

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K07537

研究課題名（和文）哺乳類の季節繁殖の性差：RNAseqを用いた遺伝的基盤と多様化の仕組みの解明

研究課題名（英文）Sex differences in seasonal reproduction in mammals: elucidation of the genetic basis and diversification mechanisms using RNAseq

研究代表者

坂本 信介（Sakamoto, Shinsuke）

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：80611368

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は小型哺乳類の繁殖期の多型は主に環境温度変化への応答により形成されるとの仮説を確かめるため、アカネズミを対象に飼育交配実験と野外調査、遺伝子解析を実施した。新型コロナウイルス感染拡大の影響により飼育交配実験中心の計画に変更し、メスの繁殖状態の誘導にはオスの匂いと環境温度変化が重要で、日長の変化は必要ないことを示した。さらに、繁殖に不適な環境温度から繁殖に適した環境温度に至るまで全く同じ温度変化を経験させることで、繁殖期が真逆の両集団ともに繁殖状態を誘導しうることを示した。また環境温度変化への繁殖応答に関わる遺伝子情報を蓄積した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長らく、哺乳類の季節繁殖は日長の制御下にあると考えられてきたが、これは実際に哺乳類が示す多様な繁殖パターンを説明するには不十分である。本研究は、環境温度に対する応答に雌雄差があり、特に雌が温度に鋭敏に反応して繁殖状態を変えることによって、繁殖期の地理的多型を説明しうることを実験的に示した。このような環境温度への応答の雌雄差は生物の多様性やヒトの季節性疾患の雌雄差、地球温暖化に対する生物の反応の理解につながる。さらに、野生動物の保全、家畜や動物園動物の飼育下繁殖に有用な知見となりえる。今後は継続課題20K15865と合わせて遺伝子情報の解析に取り組み、このメカニズムの詳細にアプローチしていく。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted captive mating experiments, field studies, and genetic analyses in *Apodemus speciosus* to confirm the hypothesis that polymorphism in the breeding season of small mammals is mainly formed in response to changes in environmental temperature. We showed that male odor and environmental temperature change were important for inducing the breeding condition of females, and that day length change was not necessary. Furthermore, we showed that both populations, which are in opposite breeding seasons, can be induced to a reproductive state by experiencing the exact same temperature change from an unsuitable environmental temperature to a suitable environmental temperature for breeding. We also accumulated genetic information related to reproductive responses to changes in environmental temperature.

研究分野：動物生態学，行動生態学

キーワード：季節繁殖 雌雄差 光周性 温周性 アカネズミ

1. 研究開始当初の背景

環境の季節変化に適応するため、動物は様々な生理機能や行動を周期的に変化させている。季節繁殖や冬眠、渡りなどは日照時間の変化を手掛かりとする光周性が制御していると考えられている。最近、この光周性の遺伝的仕組みが多様な分類群で似ていることがわかってきた。しかし同時に、動物の季節応答には性差や個体差がある。ウマのオスは精子を通年作るがメスの性腺は春のみ発達し、ヒトの季節性疾患は女性患者で重篤で生起率に地域差がある。集団間で繁殖季節が異なる動物もいる。季節応答には多様化の仕組みも存在するはずである。地球温暖化が注視される今日、温度が動物の繁殖に与える影響は大きな関心を集めている。しかし、良いモデル動物がなく、生理学的研究は進んでいない。繁殖という重要な生活史形質の多様化の仕組みを理解するため、また医学や畜産への応用の観点からも、優れた野生哺乳類モデルを用いた生態学的研究が待たれている。

2. 研究の目的

哺乳類は光周性の遺伝的仕組みを共有するが、光周性が制御する季節応答には性差や個体差がある。この多様化の仕組みを調べるのに好適な実験動物はなく、野生哺乳類での検証が望まれている。申請者は、日本固有種のアカネズミが哺乳類で最も多様な繁殖期を持つことに着目し、環境温度が繁殖に与える影響が雌雄で異なる可能性を見出してきた。そこで本研究では、温度への応答に性差があるとの仮説のもと、飼育実験と RNAseq による網羅的遺伝子発現解析を用いて、アカネズミの季節繁殖を制御する遺伝的基盤と繁殖期が多様化する仕組みの解明に挑む。

