

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	卵・稚魚食性シクリッドの進化 – 保全と食性適応機構の解明–
Title(English)	The evolution of egg-eating cichlids – their conservation and ecological adaptation
著者(和文)	今本南
Author(English)	Minami Imamoto
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京科学大学, 報告番号:甲第236号, 授与年月日:2025年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:二階堂 雅人,本郷 裕一,田中 幹子,立花 和則,加藤 明
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Institute of Science Tokyo, Report number:甲第236号, Conferred date:2025/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

令和6年度 博士論文

卵稚魚食性シクリッドの進化
—保全と食性適応機構の解明—

東京科学大学 生命理工学院
生命理工学系 生命理工学コース

今本 南

指導教員

二階堂 雅人 准教授

目次

目次.....	1
序論.....	4
本研究におけるシクリッド種名の略称.....	7
第 1 章 外来種・ナイルパーチの侵略が在来種・シクリッドへ与えた遺伝的な影響	8
1. 要旨.....	8
2. 背景.....	9
3. 材料と手法.....	13
3.1 全ゲノムデータの取得と新規ゲノム配列決定.....	13
3.2 SNP データセットの作成.....	16
3.2.1 Master VCF.....	16
3.2.2 Population dataset.....	17
3.2.3 Statistics dataset.....	18
3.2.4 Phylogeny dataset.....	18
3.3 集団構造と種間の遺伝的分化度の推定.....	20
3.4 過去 700 世代における有効集団サイズの推定.....	20
3.5 複数手法を用いた分子系統解析.....	21
3.5.1 RAxML-NG, IQ-TREE2, SVDquartets.....	21
3.5.2 ASTRAL-III.....	21
3.5.3 SNAPP.....	22
3.5.4 TWISST による Topology Weighting 解析.....	22
3.6 種間の分岐年代の推定.....	23

4. 結果	24
4.1 ビクトリア湖シクリッドの集団構造の比較と卵・稚魚食者の遺伝構造の特性..	24
4.2 卵・稚魚食者 2 種を含む 4 種におけるボトルネックの形跡.....	31
4.3 卵・稚魚食者は強い単系統性を示した.....	37
4.4 マタンビハンターは他種と同じ時期に祖先系統と分岐した	43
5. 考察.....	45
5.1 複数のシクリッドにおけるナイルパーチ由来のボトルネック.....	45
5.2 なぜマタンビハンターのボトルネックが強かったのか.....	50
5.3 ビクトリア湖における卵・稚魚食者の系統的起源.....	53
5.4 ILS に陥りやすい生物種における系統解析.....	54
5.5 ビクトリア湖シクリッドの分岐年代.....	56
6. 結論.....	57
第 2 章 卵・稚魚食性シクリッドの食性適応メカニズムの解明.....	58
1. 要旨.....	58
2. 背景.....	59
3. 材料と手法.....	61
3.1 追加ゲノムデータの新規配列決定・配列取得.....	61
3.2 ゲノム解析用データセットの作成.....	64
3.2.1 系統解析データセット.....	65
3.2.2 分化領域探索データセット.....	65
3.3 ASTRAL-IV による系統樹の構築.....	66
3.4 集団構造の推定.....	66
3.5 卵・稚魚食者— <i>Pundamilia</i> 属間で遺伝的に高く分化した領域（高度分化領域） の探索.....	66
3.6 肝臓組織を用いたトランスクリプトーム解析.....	67

3.6.1	サンプルの採集と RNA の抽出	67
3.6.2	遺伝子発現変動解析	68
3.7	高度分化遺伝子および発現変動遺伝子のエンリッチメント解析	69
4.	結果	70
4.1	種数を増やした <i>Pundamilia</i> 属および卵・稚魚食者の系統解析	70
4.2	異なる食性間における高度分化領域の特定	72
4.3	卵・稚魚食者- <i>P. nyererei</i> 間での発現変動遺伝子の探索	87
5.	考察	99
5.1	卵・稚魚に含まれる脂質の代謝能力の向上	99
5.1.1	脂肪酸	100
5.1.2	リン脂質、中性脂肪、コレステロール	102
5.1.3	脂質代謝のまとめ	103
5.2	特殊な捕食行動に重要な頭蓋・顔面の形態形成	103
6.	結論	105
	総論	106
	参考文献	108
	謝辞	115
	共同研究者の一覧と貢献	116
	報文目録	117

序論

この世界には、多様な形態や生態を有した生物が存在している。それらの生物は、それぞれ異なる特徴や能力を持ち、生態系の中で特定の役割を担っている。では、これら多種多様な形質や特徴は、どのようにして進化の過程で獲得されてきたのだろうか。形態や生態の適応進化の分子メカニズムを理解することは、生物学や進化学における重要な課題であり、生物の進化や適応に関する新たな知見をもたらすと期待されている。

近年、種分化のモデル生物として淡水性の熱帯魚・シクリッドが注目されている。特に東アフリカのシクリッドは、大規模な適応放散が複数の湖で独立して生じたことで知られている。中でもビクトリア湖では、現在の水系が形成されてから 15,000 年の間で、約 500 種のシクリッドが適応放散を経て誕生した(Seehausen 1996; McGee et al. 2020; Meier et al. 2023)。人類が農耕を始めたのがわずか 12,000 年前だったことを踏まえると、15,000 年は進化のスケールでは極めて短期間である。ビクトリア湖のシクリッドはその種数の多さから察せられる通り、体色、体型など形態的多様性、そしてユニークな捕食行動など生態の多様性に非常に富んでいる。したがって極めて短期間で高いレベルの生態・形態的分化が生じたといえ、種間のわずかな遺伝的差異に注目することで、個体群の動態や特殊な形質の分子メカニズムを辿ることが可能であると言える。

ビクトリア湖の種がこれほどまでに多くの種の獲得を可能とした要因の一つが、大規模な食性適応であったと言われている。ビクトリア湖の種は、プランクトンや藻類といった捕食対象と、それらを捕食する様式の違いから、およそ 20 種類の食性グループへ分類される。その中でも最も特殊な食性が、卵・稚魚を主食とする「卵・稚魚食」である。ビクトリア湖のシクリッドはメスの口内で卵から稚魚まで保育を行っており、卵・稚魚食者は卵・稚魚をくわえたメスへ攻撃し、卵を奪って捕食する (Kaplan et al., 2005; Figure 0-1)。栄養価の高い魚卵や幼生を食べること自体は自然界でごく一般的にみられる行為である。しかし卵・

稚魚食者はメスの口から卵・稚魚を奪うという、口内保育を行うシクリッドで特異的な捕食様式を獲得した。このような特殊な食性グループの進化史や、食性そのものの分子メカニズムの理解は、シクリッドの適応進化を理解する上で重要であると言える。しかし卵・稚魚食者に関する知見は、形態に基づいた分類学的記載にとどまっており、種の進化史や食性の分子基盤は未解明である。したがって本研究では、ビクトリア湖の食性の多様性の象徴とも言える卵・稚魚食者の進化を理解することを目的とした。

第1章ではビクトリア湖への外来種・ナイルパーチの侵略が、在来魚類であるシクリッド、特に卵・稚魚食者に与えた遺伝的な影響について、全ゲノムレベルでの解析から評価を行った。結果として、4種のシクリッドにおいて、個体数の減少と遺伝的多様度の低下が検出され、それらがナイルパーチの影響で生じたことがわかった。先行研究から、高次の栄養段階にある食性グループが、ナイルパーチとニッチが競合したことでより強い影響をうけたと予想されていた。実際に、卵・稚魚食者で個体数が著しく減少した痕跡が見られ、特にマタンビハンターとよばれる種が最も強い影響を受けたことが明らかとなった。

第2章では特殊な食性を司る分子メカニズムについて、ゲノムおよび遺伝子発現解析を通じて理解を深めることを試みた。卵・稚魚食者は栄養価の高い魚卵や稚魚を主食としており、タンパク質や脂質の代謝能力が他の食性と比較して高いという仮説を立てた。この仮説を検証するため、卵・稚魚食者とその姉妹系統である *Pundamilia* 属との遺伝子発現比較を行った。解析の結果、脂肪酸や脂質の輸送、代謝、生合成に関与する遺伝子群の発現量が、卵・稚魚食者において有意に上昇していることが確認された。さらに、これらの遺伝子領域およびその周辺において、卵・稚魚食者-*Pundamilia* 属間で高度に分化した領域の存在が確認された。このような高度分化領域が、遺伝子発現のシス制御に寄与している可能性があり、食性に関連する遺伝子発現の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。

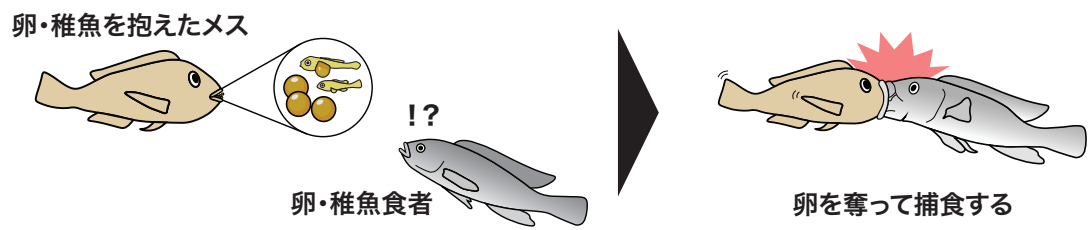


Figure 0-1 卵・稚魚食者の捕食様式 (Kaplan 2005 を改変)

本研究におけるシクリッド種名の略称

Table 0-1 本研究で使用する主なシクリッドの種名とその略称の一覧

属名	種名	略称
卵・稚魚食者		
	<i>Haplochromis</i> sp. "matumbi hunter"	Hmat
	<i>Haplochromis microdon</i>	Hmid
	<i>Lipochromis cryptodon</i>	Lcry
	<i>Lipochromis melanopterus</i>	Lmel
	<i>Lipochromis parvidens</i>	Lpar
	<i>Haplochromis chilotes</i>	Hchi
	<i>Haplochromis sauvagei</i>	Hsau
	<i>Lithochromis rufus</i>	Lruf
	<i>Pundamilia pundamilia</i>	Ppun
	<i>Pundamilia nyererei</i>	Pnye
	<i>Pundamilia</i> sp. "big blue"	Pbig
河川種 (外群)		
	<i>Astatotilapia stappersii</i>	Asta
	<i>Astatotilapia burtoni</i>	Abur

第1章 外来種・ナイルパーチの侵略が在来種・シクリッドへ与えた遺伝的な影響

1. 要旨

外来種の侵略は、生態系に深刻な変化をもたらすことが多く、在来種の存続に大きな脅威となることが知られている。1950年代、肉食性の外来種であるナイルパーチがビクトリア湖に殖産目的で放流され、湖の生態系へ多大な影響を与えた。特に湖の在来種であるシクリッドは、ナイルパーチの勢力拡大後に個体数および種数が大幅に減少しており、1980年代には約200種のシクリッドが絶滅している。本研究では、シクリッドの遺伝的多様性や集団史の変動を推定し、シクリッドが受けた遺伝的な影響の評価を行った。シクリッド8種を用いた大規模な比較ゲノム解析から、4種において個体数の減少とそれに伴う遺伝的な多様性の低下（ボトルネック効果）が確認された。さらに個体数の減少は、ナイルパーチの勢力拡大時期である1970–1980年代から始まったことが明らかとなった。また、卵・稚魚食者のマタンビハンターが最も強いボトルネック効果を受けており、生態的地位や種ごとの形態や生息環境によって、ナイルパーチの捕食圧が異なっていた可能性が示唆された。ゲノム解析から、外来種の侵略が在来種の遺伝的多様性や、集団構造に与える影響を定量的に示したことで、生物多様性の保全における重要な知見となることが期待される。

2. 背景

外来種の侵略は、元の生態系へ様々な影響を与えることで知られている。特に、外来種の勢力の拡大は、しばしば在来種の個体数減少の主な原因となっており、在来種の遺伝構造や遺伝的多様性に劇的な変化をもたらす可能性がある(Wang et al. 2005; Fukuda et al. 2016; Burne et al. 2017; Colautti et al. 2017)。

東アフリカのビクトリア湖では、外来種であるナイルパーチ (*Lates niloticus*) の放流とそれらの勢力拡大が原因で、湖の生態系が著しく変化した過去がある。ナイルパーチは肉食性の大型魚で、「白身魚」として全世界に流通しており、食用魚として高い商業的価値を誇る (Figure 1-1)。1950 年代初頭、殖産目的でナイルパーチがビクトリア湖に放流されて以降勢力を拡大し、1980 年代には個体数がピークに達している(Kaufman 1992; Pringle 2005)。ナイルパーチの放流が商業的成功を取めた側、同時期には湖の主要な在来種であるシクリッドの個体数は減少し、さらに種多様性が失われつつあることも報告されていた(Kaufman 1992; Natugonza et al. 2021)。最終的に、1990 年代にはおよそ 200 種のシクリッドが絶滅したとされ、種ごとの個体数の減少も確認されている(Ribbink 1987; Ogutu-Ohwayo 1990; Kaufman 1992; Witte, Goldschmidt, Wanink, et al. 1992; Seehausen 1996; Natugonza et al. 2021)。その後、一部のシクリッドでの個体数の回復が報告されているもの(Witte et al. 2007; Kische-Machumu et al. 2015; Natugonza et al. 2021)、具体的にどの種がどの程度個体数を減らしたのか、それらの種の遺伝構造への影響はあったのか、そして生態の違いで影響の度合いに差はあったのかは解明されていない。

これまでに、ナイルパーチの影響を強く受けたと報告されているシクリッドとして、ビクトリア湖に生息する卵・稚魚食者・*Haplochromis* sp. ‘matumbi hunter’ (以下マタンビハンター) が挙げられる。マタンビハンターは 1996 年に Ole Seehausen によって初めて報告された種(Seehausen 1996)、まだ正式に種記載がされていない未記載種である。ビクトリア湖のシクリッドでは珍しい、灰色の体色と細長い体型を有しており、湖の南端にあるム

ワンザ湾のごく限られた地域に生息している (Figure 1-2a)。マタンビハンターの個体数について、ナイルパーチの個体数増加後の 1990 年代後半から 2000 年代初頭に行われた現地調査から、個体数が少ないことが懸念されていた(Seehausen 1996; Mizoiri et al. 2008)。さらに、ビクトリア湖シクリッドにおける嗅覚受容体遺伝子 VIR2 のアレル多様性を調べた先行研究では、マタンビハンター固有のアレル型が存在し、かつ種内でそのアレル型に固定していることから、種内の遺伝的な多様性が低いと考えられていた(Nikaido et al. 2014)。実際に、マタンビハンターのミトコンドリア DNA の D-loop 領域におけるハプロタイプ多様度が、他種と比べて著しく低いこともわかっている (二階堂未発表 ; Figure 1-2b)。

個体数の少なさと遺伝的な多様性の低さから、マタンビハンターがナイルパーチの影響で個体数を減らし、ボトルネック効果が働いたと考えた。ボトルネック効果とは、種の個体数が減ると、種内の遺伝的な多様性も低下する現象である (Figure 1-3)。集団サイズが小さいと、遺伝的浮動の影響で有害変異が種内へ蓄積しやすくなる。さらに、生存に不利な有害変異を取り除く自然選択の働きも弱まることで、有害変異の蓄積がさらなる個体数の減少を招き、種が絶滅してしまう可能性が高くなる。また、失われた遺伝的多様性の回復にも長期間を有する。したがって、ボトルネック効果が働いた時期や強さを推定し、生物が外来種侵略や環境変動などの外的要因による影響をどの程度受けたのか推測することは、保全生物学の観点から非常に重要である。

実際に、卵・稚魚食者など肉食性シクリッドは、ナイルパーチの侵略の影響をより強く受けたことが予想されてきた(Witte, Goldschmidt, Goudswaard, et al. 1992; Seehausen 1996; McGee et al. 2015)。元々生態ピラミッドで高次の栄養段階に属していた魚食性や卵・稚魚食性のシクリッドと、後から放流され個体数を増やしたナイルパーチとの間にニッチの競合が生じ、肉食性シクリッドが先に個体数を減らした可能性がある (Figure 1-4)。さらに、野外の観測データからシクリッドの絶滅リスク指数を調べた研究では、肉食性シクリッドの絶滅リスク指数がナイルパーチの勢力拡大後に上昇していることがわかっている

(McGee et al. 2015)。したがって、マタンビハンターをはじめとする卵・稚魚食者は、ナイルパーチに直接捕食された可能性だけでなく、その生態的地位が要因となり、ナイルパーチの影響を強く受けた可能性が高いと予想される。

そこで本章では、外来種・ナイルパーチが在来種であるシクリッド、特に卵・稚魚食者へ与えた影響を評価するため、シクリッドの集団動態と遺伝構造の解析を行った。具体的には、大規模な比較ゲノム解析から、ボトルネック効果が働いた時期とその規模について考察を行った。

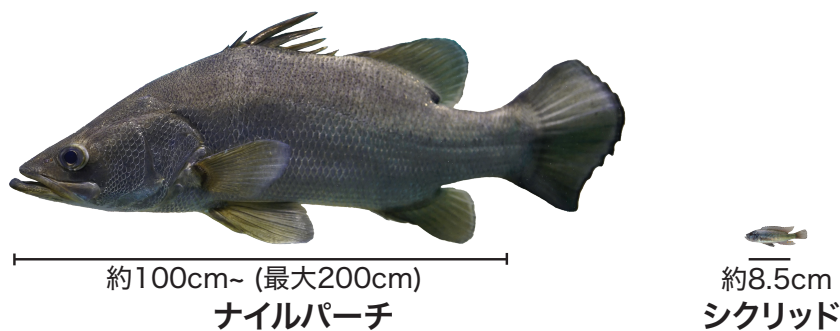


Figure 1-1 ナイルパーチ (*Lates niloticus*) と一般的なサイズのシクリッド(写真は *Haplochromis* sp. 'matumbi hunter')との体長比較

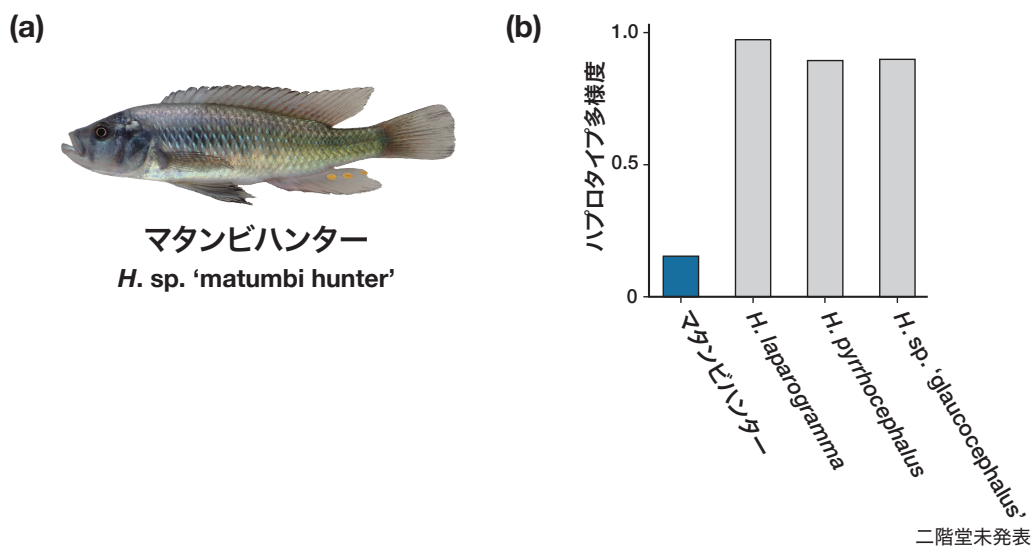


Figure 1-2 マタンビハンター (a) と他種とのハプロタイプ多様度の比較 (b)

*H*は *Haplochromis* の略。(b) ミトコンドリア DNP の D-loop 領域のうち、種間で異なるアリルを持つ割合をハプロタイプ多様度として算出した。

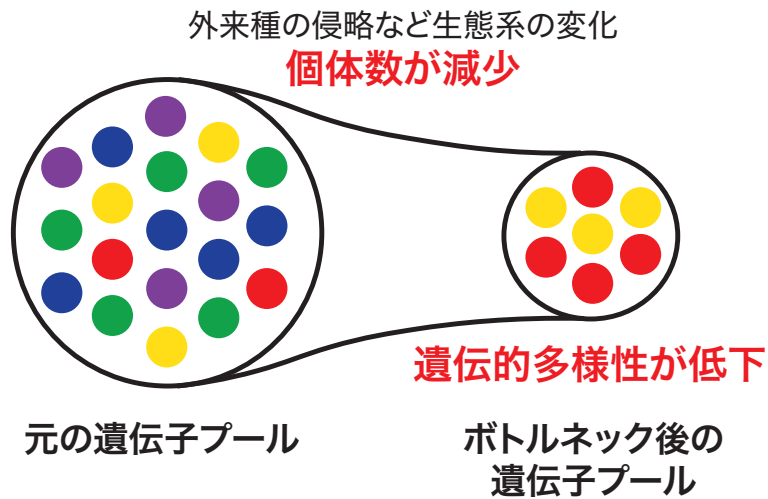


Figure 1-3 ボトルネック効果の概念図

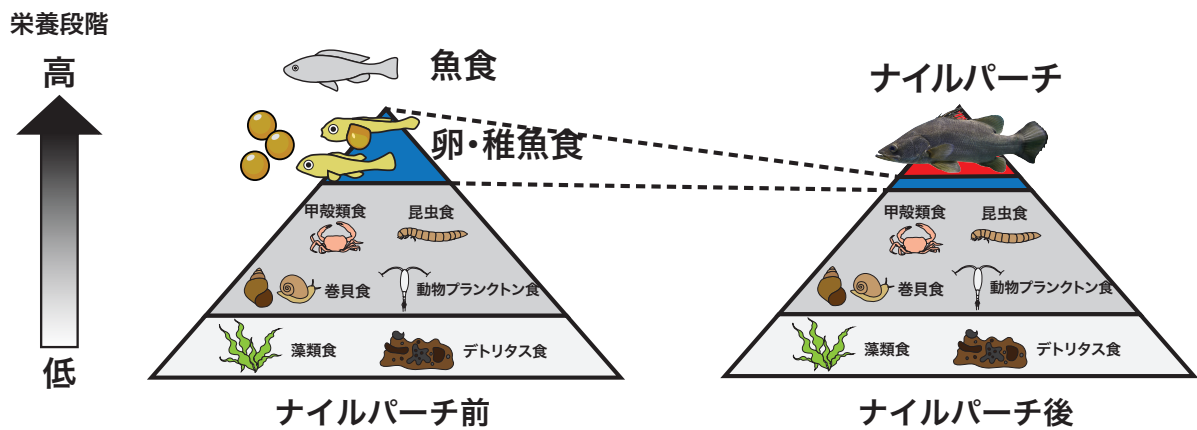


Figure 1-4 ナイルパーチの勢力拡大前後でのビクトリア湖シクリッドの生態ピラミッドの変化

3. 材料と手法

3.1 全ゲノムデータの取得と新規ゲノム配列決定

本章では、NCBI データベースに登録されている 137 個体と、本研究で新規に配列決定を行った 21 個体の、合計 158 個体分のシクリッドの全ゲノムデータを解析に用いた (Table 1-1)。新規にゲノム配列を決定した個体は、所属研究室の相原光人研究員、タンザニアの共同研究者らによって、ビクトリア湖のムワンザ湾にて採集された。DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) のプロトコルに従い、採集個体の筋肉あるいはヒレから全ゲノム DNA を抽出した。TruSeq DNA PCR Free (350) プロトコルに従ってペアエンドライブラリを作成し、マクロジェンに外部委託し Illumina HiSeq X によって全ゲノムリシーケンスを行った。これらのサンプルの全ゲノムデータは、BioProject Accession ID PRJDB18059 で DDBJ Sequence Read Archive に登録されている。

Table 1-1 第一章で用いたゲノムサンプルの一覧 (1/2)

color	Species name	Sample ID	BioSample accession ID	Reference	Lake / River	Locality	Diet	Year	ds1	ds2	ds3	Label in ADMIXTURE	meanDP	minDP	maxDP
paedophage	Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HmH23	SAMD00776973	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Nyegesi	Eggs	2018	+	+	+	17	29.01	10	49
paedophage	Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HmH24	SAMD00776974	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Nyegesi	Eggs	2018	+	+	+	18	44.30	10	64
paedophage	Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HmH25	SAMD00776975	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Nyegesi	Eggs	2018	+	+	+	19	61.23	10	90
paedophage	Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HmH26	SAMD00776976	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Kilimo Island	Eggs	2018	+	+	+	13	18.92	5	33
paedophage	Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HmH27	SAMD00776977	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Kilimo Island	Eggs	2018	+	+	+	14	23.51	5	37
paedophage	Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HmH28	SAMD00776978	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Kilimo Island	Eggs	2018	+	+	+	15	40.21	10	72
paedophage	Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HmH58	SAMD00776979	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Kilimo Island	Eggs	2018	+	+	+	16	45.84	10	84
paedophage	Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	Hmat01	SAMN15891820	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Eggs	2006	+	+	+	20	29.47	10	50
paedophage	Haplochromis microdon	Hmic49	SAMD00776980	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Bwiru Bay	Eggs	2006	+	+	+	21	18.49	5	30
paedophage	Haplochromis microdon	Hmic51	SAMD00776981	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Kilimo Island	Eggs	2018	+	+	+	22	25.27	10	45
paedophage	Haplochromis microdon	Hmic50	SAMD00776982	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Butimba Bay	Eggs	2018	+	+	+	23	27.24	10	48
	Haplochromis chilotes	HC04	SAMD00269294	Nakamura et al. (2021)	Lake Victoria	Kilimo Island	Insects	2009	+	+	+	57	25.38	10	40
	Haplochromis chilotes	HC19	SAMD00776983	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Kilimo Island	Insects	2018	+	+	+	58	34.81	10	53
	Haplochromis chilotes	HC20	SAMD00776984	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Kilimo Island	Insects	2018	+	+	+	59	33.45	10	56
	Haplochromis chilotes	HC21	SAMD00776985	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Kilimo Island	Insects	2018	+	+	+	60	28.24	10	46
	Haplochromis chilotes	HC22	SAMD00776986	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Kilimo Island	Insects	2018	+	+	+	61	33.84	10	52
	Haplochromis chilotes	HC36	SAMD00776987	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Kilimo Island	Insects	2018	+	+	+	62	12.84	5	22
	Haplochromis chilotes	HC01	SAMD00269291	Nakamura et al. (2021)	Lake Victoria	Nyegesi	Insects	2006	+	+	-	63	26.17	10	43
	Haplochromis chilotes	HC34	SAMD00776988	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Nyegesi	Insects	2018	+	+	-	64	14.83	5	23
	Haplochromis chilotes	HC35	SAMD00776989	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Nyegesi	Insects	2009	+	+	-	65	15.39	5	24
	Haplochromis sauvagei	HS08	SAMD00269298	Nakamura et al. (2021)	Lake Victoria	Kilimo Island	Insects	2009	+	+	+	66	22.64	5	39
	Haplochromis sauvagei	HS29	SAMD00776990	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Nyegesi	Insects	2018	+	+	+	69	50.39	10	72
	Haplochromis sauvagei	HS30	SAMD00776991	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Nyegesi	Insects	2018	+	+	+	70	74.17	10	96
	Haplochromis sauvagei	HS31	SAMD00776992	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Kilimo Island	Insects	2018	+	+	+	67	37.09	10	64
	Haplochromis sauvagei	HS32	SAMD00776993	Imamoto et al. (2024)	Lake Victoria	Kilimo Island	Insects	2018	+	+	+	68	50.79	10	84
	Lithochromis rufus	LR13	SAMD00269303	Nakamura et al. (2021)	Lake Victoria	Nyaruwambu	Insects	2006	+	+	+	73	20.38	5	37
	Lithochromis rufus	LR14	SAMD00269304	Nakamura et al. (2021)	Lake Victoria	Nyegesi	Insects	2006	+	+	+	76	20.84	5	35
	Lithochromis rufus	LR15	SAMD00269305	Nakamura et al. (2021)	Lake Victoria	Kilimo Island	Insects	2009	+	+	+	71	19.74	5	33
	Lithochromis rufus	LR16	SAMD00269306	Nakamura et al. (2021)	Lake Victoria	Kilimo Island	Insects	2009	+	+	+	72	21.60	5	36
	Lithochromis rufus	LR17	SAMD00269307	Nakamura et al. (2021)	Lake Victoria	Nyaruwambu	Insects	2009	+	+	+	74	21.37	5	36
	Lithochromis rufus	LR18	SAMD00269308	Nakamura et al. (2021)	Lake Victoria	Nyaruwambu	Insects	2009	+	+	+	75	21.47	5	37
Pundamilia I	Pundamilia nyererei	Pnye02	SAMN05711167	Meier et al. (2017)	Lake Victoria	Makobe Island	Plankton	2009	+	+	+	28	19.12	5	26
Pundamilia I	Pundamilia nyererei	Pnye03	SAMN05711165	Meier et al. (2017)	Lake Victoria	Makobe Island	Plankton	2009	+	+	+	29	20.93	5	28
Pundamilia I	Pundamilia nyererei	Pnye04	SAMN05711163	Meier et al. (2017)	Lake Victoria	Makobe Island	Plankton	2009	+	+	+	30	24.25	5	32
Pundamilia I	Pundamilia nyererei	Pnye05	SAMN05711162	Meier et al. (2017)	Lake Victoria	Makobe Island	Plankton	2009	+	+	+	31	27.67	10	38
Pundamilia I	Pundamilia nyererei	Pnye06	SAMN15891801	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Plankton	2006	+	+	+	32	27.67	10	38
	Pundamilia pundamilia	Ppun01	SAMN05711183	Meier et al. (2017)	Lake Victoria	Makobe Island	Insects	2009	+	+	+	52	23.59	5	29
	Pundamilia pundamilia	Ppun02	SAMN05711178	Meier et al. (2017)	Lake Victoria	Makobe Island	Insects	2009	+	+	+	53	27.31	5	34
	Pundamilia pundamilia	Ppun03	SAMN05711175	Meier et al. (2017)	Lake Victoria	Makobe Island	Insects	2009	+	+	+	54	25.25	5	35
	Pundamilia pundamilia	Ppun04	SAMN05711174	Meier et al. (2017)	Lake Victoria	Makobe Island	Insects	2009	+	+	+	55	21.11	5	29
	Pundamilia pundamilia	Ppun05	SAMN15891778	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Insects	2006	+	+	+	56	21.11	5	29
	Astatotilapia stappersii	Asta02	SAMN09786240	Weber et al. (2021)	Rusizi River	unknown	unknown	2009	+	+	-	7	24.25	5	36
	Astatotilapia stappersii	Asta03	SAMN09786241	Weber et al. (2021)	Rusizi River	unknown	unknown	2009	+	+	-	8	20.21	5	28
	Astatotilapia stappersii	Asta04	SAMN09786238	Weber et al. (2021)	Rusizi River	unknown	unknown	2009	+	+	-	9	20.37	5	29
	Astatotilapia stappersii	Asta05	SAMN09786239	Weber et al. (2021)	Rusizi River	unknown	unknown	2009	+	+	-	10	21.16	5	30
	Astatotilapia stappersii	Asta06	SAMN09786232	Weber et al. (2021)	Rusizi River	unknown	unknown	2009	+	+	-	11	21.65	5	33
	Astatotilapia stappersii	Asta07	SAMN09786231	Weber et al. (2021)	Rusizi River	unknown	unknown	2009	+	+	-	12	21.28	5	33
	Astatotilapia bloyeti	Ablo01	SAMN09786231	Malinsky et al. (2018)	Nala	unknown	unknown	2018	+	-	-	0	17.94	5	30
	Astatotilapia bloyeti	Ablo02	SAMN09786231	Malinsky et al. (2018)	Burungi	unknown	unknown	2018	+	-	-	1	28.09	10	49
	Astatotilapia bloyeti	Ablo03	SAMN09786231	Malinsky et al. (2018)	Kumba	unknown	unknown	2018	+	-	-	2	34.38	10	56
	Astatotilapia paludinoso	Apal01	SAMN12124021	Svardal et al. (2020)	Malagarasi River	unknown	unknown	2020	+	-	-	3	10.25	5	14
	Haplochromis gracilior	Hgra01	SAMN06066473	Meier et al. (2017)	Lake Kivu	unknown	Omnivorous	2017	+	-	-	4	16.35	5	27
	Thoracochromis pharyngalis	Tpha01	SAMN06066504	Meier et al. (2017)	Lake Edward	unknown	Snails	2017	+	-	-	5	17.60	5	26
paedophage	Lipochromis cryptodon	Lcry01	SAMN15891831	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Eggs	2006	+	-	+	24	39.96	10	59
paedophage	Lipochromis sp. 'velvet black cryptodon'	Lvel01	SAMN15891866	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Eggs	2006	+	-	+	25	37.75	10	50
paedophage	Lipochromis melanopterus	Lmel01	SAMN15891824	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Eggs	2006	+	-	+	26	38.28	10	57
paedophage	Lipochromis parvidens	Lpar01	SAMN15891807	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Eggs	2006	+	-	+	27	36.63	10	51
Pundamilia I	Pundamilia sp. 'nyererei-like'	Pnye01	SAMN05711242	Meier et al. (2017)	Lake Victoria	Python Island	unknown	2009	+	-	-	33	37.65	10	52
Pundamilia I	Pundamilia sp. 'nyererei-like'	Pnye02	SAMN05711241	Meier et al. (2017)	Lake Victoria	Python Island	unknown	2009	+	-	-	34	26.16	5	35
Pundamilia I	Pundamilia sp. 'nyererei-like'	Pnye03	SAMN05711237	Meier et al. (2017)	Lake Victoria	Python Island	unknown	2009	+	-	-	35	40.90	10	56
Pundamilia I	Pundamilia sp. 'nyererei-like'	Pnye04	SAMN05711235	Meier et al. (2017)	Lake Victoria	Python Island	unknown	2009	+	-	-	36	30.07	10	38
Pundamilia I	Pundamilia sp. 'pundamilia-like'	Ppun01	SAMN05711264	Meier et al. (2017)	Lake Victoria	Python Island	unknown	2009	+	-	-	37	24.62	5	34
Pundamilia I	Pundamilia sp. 'pundamilia-like'	Ppun02	SAMN05711263	Meier et al. (2017)	Lake Victoria	Python Island	unknown	2009	+	-	-	38	21.80	5	30
Pundamilia I	Pundamilia sp. 'pundamilia-like'	Ppun03	SAMN05711262	Meier et al. (2017)	Lake Victoria	Python Island	unknown	2009	+	-	-	39	24.02	5	32
Pundamilia I	Pundamilia sp. 'pundamilia-like'	Ppun04	SAMN05711261	Meier et al. (2017)	Lake Victoria	Python Island	unknown	2009	+	-	-	40	27.96	10	37
Pundamilia I	Pundamilia sp. 'big blue red'	Pbig01	SAMN15891860	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Insects	2006	+	-	-	42	57.16	10	85
Pundamilia I	Pundamilia igneopinnis	Pign01	SAMN15891859	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Plankton	2006	+	-	-	43	23.98	5	37
Pundamilia I	Pundamilia sp. 'orange'	Pora01	SAMN15891840	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Plankton	2006	+	-	-	41	42.11	10	62
	Pundamilia sp. 'all red'	Pall01	SAMN15891855	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Insects	2006	+	-	-	44	37.37	10	56
	Pundamilia azurea	Pazu01	SAMN15891784	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Plankton	2006	+	-	-	45	29.51	10	44
	Pundamilia sp. 'blue giant'	Pblu01	SAMN15891822	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Insects	2006	+	-	-	46	36.16	10	50
	Pundamilia sp. 'large red deepwater'	Plar01	SAMN15891788	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Insects	2006	+	-	-	47	31.99	10	48
	Pundamilia macrocephala	Pmac01	SAMN15891828	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Insects	2006	+	-	-	48	27.87	10	37
	Pundamilia sp. 'pink anal'	Ppin01	SAMN15891792	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Plankton	2006	+	-	-	50	29.77	10	39
	Paralabidochromis sp. 'orange anal picker'	Poap01	SAMN15891854	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	unknown	2006	+	-	-	49	31.66	10	47
	Ptyochromis prodromus	Ppro01	SAMN15891827	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN	2006	+	-	-	51	27.29	10	42
	Astatotilapia sp. 'nubila rocks'	Anub01	SAMN15891800	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Insects	2006	+	-	-	77	43.61	10	60
	Haplochromis velifer	Avel01	SAMN15891852	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Insects	2006	+	-	-	78	33.70	10	52
	Enterochromis sp. 'blue'	Eblu01	SAMN15891833	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN	2006	+	-	-	79	30.11	10	39

