

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580250

研究課題名(和文) 水産重要種カワヤツメの性成熟制御機構解明のための分子生態学的アプローチ

研究課題名(英文) Ecogenetic studies for the elucidation of the regulatory mechanisms in lamprey maturation.

研究代表者

山崎 裕治 (Yamazaki, Yuji)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・准教授

研究者番号：30332654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：水産重要資源であるヤツメウナギ類の資源管理・保全を目的として、分子生態学的手法を用いた性成熟制御機構の解明を目指した。分子遺伝学的解析の結果、正の淘汰を受けた遺伝子領域の存在が示唆され、そこに含まれる機能遺伝子の転写調節に影響をもたらすことが期待される構造変異の存在を明らかにした。また、生態調査を加えることで、性成熟制御に関わる成長や脂肪蓄積に、餌資源が重要な要因となっていること、および資源維持には、集団間の交流が必要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Ecogenetic researches have been conducted in order to elucidate regulatory mechanisms of lamprey sexual maturation. Outlier tests for microsatellite loci indicated that a significant signature of directional selection could be detected in one microsatellite locus. Based on homology search, this locus was estimated to be located near the vasotocin precursor gene, which plays an important role in osmoregulation. Additionally, genetic variation was detected in the transcriptional regulatory region of this locus. Culture experiment of larval lamprey showed suitable growth patterns under sufficient and nutritious bait condition. Furthermore, for lamprey resource management, unconstrained gene flow across all populations should be maintained. Life history differences in lampreys have resulted from habitat difference in adult phase, which have probably led to recent natural selection on gene responsible for osmoregulatory functions.

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：ヤツメウナギ 性成熟 マイクロサテライトDNA 淘汰 パソトシン 遺伝的集団構造 資源管理

1. 研究開始当初の背景

近年、開発による生息・繁殖地の減少や温暖化による環境変化に伴う生息範囲の変化が、水産有用魚種においても指摘され、資源減少に至る事例も少なくない。そのような有用魚種に対して、積極的な資源管理・回復が必要となるが、そのための基礎情報としての遺伝的集団構造および基礎技術となる繁殖生態や繁殖（特に性成熟）の制御機構については、多くの魚種において未解明である。

カワヤツメ (*Lethenteron camtschaticum*) は、無顎類に属し、日本列島北部を中心に水産重要魚種として扱われている。一般に本種は遡河回遊型の生活史を有するが、東北地方の河川において、ダム上流部に陸封され、河川型の生活史を持つ集団の存在が申請者らの研究により明らかになっている。このカワヤツメにおいて、近年の資源量減少が著しく、資源管理・回復が求められている。この問題を解決するために、申請者はこれまでにカワヤツメをはじめとするヤツメウナギ類における遺伝的集団構造、繁殖形質、そしてハビタット利用などに関する幅広い研究を行っており、ヤツメウナギ類における自然史の一端を明らかにしてきた。

一方、ヤツメウナギ類の性成熟を制御する機構については、申請者が、科研費・若手(B)研究(H20~21)において、取り組んできた。その中で、遺伝的集団構造の推定や性成熟に関与する遺伝子の存在が示唆されたが、いずれも解析範囲が限定されており、性成熟制御について詳細の解明には至らなかった。そのため、解析対象集団の拡充や候補遺伝子の詳細な構造解析、そして解析遺伝子領域を拡げた解析などが求められている。特に、性成熟に関与する遺伝子については、異なる生活史に関連した淘汰を受けていることが予想され、淘汰の検出が近年注目されている。また、性成熟に対する生態要因や遺伝的集団構造に関する解析においても、近年発達している手法を取り入れた解析が求められている。

これらのことから、ヤツメウナギ類における性成熟制御を解明するためには、近年盛んに取り組まれている分子遺伝学的アプローチと、実際に自然界で生じている現象を解き明かす生態学的なアプローチとの融合研究をさらに発展・実施することが必要である。

