

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07558

研究課題名(和文) ミジンコの誘導防御における可塑性の進化をもたらす分子遺伝基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular genetic basis of plasticity evolution of the inducible defence in the water flea *Daphnia pulex*

研究代表者

宮川 一志 (Miyakawa, Hitoshi)

宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授

研究者番号：30631436

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)：本研究では周期性単為生殖を行うミジンコの誘導防御という現象を題材とし、表現型可塑性を担う因子がゲノム上にどのように分布し、またそれらが世代を経てどのように遺伝し可塑性の進化をもたらすのかを明らかにするための実験基盤の整備を行った。その結果、ミジンコの新規全ゲノム配列の構築、クローン繁殖と有性生殖を組み合わせた交配実験系の確立、反応規準の定量的な評価法の確立に成功した。またこれらの実験系を用いて両親の可塑性(反応規準の形)が次世代に遺伝することを明らかにし、遺伝解析に用いる反応規準の異なるF2バッククロス系統群の作成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同一ゲノムから多様な表現型をつくり出す表現型可塑性の制御機構とその進化過程は多くの研究者が興味を持つ現象である。しかし、可塑性は同一遺伝情報を持つ個体を複数用意しなければ評価することができないため、ランダムな染色体分配と組換えによって唯一無二の遺伝子型の子が生じる人為交配実験による遺伝学的解析はこれまで困難であった。本研究で確立した周期性単為生殖を行うミジンコを用いた交配実験系および様々な反応規準を示す近交系統群はこの問題を解決し、表現型可塑性の進化研究にブレークスルーをもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, by using one of the most famous examples of phenotypic plasticity, inducible defense, in daphnids that carry out cyclical parthenogenesis, we focus on how the factors responsible for the regulation of phenotypic plasticity are distributed in the genome, and how they are inherited and evolved through generations. Here we established the experimental system to investigate these subjects. As a result, we succeeded in 1) construction of a novel whole genome sequence of a model daphnid, *Daphnia pulex*, 2) establishment of a mating experiment system using characteristics of both clonal and sexual reproductions, and 3) establishment of a quantitative evaluation method for reaction norm. Using these experimental systems, the F2 backcross strains with different reaction criteria used for genetic analysis were successfully constructed and it was clarified that the plasticity of the parents (the shape of the reaction norm) is inherited in the next generation.

研究分野：生態発生学

キーワード：ミジンコ 周期性単為生殖 誘導防御 表現型可塑性 反応規準

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) ミジンコの示す表現型可塑性とその遺伝基盤

生物が環境に応じて表現型を様々に作り変える表現型可塑性は種の繁栄に貢献するすぐれたシステムであり、その分子制御機構がさかんに研究されている。本研究の材料であるミジンコ *Daphnia pulex* においては、捕食者であるフサカ幼生の発する匂い物質(カイロモン)を感受することで、後頭部にネックティースと呼ばれるトゲ状の防御形態を形成する。この現象は「誘導防御」と呼ばれ、防御形態を誘導された個体はフサカ幼生による被食率が顕著に低下する。我々はこれまでにこの防御形態形成を担う分子機構の解明に従事しており、様々な遺伝子や内分泌機構の関与を報告している。一方で、表現型可塑性を担う因子がゲノム上にどのように分布し、またそれらが世代を経てどのように遺伝し可塑性の進化をもたらすのかといった分子遺伝基盤についてはほとんど解明されていない。

#### (2) 周期性単為生殖を利用した表現型可塑性の遺伝学

淡水性動物プランクトンのミジンコは環境によって有性生殖と単為(クローン)生殖を切り替える周期性単為生殖を行う。また環境依存型性決定を行うため単一クローン集団からオスを誘導し交配させることが可能である。したがって、クローン集団を用いて表現型可塑性を評価したのちに、その可塑性自体を対象とした人為選抜実験が可能となる。