Table 1-1 第一章で用いたゲノムサンプルの一覧 (2/2)

color	Species name	Sample ID	BioSample accession ID	Reference	Lake / River	Locality	Diet	Year	ds1	ds2	ds3	Label in ADMIXTURE	meanDP	minDP	maxDP
	<i>Enterochromis cinctus</i>	Ecin01	SAMN15891775	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	80	40.55	10	54
	<i>Enterochromis coprolagus</i>	Ecop01	SAMN15891789	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	81	55.19	10	75
	<i>Enterochromis sp. 'red'</i>	Ered01	SAMN15891832	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	82	42.62	10	56
	<i>Haplochromis bicolor</i>	Hbico01	SAMN15891847	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	83	26.55	10	40
	<i>Haplochromis sp. 'brown snout'</i>	Hbrso1	SAMN15891850	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	84	39.32	10	60
	<i>Haplochromis cavifrons</i>	Hcav01	SAMN15891771	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Fish		+	-	-	85	23.83	5	36
	<i>Harpagochromis sp. 'checkmate'</i>	Hche01	SAMN04158999	McGee et al. (2016)	Lake Victoria	unknown	Fish		+	-	-	86	12.06	5	19
	<i>Haplochromis crassilabris</i>	Hcra01	SAMN15891819	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	87	27.24	10	42
	<i>Haplochromis cyaneus</i>	Hcya01	SAMN15891780	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	88	35.14	10	51
	<i>Haplochromis sp. 'deepwater rock sheller'</i>	Hdso01	SAMN15891776	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	89	25.29	5	38
	<i>Haplochromis sp. 'deepwater giant'</i>	Hdwg01	SAMN15891830	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	90	29.57	10	43
	<i>Haplochromis fischeri</i>	Hfisc01	SAMN15891846	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	91	44.89	10	63
	<i>Haplochromis hiatus</i>	Hhia01	SAMN15891868	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	92	45.48	10	71
	<i>Haplochromis howesi</i>	Hhow01	SAMN15891787	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Fish		+	-	-	93	40.13	10	58
	<i>Harpagochromis sp. 'orange rock hunter'</i>	Hora01	SAMN15895451	Urban et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Fish		+	-	-	94	38.91	10	51
	<i>Harpagochromis sp. 'orange rock hunter'</i>	Hora02	SAMN15891858	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Fish		+	-	-	95	62.63	10	93
	<i>Haplochromis iris</i>	Hiri01	SAMN15891867	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	96	37.19	10	53
	<i>Haplochromis ishmaeli</i>	Hish01	SAMN15895441	Urban et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Snails		+	-	-	97	38.34	10	50
	<i>Haplochromis ishmaeli</i>	Hish02	SAMN15891861	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Snails		+	-	-	98	40.63	10	60
	<i>Haplochromis lividus</i>	Hlivi01	SAMN15891808	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	99	35.90	10	51
	<i>Haplochromis megalops</i>	Hmeg01	SAMN15891841	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	100	44.94	10	70
	<i>Haplochromis sp. 'odd upper'</i>	Hodd01	SAMN15891839	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Fish		+	-	-	101	28.89	10	44
	<i>Haplochromis paropus</i>	Hpar01	SAMN15895443	Urban et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Algae		+	-	-	102	24.88	5	35
	<i>Haplochromis plagiodon</i>	Hpia01	SAMN15891774	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	103	31.05	10	42
	<i>Haplochromis sp. 'purple yellow'</i>	Hpur01	SAMN15891803	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Algae		+	-	-	104	48.87	10	65
	<i>Hoplotilapia cf. retrodens</i>	Hret01	SAMN15891804	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	105	33.16	10	44
	<i>Haplochromis serranus</i>	Hserr01	SAMN15895449	Urban et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Fish		+	-	-	106	31.55	10	45
	<i>Haplochromis tanaos</i>	Htano01	SAMN15891835	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Plankton		+	-	-	107	16.59	5	26
	<i>Haplochromis thereuterion</i>	Hthe01	SAMN15895453	Urban et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Insects		+	-	-	108	34.32	10	46
	<i>Haplochromis sp. 'thickskin'</i>	Hthi01	SAMN15891834	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Insects		+	-	-	109	36.74	10	51
	<i>Haplochromis thliodon</i>	Htho01	SAMN15891848	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	110	41.30	10	57
	<i>Haplochromis vanojeni</i>	Hvno01	SAMN15891777	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	111	24.60	5	36
	<i>Haplochromis vorlinnei</i>	Hvon01	SAMN15891795	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Fish		+	-	-	112	45.51	10	62
	<i>Labrochromis sp. 'grey'</i>	Lgre01	SAMN15891783	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	113	32.56	10	50
	<i>Lithochromis sp. 'orange'</i>	Lora01	SAMN15891823	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	114	33.88	10	50
	<i>Lithochromis sp. 'pseudoblue'</i>	Lpsp01	SAMN15891825	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	115	38.89	10	55
	<i>Lithochromis rubripinnis</i>	Lrub01	SAMN15891836	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	116	22.18	5	31
	<i>Lithochromis sp. 'scrapper'</i>	Lscr01	SAMN15891793	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	117	38.67	10	53
	<i>Haplochromis sp. 'stone'</i>	Lsto01	SAMN15891826	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Snails		+	-	-	118	26.95	10	44
	<i>Lithochromis xanthopteryx</i>	Lxan01	SAMN15891838	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	119	23.73	5	36
	<i>Lithochromis sp. 'yellow chin'</i>	Lyec01	SAMN15891791	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	120	35.79	10	52
	<i>Mbipla mbipla</i>	Mmbi01	SAMN15891779	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	121	36.68	10	55
	<i>Mred01</i>	Mred01	SAMN15891785	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Algae		+	-	-	122	27.31	10	42
	<i>Neochromis gigas</i>	Ngig01	SAMN15891799	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Algae		+	-	-	123	33.87	10	52
	<i>Neochromis greenwoodi</i>	Ngre01	SAMN15891805	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	124	32.66	10	42
	<i>Neochromis sp. 'long black'</i>	Nlon01	SAMN15891853	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Algae		+	-	-	125	48.43	10	75
	<i>Neochromis ornicaeruleus</i>	Norn01	SAMN15891865	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	126	26.32	10	43
	<i>Neochromis ruficaudalis</i>	Nruf01	SAMN15891782	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Algae		+	-	-	127	24.18	10	37
	<i>Neochromis sp. 'unicuspid scrapper'</i>	Nuns01	SAMN15891796	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	128	43.73	10	63
	<i>Neochromis sp. 'yellow anal scrapper'</i>	Nyas01	SAMN15891864	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	129	35.17	10	50
	<i>Haplochromis argenteus</i>	Parg01	SAMN15891806	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Fish		+	-	-	130	32.80	10	53
	<i>Paralabidochromis sp. 'blue beadle'</i>	Pbbe01	SAMN15891851	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	131	29.85	10	48
	<i>Paralabidochromis sp. 'blue biter'</i>	Pbbi01	SAMN15891818	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	132	32.68	10	54
	<i>Haplochromis chromogynos</i>	Pchr01	SAMN15891802	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Insects		+	-	-	133	46.80	10	73
	<i>Platytaenioides degeni</i>	Pdgd01	SAMN15891837	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	134	22.02	5	37
	<i>Haplochromis sp. 'dwarf dentax'</i>	Pdwa01	SAMN15891790	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Fish		+	-	-	135	38.29	10	55
	<i>Haplochromis flavipinnis</i>	Pfla01	SAMN15891810	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Fish		+	-	-	136	26.20	10	40
	<i>Haplochromis flavus</i>	Pfla02	SAMN15891849	McGee et al. (2016)	Lake Victoria	unknown	Insects		+	-	-	137	19.57	5	29
	<i>Haplochromis flavus</i>	Pfla03	SAMN04158998	McGee et al. (2016)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	138	19.60	5	29
	<i>Haplochromis gowersii</i>	Pgow01	SAMN15891809	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Fish		+	-	-	139	24.90	5	35
	<i>Psychichromis orthostoma</i>	Port01	SAMN15891811	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Fish		+	-	-	140	29.94	10	49
	<i>Haplochromis perrieri</i>	Pper01	SAMN15891821	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Fish		+	-	-	141	31.32	10	53
	<i>Psammochromis riponians</i>	Prip01	SAMN15891829	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	142	30.84	10	43
	<i>Paralabidochromis sp. 'sky blue picker'</i>	Psbp01	SAMN15891856	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	143	35.43	10	47
	<i>Haplochromis sp. 'short snout scaper'</i>	Psss01	SAMN15891797	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Algae		+	-	-	144	43.31	10	62
	<i>Haplochromis sp. 'supramacrops'</i>	Psup01	SAMN15891773	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	145	21.79	5	33
	<i>Haplochromis xenognathus</i>	Pxen01	SAMN15891845	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Snails		+	-	-	146	49.02	10	70
	<i>Pytochromis sp. 'xenognatus rocks'</i>	Pyer01	SAMN15891786	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	NAN		+	-	-	147	41.82	10	57
	<i>Psychichromis sp. 'stripe'</i>	Pyst01	SAMN15891814	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Fish		+	-	-	148	38.80	10	63
	<i>Xystichromis sp. 'cherry fin'</i>	Xche01	SAMN15891813	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Algae		+	-	-	149	37.30	10	60
	<i>Xystichromis sp. 'ruby green'</i>	Xrub01	SAMN15891812	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Algae		+	-	-	150	39.16	10	63
	<i>Haplochromis cf. argens</i>	Yarg01	SAMN15891843	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Plankton		+	-	-	151	52.40	10	75
	<i>Yasichromis fusiformis</i>	Yfus01	SAMN15891842	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Plankton		+	-	-	152	43.99	10	65
	<i>Yasichromis laparogramma</i>	Ylap01	SAMN15891857	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Plankton		+	-	-	153	24.41	5	35
	<i>Yasichromis sp. 'plumbus'</i>	Yplu01	SAMN15891844	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Plankton		+	-	-	154	53.81	10	75
	<i>Yasichromis pyrrocephalus</i>	Ypyr01	SAMN15891869	McGee et al. (2020)	Lake Victoria	unknown	Plankton		+	-	-	155	29.69	10	46
	<i>Astatotilapia burtoni</i>	Abur05	SAMN09786182	Weber et al. (2021)	Rusizi River	unknown	Omnivorous		-	+	+	15.30	5	26	
	<i>Astatotilapia burtoni</i>	Abur06	SAMN09786183	Weber et al. (2021)	Rusizi River	unknown	Omnivorous		-	+	+	18.60	5	32	
	<i>Astatotilapia burtoni</i>	Abur07	SAMN09786191	Weber et al. (2021)	Rusizi River	unknown	Omnivorous		-	+	+	22.33	5	38	

“color”列は、それぞれの種を表す色で網掛けされており、“paedophage (卵・稚魚食者)”または“*Pundamilia I*”に属する種にラベルが付けられている。サンプルを採取した場所が明らかとなっている場合は“Locality”列に記され、不明な個体については“unknown”としている。本研究で新たに配列決定されたサンプルと、以前に当グループで配列決定されたサンプルについては、サンプルが採取された年を“Year”列に記載している。サンプルが Population dataset, Statistics

datasetあるいはPhylogeny datasetに含まれている場合は、それぞれ“ds1”、“ds2”および“ds3”列に“+”（含まれていない場合は「-」）とマークされている。“label in ADMIXTURE”には、解析に含まれた個体の ADMIXTURE 解析結果図上での X 軸ラベル番号を表記している。McGee et al. (2020) および Seehausen (1996) は *Lipochromis* sp. ‘velvet black cryptodon’は、形態が類似する *L. cryptodon* とは別種だと定義した。しかし両者の遺伝的分化度が極めて低かったことから (Figure 1-6, Figure 1-7)、本研究では *L. sp.* ‘velvet black cryptodon’を *L. cryptodon* とみなし解析を行った。

3.2 SNP データセットの作成

本研究では、まず 3.1 にて取得した全ゲノムデータを全て含む Master VCF データを作成し (3.2.1)、その後解析の目的に合わせて3種類の SNP データセットを作成した (3.2.2、3.2.3、3.2.4)。各データセットに含まれた種の詳細は Table 1-1 の“ds1”、“ds2”、“ds3”列に、SNP 数・種数・個体数については Table 2-1 を参照されたい。

Table 1-2 各データセットの SNP 数・種数・個体数のまとめ

Dataset name	Number of		
	SNPs	species	samples
Master VCF	622,956,232		158
Ppulation dataset (ds1)	1,282,071	97	155
Statistics dataset (ds2)	37,335,868	8	41
Phylogeny dataset (ds3)	298,674	11	45

3.2.1 Master VCF

3.1 にて取得した 158 個体のシクリッドの全ゲノムデータから、以下の手順で SNP の抽出を行い Master VCF を作成した。ショートリードデータのクオリティチェックを FastQC (Andrews 2010)で行い、アダプター配列とクオリティの低いリードを fastp (Chen et al. 2018)で除去した。*Haplochromis chilotes*のアセンブリ配列 ((Nakamura et al. 2021)を

参照配列とし、bwa-mem (v. 0.7.17-r1188) (Li 2013) でリードデータのマッピングを行った。その後、samtools (v. 1.8) (Li et al. 2009) のオプション “-f 2 -F2052 -q 30” で、ゲノム上の複数の場所にマッピングされたリードとマッピングクオリティが 30 以下のリードを除去し、forward read と reverse read が同じ位置に適切にマッピングされたリードのみを抽出した。Bcftools (v. 1.8) (Li 2011) で参照配列に対する多型サイト (SNP) の抽出を行い、VCF ファイルを作成した。VCF ファイルから、vcftools (v. 0.1.16) (Danecek et al. 2011) のオプション “--minQ 30” で、minimum mapping quality が 30 以下のサイトを除去した。カバレッジが低すぎる・高すぎる領域を除去するにあたり、ゲノムサンプルごとのカバレッジのばらつきが見られたため、サンプル個別にカバレッジの閾値を設定した。まず scaffold あたりのカバレッジを samtools のコマンド “samtools depth” にて算出し、それらの中央値が 10 以上であった場合は minimum depth=10、10 以下であった場合は minimum depth=5 とし、maximum depth は第三四分位数 $\times 2$ の値とした。vcflib (Garrison et al. 2022) のオプション “vcffilter” で、閾値の範囲から逸脱したカバレッジを示したサイトを除去した。全ての個体の VCF ファイルを bcftools の “bcftools merge” コマンドで結合した。Vcftools のオプション “--max-missing 1 --remove-indels --max-alleles 2 --min-alleles 2” で、欠損サイト、indels、multiallelic なサイトを除去し、Master VCF とした。

3.2.2 Population dataset

ビクトリア湖シクリッド間で集団構造を比較するため、外群にあたる祖先系統 5 種含めた 97 種 155 個体で構成される **Population dataset** を作成した。Master VCF から、Vcftools のオプション “--keep --maf 0.01 --plink” で、目的の 155 個体のデータの抽出、頻度が全個体の 1% 以下であった SNP (マイナーアレル) を除去し、VCF から PLINK 用のフォーマットへの変換を行った。PLINK (v. 1.9) (Chang et al. 2015) のオプション “--indep-pairwise

50 5 0.1”で連鎖不平衡係数が 0.1 以下のサイトを特定し、“--extract”で対象の SNP のみを抽出し、最終的に 1,282,071 SNPs からなるデータセットを作成した。

3.2.3 Statistics dataset

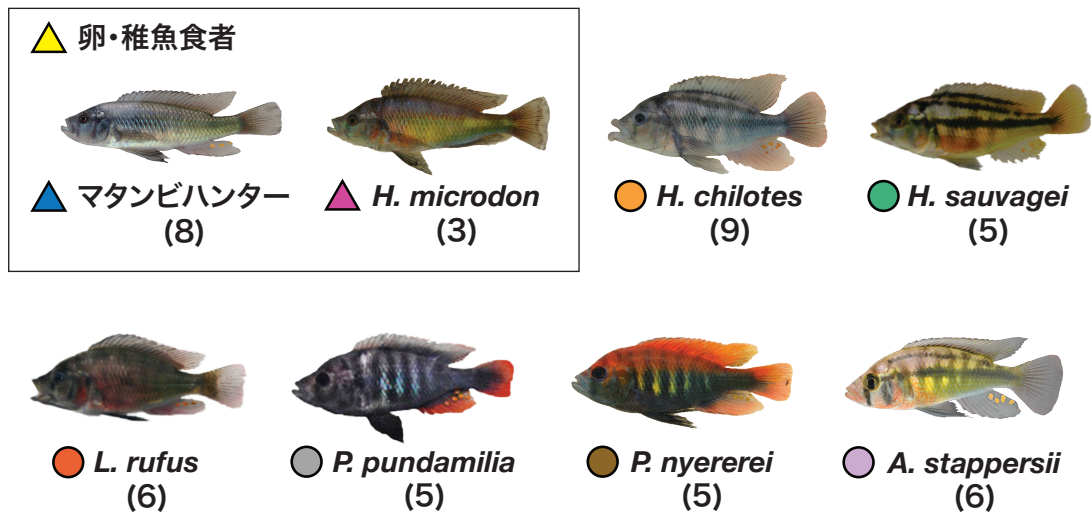
ボトルネック効果の有無と強さを評価するにあたり、遺伝的統計量の比較・有効集団サイズの推定のための **Statistics dataset** を作成した。1 種あたり最低 3 個体以上ゲノムデータが入手可能な 8 種 41 個体がデータセットに含まれている (Figure 1-5)。Vcftools のオプション“--keep”で抽出し、37,335,868 SNPs を含むデータセットが生成された。

3.2.4 Phylogeny dataset

卵・稚魚食者 5 種とそれらの姉妹種間の詳細な系統関係を明らかにするために、外群にあたる河川種の *Astatotilapia burtoni* を含んだ、11 種 45 個体からなる **Phylogeny dataset** を作成した。Master VCF から、Vcftools のオプション“--keep --maf 0.03 --plink”で、目的の 45 個体のデータの抽出、頻度が全個体の 1%以下であった SNP (マイナーアレル) を除去し、VCF から PLINK 用のフォーマットへの変換を行った。PLINK (v. 1.9) (Chang et al. 2015)のオプション “--indep-pairwise 50 5 0.1”で連鎖不平衡係数が 0.1 以下のサイトを特定し、“--extract”で対象の SNP のみを抽出し、最終的に 298,674 SNPs からなるデータセットを作成した。

ASTRAL-III での系統解析では、別途 haplotype phasing を行ったデータセットを用いた。Phasing 時のエラーを避けるため、SNP が 50 個以下の scaffold をあらかじめ除去した。Beagle (v. 5.2)(Browning et al. 2021)で iterations を 50 回に設定し、haplotype phasing を行った。その後の SNP フィルタリングは上述と同条件で行った。

(a)



H : *Haplochromis* L : *Lithochromis* P : *Pundamilia* A : *Astatotilapia*

(b)

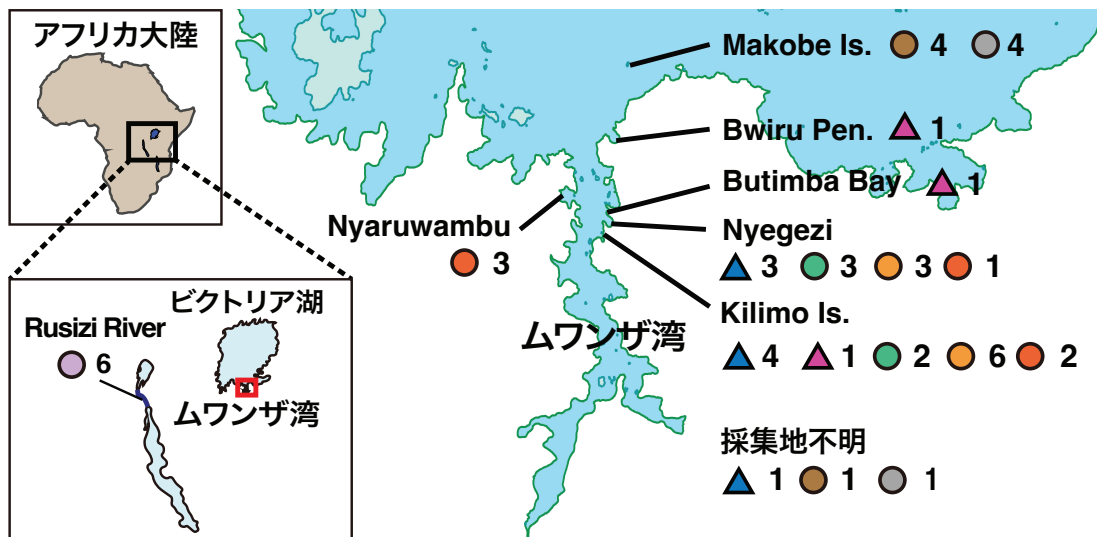


Figure 1-5 第1章でメインの解析対象としたビクトリア湖シクリッド8種 (a) と Statics dataset に含まれる41個体の採集地 (b)

河川種の *Astatotilapia stappersii* はアウトグループとして解析に含めた (写真 は Meier et al., (2017)より抜粋)。(a)の種名下の () 内に個体数の合計を記載している。種名横のマークは△が卵・稚魚食者、○はそれ以外の種で、(b)の地図上の採集地点と対応している。これらのマークの形・色は、以降の解析結果でも用いた。(b)の左下地図で赤い四角で示した領域は、ビクトリア湖ムワンザ湾の場所を表しており、右側にムワンザ湾の拡大地図を示している。地図上のマーク横に、マークと対応する種のその地点で採集された個体数を記載している。

3.3 集団構造と種間の遺伝的分化度の推定

Population dataset を用いて、ビクトリア湖シクリッドの集団構造の推定、ならびに複数個体ゲノムが読まれている種間における遺伝的分化度の推定を行った。まず、データに含まれる全個体が K 個の遺伝的要素で構成されると仮定した場合の、個体ごとの遺伝的要素の構成比を求める ADMIXTURE 解析を行った。 $K=1$ から $K=8$ について ADMIXTURE (v1.3.0)(Alexander et al. 2009)を実行し、各 K の信頼度の指標となる cross-validation error rate も算出した。さらに PLINK のオプション “--pca” で SNP データの主成分分析を行い、各主成分における固有ベクトルおよび寄与率を得た。集団間の遺伝的分化度の比較は、用いた遺伝的統計量 F_{ST} の特性上、ゲノムデータが3個体以上利用可能な8種 (Statistics dataset) を用いた。8種28ペアにおいて、vcftools のオプション “--fst-window-size 10000 --weir-fst-pop” でペアワイズ F_{ST} (Weir and Cockerham 1984)を計算した。

3.4 過去700世代における有効集団サイズの推定

Statistics dataset を用いて、過去700世代の有効集団サイズを GONE(v1.0)(Santiago et al. 2020)にて推定した。まず Statistics dataset から 150,000SNP 以上を含む scaffold のみを抽出した。GONE 実行時のパラメータの組換え最大値 (the greatest value of recombination) は、他集団との交雑などを加味し、種ごとに異なる値を設定した (matumbi hunter、*H. microdon* および *H. sauvagei* は 0.05、*H. chilotes*、*P. pundamilia*、*P. nyererei*、*L. rufus* および *A. stappersii* は 0.01)。GONE にて、ひとつの scaffold あたり 22,000SNP をランダムで抽出し、現在から700世代前までの有効集団サイズの推定する解析を200回試行繰り返した (GONE の INPUT_PARAMETERS_FILE 内を、NGEN = 700、NBIN = 700、maxNCHROM = -99、maxNSNP = 22000、hc=<種ごとに設定した組換えの最大値>で設定した)。

3.5 複数手法を用いた分子系統解析

3.5.1 RAxML-NG, IQ-TREE2, SVDquartets

RAxML-NG および IQ-TREE2 で最尤系統樹の、SVDquartets でカルテット法によって分子系統樹の構築を行った。まず最尤系統樹の推定にあたり、vcf2phylip(v2.0)(Ortiz 2019)を用いて VCF 形式の Phylogeny dataset を phylip 形式に変換した。ModelTest-NG(v. x.y.z.) (Flouri et al. 2015)にて推定された最適な置換モデル・GTR+G4 を用いて、bootstrap 値 200 回で RAxML-NG(v. 0.9.0)(Kozlov et al. 2019)にて最尤系統樹の推定を行った。続いて ModelFinder(Kalyaanamoorthy et al. 2017)にて推定された最適な置換モデル・TVMe+R5 を設定し、ultrafast bootstrap 値 1000 回で IQ-TREE2 (v. 2.0.3.)(Nguyen et al. 2015)で最尤系統樹の推定を行った。convert_vcf_to_nexus.rb (https://github.com/mmatschiner/tutorials/blob/master/species_tree_inference_with_sn_p_data/src)を用いて Phylogeny dataset を nexus 形式に変換し、PAUP(v 4.0)(Swofford 2003)のパッケージ・SVDquartets(Chifman and Kubatko 2014; Chifman and Kubatko 2015)を用いて multispecies coalescent tree の推定を行った。

3.5.2 ASTRAL-III

3.2.4 で述べた通り、ASTRAL-III (v5.7.8) (Zhang et al. 2018)での系統解析では Haplotype phasing 済みの Phylogeny dataset を用いた。まず raxml_sliding_window.py (https://github.com/simonhmartin/genomics_general)を用いて、ゲノム領域を 20-kb ごとに区切り系統樹を推定し (Window size=20-kb、step window size=5 -kb)、合計 7,980 個の系統樹データからなる multi-tree file を作成した。この multi-tree file を入力データとし、ASTRAL-III でコンセンサスな系統樹の推定を行った。

3.5.3 SNAPP

BEAST 2.5 (Bouckaert et al. 2014; Bouckaert et al. 2019)とそれに含まれるパッケージ・SNP and AFLP Package for Phylogenetic analysis (SNAPP) を用いて、ベイズ法による系統樹の推定を行った。SNAPP で大規模なデータを解析する場合は、多くのマシンパワーが要求される。そこで Phylogeny dataset からランダムに 1000SNP を抽出した小データセットを 10 個作成し、系統解析を行った。小データセットを vcf2phylip で nexus 形式へと変換し、BEAST 2.5 に含まれる GUI・BEAUTi 上で BEAST 2.5 実行のためのパラメータが記載された XML ファイルを作成した。BEAST 2.5 上で SNAPP による系統樹の推定を 2,000,000 世代で行った。1,000 世代ごとに樹形を記録しており、最終的に 2,000 個の樹形データを含む multiple-tree file を得た。Tracer(Rambaut et al. 2018)上で、各小データセットの有効サンプルサイズが 200 を超えていることを確認した。

得られた系統樹は 3 つの異なる方法で描画した。まずは得られた 10 個の multiple-tree files を用いて、DensiTree (Bouckaert and Heled)で 2,000 個の系統樹を重ね書きした (unconcatenated tree, Figure 1-14)。次に 10 個の multiple-tree files を LogCombiner で結合し、20,000 個の樹形を DensiTree で重ね描きした (concatenated multi-trees, Figure 1-13c)。最後に LogCombiner で結合した樹形データをから、TreeAnnotator で 10% burn-in でコンセンサスな系統樹を推定し、Figtree (v1.4.4)(Rambaut 2006)にて描画した (concatenated consensus tree, Figure 1-13d)。

3.5.4 TWISST による Topology Weighting 解析

ASTRAL-III での系統解析に使用したデータセット (3.2.4) を用いて、TWISST (Martin and Van Belleghem 2017)で topology weighting の解析を行った。まず 50、100、150 bp の 3 種類の window size でゲノム領域ごとの系統樹を raxml_sliding_window.py で推定し、731,216、366,759、125,123 個の系統樹データからなる multi-tree file を得た。

Astatotilapia burtoni を外群とし、データセットに含まれる他の 10 種を 0~0 の系統解析の結果を元に 4 つのグループに分け (Figure 1-15a)、とりうる 15 種類の樹形における topology weights を TWISST で推定した。

3.6 種間の分岐年代の推定

Statistics dataset の 8 種のうち、*H. microdon* を除いた 7 種を用いた分岐年代推定を SMC++ (v1.15.4) (Terhorst et al. 2017)で行った。1 種あたりのサンプル数が少ないと、分岐年代の推定にバイアスが生じる恐れがあるため、3 サンプルのみの *H. microdon* は解析から除外することとした。まず、有効集団サイズの推定に用いた、150,000SNP 以上を含む scaffold のみで構成される VCF 形式のデータセット (3.4) を、SMC++ のコマンド “smcpp vcf2smc” で SMC 形式に変換した。以降の SMC++ での解析は、世代あたりの突然変異率を 3.5×10^{-9} としている (Malinsky et al. 2018)。続いて SMC++ の “smcpp estimate” で、過去数万年における有効集団サイズの変動を種ごとに推定した。このとき、集団史の推定を 100 回試行行うため、1 つの scaffold あたり 100 個の SNP を抽出したデータセットを 100 個作成し (bootstrap_smcpp.py (<https://github.com/popgenmethods/smcpp/issues/37>))、100 個のデータセットすべてにおける集団史を推定している。最後に SMC++ のコマンド “smcpp split” で、21 ペアすべてにおける分岐年代を推定した。

4. 結果

4.1 ビクトリア湖シクリッドの集団構造の比較と卵・稚魚食者の遺伝構造の特性

まず、ビクトリア湖シクリッドのおおまかな遺伝構造を把握するため、湖の固有種 97 種を用いて ADMIXTURE 解析を行った (Figure 1-6a ; Table 1-1)。ビクトリア湖シクリッドの祖先系統にあたるナイル水系 (*Astatotilapia bloyeti*, *A. paludinoso*, *H. gracilior*, *Thoracochromis pharyngalis*) とコンゴ系 (*A. stappersii*) のシクリッドをアウトグループとして解析に含めた。Figure 1-5a の 8 種については、1 種につき少なくとも 3 個体以上のゲノムデータを解析に用い、残りは 1 種につき 1 個体のゲノムデータを使用した (Table 1-1)。

解析結果の信頼度の指標であるエラー率は $K=2$ で最も低かった (Figure 1-6b)。この結果から、解析に用いた全種がいくつかの系統グループに分類されるというより、遺伝的に均質であるという解釈のほうがもっともらしいということが示唆された。これは、ビクトリア湖シクリッドがごく最近に種分化したため、種間の遺伝的分化度が低いことと、種間交雑による遺伝子流動が起こっているためと考えられる (Meier, Sousa, et al. 2017)。

$K=3$ では、1) ナイル水系とコンゴ水系の二つの祖先系統を特徴づける緑の要素、2) コンゴ水系の一部とマタンビハンター以外のビクトリア湖シクリッドが有するピンクの要素、そして 3) マタンビハンターを含む卵・稚魚食者と一部の *Pundamilia* 属でみられる青の要素に分けられた (Figure 1-6a)。ナイル水系とコンゴ水系のシクリッドは、ビクトリア湖シクリッドよりも古くに分岐したことから、 $K=3$ ではそれら祖先系統の要素とビクトリア湖の系統の 3 つに分かれると予想していた。しかし実際はマタンビハンターの独立した遺伝構造が反映される結果となった。他のビクトリア湖シクリッドは主にピンクの要素で構成されているが、マタンビハンターについては青一色で構成されており、他のシクリッドと遺伝的に高く分化していると言える。

また、*H. microdon* を含む他の卵・稚魚食者や、*P. nyererei* をはじめとする一部の *Pundamilia* 属で、 $K=3$ での青色の要素の比率が高かった。特に $K=6$ 以降では卵・稚魚食者のみで共有される遺伝的要素も確認されたことから、食性グループ特有のゲノム領域の存在が示唆された。Meier らによって行われたビクトリア湖シクリッドの大規模な系統解析では、*Pundamilia* 属の種は系統的に 3 つのグループに分けられ、それらのうち *Pundamilia* I が、卵・稚魚食者の姉妹系統であることが明らかとなった (Meier et al. 2023)。今回、卵・稚魚食者とアリルを多く共有していた 6 種 (*P. nyererei*、*P. sp.* ‘big blue red’、*P. igneopinnis*、*P. sp.* ‘nyererei-like’、*P. sp.* ‘orange’、*P. sp.* ‘Pundamilia-like’) は、すべて *Pundamilia* I に属する種であった。

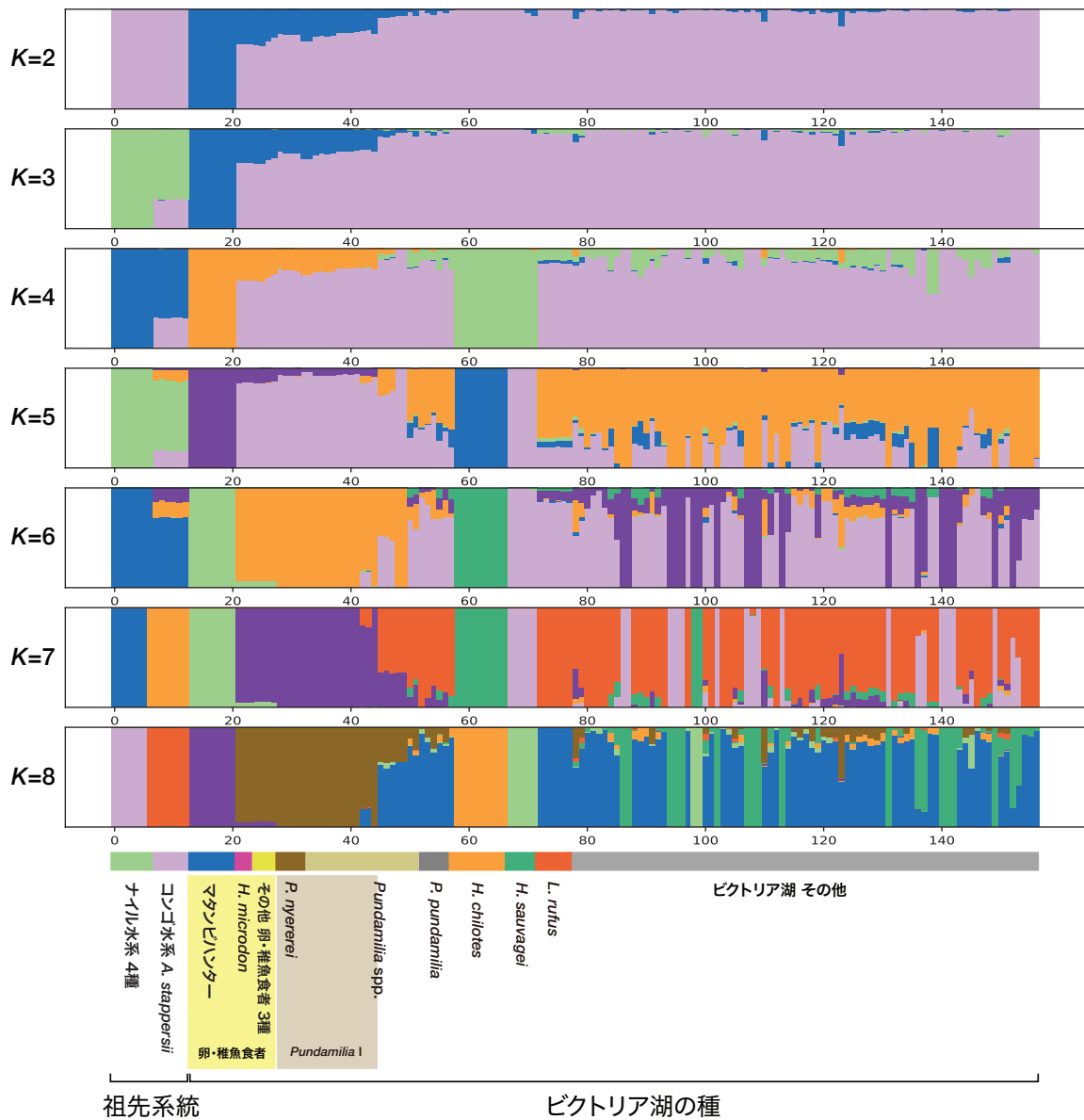
ADMIXTURE と同じ SNP データセットを用いて主成分分析も行った (Figure 1-7)。最も寄与率の高かった PC1 では、2 つの祖先系統とビクトリア湖シクリッドのクラスターを分けるような要素、すなわち水系の違いが反映された要素であることがわかる (Figure 1-7a、左)。一方で、PC2 はマタンビハンターとその他の種を分ける要素で、結果的にマタンビハンターは他の卵・稚魚食者と離れてクラスターを形成している (Figure 1-7a)。PC3 以降の主成分では *H. chilotes*、*H. sauvagei* のクラスターも確認されたが (Figure 1-7b-c)、PC2 での寄与率の高さを踏まえると、マタンビハンターがかなり独立した遺伝構造を有していると言える。

さらに、種間の遺伝的な分化度の指標である F_{ST} の値を、ゲノムデータが 1 種あたり複数個体決定されている 8 種の総当たり 28 ペア間で算出した (Figure 1-8)。マタンビハンターと他 7 種との F_{ST} は 0.31–0.41 で、他のビクトリア湖の種同士のペアでの F_{ST} は 0.11–0.28 の範囲であることを踏まえるとかなり高い値であることがわかる。同じ卵・稚魚食者の *H. microdon* とも 0.37 であった。通常、 F_{ST} が高く遺伝的な分化が生じている場合、その 2 種同士が遠縁である可能性が高い。しかし、ボトルネック効果で遺伝的多様性が低下した種で

は、たとえ近縁な種間であっても、遺伝的な分化度が高く推定されやすいことがわかっている(Chakraborty and Nei 1974; Chakraborty and Nei 1977)。

集団構造の比較の結果をまとめると、マタンビハンターは独立した遺伝構造を有しており、他種と遺伝的に高く分化していると言える (Figure 1-6a ; Figure 1-7 ; Figure 1-8)。一方で、マタンビハンターは他の卵・稚魚食者や一部の *Pudamilia* 属とアリルを共有していることも明らかとなった (Figure 1-6a)。したがって、マタンビハンターは *Pundamilia* 属と遺伝的構成を共有しつつも、強いボトルネックを受けたことによって遺伝的に高く分化していると予想される。

(a)



(b)

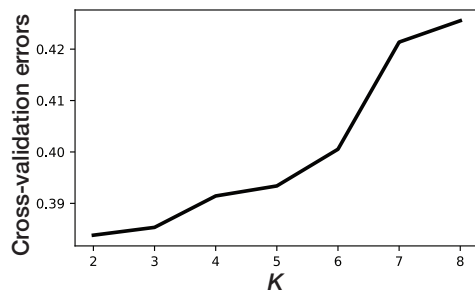


Figure 1-6 $K=8$ までの ADMIXTURE 解析の結果 (a) と各 K での解析結果の信頼度の指標となるエラー率 (Cross-validation errors) の値 (b)

ビクトリア湖シクリッドの祖先系統にあたるナイル水系(*Astatotilapia bloyeti*, *A. paludinos*, *Haplochromis gracilior*, and *Thoracochromis pharyngalis*) とコンゴ水系 (*A. stappersii*) のシ

クリッドをアウトグループとして含めた ((a) の左端)。卵・稚魚食者 (マタンビハンター、*H. microdon*、その他卵・稚魚食者 3 種 (*Lipochromis parvidens*、*Lip. melanopterus*、*Lip. cryptodon*)) は黄色で網掛けしている。また、Meier et al., (2023)で“*Pundamilia* I”とされた 5 種 (*P. nyererei*と“*Pundamilia* spp.”に含まれる *P. sp.* ‘big blue red’、*P. igneopinnis*、*P. sp.* ‘nyererei-like’、*P. sp.* ‘orange’、*P. sp.* ‘Pundamilia-like’) はベージュで網掛けしている。横軸の番号ラベルとゲノムサンプルの対応は Table 1-1“Label in ADMIXTURE”に記載している。

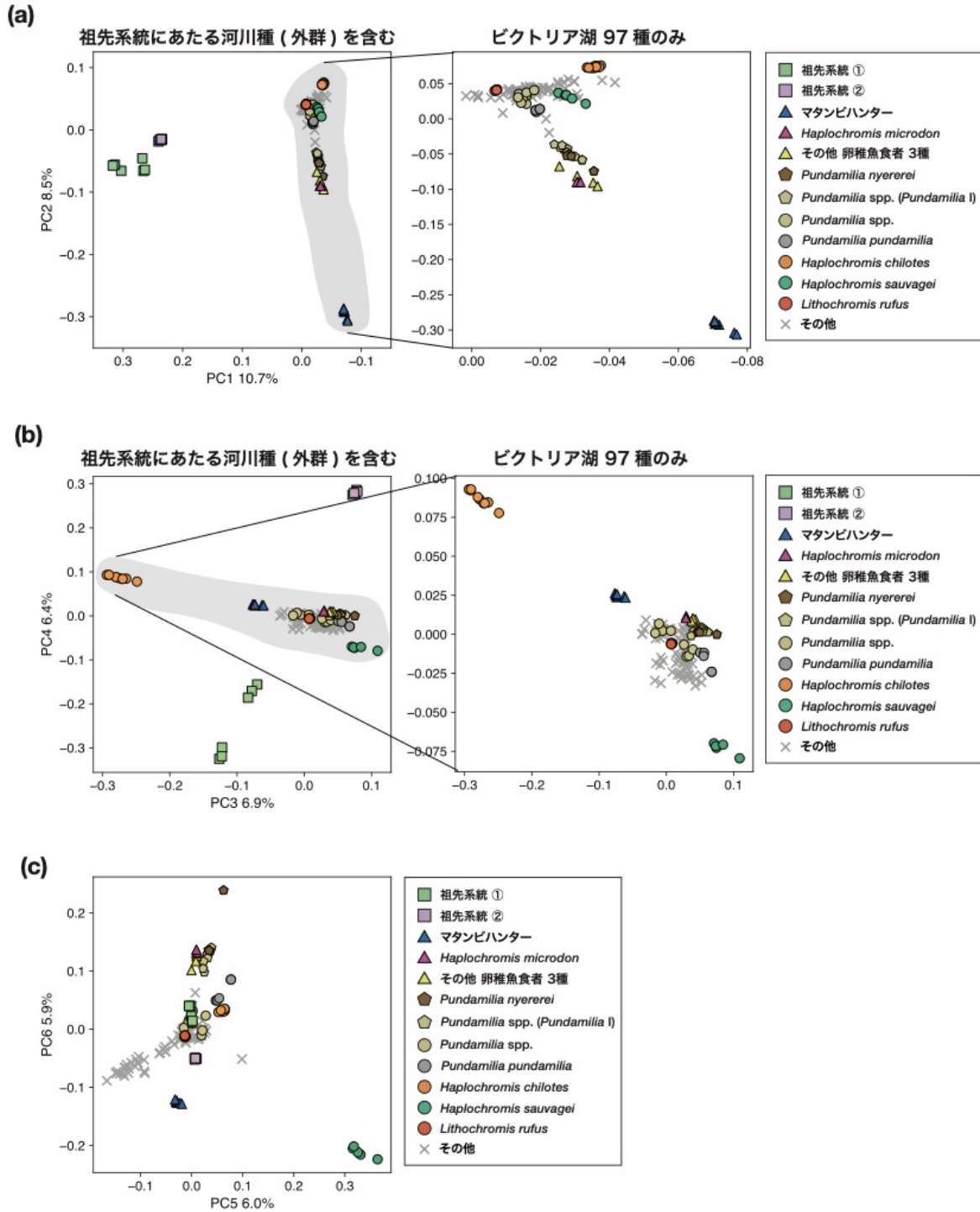


Figure 1-7 全ゲノム SNP を用いた主成分分析の結果 ((a) PC1・PC2、(b) PC3・PC4、(c) PC5・PC6)

(a)と(b)では、左が全個体での PCA の結果で、網掛けしたビクトリア湖シクリッド 97 種のクラスターを拡大したのが右図である。各主成分の寄与率は軸ラベルに記載している。

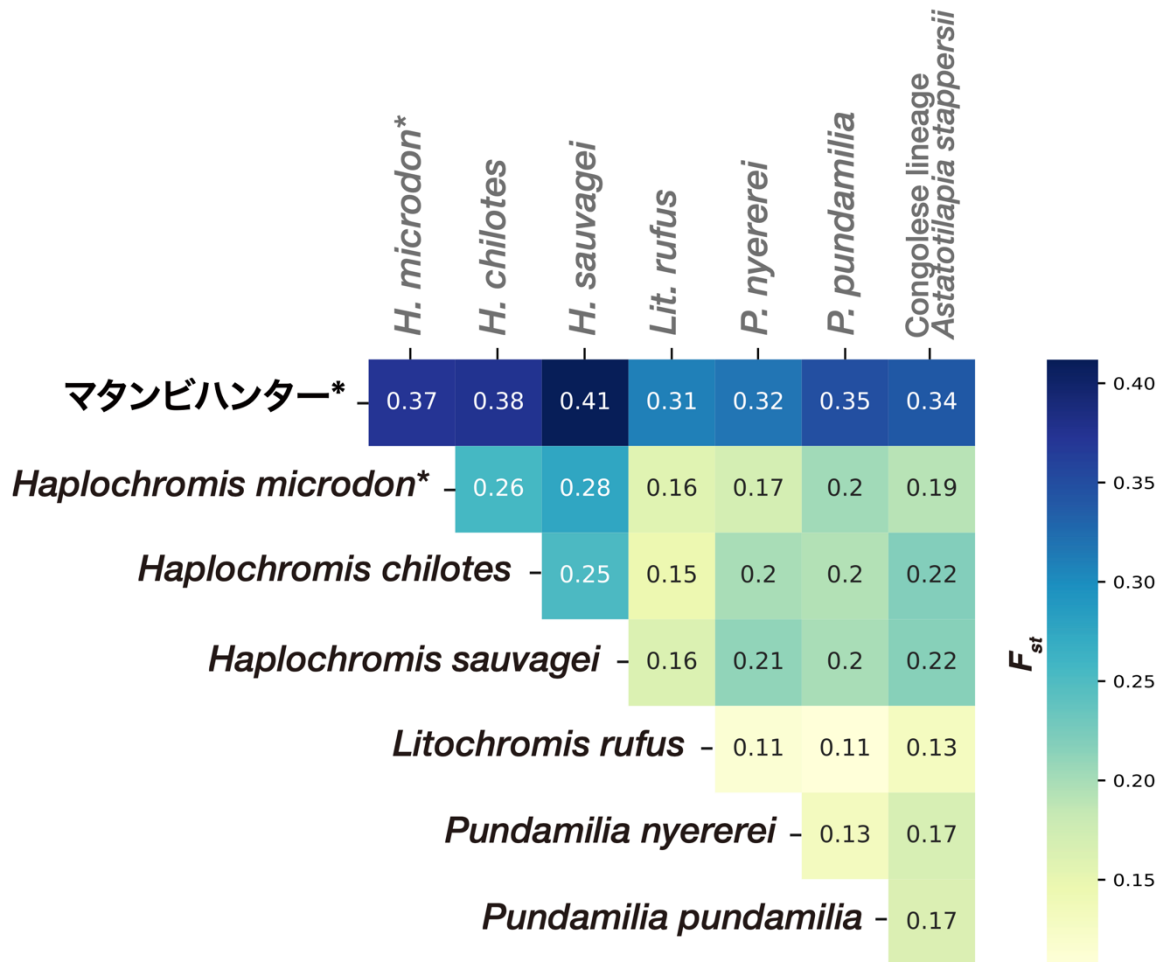


Figure 1-8 8種の総当たり28ペアにおける weighted F_{ST} の比較

卵・稚魚食者は種名の横にアスタリスクがついている。縦軸—横軸の種間で算出された F_{ST} の値をヒートマップで表しており、例えばマタンビハンター—*H. microdon* の F_{ST} は 0.37 であった。

