

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15879

研究課題名（和文）夜行性カエル類における視覚と体色の多様化プロセスの解明

研究課題名（英文）Diversification in vision and coloration in anurans

研究代表者

児島 庸介 (Kojima, Yosuke)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：90793026

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：カエル類を対象にトランスクリプトーム解析および核ゲノム決定を実施した。トランスクリプトーム解析では、機能遺伝子の塩基配列および発現パターンの種間変異や多様化のプロセスを明らかにした。また、一部の系統は他の系統よりも遺伝的に多様化していることが示唆され、表現型の多様化のメカニズムに関する有益な知見が得られた。核ゲノム決定では、約33億塩基対の質の高いゲノムアセンブリを再構築することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年では非モデル生物を対象にしたゲノミクス研究が比較的安価かつ簡便に行えるようになり、表現型の進化や多様化のメカニズムの理解が進んでいるが、両生類における研究の対象は一部の系統に限られていた。本研究の成果は、機能遺伝子の配列の多様性や表現型の多様化のメカニズムに関する新知見を提供することで、両生類の多様性の理解に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We conducted transcriptome analysis to clarify interspecific variation in the sequence of anuran functional genes, with results showing amino acid substitutions between species. Some lineages were suggested to be more genetically diverse than others, providing implications for the mechanisms of genotypic and phenotypic diversification. We also conducted de novo assembly of whole genome sequences to investigate the molecular basis of adaptive evolution, and a high-quality genome assembly was reconstructed.

研究分野：生態学、動物行動学、進化生態学

キーワード：両生類 適応進化

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

視覚は動物の主要な感覚の一つであり、採餌や繁殖など様々な場面で活用される。分子レベルでは、視覚情報(光)は網膜に存在する視物質で受容される。視物質はオプシタンパク質とレチナルからなり、レチナルが光に反応する。レチナル単体での吸収極大波長はおよそ 370 nm であるが、オプシタンパク質と結合した状態では感度がより長波長側にシフトする。長波長シフトの大きさはオプシタンパク質の種類によって異なっており、脊椎動物では、4 種類のオプシタンパク質が知られている。さらに、同じ種類のオプシンでも、特定のアミノ酸サイトに置換が起きると、視物質の感度が長波長あるいは短波長側にシフトすることが知られている。このようなアミノ酸置換は、環境適応において重要な役割を果たしている。例えば、海洋から淡水環境へと進出したさまざまな系統の魚類において、オプシタンパク質のアミノ酸置換とそれに伴う視物質の感度の長波長シフトが平行的に起きたことが知られている。淡水域では海洋よりも長波長の光が多いことから、視物質の感度の長波長シフトは淡水域の光環境への適応であると考えられている。近年の研究により、脊椎動物が持つオプシン遺伝子の配列がこれまで信じられていたより遥かに多様であることが明らかにされつつあり、脊椎動物の視覚システムは生物多様性や適応進化の研究において注目を集めている。

19 世紀半ばから 1980 年代にかけて、視覚に関する神経科学的研究が盛んに行われ、視覚の基本的なメカニズムに関する理解が進んだ。このような研究において、カエル類はモデル生物として重要な役割を果たしていた。しかし、20 世紀以降には、魚類など他の脊椎動物が視覚の研究のモデルとして中心となっている。カエルは高度に発達した視覚をもち、分類学的、生態的、生理的な多様性が高いことから、今後の視覚研究におけるモデルシステムとして有用な分類群である。

## 2. 研究の目的

7,000 種を超えるカエル類の中でのオプシン遺伝子の多様性は大部分が未解明である。本研究では、アオガエル科の視覚システム(網膜で発現するオプシンの配列および発現量)における多様性を明らかにすることを第一の目的とした。また、信頼性の高い系統樹を構築してアオガエル科における視覚の進化史を復元し、視覚と相関する生態的要因を明らかにすることを第二の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) サンプルング

フィールドワークを行い、アオガエル類を採集し、組織サンプルを取得した。フィールドワークは日本、マレーシア、ベトナム、台湾で実施した。本研究は国際共同研究として実施し、海外で調査を行う場合には、現地研究機関との協定に基づき ABS に関する手続きを踏んだ上で、法令を遵守して行なった。また、研究実施にあたっては京都大学動物実験倫理委員会の規定を遵守し、使用頭数は研究に必要な最小限の数に限定した。

