

令和 5 年 12 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19323

研究課題名（和文）失われた野性味から明らかにする自然環境特異的な生体調節のメカニズム

研究課題名（英文）Elucidation of flexible homeostasis regulation that are lost during domestication

研究代表者

神田 真司 (Kanda, Shinji)

東京大学・大気海洋研究所・准教授

研究者番号：50634284

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、野生と家畜の違いと同じように、ペット化された生物の行動や生理学的性質が変化することに着目し、それに関与する遺伝的背景を解析した。遺伝学的解析に便利なメダカを材料にした。野生由来のKiyosu系統と、実験室で継代された系統であるd-rRのF2ハイブリッドを作成し、量的形質遺伝子座（QTL）解析を行うことで、多産やストレス応答などの原因となる遺伝子座の同定を試みた。1回目は209個体、2回目は77個体を用いて各種形質の定量化、シーケンスを行った。そうしたところ、生殖とストレス応答に関する形質において、関連する遺伝子座を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニワトリをはじめとする家畜に関しては、多くの研究が行われ、家畜化に関する形質に関連する遺伝子座・遺伝子が同定されている。その一方で、家畜以外に関してはそのような研究はほとんど行われてこなかった。今回、メダカを用いて解析を行ったことで、メダカのペット特有の遺伝変異について、遺伝子座レベルでの同定を行うことができた。単一遺伝子に帰着するまでには更なる研究が必要ではあるが、ゲノム編集が多くの生物に行えるようになってきており、将来的に養殖魚にこの知見を応用すれば、養殖の効率化につながる可能性もある。

研究成果の概要（英文）：Generally, wild and domesticated strains have different behavioral and physiological properties in animals. Here, by using wild and pet strains of medaka, we performed QTL analysis to identify the genomic loci that are responsible to the differences of phenotypes in wild and laboratory strains. From the two rounds of QTL analysis using 209 and 77 F2 hybrids, we identified multiple loci that showed correlation to phenotypes of stress response and reproduction.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：ストレス応答 繁殖 QTL メダカ 野生

1. 研究開始当初の背景

野生動物と家畜が行動やその生理について全く異なる性質を示すことは広く知られている。例えばオオカミとイヌは元々共通祖先から生じたものであるのにも関わらず長年の人間による継代飼育選抜により全く異なる性質を示す。産まれたときから人工飼育下で育てたオオカミも、イヌとはまったく異なることから、環境要因等のエピジェネティックな制御に加えて、ジェネティックな違いに起因する部分が明確に存在する。

実際に、家畜を含む哺乳類に関しては多くの研究が行われてきたが、現在に至るまで哺乳類・鳥類以外の生物において人工飼育下による継代に伴う変化と、その原因となる遺伝的背景グラウンドを解析した研究はほぼ存在しない。我々はこれまで実験動物としてメダカを用いた研究を進めてきたが、野生メダカに接した際に、実験に用いるメダカはいわゆる家畜化に伴う性質の変化と類似した形質を示すことに気づいた。すなわちペット、実験動物として長年継代されてきたメダカは飼育者に対して従順でよく餌を食べ、そしてよく繁殖するのである。この傾向は野生メダカを2世代実験室内で継代し卵から実験系と同様に飼育した場合でも見られた。したがってこの形質の差異は上記のイヌとオオカミの例と同様に、エピジェネティックな制御以外に遺伝的な要因を含むことが明らかである。すなわちメダカにおいても長年の継代飼育によって失われた野性味が遺伝的要因として存在し、その同定は遺伝学的手法によって可能であると考えた。

2. 研究の目的

上記の背景より、本研究では遺伝学的解析によく用いられる量的形質遺伝子座（QTL）解析により、野生メダカと飼育系統のメダカ（d-rR）の表現型の原因となる遺伝子座・最終的には遺伝子を同定することを目的とした。とくに、多くの水産有用魚は、体サイズが大きく、生育にかかる時間・コストが極めて大きいものに対して、メダカは飼育容易で世代時間が短い。そして、今回の研究で示したように研究用 vs 野生メダカというスキームを使い、この遺伝子の同定に成功すれば、人為的な環境で成長・繁殖しやすくする遺伝子型を見つけ出す事も可能になるのではないかと考えた(図1)。