4.2 卵・稚魚食者 2 種を含む 4 種におけるボトルネックの形跡

次に、Figure 1-5 の 8 種を用いて遺伝的統計量と集団史の推定を行い、ボトルネックを経験した種とそれらに働いたボトルネックの規模（時期や期間、強さ）を調べた。

まずは種内の遺伝的多様性や集団サイズの指標となる遺伝的統計量を複数算出し、ボトルネックを受けた集団に特徴的な傾向が見られるかどうか調べた (Figure 1-9c ; Table 1-3)。塩基多様度は、塩基配列間で異なる塩基の割合を示す統計量で、この値が低い (0 に近い) と種内の遺伝的な多様性が低いことを意味する。ゲノム全体で 10-kb ごとに塩基多様度を算出し、種間で比較したところ、卵・稚魚食者 2 種 (マタンビハンターおよび *H. microdon*)、*H. chilotes*、*H. sauvagei* の 4 種の塩基多様度が低かった (Figure 1-9a ; Table 1-3)。特にマタンビハンターの塩基多様度の平均値は解析に用いた 8 種の中で最も低く、同様に塩基多様度が低かった。個体数の少ない種では、交配相手が限られ、より近縁な個体同士の交配が起りやすくなることが知られている。そこで、ホモ接合度の期待値と実測値の差異から、種内での近交度合いを推定できる近交係数を算出した。その結果、塩基多様度が低かった 4 種で近交係数が高く、特にマタンビハンターの近交係数が最も高かった ($F_{mean} = 0.49$; Figure 1-9b ; Table 1-3)。ボトルネックした直後の種では、遺伝的浮動でランダムにアレルが固定しやすく、遺伝子座間でランダムでない相関・連鎖不平衡 (linkage disequilibrium, LD) が観測されやすい(Ohta and Kimura 1969)。そこで 10-kb 未満の距離に位置する SNP 間で連鎖不平衡係数を算出し LD decay を種間で比較したところ、マタンビハンター、*H. sauvagei*、*P. nyererei*、*P. pundamilia* において強い連鎖不平衡が見られた (Figure 1-9c ; Table 1-3)。通常、近接する SNP 同士は連鎖しやすく、その後組み換えを経て連鎖が解除され連鎖平衡に至るが、マタンビハンターでは離れた SNP 同士でも強く連鎖していることがわかった。

さらに、ゲノム全体における Runs of homozygosity (ROH) の長さの合計 (SROH) と ROH の総数 (NROH) を算出し、種間で比較を行った (Figure 1-10)。ROH はホモ接合

SNP が連続したブロックのことで、SROH と NROH の値とその相関から、ある程度集団史を推測することが可能である。例えば個体数の多い種では SROH は短く NROH も少ないが、ボトルネックを経た種は SROH が長く NROH が多くなる傾向がある(Ceballos et al. 2018)。今回解析に含めた種の中で、マタンビハンターの SROH が最も長くかつ NROH が最も多かったことから、ボトルネックを経験した集団に特徴的な傾向が見られたと言える (Figure 1-10b)。

次に塩基多様度から算出される遺伝的統計量・Tajima's D の比較を行った (Figure 1-11; Table 1-3)。遺伝子座ごとの Tajima's D から自然選択が働いた領域を検出することが可能だが、ゲノム全体の平均値を取ることで、ボトルネックなど種の大まかな集団史を推測することができる(Tajima 1989)。通常、対象とする種の集団サイズが一定の場合、ゲノム全体の平均の Tajima's D は 0 となるが、集団サイズの縮小やボトルネックが働いた場合、Tajima's D が正の値をとる(Tajima 1989; Schmidt and Pool 2002)。今回解析に用いた 8 種すべてが 0 から逸脱しており、*A. stappersii* と *L. rufus* で負の値が、その他の種は全て正の値を示した (Figure 1-11 ; Table 1-3)。しかし、他の統計量比較ではマタンビハンターの塩基多様度やホモ接合度が高かったが、Tajima's D の値は *H. chilotes* が最も高かった ($D_{mean} = 0.32$; $Z = 104.89$; $P = 0$; Table 1-3)。

さらに過去 700 世代の有効集団サイズ (N_e) を推定した結果、ボトネックの形跡が見られた 4 種において N_e の大幅な変動が確認された (Figure 1-12 (a) マタンビハンター、(b) *H. microdon*、(c) *H. chilotes*、(d) *H. sauvagei*)。 N_e の増減幅は種によって異なっているが、どの種もおよそ 40–30 世代前から N_e が減少し始め、20–10 世代前に再び回復している (Figure 1-12a–d)。シクリッドの世代時間は 1 世代あたり 1 年で、本解析に用いたサンプルのほとんどが 2018 年に採集されている。したがって、これら 4 種のボトルネックは 1970–1980 年代に始まり、10–20 年間ほど集団サイズが小さいままの状態が続き、やがて 1990–2000 年代に集団サイズが回復しはじめたことになる。残りの種については、上記 4

種のような数十年前の短期間のボトルネックは観測されず、代わりに 10 世代前〜とごく最近での N_e の低下が見られた (Figure 1-12 (e) *P. nyererei*, (f) *P. pundamilia*, (g) *L. rufus*, (h) *A. stappersii*)。

以上の結果から、卵・稚魚食者 2 種 (マタンビハンターおよび *H. microdon*)、*H. chilotes*、*H. sauvagei* の 4 種にボトルネック効果が働いたことが明らかとなった。特に卵・稚魚食者のマタンビハンターは、Tajima's D を除くすべての遺伝的統計量の比較から、最も強いボトルネックが働いた形跡が確認された (最も低い塩基多様度 (Figure 1-9a)、高い近交係数 (Figure 1-9b)、離れた SNP 間の強い連鎖 (Figure 1-9c)、ROH の長さ と 多 数 (Figure 1-10)、ボトルネック時の N_e が最低 ($N_e \approx 90$, 20 世代前; Figure 1-12a))。

Table 1-3 各種遺伝的統計量の平均値のまとめ

種名	塩基多様度 π [$\times 10^{-3}$]	近交係数 F	連鎖不平衡係数 r^2	Tajima's D			
				平均値	分散値	z-score	p-value
マタンビハンター	0.73	0.49	0.35	0.07	1.63	15.73	1.E-55
<i>H. microdon</i>	1.14	0.23	nan	0.01	0.6	2.57	1.E-02
<i>P. nyererei</i>	1.29	0.09	0.28	0.18	0.47	77.45	0.E+00
<i>P. pundamilia</i>	1.3	0.08	0.28	0.18	0.49	76.32	0.E+00
<i>H. sauvagei</i>	1.13	0.22	0.3	0.02	0.76	7.60	3.E-14
<i>H. chilotes</i>	1.12	0	0.22	0.32	0.77	104.89	0.E+00
<i>L. rufus</i>	1.4	0.06	0.19	-0.16	0.42	-73.21	0.E+00
<i>A. stappersii</i>	1.73	-0.15	0.22	-0.2	0.4	-89.95	0.E+00

塩基多様度・近交係数・連鎖不平衡係数は、ゲノム全体で得られた値の平均値を個体ごとに計算し、種ごとの平均値を表に記載している。*H. microdon* はサンプル数が少なかったため ($n = 3$)、連鎖不平衡係数の解析から除外した。

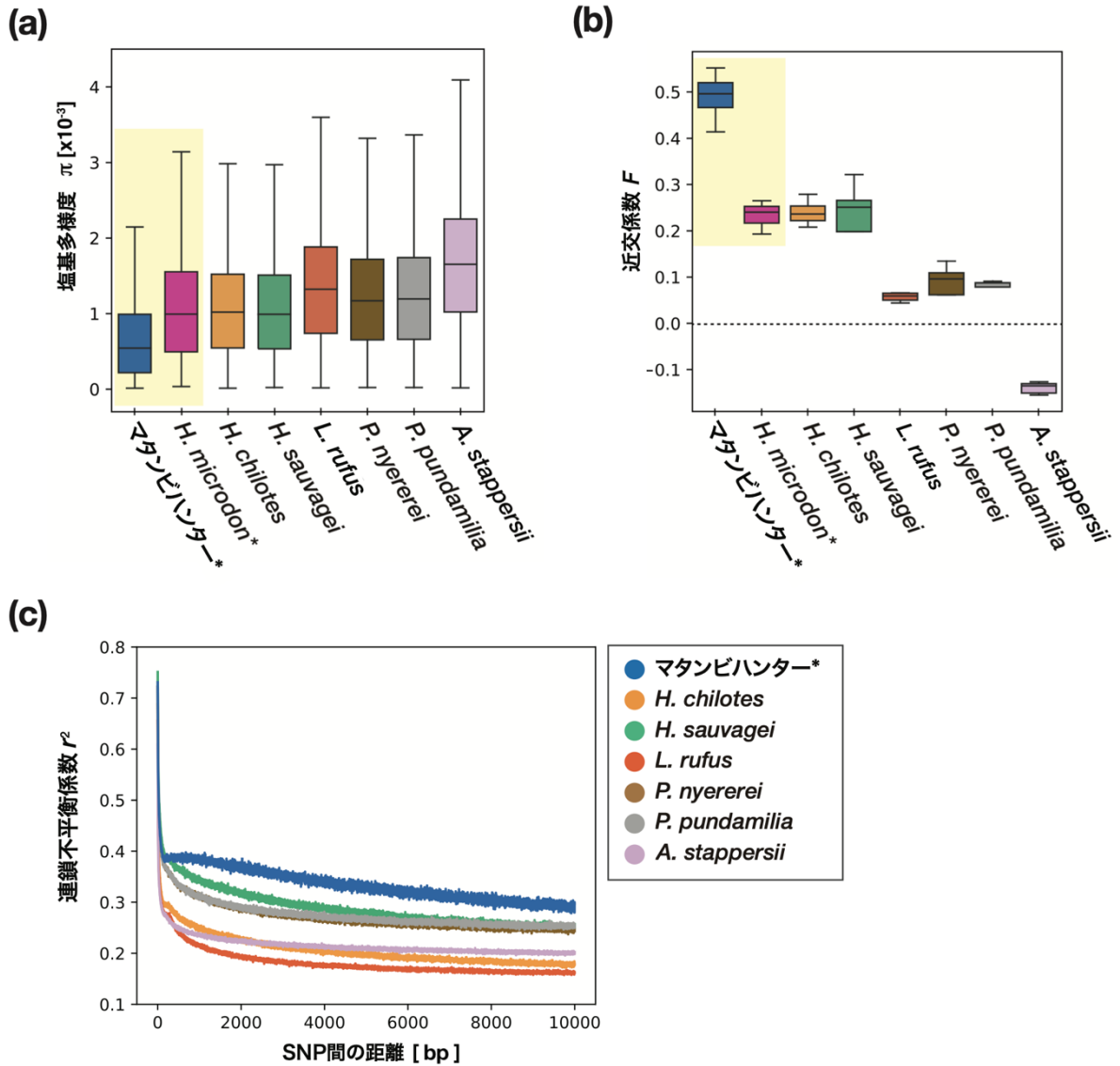


Figure 1-9 ボトルネックの有無の指標となる遺伝的統計量 ((a) 塩基多様度 π 、(b) 近交係数 F 、(c) 連鎖不平衡係数 r^2) の種間比較

卵・稚魚食者のマタンビハンターと *H. microdon* は黄色の網掛けと種名横の*で示している。各統計量の平均値は別途 Table 1-3 に記載している。*H. microdon* はサンプル数が少なかったため ($n = 3$)、(c) 連鎖不平衡係数の解析から除外した。

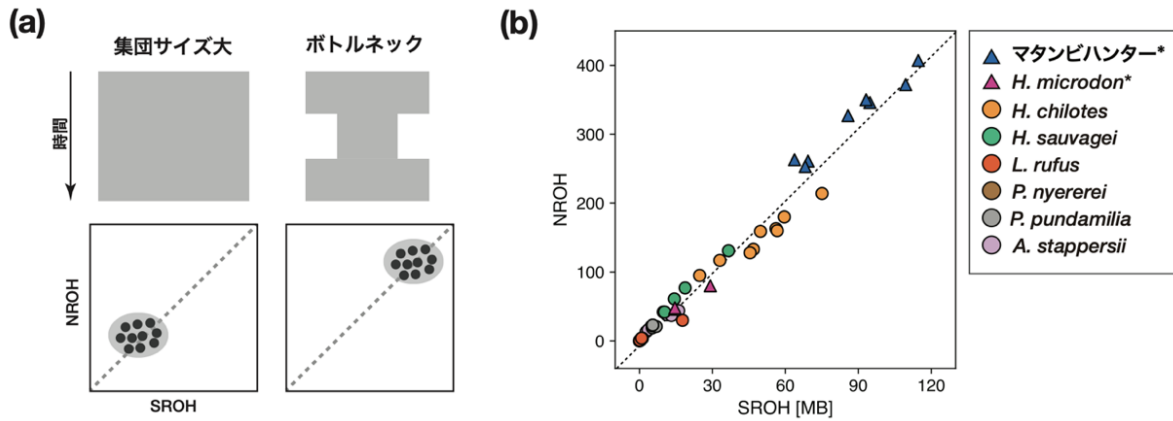


Figure 1-10 集団史別の Runs of homozygosity (ROH) の傾向 (a) と解析結果 (b)

ROH の全長 (the sum total length of ROH, SROH) と ROH の総数 (the total number of ROH, NROH) を算出することで、集団サイズの変動のおおまかな推察が可能である(Ceballos et al. 2018)。(a) 集団サイズが大きい場合や集団サイズが最近拡大した場合、SROH は短く NROH は少なくなる。一方で、集団がボトルネックを経験した場合、SROH は長く NROH は多くなる傾向がある。(b) SROH・NROH の個体ごとの比較。ホモ接合領域が 150 kb 以上連続した領域を ROH と定義した。

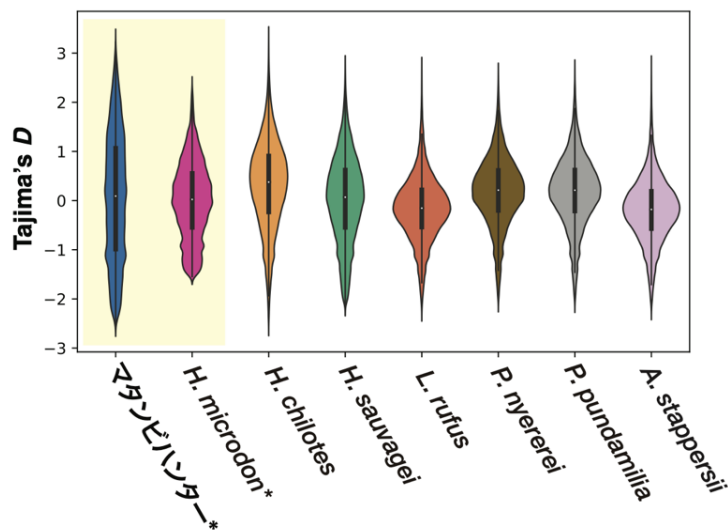


Figure 1-11 10 kb window で算出されたゲノムワイド Tajima's D の種間比較

卵・稚魚食者のマタンビハンターと *H. microdon* は黄色の網掛けと種名横の * で示している。各統計量の平均値は別途 Table 1-3 に記載している。

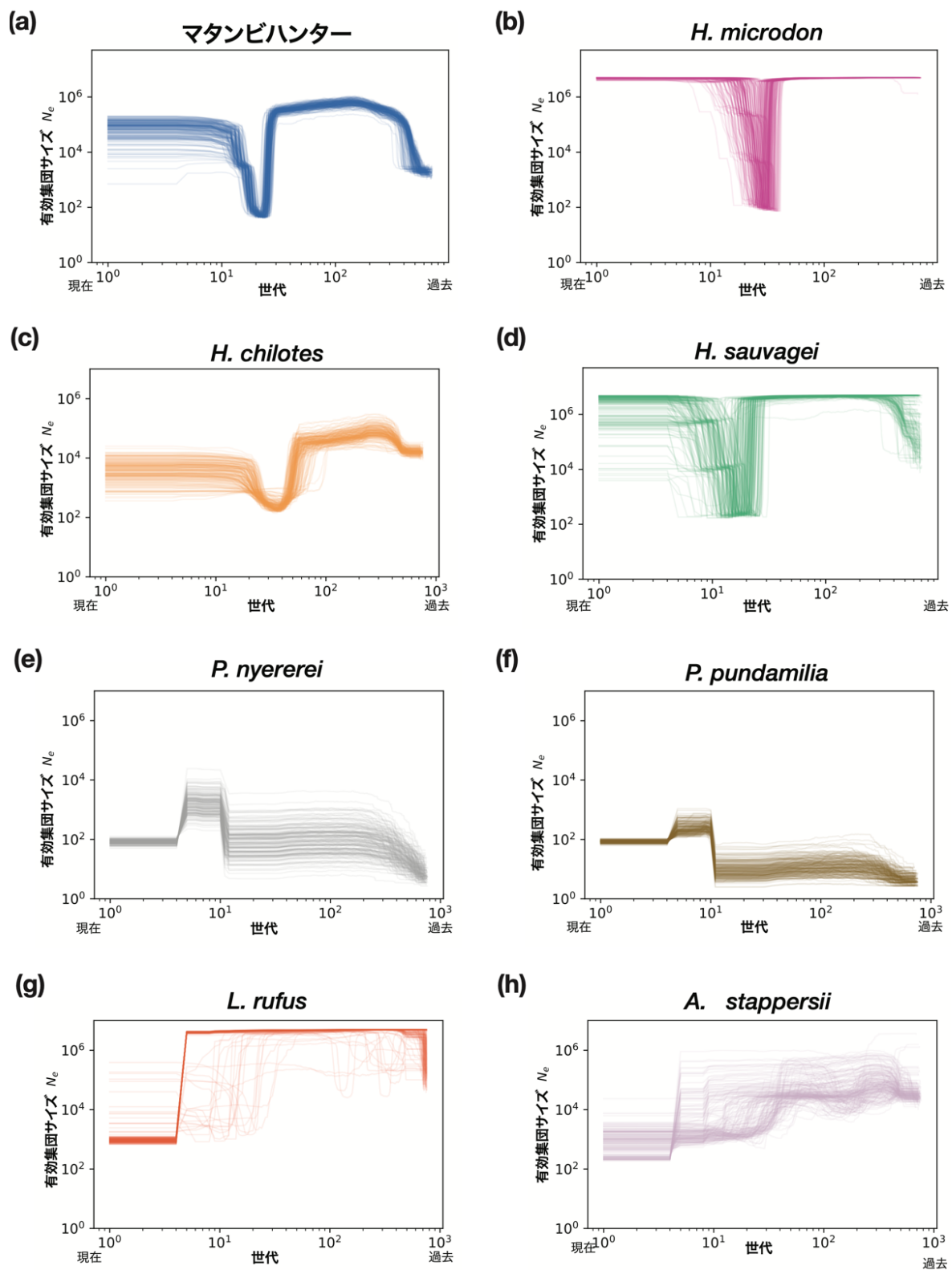


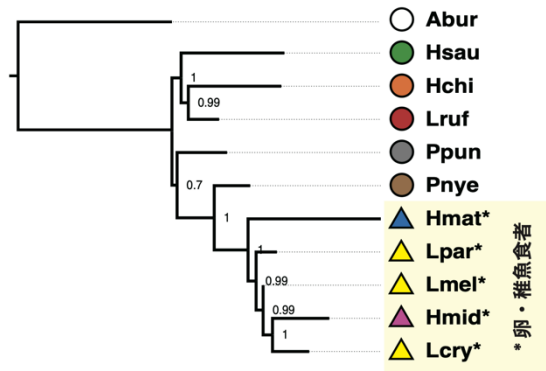
Figure 1-12 過去 700 世代 (700 年) における有効集団サイズ (N_e) の変動

(a) マタンビハンター、(b) *H. microdon*、(c) *H. chilotes*、(d) *H. sauvagei*、(e) *P. nyererei*、(f) *P. pundamilia*、(g) *L. rufus*、(h) *A. stappersii*。GONE での N_e の推定を 200 回試行繰り返し、得られた集団史を重ね書きしている。

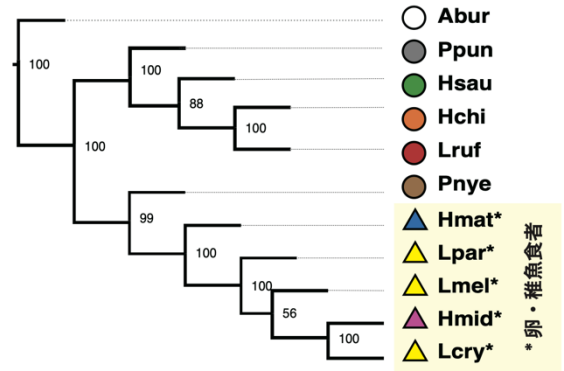
4.3 卵・稚魚食者は強い単系統性を示した

次に、マタンビハンターの遺伝的分化度の高さ (Figure 1-6a ; Figure 1-7 ; Figure 1-8) が、他種と系統的に離れているからではなく、ボトルネック効果が働いたことで生じたことを裏付けるため、卵・稚魚食者を複数種含め系統解析を行った。1 種あたり複数個体が含まれたデータセットを用いて、5 つの異なる系統解析手法で系統樹を構築した。3 種類の Coalescence-based method (Figure 1-13 (a) ASTRAL-III、(b) SVDquartets、(c-d) SNAPP) および 2 種類の最尤法 (Figure 1-13 (e) RAxML-NG、(f) IQ-TREE2) で推定された系統樹から、SNAPP で推定された樹形を除いたすべての系統樹で卵・稚魚食者 5 種 (マタンビハンター(Hmat)、*H. microdon* (Hmid)、*L. parvidens* (Lpar)、*L. melanopterus* (Lmel)、*L. cryptodon* (Lcry)) が単系統群を形成した。SNAPP は解析に多くのマシンパワーを要することから、ランダム抽出した 1000SNP で構成されるデータセット 10 個を作成し、並列的に解析することで計算負荷の分散を図った (詳細な解析手法は 0 3.5.3 SNAPP に記載している)。樹形の推定は 200 万世代で行い、1000 世代ごとに樹形を記録し、これら全てのデータセットから得られた系統樹を LogCombiner で連結し、DensiTree にて重ね描きしたものが Figure 1-13c で、Figure 1-13c から推定された maximum clade credibility tree をコンセンサスな樹形とした (Figure 1-13d)。コンセンサス系統樹では、マタンビハンターは卵・稚魚食者の系統群には属さず、ビクトリア湖シクリッドのクレードの根元で分岐している。重ね描き系統樹でもコンセンサス系統樹と同じ樹形が、その事後確率が高いことを意味する青色で塗られている。しかし、重ね描き系統樹ではコンセンサス系統樹以外の樹形も含まれており、さらに連結する前のデータセットごとの重ね描き系統樹でも、10 個中 7 個のデータセットでマタンビハンターが卵・稚魚食者の系統群にふくまれる、すなわち SNAPP 以外の手法で推定された系統樹と同じ傾向が見られた。したがって、マタンビハンターは他の卵・稚魚食者と同じ系統グループとしてまとめ、食性グループとしての強い単系統性が示唆された。

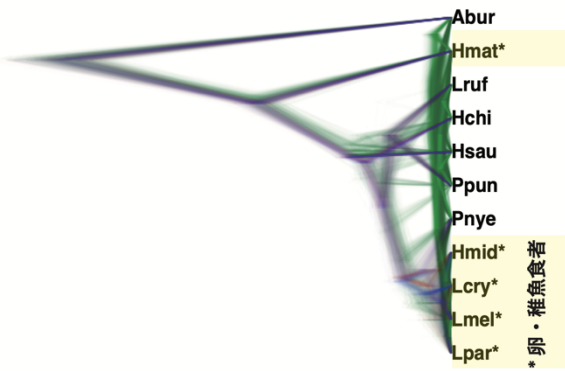
(a) ASTRAL-III



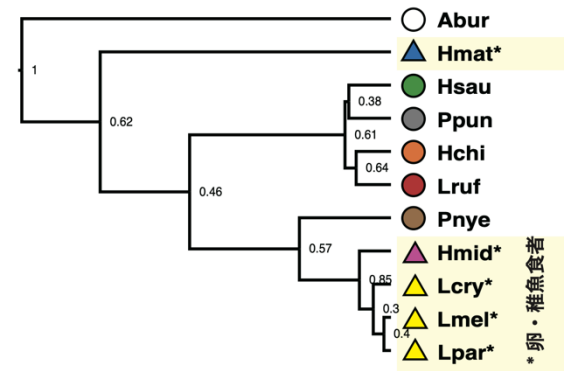
(b) SVDquartets



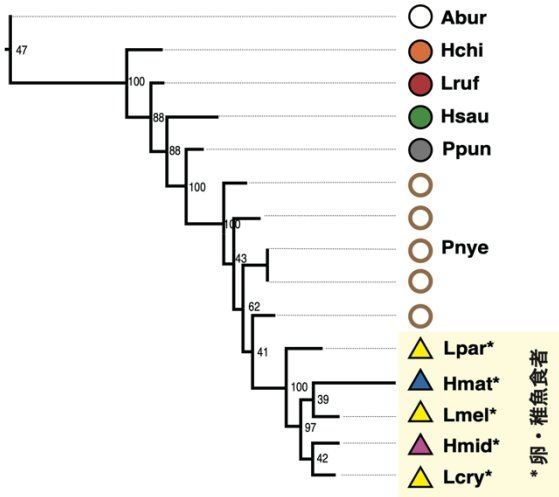
(c) SNAPP DensiTree



(d) SNAPP Consensus Tree



(e) RAxML-NG



(f) IQ-TREE2

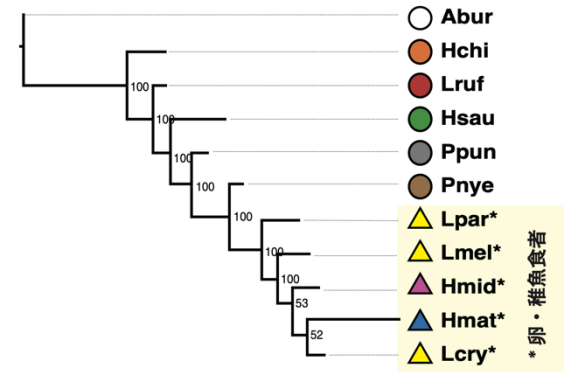


Figure 1-13 異なる5つの系統解析ソフトによって推定された系統樹

すべての系統樹で河川種 *Astatotilapia burtoni* (Abur) を外群とした。種名の略称は Table 0-1 に記載している。卵・稚魚食者は黄色の網掛けとアスタリスク (*) で示している。分岐の信頼度を表す事後確立 (a, d) あるいはブートストラップ値 (b, e, f) を各ノード上に記している。(b)

(e) (f) は個体間の系統樹が推定されたが、一部を除くほぼすべての個体が種で単系統群を形成したため種でまとめた ((e) の *P. nyererei* (Pnye) は個体間が側分岐になったため、種でまとめず白抜きの円で示している)。(a) 7.980 個の遺伝子系統樹 (20-kb sliding window、5-kb overlap) から ASTRAL-III によって推定された系統樹 (b) SVDquartets によって推定されたコアレット系統樹 (ブートストラップ=100 回)。ただし SVDquartets は手法の特性上枝長は推定されない。(c) SNAPP で推定された全樹形の DensiTree による重ね書き系統樹とそれらから推定された Maximum clade credibility 系統樹 (d)。DensiTree は最もよく観測された順番に樹形を青>赤>緑>濃緑で色分けしている。(e) RAxML-NG によって GTR+G4 モデルで推定された最尤系統樹 (ブートストラップ=200 回) (f) IQ-TREE2 によって TVMe+R5 モデルで推定された最尤系統樹 (Ultra-fast bootstrap=1000 回)

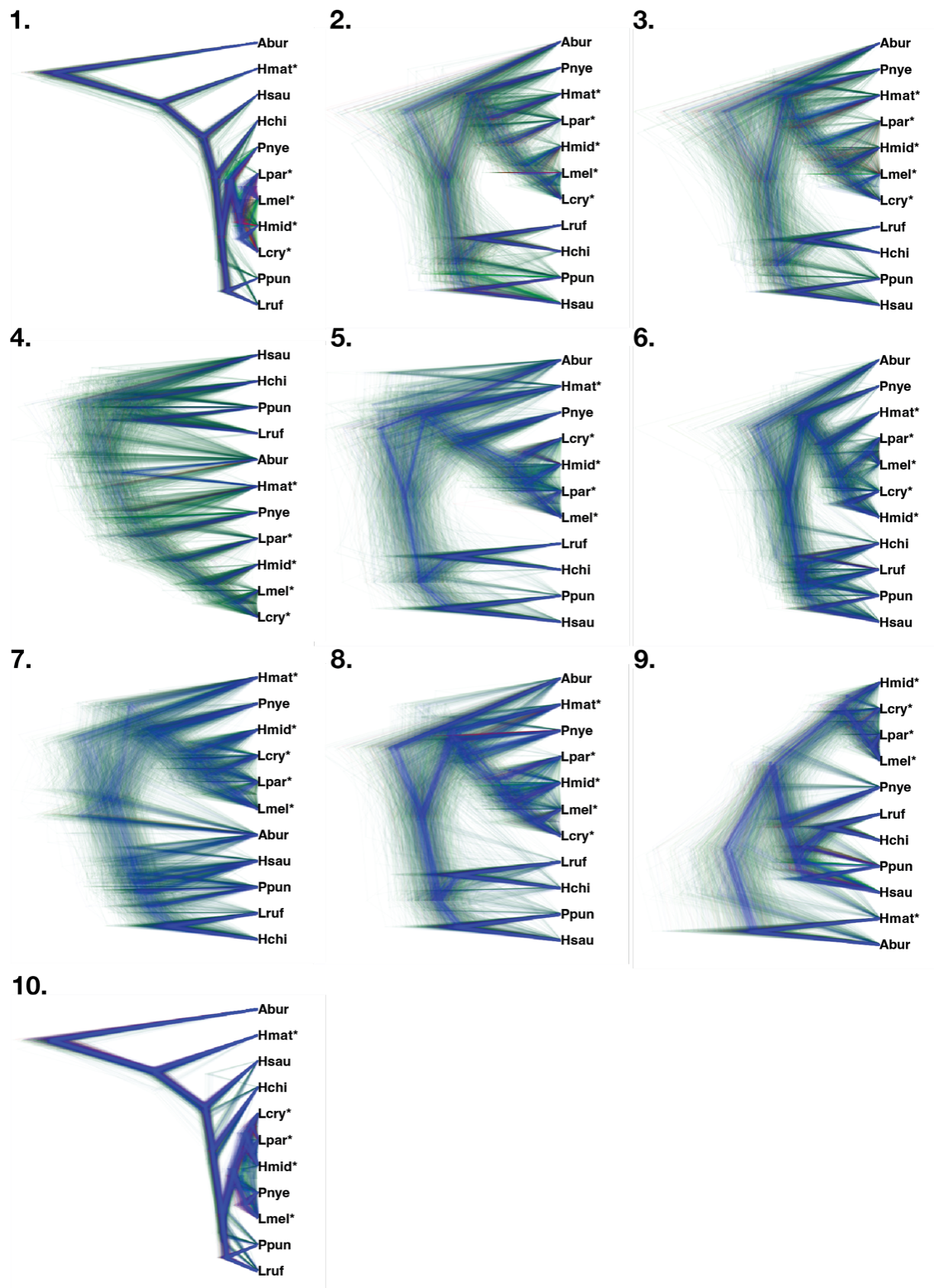
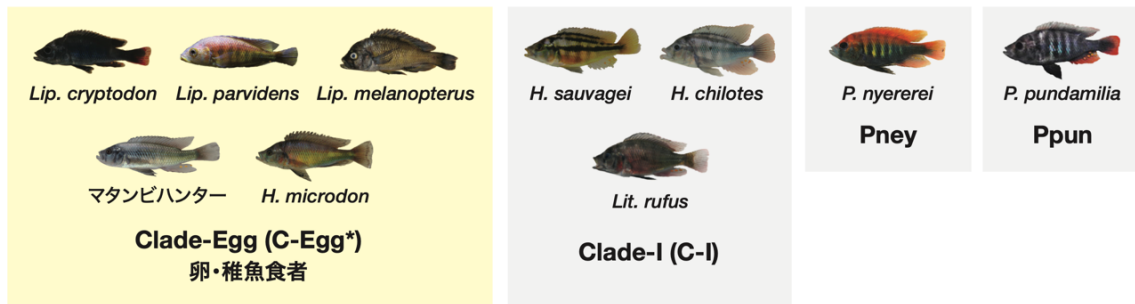


Figure 1-14 SNAPP でのデータセットごとの重ね描き系統樹とコンセンサス樹形（青太字）
 データセットの番号は系統樹の左上に記している。すべての系統樹で河川種 *Astatotilapia burtoni* (Abur)を外群とした。種名の略称は Table 0-1 に記載している。卵・稚魚食者はアスタリスク（*）で示している。事後確率が高かった順に青、赤、緑、濃緑で樹形が色分けされている。

Figure 1-13 で得られた樹形の確からしさをさらに検証するために、ソフトウェア TWISST で topology weighting 解析を行った (Figure 1-15)。Topology weighting 解析は、ゲノム全体を数十～数百 bp ごとのウィンドウに区切り、ウィンドウごとに系統樹を推定し得られた multi tree file をインプットとし、各樹形が得られた頻度を算出する解析である (Martin and Van Belleghem 2017)。TWISST では複数種を系統的グループとしてまとめることができ、例えば解析に含める種を近縁種で構成されるグループにまとめることで、属間での系統関係などを推定することができる (Scherz et al. 2022)。今回は Figure 1-13 の解析結果を考慮し、外群の他に 4 つの系統グループに分けた (Figure 1-15a)。4 つの系統グループがとりうる樹形は全部で 15 種類あり、ゲノム全体における 15 個の樹形の出現頻度 (average weighting) を、3 種類のウィンドウサイズ (50 SNPs、100 SNPs、150 SNPs) で算出した (Figure 1-15b)。最も average weighting が高かったのは Topo 1 ((out, (C-I, Ppun), (Pnye, C-Egg));) で、これは SVDquartets で推定された樹形と一致する (Figure 1-13b ; Figure 1-15b)。Average weighting が高かった上位 3 つの樹形 (topo1、topo2、topo3) は、全て *P. nyererei* (Pnye) と卵・稚魚食者 (Clade-Egg, C-Egg*) が単系統になる樹形であり、この傾向は Figure 1-13 の系統樹とも一致する。実際に 4.1 で行った ADMIXTURE 解析でも、*P. nyererei* が卵・稚魚食者と遺伝的要素を共有していたことも踏まえると、両者は姉妹系統であると言える (Figure 1-6a)。

(a)



(b)

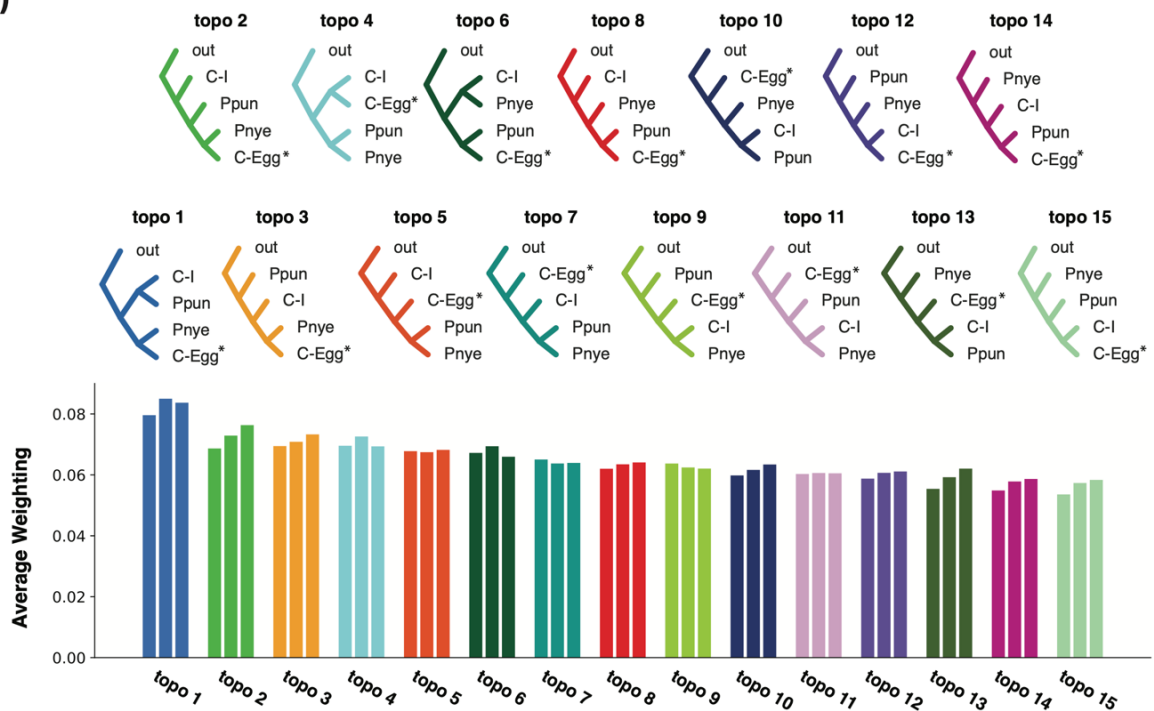


Figure 1-15 TWISSTで4つの系統グループ (a) で topology weighting を行った結果 (b)

(a) 前項の系統解析の結果 (Figure 1-13) を元に分けた、ビクトリア湖シクリッド 10 種の系統グループ。卵・稚魚食者 5 種を Clade-Egg (C-Egg*)、しばしば単系統群を形成していた 3 種を Clade-I (C-I)、*P. nyererei*、*P. pundamilia* の 4 グループで (b) の解析を進めた。(b) 4 グループにおいてとりうる 15 種類の樹形 (上段) とそれらの樹形がゲノム全体で得られた頻度 (average weighting、下段)。河川種 *Astatotilapia burtoni* (Abur) を外群とした。下段の棒グラフでは average weighting が高かった順番に横軸の樹形を並べ替えている。Average weighting は 3 種類の SNP window (50 SNPs、100 SNPs、150 SNPs) で算出しており、棒グラフの左、中央、右と対応している。

4.4 マタンビハンターは他種と同じ時期に祖先系統と分岐した

最後に、マタンビハンターが他種と同時期に種形成したかどうかを確かめるため、解析に用いた7種の総当たり21ペアにおける分岐年代を推定した (Figure 1-16 ; Table 1-4)。ビクトリア湖シクリッドのペア間 (河川種・*Astatotilapia stappersii* (Asta) 以外の15ペア) の平均分岐年代は19,158年であった (Table 1-4)。この値は、先行研究で予想されていたビクトリア湖シクリッドの適応放散時期と一致している (Johnson et al. 2000; Meier, Marques, et al. 2017; Meier et al. 2023)。*A. stappersii* とマタンビハンターの分岐年代はおよそ40,000年で、これは *A. stappersii* と他のビクトリア湖シクリッドとの分岐年代と同時期である。マタンビハンターと *A. stappersii* 以外の種との分岐年代も、ビクトリア湖シクリッド間の平均分岐年代と同程度であった。これらの結果を踏まえると、マタンビハンターの種形成は他のビクトリア湖シクリッド と同時期に生じたと言える。