2. 研究の目的

ヤツメウナギ類における性成熟制御機構を解明するために、異なる空間スケールにおける遺伝的集団構造の解明、性成熟の調節・決定に関与する遺伝子の探索と構造解析およびそれら遺伝子の発現とそれを制御する環境要因（生態学的要因）の解明を目指す。

(1) 資源管理のための河川内および河川間における遺伝的集団構造

水産上重要なヤツメウナギ類の資源管理を行う上での基礎資料として、異なる空間構造、すなわち河川内および河川間における遺伝的集団構造の把握が不可欠である。特に、河川内において、ヤツメウナギ類は初期発達から幼生成長期を過ごす。最近の研究では、河川内に設置された構造物が河川内移動を妨げ、その結果として集団の分断化、ひいては小集団化をもたらす、集団の存続を脆弱化していることが指摘されている。また、日本北部および東ユーラシア地域に分布を持つカワヤツメの資源動態を把握するため、分布域全域に渡る集団構造および集団間の遺伝子流動パターンの解明を行うことを目的として、高感度の多型性マーカーであるマイクロサテライト分析を実施した。

(2) 淘汰を受けている遺伝子座の探索と機能遺伝子の構造解析

同一種内において、異なる生活史が存在する場合、それら生活史に関わる形質およびそれを支配する遺伝子に対して、淘汰が働いていることが考えられる。自然淘汰の存在を証明するために、従来は野外観察や操作実験が行われることが多かった。一方最近では、遺伝的変異パターンに注目して、淘汰を受けている遺伝子座そのものを探索する技術が開発されている。しかし、淘汰を受けることが期待される機能遺伝子そのものは変異性が低い。そのため、自然淘汰を検出することは困難である。これに対してマイクロサテライト遺伝子座の変異性は高く、この遺伝子座そのものは淘汰的に中立であるが、隣接する機能遺伝子が自然淘汰を受けている場合、ヒッチハイク効果によってマイクロサテライト遺伝子座も同様の淘汰を受けることが予想される。

そこで本研究では、網羅的なマイクロサテライト遺伝子座の多型解析を行い、自然淘汰を受けているマイクロサテライト遺伝子座の周辺に存在する機能遺伝子を探索することを目的とした。また、そこで検出された機能遺伝子を対象として、その遺伝子発現の調整に影響を与える遺伝子構造解析を行い、異なる生活史間で比較した。

(3) 性成熟に関与する生態学的要因

ヤツメウナギ類の性成熟決定において、性成熟開始時期（年齢や季節）が個体や集団によって異なることが知られている。この調整においては、これまでに成長パターンの違いや体内における脂肪蓄積量が影響を与える可能性が指摘されている。しかし、それらを非侵襲的に調べる方法が確立されていなかった。そこで本研究では、成長に影響を与える要因の推定、および生体内脂肪量の推定方法の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 資源管理のための河川内および河川間における遺伝的集団構造

河川内における遺伝的集団構造

河川内における遺伝的集団構造を把握するために、幼生期にカワヤツメと同様の生活パターンを有すると考えられるスナヤツメ南方種を対象とした。本種について、富山県氷見市を流れる仏生寺川流域全域において、調査地点として設置した 17 箇所から個体を採集し、解析に供した。採集した個体については、鱗の一部を切除し、これを遺伝子解析のための標本とした。その後、個体は採集地点に放流した。また、一部個体については (3) の実験に供した。

遺伝的多型の検出において、高い多型性マーカーであるマイクロサテライト遺伝子座を対象とした。筆者らが報告した 4 つのプライマーセットを用いて、各個体の遺伝子型を推定し、地点間の遺伝的分化の程度および地点間における遺伝子流動量を推定した。

河川間における遺伝的集団構造

北日本および東ユーラシア地域に渡るカワヤツメの分布域のほぼ全域から採集された河川集団を解析に供した。遺伝的多型の検出には、既報の 7 つのマイクロサテライト遺伝子座を対象とした。河川集団間における遺伝的分化の程度を算出すると同時に、ベイズ推定に基づく集団構造解析を行った。また、河川集団間における遺伝子流動量を推定し、集団間における遺伝子流動モデル(回遊モデル)を最尤推定法に基づき求めた。

