

令和元年6月17日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18613

研究課題名(和文) エゾサンショウウオの表現型可塑性を引き起こす遺伝基盤とその進化過程

研究課題名(英文) Evolution and molecular mechanism of phenotypic plasticity in the Hokkaido salamander

研究代表者

松波 雅俊 (Matsunami, Masatoshi)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60632635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：同一のゲノム情報をもつにも関わらず、環境に応じて表現型を変化させる現象は表現型可塑性と呼ばれる。北海道に生息する有尾両生類であるエゾサンショウウオ (*Hynobius retardatus*) の幼生は、被食者・捕食者の存在や個体群密度に応じて、明瞭な表現型可塑性を示す。本申請課題では、本種を対象として次の研究を遂行した。表現型変化を引き起こす内分泌系反応を明らかにするために、脳下垂体を用いたトランスクリプトーム解析を行い、発現が変化するホルモン遺伝子を同定した。可塑的表現型進化のプロセスを明らかにするためにRAD-seq解析をおこない、SNPを同定し、それを元に本種の進化史を推定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

表現型可塑性の研究は、至近要因を探る分子発生学的な研究と、究極要因を明らかにするための生態学的な研究が先行しており、遺伝的背景は御座なりにされてきた。生態系においては地域集団間で多様な可塑性を保持する生物がいる一方、その進化を探るのは技術的に難しかったからである。本研究の最大の特徴は表現型可塑性という現象について、先行研究とは異なる学際的なアプローチにより、分子機構と進化過程を同時に明らかにした点である。これによって、今後、原因遺伝子の機能解析が可能となり、可塑性がどのように生態系や発生過程に影響を及ぼしているか調べることができる。したがって、本研究は大きなインパクトをもつと言える。

研究成果の概要(英文)：Amphibians display flexible phenotypes depending on environmental conditions. Larvae of the Hokkaido salamander, *Hynobius retardatus*, exhibit two distinct morphs, "attack morphs" and "defense morphs", as an inducible phenotypic response to prey and predators, respectively. The presence of their prey, induces a broad-headed attack morph. The presence of predator induces a defense morph, characterized by enlarged external gills and a high tail. In this study, two researches were carried out. 1) I conducted transcriptome analysis using pituitary glands to understand endocrine mechanisms of phenotypic plasticity, and identified differentially expressed hormonal genes. 2) To understand the evolution of phenotypic plasticity, RAD-sequencing was conducted. I genotyped several thousands of SNPs and inferred evolution of focal species.

研究分野：進化生態発生学

キーワード：生態発生学 表現型可塑性 両生類 サンショウウオ 脳下垂体 RNA-seq RAD-seq 系統地理

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生物は変化する環境のなかで異なる表現型を示すことがある。異なった表現型が単一の遺伝子型から生じる現象は表現型可塑性と呼ばれ、環境における適応を考える上で極めて重要である。北海道に生息するエゾサンショウウオ (*Hynobius retardatus*) は、可塑性によって生じる幼生の形態多型について様々な研究がなされている。被食者であるオタマジャクシ存在下では、捕食に有利な頭部が発達した攻撃型となる。一方、捕食者であるヤゴの存在下では、外敵の攻撃から身を守るため、外鰓が発達し尾高や体色の変化が生じ、防御型となる。エゾサンショウウオの形態とその可塑性は、地域集団間で違いがあると考えられているが、形態の可塑性の全容はもとより、その遺伝・分子発生学的基盤についてはまったく不明であった。申請者は、地域集団間の可塑性比較研究のためのマーカー開発、可塑性による発現形態の比較とトランスクリプトーム解析による研究を遂行してきた。

#### トランスクリプトーム解析

本研究では、エゾサンショウウオ幼生が示す防御型・攻撃型の2つの表現型を誘導し、遺伝子発現の変化を比較することでそれぞれの表現型可塑性の分子機構にどのような違いと共通性があるかを明らかにした。操作飼育実験により得られた RNA を用いて発現解析をおこない、有意に発現量が変化していた遺伝子を DEG (Differentially Expressed Gene) として定義し、解析した。結果、以下の2点が明らかになった。1) 防御型における DEG 数は、攻撃型における DEG 数より、約5倍多かった。攻撃型では頭部の形態のみが変化するのに対して、防御型では尻尾・外鰓など様々な形態変化が起こる。従って、この DEG 数の違いは、形態変化の度合いを反映しているのではないかと考えられる。2) 脳においては活性酸素関連の機能を持つ遺伝子は、攻撃型・防御型でともに発現が上昇していた。生物が代謝量を上昇させるとき、多くのエネルギーを作り出すために酸素の消費量が上昇する。可塑性が発現するには、形態を改変するためにより多くのエネルギーを作り出す必要があり、そのために酸素の消費に必要な活性酸素関連遺伝子の発現が上昇したと推察される。