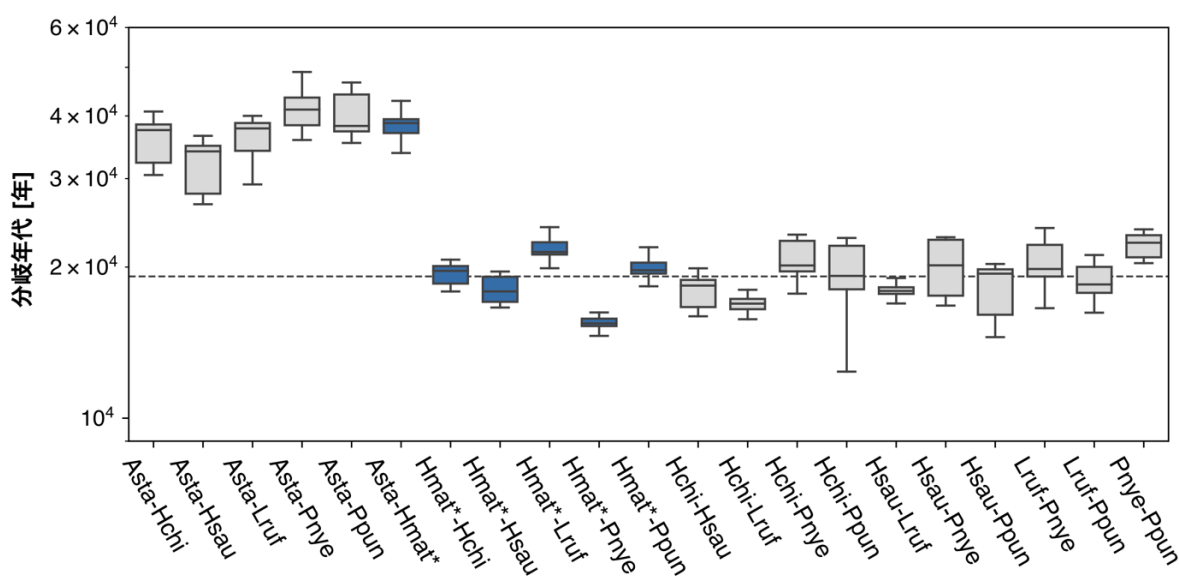


Figure 1-16 7種の総当たり21ペアにおいて推定された分岐年代

分岐年代の推定は、世代あたりの変異率 (the per-generation mutation rate) を 3.5×10^{-9} とし (Malinsky et al. 2018)、一つのペアあたり100回試行繰り返し、推定された分岐年代の分布を箱ひげ図で示している。種名の略称は Table 0-1 に記載している。卵・稚魚食者 (マタンビハンター) は種名の横にアスタリスク (*) をつけており、マタンビハンターが含まれるペアは青色の箱ひげ図で示している。ビクトリア湖シクリッドのペア間 (*Astatotilapia stappersii* (Asta) 以外の15ペア) の平均分岐年代 (19,158年 ; Table 1-4) を点線で示している。

Table 1-4 各ペアにおける分岐年代の平均値

分岐年代 平均値 [年]	
Asta-Hchi	35,915
Asta-Hsau	31,780
Asta-Lruf	36,683
Asta-Pnye	41,211
Asta-Ppun	40,551
Asta-Hmat	38,387
Hmat-Hchi	19,379
Hmat-Hsau	18,060
Hmat-Lruf	21,688
Hmat-Pnye	15,493
Hmat-Ppun	20,038
Hchi-Hsau	17,824
Hchi-Lruf	16,909
Hchi-Pnye	20,751
Hchi-Ppun	19,769
Hsau-Lruf	17,965
Hsau-Pnye	20,079
Hsau-Ppun	17,978
Lruf-Pnye	20,546
Lruf-Ppun	18,834
Pnye-Ppun	22,056
ビクトリア湖種間 平均	19,158

分岐年代の推定は一つのペアあたり 100 回行っており、それらの平均値を算出した。種名の略称は Table 0-1 に記載している。ビクトリア湖種間平均は、外群として用いた河川種・*Astatotilapia stappersii* (Asta) を含まない、15 ペアの平均分岐年代である。

5. 考察

本章では、外来種であるナイルパーチの勢力拡大が、在来種・シクリッドへ与えた遺伝的な影響を、大規模な比較ゲノム解析によって評価した。4.1 では、ビクトリア湖シクリッドの網羅的な集団構造の比較、および祖先系統にあたる河川種とのアレル共有程度を調べた。4.2 では遺伝的統計量と個体数の変動を推定し、ナイルパーチの勢力が拡大したタイミングで個体数を減らした種の特定制と、遺伝構造の変化を明らかにした。マタンビハンターは独立した遺伝構造を有しているものの、4.3 複数の手法を用いた系統解析と 4.4 分岐年代の推定から、あくまで卵・稚魚食者の系統群に属することも明らかとなった。マタンビハンターは最も強いボトルネックを経験しており、これが高い遺伝的分化の要因となった可能性が高いと言える。

5.1 複数のシクリッドにおけるナイルパーチ由来のボトルネック

遺伝的統計量と集団史の比較から、今回解析に含めた 8 種のうちマタンビハンター、*H. microdon*、*H. chilotes* そして *H. sauvagei* の 4 種が、ナイルパーチの勢力拡大と同時期に個体数を減らし、ボトルネック効果を受けたことが明らかとなった。

推定された集団史から、これら 4 種の個体数は 40–30 世代前（1970 年代–1980 年代）から減少しはじめており（Figure 1-12 (a) マタンビハンター、(b) *H. microdon*、(c) *H. chilotes*、(d) *H. sauvagei*）、これはビクトリア湖シクリッドの大規模な絶滅が報告された時期と一致している（Ogutuhwayo 1990; Kaufman 1992; Witte, Goldschmidt, Goudswaard, et al. 1992）。その後、集団サイズが小さい状態 ($N_e \geq 1,000$) が 10–20 世代ほど続き、20–10 世代前（1990–2000 年代）から再び集団サイズが回復し始め、最終的に現在の集団サイズまで増加している（Figure 1-12a-d）。実際に、2000 年代以降一部のシクリッドで個体数の回復が確認されており（Witte et al. 2007; Natugonza et al. 2021）、本研

究で推定されたボトルネック後の個体数の回復時期と一致している。これら 4 種にボトルネック効果が働いた形跡は、遺伝的統計量の値からも確認された (Figure 1-9 ; Figure 1-10 ; Table 1-3)。マタンビハンター、*H. microdon*、*H. chilotes*、*H. sauvagei* の塩基多様度は低く、個体数が減ったことで遺伝的な多様性が低下したと言える (Figure 1-9a)。この 4 種では近交係数も高かったことから、個体数が少ないために集団内の任意交配が保たれなくなり、近交が生じやすくなったと予想される (Figure 1-9b)。SROH と NROH の比較からも、これら 4 種はボトルネックを経験した集団に特徴的な ROH の傾向を示した (Figure 1-10b)。連鎖不平衡解析では、特にマタンビハンターと *H. sauvagei* において、遠い SNP 間でも強い連鎖の傾向が見られた。集団がボトルネックを経験すると、遺伝的浮動の効果が強まることでアレルがランダムで固定しやすくなり、結果としてゲノム上で全く関係のないアレル間が強くと連鎖しやすくなる (Ohta and Kimura 1969)。まとめると、集団史からボトルネックが検出された 4 種は、遺伝的統計量の比較においてもボトルネックをした集団に特徴的な値を示した。

また、遺伝的分化の指標となる統計量・ F_{ST} を用いた種間の遺伝的分化度の比較において、ボトルネックを経験した 4 種は他種との F_{ST} が比較的高かった (Figure 1-8)。ボトルネック効果が働いた集団では、遺伝的な分化度が高く推定されやすいことから (Chakraborty and Nei 1974; Chakraborty and Nei 1977)、これらボトルネックの影響で F_{ST} が高く推定された可能性が高い。

集団史の変動、遺伝的統計量の値、そして遺伝的な分化度の高さから、マタンビハンター、*H. microdon*、*H. chilotes*、*H. sauvagei* の 4 種は、ナイルパーチの侵略が原因でボトルネックを受けた可能性が高いと言えるが、一方でボトルネックが始まった時期・期間の長さ・強さについては種間で差が見られた (Figure 1-9 ; Figure 1-10 ; Figure 1-11 ; Figure 1-12a-d ; Table 1-3)。このボトルネックの種間差は、4 種の生息環境や生態、食性・捕食様式の違いによって、ナイルパーチ侵略の影響の受けやすさに差があったと予想される。例

例えば、マタンビハンターと *H. microdon* は卵・稚魚食であるのに対し、*H. chilotes* と *H. sauvagei* は昆虫食である (Table 0-1)。Tajima's D の比較では *H. chilotes* で最も高い値が得られ、これは最近の集団サイズの縮小を意味している (Tajima 1989; Schmidt and Pool 2002)。一方で、マタンビハンター、*H. microdon*、*H. sauvagei* ではゲノム平均の Tajima's D は 0 に近く、これは直近の集団サイズが一定で、変動していないことを意味する (それぞれ $D_{mean} = 0.07$ 、 $D_{mean} = 0.01$ 、 $D_{mean} = 0.18$; Table 1-3)。通常、ゲノム平均の Tajima's D の値にはその種の集団史を反映が反映されるが、同時にボトルネックの時期・期間・強さの影響も非常に受けやすいことで知られている (Schmidt and Pool 2002; Gattepaille et al. 2013)。また、例えば直近数十年で生じた比較的最近のボトルネックは、Tajima's D による検出が難しいことも指摘されている (Ramakrishnan et al. 2005)。したがって、本研究で算出された Tajima's D は、ナイルパーチに起因する個体数の変動ではなく、それ以前の集団史を反映している可能性が高い。

先行研究から、卵・稚魚食者など生態ピラミッドの頂点にいた魚食性のシクリッドが、ナイルパーチの侵略の影響を特に強く受けたと予想していた (Witte, Goldschmidt, Goudswaard, et al. 1992; Seehausen 1996; McGee et al. 2015)。本研究では卵・稚魚食者 2 種 (マタンビハンターおよび *H. microdon*) において、ごく最近・短時間で強いボトルネック効果が働いた形跡が見られた (Figure 1-9; Figure 1-10; Figure 1-12a-b)。実際に、マタンビハンターと *H. microdon* は同時期に個体数の減少がみられることから (Figure 1-12a-b)、両種ともにナイルパーチの勢力拡大をきっかけに個体数を減らした可能性が高いと言える。

P. nyererei、*P. pundamilia*、*L. rufus* に関しては、ナイルパーチ侵略に起因するボトルネックの痕跡は見られなかった。これらの 3 種では高い塩基多様度・低い近交係数が得られ、SNP 間の強い連鎖も見られず、ROH 領域も短くかつ総数も少なかった (Figure 1-9; Figure 1-10; Figure 1-11)。どれもボトルネックが働いた集団では見られない特徴であることから、

これらの種はナイルパーチの勢力拡大の影響を、あくまでも種レベルでは受けていないと考えられる。有効集団サイズに着目すると、確かに直近の5世代で有効集団サイズが減少しているが、これはナイルパーチが生態系へ影響を与えた時期よりも後である (Figure 1-12e-h)。

今回ボトルネックが検出された種、あるいはされていない種で共通の形態、生態、生息環境、生息地域 (Table 1-5) は確認されず、こういった要素が個体数を減らすきっかけとなったかは不明である。今後、対象とする食性グループの多様性を拡大するとともに、ゲノムデータの収集を進め、解析規模を拡大することで、ナイルパーチ侵略の影響を受けやすい要因や条件をより詳細に解明できることが期待される。

Table 1-5 ボトルネックの解析に用いたシクリッド7種のビクトリア湖ムワンザ湾近辺における分布地域の一覧

地域	ボトルネックあり				ボトルネックなし		
	マタンビハンター	<i>Haplochromis microdon</i>	<i>Haplochromis sauvagei</i>	<i>Haplochromis chilotes</i>	<i>Pundamilia nyererei</i>	<i>Pundamilia pundamilia</i>	<i>Lithochromis rufus</i>
ムワンザ湾内							
Buyago Rocks							○
Marumbi Island							○
Matumbi Island							○
Luanso Island							○
Shadi Rocks	○						○
Northern Luanso Bay							○
Nyamatala Islands					○	○	○
Nyameruguyu Island				○	○	○	
Kilimo Island	○	○	○	○	○		○
Nyegezi Bay		○	○		○		
Nyaruwambu Bay	○					○	○
Chankende Island		○	○				○
Kissenda Island	○				○	○	
Gabalema Islands	○					○	
ムワンザ湾外							
Chamagati Island				○	○		
Juma Island			○	○	○	○	
Bwiru Peninsula		○	○			○	
Makobe Island				○	○	○	
Ruti Island				○	○	○	
Mabibi Island				○	○	○	
Southern Speke Gulf				○	○		
Eastern Speke Gulf			○				
合計	5	4	6	8	11	10	10

Mizoiri et al. (2008) の採集地別種リスト (p. 253-254) を一部改変している。地域名は、上からムワンザ湾の南側から北側の順番に並べられている。本研究でボトルネックの痕跡が見られた4種をグレーで網掛けしている。

5.2 なぜマタンビハンターのボトルネックが強かったのか

興味深いことに、ボトルネックが働いた4種のうち、マタンビハンターが最も強いボトルネックを受けたことが明らかとなった。マタンビハンターはボトルネック時の有効集団サイズが最も小さく、ボトルネック後に元の集団サイズの0.03%にまで減少している(30世代前の $N_e \approx 292,785$ 、20世代前の $N_e \approx 90$; Figure 1-12a)。現地調査から予想されていたマタンビハンターの個体数の少なさが、ゲノム比較からも観測された(Seehausen 1996; Mizoiri et al. 2008)。さらに、塩基多様度が最も低く他のボトルネックを受けた種の半分程度であった ($\pi_{mean} = 0.73 \times 10^{-3}$; Figure 1-9a; Table 1-3)。マタンビハンターの遺伝的な多様性は、特定の遺伝子座 (Nikaido et al. 2014)やミトコンドリア DNA (Figure 1-2b)に限らずゲノム全体で低下していたことが明らかとなった。マタンビハンターは近交係数も最も高く (Figure 1-9b)、ゲノム全体で SNP 間の連鎖が最も多く生じており (Figure 1-9c)、ROH の長さも数も最も多い (Figure 1-10b) など、Tajima's D 以外の統計量全てでボトルネックの傾向が最も強く得られた。

さらに独立した遺伝構造を有しており、同所的に生息する種とも遺伝的に高く分化していることが明らかとなった (Figure 1-6; Figure 1-7; Figure 1-8)。しかし、系統解析からマタンビハンターはあくまで卵・稚魚食者のクレードに属しており (Figure 1-13)、他種との分岐年代もビクトリア湖シクリッド間の平均分岐年代と同程度であった (Figure 1-16)。したがって、ボトルネックを経て遺伝的浮動の効果が強まったことで、近縁種やビクトリア湖の系統間で共有するアレルが極端に減ってしまったことで、近縁種とも遺伝的な分化が生じたと考えられる(Chakraborty and Nei 1974; Chakraborty and Nei 1977)。

マタンビハンターのボトルネックが最も強かった主要な要因として、ニッチの競合による個体数の減少に加え、本種特有の形態的および生態的特徴がナイルパーチによる捕食圧を受けやすかったと予想される。マタンビハンターは細長い体型やグレー色の体色といった、他の

同所的に生息するシクリッドには見られない形態的特徴を有している (Figure 1-5a)。シクリッドは食性に応じた特徴的な頭蓋構造を持つことで知られているが、マタンビハンターの下顎外列歯の傾斜は、他の卵・稚魚食者では確認されていない独自の形質である (Seehausen 1996)。これらの形態的特徴がナイルパーチによる捕食を受けやすい要因となった可能性がある。また、シクリッドは生息地が異なっても、岩場や浅瀬といった同様の環境を選好する傾向があるが、マタンビハンターに関しては、生息地によって生息する環境が異なることが確認されている。例えば、Kilimo Island や Nyegezi Bay の集団は岩場環境で見られる一方、Nyaruwambu Bay の集団は浅い砂地で確認されている (Mizoiri et al. 2008)。このことから、マタンビハンターは遊泳性で、ナイルパーチの捕食圧によりさらされやすかった可能性がある。こうした形態的・生態的特性の組み合わせが、マタンビハンターの強いボトルネックを引き起こしたと考えられる。

マタンビハンターはボトルネック後に生息範囲が拡大したことがわかっている (Figure 1-17)。マタンビハンターの現在の主要な生息地は、Kilimo Island や Nyegezi Bay などムワンザ湾の北部で、本研究で用いたサンプルもいずれかの地域で採集している (Figure 1-5b)。マタンビハンターは、Seehausen (1996) によって初めて形態および生態が報告された種である。この報告は、1991 年から 1996 年にかけて実施された現地調査に基づくものであり、調査範囲には現在の主要な生息地であるムワンザ湾北部も含まれていた。しかし、マタンビハンターの生息は、ムワンザ湾中央部の Matumbi Island に限定して確認されている。一方で、Mizoiri et al. (2008) が 2004–2005 年にかけて行った現地調査では、マタンビハンターは Matumbi Island で生息が確認されなかった。このことから、Matumbi Island の集団が絶滅したか、あるいは個体数が極めて少ないと予想される。マタンビハンターは Seehausen (1996) の現地調査以降に、Matumbi Island から北部に分布を拡大したか、あるいは Matumbi Island の集団が絶滅し、北部へ移入した可能性がある。

以上の要因を踏まえ、マタンビハンターの集団史について考察すると、1990年代に Matumbi Island に生息していたマタンビハンターの集団は、その形態的およびニッチの競争などの生態的要因によってナイルパーチの捕食圧を強く受け、大幅な個体数の減少を経験し、ボトルネックが生じたと推測される (Figure 1-17)。その後、北側への分布拡大あるいは移動を遂げた結果、ナイルパーチの捕食圧を回避できた可能性がある。また、同時期には乱獲によるナイルパーチ個体数の減少が確認されており (Matsuishi et al. 2006)、これらの要因が相まって、マタンビハンターの個体数はボトルネック以前の水準にまで回復したと推察される (Figure 1-12a)。ナイルパーチ以外の要因によって北側への移動が引き起こされ、ボトルネックが発生した可能性も否定できないが、現時点で同時期にナイルパーチ以外の生態的または環境的变化が生じたという報告は確認されていない。さらに、マタンビハンターのボトルネック発生時期、他のシクリッド種がナイルパーチの影響を受けた時期、そして分布域の変化が生じた年代がすべて一致している。マタンビハンターのボトルネックとその後の分布変化は、主にナイルパーチの捕食圧およびその時期における生態的動態の影響を強く受けた結果であると考えられる。

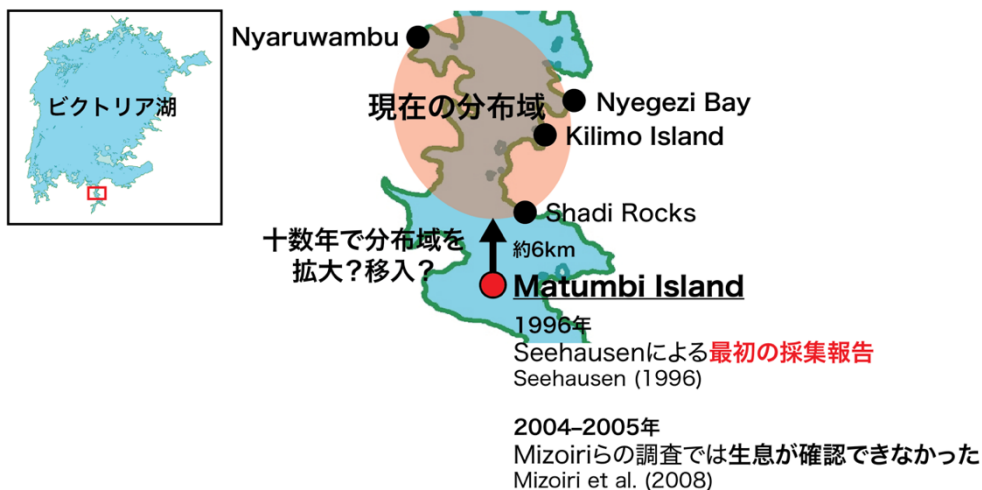


Figure 1-17 マタンビハンターの年代別生息地の変化

マタンビハンターの生息地 (右の地図) は、左上ビクトリア湖の地図上で赤枠で示した場所を拡大したものである。

5.3 ビクトリア湖における卵・稚魚食者の系統的起源

本研究は、ビクトリア湖の卵・稚魚食者のゲノムデータを用いた詳細な系統解析・集団遺伝学的解析を行い、特殊な食性グループの遺伝的特徴を明らかにすることに成功した。

先行研究で示されていたように、複数の手法によって推定された系統樹で、卵・稚魚食者は単系統群を形成したことから、食性グループとして系統的に他系統から独立していると言える(Wagner et al. 2013; McGee et al. 2020; Meier et al. 2023)。ビクトリア湖の卵・稚魚食者は湖の固有種で、食性グループで共通の形質を有することで知られている。例えば縦の可動域の大きい顎、比較的厚い唇、小さく歯茎に埋まった歯、そして少ない内列歯数などが挙げられる(Seehausen 1996)。系統解析で見られた強い単系統性と、共有される形態的特徴から、ビクトリア湖の卵・稚魚食者は複数系統に分けられる、あるいは移入したのではなく、湖内で一度だけ派生した系統であると考えられる。

近年、Meier らが行った大規模なゲノム比較から、ビクトリア湖の系統の祖先にあたるエドワード湖・キブ湖の卵・稚魚食者からビクトリア湖の種まで、食性グループ内で共有されているアレルの存在が確認されている(Meier et al. 2023)。ADMIXTURE 解析では、卵・稚魚食者のみで共有されるゲノム領域の存在も確認された (Figure 1-6a $K = 6-7$ の薄緑の要素、 $K = 8$ の紫の要素)。一方で、卵・稚魚食者、*Pundamilia* 属、その他のシクリッドにおいて共有される要素もあった。今後、卵・稚魚食者とそれらの近縁種を用いて、詳細なゲノム比較や遺伝子発現の比較を行うことで ecological specialization やユニークな食性を司る分子メカニズムの解明が期待される。

さらに、本研究では *Pundamilia* 属の一部の種 (*Pundamilia I*) が卵・稚魚食者の姉妹系統であることを強く支持する結果が得られた。近年行われた、ゲノムデータを用いた属間の系統関係を推定した先行研究では、卵・稚魚食者の単系統性とそれらの姉妹系統にあたる *Pundamilia* 属の種が *Pundamilia I* と定義された(McGee et al. 2020; Meier et al. 2023)。ゲノムワイドで identity by descent (IBD) ブロックのネットワーク解析では、卵・稚魚食

者と *Pundamilia* I が IBD を多く共有することも明らかとなっている (McGee et al. 2020)。本研究で行った ADMIXTURE 解析でも、卵・稚魚食者が全ての *Pundamilia* 属と遺伝的要素を共有するわけではなく、特に *Pundamilia* I の種と多くアリルを共有していることも示唆された (Figure 1-6a)。興味深いことに、Seehausen (1996)では、ムワンザ湾西部で *P.* sp. ‘nyererei paedophage’ と呼ばれる、*P. nyererei* と卵・稚魚食者の形態的特徴を併せ持つ新種が報告されている。卵・稚魚食者と *P. nyererei* の系統関係を考慮すると、両系統の表現型を有するハイブリッドなシクリッドは、両系統の種分化の途中段階にある状態を反映している可能性もある。また、*Pundamilia* I に分類される種は動物プランクトン食または昆虫食であり、卵・稚魚食は報告されていない。そのため、卵・稚魚食者と *Pundamilia* I の間で分化しているアリルが、卵・稚魚食性の食性適応を理解する鍵となると言える。

5.4 ILS に陥りやすい生物種における系統解析

本研究では、1 種あたり複数個体の全ゲノムデータを用い、複数の異なる手法によって系統樹を構築し、その妥当性を検証した (Figure 1-13 ; Figure 1-14 ; Figure 1-15)。

従来の研究では、主にミトコンドリア DNA や特定の遺伝子配列など部分的な遺伝情報を基にした系統解析や、1 種あたり 1-2 個体のゲノムデータを用いた単一手法による系統解析が一般的であった (Samonte et al. 2007; Wagner et al. 2013; McGee et al. 2020; Meier et al. 2023)。一方で、ビクトリア湖に生息するシクリッドは、分岐年代が浅いことに加え、一部の系統間で交雑が生じているため、種間の遺伝的分化度が低いことが知られている (Meier, Sousa, et al. 2017)。これにより種内多型が多く観察され、incomplete lineage sorting (ILS) が生じやすいことが指摘されている (Nikaido et al. 2014; Salzburger 2018)。こうしたシクリッドの遺伝的特徴を考慮すると、1 個体分のデータを種の代表として用いる従来の手法では、進化史の正確な解析に限界があると言える。本研究では、1 種あたり複数個体の全

ゲノムデータを活用することで、シクリッドのように ILS が生じやすい種における系統解析の精度向上を図った。

さらに、本研究では系統解析を異なる複数の手法によって行うことで、ILS によって生じる樹形の不確かさの克服を試みた。特に、最近種分化したことに起因するビクトリア湖シクリッドの高いヘテロ接合度を扱うにあたり、本研究ではこうした種間の系統解析に特化した手法である ASTRAL-III (Johnson et al. 2000)にて系統樹の推定を行った。ASTRAL-III は haplotype phasing 済みの多型データを入力データとし、ヘテロ接合サイトも樹形の推定に考慮するため、理論上はビクトリア湖シクリッドの系統解析に最適であると言える。今回用いた ASTRAL-III と SVDquartets はどちらも coalescent 理論に基づいた樹形の推定方法で、*P. pundamilia* の分岐を除いて同じ樹形を示した (Figure 1-13a-b)。先行研究で行われた集団史のシミュレーションでは、ムワンザ湾外の Makobe Island の *P. pundamilia* と *P. nyererei* の集団間において、過去 6,000 年間で少なくとも 2 回の遺伝子流動が生じたことが予想されている (Meier, Sousa, et al. 2017)。このような交雑イベントの存在は、系統関係の推定に影響を与えうる要素の一つであり、*P. pundamilia* の分岐の推定結果が合わなかった要因となった可能性が高いと言える。

興味深いことに、TWISST による topology weighting 解析でもゲノムワイドの ILS の傾向が見られた (Figure 1-15)。Topology weighting では、対象とする種間で交雑があったとしても、ゲノム全体で window ごとの系統樹を推定したときに、最も高頻度で得られた樹形が種の系統樹と一致するという理論に基づいている (Martin and Van Belleghem 2017)。今回の解析では、15 種類の樹形のうち topo1 が最も高頻度で得られたが、topo1 と他 14 種類の樹形の average weightings の差は小さく、topo2-topo15 の average weightings にも大きな差は見られなかった (Figure 1-15b)。したがって、ゲノム領域のどこに注目するかで樹形が変化しやすく、ILS が非常に生じやすいということが、TWISST の解析からも示唆された。

5.5 ビクトリア湖シクリッドの分岐年代

分岐年代の推定結果は、ビクトリア湖の系統が過去数万年の急速な適応放散を経て誕生したという進化史シナリオを支持するものであった (Figure 1-16)。ビクトリア湖周辺の湖・河川に生息する祖先系統の種形成はおよそ 100,000–200,000 年前から始まったと言われていた (Verheyen et al. 2003; Seehausen 2006; Genner et al. 2007; Bezault et al. 2011)。ビクトリア湖は、およそ 15,000 年前に大規模な干ばつを経験している (Johnson et al. 2000)。この干ばつで固有種が完全に絶滅したか否かは長年議論され続けてきたが、近年明らかとなった化石記録から、干ばつの期間にもいくつかの種は生存しており、これらがビクトリア湖で生じた適応放散の祖先系統にあたる可能性が示唆された (Meier et al. 2023; Ngoepe et al. 2023; Ngoepe et al. 2024)。全ゲノムデータを用いて行われた分岐年代の推定では、*H. sauvagei*–*H. chilotes*、*H. sauvagei*–*L. rufus*、*H. chilotes*–*L. rufus* の分岐年代はそれぞれ 14,700、15,600、8,800 年であった (Nakamura et al. 2021)。本研究では、より祖先的な河川種である *A. stappersii* とビクトリア湖の種間の平均分岐年代は 37,421 年で、湖固有種間では 19,158 年であった (Figure 1-16 ; Table 1-4)。したがって、先行研究よりも分岐年代がやや古めに推定されたと言えるが、分岐年代推定はゲノムデータの質や SNP のフィルタリング条件で結果が変動しやすく、こうした解析条件の違いが結果に影響を与えた可能性がある。ミトコンドリア DNA と一部の核遺伝子配列を用いた分岐年代推定では、*H. sauvagei* が他のビクトリア湖シクリッドよりも古い、41,300 年前に分岐したと推定され、本種が適応放散以前に分岐した種であることが示唆されていた (Samonte et al. 2007; Takeda et al. 2013)。しかし、本研究では *H. sauvagei* を含め、特定の種が他種よりも古くに分岐したという結果は得られなかった (Figure 1-16 ; Table 1-4)。本研究で得られた分岐年代は、地質学的なイベントが生じた年代とも矛盾しておらず、シクリッドの適応放散を理解する上で重要な知見を提供したと言える。

6. 結論

本研究は、ビクトリア湖における外来種侵略が在来シクリッド集団の個体数減少および遺伝構造に与えた影響を、大規模な比較ゲノム解析を用いて世界で初めて解明した。これまで観測データによって示唆されていた外来種ナイルパーチの侵略によるシクリッドの個体数変動および遺伝的变化を、全ゲノムデータに基づき定量的に評価した。結果として、複数のシクリッド種において、個体数減少後のボトルネック効果の痕跡を検出した。さらに、肉食性シクリッド、特に卵・稚魚食者においては、ナイルパーチとのニッチ競合により、より強い負の影響を受けていたことが明らかとなった。この成果は、類似する生態系における外来種問題への適応管理や、保全戦略の策定においても重要な示唆を与えることが期待される。

第2章 卵・稚魚食性シクリッドの食性適応メカ

ニズムの解明

1. 要旨

卵・稚魚食者は、栄養価の高い魚卵や稚魚を効率的に摂取する、独自の捕食戦略を進化させてきた。卵・稚魚食者は、卵をくわえたメスに攻撃し、卵を奪うという特殊な捕食様式をとることで知られ、この捕食様式に適した顎、歯と歯列、そして唇といった頭蓋・顔面の形質を獲得した。さらに、卵や稚魚はタンパク質や脂質を多く含んでおり、これらの栄養素を効率的に代謝するための生理機能の向上も予想される。本章では、卵・稚魚食者の食性そのものの分子メカニズムに着目し、食性適応に関わった遺伝子を明らかにすることを目指した。具体的には卵・稚魚食者と、その姉妹系統でありながら食性の異なる *Pundamilia* 属とのゲノムおよび遺伝子発現の比較を行った。ゲノム比較から、卵・稚魚食者と *Pundamilia* 属間で配列が大きく異なっている高度分化領域を特定し、これらの変異が卵・稚魚食者に特徴的な頭蓋・顔面構造の獲得に寄与した可能性が示唆された。さらに、卵・稚魚食者では脂肪酸や脂質の輸送と代謝に関与する遺伝子群の発現量が、有意に増加していることが明らかとなった。これらの遺伝子領域の周辺には高度分化領域も存在しており、食性に関連する遺伝子発現の調節に寄与している可能性が示唆された。今回、卵・稚魚食者の食性適応に伴う形態的、および生理的進化の分子メカニズムについて新たな知見が得られ、ビクトリア湖のシクリッドにおける食性多様性とその進化的意義の理解の一助となることが望まれる。

2. 背景

生物にとって「食べる」という行為は、生存と繁殖を維持するために欠かせない普遍的な行動である。何をどうやって捕食するかは、生態的地位を占めるための重要な要素であり、生物は捕食対象や捕食様式に応じて特異的な戦略や形質を発達させてきた。

ビクトリア湖におけるシクリッドの著しい種分化の要因の一つとして、大規模な食性適応が挙げられる。ビクトリア湖のシクリッドは、捕食対象と捕食様式に基づく 20 の食性グループに分類され、その中でも卵・稚魚食性は極めてユニークな食性であると言える。

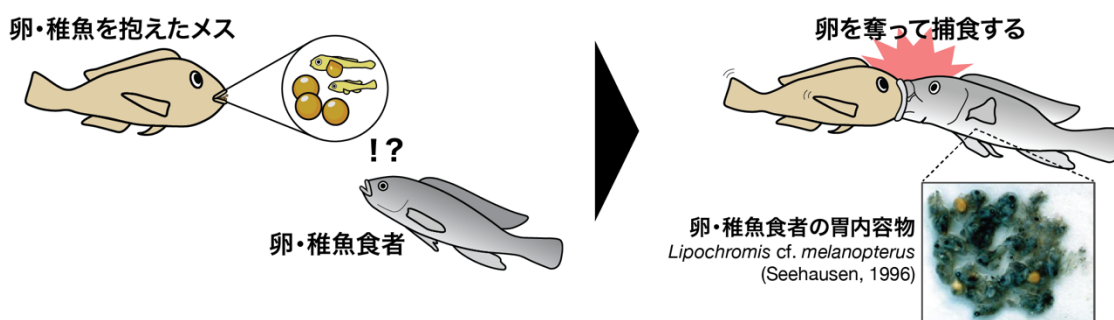
卵・稚魚食者は、発育段階にある卵・稚魚を捕食することで、効率的に高エネルギー源を獲得する一方で、捕食対象の特異性から、他の捕食者とは異なる捕食様式や戦略を進化させてきた (Figure 2-1)。卵・稚魚食者は、卵・稚魚をくわえたメスに攻撃し、卵を奪って捕食するという特殊な捕食様式をとる (Figure 2-1 上段)。卵・稚魚食者では、この捕食戦略に特化した頭蓋・顔面構造が見られる。例えば内列歯の数が他の系統では 3-4 列なのに対し、卵・稚魚食者では 0-1 列と少ない点や、上下の可動域が広く頑強な顎、分厚い唇、そして歯茎に埋没した小さい歯などが挙げられる (Figure 2-1 下段)。これらの形質は捕食効率を高めるために重要な役割を果たすと考えられている (Greenwood 1974; Ribbink and Ribbink 1997; Vranken 2017)。さらに、魚卵の主な構成要素はタンパク質と脂質である (Kamler 1992)。こうした高栄養価な食事を可能とするためには、タンパク質や脂質の代謝・貯蔵などの機能が強化されていると考えられる。しかし、こうした特異的な捕食様式、形態、そして生理学的な機能の進化メカニズムについては、未だ十分な研究がなされていないのが現状である。

本章では、卵・稚魚食性に焦点を当て、卵・稚魚の代謝や捕食様式に適応した生態・形態の分子基盤を解明することを目指す。前章で行った系統解析および先行研究から、卵・稚魚食性を持つシクリッドは、*Pundamilia* 属と姉妹系統の関係にあることが示されている (Meier et al. 2023)。これにより、卵・稚魚食性は *Pundamilia* 属との共通祖先において一

度だけ獲得された形質であることが予想される。そこで、*Pundamilia* 属の代表種として *Pundamilia nyererei* および *P. sp. 'big blue'*、そして卵・稚魚食者であるマタンビハンター および *Haplochromis microdon* を用いて、ゲノム解析および遺伝子発現解析を実施した (Figure 2-2)。比較ゲノム解析から、*Pundamilia* 属-卵・稚魚食者間で高度に遺伝的に分化している遺伝子座を特定し、卵・稚魚食者の代謝能や形態との関連性について考察を行った。さらに、肝臓組織における遺伝子発現の比較を通じて、卵・稚魚食性に関連する代謝系や捕食戦略に適応した分子基盤の解明を目指した。

生態

生態卵・稚魚を奪うための特殊な捕食様式



形態

捕食様式に適した頭蓋・顔面構造

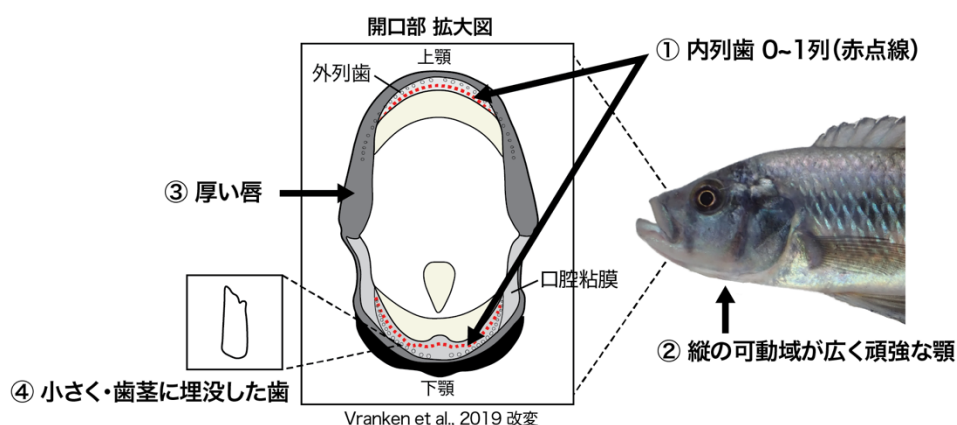


Figure 2-1 特殊な捕食戦略に特化した卵・稚魚食者の捕食行動 (上) と頭蓋・顔面の特徴 (下)

3. 材料と手法

3.1 追加ゲノムデータの新規配列決定・配列取得

卵・稚魚食者の *Haplochromis* sp. “matumbi hunter” ($n=7$)と *H. microdon* ($n=4$)、そして卵・稚魚食者の姉妹系統である *Pundamilia* 属の *P. nyererei* ($n=3$)、*P.* sp. “big blue” ($n=7$) のゲノム配列を新規に決定し、ゲノム比較に使用した (Figure 2-2 ; Table 2-1 で “Reference”が“This study”のサンプル)。サンプルは全て所属研究室の相原光人研究員、タンザニアの共同研究者らによって、ビクトリア湖のムワンザ湾にて採集された。DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) のプロトコルに従い、採集個体の筋肉あるいはヒレから全ゲノム DNA を抽出した。TruSeq DNA PCR Free (350) プロトコルに従ってペアエンドライブラリを作成し、Illumina HiSeq X によって全ゲノムリシーケンスを行った。

さらに、近年ビクトリア湖シクリッドの大規模なゲノム解析が行われ、342 個体のシクリッドゲノムが新たに公開された(Meier et al. 2023)。卵・稚魚食者および *Pundamilia* 属の種のゲノム配列も新規に公開されたことから、67 サンプル分の全ゲノム配列を NCBI データベースから追加取得し、系統解析に用いることとした (Table 2-1)。

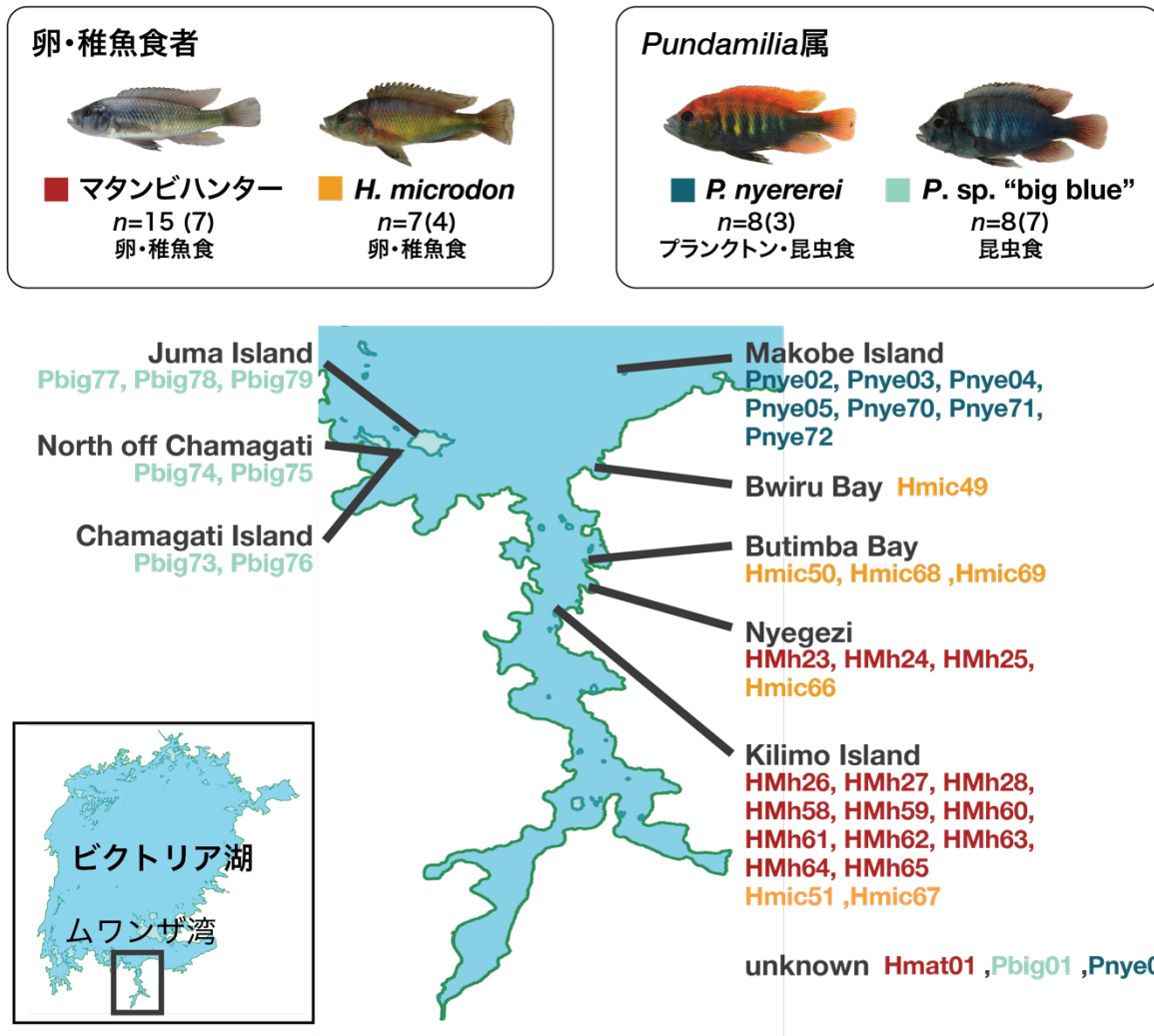


Figure 2-2 第2章のゲノム解析で用いたサンプルの採集地図

種名下に合計のゲノムサンプル数を、カッコ内に本章で新規に配列決定したサンプルの数を記載している。

Table 2-1 第2章で用いたゲノムデータの詳細 (1/2)