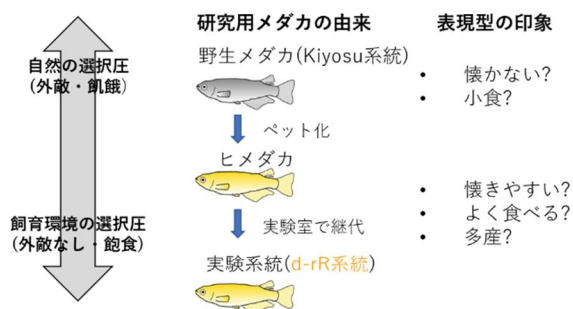


図1. 用いたメダカの由来。野生メダカ由来のKiyosu系統と実験系統のd-rRで印象として存在する表現型を、定量化し、さらにその表現型と相関する遺伝子座の同定を試みた。

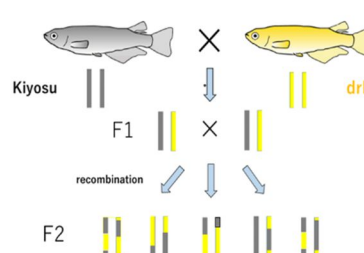


図2. QTL解析の概念図

その実現のため、遺伝的要因を解明するために野生由来の系統と人工継代された系統のメダカのF₂ハイブリッドを数百個体作成し、その形質と遺伝子座の相関を解析することに

した(図 2)。しかしながら、こういった遺伝学的解析に用いられる QTL 解析では、形質及び遺伝子の性質により、結果として同定できるものはごくわずかであると言われている。したがって、考えられる形質をできるだけ多く解析することにより、相関関係の見られやすいものを探る方針で研究を開始した。さらに、同定された遺伝子座から形質に関係する可能性の高い遺伝子を探し、各種遺伝学的・生理学的手法でさらにその遺伝子を絞り込み、最終的にその機能を同定、失われた野性味との関係性を解明すること目的とした。

3. 研究の方法

まず、野生由来の系統と人工継代された系統に実際に差異があるかどうかを、定量的に解析した。野生より採取された Kiyosu 系統 (NBRP medaka 成瀬清博士提供) を 2 世代研究室で継代した子と、研究者によって長年継代されていた d-rR を利用した。まず、それぞれの形質を定量化し、期待通りの差異があることを検証した。複数の形質において、両者に有意な差が検出された。

さらにこれらを交配して F₂ ハイブリッドを数百匹作成し、同定した行動や形態等の形質の原因遺伝子座を同定するために QTL 解析を行った。F₂ 個体の遺伝子型判定のため、Double Digest RAD-seq(ddRAD-seq)によってゲノムワイドに各個体の遺伝子多型情報を取得した。この方法では、2 種類の制限酵素を用いてゲノムを切断した後、共通アダプターのライゲーションによりライブラリーを作成することで、制限酵素切断部位近傍の SNP 情報を取得することができる。これにより、ある個体のゲノムに含まれていた配列が 2 世代前の d-rR 由来の配列なのかあるいは Kiyosu 由来の配列なのかということがシーケンスデータから読み取ることができる。209 個体 (1 回目の QTL 解析) および 77 個体 (2 回目の QTL 解析、メスのみ) のゲノムについて ddRAD-seq ライブラリーを作製し、次世代シーケンサー (Illumina HiSeq X-Ten, マクロジェン・ジャパン社に依頼) によりシーケンスを行った。得られたデータをメダカリファレンスゲノムにマッピングすることで SNP 情報を取得した後、行動や形態等の形質について、ソフトウェア R/qtl を用いて個体の形質と SNP との相関を解析した。

2 回の QTL 解析を通し、全体として、以下のパラメーターを解析した。

1 週間の絶食後の体重減少 アイスショックからの回復時間 摂食後の体重増加率
体重 メスの生殖腺重 メスのゴナドソマティック指数(GSI) 鰭の長さ 体高 体長
顔の大きさ