(2) 淘汰を受けている遺伝子座の探索と機能遺伝子の構造解析

淘汰を受けている遺伝子座の探索

ヤツメウナギ類の性成熟の制御に関与し、かつ淘汰を受けている機能遺伝子を探索するために、当該遺伝子周辺に配置されているマイクロサテライト遺伝子座に注目した。すなわち、複数のマイクロサテライト遺伝子座を選定して、アリル組成を遺伝子座間および異なる生活史を有する集団間で比較することによる自然淘汰パターンを推定、特に方向性淘汰を受けているマイクロサテライト遺伝子座を検出した。

解析集団として、水産重要種カワヤツメにおいて一般的な遡河回遊型集団とダム上流部に隔離された河川型集団とを比較研究に用いた。マイクロサテライト遺伝子座としては、上記(1)で用いた領域に加えて、類似生物で報告されている領域を解析に供した。それぞれの集団間において遺伝的組成を把握した後、複数の解析プログラムを用いて、中立仮説から大きく逸脱した遺伝子座(アウト라이어遺伝子座)の検出を行い、自然淘

汰を受けていることが推定された遺伝子座についてホモロジサーチを行い、近傍に座位する機能遺伝子を探索した。

機能遺伝子の構造解析

において、自然淘汰を受けていることが推定された機能遺伝子を対象として、塩基配列・構造解析を行った。特に、配列上流側のプロモーター領域における特異構造の検出と変異の比較を行った。

(3) 性成熟に関与する生態学的要因

ヤツメウナギ類において、性成熟を制御する生態学的要因を明らかにするために、飼育条件下における幼生の成長パターンを調べた。この際、複数の実験水槽を設置し、異なる餌を与えた。餌として、生息地から採取したリター、藻類、そして人工餌料を与えた。定期的な体サイズ計測を行い、成長追跡を行った。

同時に、個体を傷つけることなく体内の脂肪蓄積量を知るために、近赤外線分光分析法を応用した脂肪含有量測定法の開発を目指した。計測機器として、ハンディタイプ近赤外分光分析器 FQA - NIR GUN を用いた。

4. 研究成果

(1) 資源管理のための河川内および河川間における遺伝的集団構造

河川内における遺伝的集団構造

仏生寺川水系において、調査した 17 地点のうち、11 地点でスナヤツメ南方種の生息が確認され、採集された合計 298 個体を用いて多型解析を行った。その結果、ほとんどの支流間において、有意な遺伝的分化の存在が示唆された ($F_{ST} > 0.074$, $P < 0.05$)。その原因として、河川内に設置された堰堤等の人工構造物や夏季に河川下流域に形成される温水域が、ヤツメウナギ幼生の移動(遺伝子流動)の妨げとなっていることが考えられる。

また、上流域に位置する地点においては、平均ヘテロ接合度の低下が示され、近親交配の進行が懸念される。以上のように、自由な交流の阻害は、ヤツメウナギ類の河川生活期における生息地あるいは繁殖地の分断・縮小や喪失をもたらす可能性を有しており、資源の維持管理を行う上では、これら障壁を排除することの重要性が示唆された。特に、従来の研究においても指摘されてきた人工構造物だけではなく、下流域の温水域も生物の遺伝子交流に負の影響をもたらしていることが明らかになった。

河川間における遺伝的集団構造

北日本およびロシア東ユーラシア地域から採集された 12 河川集団(合計 255 個体)を用いて多型解析を行った。集団構造推定の結果、ユーラシア大陸北東端に位置するアナ

ディール川集団が、他集団から遺伝的に分化していることが示唆された ($F_{ST} > 0.109-0.171$, $P < 0.05$)。また、ベイズ推定を行った結果、2つの遺伝的クラスターの存在が示唆され、日本周辺の河川集団においては、クラスター1に由来する個体が高頻度で出現したのに対して、アナディール川集団においては、クラスター2に由来する個体の出現頻度が高く、クラスター2の出現頻度は、緯度によって変化していくことが示された(図1)。