Species name	Sample ID	BioSample accession ID	Reference	Lake / River	Locality	Diet	Sampled year	Dataset	
								3.2.1	3.2.2
Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	Hmat01	SAMN15891820	McGee et al. (2020)	Victoria	unknown	Eggs	1995	+	+
Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HMh23	SAMD00776973	Imamoto et al. (2024)	Victoria	Nyegezi	Eggs	2018	+	+
Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HMh24	SAMD00776974	Imamoto et al. (2024)	Victoria	Nyegezi	Eggs	2018	+	+
Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HMh25	SAMD00776975	Imamoto et al. (2024)	Victoria	Nyegezi	Eggs	2018	+	+
Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HMh26	SAMD00776976	Imamoto et al. (2024)	Victoria	Kilimo Island	Eggs	2018	+	+
Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HMh27	SAMD00776977	Imamoto et al. (2024)	Victoria	Kilimo Island	Eggs	2018	+	+
Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HMh28	SAMD00776978	Imamoto et al. (2024)	Victoria	Kilimo Island	Eggs	2018	+	+
Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HMh58	SAMD00776979	Imamoto et al. (2024)	Victoria	Kilimo Island	Eggs	2018	+	+
Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HMh59	NAN	This study	Victoria	Kilimo Island	Eggs	2018	+	+
Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HMh60	NAN	This study	Victoria	Kilimo Island	Eggs	2018	+	+
Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HMh61	NAN	This study	Victoria	Kilimo Island	Eggs	2018	+	+
Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HMh62	NAN	This study	Victoria	Kilimo Island	Eggs	2018	+	+
Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HMh63	NAN	This study	Victoria	Kilimo Island	Eggs	2018	+	+
Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HMh64	NAN	This study	Victoria	Kilimo Island	Eggs	2018	+	+
Haplochromis sp. 'matumbi hunter'	HMh65	NAN	This study	Victoria	Kilimo Island	Eggs	2018	+	+
Haplochromis microdon	Hmic49	SAMD00776980	Imamoto et al. (2024)	Victoria	Bwiru Bay	Eggs	2006	+	+
Haplochromis microdon	Hmic50	SAMD00776982	Imamoto et al. (2024)	Victoria	unknown	Eggs	2018	+	+
Haplochromis microdon	Hmic51	SAMD00776981	Imamoto et al. (2024)	Victoria	Kilimo Island	Eggs	2018	+	+
Haplochromis microdon	Hmic66	NAN	This study	Victoria	Nyegezi	Eggs	2018	+	+
Haplochromis microdon	Hmic67	NAN	This study	Victoria	Kilimo Island	Eggs	2018	+	+
Haplochromis microdon	Hmic68	NAN	This study	Victoria	Butimba Bay	Eggs	2018	+	+
Haplochromis microdon	Hmic69	NAN	This study	Victoria	Butimba Bay	Eggs	2018	+	+
Pundamilia sp. 'big blue red'	Pbig01	SAMN15891860	McGee et al. (2020)	Victoria	unknown	Insects	1995/96	+	+
Pundamilia sp. 'big blue red'	Pbig73	NAN	This study	Victoria	Chamagati Island	Insects	2006	+	+
Pundamilia sp. 'big blue red'	Pbig74	NAN	This study	Victoria	North off Chamagati	Insects	2006	+	+
Pundamilia sp. 'big blue red'	Pbig75	NAN	This study	Victoria	North off Chamagati	Insects	2006	+	+
Pundamilia sp. 'big blue red'	Pbig76	NAN	This study	Victoria	Chamagati Island	Insects	2009	+	+
Pundamilia sp. 'big blue red'	Pbig77	NAN	This study	Victoria	Juma Island	Insects	2005	+	+
Pundamilia sp. 'big blue red'	Pbig78	NAN	This study	Victoria	Juma Island	Insects	2005	+	+
Pundamilia sp. 'big blue red'	Pbig79	NAN	This study	Victoria	Juma Island	Insects	2006	+	+
Pundamilia nyererei	Pnye02	SAMN05711167	Meier et al. (2017)	Victoria	Makobe Island	Planktons	2010	+	+
Pundamilia nyererei	Pnye03	SAMN05711165	Meier et al. (2017)	Victoria	Makobe Island	Planktons	2010	+	+
Pundamilia nyererei	Pnye04	SAMN05711163	Meier et al. (2017)	Victoria	Makobe Island	Planktons	2010	+	+
Pundamilia nyererei	Pnye05	SAMN05711162	Meier et al. (2017)	Victoria	Makobe Island	Planktons	?	+	+
Pundamilia nyererei	Pnye06	SAMN15891801	McGee et al. (2020)	Victoria	unknown	Planktons	?	+	+
Pundamilia nyererei	Pnye70	NAN	This study	Victoria	Makobe Island	Planktons	2004	+	+
Pundamilia nyererei	Pnye71	NAN	This study	Victoria	Makobe Island	Planktons	2004	+	+
Pundamilia nyererei	Pnye72	NAN	This study	Victoria	Makobe Island	Planktons	2004	+	+
Lipochromis cryptodon	Lcry01	SAMN15891831	McGee et al. (2020)	Victoria	unknown	Eggs	2010	+	-
Lipochromis cryptodon	Lcry02	SAMN32927088	Meier et al. (2023)	Victoria	Makobe Island	Eggs	2005	+	-
Lipochromis melanopterus	Lmel01	SAMN15891824	McGee et al. (2020)	Victoria	unknown	Eggs	2010	+	-
Lipochromis melanopterus	Lmel02	SAMN32926878	Meier et al. (2023)	Victoria	Makobe Island	Eggs	2010	+	-
Haplochromis parvidens	Lpar01	SAMN15891807	McGee et al. (2020)	Victoria	unknown	Eggs	2015	+	-
Lipochromis sp. 'velvet black cryptod	Lvel01	SAMN15891866	McGee et al. (2020)	Victoria	unknown	Eggs	1995/96	+	-
Lipochromis sp. 'velvet black cryptod	Lvel02	SAMN32926828	Meier et al. (2023)	Victoria	Makobe Island	Eggs	2010	+	-
Lipochromis sp. 'velvet black cryptod	Lvel03	SAMN32926855	Meier et al. (2023)	Victoria	Makobe Island	Eggs	2010	+	-
Pundamilia azurea	Pazu02	SAMN32926834	Meier et al. (2023)	Victoria	Ruti	insecti-plan	2010	+	-
Pundamilia azurea	Pazu03	SAMN32926836	Meier et al. (2023)	Victoria	Ruti	insecti-plan	2010	+	-
Pundamilia azurea	Pazu04	SAMN32926894	Meier et al. (2023)	Victoria	Ruti	insecti-plan	2010	+	-
Pundamilia sp. "deepwater"	Pdee01	SAMN32926782	Meier et al. (2023)	Victoria	Luanso	insecti-plan ?		+	-
Pundamilia sp. "deepwater"	Pdee02	SAMN32926859	Meier et al. (2023)	Victoria	Luanso	insecti-plan	2010	+	-
Pundamilia sp. "deepwater"	Pdee03	SAMN32926860	Meier et al. (2023)	Victoria	Luanso	insecti-plan	2010	+	-
Pundamilia sp. "deepwater"	Pdee04	SAMN32926861	Meier et al. (2023)	Victoria	Luanso	insecti-plan	2010	+	-
Pundamilia sp. "deepwater"	Pdee05	SAMN32926862	Meier et al. (2023)	Victoria	Luanso	insecti-plan	2010	+	-
Pundamilia sp. "deepwater"	Pdee06	SAMN32926863	Meier et al. (2023)	Victoria	Luanso	insecti-plan	2010	+	-
Pundamilia sp. "deepwater"	Pdee07	SAMN32926880	Meier et al. (2023)	Victoria	Luanso	insecti-plan	2010	+	-
Pundamilia sp. "deepwater"	Pdee08	SAMN32926892	Meier et al. (2023)	Victoria	Luanso	insecti-plan	2010	+	-
Pundamilia sp. "deepwater"	Pdee09	SAMN32926932	Meier et al. (2023)	Victoria	Luanso	insecti-plan	2010	+	-
Pundamilia sp. "deepwater"	Pdee10	SAMN32926933	Meier et al. (2023)	Victoria	Luanso	insecti-plan	2010	+	-
Pundamilia macrocephala	Pmac02	SAMN32926768	Meier et al. (2023)	Victoria	Python Island	insecti-plan	2010	+	-
Pundamilia macrocephala	Pmac03	SAMN32926889	Meier et al. (2023)	Victoria	Python Island	insecti-plan	2010	+	-
Pundamilia macrocephala	Pmac04	SAMN32926890	Meier et al. (2023)	Victoria	Python Island	insecti-plan	2010	+	-

Table 2-1 第2章で用いたゲノムデータの詳細 (2/2)

Pundamilia nyererei	Pnye07	SAMN32926857	Meier et al. (2023)	Victoria	Makobe Island	insecti-plan 2010	+	-
Pundamilia nyererei	Pnye08	SAMN32926869	Meier et al. (2023)	Victoria	Ruti	insecti-plan 2010	+	-
Pundamilia nyererei	Pnye09	SAMN32926870	Meier et al. (2023)	Victoria	Ruti	insecti-plan 2010	+	-
Pundamilia nyererei	Pnye10	SAMN32926872	Meier et al. (2023)	Victoria	Ruti	insecti-plan 2010	+	-
Pundamilia nyererei	Pnye11	SAMN32926873	Meier et al. (2023)	Victoria	Ruti	insecti-plan 2010	+	-
Pundamilia nyererei	Pnye12	SAMN32926884	Meier et al. (2023)	Victoria	Ruti	insecti-plan 2010	+	-
Pundamilia sp. "nyererei-like"	Pnye05	SAMN32926891	Meier et al. (2023)	Victoria	Python Island	insecti-plan 2010	+	-
Pundamilia sp. "nyererei-like"	Pnye06	SAMN32927006	Meier et al. (2023)	Victoria	Kissenda	insecti-plan 2005	+	-
Pundamilia sp. "nyererei-like"	Pnye07	SAMN32927008	Meier et al. (2023)	Victoria	Kissenda	insecti-plan 2005	+	-
Pundamilia sp. "nyererei-like"	Pnye08	SAMN32927011	Meier et al. (2023)	Victoria	Kissenda	insecti-plan 2005	+	-
Pundamilia sp. "nyererei-like"	Pnye09	SAMN32927013	Meier et al. (2023)	Victoria	Kissenda	insecti-plan 2005	+	-
Pundamilia sp. "nyererei-like"	Pnye10	SAMN32927014	Meier et al. (2023)	Victoria	Kissenda	insecti-plan 2005	+	-
Pundamilia sp. "pink anal fin"	Ppin02	SAMN32926853	Meier et al. (2023)	Victoria	Makobe Island	insecti-plan 2010	+	-
Pundamilia sp. "pink anal fin"	Ppin03	SAMN32926854	Meier et al. (2023)	Victoria	Makobe Island	insecti-plan 2010	+	-
Pundamilia sp. "pink anal fin"	Ppin04	SAMN32926856	Meier et al. (2023)	Victoria	Makobe Island	insecti-plan 2010	+	-
Pundamilia sp. "pink anal fin"	Ppin05	SAMN32926864	Meier et al. (2023)	Victoria	Makobe Island	insecti-plan 2010	+	-
Pundamilia sp. "yellow azurea"	Pyel01	SAMN32927080	Meier et al. (2023)	Victoria	Nsimba Island	insecti-plan 2001	+	-
Pundamilia sp. Luanso	Plua01	SAMN32926799	Meier et al. (2023)	Victoria	Luanso	Insects 2010	+	-
Pundamilia sp. Luanso	Plua02	SAMN32926882	Meier et al. (2023)	Victoria	Luanso	Insects 2010	+	-
Pundamilia sp. Luanso	Plua03	SAMN32926893	Meier et al. (2023)	Victoria	Luanso	Insects 2010	+	-
Pundamilia sp. Luanso	Plua05	SAMN32926896	Meier et al. (2023)	Victoria	Luanso	Insects 2010	+	-
Pundamilia sp. Luanso	Plua06	SAMN32927065	Meier et al. (2023)	Victoria	Luanso	Insects 2005	+	-
Pundamilia sp. Luanso	Plua07	SAMN32927066	Meier et al. (2023)	Victoria	Luanso	Insects 2005	+	-
Pundamilia sp. Luanso	Plua08	SAMN32927067	Meier et al. (2023)	Victoria	Luanso	Insects 2005	+	-
Pundamilia sp. Luanso	Plua09	SAMN32927068	Meier et al. (2023)	Victoria	Luanso	Insects 2005	+	-
Pundamilia sp. Luanso	Plua10	SAMN32927069	Meier et al. (2023)	Victoria	Luanso	Insects 2005	+	-
Pundamilia pundamilia	Ppun06	SAMN32926821	Meier et al. (2023)	Victoria	Makobe Island	Insects 2010	+	-
Pundamilia pundamilia	Ppun07	SAMN32926871	Meier et al. (2023)	Victoria	Ruti	Insects 2010	+	-
Pundamilia pundamilia	Ppun08	SAMN32926883	Meier et al. (2023)	Victoria	Ruti	Insects 2010	+	-
Pundamilia pundamilia	Ppun09	SAMN32926885	Meier et al. (2023)	Victoria	Ruti	Insects 2010	+	-
Pundamilia pundamilia	Ppun10	SAMN32926886	Meier et al. (2023)	Victoria	Ruti	Insects 2010	+	-
Pundamilia pundamilia	Ppun11	SAMN32926887	Meier et al. (2023)	Victoria	Ruti	Insects 2010	+	-
Pundamilia sp. "pundamilia-like"	Ppun05	SAMN32926877	Meier et al. (2023)	Victoria	Python Island	Insects 2010	+	-
Pundamilia sp. "pundamilia-like"	Ppun06	SAMN32927005	Meier et al. (2023)	Victoria	Kissenda	Insects 2005	+	-
Pundamilia sp. "pundamilia-like"	Ppun07	SAMN32927007	Meier et al. (2023)	Victoria	Kissenda	Insects 2005	+	-
Pundamilia sp. "pundamilia-like"	Ppun08	SAMN32927009	Meier et al. (2023)	Victoria	Kissenda	Insects 2005	+	-
Pundamilia sp. "pundamilia-like"	Ppun09	SAMN32927010	Meier et al. (2023)	Victoria	Kissenda	Insects 2005	+	-
Pundamilia sp. "pundamilia-like"	Ppun10	SAMN32927012	Meier et al. (2023)	Victoria	Kissenda	Insects 2005	+	-
Pundamilia sp. "red head"	Pred01	SAMN32927072	Meier et al. (2023)	Victoria	Zue Island	Insects 1995/1996	+	-
Pundamilia sp. "red head"	Pred02	SAMN32927073	Meier et al. (2023)	Victoria	Zue Island	Insects 1995/1996	+	-
Pundamilia sp. "red head"	Pred03	SAMN32927074	Meier et al. (2023)	Victoria	Zue Island	Insects 1995/1996	+	-
Astatotilapia stappersi	Asta08	SAMN32927055	Meier et al. (2023)	Tanganyika	KalamboR	Insects ?	+	-
Astatotilapia stappersi	Asta09	SAMN32927056	Meier et al. (2023)	Tanganyika	KalamboR	Insects ?	+	-
Astatotilapia stappersi	Asta10	SAMN32927057	Meier et al. (2023)	Tanganyika	KalamboR	Insects ?	+	-
Lipochromis sp. "cryptodon-like"	Lryl01	SAMN32926898	Meier et al. (2023)	Kyoga	Nawampasa	Eggs 2015	+	-
Lipochromis sp. "occutidens"	Locc01	SAMN32926961	Meier et al. (2023)	Kivu	Kivu	Eggs 2012	+	-
"Lipochromis" taurinus	Ltau01	SAMN32927046	Meier et al. (2023)	Edward	Kazinga Channel	Eggs 2000	+	-

3.2.1 系統解析データセットおよび3.2.2 分化領域探索データセットに含んだゲノムサンプルの情報を全て記載しており、各サンプルが含まれたデータセットは“3.2.1”および“3.2.2”列に“+” (含まれていない場合は「-」) とマークされている。

3.2 ゲノム解析用データセットの作成

第1章と同様に、本章でも解析の目的に合わせて2種類の異なるデータセットを用意した。

各データセットに含まれた種の詳細は Table 2-1 に明記している。

3.2.1 系統解析データセット

卵・稚魚食者の系統群の直前に分岐する種をより詳細に調査するため、*Pundamilia* 属 13 種および卵・稚魚食者 7 種を含む、合計 108 個体で構成される系統解析データセットを作成した。ショートリードデータから全個体の SNP データを結合した VCF ファイルの作成までは、**3.2.1 Master VCF の作成**と同様の手順で行った。ただし、マッピング時の参照配列は *P. nyererei* (Brawand et al. 2014) を使用した。結合した VCF ファイルは、Vcftools のオプション “--max-missing 0.9 --remove-indels --max-alleles 2 --min-alleles 2” で、全サンプルの 10% 以上が欠損データだったサイト、indels、multiallelic なサイトを除去した。Haplotype phasing 時のエラーを避けるため、SNP が 150 個以下の scaffold を除外し、最終的に 8,763,351 SNPs からなる VCF ファイルが得られた。Beagle (v. 5.2) (Browning et al. 2021) で iterations を 50 回に設定し、haplotype phasing を行った。

3.2.2 分化領域探索データセット

卵・稚魚食者 2 種と *Pundamilia* 属 2 種を含む、合計 38 個体からなる、高度分化領域探索データセットを作成した。ショートリードデータから、全個体の SNP データを結合した VCF ファイルの作成までは、**3.2.1 Master VCF の作成**と同様の手順で行った。ただし、マッピング時の参照配列は *P. nyererei* (Brawand et al. 2014) を使用した。結合した VCF ファイルは、Vcftools のオプション “--max-missing 0.9 --remove-indels --max-alleles 2 --min-alleles 2” で、全サンプルの 10% 以上が欠損データだったサイト、indels、multiallelic なサイトを除去し、最終的に 1,204,578 SNPs からなるデータセットを作成した。

3.3 ASTRAL-IV による系統樹の構築

3.2.1 系統解析データセットを用いて系統樹の推定を行った。3.5.2 ASTRAL-III と同様の手順で、合計 434 個の系統樹データからなる multi-tree file を作成した。この multi-tree file を入力データとし、ASTRAL-IV でコンセンサスな系統樹の推定を行った。

3.4 集団構造の推定

3.2.2 分化領域探索データセットを用いて、集団構造の推定を行った。解析を行う前に、3.2.2 Population dataset と同様の手順で、データセットの SNP フィルタリングを行った（データセットから頻度が全個体の 1%以下であった SNP（マイナーアリル）、連鎖不平衡係数が 0.1 以上の SNP を除去）。 $K=1$ から $K=4$ について、ADMIXTURE (v1.3.0)(Alexander et al. 2009)を実行した。さらに PLINK のオプション “--pca” で SNP データの主成分分析を行い、各主成分における固有ベクトルおよび寄与率を得た。

3.5 卵・稚魚食者—*Pundamilia* 属間で遺伝的に高く分化した領域（高度分化領域）の探索

3.2.2 分化領域探索データセットを用いて、卵・稚魚食者—*Pundamilia* 属のペアにおいて遺伝的に高く分化したゲノム領域（高度分化領域）を、遺伝的統計量・ F_{ST} の値を基準に決定した。データセットに含まれる 4 種の総当たり 6 ペアのうち、卵・稚魚食者—*Pundamilia* 属となっている 4 ペア（マタンビハンター—*P. nyererei*、マタンビハンター—*P. sp.* “big blue”、*H. microdon*—*P. nyererei*、*H. microdon*—*P. sp.* “big blue”）を解析の対象とした。まず Pixy (v1.2.7)(Korunes and Samuk 2021)で、2-kb ごとの F_{ST} 、種間の絶対的な遺伝的分化の指標である D_{XY} 、および塩基多様度 π を算出した。得られたゲノム領域ごとの $F_{ST} \cdot D_{XY} \cdot \pi$ の表を、 F_{ST} の高かった順番に並べかえ、 F_{ST} が上位 1%で、かつマタンビハンター—*H. microdon* および *P. sp.* “big blue”—*P. nyererei* で高度に分化していないゲノム領域を

高度分化領域と定義した。*P. nyererei*のアノテーションファイル(Brawand et al. 2014)を元に、SNP window が遺伝子領域あるいはその近傍 5-kb に存在するか否かを、自作の Python スクリプトによって判定した。

3.6 肝臓組織を用いたトランスクリプトーム解析

3.6.1 サンプルの採集と RNA の抽出

卵・稚魚食者と *Pundamilia* 属で、肝臓における遺伝子発現の比較を行うため、RNA-seq 解析を実施した。マタンビハンター ($n=4$)、*H. microdon* ($n=3$)、*P. nyererei* ($n=5$) の肝臓組織から RNA の抽出を行った (Table 2-2)。マクロジェンに外部委託し、TruSeq standard mRNA Library kit (Illumina) を用いたライブラリ調整後、Illumina Novaseq 6000 によってシーケンスが行われた。

Table 2-2 RNA-seq 解析に用いたサンプルの一覧

Species	Sample ID	Tissue	Lake / River	Locality	Date	Reference
Haplochromis sp. matumbi hunter	Hmat01L	liver	Victoria	Kilimo Island	2023.10.09	This study
Haplochromis sp. matumbi hunter	Hmat02L	liver	Victoria	Kilimo Island	2023.10.09	This study
Haplochromis sp. matumbi hunter	Hmat03L	liver	Victoria	Kilimo Island	2023.10.09	This study
Haplochromis sp. matumbi hunter	Hmat04L	liver	Victoria	Kilimo Island	2023.10.09	This study
Haplochromis microdon	Hmic01L	liver	Victoria	Nyegezi Bay	2023.10.09	This study
Haplochromis microdon	Hmic02L	liver	Victoria	Kilimo Island	2023.10.09	This study
Haplochromis microdon	Hmic03L	liver	Victoria	Nyegezi Bay	2023.10.09	This study
Pundamilia nyererei	Pnye01L	liver	Victoria	Kilimo Island	2023.10.09	This study
Pundamilia nyererei	Pnye02L	liver	Victoria	Kilimo Island	2023.10.09	This study
Pundamilia nyererei	Pnye03L	liver	Victoria	Kilimo Island	2023.10.09	This study
Pundamilia nyererei	Pnye04L	liver	Victoria	Kilimo Island	2023.10.09	This study
Pundamilia nyererei	Pnye05L	liver	Victoria	Kilimo Island	2023.10.09	This study

3.6.2 遺伝子発現変動解析

続いて、RNA-seq後に得られたリードデータから発現量の正規化を行い、マタンビハンター--*P. nyererei*および*H. microdon*-*P. nyererei*において遺伝子発現変動解析を行った。まず、シーケンス後のショートリードデータのクオリティコントロールを fastp (Chen et al. 2018)で行った。リードのフィルタリングには"--trim_front1 5 --trim_tail1 5 --trim_front2 5 --trim_tail2 5"のオプションを用いた。次に *P. nyererei*の全ゲノム配列からインデックスを構築し、同配列に対し STAR (v2.7.10a)(Dobin et al. 2013)でマッピングを行った。マッピング後は、RSEM (ver. 1.3.1)(Li and Dewey 2011)を用いてリードカウントを行った。得られたリードカウントを用いて、TCC-GUI(Su et al. 2019)でリードカウントの正規化を行うと DEG の検出を行った。この時、正規化方法および DEG 検出方法は deseq2(Love et al. 2014)を選択し、FDR(False discovery rate) ≤ 0.1 を発現変動遺伝子の条件とした。遺伝子ごとの発現量の比較には、RSEMによって出力された TPM (Transcripts Per Million、遺伝子座における推定リード数とリードカウントを、遺伝子長と総リード数で正規化した値)を用いた。種間の発現量の有意差は、マン・ホイットニーの U 検定によって算出された *p*-value を元に判定した。

H. microdon-*P. nyererei*の DEGs の検出の際、*H. microdon*の Hmic03L は解析から除外した。Hmic03L は、形態から他の 2 つのサンプルよりも若い個体であることが予想されており、発現プロファイルが異なることが懸念されていた。実際に、正規化したリードカウントを元に TCC-GUI で主成分分析を行ったところ、他の 2 サンプルと異なる発現プロファイルを有することが示唆された (Figure 2-3)。したがって Hmic03L は DEG の判定には含めず、遺伝子別の TPM 比較にのみ用いることとした。

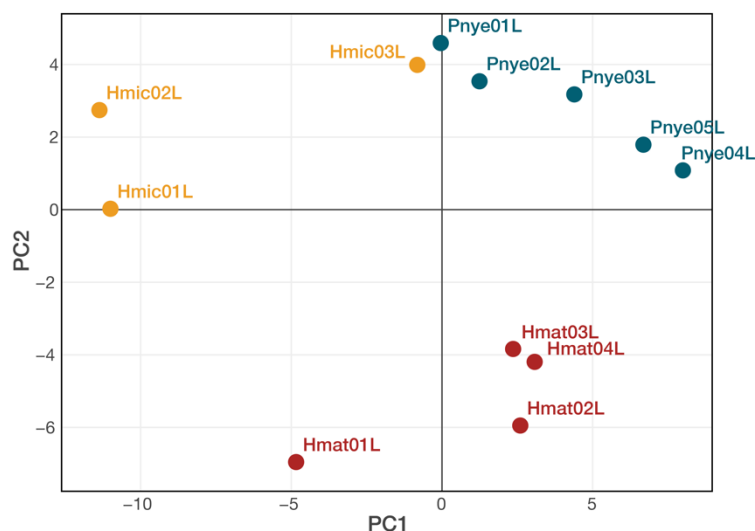


Figure 2-3 主成分分析による肝臓組織での遺伝子発現プロファイルのサンプル間比較

主成分分析は TCC-GUI 上で行った。主成分分析の入力データとして、リードカウントの種間の分散が大きかった 100 個の遺伝子のみを用いている。

3.7 高度分化遺伝子および発現変動遺伝子のエンリッチメント解析

卵・稚魚食者と *Pundamilia* 属の高度分化領域、および卵・稚魚食者で発現量の有意な上昇が見られた遺伝子の機能を把握するため、エンリッチメント解析を行った。高度分化遺伝子のエンリッチメント解析には、高度分化領域が存在する、あるいは近傍に存在する遺伝子 3042 個をクエリとして用いた。卵・稚魚食者で高発現していた遺伝子は、マタンビハンターで 114 個、*H. microdon* で 253 個あり、これらをクエリとして用いた。エンリッチメント解析は g:Profiler(Kolberg et al. 2023)の g:GOST で行い、出力された adjusted p -value (p_{adj}) をエンリッチメントの指標とした。

4. 結果

4.1 種数を増やした *Pundamilia* 属および卵・稚魚食者の系統解析

前章で構築した系統樹では、*Pundamilia* 属に含まれる種が 2 種のみであったが、卵・稚魚食者の系統群の直前に分岐する種をより詳細に調査するため、*Pundamilia* 属 13 種および卵・稚魚食者 7 種を含めた大規模な系統解析を実施した (Figure 2-4)。Meier らによるビクトリア湖シクリッドの大規模な系統解析では、*Pundamilia* 属 15 種は *Pundamilia* 属だけでは単系統群を形成せず、いくつかの系統グループに分かれている (Meier et al. 2023)。卵・稚魚食者の姉妹系統に位置する *Pundamilia* I 以外の種は、他属によって構成される系統群により近縁であることが示されている。

今回の解析でも、*Pundamilia* I の種が単系統群を形成し、卵・稚魚食者クレードの根本で分岐する結果が得られた (Figure 2-4)。一方で、*P. sp.* “big blue”は *Pundamilia* I クレードには含まれず、卵・稚魚食者クレードの直前で分岐することが確認された。Figure 1-13 において、*P. nyererei* が卵・稚魚食者に最も近縁であるとされていたが、今回の解析では *P. sp.* “big blue”の方が卵・稚魚食者クレードに近縁であることが明らかとなった。以上の結果から、*P. nyererei*に加えて *P. sp.* “big blue”を比較ゲノム解析に用いることは、食性適応遺伝子の探索において妥当であると考えられる。

さらに、今回解析に用いた *Pundamilia* 属の食性は昆虫食と昆虫・プランクトン食のいずれかであったが、食性ごとに系統が分かれるという結果は得られず、各クレードでプランクトン食が独立して複数回生じるという結果となった。最節約的に考えると、同じ食性グループ同士で系統群を形成すると考えられる。しかし、プランクトンは環境中で容易に利用可能な餌資源であり、その汎用性の高さから、どの魚種であっても容易に摂食する可能性があると推測される。

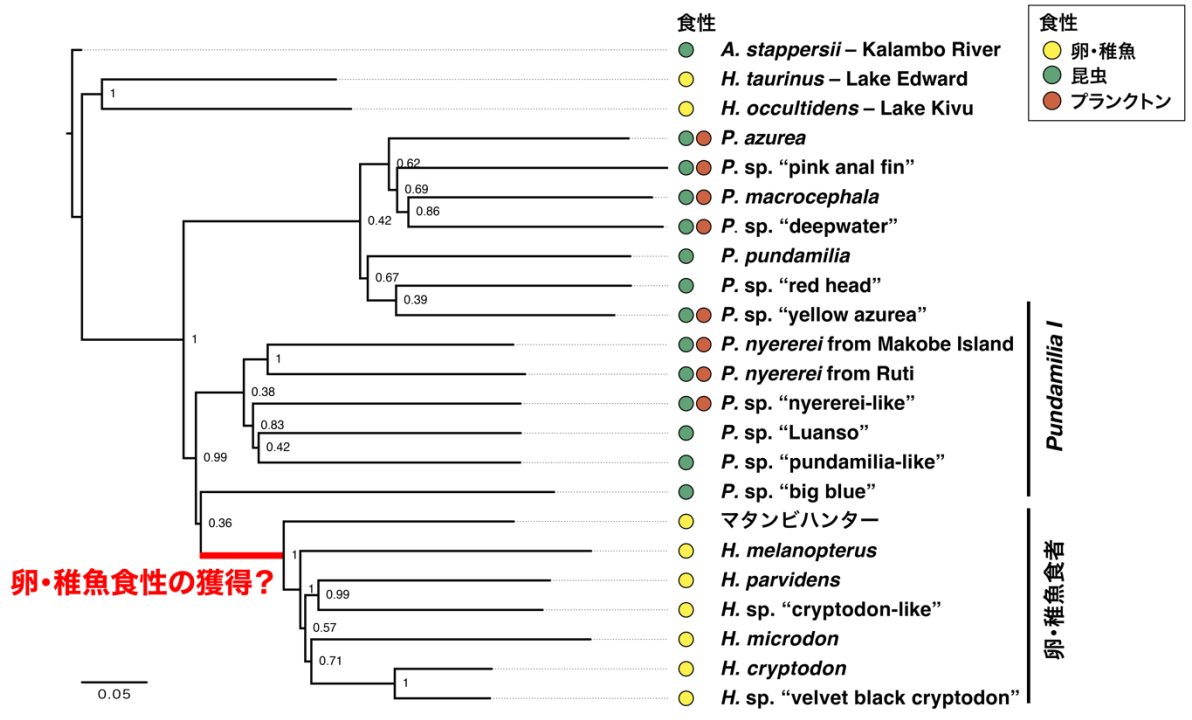


Figure 2-4 *Pundamilia* 属ならびに卵・稚魚食者の系統関係と食性

ノード横に分岐の信頼度を表す事後確立を表記している。属名とその略称は *A*: *Astatotilapia*、*L*: *Lipochromis*、*P. pundamilia*、*H*: *Haplochromis* となっている。外群として追加したビクトリア湖以外に生息する3種は、種名横に生息河川・湖を記載している。

4.2 異なる食性間における高度分化領域の特定

まず、新たにゲノム配列を決定したサンプルの遺伝構造を評価するため、集団構造の推定を行った。主成分分析の結果、PC1 はマタンビハンター、PC2 は *H. microdon*、PC3 は *P. nyererei* および *P. sp.* “big blue” を特徴づける要素として同定され、各種が独立したクラスターを形成していることが明らかとなった (Figure 2-5a)。同様に、ADMIXTURE 解析では $K=4$ において、各種を特徴づける 4 色の遺伝的要素が得られた (Figure 2-5b)。追加したサンプルも含めて、各種が独立した遺伝構造を有していることが確認され、次段階として高度分化領域の探索を進める上で十分な基盤が得られた。

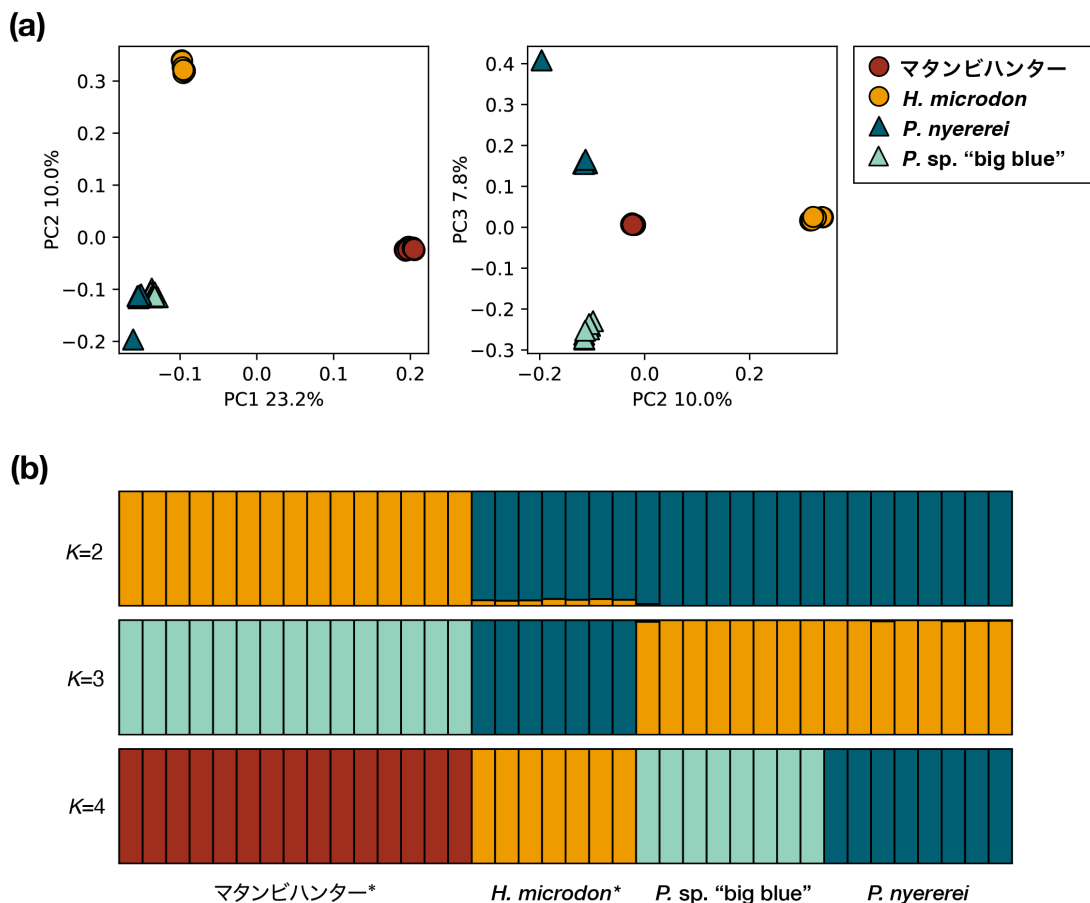


Figure 2-5 食性関連遺伝子の探索に用いたデータセットの集団構造

(a) 主成分分析による全ゲノム SNP のクラスタリング解析。各主成分 (PC) の寄与率は軸ラベルに記載している。(b) $K=2$ から $K=4$ における ADMIXTURE 解析の結果。卵・稚魚食者は種名横にアスタリスク (*) を記している。

次に、ゲノム領域ごとに遺伝的統計量の F_{ST} を算出し、その値の比較を行うことで、卵・稚魚食者において自然選択が働いた可能性のあるゲノム領域の特定を試みた。

F_{ST} は 2 種間で算出される遺伝的統計量であり、種間の遺伝的分化度を示す相対的な指標として広く用いられている。 F_{ST} は、2 種間の塩基配列を比較した際に、2 種が異なるアリル型を有する場合、すなわち遺伝的に高く分化している場合は 1 に近づく。逆に 2 種間でアリル型が似ている場合は 0 に近づく特性がある。第 1 章では、ゲノム全体の平均 F_{ST} を種間で比較することで、種間の遺伝的分化度の評価を行った (Figure 1-8)。一方で、ゲノム領域ごとの F_{ST} に注目する場合、 F_{ST} が高くなっているゲノム領域には、種の分化に関わる自然選択が働いたゲノム領域が含まれている。一般的に、種間の完全な遺伝的分化が生じている場合 (種分岐後に長期間が経過している場合)、ほとんどのゲノム領域の F_{ST} が 1 に近づく。しかし、ビクトリア湖のシクリッドは比較的最近の適応放散により急速に種分化が生じたため、全体的に F_{ST} が低くなる傾向がある。このような背景を考慮すると、 F_{ST} がゲノム全体の平均より高い、高度分化領域に着目することで、自然選択の作用を検出することが可能である。実際に複数の先行研究において、シクリッドの形質に関連する原因遺伝子の探索に F_{ST} が用いられている (Meier et al. 2018; Nakamura et al. 2021)。

ゲノム比較に用いた 4 種の総当たり 6 ペアのうち、卵・稚魚食者-*Pundamilia* 属に該当する 4 ペア (マタンビハンター-*P. nyererei*、マタンビハンター-*P. sp. "big blue"*、*H. microdon*-*P. nyererei*、*H. microdon*-*P. sp. "big blue"*) について、2-kb window ごとに F_{ST} を算出した (Figure 2-6 ; Table 2-3)。ゲノム全体の平均 F_{ST} はマタンビハンター-*P. nyererei* で 0.303、マタンビハンター-*P. sp. "big blue"* で 0.306、*H. microdon*-*P. nyererei* で 0.135、*H. microdon*-*P. sp. "big blue"* で 0.142 であった (Table 2-3)。これらの値は Figure 1-8 で示した値よりも低く算出されたが、これは F_{ST} を算出したソフトウェアやその算出方法が異なることに起因する差異であると考えられる。

続いて、 F_{ST} が高かった順に SNP window を並べ替え、上位 1%に該当する SNP window を特定した。これらの SNP window のうち、マタンビハンター–*H. microdon* 間および *P. sp.* “big blue”–*P. nyererei*間で高度に分化していないゲノム領域（これら 2 ペアにおいて F_{ST} が上位 1%に該当しない領域）を、卵・稚魚食者に特異的な高度分化領域として定義した（Figure 2-6 の赤いプロット；Table 2-3 F_{ST} 上位 1% 「SNP windows」）。これらの高度分化領域が重なる、あるいは前後 5-kb に位置している遺伝子を、高度分化遺伝子として特定した（Table 2-3 F_{ST} 上位 1% 「Genes」）。

卵・稚魚食者–*Pundamilia*属の 4 ペアの高度分化遺伝子は、複数のペアで重複する遺伝子も含めて 3042 遺伝子あった。これらの遺伝子セットをクエリとし、g:Profiler の g:GOST にてエンリッチメント解析を実施したところ、形態発生や発生プロセスなどの GO タームがエンリッチした（Figure 2-7）。さらに、高度分化領域と高度分化遺伝子について、ペアごとの個数、および他のペアと共通で得られたものの内訳を調べたところ、464 SNP windows 51 遺伝子が、4 ペアすべてで高度に分化していることが確認された（Figure 2-8 のベン図中央；Table 2-4）。卵・稚魚食者–*Pundamilia*属の 4 ペアすべてにおいて高度分化領域が確認された遺伝子には、*htatip2*（Figure 2-9）、*acot19*（Figure 2-10）、*nr5a2*（Figure 2-11）など脂質の代謝に関わる遺伝子や、*vax1*（Figure 2-12）、*tcf4*（Figure 2-13）、*acvr2ab*（Figure 2-14）、*nfixb*（Figure 2-15）など、顔面の形態形成に関わる遺伝子も含まれていた。