#### 地域集団の形態・遺伝的比較

地域集団間の表現型変異の一端として可塑性変異、それを生じさせる遺伝的変異、それらの結びつきから理解できる形態可塑性の進化過程を調べるための準備を進めている。mtDNA の haplotype による生息範囲全域の集団構造推定を試みた先行研究を参考に、北海道内の5地域(函館・野幌・襟裳・北見・天塩)でサンプリングし、地域集団の遺伝的背景を比較するために12座位のマイクロサテライトマーカーの開発をおこなった

### 2. 研究の目的

これまでの研究で、形態変化時の遺伝子発現の変化パターンが明確化され、また地域集団の遺伝的違いを比較する基盤が構築された。しかし、実際に可塑性を引き起こす原因となる遺伝子の地域間の変化や変異については何も分かっていない。さらには、どのようにして本種が表現型可塑性を手に入れ、進化したかについても不明である。本研究ではこれらの謎に挑戦するために、従来の分野に縛られず、内分泌学的・分子発生学的・ゲノム進化的解析を統合的に活用することで、本種の表現型可塑性の分子基盤とその進化過程の解明を目指す。特に近年、発達著しい次世代シーケンサーを用いた大規模配列解析を活用した2つのアプローチを用いる。まず、脳下垂体におけるトランスクリプトーム解析や生化学的実験をおこない、この表現型可塑性を誘導する内分泌系の変化を明らかにし、可塑性を引き起こす遺伝子を特定するための糸口とする(研究1)。さらに地域集団間の遺伝的組成を比較することで表現型の多様性と、その一端を担う可塑性の多様性が、種内でどのようにゲノムに反映されているかを明らかにする(研究2)。これらの研究を統合的に理解することで、本種における表現型とその可塑性の進化、ひいては脊椎動物の表現型進化がどのように起こるかを推察する。

### 3. 研究の方法

本研究では、まず、脳下垂体におけるトランスクリプトーム解析や生化学的実験を活用することで、この表現型可塑性を誘導する内分泌系の変化を明らかにし、至近要因を解明するための糸口とする(研究1)。さらに異なる環境への応答を示す地域集団間の遺伝的組成を比較することで表現型可塑性の多様性が種内でどのようにゲノムに反映されているかを明らかにする(研究2)。これらの研究を統合的に理解することで、本種における表現型可塑性の進化、ひいては脊椎動物の表現型進化がどのように起こるかを推察する。

#### 脳下垂体からのトランスクリプトーム解析による可塑性の内分泌機構の解明

可塑性を引き起こす内分泌系の変化を明らかにするために、内分泌制御の中核である脳下垂体のトランスクリプトームによる網羅的遺伝子発現解析をおこなう。先行研究から特にホルモン関連の遺伝子は、両生類の表現型可塑性への関与が示唆されている。また、無尾両生類の防御型はストレスホルモンの投与で誘導されることが示されている。しかし、これまで申請者がおこなったトランスクリプトーム解析では、このようなホルモン関連遺伝子はほとんど検出されなかった。これは、扱った組織が大きいことが一因であると考えられる。よって、本研究で

は脊椎動物のホルモン分泌の中枢である脳下垂体に組織を絞って、遺伝子の発現を調べる。

#### RAD-seq による地域集団間での可塑性の進化過程の推定

エゾサンショウウオの可塑性の進化過程を明らかにするため、マイクロサテライトマーカーと RAD(Restriction-site-Associated DNA)-seq による大規模な集団多型解析を行う。従来、非モデル生物の遺伝多型解析は数遺伝子座に限定されていたが、塩基配列解読技術の発達により、RAD-seq のようなゲノムワイドでの遺伝多型解析が可能となった。エゾサンショウウオの可塑性の変化は、地域集団によって異なる。しかし、この多様性がどのようにして獲得され、進化してきたかは未だ不明な点が多い。その過程を明らかにするために、まず開発済みのマイクロサテライトマーカーを利用して集団間の系統関係を明らかにし、さらに RAD-seq 解析によって得られた情報を活用して、ゲノム上で自然選択が起こっている領域を同定する。本研究では、先行研究でのミトコンドリア DNA 多型の分布を考慮し、北海道内の 5 つの地域で偏りなく卵の採集をおこなう。これらの地域集団の遺伝的背景を比較することで、表現型可塑性の進化過程に迫る。エゾサンショウウオゲノムは非常に大きく、ゲノムサイズは二倍体で約 15.80 Gbp ( $2n = 40$ ) と予想されている。このゲノムサイズに関する問題を回避するため、通常の RAD-seq ではなく、特異性の高い ddRAD-seq 法を用いる。断片化される箇所が減少することで、ゲノムサイズが大きくてもそれぞれの座位について十分なカバレッジが確保できる。マイクロサテライトの多型データにさらに RAD-seq 解析の結果を加えることで解析の解像度はより鮮明になり、それに伴い、新たな研究が展開されることが期待される。

