

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻
平成 24 年度博士課程進学

氏名 中村政裕
指導教員 大竹二雄

論文題目：魚類の通し回遊現象の起源と進化に関する研究

本研究は「通し回遊はいかにして始まり、どのように進化してきたのか」という命題を、生態学・行動学・生理学・ゲノム科学の様々な観点から包括的に検討したものである。通し回遊は回遊環が複数の浸透圧環境に跨る点で他の回遊と区別されるため、非出生浸透圧環境の活用がその本質といえる。本研究では個体もしくは種の系統と浸透圧環境の関係に着目し、まず、(1) 通し回遊の起源において重要な行動要素となったであろう非出生浸透圧環境への進歩行動の解発機構を、遡河回遊のあらゆる進化段階に属する種を含むトラフグ属魚類を用いて検討した。次に、(2) 通し回遊種が普遍的に備える生理特性の獲得過程を通し回遊種の回遊機構の原型を示すと考えられる河口偶来種のウグイ (*Tribolodon hakonensis*)・クロダイ (*Acanthopagrus schlegelii*)・スズキ (*Lateolabrax japonicus*) を用いて検討した。さらに、(3) 通し回遊の進化の遺伝基盤を検討するのに適したトラフグ属魚類に再び着目して、新規の浸透圧環境への適応機構獲得の遺伝基盤をトランスクリプトーム解析により調べた。最後に、各アプローチにより得られた結果を統合して通し回遊の起源と進化過程のシナリオを提示した。

1. 行動学的起源および進化過程

通し回遊の行動学的起源と進化過程を検討するために、通し回遊の進化に重要な行動要素と考えられる非出生浸透圧環境進入行動の解発機構を、トラフグ属の海産単一ハロハビタット種であるショウサイフグ (*Takifugu snyderi*)、海産河口偶来種であるトラフグ (*T. rubripes*) とクサフグ (*T. niphobles*) の3種について空腹度に着目して検討した。各種を個体ごとに海中で7-14日間飽食飼育した後、同一の期間絶食条件で海水飼育した。飽食・絶食飼育開始から1, 3, 7, 14日後に低張環境（非出生浸透圧環境）への進入率を調べ、同一の日数が経過した時点における両条件下での値を比較した。その結果、全種とも全ての時点で空腹度とは関係なく高い低張環境進入率を示した。これより、トラフグ属の低張環境進入行動の解発に空腹度は影響しないものと考えられた。また、狭塩性海産種のショウサイフグの中には低張環境に積極的に進入する個体が存在することが明らかになった。

2. 生理特性の獲得過程

通し回遊種が普遍的に備える広範な水温帯における非出生浸透圧環境適応能と、preparatory adaptation（以下、予備適応）の獲得過程を推定するために、河口偶来種におけるこれらの性質の有無を調べた。まず、河口偶来種の非出生浸透圧環境適応能の水温依存性を検討するため、淡水産河口偶来種であるウグイと海産河口偶来種であるクロダイについて、低張・海水環境にそれぞれに馴致した実験群を用い、順応した浸透圧条件で、(1) 水温を急激に変化させた場合の生残率、(2) 水温を段階的に変化させた場合の生残率と血漿浸透圧を調べた。水温を急変させた場合、両種とも非出生浸透圧環境においてのみ、低温・高温の両条件下で生残率が大きく低下した。水温を段階的に変化させた場合、両種とも高温の非出生浸透圧環境で血漿浸透圧が環境水の浸透圧に近づき、浸透圧調節能が低下することが示唆された。一方、低温条件下では顕著な血漿浸透圧の変化は認められなかった。以上より、ウグイとクロダイが非出生浸透圧環境において順応可能な水温帯は水温急変時には低温・高温の両方向で縮小するのに対し、水温を段階的に変化させた際には高温方向でのみ狭まることを示された。

ウグイ、クロダイに加えて海産河口偶来種であるスズキの稚魚を用い、河口偶来種における予備適応の有無を、鰹における輸送体遺伝子の発現量と非出生浸透圧環境に対する選好性の関係性に着目して検討した。まず、3種における淡水・海水適応機構の発達指標を選定するために各種イオン輸送体遺伝子の発現変動を調べたところ、スズキとクロダイではCFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) とNKCC1 (sodium-potassium-chloride cotransporter-1) が、ウグイではCFTR とNKCC1a (sodium-potassium-chloride cotransporter-1a) が、それぞれ海水マーカーとして有用であることが分かった。また、スズキではNCC (sodium-chloride cotransporter) とNHE3 (sodium-hydrogen exchanger-3) が、クロダイではNHE3が、それぞれ淡水マーカーとして使えることが明らか

になった。

次に、非出生浸透圧環境に対する選好性の指標となる非出生浸透圧環境選好指数を行動実験により算出した各個体の、鰓における環境適応マーカー遺伝子の発現量を測定し、両者の関係を調べたところ、3種全てにおいて相関関係は認められなかった。このことから、今回の実験に用いた3種の河口偶来種では、非出生浸透圧環境への選好性に浸透圧適応機構の発達は関係しないことが明らかになり、非出生浸透圧環境への進入行動には予備適応は伴わないことが示された。