3. 研究の方法

(1) 野外実験

アカネズミは標高の高い菅平高原では春から秋にかけて繁殖し、宮崎市の低地集団では秋から春にかけて繁殖することが先行研究（研究課題番号：24657018 坂本信介 代表）によりわかっている（図1）。これらの集団の繁殖状態を誘導する環境要因を実験的に検証するため、菅平高原と宮崎市で生け捕り罠を用いた捕獲調査をおこない、飼育実験用の個体を採集した。当初計画では飼育実験の進捗後に RNA 発現解析用のサンプリングを野外で行う予定であったが、新型コロナウイルスの感染拡大の影響で、所属機関から遠く離れた地域での長期にわたる頻回サンプリングは実現が難しくなってしまった。そのため、計画を延長してサンプリングの好機を伺ったが、その間も動物の維持管理費用が必要になることから発想を転換し、本課題の中心的課題の一つである 3-(2) 飼育実験の内容を当初計画よりも充実させ、動物の RNA 発現解析は後継課題（研究課題番号：20K15865 坂本信介 代表）と合わせて実施することに計画を変更した。

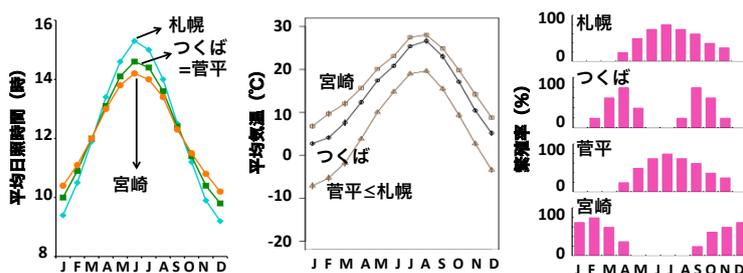


図1. アカネズミの繁殖期の多型

3つの繁殖パターンを持つ。秋から春に繁殖する宮崎のような集団が秋に交尾する短日繁殖動物と類似の季節応答を示すかは明らかでない。温暖なつくばと寒冷な菅平では、日照時間がほぼ等しいのに繁殖パターンが異なる。



図2. 温度変化に対する雌雄の繁殖応答
環境温度が雌雄の繁殖状態の誘導にどのような影響を及ぼすのかを確かめるため、インキュベータを用いて様々な日長条件・環境温度条件で飼育実験を実施した。一部条件下で(3) RNA発現解析用のサンプルを採集した。

(2) 飼育実験

繁殖期が異なる集団を用いて様々な環境条件で飼育実験を繰り返せると本研究課題の進捗を加速させる事ができる。そのためには繁殖コロニーの確立が不可欠である。宮崎集団については（研究課題番号：24657018 坂本信介 代表、研究課題番号：26430092 越本知大 代表）において確立した飼育手法（酒井ら（2013））によって繁殖コロニーを作出済みであったが、実験計画段階ではこれを(1)で採集した菅平由来の集団に適用できるという確証がなかった。そのため、野外サンプリングを基本とした計画を立てていたが、3-(1)で示したように野外実験が実施しにくい状況になったことから、菅平集団の繁殖コロニーの作出を試みた。その上で、本課題の中

心的内容の一つである、環境温度が雌雄の繁殖状態の誘導にどのような影響を及ぼすのかをインキュベータを用いた飼育実験により調べた（図2）。本実験の充実を図るために、当初計画よりも条件設定を増やし、より詳細に検討した。