#### 4. 研究成果

本研究では、エゾサンショウウオにおける表現型可塑性の分子機構を明らかにするために、脊椎動物の内分泌系の中枢であり、種々のホルモンの分泌を制御している脳下垂体に注目し、その遺伝子発現の変化を明らかにするためにトランスクリプトーム解析をおこなった。野外で採集した卵から孵化した幼生を捕食者存在下・被食者存在下、及びそれぞれのコントロールの 4 つの条件で飼育し、その遺伝子発現を比較した。解析の結果、可塑性間で異なる発現変動を示す 4 つのペプチドホルモン (PTH2, CALCA, PRL1, GH) と 1 つの神経ペプチド (NPB) が、可塑性を引き起こす分子の候補として同定された。また、分子系統解析の結果、PRL1 と CALCA は、それぞれ両生類の祖先系統と有尾両生類の祖先系統で遺伝子重複を起こしていることがわかった。これらの結果より、同定された内分泌関連因子は可塑性の分子機構と進化において重要な役割を担う可能性が示唆された。

本研究では、エゾサンショウウオにおける表現型可塑性の進化機構の一端を明らかにするために、各地域集団のリアクションノームの測定と RAD-seq による集団遺伝解析をおこなった。北海道内の 5 つの地域 (襟裳、野幌、函館、天塩、北見) で卵の採集をおこない、同一の条件で攻撃型可塑性の形態変化を誘導した。形態測定の結果、集団に応じて、可塑性変化能力は異なることがあきらかになった。また、RAD-seq を用いて各集団 20 個体 (計 100 個体) の遺伝的多型を検出した。検出された 547 座位の遺伝的多型マーカーを用いて、遺伝構造を推定したところ、それぞれの地域集団で明瞭な集団構造が観察されたが、遺伝的距離は地理的な距離とは相関せず、野幌・天塩集団、次いで襟裳・北見集団が近縁であることが示唆された。これらの結果より、可塑性の能力と遺伝的な近縁性は相関せず、可塑性はそれぞれの集団で独自に進化したことが示唆された。

さらに今後の遺伝子の機能検証研究の布石として、有尾両生類のモデル生物であるイベリアトゲイモリ (*Pleurodeles waltl*) の遺伝子データベースを整備した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1) Matsunami M, Suzuki M, Haramoto Y, Fukui A, Inoue T, Yamaguchi K, Uchiyama I, Mori K, Tashiro K, Ito Y, Takeuchi T, Suzuki KT, Agata K, \*Shigenobu S, \*Hayashi T. 2019. A comprehensive reference transcriptome resource for the Iberian ribbed newt *Pleurodeles waltl*, an emerging model for developmental and regeneration biology. *DNA research*, In press. 査読あり

2) Sugime Y, Oguchi K, Gotoh H, Hayashi Y, Matsunami M, Shigenobu S, Koshikawa S, \*Miura T. 2019. Termite soldier mandibles are elongated by dachshund under hormonal and Hox gene controls. *Development*, 146: In press. 査読あり

3) \*Yaguchi H, Suzuki R, Matsunami M, Shigenobu S, \*Maekawa K. 2019. Transcriptomic changes during caste development through social interactions in the termite *Zootermopsis nevadensis*. *Ecology and Evolution*, 9:3446-3456. 査読あり

4) Sakuma Y, \*Matsunami M, Takada T, Suzuki H. 2019. Multiple conserved elements structuring inverted repeats in the mammalian coat color-related gene *Asip*. *Zoological Science*, 36:23-31. 査読あり

- 5) \*Matsunami M, Nozawa M, Suzuki R, Toga K, Masuoka Y, Yamaguchi K, Maekawa K, Shigenobu S, Miura T. 2019. Caste-specific microRNA expression in termites: insights into soldier differentiation. *Insect Molecular Biology*, 28:86-98. 査読あり
- 6) Mori S and \*Matsunami M. 2018. Signature of positive selection in mitochondrial DNA in *Cetartiodactyla*. *Genes & Genetic Systems*, 93:65-73. 査読あり
- 7) \*Michimae H, Yoshida A, Emura T, Matsunami M, Nishimura K. 2018. Reconsidering the estimation of costs of phenotypic plasticity using the robust ridge estimator. *Ecological Informatics*, 44:7-20. 査読あり
- 8) Matsunami M, Endo D, Saitou N, Suzuki H, \*Onuma M. 2018. Draft genome sequence of Japanese wood mouse, *Apodemus speciosus*. *Data in Brief*, 16:43-46. 査読あり
- 9) \*Matsunami M, Igawa T, Michimae H, Miura T, Nishimura K. 2016. Population structure and evolution after speciation of the Hokkaido salamander (*Hynobius retardatus*). *PLoS One*, 11:e0156815. 査読あり