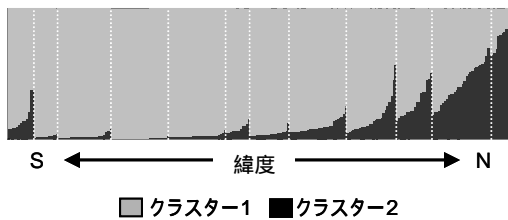


図1. ベイズ推定された集団構造。

一方、集団間の遺伝子流動モデルを推定した結果、 n -islandモデルが最も適したモデルとして採択された。この結果は、長い時間スケールで見ると、各集団間において、自由な遺伝子流動が保たれていることを示唆している。

以上のことから、かつては2つの遺伝的クラスターが存在したが、時間の経過と共に遺伝的交流が進み、その結果として現在では、カワヤツメは分布域全体に渡る遺伝子流動が保たれ、大きい集団サイズが維持されていることが示唆された。このことから、カワヤツメ資源を維持していく上では、個別の河川集団を管理対象とするのではなく、分布域全体の集団の管理を考慮することが必要であると考えられる。

(2) 淘汰を受けている遺伝子座の探索と機能遺伝子の構造解析

淘汰を受けている遺伝子座の探索

中立仮説から逸脱したアウトライアー遺伝子座の探索を行った結果、異なる生活史を有する集団間でアレル組成の差異を有する遺伝子座 *Lc-locus1* が、正の淘汰(方向性淘汰)を受けていることが明らかになった(図2)。

この遺伝子座について、DNA データベースを用いてホモロジーサーチを行った結果、当該遺伝子座は、多くの水生生物において浸透圧調整に関わることが報告されているバソトシン前駆体の約 6000bp 上流に座位することが推定された。この結果は、バソトシン前駆体が、正の淘汰を受けている可能性を示唆する。また、これより少し離れた領域には、生殖腺発達や性行動に関連するゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)前駆体などが座位することが明らかになった。このため、これら遺伝子が性成熟制御に関与している可

能性が示された。

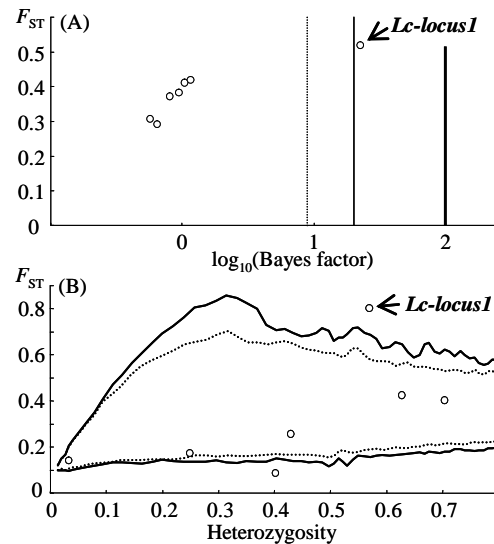


図2. BAYSCAN (A) および LOSITAN (B) を用いたアウトライアー解析による淘汰を受けた遺伝子座の推定。

機能遺伝子の構造解析

バソトシン前駆体の転写調節機構を解明するために、当該遺伝子座の上流領域の塩基配列分析を行った結果、上流側 1000bp 以内に、3つの主要な変異領域が認められた。このうち2つは、マイクロサテライト構造を呈しており、残り1つは、上流約 100bp に存在し、グアニンが連続する配列の中に認められた。この配列は、プロモーターの一領域として重要な役割を担うグアニン四重鎖に相当すると考えられ、2塩基が関与する変異が存在することが明らかになった(図3)。この変異パターンを遡河回遊型カワヤツメ集団と河川陸封型カワヤツメ集団との間において比較し、アウトライアー解析を行った結果、正の淘汰を受けている可能性が示唆された。これらのことから、浸透圧調整に関わる遺伝子座あるいはその転写調節領域が淘汰を受けていることが推定され、この遺伝子が生活史の決定の一端を担っている可能性が明らかになった。