4. 研究成果

まず、本 QTL 解析が実験として正しく行えていることを確認するため、体色の指標を解析した。d-rR の祖先であるヒメダカは、野生メダカとは異なり、12 番染色体上に存在するメラニンの蓄積に関与する遺伝子(*slc45a2*) に変異を有する(Fukamachi et al., 2001)。今回、各個体の表現型とシーケンスで得た遺伝子型がリンクしている事を確認する目的で、体色に対して QTL 解析を行い、予測通りに 12 番染色体に LOD 値の大きな単一のピーク (LOD 値=83) が見られた為、その他の表現型における解析に進んだ。その結果、以下に示す複数の形質において、遺伝子座と形質の相関が見られた。

1 週間絶食後の体重減少率

Kiyosu と d-rR において、エネルギーの消費効率に違いが想定されたため、一週間絶食後の体重減少率を解析した。そうしたところ、一週間絶食後の体重減少率と相関する遺伝子座として、第9染色体にピークがみられた (LOD 値 3.73, p value=0.056, 表現型への寄与率=7.1%)。候補遺伝子座遺伝マーカーのヘテロ個体群の平均体重減少率が 0.02%だったのに対し、d-rR ホモの個体群は平均で 0.08%減少し、顕性効果を示唆した。

アイスショックからの回復時間

アイスショックからの回復時間に関しては、5 番染色体にピークが見られた (LOD 値 3.74, p value=0.056, 表現型への寄与率=8.3%)。候補遺伝子座遺伝マーカーの Kiyosu ホモの個体群の氷冷麻酔からの平均回復時間は 220 秒だったのに対し、d-rR ホモ群では、平均で 380 秒と時間を要し、相加的効果を示唆した。

摂食後の体重増加率

摂食量の簡易的な定量指標として、摂食後の体重増加率を解析したところ、第15番染色体にピークがみられた (LOD 値 3.72, p value=0.056, 表現型への寄与率=8.1%)。候補遺伝子座遺伝マーカーの Kiyosu ホモは 20%の体重増加を示したのに対し、ヘテロ集団は 15%の体重増加率を示し、予測とは反し Kiyosu 由来の遺伝子型の顕性効果を示唆した。

体重比の生殖腺重量(GSI)

d-rR は、Kiyosu に比べて多産の印象をうけていた。そこで、産卵数などをはじめとするメスの複数の形質について各個体で数値化し、QTL 解析を行った。その結果、第3番染色体にピークがみられた (LOD 値 3.62, p value=0.083, 表現型への寄与率=22.9%)。候補遺伝子座遺伝マーカーの Kiyosu ホモは体重比の生殖腺重量が 7%だったのに対し、d-rR ホモでは 12%で、相加的効果を示唆した。

その他の鰭の長さや体高・体長、顔の大きさなどの形態形質においては、LOD 値が3を超える QTL は検出出来なかった。

これらの QTL の結果から、1 週間の絶食後の体重減少・アイスショックからの回復時間・摂食後の体重増加率・メスの体重比の生殖腺重量(GSI)において有意傾向の遺伝子座を見つけることができた。これらはそれぞれ、経験的に観察されてきた、代謝、ストレス応答、摂食量、繁殖能力の差に結びついている遺伝的相違と考えられる。いくつかの形質については、表現型への寄与率が 10%程度であるため、Kiyosu と d-rR の形質の差は、今回同定できていない複数の遺伝子を含む複合的な結果であると考えられるが、ひとつひとつの候補遺伝子について解析を進めていくことにより、少なくとも形質の差を生み出す機構の一部は説明できるようになると考えられる。特に、GSI は、Kiyosu のホモと d-rR のホモの3番染色体の遺伝子座の違いで2倍近い値がでており、今後実際に遺伝子に落とし込むことができる可能性が高い。現在、Kiyosu・d-rR の F₁ ハイブリッド個体を用いたアレル特異的発現解析を行うことにより、遺伝子座レベルから、特定の遺伝子まで絞り込む作業を継続している。