### 2. 研究の目的

互いに全く異なる誘導防御の反応規準を示す2つのミジンコ系統 MFP 系統と WTN6 系統において、ミジンコの持つ周期性単為生殖という性質を利用した交配実験によってミジンコの示す可塑性がどのように次世代に遺伝するかを明らかにする。さらには戻し交配と連鎖解析によって最終的に可塑性の変化や維持に関与するゲノム領域を決定することで、最終的に生物進化を理解する上で重要でありながら非常に困難なテーマである表現型可塑性の進化機構にせまる。

### 3. 研究の方法

#### (1) ミジンコの新規全ゲノム配列の構築

ロングリード次世代シーケンサー PacBio RS および PacBio Sequel を使用して MFP 系統ミジンコゲノムの *de novo* 構築を行った。アセンブリされたゲノム配列のエラーコレクションは Illumina のショートリードシーケンスを用いて行った。

#### (2) ミジンコの人為交配実験系の確立

捕食者カイロモンにตอบสนองしやすい(防御形態を作りやすい) MFP 系統とほとんどตอบสนองしない WTN6 系統を使用し、水温、餌量、日長、混泳時の雌雄比などの条件を様々に変化させ、効率良く有性生殖を行う条件を探索した。有性生殖個体の判別は HRM 解析で行った。

#### (3) 防御形態の可塑性を定量的に評価するシステムの確立

天然のフサカカイロモン水に代わり、カイロモンアナログである linoleoyl glycine を用いて防御形態の誘導条件を検討した。

#### (4) F<sub>2</sub> バッククロス系統群の作出

MFP 系統と WTN6 系統を交雑させた F<sub>1</sub> 系統をさらに WTN6 系統に戻し交配し、F<sub>2</sub> バッククロス系統群を作出した。

#### (5) ミジンコ防御形態形成における Wnt シグナルの解析

ゲノム中から防御形態形成への関与が予想されている WNT シグナル関連遺伝子を探索し、リアルタイム PCR を用いて防御形態形成時の発現変化を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) ミジンコの新規全ゲノム配列の構築

本研究で主に扱うミジンコ *Daphnia pulex* は初めてゲノムが解読された甲殻類であり、すでにその情報が利用可能である (Colbourne et al., 2011)。しかしながら、次世代シーケンサーが普及する前にサンガー法によって得られた配列で構築されたゲノムには空白部分が多く存在し、またミジンコは個体群間の遺伝的差異が大きいことから本研究の目標とする詳細なゲノム解析には不適であった。そのため、本研究ではまず使用する系統のひとつである MFP 系統の高精度な全ゲノム配列を新たに構築することからスタートした。

シーケンズデータはロングリードシーケンサーである PacBio RSII および PacBio Sequel で取得した。得られたシーケンズから *de novo* アセンブリを行い、Illumina ショートリードでエラーを修正し、最終的に 1,414 の scaffold からなる約 200 Mb のゲノムの構築に成功した。ゲノム上には 59,454 個の遺伝子の存在が予測された。また、構築した MFP 系統の新規ゲノムに WTN6 系統の Illumina ショートリードをマッピングすることで、WTN6 系統のゲノム情報も構築した。

## (2) ミジンコの人為交配実験系の確立

我々の過去の研究より、MFP 系統は低濃度のカイロモンでも応答して防御形態を形成するのに対し、WTN6 系統は高濃度のカイロモンに曝してもほとんど防御形態を形成しないことが明らかになっている。また、WTN6 系統は減数分裂卵を作ることができ、有性生殖の際に母親個体として使用することも明らかになっている。そこで、MFP 系統からオスを誘導し WTN6 系統のメスと掛け合わせることで異なる防御形態の反応規準を持つ両親から生まれた子供にどのような反応規準が遺伝するかを解析すべく、人為交配実験系の整備を行った。