以上の解析から得られた高度分化遺伝子の機能と、卵・稚魚食者–*Pundamilia*属における脂質の代謝能力や形態の分化との関連性については考察で述べる。

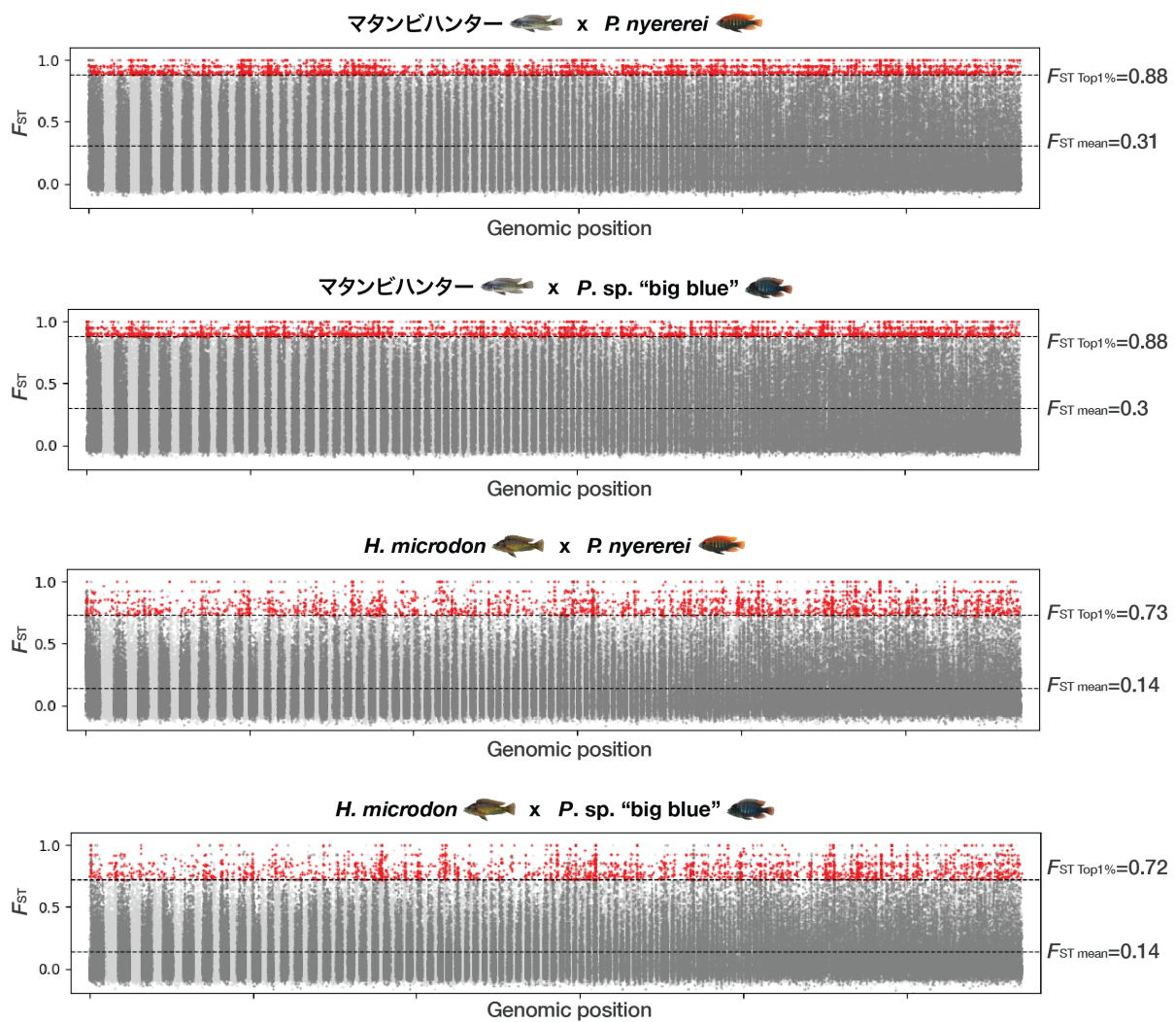


Figure 2-6 *Pundamilia* 属-卵・稚魚食者の 4 ペアにおけるゲノムワイド F_{ST}

F_{ST} は 2-kb window ごとに算出した。Scaffold ごとにプロットが色分け（灰色濃・淡）されている。 F_{ST} の値が全体の上位 1% のゲノム領域で、かつマタンビハンター-*H. microdon* および *P. sp.* “big blue”-*P. nyererei* で高度に分化していないゲノム領域（これら 2 ペアで上位 1% でなかった領域）を高度分化領域（赤のプロット）とし、この後のエンリッチメント解析に用いた。各ペアにおける高度分化領域の閾値 (F_{ST} Top1%) ならびにゲノム全体の F_{ST} の平均値 (F_{ST} mean) を点線で表示している。

Table 2-3 ペアごとの高度分化領域の SNPs・遺伝子数の内訳

	D_{XY} 平均値	F_{ST} 平均値	F_{ST} 閾値	F_{ST} 上位1% SNPs windows	Genes
マタンビハンター - <i>H. microdon</i>	0.280	0.331	-	-	-
マタンビハンター - <i>P. sp. "big blue"</i>	0.280	0.306	0.878	4904	1961
マタンビハンター - <i>P. nyererei</i>	0.281	0.303	0.876	4522	1926
<i>H. microdon</i> - <i>P. sp. "big blue"</i>	0.270	0.142	0.726	3601	1580
<i>H. microdon</i> - <i>P. nyererei</i>	0.270	0.135	0.720	3454	1559
<i>P. sp. "big blue"</i> - <i>P. nyererei</i>	0.260	0.075	-	-	-

D_{XY} は種間の遺伝的な分化度を表す絶対値である。 D_{XY} および F_{ST} を 2-kb window で推定しゲノム全体での平均値を算出した。 F_{ST} 閾値はゲノム全体で上位 1%に位置する F_{ST} の値で、その閾値を超えた SNP window の数と (SNPs windows)、それらの SNP windows が該当する・近接する (遺伝子領域の前後 5-kb) 遺伝子の数を表記している (Genes)。

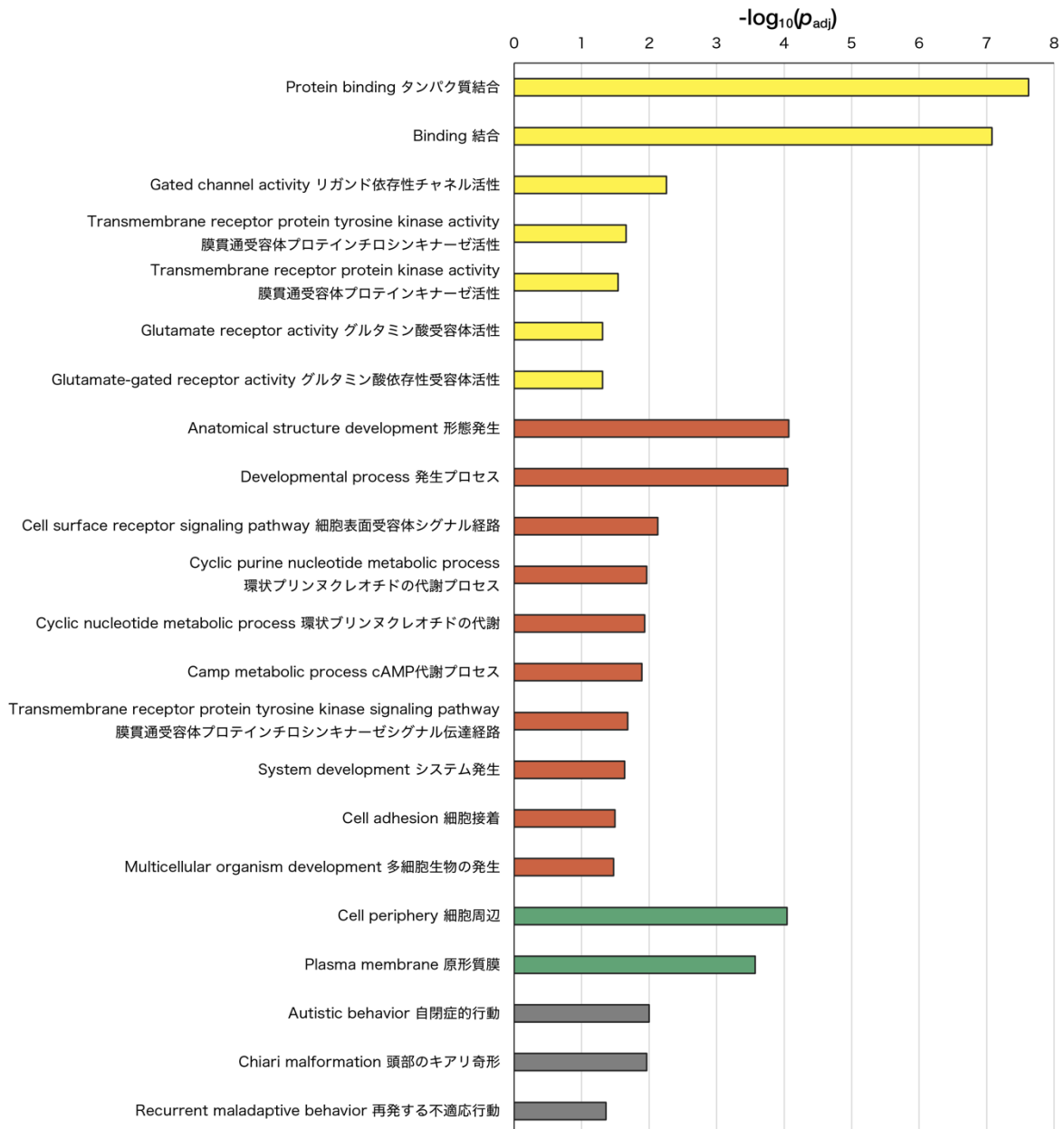


Figure 2-7 高度分化領域が該当する 3042 遺伝子をクエリとしたエンリッチメント解析

Figure 2-5 で高度分化領域とした SNP window が該当する遺伝子（とその近傍 5-kb）を対象とした。g:Profiler の g:GOSl によって出力された adjusted p -value (p_{adj}) をエンリッチメントの指標としている。Gene Ontology のデータベースごとに棒グラフが色分けされており、Molecular Function (黄)、Biological Process (赤)、Cellular Component (緑)、Human Pathogen (灰) の順に上から並べられている。

Table 2-4 卵・稚魚食者-Pundamilia 属の 4 ペアすべてにおいて高度分化領域の見られた 51 遺伝子の一覧

Ensembl gene ID	遺伝子名	説明
ENSPNYG0000000398	<i>droscha</i>	drosha ribonuclease III
ENSPNYG00000002344	<i>htatip2</i>	HIV-1 Tat interactive protein 2
ENSPNYG00000002392	unknown	unknown
ENSPNYG00000003509	<i>pdzd8</i>	PDZ domain containing 8
ENSPNYG00000003604	<i>kcnk18</i>	potassium channel, subfamily K, member 18
ENSPNYG00000003674	<i>vax1</i>	ventral anterior homeobox 1
ENSPNYG00000004709	unknown	unknown
ENSPNYG00000005138	<i>emc2</i>	ER membrane protein complex subunit 2
ENSPNYG00000006455	<i>hipk1b</i>	homeodomain interacting protein kinase 1b
ENSPNYG00000007745	<i>ndfip2</i>	Nedd4 family interacting protein 2
ENSPNYG00000009257	unknown	acidic mammalian chitinase-like
ENSPNYG00000009453	unknown	unknown
ENSPNYG00000009511	unknown	acidic mammalian chitinase-like
ENSPNYG00000009517	unknown	unknown
ENSPNYG00000009542	unknown	unknown
ENSPNYG00000009571	unknown	acidic mammalian chitinase-like
ENSPNYG00000009601	unknown	unknown
ENSPNYG00000010591	unknown	acidic mammalian chitinase-like
ENSPNYG00000010678	unknown	unknown
ENSPNYG00000010688	<i>cntn2</i>	contactin 2
ENSPNYG00000010783	unknown	retinol dehydrogenase 13-like
ENSPNYG00000010917	<i>nfasca</i>	neurofascin homolog (chicken) a
ENSPNYG00000011080	<i>acot19</i>	acyl-CoA thioesterase 19
ENSPNYG00000011474	<i>celf6</i>	CUGBP Elav-like family member 6
ENSPNYG00000011917	<i>eif3d</i>	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit D
ENSPNYG00000013266	<i>slc2a12</i>	solute carrier family 2 member 12
ENSPNYG00000013908	<i>cachd1</i>	cache domain containing 1
ENSPNYG00000014638	unknown	unknown
ENSPNYG00000015176	<i>nfixb</i>	nuclear factor I/Xb
ENSPNYG00000015605	<i>tcf</i>	transcription factor 4
ENSPNYG00000015751	<i>pih1d2</i>	PIH1 domain containing 2
ENSPNYG00000015921	<i>cyp8b1.1</i>	cytochrome P450 family 8 subfamily B member 1, tandem duplicate 1
ENSPNYG00000016296	<i>pcdh1b</i>	protocadherin 1b
ENSPNYG00000016573	unknown	unknown
ENSPNYG00000016612	<i>thoc3</i>	THO complex 3
ENSPNYG00000017585	unknown	unknown
ENSPNYG00000017723	<i>whrna</i>	whirlin a
ENSPNYG00000019035	unknown	unknown
ENSPNYG00000019060	unknown	unknown
ENSPNYG00000019340	<i>kcng4b</i>	potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 4b
ENSPNYG00000019759	<i>lgals3bp.2</i>	galectin 3 binding protein, tandem duplicate 3
ENSPNYG00000019999	<i>nr5a2</i>	nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2
ENSPNYG00000020377	unknown	unknown
ENSPNYG00000020463	<i>emp</i>	epithelial membrane protein 1
ENSPNYG00000020599	unknown	unknown
ENSPNYG00000021172	<i>tenm</i>	teneurin transmembrane protein 3
ENSPNYG00000021504	<i>pomca</i>	proopiomelanocortin a
ENSPNYG00000021551	unknown	unknown
ENSPNYG00000021586	unknown	unknown
ENSPNYG00000022291	<i>acvr2ab</i>	activin A receptor type 2Ab
ENSPNYG00000023967	unknown	centromere protein M

脂質の代謝に関わる遺伝子は黄色、頭蓋顔面構造の発生に関わる遺伝子は青色で示している。

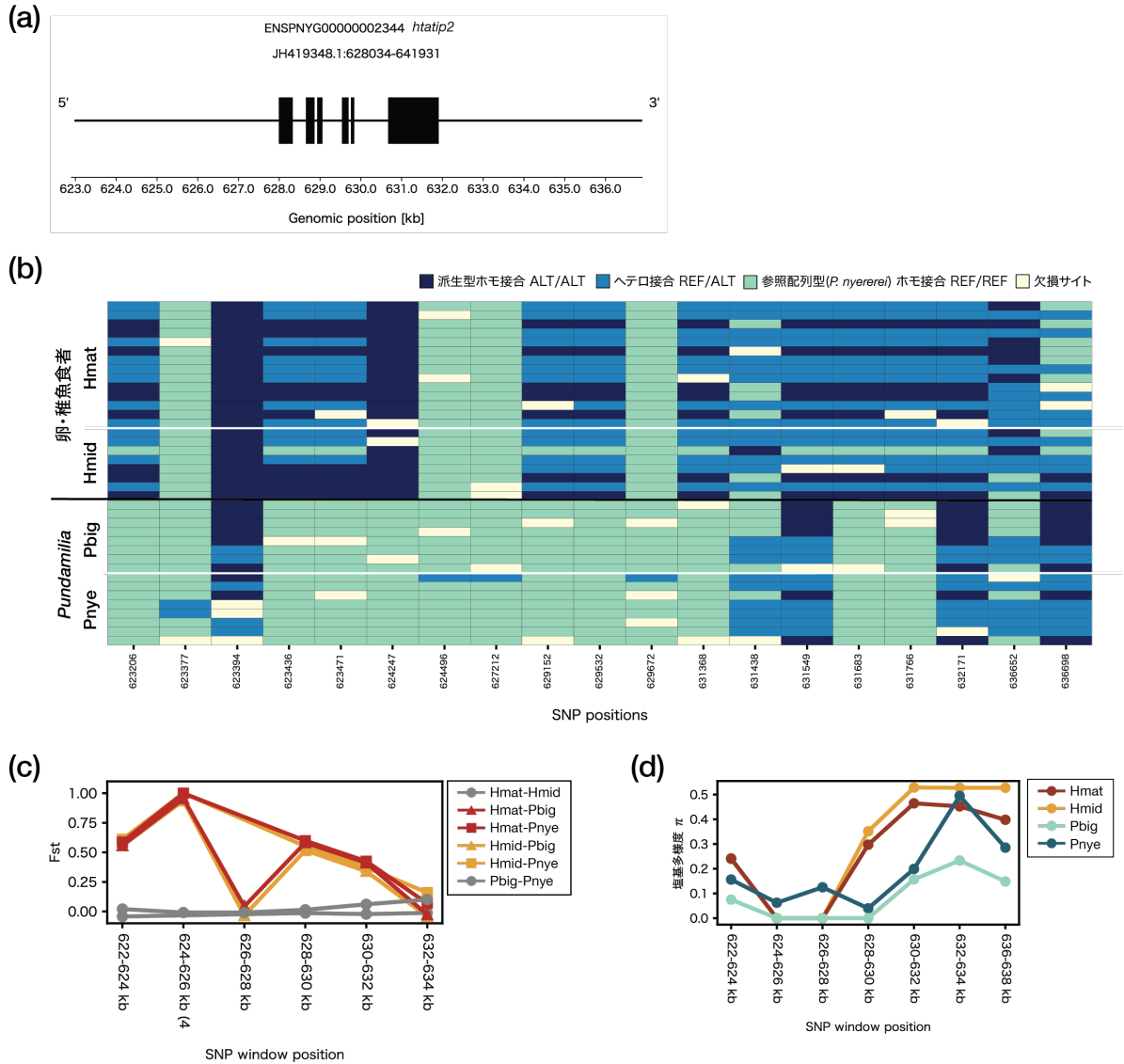


Figure 2-9 *htatip2* の遺伝子領域とその周辺の SNP

(a) インترون・エキソン構造とゲノム上での位置。Ensembl ID および遺伝子名の下に、scaffold 名と遺伝子領域のスタートコドンおよびストップコドンの位置を記載している。遺伝子とその前後 5-kb 程度に存在する (b) SNP の遺伝子型ヒートマップ、(c) ペアごとの F_{ST} 、そして (d) SNP ごとの塩基多様度 π の値。(c) では高度分化領域であった SNP window をカッコと数字で示しており、数字は卵・稚魚食者-*Pundamilia* 属の 4 ペアのうちの、何ペアで高度分化領域であったか表している。

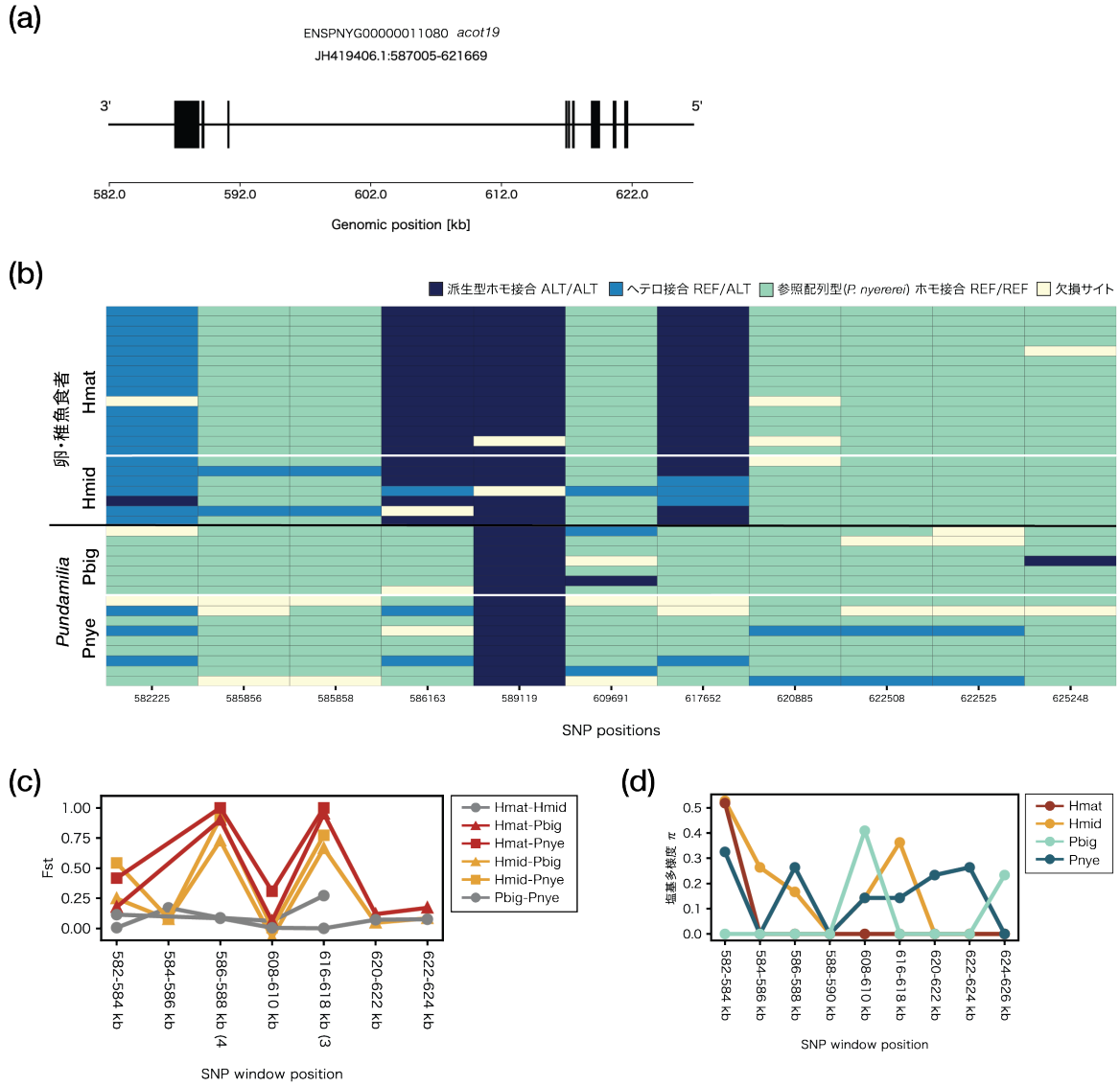


Figure 2-10 *acot19*の遺伝子領域とその周辺の SNP

(a) イントロン・エクソン構造とゲノム上の位置。Ensembl ID および遺伝子名の下に、scaffold 名と遺伝子領域のスタートコドンおよびストップコドンの位置を記載している。遺伝子領域とその前後 5-kb 程度に存在する (b) SNP の遺伝子型ヒートマップ、(c) ペアごとの F_{ST} 、そして (d) SNP ごとの塩基多様度 π の値。(c) では高度分化領域であった SNP window をカッコと数字で示しており、数字は卵・稚魚食者-*Pundamilia* 属の 4 ペアのうち、何ペアで高度分化領域であったか表している。

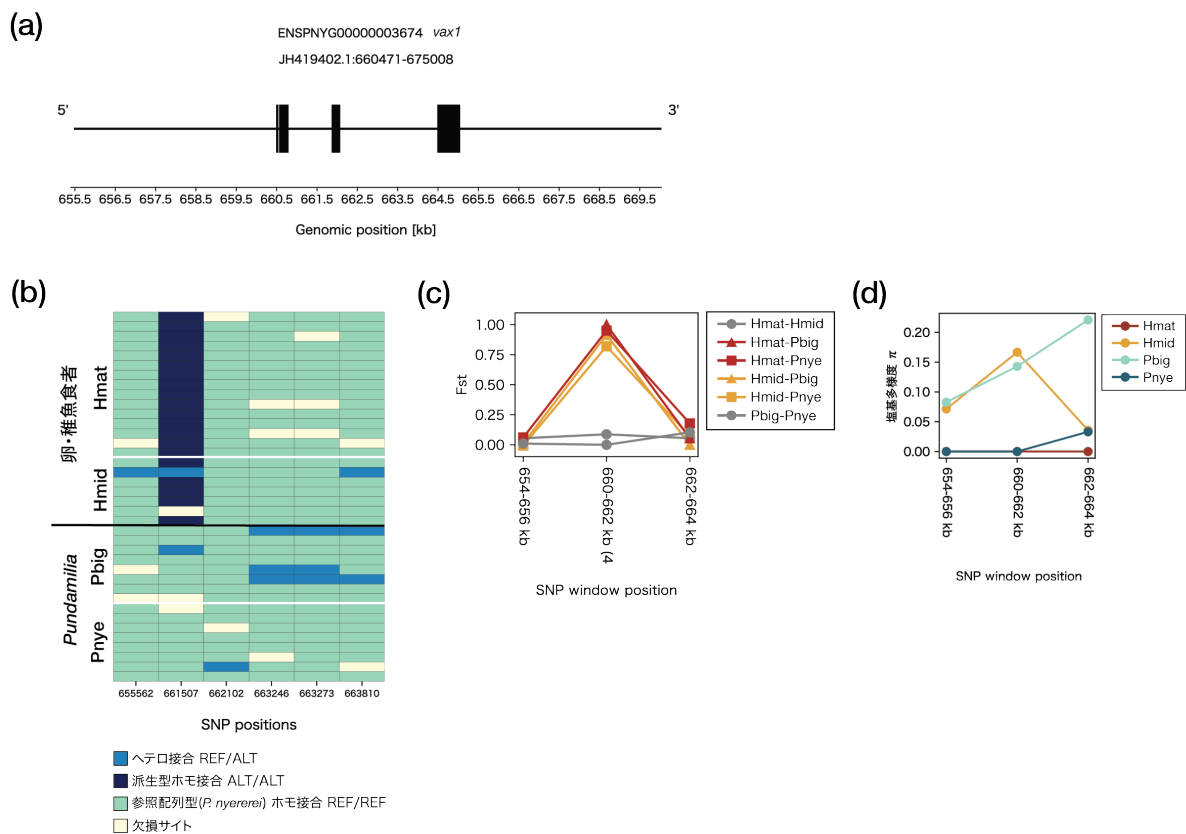


Figure 2-12 *vax1* の遺伝子領域とその周辺の SNP

(a) イントロン・エキソン構造とゲノム上での位置。Ensembl ID および遺伝子名の下に、scaffold 名と遺伝子領域のスタートコドンおよびストップコドンの位置を記載している。遺伝子領域とその前後 5-kb 程度に存在する (b) SNP の遺伝子型ヒートマップ、(c) ペアごとの F_{ST} 、そして (d) SNP ごとの塩基多様度 π の値。(c) では高度分化領域であった SNP window をカッコと数字で示しており、数字は卵・稚魚食者-*Pundamilia* 属の 4 ペアのうち、何ペアで高度分化領域であったか表している。

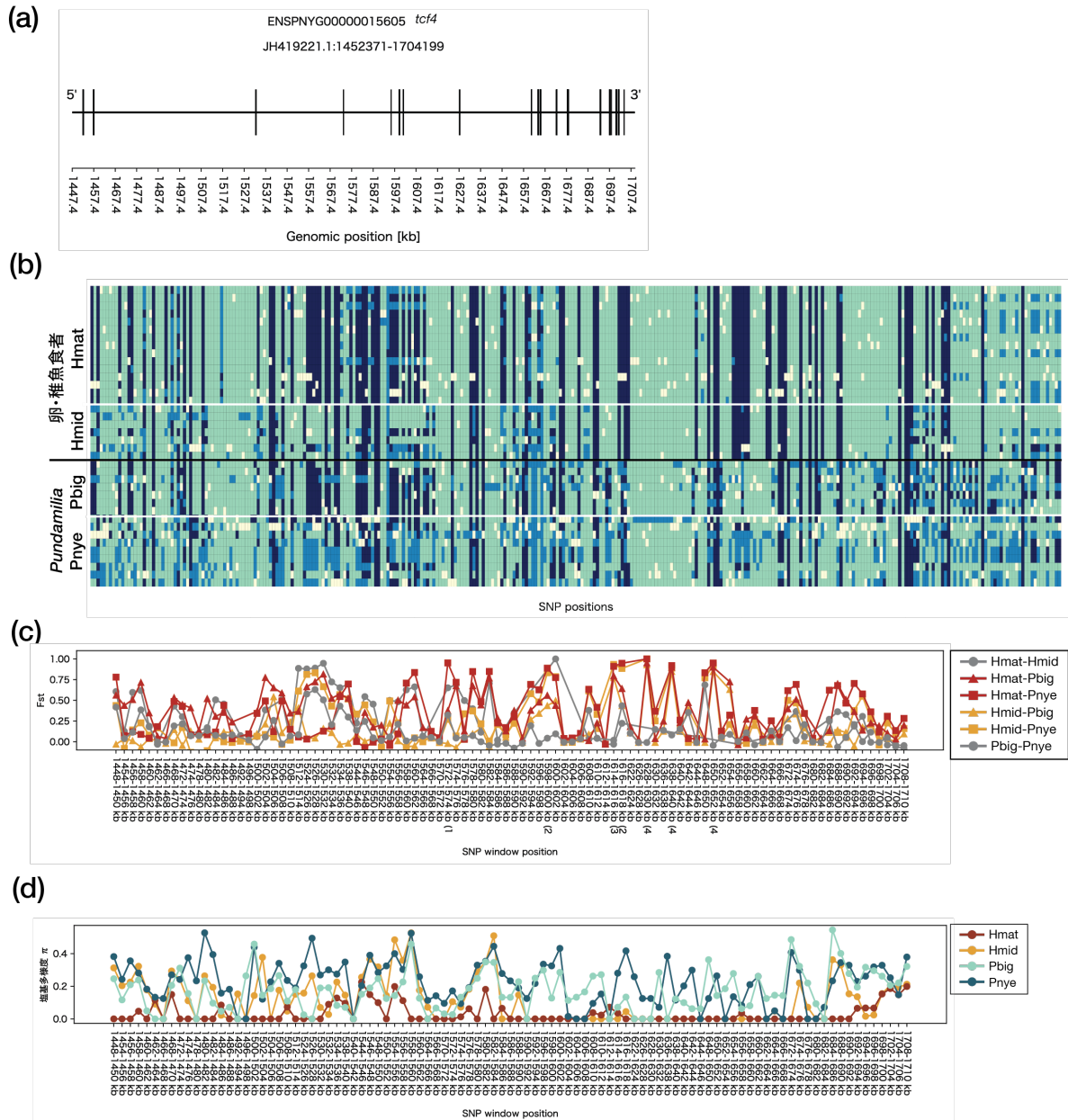


Figure 2-13 *tcf4* の遺伝子領域とその周辺の SNP

(a) イントロン・エキソン構造とゲノム上の位置。Ensembl ID および遺伝子名の下に、scaffold 名と遺伝子領域のスタートコドンおよびストップコドンの位置を記載している。遺伝子領域とその前後 5-kb 程度に存在する (b) SNP の遺伝子型ヒートマップ、(c) ペアごとの F_{ST} 、そして (d) SNP ごとの塩基多様度 π の値。*tcf4* では該当する SNP が多かったため、(b) の SNP positions のラベルを省略している。(c) では高度分化領域であった SNP window をカッコと数字で示しており、数字は卵・稚魚食者-Pundamilia 属の 4 ペアのうち、何ペアで高度分化領域であったか表している。

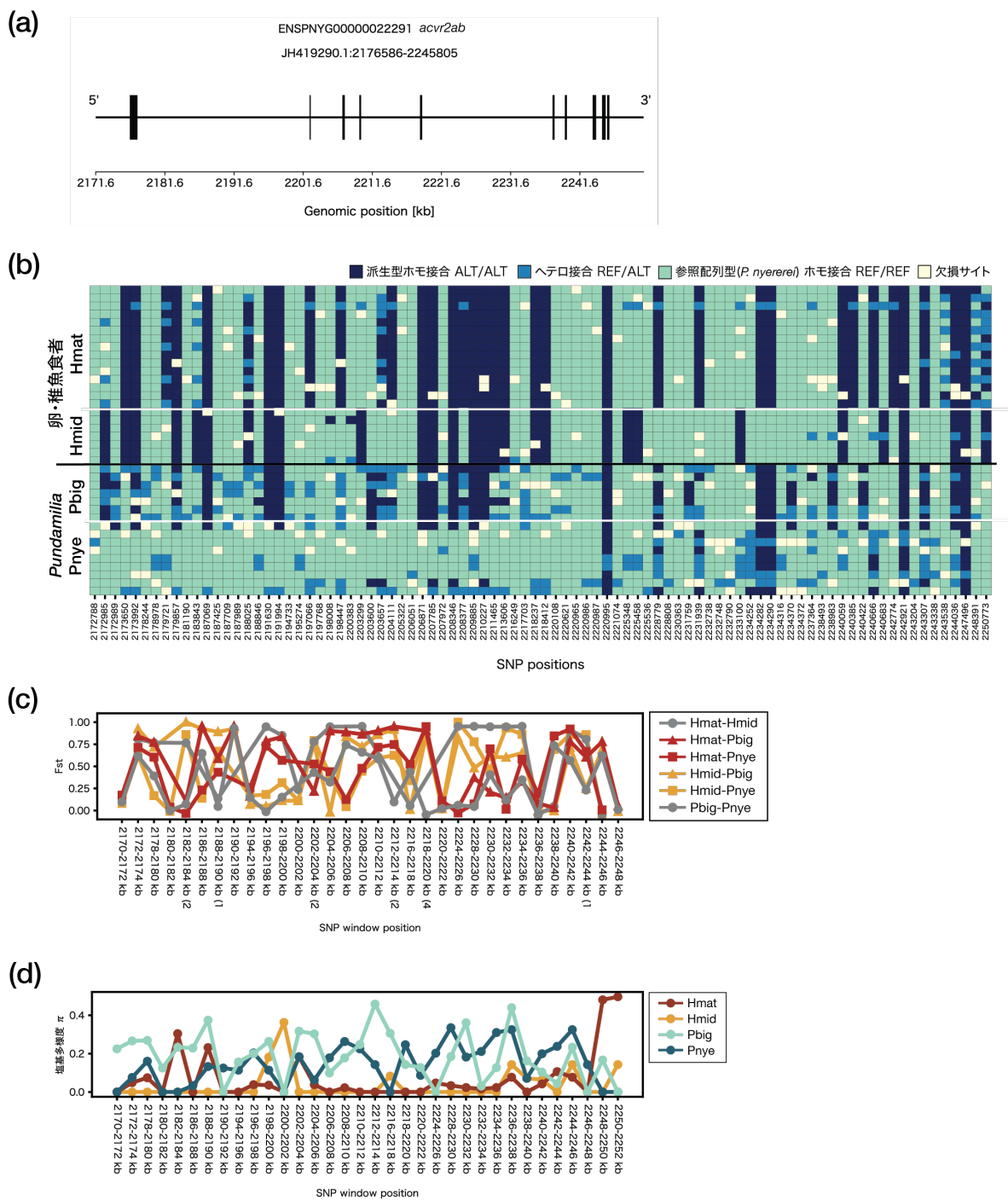


Figure 2-14 *acvr2ab* の遺伝子領域とその周辺の SNP

(a) イントロン・エキソン構造とゲノム上の位置。Ensembl ID および遺伝子名の下に、scaffold 名と遺伝子領域のスタートコドンおよびストップコドンの位置を記載している。遺伝子領域とその前後 5-kb 程度に存在する (b) SNP の遺伝子型ヒートマップ、(c) ペアごとの F_{ST} 、そして (d) SNP ごとの塩基多様度 π の値。(c) では高度分化領域であった SNP window をカッコと数字で示しており、数字は卵・稚魚食者-*Pundamilia* 属の 4 ペアのうち、何ペアで高度分化領域であったか表している。

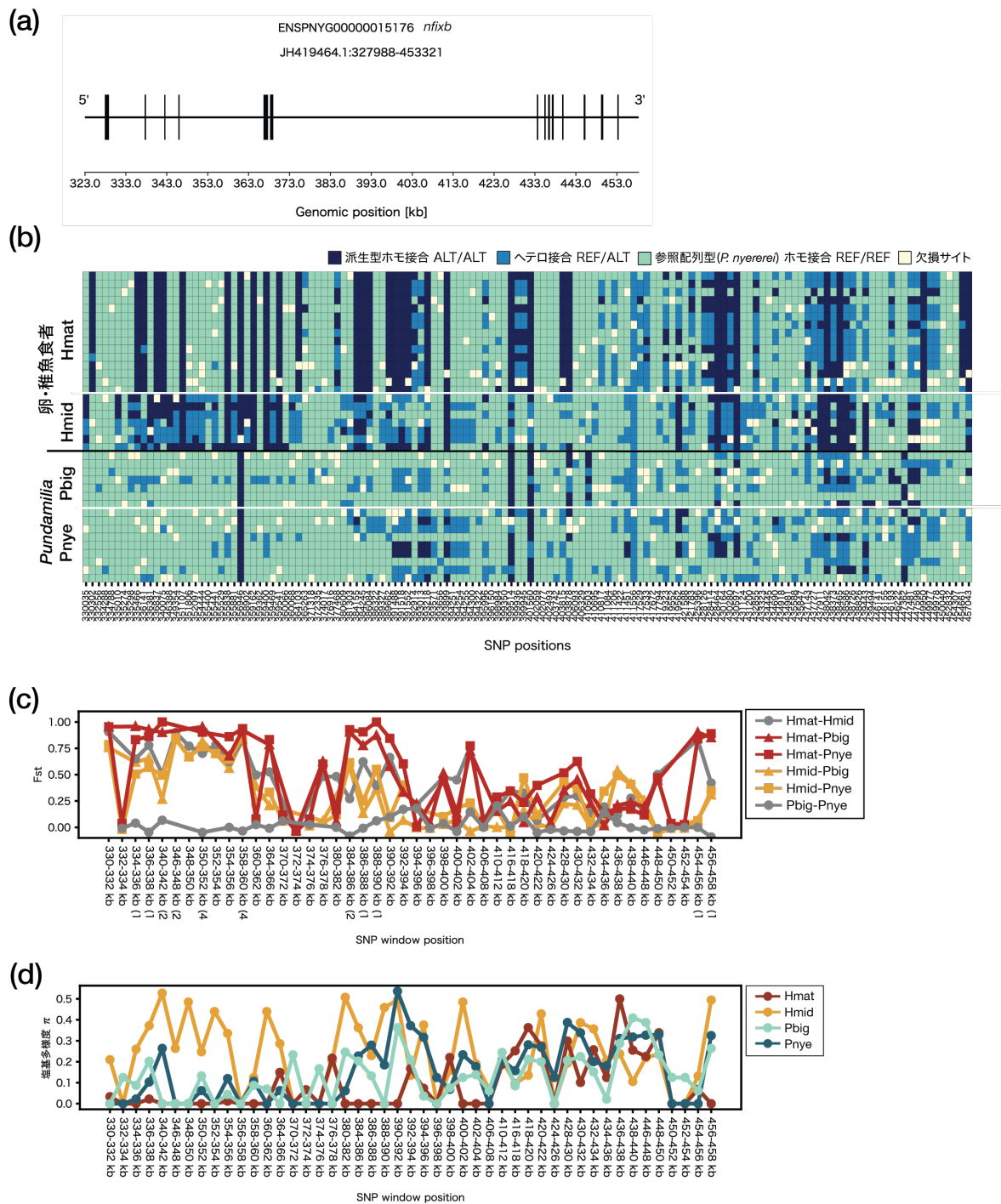


Figure 2-15 *nfixb* の遺伝子領域とその周辺の SNP

(a) イントロン・エキソン構造とゲノム上での位置。Ensembl ID および遺伝子名の下に、scaffold 名と遺伝子領域のスタートコドンおよびストップコドンの位置を記載している。遺伝子領域とその前後 5-kb 程度に存在する (b) SNP の遺伝子型ヒートマップ、(c) ペアごとの F_{ST} 、そして (d) SNP ごとの塩基多様度 π の値。(c) では高度分化領域であった SNP window をカッコと数字で示しており、数字は卵・稚魚食者-*Pundamilia* 属の 4 ペアのうち、何ペアで高度分化領域であったか表している。

4.3 卵・稚魚食者-*P. nyererei*間での発現変動遺伝子の探索

食性の違いに基づく遺伝子発現の比較を目的として、卵・稚魚食者であるマタンビハンターおよび *H. microdon*、さらに *P. nyererei* の3種においてトランスクリプトーム解析を実施した。本研究では、卵・稚魚が脂質およびタンパク質を多く含むことに着目し、肝臓組織を用いた RNA-seq 解析を行った。

その結果、マタンビハンターと *P. nyererei* の比較では、マタンビハンターで高発現している遺伝子が 114 個、*P. nyererei* で高発現している遺伝子が 176 個検出された (Figure 2-16a)。また、*H. microdon* と *P. nyererei* の比較では、*H. microdon* で高発現している遺伝子が 253 個、*P. nyererei* で高発現している遺伝子が 176 個であった (Figure 2-16b)。

次に、卵・稚魚食者 (マタンビハンターおよび *H. microdon*) で高発現していた遺伝子をクエリとして使用し、g:Profiler の g:GOST ツールを用いてエンリッチメント解析を行った。その結果、マタンビハンターではエンリッチされた 15 個の GO term のうち 7 個 (Figure 2-17、黄色の網掛けおよび*) が、*H. microdon* ではエンリッチされた 145 個の GO term のうち 8 個 (Figure 2-18、黄色の網掛けおよび*) が、脂質の代謝および輸送に関連する GO term であった。

さらに、マタンビハンターおよび *H. microdon* の2種で共通して高発現していた遺伝子は 14 個検出された (Figure 2-16c ベン図中央; Table 2-5)。それらの中には、脂質の代謝や合成に関わる遺伝子も含まれていた (Table 2-5 黄色の網掛け)。