また、遺伝子の機能的タンパクの変異がこの違いを引き起こしている可能性も同時に解析した。QTL でピークが見られた遺伝子座付近の遺伝子について解析した結果、ストレス応

答に関与しうる遺伝子および生殖に関与する遺伝子少なくともひとつずつに、d-rR は Kiyosu に対してアミノ酸変異を起こす変異を持っていることもわかった。

また、行動等の解析を容易にするように、プログラミングおよびシングルコンピューターを用いて行動撮影を自動化するツールを作成し、d-rR と Kiyosu の性行動において、特にオスの性行動のモチベーションが d-rR において高いことを定量的に示すことができた (Tomihara et al., 2021)。このように、本研究計画の一部はすでに発表までこぎ着けているが、その他の研究は進行中であり、今後論文執筆を視野に入れて研究を継続する。

近い将来、遺伝子の特定、さらにはその遺伝子ノックアウト個体や、アレルを入れ替えたゲノム編集個体の作成を通じて、人工継代によって野性味が失われていく遺伝学的プロセスの一端を解明できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tomihara Soma, Oka Yoshitaka, Kanda Shinji	4. 巻 in press
2. 論文標題 Establishment of open-source semi-automated behavioral analysis system and quantification of the difference of sexual motivation between laboratory and wild strains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
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 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 —

1. 著者名 Sassa Mieko, Takagi Toshiyuki, Kinjo Azusa, Yoshioka Yuki, Zayas Yuna, Shinzato Chuya, Kanda Shinji, Murakami-Sugihara Naoko, Shirai Kotaro, Inoue Koji	4. 巻 4
2. 論文標題 Divalent metal transporter-related protein restricts animals to marine habitats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-01984-8	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 —

1. 著者名 Park Chanhyun, Sakurai Yuki, Sato Hirofumi, Kanda Shinji, Iino Yuichi, Kunitomo Hirofumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Roles of the ClC chloride channel CLH-1 in food-associated salt chemotaxis behavior of <i>C. elegans</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 55701
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.55701	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 —

1. 著者名 Royan Muhammad Rahmad, Kanda Shinji, Kayo Daichi, Song Weiyi, Ge Wei, Weltzien Finn-Arne, Fontaine Romain	4. 巻 166
2. 論文標題 Gonadectomy and Blood Sampling Procedures in the Small Size Teleost Model Japanese Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e62006
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/62006	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 Kayo Daichi, Oka Yoshitaka, Kanda Shinji	4. 巻 285
2. 論文標題 Examination of methods for manipulating serum 17 β -Estradiol (E2) levels by analysis of blood E2 concentration in medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 113272~113272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2019.113272	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 —

1. 著者名 Kayo Daichi, Zempo Buntaro, Tomihara Soma, Oka Yoshitaka, Kanda Shinji	4. 巻 9
2. 論文標題 Gene knockout analysis reveals essentiality of estrogen receptor β 1 (Esr2a) for female reproduction in medaka	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-45373-y	査読の有無 無
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 —

1. 著者名 Kanda S	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Evolution of the regulatory mechanism for hypothalamic-pituitary-gonadal axis in vertebrates - hypothesis from a comparative view.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 General and comparative endocrinology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2018.11.014	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 Hara Y, Yamaguchi K, Onimaru K, Kadota M, Koyanagi M, Keeley SD, Tatsumi K, Tanaka K, Motone F, Kageyama Y, Nozu R, Adachi N, Nishimura O, Nakagawa R, Tanegashima C, Kiyatake I, Matsumoto R, Murakumo K, Nishida K, Terakita A, Kuratani S, Sato K, Hyodo S and Kuraku S	4. 巻 2
2. 論文標題 Shark genomes provide insights into elasmobranch evolution and the origin of vertebrates.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 1761-1771
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41559-018-0673-5	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 —

