には適応的な分化が生じていると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Population genomic analyses were conducted using the anadromous fish *Leucopsarion petersii* as a model system to detect adaptive divergence among populations within a single species in marine environments. Genome scan using many microsatellites and candidate gene markers revealed that there were genomic signatures of positive selection in the Japan Sea lineage of this species. Thus, it is strongly suggested that adaptive divergence have occurred between the Japan Sea and Pacific Ocean lineages of this species.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：適応的分化、局所適応、自然選択、魚類、海洋生態系、エコゲノミクス

## 1. 研究開始当初の背景

自然集団の適応的分化(自然選択による適応的な集団分化)に関与した遺伝子“適応遺伝子”の探索は、近年の生物学の技術革新によってアプローチが可能となった生態学・集団

遺伝学・進化生物学上の重要課題であるのに加えて、水圏における集団特異的適応遺伝子の同定は、水圏遺伝資源の探索や資源生物の地域集団の管理・保全と関連した水産学上の重要課題でもある。これまで、全ゲノム情報

が利用できない生物や、複数世代の交配実験が困難な生物における適応遺伝子のスクリーニングは困難であったが、近年のゲノム科学的手法の発展に伴い、このような非モデル生物でも適用可能な方法が開発されており、主に陸上植物を中心に研究が進んでいる。ほとんどが非モデルと言える水産生物においても、集団特異的な適応遺伝子の探索はもはや夢物語ではない。

## 2. 研究の目的

研究代表者は水圏、特に海洋の自然集団の適応的分化にアプローチする絶好のモデル系として、日本海-太平洋間の遺伝的変異、に注目してきた。日本海は過去の氷期・間氷期サイクルによる気候変動の影響を顕著に受けた代表的な水域であり、特に、最終氷期最盛期には極端な海水準の低下による外側海域との分断化が生じ、低水温化・低塩分化などの大きな環境変動を経験したとされている。このような氷期の寒冷化を含む歴史的変動環境の中で日本海集団固有の適応進化は生じたのかを、日本各地で春告魚として珍重されているハゼ科の遡河回遊魚シロウオ *Leucopsarion petersii* をモデル系として研究を進めてきた。本種には、日本海型と太平洋型といった2つの地理的集団が存在し、個体の適応度に関与していると考えられるいくつかの表現形質（体サイズ・腹椎骨数といった形態形質、低温耐性・摂餌活性といった生理形質など）に対照的な遺伝的分化が生じていることが明らかにされている。それでは、このような集団間に海域特異的な適応進化は生じたのだろうか？本研究では、多数のマイクロサテライト（STR）マーカーと形質変異の候補遺伝子マーカーを用いたゲノムスキャンによる自然選択スクリーニング（集団ゲノミクス解析）によって、シロウオ2型における適応的分化の痕跡をゲノム中に探索することを目的とする。

## 3. 研究の方法

集団ゲノミクス解析のために、シロウオのゲノムライブラリーから大量に単離したSTRの中から、合計100マーカーを作成し、そのジェノタイピングを行った。ジェノタイピングには、青森県鱒ヶ沢町と福井県敦賀市からの日本海型2集団と静岡県静岡市と和歌山県那智勝浦町からの太平洋型2集団を用い、各集団当たり48個体を解析に用いた。これら4集団の集団構造の解析結果を簡単に述べると、日本海型集団と太平洋型集団の間に相対的に大きな遺伝的分化があり、それぞれの型内の集団間にも相対的に小さな遺伝的分化が存在するというものである。