様々な条件を検討した結果、幼若ホルモンで誘導した 1 齢の MFP 系統のオスと、同じく 1 齢の WTN6 系統のメスをおよそ 1:5 の割合で高密度 (1 匹/mL 以上) で混泳させ、十分にエサを与えて 10 日ほど飼育することで安定して有性生殖卵である休眠卵を得ることができた。ミジンコは野外では一般に飢餓 (貧栄養) 条件で有性生殖に移行すると考えられているが、実験室で誘導する際はエサを与えないと全く卵を作らなかった。実験室で交配実験を行う際は自然条件を再現することが必ずしも良い結果につながらないことが明らかとなった。

得られた有性生殖卵から生じた F<sub>1</sub> 個体をクローン系統化し、カイロモン希釈系列に暴露して反応規準を解析したところ、両親の反応規準のちょうど中間的なものとなった (図 1)。これは両親の環境に対する応答能が子に遺伝したことを示している。この交配実験で作成した F<sub>1</sub> 個体が確実に有性生殖で生じたものであるかは、(1) で作成したゲノム情報を元に MFP 系統と WTN6 系統の 1 塩基置換部位を探索してプライマーを設計し、HRM 解析によって確認した (図 2)。

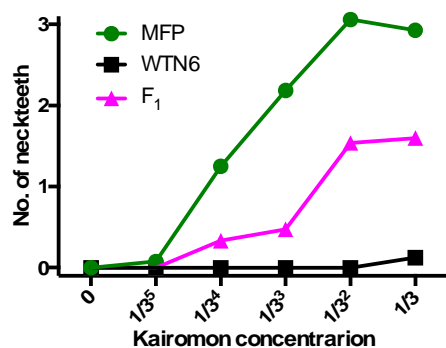


図 1 F<sub>1</sub> 系統の反応規準

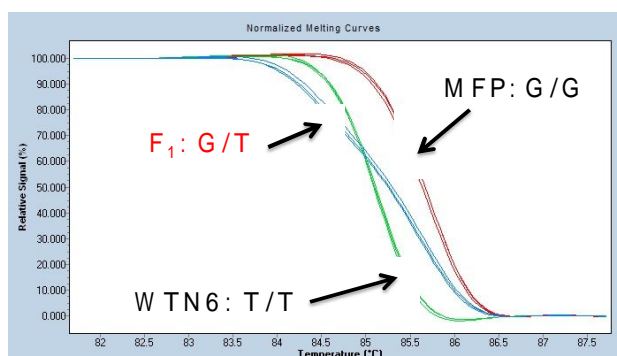


図 2 HRM 解析の結果

## (3) 防御形態の可塑性を定量的に評価するシステムの確立

ミジンコに防御形態を誘導する実験で使用されるカイロモンは、これまでは実際に天敵であるフサカ幼生を飼育した水を使用していたが、フサカ幼生の採集・飼育・カイロモン水作成には非常に手間がかかる上に、そこに実際に含まれているカイロモンの量が不明であり、異なるロットの間で結果が比較できないという問題点があった。しかし 2018 年末にフサカカイロモンを構成する分子の一部が解明され、市販されている類似物質 linoleoyl glycine でも防御形態が誘導可能であることが明らかとなった (Weiss et al., 2018)。そこでこの linoleoyl glycine を用いた反応規準解析系を確立した。人工合成物を使用することで濃度がコントロールでき、より定量的な比較が可能となった。

## (4) F<sub>2</sub> バッククロス系統群の作出

上記で確立した実験系を用いて、遺伝学解析に用いる F<sub>2</sub> バッククロス系統群を作出した。現在までに 100 以上の戻し交配系統の作出に成功しており、防御形態形成の反応規準も系統ごとに様々に異なることから、RAD-seq などを用いて反応規準の形状を規定するゲノム領域を同定可能であると期待される。

## (5) ミジンコ防御形態形成における Wnt シグナルの解析

現在までに GSK-3 を阻害することで Wnt シグナル経路を活性化する LiCl 処理によって防御形態形成部位特異的な細胞の過剰増殖が起こることが知られている (Naraki et al. 2013) この Wnt シグナル経路の防御形態形成への関与を明らかにするために、(1) で構築した新規全ゲノム配列より Wnt ファミリー遺伝子 11 個、Arm 遺伝子、および Wnt シグナル経路との関与が知られている SoxB 遺伝子 3 個の配列を見出し、リアルタイム PCR でカイロモンに応じた発現変化を解析した。その結果、Wnt7, Wnt11, WntA, SoxB2a といった遺伝子がカイロモンに応じた発現変化を見せた。これらの遺伝子について、現在 *in situ* hybridization を用いた発現局在解析を行っている。