### (2) 新規核ゲノム決定

アオガエル類が持つオプシン群遺伝子のレパートリを全て明らかにするため、1 種を対象に新規ゲノム決定を行った。組織は新たにサンプルングしたものをを用い、シーケンシングはロングリードシーケンシング(オックスフォード・ナノポア・テクノロジー)とショートリードシーケンシング(イルミナ)を実施した。新規ゲノムアセンブリには京都大学および東邦大学の大型計算機を使用した。

### (3) トランスクリプトーム解析

ゲノム中のどのオプシンが発現しているか、またその発現量を明らかにするため、網膜組織の RNA シーケンシングを実施し、各種のカエルが持つ全てのオプシン群発現遺伝子の塩基配列データを取得した。組織サンプルからトータル RNA を抽出し、抽出物のクオリティチェックを行なった。ライブラリ調製とシーケンシングは外注委託により実施した。シーケンシングで得られたリードをもとに新規アセンブリを行い、転写産物の塩基配列を網羅的に決定した。このトランスクリプトームアセンブリをもとに、発現しているオプシン遺伝子の配列を決定した。

## 4. 研究成果

### (1) サンプルング

トランスクリプトーム解析のための RNA シーケンシングに供する目的で、アオガエル科の 13 種の組織サンプルを取得した。また、核ゲノム決定のためのロングリードシーケンシングおよびショートリードシーケンシングに供する目的で、1 種の組織サンプルを取得した。

### (2) 新規核ゲノム決定

ロングリードシーケンシングに用いる長鎖ゲノム DNA を得るために実験条件を検討し、最終的に平均配列長 60,000 bp 以上のクオリティの高いサンプルを得ることができた。得られたサ

サンプルを用いてロングリードシーケンシングを行い、クオリティの高いゲノム決定に必要な十分なデータ量（ゲノムサイズの 50 倍以上）を得ることができた。また、全ゲノムショートリードシーケンシングを実施し、こちらについても十分なデータ量（ゲノムサイズの 50 倍以上）が得られた。大型計算機を用いたスーパーコンピュータを用いた新規アセンブリを約 33 億塩基対の質の高いゲノムアセンブリを再構築することができた。その結果、アオガエル科の種は他の両生類と同様にゲノム中に 4 種のオプシン遺伝子を持つことが確認できた。また、適応の遺伝基盤についての解析が可能となった。この成果について、国際学術誌に投稿する論文原稿を準備中である。

### (3) トランスクリプトーム解析

トランスクリプトームアセンブリ中から他の両生類が持つオプシン遺伝子の配列と相同性の高い配列を検索した。その結果、全てのサンプルについて、4 種全てのオプシン遺伝子と相同性の高い配列が取得できた。これらの配列と GenBank から取得した両生類のオプシン遺伝子の配列を用いて最尤法による系統推定を行なった。その結果、4 種のオプシン遺伝子と今回取得した配列が 4 つの単系統群を形成した（図 1）。このことから、解析に用いた全ての種について、4 種のオプシン遺伝子の配列が決定できたと考えられる。決定した配列を種間で比較したところ、全てのオプシン遺伝子について、種間でアミノ酸置換を起こす塩基置換が確認された。そのうちの一部は、機能的に重要なアミノ酸サイトにおける変異であった。4 つのオプシン遺伝子の相対的な発現量のパターンは種間で共通しており、RH1 が最も多く、次いで、SWS2, LWS, SWS1 の順に発現量が多かった。

トランスクリプトーム解析で得られた発現遺伝子の配列を用いて、種の系統樹の再構築を行なった。系統解析に用いるデータを得るために、相同遺伝子を同定する解析を行なった。しかし、計算量が非常に多く解析に長い時間を要したため方針を変更し、一塩基多型に基づく解析を行った。その結果、核・ミトコンドリアの複数領域を用いた先行研究の系統樹と矛盾しない樹形の系統樹が得られた。この系統樹を用いた解析の結果、オプシン遺伝子は全体としては純化選択を受けている一方で、一部の領域は多様化選択を受けたことが示唆された。また、一部の系統は他の系統よりも強い多様化選択を受けたことが示唆された。生息環境などの違いがオプシン遺伝子の多様化と関連している可能性がある。以上の結果について国際学術誌に投稿する論文原稿を準備中である。



図 1. オプシン遺伝子の系統樹

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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			
マレーシア	サラワク州森林公社	サラワク州森林局		
ベトナム	ベトナム科学技術アカデミー			