このようなSTRマーカーに加えて、シロウオ2型間に存在する表現型変異の中でも、体

サイズの変異に関与する可能性が強く示唆される成長速度と摂餌活性の遺伝的変異に着目し、その候補遺伝子群をゲノムスキャンに用いた。候補として選定した遺伝子群の中で、今回、GH/IGF-1軸の成長関連遺伝子群と摂餌行動を亢進することが知られている亢進性食欲関連遺伝子群の合計7遺伝子をゲノムスキャンに組み込んだ。これらの遺伝子では、発現組織から抽出したmRNAを用いて、縮重プライマーや遺伝子特異的プライマーによるcDNAクローニングを行った後、それら遺伝子の非翻訳領域やゲノムDNAの解析によって塩基配列情報を得たイントロンに多型部位を探索し、多型マーカー化（STR、ミニサテライト、インデル）した。STR100マーカーと候補遺伝子マーカー7マーカーの合計107マーカーの192個体分のジェノタイピング結果をゲノムスキャンに供した。

集団間比較におけるゲノムワイドな統計量の分布からのアウトライアー遺伝子座の探索には、2つのアプローチを用いた。まず最初に、 $F_{ST}$  ベースのゲノムスキャンを実施した。この方法は、集団間の遺伝的分化の指標として  $F_{ST}$  を利用し、そのゲノムワイドな分布パターンからアウトライアーとなるDNAマーカーをシミュレーションによって検出するもので、集団特異的な適応進化に関与した遺伝子とその近傍領域は、中立的なゲノムワイドな領域よりも遺伝的分化レベルが高くなるという現象を利用している。実際の解析には、hierarchical island model を用いた方法 (Excoffier *et al.* 2009) と Bayesian logistic regression model を用いた方法を用いた (Foll & Gaggiotti 2008)。 $F_{ST}$  ベースのゲノムスキャンにおいては、正の選択を受けた候補遺伝子座 ( $F_{ST}$  がゲノムワイドパターンよりも高い方向に外れ値となる) と平衡選択を受けた候補遺伝子座 ( $F_{ST}$  がゲノムワイドパターンよりもより低い方向に外れ値となる) を理論的には検出可能である。しかし、解析に用いたSTRマーカーは、SNPやAFLPといったゲノムスキャンによく用いられる他のマーカーよりも多型性が極めて高く、このような高い突然変異率を持つマーカーを使った場合、検出された平衡選択の候補遺伝子座には擬陽性の可能性が高まるため、今回は正の選択のみを解析の対象とした。

次に、集団内の遺伝的多様性レベルの集団間比較を基にしたゲノムスキャンを行い、適応候補遺伝子座を絞りこんだ。このアプローチには、STRマーカーを用いたゲノムスキャンに適した方法の一つである Ln RH test (Schlotterer 2002) を用いた。この方法は、DNAマーカーの集団内遺伝的多様性の違いを示す統計量 (Ln RH) のゲノムワイドな分布パターンからアウトライアーとなるマーカーを検出するもので、集団特異的な適応進化

に關与した遺伝子とその近傍領域は、集団特異的に遺伝的多様性が一掃されるため (“selective sweep”)、Ln RH の絶対値が中立的なゲノム領域の値よりも高くなるという現象を利用している。Ln RH test において、日本海集団 2 集団と太平洋集団 2 集団で 4 通りのペアワイズ解析を行い、すべての解析でアウトライアーとなる遺伝子座を探索した。