(3) RNA 発現解析（図3）

宮崎集団の野外捕獲個体および飼育個体から、雌雄それぞれについて冬に野外で繁殖状態が誘導された状態の個体と冬に室内で長日・高環境温度条件に馴化され、繁殖状態を示していない個体を用意して、組織を採取した。RNAの抽出、ライブラリーの作成を行い、次世代シーケンサーに供した。得られた配列をアカネズミのリファレンスゲノムにマッピングする予定であったが、先行研究から当初計画よりも焦点を絞った解析が可能になったため、標的器官を変えたところ、最初のステップでは情報の多いマウスのリファレンスゲノムにマッピングすることとなった。各遺伝子領域にマップされた配列数から発現量を測定し、2群間で発現量を比較した。

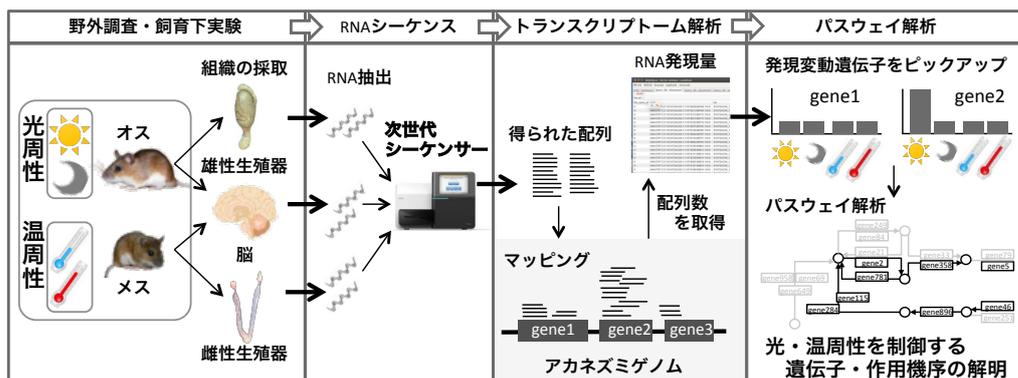


図3. RNAseqによる網羅的遺伝子発現解析の流れ

特定の日長・環境温度条件に馴化されて繁殖状態を示す個体と別の条件に馴化されて繁殖状態を示さない個体から繁殖に関わる器官を採集し、遺伝子の発現量を比較した。

4. 研究成果

(1) 飼育繁殖コロニーの確立

R2年度には、秋から春に繁殖する宮崎由来集団と春から秋に繁殖する菅平由来集団を用いて、自然光を採光した飼育室内で交配実験をした。その結果、両集団ともに本来の繁殖期とは異なる季節に繁殖状態を示す個体が確認され、宮崎・菅平集団ともに、少なくとも一部の個体は自然光による誘導なしに繁殖できることが確かめられた。これによって、今後、菅平集団についても宮崎集団と同様にさまざまな飼育実験を実施できるようになった。これは非常に大きな成果だと考えている。

(2) 飼育実験

H29年度に、異性由来の性的刺激を与えることで雌雄ともに単独飼育時に繁殖状態を誘導できる試験手法を確立した。H30年度には、非繁殖期の光条件かつ餌と異性由来の刺激を十分に与えた条件で環境温度を様々に変化させると、オスは温度の影響をあまり受けないが、メスは繁殖に好適な温度域へと温度を変化させた場合に繁殖状態が誘導されやすいことがわかった。R1年度には、一度繁殖状態を示したのちに環境温度を繁殖に不敵な温度へと変化させると、メスの繁殖状態は急速に悪化することがわかった。一方で、オスは一度繁殖状態を示すと環境温度が不適になっても、長期にわたり精子生産を継続できた。

4-(1) によって宮崎集団と菅平集団を同じように実験に使えるようになったことから、秋から春に繁殖する宮崎集団と春から秋に繁殖する菅平集団を対象に、宮崎集団が繁殖期開始期に経験する秋の環境