本章の結果から、系統的に離れていて、かつ出生浸透圧環境の異なる複数の河口偶来種に共通して、水温変動により非出生浸透圧環境への適応能が変化すること、ならびに予備適応を伴わないで環境選好性が発現することが示された。このことから、河口偶来種では普遍的に非出生浸透圧環境へのこうした応答を示す可能性が考えられる。以上のことから、これらの生理特性は河口偶来種から通し回遊種への進化過程において共通して獲得されてきたものと推察された。

3. 浸透圧調節能獲得の遺伝基盤

トラフグ属魚類における低張環境適応能獲得の遺伝基盤を知るために、低張環境に対する生態学的依存度が異なる、海産単一ハロハビタット種のショウサイフグ、海産河口偶来種であるトラフグとクサフグ、および遡河回遊種であるメフグ (*T. obscurus*) とメガネフグ (*T. ocellatus*) の5種における低張環境適応能の遺伝基盤を比較した。これに先立ち、低張環境への適応能を各種の血漿浸透圧を調べることで見積もったところ、低張環境適応能がショウサイフグ<クサフグ<トラフグ<メフグ=メガネフグの関係にあること、および海産単一ハロハビタット種のショウサイフグにおいても低張環境に対して一定の耐性を示すことが分かった。続いて、高張環境(塩分30)と低張環境(メフグ・メガネフグ:塩分0.1–0.2, トラフグ・クサフグ:塩分1.0, ショウサイフグ:塩分3.0)それぞれに馴致した個体の鰓と腸における遺伝子発現をRNA-seq法により測定し、19388遺伝子について高張環境馴致時に対する低張環境馴致時の発現量比を求めた。このうち、発現量が1/2以下に低下、もしくは2倍以上に上昇した遺伝子を発現変動遺伝子(DEGs)と定義し、5種についてベン図解析を行った。

RNA-seq法の解析に先立ち、鰓で4個(CFTR・CISH; Cytokine-inducible SH2-containing protein・NHE3・Pdlim2; PDZ and LIM domain protein 2)、腸で3個(CISH・NCC・NKCC2; sodium-potassium-chloride cotransporter-2)の遺伝子についてそれぞれ定量リアルタイムPCR法により発現量を測定し、RNA-seq法により得られた結果の定量精度を評価した。その結果、ほぼ全ての遺伝子についてRNA-seq法の結果と同様の傾向が認められた。このことから、RNA-seq法の結果を基に全体の傾向を議論して概ね間違いはないと考えられた。

RNA-seq法の結果について5種のDEGsのベン図解析を行ったところ、ショウサイフグで

のみ低張環境に応答して発現変動を示さない遺伝子が鰓で 4 個，腸で 3 個認められ，本種の鰓でのみ発現が低下しない遺伝子の中には海水適応に重要な CFTR が含まれることが分かった。このことから，本種では低張環境への適応に際して浸透圧調節関連遺伝子の発現が適切に調節されていないことが示唆された。また，メフグとメガネフグでのみ発現上昇がみられた遺伝子が鰓と腸でそれぞれ 8 個ずつ，発現低下がみられた遺伝子が鰓で 14 個，腸で 7 個あり，これらの遺伝子が低張環境への適応機構獲得に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。中でも，両種の腸において定量リアルタイム PCR 法でも大幅な発現上昇が認められた NCC は，淡水に順応した通し回遊種のニホンウナギの腸で高発現を示すことから，淡水適応に重要な遺伝子であることが知られている。したがって，NCC はトラフグ属魚類の低張環境適応能の能力差を規定するものであると考えられた。

以上の結果より，トラフグ属魚類の単一ハロハビタット種であるショウサイフグは，一定程度の低張環境耐性を有するものの，いくつかの重要な遺伝子を適切に発現できないために低張環境に対する適応能が低いこと，一方，低張環境における浸透圧調節機構がより発達したトラフグやクサフグなどの河口偶来種では，適切な発現調節が行われていることが明らかになった。また，極限的な低張環境である淡水にまで適応可能な通し回遊種のメフグとメガネフグにおいては，新たに NCC などの輸送体遺伝子の発現調節システムを獲得していることが推察され，トラフグ属魚類の低張環境適応能獲得の遺伝基盤の一端が明らかになった。

以上本研究から，非出生浸透圧環境に対する一定の耐性と選好性を示す単一ハロハビタット種から，より高度な浸透圧調節機構を保持する河口偶来種が進化し，さらにはイオン輸送に関わる重要遺伝子の発現調節システムと非出生浸透圧環境における広範な水温帯での浸透圧調節能，ならびに予備適応機構を備えた通し回遊種が誕生するという通し回遊の進化シナリオが考えられた。本研究で得られた知見は，通し回遊現象の理解の深化のみならず，地球温暖化に対する河口偶来種の資源の応答とその保全策の立案や，養殖魚の遺伝育種において役立つものと期待される。