

スラウェシマカクの種分化と適応に関する遺伝子レベルの研究

The genetic basis of speciation and adaptation of Sulawesi macaques

所属機関： 京都大学

代表研究者氏名：今井 啓雄

研究期間： 2021年4月1日～2023年3月31日

区分： グループ A

研究分担者：

氏名	所属機関	研究活動期間	役割
顔 暁嬋	京都大学	2022年10月1日～2023年3月31日	サンプリング補助
糸井川 壮大	明治大学	2022年10月1日～2023年3月31日	サンプリング補助
寺井 洋平	総合研究大学院大学	2022年10月1日～2023年3月31日	DNA サンプル解析

滞在研究機関： Department of Chemistry, Bogor Agricultural University, Bogor, Indonesia

共同研究者等： Dr. Bambang Suryobroto

We conducted the genomic analysis of Sulawesi macaques. Previously, we have analyzed 5 species of the macaques; however, pandemic of COVID-19 hampered further analysis of remaining 2 species; *M. ochreata* and *M. brunnescens*. Thanks to this support, we conducted the sampling in October, 2022 and made a NGS library in Bogor, Indonesia. Exome analysis revealed the phylogeny between the species and the possible functions of the genes in the speciation of the species.-----.

海外研究活動概要

本研究は2021年度に採択されながら、コロナ禍の影響で渡航が遅れ、2022年10月にやっとサンプリングのための渡航を実施する事ができた。以下、その概要を記す。

インドネシア・スラウェシ島は約300万年前に現在の島が形成され、それ以来他の陸地とつながることなく存在してきた。そのためこの島に生息する生物は独自の進化を遂げ、現在非常に多様で、かつ高い固有性を持つ生物が生息している。しかし生物の多様性が高い世界の他の地域に比べて、スラウェシ島はまだまだ研究が進んでいない未開の地域である。マカクとはマカカ属のサルの種の総称で、ニホンザルもこの仲間に含まれる。スラウェシ島は全マカカ属の種の分布のわずか2.5%の広さであるが、7種の固有種が別々の地域に生息している。これまでの私たちの研究では、5種のスラウェシマカクを用いて

全コード領域配列(exome)解析を行ってきた。私たちが研究を始める前は、スラウェシマカクについて部分的な系統関係しかわかっていなかったが、exome解析により系統関係が解明された。また、exomeのデータから遺伝子配列を得ることにより、味覚遺伝子や毛色遺伝子が種ごとに分化している傾向がわかった。本研究では残る2種、*M. ochreata* と *M. brunnescens* について同様の解析を行い、7種の遺伝的特徴と表現型との関連を解明することを試みた。まず、南東スラウェシの都市 Kendari を中心として *M. ochreata* の分布域である南東スラウェシを車で回りながら味覚行動実験と口腔スワブサンプルの採取を行った。また、そこからプトゥン島にわたり、車で回りながら *M. brunnescens* の行動実験とサンプルの採取を行った。日本からの4名に加えて、インドネシア側ではボゴール農科大学の Suryobroto, Widayati ら現地の研究者の協力を得ながらサンプリ

ングすることができた。その後、ボゴール農科大学にて核酸の抽出と、次世代シーケンサーで解析するためのライブラリ作成を実施した。-----
--。

成果

まず、*M. ochreata* については 4 個体、*M. brunnescens* については 6 個体の口腔スワブサンプルを得ることができた。ボゴール農科大学において合成 DNA ライブラリを作製した結果、質・量とも解析に十分なライブラリを得ることができた。

これらのライブラリについて exon capturing を行い、exon 領域だけを抽出した。すべてのライブラリの配列を均等に決定できるように混合し、Illumina 社の HiSeqX シーケンサーにより配列を合計 120 Gb 決定した。決定した配列をアカゲザルの参照ゲノム配列にマッピングし、スラウェシマカクの exon 由来の配列の比率を算出した。その結果マカク由来の配列は 70-90%と exon 由来の配列が濃縮されていることが確認された。実際の配列の総量は、個体ごとに 7-13 Gb であり、カバレッジ(exon 配列を何回決定したかの指標)を求めると 40-60x となり、解析に十分な量の配列が決定されていることが確認できた。

アカゲザルの参照ゲノムにマッピングしたそれぞれの個体由来の配列は、bam 形式で書き出しを行い、GATK v.4 のプログラムを用いることによりゲノム全体の変異情報を記録する gvcf 形式のファイルを得た。それぞれの個体の gvcf ファイルはこれまでに exon 配列を決定した個体の gvcf ファイルと結合し、全個体を合わせて解析可能な変異情報の形式、vcf ファイルにより書き出した。

この解析データを用いて、初めにスラウェシマカク個体間の遺伝的な関係を知るために系統中の構築を行った。個体間で違いのある 27 万座位を用いて解析を行ったところ、*M. brunnescens* 6 個体は遺伝的に近縁であり、単系統群を形成した。この単系統群は *M. ochreata* 4 個体の単系統群と姉妹群の関係になったが、この姉妹群に最も近縁な外群に分布域の北部の *M. ochreata* 1 個体が位置した。この結果は 1) *M. brunnescens* は *M. ochreata* の内部系統から分岐した可能性と 2) 外群になった *M. ochreata* の個体は *M. tonkeana* との交雑個体である可能性を表している。そのため次に主成分分析を行った。その結果、外群

となった 1 個体は他の *M. ochreata* 個体に比べて *M. tonkeana* との遺伝的な親和性が高く、交雑個体の子孫である可能性があることが明らかになった。また、*M. brunnescens* の 1 個体は同種の個体より *M. ochreata* との遺伝的な親和性が高く、この 2 種の交雑個体の子孫である可能性が示された。F4 統計などのより詳細な解析により、これらの交雑とその後の遺伝子流動を明らかにできる。また、*M. brunnescens* と *M. ochreata* のそれぞれ 1 個体については全ゲノム解析も行なっている。

今後の展望

エクソーム解析により遺伝子流動等の可能性等新たな知見が示されてきたが、今後のより詳細な解析により、その種分化における役割や、種の特徴を決定する因子を同定することができると期待される。また全ゲノムシーケンスの解析を実施する事により、非コード領域の進化や遺伝子重複の適応への関与も含めたゲノム全体像が解明されると考えられる。また、同時にサンプリングした毛根由来の RNA 解析により、種の特徴である毛色パターン等の分子メカニズムの手がかりも得られると期待される。今回の助成により、スラウェシマカクの全体像を明らかにするための重要な一歩を記すことができましたことについて、改めてお礼を申し上げます。

研究の発表

口頭発表

1. 荒川 那海, Kanthi Arum Widayati, Laurentia Henrieta Permita Sari Purba, Xiaochan Yan, 今井啓雄, Bambang Suryobroto, 寺井洋平. スラウェシマカク種間における広範囲の gene flow. 日本進化学会第 24 回沼津大会、2022 年 8 月

誌上発表

1. X. Yan, Y. Terai, K.A. Widayati, A. Itoigawa, L.H.P.S. Purba, F. Fahri, *B. Suryobroto and *H. Imai. (2022) Functional divergence of the pigmentation gene melanocortin-1 receptor (MC1R) in six endemic *Macaca* species on Sulawesi Island. Scientific Reports 12, 7593-----