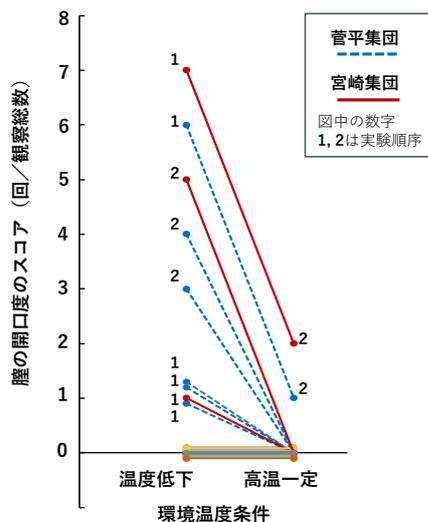


図4. 温度低下に対する菅平・宮崎集団のメスの繁殖応答

秋から春に繁殖する宮崎集団と春から秋に繁殖する菅平集団ともに、光条件を一定に保ったインキュベータ内で、暑い条件から徐々に温度を下げていくと繁殖状態を誘導できるメスが複数個体存在した。条件を入れ替えると、最初に高温一定を経験したメスの一部は、温度低下によって繁殖が誘導された（図中温度低下条件で2）。一方、高温一定条件で腹開口を示した2個体はいずれも1回目の実験の際に温度低下条件で高頻度に腹開口を示した個体であった。

温度変化を経験させ、両集団の繁殖状態を誘導できるかを検証した。H29年度に確立した異性由来の刺激を用いた繁殖状態誘導試験を、光条件を一定に保ったインキュベータ内で実施し、暑い条件から徐々に温度を下げていくことでメスの繁殖状態を誘導できるか調べた。その結果、両集団ともに複数のメスで繁殖状態が誘導された。さらに、対照群と実験群を入れ替えて実験したところ、1回目の実験では全く反応のなかった対照群のメスのうち少なくとも一部の個体は、温度低下によって繁殖が誘導されることが明らかになった。実験の過程で日長の変化を経験していないことから、繁殖期が真逆となる宮崎集団と菅平集団の双方に、環境温度変化によって繁殖状態が誘導されるメスが含まれることを実証できた(図4)。宮崎集団と菅平高原など繁殖パターンが異なる集団間で季節的な繁殖応答の雌雄差に違いがあるかを比較することは本研究の中でも特にユニークな着想に基づくものであり、非常に良い成果が得られた。

(3) RNA 発現解析

冬に野外で繁殖状態が誘導された状態のメスと冬に室内で長日・高環境温度条件に馴化され、繁殖状態を示していないメスの間で発現量に差がある遺伝子が少なくない事が明らかとなった。そして、その発現量の差は、繁殖に関するホルモンの分泌に関わる視床下部や副腎で特に多い傾向にあった(図5)。他の研究グループによりアカネズミのゲノム解析が進行中であることから、その進展にも期待しながら解析を進めていきたい。

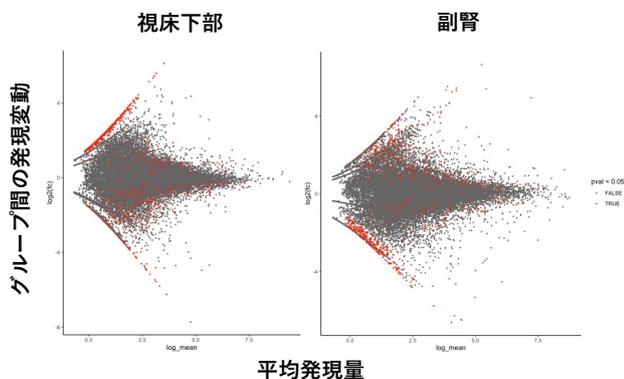


図5. RNA発現解析の予備の結果

冬に野外で繁殖状態が誘導された状態のメスと冬に室内で長日・高環境温度条件に馴化され、繁殖状態を示していないメスの間で発現量に差がある遺伝子(赤色:有意差あり)