これらの遺伝子周辺の変異による発現調節の可能性を検証するため、サンプルごとの遺伝子発現量と、遺伝子領域およびその周辺に存在する SNP の遺伝子型との比較を行った。まず、脂肪酸の合成経路で働く脂肪酸不飽和化酵素の *fads6* において、マタンビハンターと *P. nyererei* 間で発現量の有意な差が確認された (Figure 2-19)。*H. microdon* では Hmic03L の発現量が他の2個体と比較して著しく低く、発現量に有意な差は認められなかったものの、*fads6* のイントロン領域には高度分化領域が存在することが明らかとなった (Figure 2-19b-

e)。さらに *fads2* や、脂肪酸不飽和化酵素と共に脂肪酸の合成経路で働く *elov15* の発現量も、マタンビハンターにおいて有意に高かった (Figure 2-20)。他にも Table 2-5 の DEG には、グルコーストランスポーターの *slc2a12* (Figure 2-21)、リン脂質を脂肪酸やその他の親油性物質に加水分解するホスホリパーゼ 2 種類 (*pla2g3* (Figure 2-22) および *plg2g12b* (Figure 2-23))、そして酸化還元酵素の *dhfr1* (Figure 2-24) も含まれていた。

得られた脂質代謝に関わる遺伝子の詳細な機能と、卵・稚魚食者の食性適応の関連性については考察で議論する。

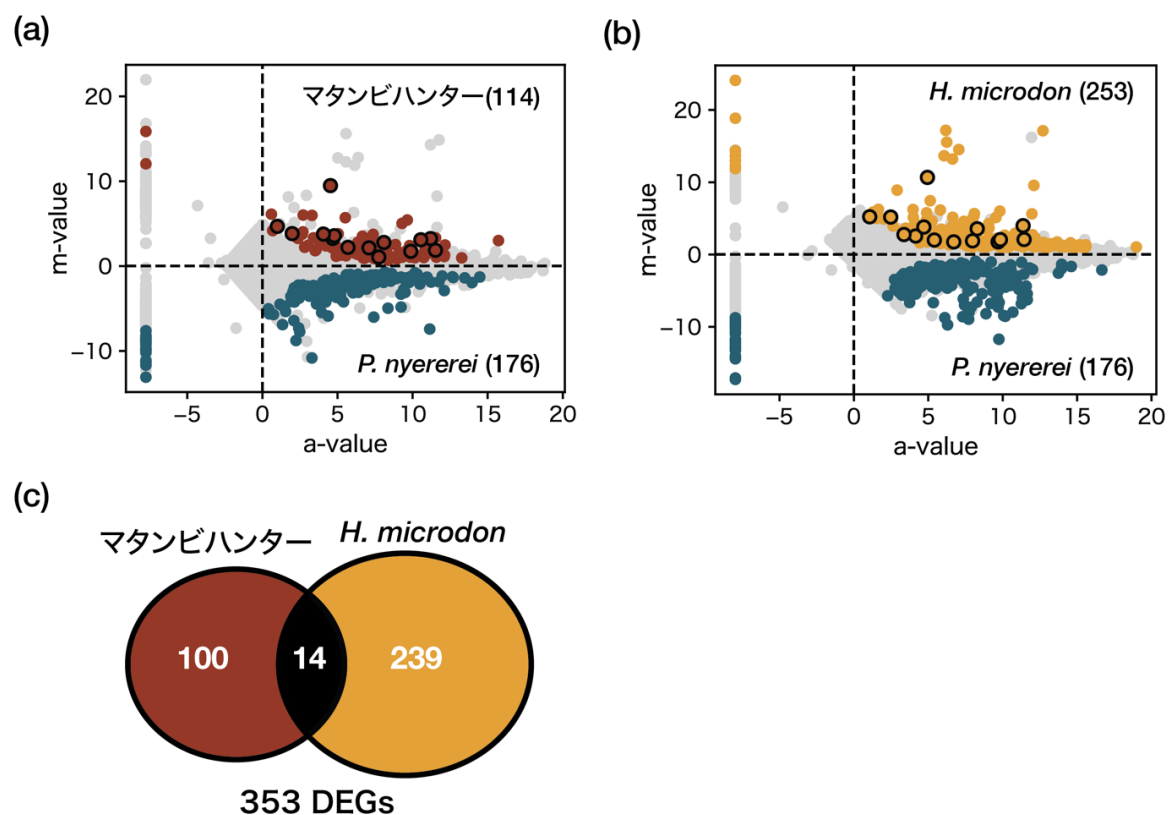


Figure 2-16 MA-plot によるマタンビハンター-*P. nyererei* (a) および *H. microdon*-*P. nyererei* (b) の DEG 探索と卵・稚魚食者間での DEG の共有内訳 (c)

(a) および (b) では、横軸に遺伝子の平均発現量を表す a-value、縦軸にサンプル間での遺伝子発現量差のログ比である m-value をとっている。種名横のカッコ内に、その種で有意に発現量が上昇していた遺伝子 ($q\text{-value} \leq 0.1$) の個数を記載しており、種ごとに色分けしプロットしている (マタンビハンター (赤)、*H. microdon* (黄)、*P. nyererei* (青))。マタンビハンターおよび *H. microdon* の両方で発現量が上昇していた 14 遺伝子 ((c) のベン図中央) は黒縁のプロットで示している。

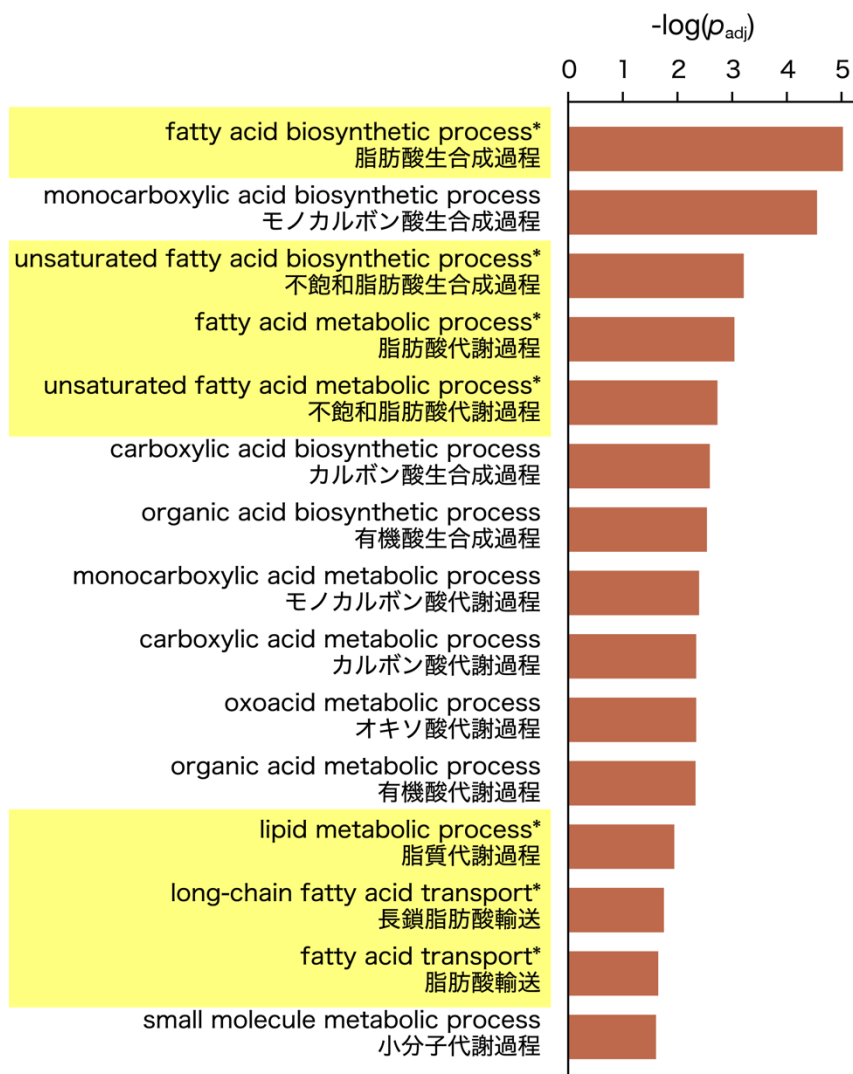
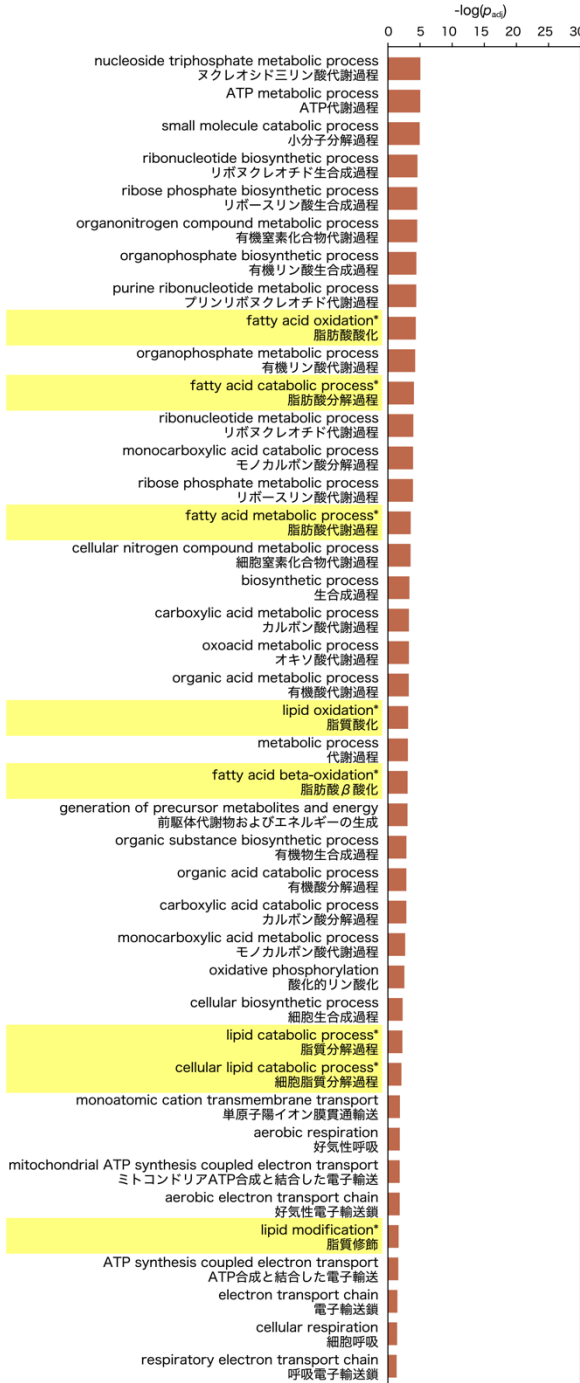
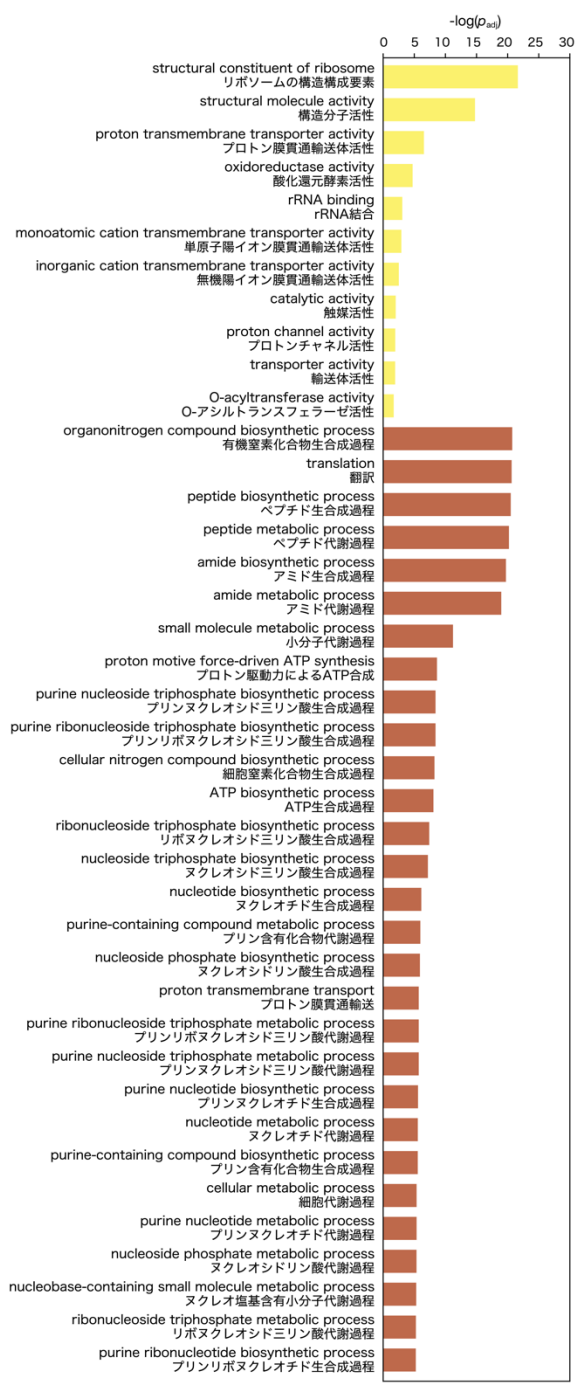


Figure 2-17 マタンビハンターで発現量が上昇していた 114 個の DEG をクエリとしたエンリッチメント解析の結果

脂質・脂肪酸の生合成や代謝に関わるタームはアスタリスクと黄色の網掛けで示している。g:Profiler の g:GOSl によって出力された adjusted p -value (p_{adj}) をエンリッチメントの指標としている。この解析では、Gene Ontology のデータベースのうち Biological Process に含まれるタームのみがエンリッチされた。



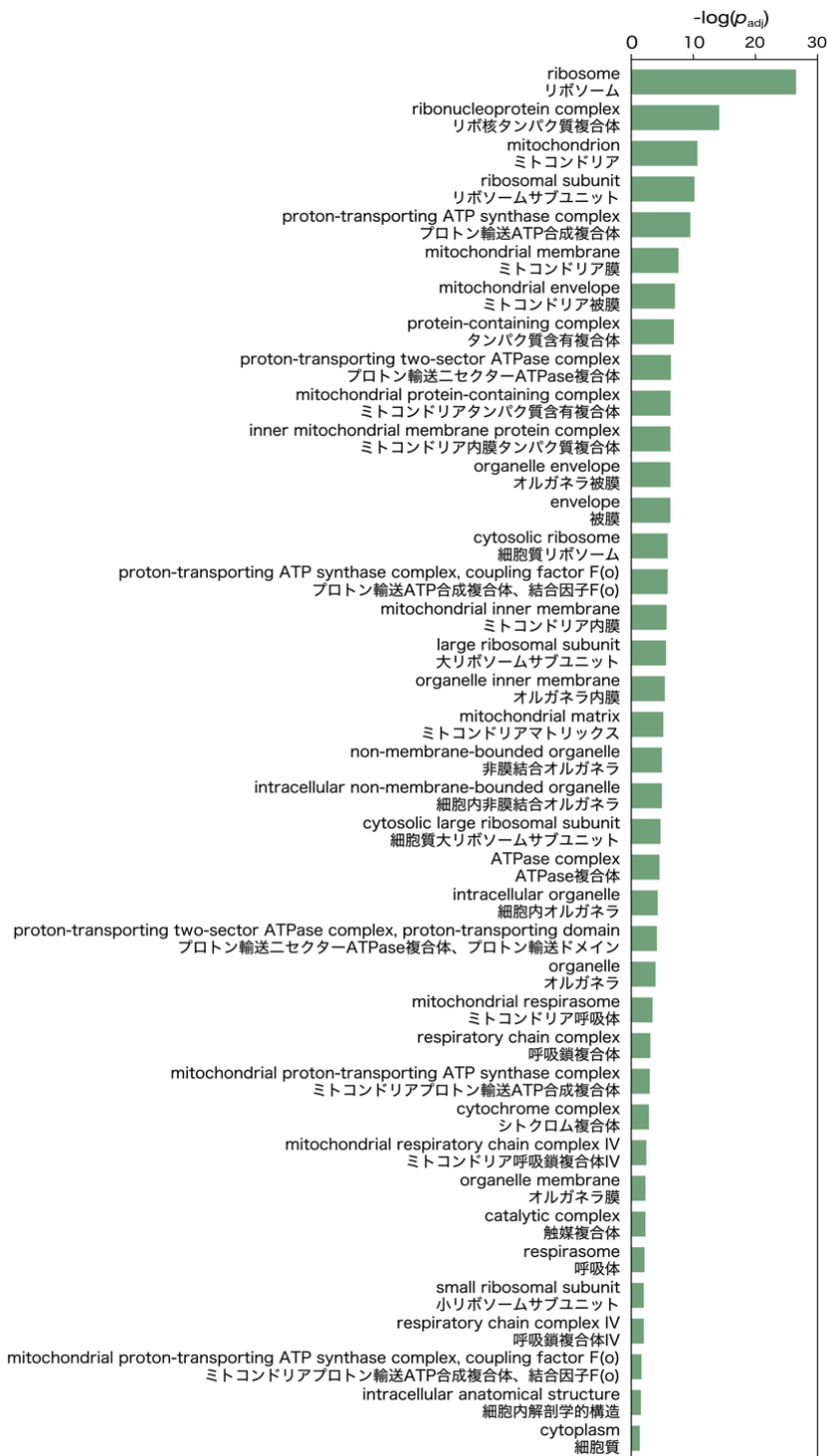


Figure 2-18 *H. microdon* で発現量が上昇していた 253 個の DEG をクエリとしたエンリッチメント解析の結果

脂質・脂肪酸の生合成や代謝に関わるタームはアスタリスクと黄色の網掛けで示している。g:Profiler の g:GOST によって出力された adjusted p -value (p_{adj}) をエンリッチメントの指標としている。Gene Ontology のデータベースごとに棒グラフが色分けされており、Molecular Function (黄)、Biological Process (赤)、Cellular Component (緑) の順に並んでいる。

Table 2-5 マタンビハンターおよび *H. microdon* の両方で発現量が上昇していた 14 遺伝子の一覧とその機能

Ensembl gene ID	遺伝子名	説明	脂質関連のGO term
ENSPNYG00000018286	<i>dhrs1</i>	Dehydrogenase/reductase (sdr family) member 1	
ENSPNYG00000003516	<i>pla2g3</i>	Phospholipase a2 group iii	1) 2) 3)
ENSPNYG00000006210	<i>pla2g12b</i>	Phospholipase a2 group xiib	1) 2) 3) 4)
ENSPNYG00000020219	<i>fads6</i>	Fatty acid desaturase 6	1) 5) 6) 7)
ENSPNYG00000022344	<i>mogat2</i>	Monoacylglycerol o-acyltransferase 2	
ENSPNYG00000006291	<i>nuak1b</i>	Nuak family, snf1-like kinase, 1b	
ENSPNYG00000011425	unknown	unknown	
ENSPNYG00000023258	unknown	Class i histocompatibility antigen, f10 alpha chain-like	
ENSPNYG00000011924	<i>rbp2a</i>	Retinol binding protein 2a, cellular	
ENSPNYG00000000821	<i>cyp4f3</i>	Cytochrome p450, family 4, subfamily f, polypeptide 3	
ENSPNYG000000021067	unknown	unknown	
ENSPNYG00000020253	<i>otop3</i>	Otopetrin 3	
ENSPNYG00000021074	<i>nop10</i>	Nop10 ribonucleoprotein homolog (yeast)	
ENSPNYG00000000023	<i>cenpu</i>	Centromere protein u	

脂質の代謝や合成に関わる遺伝子は黄色の網掛けで示している。“脂質関連の GO term”は、遺伝子が Figure 2-17・Figure 2-18 のエンリッチメント解析で得られた、脂質に関わるターム (1) lipid metabolic process、2) long-chain fatty acid transport、3) fatty acid transport、4) lipid catabolic process、5) fatty acid biosynthetic process、6) fatty acid metabolic process、7) fatty acid metabolic process) に含まれていた場合、対応するタームの番号を表記している。

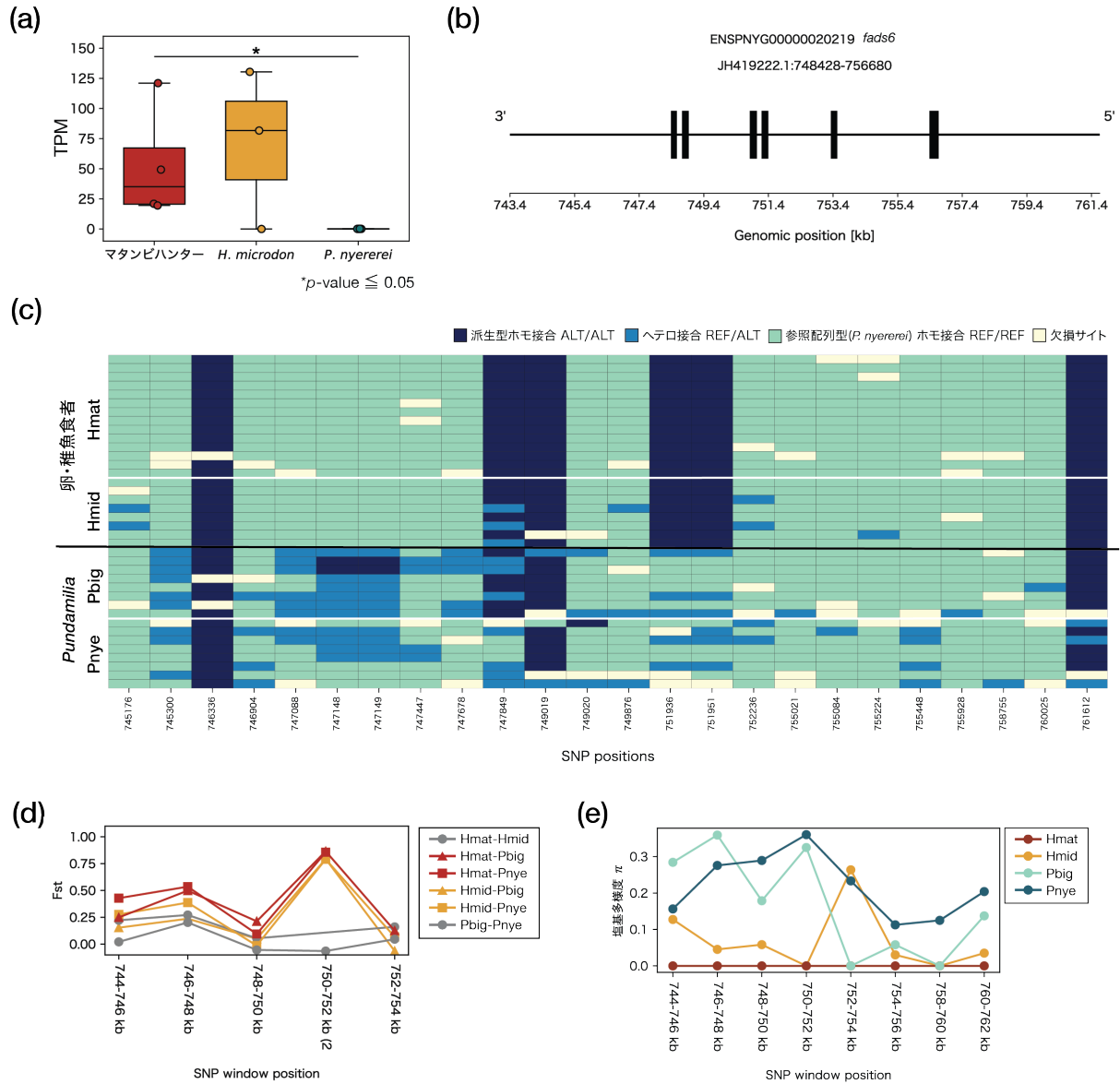


Figure 2-19 *fads6* の遺伝子発現量および遺伝子領域とその周辺の SNP

(a) TPM のサンプル・種間比較。(b) イントロン・エクソン構造とゲノム上での位置。Ensembl ID および遺伝子名の下に、scaffold 名と遺伝子領域のスタートコドンおよびストップコドンの位置を記載している。遺伝子領域とその前後 5-kb 程度に存在する (c) SNP の遺伝子型ヒートマップ、(d) ペアごとの F_{ST} 、そして (e) SNP ごとの塩基多様度 π の値。(d) では高度分化領域であった SNP window をカッコと数字で示しており、数字は卵・稚魚食者-*Pundamilia* 属の 4 ペアのうち、何ペアで高度分化領域であったか表している。

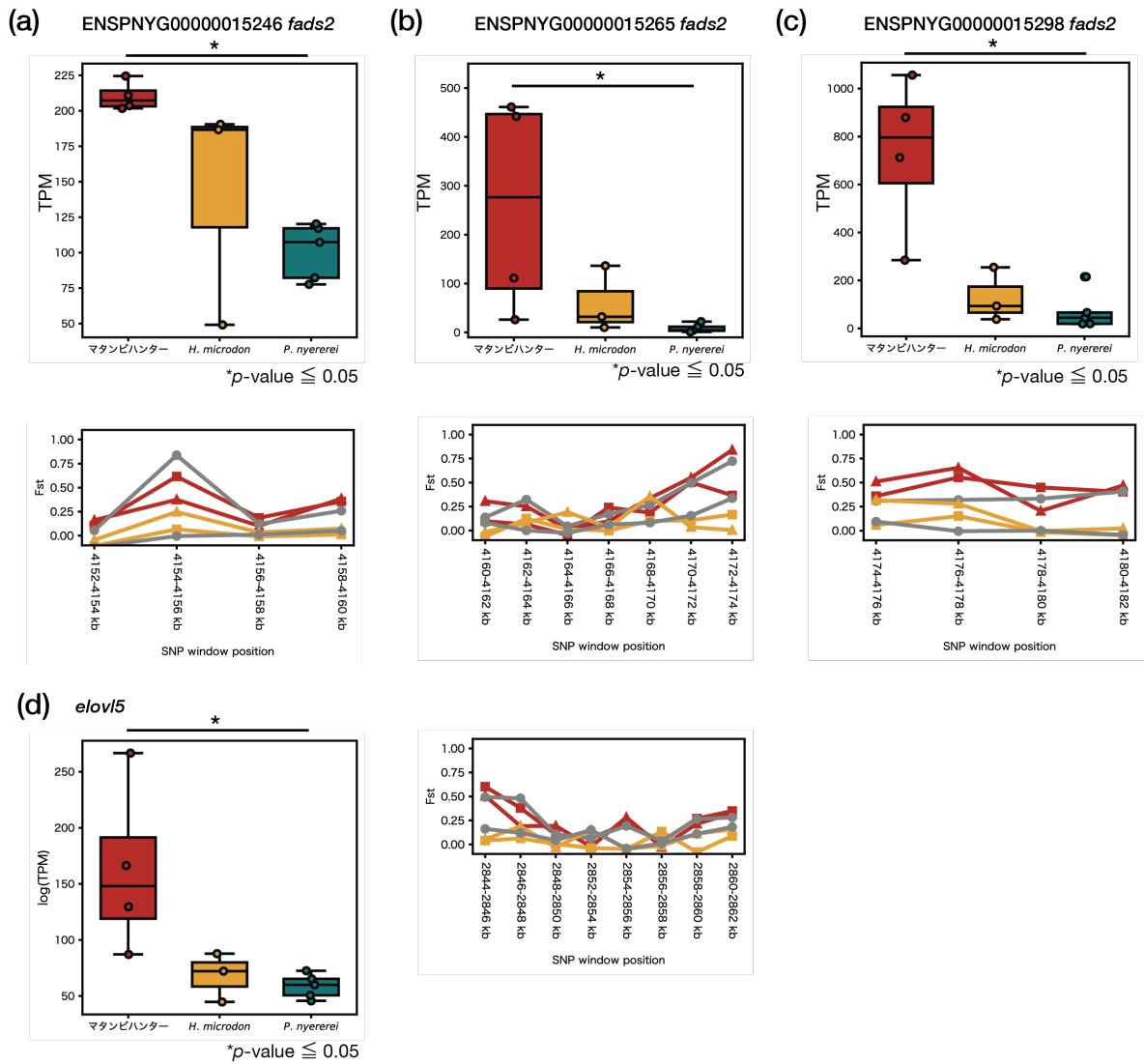


Figure 2-20 *fads6*以外の脂肪酸代謝経路で働く4つの遺伝子の発現量と F_{ST} の比較

P. nyerelei でアノテーションされている3つの *fads2* ((a) ENSPNYG00000015246、(b) ENSPNYG00000015265、(c) ENSPNYG00000015298) と (d) *elov15* の TPM と F_{ST} の比較。

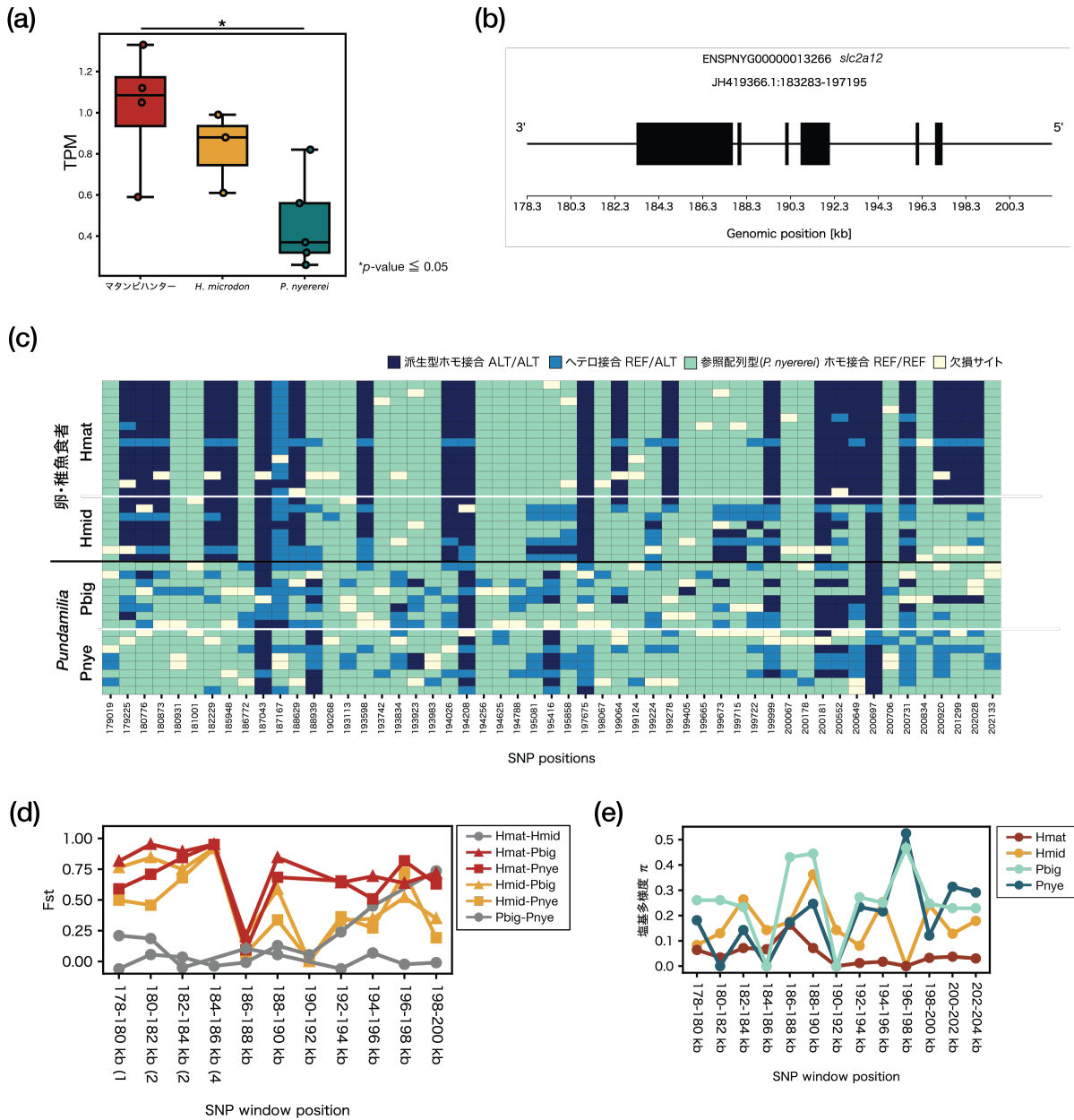


Figure 2-21 *slc2a12* の遺伝子発現量および遺伝子領域とその周辺の SNP

(a) TPM のサンプル・種間比較。(b) イントロン・エクソン構造とゲノム上での位置。Ensembl ID および遺伝子名の下に、scaffold 名と遺伝子領域のスタートコドンおよびストップコドンの位置を記載している。遺伝子領域とその前後 5-kb 程度に存在する (c) SNP の遺伝子型ヒートマップ、(d) ペアごとの F_{ST} 、そして (e) SNP ごとの塩基多様度 π の値。(d) では高度分化領域であった SNP window をカッコと数字で示しており、数字は卵・稚魚食者-*Pundamilia* 属の 4 ペアのうちの、何ペアで高度分化領域であったか表している。

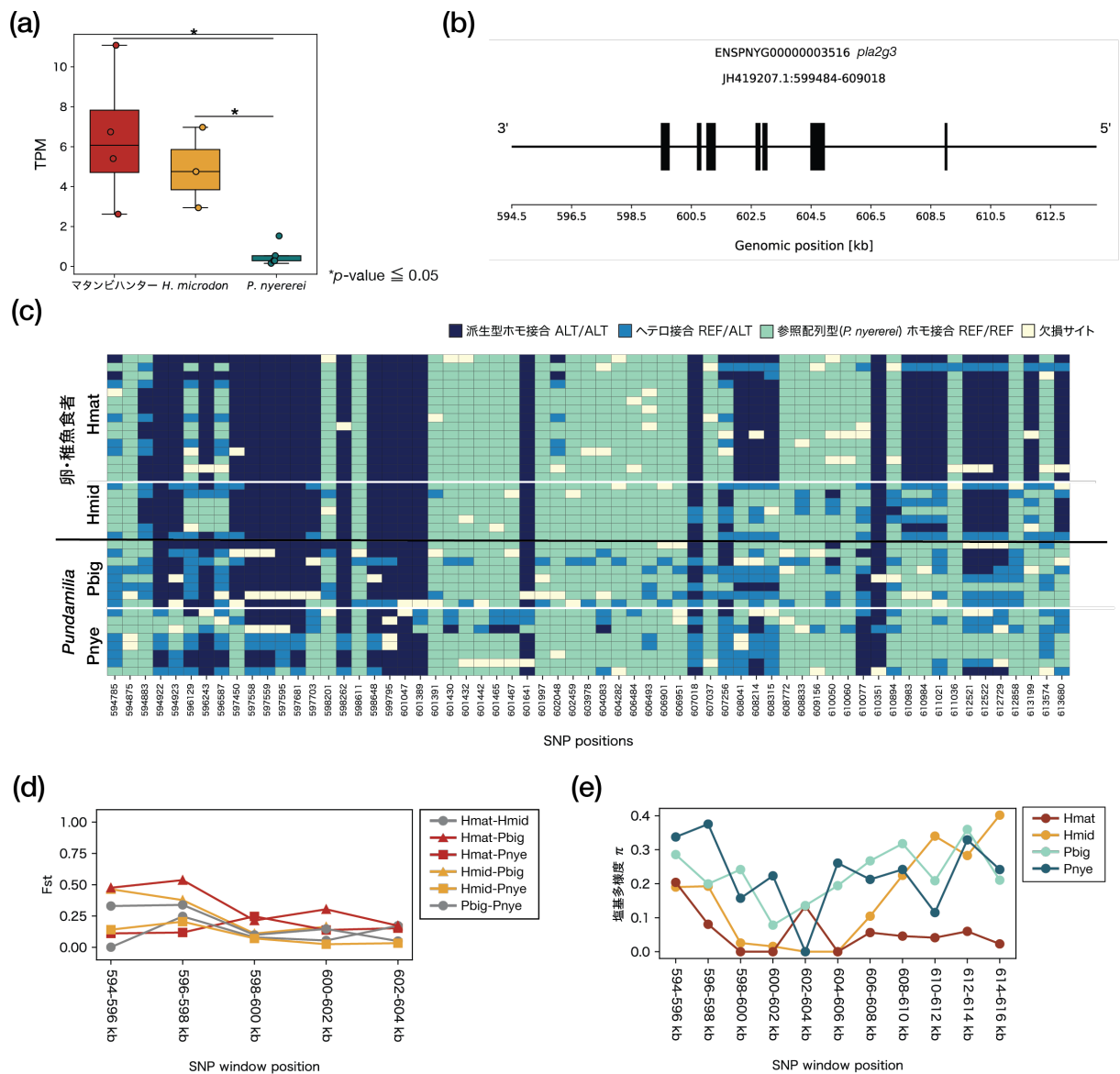


Figure 2-22 *pla2g3* の遺伝子発現量および遺伝子領域とその周辺の SNP

(a) TPM のサンプル・種間比較。(b) イントロン・エクソン構造とゲノム上での位置。Ensembl ID および遺伝子名の下に、scaffold 名と遺伝子領域のスタートコドンおよびストップコドンの位置を記載している。遺伝子領域とその前後 5-kb 程度に存在する (c) SNP の遺伝子型ヒートマップ、(d) ペアごとの F_{ST} 、そして (e) SNP ごとの塩基多様度 π の値。

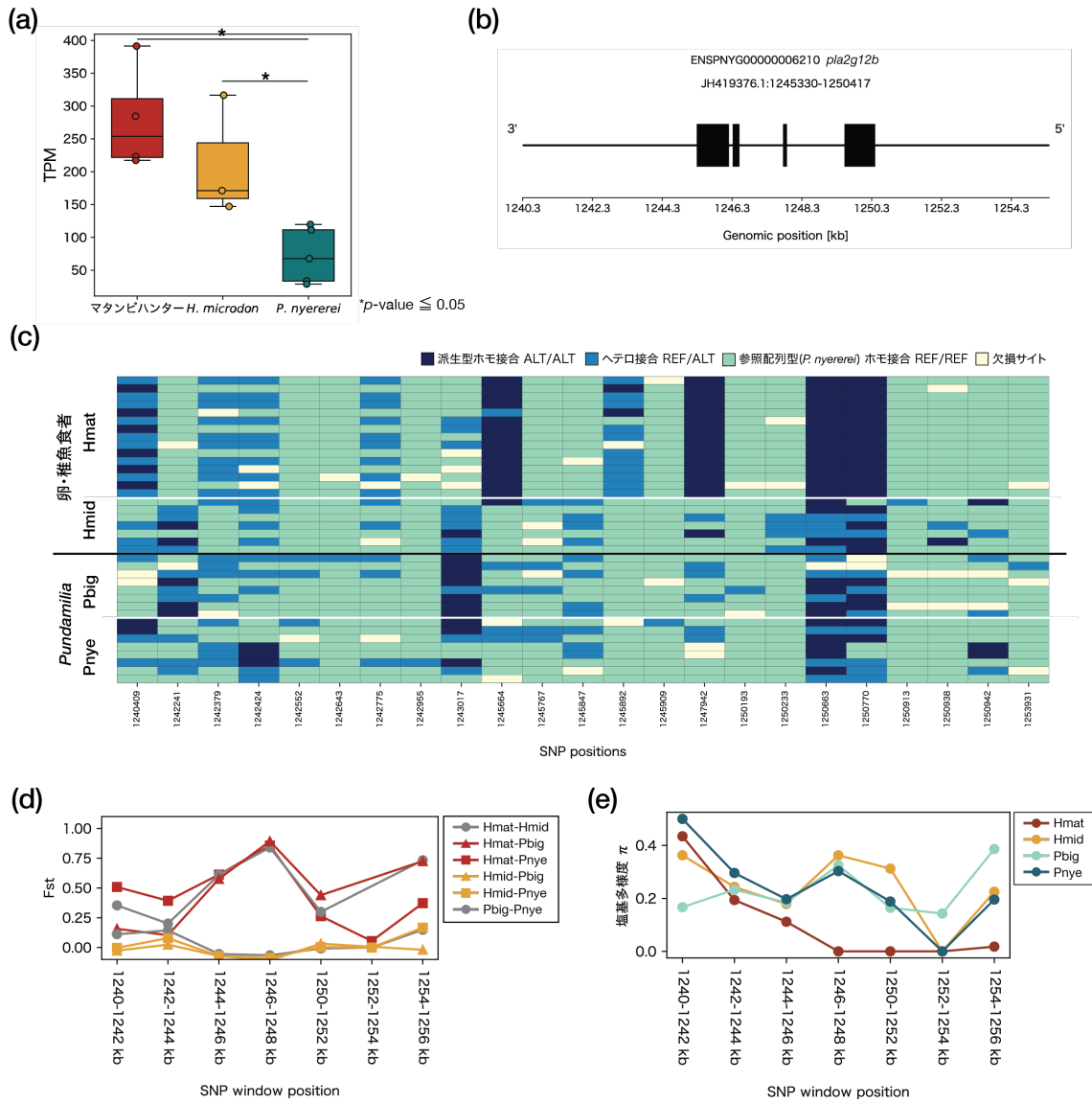


Figure 2-23 *pla2g12b* の遺伝子発現量および遺伝子領域とその周辺の SNP

(a) TPM のサンプル・種間比較。(b) イントロン・エキソン構造とゲノム上での位置。Ensembl ID および遺伝子名の下に、scaffold 名と遺伝子領域のスタートコドンおよびストップコドンの位置を記載している。遺伝子領域とその前後 5-kb 程度に存在する (c) SNP の遺伝子型ヒートマップ、(d) ペアごとの F_{ST} 、そして (e) SNP ごとの塩基多様度 π の値。