#### 4. 研究成果

日本海集団と太平洋集団の比較において、2 つの方法のいずれにおいてもアウトライアー遺伝子座として検出されたのは、解析遺伝子座の約 10% であった。この中には、魚類においても成長を促進する作用を持つことが知られている成長ホルモン (GH) 遺伝子と食欲亢進性作用を持つことが知られているニューロペプチド Y (NPY) 遺伝子が含まれていた。次に、集団内の遺伝的多様性レベルの集団間比較を基にしたゲノムスキャンを行い、適応候補遺伝子座を絞りこんだ。その結果、NPY 遺伝子と 3 個の STR マーカーがアウトライアー遺伝子座と判定された。これらのアウトライアー遺伝子座は、すべて先の  $F_{ST}$  ベースの解析においても、アウトライアーとなった遺伝子座であった。使用した全マーカーの平均値としては、アリル数や平均ヘテロ接合度の期待値 ( $H_e$ ) は 4 集団間にほとんど違いは認められなかったが、これらのマーカーにおいては日本海集団で遺伝的多様性が極めて低かった。このような現象は、このマーカーの近傍にある何らかの遺伝子に自然選択が作用し、ヒッチハイクによる遺伝的多様性の減少、つまり selective sweep によって生じていると考えられる。また、NPY 遺伝子を含めたアウトライアー遺伝子座のすべてで、日本海型集団に遺伝的多様性の減少が起こっていることが明らかになった。このことは、日本海型のゲノム中により最近の正の選択を受けた領域が存在することを意味しており、検出されたアウトライアー遺伝子座は、日本海型の適応進化に關与した適応遺伝子座であることを強く示唆している。このように日本海側の集団と太平洋側の集団間における適応的分化の存在がエコゲノミクス解析によって初めて明らかとなった。シロウオ日本海型と太平洋型の分化は最終氷期よりも前に起こり、日本海型は、生息域が生存に厳しい環境となった複数の氷期をレフュージアで乗り切ったことが示唆されているため、日本海型の持つ形質群は日本海環境と言う歴史的変動環境下のもとで適応進化してきたと考えられる。今後、NPY 遺伝子の遺伝子発現量の集団間比較を実施するとともに、トランスクリプトミクス解析によって発現量が異なる遺伝子群を網羅的に探索し、そのよう

な遺伝子群をゲノムスキャンに組み込むことによって、日本海型の適応進化に關与した適応遺伝子群を検出していく必要がある。

陸上植物においては、日本海側と太平洋側で積雪量の違いに対応した適応的な集団分化や種分化が認められることが古くから知られており、日本海側に特有な植物群は“日本海要素”と呼ばれている。一方、海域においても、日本海内への地理的隔離が特異な表現型進化を生みだし、ひいては種分化を引き起こす可能性も示唆されている。世界的に見ても、第四紀に劇的な環境変動を経験した日本海は系統地理学の研究に興味深い地域であることは既に言われてきたが、集団間や近縁種間の適応的分化へのアプローチにとっても非常に興味深い地域であると考えられ、今後の研究の進展が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 小北智之、山平寿智、自然集団の適応的分化の検出—モデル系としての日本在来魚—、月刊海洋、査読無、42 巻、2010、317–322
- ② 小北智之、歴史的変動海洋環境におけるシロウオ集団の適応的分化—エコゲノミクスからのアプローチ—、月刊海洋、査読無、42 巻、2010、353–362

[学会発表] (計 5 件)

- ① 小北智之、高橋明香、熊田裕喜、集団ゲノミクス解析によるシロウオ海域特異的適応遺伝子の探索、平成 22 年日本水産学会春季大会、2010 年 3 月 27 日、日本大学 (藤沢市)
- ② 小北智之、山平寿智、魚類研究における適応的分化の検出方法、年会シンポジウム「日本在来魚における適応的分化：その実態とエコゲノミクスへの展望」、2009 年度日本魚類学会年会、2009 年 10 月 12 日、東京海洋大学 (東京都)
- ③ 小北智之、変動環境下の適応進化：シロウオ日本海型と太平洋型を用いたゲノムスキャンから。年会シンポジウム「日本在来魚における適応的分化：その実態とエコゲノミクスへの展望」、2009 年度日本魚類学会年会、2009 年 10 月 12 日、東京海洋大学 (東京都)
- ④ 高橋明香、小北智之、シロウオ日本海型と太平洋型の適応的分化に關与した遺伝子座の探索：ゲノムスキャンを用いた解析、2008 年度日本魚類学会年会、2008 月

9月22日、愛媛大学（松山市）

- ⑤ 小北智之、海洋環境変化と生物の小進化、ワークショップ「人為的環境下における進化のメカニズム、及び保全策への応用」、第10回日本進化学会大会、2008年8月23日、東京大学（東京都）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小北 智之 (KOKITA TOMOYUKI)

公立大学法人福井県立大学・海洋生物資源学部・講師

研究者番号：60372835

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：