まとめ

研究期間全体としては、秋から春に繁殖する宮崎集団と春から秋に繁殖する菅平集団の両集団ともに、メスの繁殖状態の誘導にはオスの匂いと環境温度変化が重要で、日長の変化は必要ではないことを実証した。さらに、繁殖に不適な同一環境温度に馴化した後、繁殖に適した環境温度に至るまで全く同じ温度変化を経験させることで、繁殖期が真逆の両集団ともに繁殖状態を誘導しうることを示した。一方で、オスの繁殖状態にも日長の変化は必要ではなかったが、温度条件よりもメスの匂いの方がより重要であった。以上のことから、アカネズミの季節繁殖の多型は、日長への応答への地域差ではなく、生息地域の環境温度に合わせて可塑的に繁殖のタイミングを変えることにより形成されていると考えられる。オスの方が広範な温度域で繁殖状態を維持し、メスは好適な環境温度への温度変化を経験することで繁殖状態が誘導されやすいという結果は、環境温度への応答性がメスでより高いことを示唆している。したがって、この地域多型はオスではなくメスによる環境温度への応答によって維持されていることが示唆された。さらに、季節的にはオスが繁殖状態に先に入り、メスの繁殖可能な期間を超えて繁殖状態を維持するという野外での観察結果を裏付ける結果である。本種の季節繁殖応答には、哺乳類の繁殖への投資の雌雄差に着目した際に進化生物学的な視点から予測される通りの明確な雌雄差があるといえる。今後は継続課題と合わせて遺伝子情報の解析に取り組み、このメカニズムの詳細にアプローチしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kuroyanagi A, Ukyo R, Kodama Y, Eto T, Okubo Y, Kobayashi I, Ieiri S, Morita T, Sakamoto SH	4. 巻 47
2. 論文標題 Body temperature measurement reveals the reproductive profile of female Apodemus speciosus under laboratory and field conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mammal Study	6. 最初と最後の頁 177-187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3106/ms2021-0048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田 椋太, 松本 奈緒美, 續木 靖浩, 坂本 信介
2. 発表標題 膣口の‘開口度’によるアカネズミの雌の繁殖の進み具合の評価
3. 学会等名 日本哺乳類学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 奈緒美, 岡田 椋太, 坂本 信介, 續木 靖浩
2. 発表標題 アカネズミ(Apodemus speciosus)の子宮頸-膣粘液タンパク質に関する研究
3. 学会等名 日本哺乳類学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本信介（宮大農・動物環境管理）
2. 発表標題 環境温度変化に対するアカネズミの繁殖応答の性差
3. 学会等名 日本生態学会第65回全国大会（2018年3月、札幌）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 畔柳 聡 (宮大院・動物環境管理), 児玉 芳宣 (宮大院・動物環境管理), 大久保 慶信 (自然研), 江藤 毅 (新潟大・朱鷺自然セ), 森田 哲夫 (宮大・フ・生物資源), 家入 誠二 (宮大農・動物環境管理), 坂本 信介 (宮大農・動物環境管理)
2. 発表標題 体温モニタリングによるアカネズミの繁殖、日内休眠、活動時間の推定
3. 学会等名 日本生態学会第65回全国大会 (2018年3月、札幌)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 陽菜 (宮大農・動物環境管理), 畔柳 聡 (宮大院・動物環境管理), 秦 成未 (宮大農・動物環境管理), 右京 里那 (宮大農・動物環境管理), 家入 誠二 (宮大農・動物環境管理), 坂本 信介 (宮大農・動物環境管理)
2. 発表標題 子の増体と離乳後の親和性は出生季節により変わるか
3. 学会等名 日本生態学会第65回全国大会 (2018年3月、札幌)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Details of a Researcher, University of Miyazaki https://srhumbd.miyazaki-u.ac.jp/html/100001424_en.html</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石庭 寛子 (Ishiniwa Hiroko) (00624967)	福島大学・環境放射能研究所・特任講師 (11601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大沼 学 (Onuma Manabu) (50442695)	国立研究開発法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・主任研究員 (82101)	
研究分担者	續木 靖浩 (Tsuzuki Yasuhiro) (00236928)	宮崎大学・農学部・教授 (17601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関