〔学会発表〕(計 15 件)

- 1) 松波 雅俊. イベリアトゲイモリのモデル生物化に向けた網羅的遺伝子発現解析とデータベース整備. 革新エコモルフオロジー 第 3 回公開シンポジウム, 宜野湾(沖縄), 2019 年 3 月
- 2) 松波 雅俊, 鈴木 美有紀, 原本 悦和, 福井 彰雅, 井上 武, 山口 勝司, 内山 郁夫, 森 一樹, 田代 康介, 伊藤 弓弦, 竹内 隆, 鈴木 賢一, 阿形 清和, 重信 秀治, 林 利憲. Transcriptome resource for *Pleurodeles waltl*: Next-generation model species for comparative studies in developmental biology and regeneration research with vertebrate model animals. 第 12 回日本ツメガエル研究集会・第 4 回次世代両生類研究会 合同シンポジウム, 東広島(広島), 2018 年 9 月
- 3) 松波 雅俊, 北野 潤, 岸田 治, 道前 洋史, 永野 惇, 豊田 敦, 藤山 秋佐夫, 三浦 徹, 西村 欣也. 可塑的形態のリアクションノームの地域変異は RAD-seq による集団遺伝情報から読み解けるか. 日本進化学会第 20 回大会, 東京(駒場), 1E-6, 2018 年 8 月
- 4) Masatoshi Matsunami. Phylogeography and phenotypic plasticity in the Hokkaido salamander, *Hynobius retardatus*. Special Symposium to Celebrate over 50,000 citations of Saitou & Nei (1987)'s Neighbor-Joining Method paper, Mishima (Japan), Jun. 2018 <invited>
- 5) Masatoshi Matsunami. Endocrine basis of predator- and prey-induced phenotypic plasticity in the Hokkaido salamander (*Hynobius retardatus*). International Symposium "Amphibian development, regeneration, evolution and beyond", P4, Hiroshima (Japan), Mar. 2018
- 6) 松波 雅俊. 捕食者・被食者によって引き起こされる両生類の表現型可塑性の内分泌基盤. 第 2 回イベリアトゲイモリ研究会, 米子(鳥取), 2017 年 12 月
- 7) 松波 雅俊. エゾサンショウウオの表現型可塑性における内分泌基盤. 第 9 回生命情報科学若手の会研究会, 蒲郡(愛知), 2017 年 10 月
- 8) 松波 雅俊, 岸田 治, 道前 洋史, 三浦 徹, 西村 欣也. エゾサンショウウオの表現型可塑性における内分泌基盤. 日本動物学会・第 88 回大会, 富山(富山), 111130, 2017 年 9 月
- 9) Masatoshi Matsunami, Osamu Kishida, Hirofumi Michimae, Toru Miura, Kinya Nishimura. Endocrine basis of predator- and prey-induced phenotypic plasticity in the Hokkaido salamander (*Hynobius retardatus*). XVI Congress of the European Society for Evolutionary Biology, S16-P49, Groningen (Netherlands), Aug. 2017
- 10) 松波 雅俊, 岸田 治, 道前 洋史, 三浦 徹, 西村 欣也. サンショウウオの表現型可塑性を引き起こす原因遺伝子の探索. NGS 現場の会・第 5 回研究会, 仙台(宮城), 2C1-2, 2017 年 5 月 <invited>
- 11) 松波 雅俊. エゾサンショウウオ幼生の表現型可塑性のゲノム基盤. 第 122 回日本解剖学会総会・学術集会, 長崎(長崎), 3S19-5, 2017 年 3 月 <invited>

12) 松波 雅俊. エゾサンショウウオの表現型可塑性についての生態発生学. 山口大学第 6 回理学部講演会, 山口(山口), 2016 年 12 月 <invited>

13) Masatoshi Matsunami, Jun Kitano, Osamu Kishida, Hirofumi Michimae, Atushi Nagano, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Naoki Osada, Toshinori Endo, Toru Miura, Kinya Nishimura. Evolution of prey-induced phenotypic plasticity in the Hokkaido Salamander (*Hynobius retardatus*). 22nd International Congress of Zoology & 87th meeting of Zoological Society of Japan, P20, Okinawa (Japan), Nov. 2016.

14) 松波 雅俊. エゾサンショウウオの表現型可塑性についての生態発生学的研究. 第 8 回生命情報科学若手の会研究会, 大滝(北海道), 2016 年 10 月

15) 松波 雅俊. エゾサンショウウオの表現型可塑性についての生態発生学的研究. 第 2 回ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会, 岡崎(愛知), 2016 年 8 月 <invited>

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

iNewt (イベリアトゲイモリの遺伝子データベース)

<http://www.nibb.ac.jp/imori/main/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。