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富原壮真、富田大貴、岡良隆、神田真司
2. 発表標題 Raspberry Pi を用いた効率的な動物行動解析システムの開発
3. 学会等名 日本動物学会91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富田大貴、安齋賢、馬谷千恵、神田真司
2. 発表標題 研究用メダカで見られる原種とは違った表現型とその遺伝的基盤について
3. 学会等名 日本動物学会91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横田克己、神田真司
2. 発表標題 トランスジェニックメダカを用いたメラニン凝集ホルモン(MCH)産生ニューロンの投射解析
3. 学会等名 日本動物学会関東支部大会73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神田真司
2. 発表標題 メダカの研究で脊椎動物内での生殖中枢制御メカニズムの多様性を照らし出す
3. 学会等名 日本動物学会90回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田杭夕里佳、武田進吾、和井田洋世、木村智貴、神田真司、岡良隆、馬谷千恵
2. 発表標題 真骨魚類メダカを用いた繁殖期依存的な摂食行動の中枢制御機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山岸 遼、小川 斐女、加用 大地、神田 真司、野村 一騎、加藤 尚志
2. 発表標題 メダカにおける性ステロイドホルモンによる末梢赤血球数の変動の評価
3. 学会等名 日本動物学会90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田彩華、藤森千加、馬谷千恵、神田真司
2. 発表標題 脳下垂体自体の光受容を介した体色変化の新規経路の解析
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊花菜、神田真司、佐野香織
2. 発表標題 メダカとゼブラフィッシュの肝臓由来および卵巣由来リコンビナントZPの作製
3. 学会等名 日本動物学会72回関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 財田里梨花、大西洋、長澤竜樹、加用大地、神田真司、安増茂樹、佐野香織
2. 発表標題 下位条鰭類は真骨魚類よりも両生類に類似した卵膜硬化機構をもつ
3. 学会等名 日本動物学会72回関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本航平、加用大地、藤森千加、中城光琴、岡良隆、神田真司
2. 発表標題 原始的な形質を示すピラニアが示唆するGnRH1/3神経系の進化プロセス
3. 学会等名 日本動物学会72回関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kanda S, Kayo D, Fujimori C, Takahashi A, Oka Y
2. 発表標題 Role of GnRH in the gonadotropin release: changes during vertebrate evolution
3. 学会等名 Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology Intercongress (A0SCE) (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kayo D, Kanda S, Oka Y
2. 発表標題 The role of estrogen receptor β 1 (Esr2a) in the negative feedback regulation of follicle stimulating hormone by 17 β -Estradiol in a teleost medaka
3. 学会等名 Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology Intercongress (A0SCE)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤森千加、松田真以子、竹内雅貴、岡良隆、神田真司
2. 発表標題 脊椎動物の脳下垂体におけるFSH・LH産生細胞の発現分化の進化
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加用大地、神田真司、善方文太郎、岡良隆
2. 発表標題 真骨魚類メダカにおけるエストロゲン受容体 $\beta 1$ (Esr2a) を介した濾胞刺激ホルモン (FSH) のエストロゲンフィードバック機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 富原壮真、加用大地、神田真司、岡良隆
2. 発表標題 繁殖可能な生理状態に同期して性行動を賦活する脳内神経メカニズムの解明
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加用大地、神田真司、岡良隆
2. 発表標題 小型の真骨魚類、メダカを対象とした 17β -Estradiol投与方法の検討
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤森千加、松田真以子、岡良隆、神田真司
2. 発表標題 糖タンパク質ホルモンFSH・LH・TSHの各サブユニットの発現の進化
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬谷 千恵，岡良隆
2. 発表標題 終神経GnRH ニューロンは幼少期特異的に活発な神経活動を示す
3. 学会等名 第41回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件	
1. 著者名 神田真司（編）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 一色出版	5. 総ページ数 480
3. 書名 遺伝子から解き明かす魚の不思議な世界	

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

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	安齋 賢	東北大学・生命科学研究科・助教	
	(Ansai Satoshi)		
	(20779467)	(11301)	

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	馬谷 千恵 (Umatani Chie) (60779346)	東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・助教 (12601)	
研究 分担者	兵藤 晋 (Hyodo Susumu) (40222244)	東京大学・大気海洋研究所・教授 (12601)	

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
---------	---------