これらの研究が達成されたことにより、ミジンコ誘導防御の制御機構の理解が進んだのみならず、表現型可塑性の遺伝基盤の研究が大きく進展した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka Takahiro, Iguchi Taisen, Miyakawa Hitoshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Establishment of a high-sensitivity reporter system in mammalian cells for detecting juvenoids using juvenile hormone receptors of <i>Daphnia pulex</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Applied Toxicology	6. 最初と最後の頁 241-246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1002/jat.3713	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyakawa Hitoshi, Sato Tomomi, Song You, Tollefsen Knut Erik, Iguchi Taisen	4. 巻 184
2. 論文標題 Ecdysteroid and juvenile hormone biosynthesis, receptors and their signaling in the freshwater microcrustacean <i>Daphnia</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 62-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jsbmb.2017.12.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Miyakawa Hitoshi, Watanabe Minae, Araki Marina, Ogino Yukiko, Miyagawa Shinichi, Iguchi Taisen	4. 巻 93
2. 論文標題 Juvenile hormone-independent function of Kruppel homolog 1 in early development of water flea <i>Daphnia pulex</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 12-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibmb.2017.12.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sunayama Kota, Miyakawa Hitoshi, Hayasaki Yoshio	4. 巻 26
2. 論文標題 Size measurement of <i>Daphnia pulex</i> using low-coherence Gabor digital holography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Optical Review	6. 最初と最後の頁 693-698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10043-019-00558-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 田中雄大, 井口泰泉, 宮川一志	4. 巻 21
2. 論文標題 ミジンコのJH受容体を用いたin vitroにおける幼若ホルモン活性検出法の確立	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 環境ホルモン学会ニュースレター	6. 最初と最後の頁 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 謝肖男, 豊田賢治, 宮川一志
2. 発表標題 ミジンコ類の体内で働く脱皮ホルモンおよび幼若ホルモンの同定
3. 学会等名 第43回比較内分泌学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮川一志, 謝肖男
2. 発表標題 ミジンコ類の体内で働く昆虫ホルモンの同定
3. 学会等名 日本動物学会 第89回大会 (代替行事)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中雄大, 井口泰泉, 宮川一志
2. 発表標題 ミジンコの幼若ホルモン受容体を用いたin vitroにおける幼若ホルモン活性検出法の確立
3. 学会等名 環境ホルモン学会第21回研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮川一志
2. 発表標題 ミジンコの環境応答と内分泌かく乱
3. 学会等名 第11回バイオナノシステムズ研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitoshi Miyakawa
2. 発表標題 The common water flea Daphnia: a new model for studying environmental responses
3. 学会等名 International Workshop on Bioimaging 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮川一志
2. 発表標題 ミジンコの環境依存型性決定における内分泌かく乱の分子機構
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中雄大, 井口 泰泉, 宮川一志
2. 発表標題 ミジンコの幼若ホルモン受容体を用いたin vitroにおける幼若ホルモン活性検出法の開発
3. 学会等名 環境ホルモン学会第20回研究発表会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮川 一志
2. 発表標題 ミジンコの防御形態形成におけるリアクションノームの遺伝様式
3. 学会等名 第65回日本生態学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究者の研究室のウェブサイト  <a href="http://c-bio.mine.utsunomiya-u.ac.jp/miyakawa/">http://c-bio.mine.utsunomiya-u.ac.jp/miyakawa/</a></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
研究協力者	鈴木 智大  (Suzuki Tomohiro)		
研究協力者	道羅 英夫  (Dohra Hideo)		
研究協力者	早崎 芳夫  (Hayasaki Yoshio)		