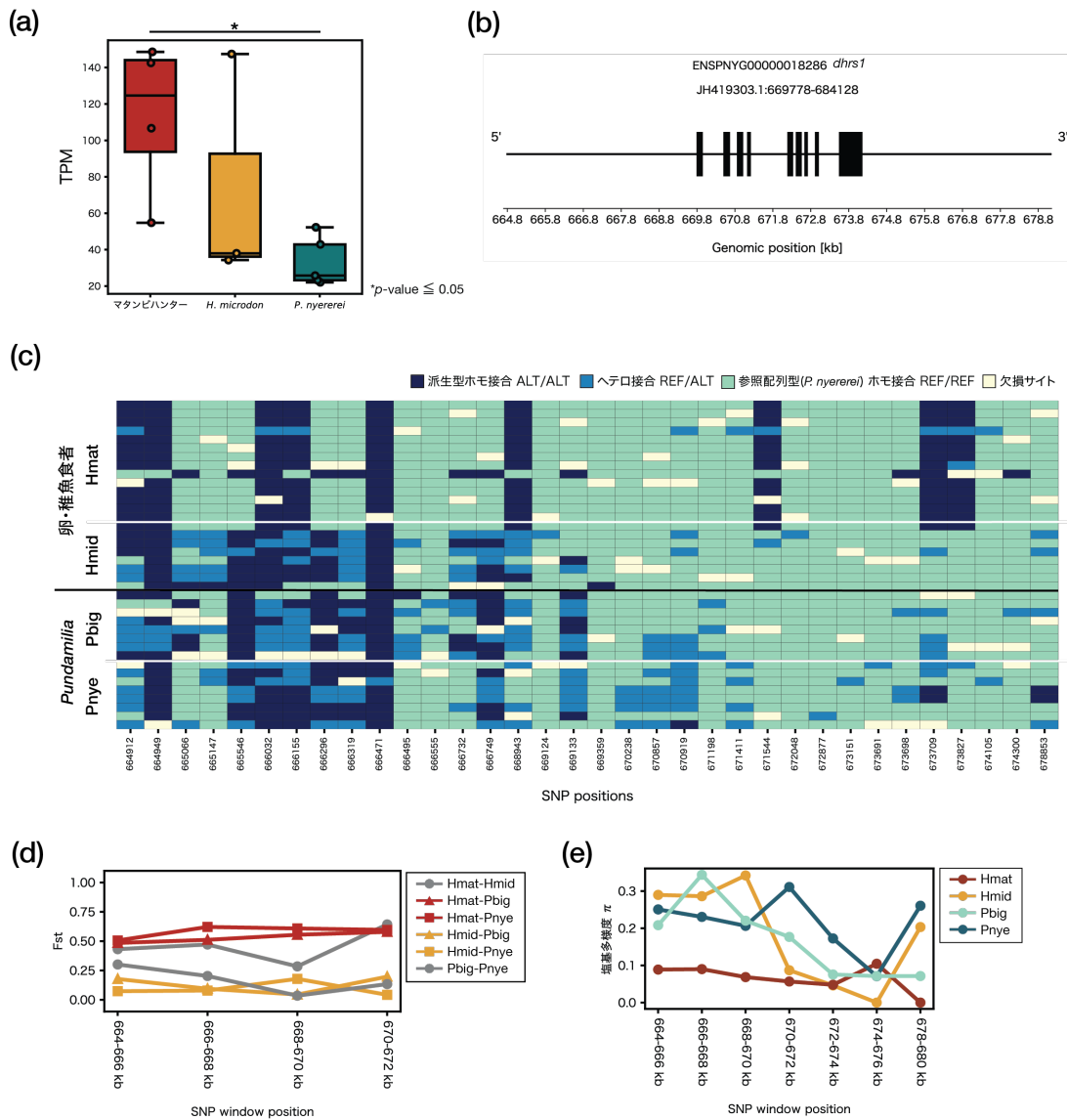


Figure 2-24 *dhrs1* の遺伝子の発現量および遺伝子領域とその周辺の SNP

(a) TPM のサンプル・種間比較。(b) イントロン・エクソン構造とゲノム上での位置。Ensembl ID および遺伝子名の下に、scaffold 名と遺伝子領域のスタートコドンおよびストップコドンの位置を記載している。遺伝子領域とその前後 5-kb 程度に存在する (c) SNP の遺伝子型ヒートマップ、(d) ペアごとの F_{ST} 、そして (e) SNP ごとの塩基多様度 π の値。

5. 考察

本章では、高度分化領域と発現変動遺伝子から、卵・稚魚食性の分子メカニズムの解明を試みた。系統解析から、姉妹種である昆虫食の *Pundamilia* sp. “big blue” との分岐後に卵・稚魚食への食性適応が生じたと予想される (Figure 2-4)。この *P.* sp. “big blue” と *P. nyererei* の 2 種と、卵・稚魚食者であるマタンビハンターと *H. microdon* における分化領域を特定することで、食性の違いに寄与する変異の特定を試みた。脂質が豊富に含まれた卵・稚魚を恒常的に摂取するにあたり、卵・稚魚食者では肝臓における脂質代謝能力が他の食性と比べて高いと予想していた。実際に、脂肪酸と脂質の代謝・輸送に関わる遺伝子において、高度分化領域が複数検出された。同様に、肝臓組織を用いたトランスクリプトーム解析からも、脂質の代謝に関わる遺伝子の発現量が、卵・稚魚食者で共通して増加していることも確認された。さらに、卵・稚魚食者は、その特殊な捕食戦略に適した頭蓋顔面構造を有している。頭部・顎などの発生に関わる遺伝子の近傍に、高度分化領域が存在することが明らかとなった。

今回特定された食性適応の候補遺伝子を元に、現時点で考えられる卵・稚魚食者の食性適応のメカニズムについて、各遺伝子の機能と共に考察していく。

5.1 卵・稚魚に含まれる脂質の代謝能力の向上

ビクトリア湖シクリッドの食性グループの中でも、卵・稚魚食者は高次の栄養段階にあたる、肉食性に分類される (Figure 1-4)。卵・稚魚食者の捕食対象である魚卵は、主にタンパク質・脂質・炭水化物で構成されており、特に卵黄は中性脂肪、コレステロール、リン脂質、脂肪酸から構成されている (Termer 1979; Kamler 1992)。魚類の脂質代謝には種間差があり、環境や食性に応じて適応的な変化が見られることがわかっている (Tocher 2003)。し

たがって、シクリッドにおいても、餌に含まれる脂質の量によって、代謝能が異なる可能性があると言える。

卵・稚魚食者で高発現していた遺伝子にはカルボン酸、アミノ酸そして脂質といった有機化合物の代謝・生合成・輸送に関わる遺伝子が含まれており (Figure 2-17 ; Figure 2-18)、特に脂質に関わる遺伝子の一部では、高度分化領域の存在も確認された (Figure 2-19 ; Figure 2-23)。今回は、主に脂質の代謝等に関わる遺伝子の個別の遺伝子発現および分化領域に着目し、ターゲットとなる脂質の種類別に考察していく。

5.1.1 脂肪酸

生体内では、餌から摂取されたグルコースが、さまざまな中間物質を経て代謝され、最終的に脂肪酸合成経路によって長鎖脂肪酸、中性脂肪へと変換され、脂肪組織へ蓄積される (Figure 2-25)。

食性適応の候補遺伝子には、グルコースから脂肪酸への代謝経路に関わる遺伝子が多く含まれていた。脂肪酸不飽和化酵素 (*fads*) および脂肪酸伸長酵素 (*elovl*) は、短鎖脂肪酸から長鎖脂肪酸を合成する経路で働く酵素である (Figure 2-25)。興味深いことに、マタンビハンターにおいて *fads6* の発現量が有意に増加しており、かつイントロン上に高度分化領域も存在することが明らかとなった (Figure 2-19)。対象となった SNP の遺伝子型に着目すると、卵・稚魚食者 2 種で共通して派生型の SNP に固定しており、卵・稚魚食者に対して強い自然選択が働いたと言える (Figure 2-19c)。したがって、これら SNP によるシス制御が、*fads6* の遺伝子発現量に関わっている可能性があると言える。さらに、ゲノム中に 3 コピー存在する *fads2* と、脂肪酸伸長酵素の *elovl5* の発現量が、マタンビハンターで増加していることも明らかとなった (Figure 2-20)。魚類を対象とした複数の先行研究で、*fads2* の発現量・コピー数の増加に伴い、DHA 合成経路が活性化されることがわかっている (Ishikawa et al. 2019; Matsushita et al. 2020)。さらに *slc2a12* (solute carrier family 2

member 12) は別名 *glut12* (glucose transporter type 12) と呼ばれるグルコーストランスポーターで、特に筋肉や脂肪組織における糖代謝に関与している(Rogers et al. 2002)。*slc2a12* も、マタンビハンターで発現量が増加しており、かつ遺伝子の上流とエキソン内に高度分化領域が存在している (Figure 2-21)。これらの遺伝子の発現量の増加により、卵・稚魚食者の生体内で脂肪酸の代謝経路が活性化されていると推察する。とりわけ *fads6* や *slc2a12* においては、高度分化領域の存在が、遺伝子の発現量の増加に寄与した可能性がある。

RNA-seq 解析で DEG として検出はされなかったものの、*htatip2*、*acot19* など脂肪酸の代謝と合成に関わる遺伝子領域において、高度分化領域の存在が確認された (Table 2-4 黄色の網掛け; *htatip2* (Figure 2-9)、*acot19* (Figure 2-10))。マウスの肝臓におけるプロテオミクス解析から、*htatip2* (HIV-1 Tat interactive protein 2) が脂肪酸蓄積と酸化を調節する役割を持つことがわかっている(Liao et al. 2014)。*acot19* (acyl-CoA thioesterase 19) は、アシル CoA チオエステルを遊離脂肪酸と補酵素に加水分解する酵素で、脂肪酸の伸長に間接的に影響を与えている(Tillander et al. 2017)。

まとめると、卵・稚魚食者においてこれらの酵素やトランスポーターが、高度分化領域によるシス制御を受けた、あるいはその他の生理学的要因によって発現量が上昇し、グルコース-脂肪酸の代謝経路の活性が変化したと推察する。

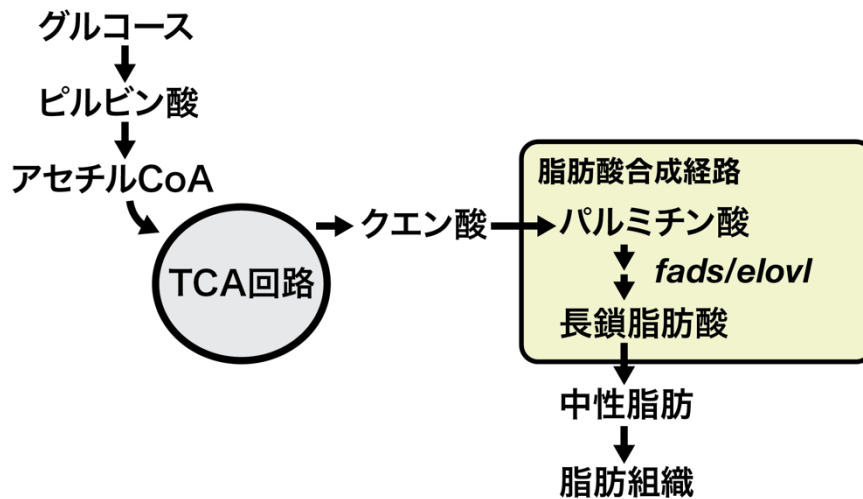


Figure 2-25 グルコースから長鎖脂肪酸が生成される経路の概略図

経路の途中産物と関連酵素を一部省略している。ヴォート基礎生化学 第5版、Foster et al. (2014)、Ishikawa et al. (2019)を元に作成した。

5.1.2 リン脂質、中性脂肪、コレステロール

脂肪酸だけでなく、魚卵に含まれるリン脂質、中性脂肪、コレステロールの代謝経路に関わる遺伝子の発現量の上昇が見られ、これらの代謝経路が卵・稚魚食者で活性化されている可能性も示唆された。まず、リン脂質を脂肪酸やその他の親油性物質に加水分解するホスホリパーゼにおいて、卵・稚魚食者において有意な発現量の増加が見られた (*pla2g3* (Figure 2-22a)、*pla2g12b* (Figure 2-23a))。脂肪滴は細胞内に存在する中性脂質の塊で、細胞内のエネルギーの貯蔵や分解によるエネルギー産生、脂質合成、熱産生、タンパク質分解などに関与している。*dhrs1* は、発現量が増加すると、脂肪滴のサイズおよび中性脂肪量も増加することがわかっている(Bamigbade et al. 2023)。実際に、マタンビハンターにおいて *dhrs1* の発現量の増加が確認された (Figure 2-24a)。*nr5a2* は胆汁酸合成、コレステロール恒常性、中性脂肪合成に関与する遺伝子の発現を調節することにより、重要な代謝センサーとして機能することで知られている(Sandhu et al. 2021)。*nr5a2* は卵・稚魚食者での発現量の増加は観察されなかったものの、高度分化領域が確認された (Figure 2-11)。

5.1.3 脂質代謝のまとめ

まとめると、卵・稚魚食者では脂肪酸やリン脂質、中性脂肪、そしてコレステロールといった脂質の代謝に関わるタンパク質の発現量が高く、*P. nyererei*よりも脂質の代謝能力が高いことが予想される。実際に、脂質の代謝関連の遺伝子は *P. nyererei* の DEG としては検出されなかった。

一部の脂質代謝関連遺伝子では、卵・稚魚食者での遺伝子発現量の増加は検出されず、高度分化領域のみが得られた。しかし、RNA-seq は RNA のサンプルの質によって結果が左右されやすく、また発現量が低い遺伝子の検出が困難であることが知られている。したがって、高度分化領域の存在が確認された遺伝子について、遺伝子の機能や発現に間接的に影響を与えた可能性は否定できない。

今後の展望として、卵・稚魚食性だけでなく、他の食性グループを対象に今回行った解析を応用することで、シクリッドの包括的な食性適応機構の解明が望まれる。例えば、魚食性のシクリッドは、卵・稚魚食性と同じく、捕食対象が比較的高栄養価な食性グループと言える。魚食者において代謝に関わる遺伝子の発現プロファイルが、卵・稚魚食者とどこまで類似するのかが興味深い。さらに藻類など、卵や稚魚とは異なる組成のものを捕食対象とする食性グループでは、肝臓組織における遺伝子発現プロファイルが、肉食性のシクリッドと大きく異なることが予想される。

5.2 特殊な捕食行動に重要な頭蓋・顔面の形態形成

卵・稚魚食者は、その特殊な捕食戦略に適した頭蓋顔面構造を有しており、どれも姉妹系統である *Pundamilia* 属では見られない形質である (Figure 2-1)。

実際に、高度分化遺伝子をクエリとしたエンリッチメント解析では、形態発生や発生プロセスなど、形態発生に関わるタームがエンリッチした (Figure 2-7)。特に、形態形成に重要な *vax1* (Figure 2-12)、*tcf4* (Figure 2-13)、*acvr2ab* (Figure 2-14)、*nfixb* (Figure

2-15) において、卵・稚魚食者-*Pundamilia* 属の 4 ペアすべてで高度分化領域が確認された (Table 2-4 青の網掛け)。 *vax1* (ventral anterior homeobox 1) は、発生過程において重要な役割を果たすホメオボックス遺伝子であり、 *vax1* を欠損したマウスでは、視神経の形成不全、コロポーマ、基底前脳の欠陥、ならびに葉状全前脳症が観察されている (Hallonet et al. 1999)。 *tcf4* (transcription factor 4) は Wnt シグナル伝達に関わる転写因子の一つで、マラウイ湖のシクリッドにおいて、Wnt シグナルの拡張が頭部形態の種間差の調節に関わっていることが明らかとなっている (Parsons et al. 2014)。 *acvr2ab* (activin A receptor type 2Ab) はアクチビン受容体で、 *acvr2ab* の変異体において、頭部の骨化異常が誘導されることが確認されている (Trumpp et al. 2023)。さらに、 *nfixb* (Nuclear factor I/Xb) はマウス・ゼブラフィッシュにおいて骨格筋の発生に関わる (Pistocchi et al., 2013)。これら顔面・頭部の形態形成に関わる遺伝子のシス制御領域への変異によって、卵・稚魚食者と *Pundamilia* 属の形態差が生み出されている可能性があると言える。

一方で、形態発生は発生段階ごとのわずかな遺伝子発現の調節によって変化しやすい。したがって、形態の説明遺伝子の決定には、分化領域のみで議論するのではなく、発生段階での遺伝子発現の差を見る必要があると言える。具体的には、発生の初期段階の個体を用いて、両系統間で顕著な形態差が見られる歯や、顎そのもののトランスクリプトーム解析を行うことで、食性特異的な形質の獲得機構の解明が望まれる。

6. 結論

本章では、特殊な食性である卵・稚魚食者の食性適応について、代謝機能と捕食行動に関わる形質の分子メカニズムを明らかにすることに成功した。卵・稚魚食者において、脂質代謝に関わる複数の遺伝子の発現量が顕著に上昇しており、魚卵に多く含まれる脂肪酸や中性脂肪、リン脂質などの効率的な代謝が、卵・稚魚食への適応を可能としたと考えられる。さらに、捕食戦略に適した頭蓋顔面構造の形成に関与する遺伝子においても高度分化領域が見られた。これらの高度分化領域による遺伝子発現の制御が、形態の適応進化にも関わった可能性が示唆された。卵・稚魚を効率的に代謝するための生理機能の向上、そして卵・稚魚の捕食を行うための形質の獲得が、卵・稚魚食者の食性適応の基盤となったと考えられる。

一方で、捕食行動を引き起こす神経系のメカニズムについては未解明である。今後は、実際に卵・稚魚を与えての行動実験や、脳組織での遺伝子発現の比較を行うことで、卵・稚魚食の進化についてさらなる理解が期待される。

総論

生物の進化史や形態や生態を司る分子メカニズムの理解は、常に進化生物学者の関心を集めるテーマである。本研究では、種分化のモデル生物とも呼ばれるビクトリア湖のシクリッドを題材とし、特殊な食性を持つシクリッドである卵・稚魚食者の進化史と、食性適応のメカニズムの解明を試みた。

第1章では、ビクトリア湖に放流された外来種・ナイルパーチが、湖生態系の主要な構成要素であったシクリッドの遺伝構造へ与えた影響を、全ゲノムレベルで明らかにした。大規模なゲノム比較解析から、実際にナイルパーチの影響で個体数を減らし、ボトルネック効果を受けた種を特定した。特に卵・稚魚食者であるマタンビハンターが最も強いボトルネックを経験しており、卵・稚魚食者の生態的地位が主な要因となって、ナイルパーチの影響をより強く受けたことが示唆された。これまで観測データにのみ基づき議論されていた、ビクトリア湖シクリッドが受けた外来種侵略の影響について、詳細な進化史とともに考察を行った。

第2章では、卵・稚魚食性への食性適応に関わった分子メカニズムを明らかにするために、姉妹種とのゲノム配列・遺伝子発現の比較を行った。卵・稚魚食者2種と、その姉妹系統でありながら食性の異なる *Pundamilia* 属との間で、遺伝的に高く分化しているゲノム領域を、高度分化領域と定義した。高度分化領域の隣接する遺伝子、および両系統間で遺伝子発現領域に差が見られた遺伝子を食性適応の候補遺伝子とし、それらの遺伝子の機能と照らし合わせ考察を行った。実際に、卵・稚魚食者において脂肪酸やリン脂質といった脂質の代謝に関する遺伝子が食性適応候補遺伝子として得られ、脂質が豊富に含まれた魚卵を代謝するために、脂質の代謝機能が分化したと考えられる。また、魚卵の捕食に適した顔面構造の発生や形態形成に関わる遺伝子についても、遺伝子の周辺領域やイントロンにおいて高度分化領域が検出され、こうした変異が遺伝子の発現制御に関わった可能性が示唆された。

本研究から、これまで解明されていなかった卵・稚魚食者の進化史と、食性の分子メカニズムについて新たな知見が得られた。今後、外来種の侵略を受けた種の具体的な保全政策の策定や、他の特殊な生態・形態の遺伝的基盤のさらなる理解が望まれる。

参考文献

- Alexander DH, Novembre J, Lange K. 2009. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res.* 19:1655–1664.
- Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- Bamigbade AT, Ogunsade OO, Xu S, Deng Y, Liu P. 2023. ERLIN1 may be involved in DHRS1-induced Change in Lipid Droplet Morphology in HeLa Cell. *Cell Biology* [Internet]. Available from: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.12.09.570901v1.full.pdf?utm_source=chatgpt.com
- Bezault E, Mwaiko S, Seehausen O. 2011. Population genomic tests of models of adaptive radiation in Lake Victoria region cichlid fish. *Evolution* 65:3381–3397.
- Bouckaert R, Heled J. DensiTree 2: Seeing trees through the Forest. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/012401v1>
- Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu C-H, Xie D, Suchard MA, Rambaut A, Drummond AJ. 2014. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.* 10:e1003537.
- Bouckaert R, Vaughan TG, Barido-Sottani J, Duchêne S, Fourment M, Gavryushkina A, Heled J, Jones G, Kühnert D, De Maio N, et al. 2019. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.* 15:e1006650.
- Brawand D, Wagner CE, Li YI, Malinsky M, Keller I, Fan S, Simakov O, Ng AY, Lim ZW, Bezault E, et al. 2014. The genomic substrate for adaptive radiation in African cichlid fish. *Nature* 513:375–381.
- Browning BL, Tian X, Zhou Y, Browning SR. 2021. Fast two-stage phasing of large-scale sequence data. *Am. J. Hum. Genet.* 108:1880–1890.
- Burne AR, Ritchie PA, Gruber MAM, Lester PJ. 2017. A genetic bottleneck in populations of a New Zealand endemic ant associated with density of an invasive predatory wasp. *Insectes Soc.* 64:65–74.
- Ceballos FC, Joshi PK, Clark DW, Ramsay M, Wilson JF. 2018. Runs of homozygosity: windows into population history and trait architecture. *Nat. Rev. Genet.* 19:220–234.
- Chakraborty R, Nei M. 1974. Dynamics of gene differentiation between incompletely isolated populations of unequal sizes. *Theor. Popul. Biol.* 5:460–469.
- Chakraborty R, Nei M. 1977. BOTTLENECK EFFECTS ON AVERAGE HETEROZYGOSITY AND GENETIC DISTANCE WITH THE STEPWISE MUTATION MODEL. *Evolution* 31:347–356.
- Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. 2015. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience* 4:7.

- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34:i884–i890.
- Chifman J, Kubatko L. 2014. Quartet inference from SNP data under the coalescent model. *Bioinformatics* 30:3317–3324.
- Chifman J, Kubatko L. 2015. Identifiability of the unrooted species tree topology under the coalescent model with time-reversible substitution processes, site-specific rate variation, and invariable sites. *J. Theor. Biol.* 374:35–47.
- Colautti RI, Alexander JM, Dlugosch KM, Keller SR, Sultan SE. 2017. Invasions and extinctions through the looking glass of evolutionary ecology. *Phil. Trans. R. Soc. B* 372.
- Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, Handsaker RE, Lunter G, Marth GT, Sherry ST, et al. 2011. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* 27:2156–2158.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29:15–21.
- Flouri T, Izquierdo-Carrasco F, Darriba D, Aberer AJ, Nguyen L-T, Minh BQ, Von Haeseler A, Stamatakis A. 2015. The phylogenetic likelihood library. *Syst. Biol.* 64:356–362.
- Foster DA, Salloum D, Menon D, Frias MA. 2014. Phospholipase D and the maintenance of phosphatidic acid levels for regulation of mammalian target of rapamycin (mTOR). *J. Biol. Chem.* 289:22583–22588.
- Fukuda Y, Tingley R, Crase B, Webb G, Saalfeld K. 2016. Long-term monitoring reveals declines in an endemic predator following invasion by an exotic prey species. *Anim. Conserv.* 19:75–87.
- Garrison E, Kronenberg ZN, Dawson ET, Pedersen BS, Prins P. 2022. A spectrum of free software tools for processing the VCF variant call format: vcflib, bio-vcf, cyvcf2, hts-nim and slivar. *PLoS Comput. Biol.* 18:e1009123.
- Gattepaille LM, Jakobsson M, Blum MGB. 2013. Inferring population size changes with sequence and SNP data: lessons from human bottlenecks. *Heredity* 110:409–419.
- Genner MJ, Seehausen O, Lunt DH, Joyce DA, Shaw PW, Carvalho GR, Turner GF. 2007. Age of cichlids: new dates for ancient lake fish radiations. *Mol. Biol. Evol.* 24:1269–1282.
- Greenwood P. 1974. Cichlid fishes of Lake Victoria, East Africa : the biology and evolution of a species flock. *Bull Brit Mus (Nat Hist) Zool Suppl* 6:1–134.
- Hallonet M, Hollemann T, Pieler T, Gruss P. 1999. Vax1, a novel homeobox-containing gene, directs development of the basal forebrain and visual system. *Genes Dev.* 13:3106–3114.

- Ishikawa A, Kabeya N, Ikeya K, Kakioka R, Cech JN, Osada N, Leal MC, Inoue J, Kume M, Toyoda A, et al. 2019. A key metabolic gene for recurrent freshwater colonization and radiation in fishes. *Science* 364:886–889.
- Johnson TC, Kelts K, Eric Odada. 2000. The Holocene History of Lake Victoria. *Ambio* 29:2–11.
- Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermiin LS. 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods* 14:587–589.
- Kamler E. 1992. Characteristics of fish reproductive products. In: Early Life History of Fish. Dordrecht: Springer Netherlands. p. 31–106.
- Kaufman L. 1992. Catastrophic Change in Species-Rich Freshwater Ecosystems. *Bioscience* 42:846–858.
- Kishe-Machumu MA, van Rijssel JC, Wanink JH, Witte F. 2015. Differential recovery and spatial distribution pattern of haplochromine cichlids in the Mwanza Gulf of Lake Victoria. *J. Great Lakes Res.* 41:454–462.
- Kolberg L, Raudvere U, Kuzmin I, Adler P, Vilo J, Peterson H. 2023. g:Profiler-interoperable web service for functional enrichment analysis and gene identifier mapping (2023 update). *Nucleic Acids Res.* 51:W207–W212.
- Korunes KL, Samuk K. 2021. pixy: Unbiased estimation of nucleotide diversity and divergence in the presence of missing data. *Mol. Ecol. Resour.* 21:1359–1368.
- Kozlov AM, Darriba D, Flouri T, Morel B, Stamatakis A. 2019. RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics* 35:4453–4455.
- Li B, Dewey CN. 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12:323.
- Li H. 2011. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* 27:2987–2993.
- Li H. 2013. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. Available from: <http://arxiv.org/abs/1303.3997>
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078–2079.
- Liao BM, Raddatz K, Zhong L, Parker BL, Raftery MJ, Schmitz-Peiffer C. 2014. Proteomic analysis of livers from fat-fed mice deficient in either PKC δ or PKC ϵ identifies Htatip2 as a regulator of lipid metabolism. *Proteomics* 14:2578–2587.
- Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *bioRxiv* [Internet]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/002832>

- Malinsky M, Svardal H, Tyers AM, Miska EA, Genner MJ, Turner GF, Durbin R. 2018. Whole-genome sequences of Malawi cichlids reveal multiple radiations interconnected by gene flow. *Nat Ecol Evol* 2:1940–1955.
- Martin SH, Van Belleghem SM. 2017. Exploring Evolutionary Relationships Across the Genome Using Topology Weighting. *Genetics* 206:429–438.
- Matsuishi T, Muhoozi L, Mkumbo O, Budeba Y, Njiru M, Asila A, Othina A, Cowx IG. 2006. Are the exploitation pressures on the Nile perch fisheries resources of Lake Victoria a cause for concern? *Fish. Manag. Ecol.* 13:53–71.
- Matsushita Y, Miyoshi K, Kabeya N, Sanada S, Yazawa R, Haga Y, Satoh S, Yamamoto Y, Strüssmann CA, Luckenbach JA, et al. 2020. Flatfishes colonised freshwater environments by acquisition of various DHA biosynthetic pathways. *Commun. Biol.* 3:516.
- McGee MD, Borstein SR, Meier JI, Marques DA, Mwaiko S, Taabu A, Kische MA, O’Meara B, Bruggmann R, Excoffier L, et al. 2020. The ecological and genomic basis of explosive adaptive radiation. *Nature* 586:75–79.
- McGee MD, Borstein SR, Neches RY, Buescher HH, Seehausen O, Wainwright PC. 2015. A pharyngeal jaw evolutionary innovation facilitated extinction in Lake Victoria cichlids. *Science* 350:1077–1079.
- Meier JI, Marques DA, Mwaiko S, Wagner CE, Excoffier L, Seehausen O. 2017. Ancient hybridization fuels rapid cichlid fish adaptive radiations. *Nat. Commun.* 8:14363.
- Meier JI, Marques DA, Wagner CE, Excoffier L, Seehausen O. 2018. Genomics of Parallel Ecological Speciation in Lake Victoria Cichlids. *Mol. Biol. Evol.* 35:1489–1506.
- Meier JI, McGee MD, Marques DA, Mwaiko S, Kische M, Wandera S, Neumann D, Mrosso H, Chapman LJ, Chapman CA, et al. 2023. Cycles of fusion and fission enabled rapid parallel adaptive radiations in African cichlids. *Science* 381:eade2833.
- Meier JI, Sousa VC, Marques DA, Selz OM, Wagner CE, Excoffier L, Seehausen O. 2017. Demographic modelling with whole-genome data reveals parallel origin of similar *Pundamilia* cichlid species after hybridization. *Mol. Ecol.* 26:123–141.
- Mizoiri S, Aibara M, Okada N. 2008. Live Cichlids in the Southern Lake Victoria-Ongoing Speciation. *Report of Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas 2002-2007*.
- Nakamura H, Aibara M, Kajitani R, Mrosso HDJ, Mzighani SI, Toyoda A, Itoh T, Okada N, Nikaido M. 2021. Genomic Signatures for Species-Specific Adaptation in Lake Victoria Cichlids Derived from Large-Scale Standing Genetic Variation. *Mol. Biol. Evol.* 38:3111–3125.
- Natugonza V, Musinguzi L, Kische MA, van Rijssel JC, Seehausen O, Ogutu-Ohwayo R. 2021. The Consequences of Anthropogenic Stressors on Cichlid Fish Communities: Revisiting Lakes Victoria, Kyoga, and Nabugabo. In: Abate ME, Noakes DLG, editors. *The Behavior, Ecology and Evolution of Cichlid Fishes*. Springer Netherlands. p. 217–246.

- Ngoepe N, Merz A, King L, Wienhues G, Kische MA, Mwaiko S, Misra P, Grosjean M, Matthews B, Mustaphi CC, et al. 2024. Testing alternative hypotheses for the decline of cichlid fish in Lake Victoria using fish tooth time series from sediment cores. *Biol. Lett.* 20:20230604.
- Ngoepe N, Muschick M, Kische MA, Mwaiko S, Temoltzin-Loranca Y, King L, Courtney Mustaphi C, Heiri O, Wienhues G, Vogel H, et al. 2023. A continuous fish fossil record reveals key insights into adaptive radiation. *Nature* 622:315–320.
- Nguyen L-T, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32:268–274.
- Nikaido M, Ota T, Hirata T, Suzuki H, Satta Y, Aibara M, Mzighani SI, Sturmbauer C, Hagino-Yamagishi K, Okada N. 2014. Multiple episodic evolution events in VIR receptor genes of East-African cichlids. *Genome Biol. Evol.* 6:1135–1144.
- Ogutu-Ohwayo R. 1990. The decline of the native fishes of lakes Victoria and Kyoga (East Africa) and the impact of introduced species, especially the Nile perch, *Lates niloticus*, and the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Environ. Biol. Fishes* 27:81–96.
- Ohta T, Kimura M. 1969. Linkage disequilibrium at steady state determined by random genetic drift and recurrent mutation. *Genetics* 63:229–238.
- Ortiz EM. 2019. vcf2phylip v2. 0: convert a VCF matrix into several matrix formats for phylogenetic analysis. Available from: <https://doi.org/10.5281/zenodo.2540861>
- Parsons KJ, Trent Taylor A, Powder KE, Albertson RC. 2014. Wnt signalling underlies the evolution of new phenotypes and craniofacial variability in Lake Malawi cichlids. *Nat. Commun.* 5:3629.
- Pringle RM. 2005. The Origins of the Nile Perch in Lake Victoria. *Bioscience* 55:780–787.
- Ramakrishnan U, Hadly EA, Mountain JL. 2005. Detecting past population bottlenecks using temporal genetic data. *Mol. Ecol.* 14:2915–2922.
- Rambaut A. 2006. FigTree. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA. 2018. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* 67:901–904.
- Ribbink A, Ribbink A. 1997. Paedophagia among cichlid fishes of lake Victoria and lake Malawi/Nyasa. *South African Journal of Science* 93:509–512.
- Ribbink AJ. 1987. African lakes and their fishes: conservation scenarios and suggestions. *Environ. Biol. Fishes* 19:3–26.
- Rogers S, Macheda ML, Docherty SE, Carty MD, Henderson MA, Soeller WC, Gibbs EM, James DE, Best JD. 2002. Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282:E733-8.
- Salzburger W. 2018. Understanding explosive diversification through cichlid fish genomics. *Nat. Rev. Genet.* 19:705–717.

- Samonte IE, Satta Y, Sato A, Tichy H, Takahata N, Klein J. 2007. Gene flow between species of Lake Victoria haplochromine fishes. *Mol. Biol. Evol.* 24:2069–2080.
- Sandhu N, Rana S, Meena K. 2021. Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2 (NR5A2): role in health and diseases. *Mol. Biol. Rep.* 48:8155–8170.
- Santiago E, Novo I, Pardiñas AF, Saura M, Wang J, Caballero A. 2020. Recent Demographic History Inferred by High-Resolution Analysis of Linkage Disequilibrium. *Mol. Biol. Evol.* 37:3642–3653.
- Scherz MD, Masonick P, Meyer A, Hulsey CD. 2022. Between a rock and a hard polytomy: Phylogenomics of the Rock-dwelling mbuna cichlids of Lake Malaŵi. *Syst. Biol.* 71:741–757.
- Schmidt D, Pool J. 2002. The effect of population history on the distribution of the Tajima's D statistic. *Population English Edition*:1–8.
- Seehausen O. 1996. Lake Victoria Rock Cichlids: Taxonomy, Ecology, and Distribution. Verduyn Cichlids
- Seehausen O. 2006. African cichlid fish: a model system in adaptive radiation research. *Proc. Biol. Sci.* 273:1987–1998.
- Su W, Sun J, Shimizu K, Kadota K. 2019. TCC-GUI: a Shiny-based application for differential expression analysis of RNA-Seq count data. *BMC Res. Notes* 12:133.
- Swofford DL. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Available from: <http://paup.csit.fsu.edu/>
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595.
- Takeda M, Kusumi J, Mizoiri S, Aibara M, Mzighani SI, Sato T, Terai Y, Okada N, Tachida H. 2013. Genetic Structure of Pelagic and Littoral Cichlid Fishes from Lake Victoria. *PLoS One* 8:e74088.
- Terhorst J, Kamm JA, Song YS. 2017. Robust and scalable inference of population history from hundreds of unphased whole genomes. *Nat. Genet.* 49:303–309.
- Terner C. 1979. Metabolism and energy conversion during early development. In: Fish Physiology. Vol. 8. Fish physiology. Elsevier. p. 261–278.
- Tillander V, Alexson SEH, Cohen DE. 2017. Deactivating fatty acids: Acyl-CoA thioesterase-mediated control of lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 28:473–484.
- Tocher DR. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* 11:107–184.
- Trumpp M, Tan WH, Burdzinski W, Basler Y, Jatzlau J, Knaus P, Winkler C. 2023. Characterization of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva relevant Acvr1/Acvr2 Activin receptors in medaka (*Oryzias latipes*). *PLoS One* 18:e0291379.
- Verheyen E, Salzburger W, Snoeks J, Meyer A. 2003. Origin of the superflock of cichlid fishes from Lake Victoria, East Africa. *Science* 300:325–329.

- Voet D, Voet JG, 信雄田宮, 正實村松, 達彦八木, 浩吉田, 斗志也遠藤. ヴォート基礎生化学 第5版. Available from: <https://www.tkd-pbl.com/book/b298034.html>
- Vranken N. 2017. The thick-lipped haplochromine cichlids of the Lake Edward system. Available from: <https://scriptieprijjs.be/sites/default/files/thesis/2017-10/Nathan%20Vranken%20masterthesis.pdf>
- Wagner CE, Keller I, Wittwer S, Selz OM, Mwaiko S, Greuter L, Sivasundar A, Seehausen O. 2013. Genome-wide RAD sequence data provide unprecedented resolution of species boundaries and relationships in the Lake Victoria cichlid adaptive radiation. *Mol. Ecol.* 22:787–798.
- Wang Y, Williams DA, Gaines MS. 2005. Evidence for a recent genetic bottleneck in the endangered Florida Keys silver rice rat (*Oryzomys argentatus*) revealed by microsatellite DNA analyses. *Conserv. Genet.* 6:575–585.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. ESTIMATING F-STATISTICS FOR THE ANALYSIS OF POPULATION STRUCTURE. *Evolution* 38:1358–1370.
- Witte F, Goldschmidt T, Goudswaard PC, Ligtvoet W, Van Oijen MJP, Wanink J. 1992. Species extinction and concomitant ecological changes in Lake Victoria. *Neth. J. Zool.* 42:214–232.
- Witte F, Goldschmidt T, Wanink J, van Oijen M, Goudswaard K, Witte-Maas E, Bouton N. 1992. The destruction of an endemic species flock: quantitative data on the decline of the haplochromine cichlids of Lake Victoria. *Environ. Biol. Fishes* 34:1–28.
- Witte F, Wanink JH, Kische-Machumu M. 2007. Species Distinction and the Biodiversity Crisis in Lake Victoria. *Trans. Am. Fish. Soc.* 136:1146–1159.
- Zhang C, Rabiee M, Sayyari E, Mirarab S. 2018. ASTRAL-III: polynomial time species tree reconstruction from partially resolved gene trees. *BMC Bioinformatics* 19:153.

謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの方々のご支援とご協力を賜りました。ここに心より感謝の意を表します。

指導教官である二階堂雅人准教授には5年間にわたり、研究活動全般において多大なるご指導と温かい助言をいただきました。シクリッドや進化生物学について全くの無知であった私を受け入れてくださり、私が希望したマタンビハンターの研究を自由に進める機会を与えてくださいました。日々のディスカッション、論文投稿、学会発表、さらには学位審査に至るまで、何度も添削・指導をいただいたことに心から感謝いたします。

相原光人研究員には、シクリッドのサンプリングや野外調査にご尽力いただきました。シクリッド分類学に関する豊富な知見と野外調査のご協力がなければ、本研究の遂行は不可能でした。心よりお礼申し上げます。

長澤竜樹助教には、研究に関するディスカッションや研究計画書の添削、プレゼンテーションのアドバイスを熱心にしていただきました。貴重なご助言に深く感謝いたします。

さらに、ご多忙の中、副査として本論文を審査していただきました本郷裕一教授、田中幹子教授、立花和則准教授、加藤明准教授に深く感謝申し上げます。修士論文の審査時から建設的なご意見を多数いただき、本研究の遂行に大きな助力となりました。

また、ゲノムシーケンス用サンプル抽出を行ってくださった畑島さん、RNAseq サンプルの取扱・抽出をしてくださった伊藤くんをはじめ、共同研究者の皆様にも心よりお礼申し上げます。皆様の協力なくして、本研究は成り立ちませんでした。

公私共に支えてくださった二階堂研究室のメンバーにも感謝いたします。共に切磋琢磨しながら過ごした時間は、私にとってかけがえのないものとなりました。

最後に、どんな選択も温かく見守り応援し続けてくれた母に、心からの感謝を捧げます。

本研究は、JSPS 特別研究員奨励費 (20J13861・20KK0167) および JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム (JPMJSP2106・JPMJSP2180) の支援を受けて実施されました。

共同研究者の一覧と貢献

第 1 章 外来種・ナイルパーチの侵略が在来種・シクリッドへ与えた 遺伝的な影響

今本 南：研究計画立案、資金獲得、データ解析、作図、論文原稿執筆

中村 遥奈：研究計画立案、資金獲得、データ解析、論文原稿の改訂

畑島 諒：次世代シーケンサ用サンプル調整

相原 光人：シクリッドの採集・種同定、ディスカッション

Kimirei I.A.：シクリッドの採集

Kashindye B.B.：シクリッドの採集

伊藤 武彦：次世代シーケンス

二階堂 雅人：資金獲得、論文原稿の改訂、研究総括

第 2 章 卵・稚魚食性シクリッドの食性適応メカニズムの解明

今本 南：研究計画立案、資金獲得、次世代シーケンサ用サンプル調整、データ解析、
作図、論文原稿執筆

伊藤 隆晃：RNA-seq 解析用サンプル調整

相原 光人：シクリッドの採集・種同定、ディスカッション

二階堂 雅人：資金獲得、論文原稿の改訂、研究総括

報文目録

Imamoto, M., Nakamura, H., Aibara, M., Hatashima, R., Kimirei, IA, Kashindye, BB, Itoh, T. and Nikaido, N. (2024). Severe Bottleneck Impacted the Genomic Structure of Egg-Eating Cichlids in Lake Victoria, *Molecular Biology and Evolution*, 41(6), msae093.