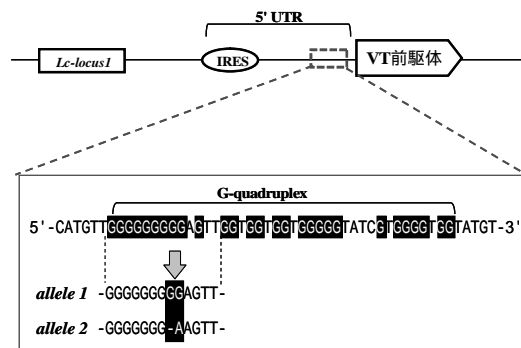


図3. UTRscan 推定によるバソトシン(VT)前駆体における転写調節領域の *in silico* 探索。

また、河川型の生活史を持つ近縁種スナヤマツメ北方種について同領域を解読した結果、類似する変異を示したが、種特異性は認められなかった。そして、両種間で当該領域の塩基配列を比較した結果、約98%の相同性を示した。これらのことから、当該領域は高い保存性を示しており、バソトシン前駆体の転写調節に重要な役割を果たす領域であることが示唆された。

(3) 性成熟に関する生態学的要因

ヤマツメウナギ幼生個体の飼育実験を行った結果、いずれの実験群においても、夏季における成長の停滞と秋季における成長の促進の傾向が認められた。また、異なる餌条件間で比較した結果、成長には餌条件が大きく影響しており、天然餌料(リターなど)と珪藻類を含む人工餌料との混合餌を与えることにより、高い成長が示された。このように、主に水温と餌条件が個体の成長に対して重要な要因となっていることが示唆された。

一方、近赤外分光分析を行った結果、脂肪量を反映する胴体部における近赤外光透過量と全長および体重それぞれとの間に有意な負の相関が認められた(全長 $R^2=0.186$, 体重 $R^2=0.175$)。このことは、脂肪量の増加が近赤外光の透過を阻害していることを意味しており、本方法が体内脂肪量を非侵襲的に測定する上で、有効であることが示唆された。また、性成熟の引き金となる変態の開始が、一部の個体で確認され、いずれの個体においても、変態直前には高い肥満度を保持していた。これらのことから、十分な成長と栄養蓄積が性成熟の開始に関与している可能性が明らかにされた。

以上における分子遺伝学および生態学的研究による成果は、ヤマツメウナギ類の資源を持続的に利用すると同時に、ヤマツメウナギ類の保護・保全、そして種分化の解明に資するに止まらず、脊椎動物における性成熟機構の解明にも重要な示唆を与えるものと評価される。

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)

Yamazaki, Y., Yokoyama, R., Nagai, T. and Goto, A. 2014. Population structure and gene flow among anadromous arctic lamprey (*Lethenteron camtschaticum*) populations deduced from polymorphic microsatellite loci. *Environmental Biology of Fishes*. 査読有. 97: 43-52.

Yamazaki, Y. and Nagai, T. 2013.

Directional selection against different life histories in the Arctic lamprey (*Lethenteron camtschaticum*): identification by microsatellite analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 査読有. 70: 825-829.

[学会発表](計 4 件)

山崎裕治・長井輝美. カワヤツメ浸透圧調節関連遺伝子の転写調節が生活史決定に与える影響の検討. 日本魚類学会年会. 2012年9月22日-23日. 水産大学校(山口県).

山崎裕治・長井輝美. カワヤツメの生活史決定に関わる遺伝子の探索. 日本水産学会春季大会. 2012年3月29日. 東京海洋大学(東京都).

山崎裕治・長井輝美・横山良太・後藤晃. 希少水産資源カワヤツメの遺伝的集団構造. 日本水産学会秋季大会. 2011年10月1日. 長崎大学(長崎県).

Yamazaki, Y. Phylogeny and speciation of lampreys in eastern Eurasia. American Fisheries Society 141st Annual Meeting. 2011年9月7日. Washington State Convention Center (Seattle, USA).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 裕治 (YAMAZAKI, Yuji)

富山大学・大学院理工学研究部・准教授
研究者番号: 30332654

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし