

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16201

研究課題名（和文）遺伝的多様性とエピジェネティック多様性の相互補償性の検証

研究課題名（英文）Verification of mutual compensation between genetic and epigenetic diversity

研究代表者

勝村 啓史（Katsumura, Takafumi）

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：10649544

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝的多様性の低下は絶滅につながるが、遺伝的多様性が低い集団でも安定的に子孫を残すことができる。これは、エピジェネティックな変化により新しい環境に適応できる表現型の多様性を維持しているためと考えられる。しかし、遺伝的多様性の低い集団で高いエピジェネティックな多様性を示した研究はほとんどない。本研究では、香川県の野生メダカ6個体群を対象に、遺伝的多様性とエピジェネティック多様性を調べ、これらの多様性が相互に関連しているかどうかを明らかにした。DNAメチル化の季節変動は遺伝的多様性の低い集団で大きく、遺伝的多様性とDNAメチル化の間に弱い負の相関があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、表現型に寄与するエピジェネティクスの実態とその効果が明らかになるにつれ、エピジェネティクスが突然変異だけでは説明できない表現型変化に関わっている可能性が示されている。DNA変化によらない表現型変化が、集団の生存や進化にどの程度寄与しているかを知ることは、生物進化を分子レベルで理解するために重要である。本研究により、エピジェネティック多様性が遺伝的多様性を互いに補償しうる可能性が示されたことから、適応進化におけるエピジェネティクスの役割の理解が進むだろう。さらに、環境が集団の生存や進化に重要であることも分子レベルで示唆され、持続可能な地球環境維持へのヒントとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Decreased genetic diversity can lead to extinction, but even low-genetic-diversity populations can generate offspring stably. This may be due to maintaining phenotypic diversity that can adapt to new environments through epigenetic changes. However, few studies have shown high epigenetic diversity in low-genetic-diversity populations. In this study, we examined genetic and epigenetic diversity in six wild medaka populations in Kagawa Prefecture to determine whether these types of diversity are interrelated. Seasonal variation in DNA methylation was greater in low-genetic-diversity populations, suggesting a weak negative correlation between genetic diversity and DNA methylation.

研究分野：進化生物学

キーワード：DNAメチル化 遺伝的多様性 メダカ 表現型可塑性

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝的多様性の低下は、種やその集団を存続の危機にさらし、絶滅の恐れを増大させる。これは、多様性の減少により、疾患抵抗性の低下などにより、生息環境変化に対応できないためだと考えられている。しかしながら自然環境下では、低い遺伝的多様性を示す集団でも環境変化に耐え、安定的に次世代を残すケースが少なからず観察される。これには多くの生物に認められる、表現型可塑性という遺伝的变化を伴わずに表現型を変化させる現象の寄与が大きいとされる。この表現型可塑性は急激な環境変化への耐性を与えるだけでなく、新奇な形質を生み出すドライビングフォース(可塑性第一仮説)でもあると言われている (Levis and Pfennig 2016)。

これまで可塑性第一仮説は、実験室レベルでは観察されるものの、自然集団での報告は限られていた。また、実験的証明も不十分であったことから、生物進化における表現型可塑性の貢献度は少なく見積もられてきた。しかしながら、近年では自然集団レベルの研究からも可塑性第一仮説が支持する結果が得られてきており、分析技術の発展に伴い、その分子メカニズムと進化プロセスの解明へと移りつつある。すなわち、これら研究成果は、自然選択の影響を受ける表現型の多様性が、DNA 変異のみに起因しないことを示唆し、集団の存続には遺伝的多様性が最も重要であるとの理解に疑問を投げかける。集団にみられる表現型多様性は、DNA 多型など遺伝的な要因だけでなく、DNA メチル化などのエピジェネティクスも寄与し、それが集団の存続に関与している可能性が言われている。私たちはこれまでに、メダカの消化管が DNA メチル化修飾で制御される表現型可塑性を示すこと、その制御領域が失われることによって、表現型が遺伝的に固定されるプロセスが存在することを分子レベルで示した (Katsumura et al. 2020)。

私たちの先行研究により、香川県野生メダカにおいて DNA メチル化の季節変動が起こることが示された。この結果は、季節間において DNA メチル化などのエピジェネティックな変化が環境変化に対応する重要な役割を果たしている可能性を示す。予測されているように、遺伝的多様性の低さをエピジェネティックな変化で補う機構があるのであれば、遺伝的多様性が低い集団では、より季節と対応して、エピゲノム状態を変えているかもしれない。実際、トゲウオにおいて遺伝的多様性が高い集団では DNA メチル化のパラツキが小さく、多様性が低い集団ではそのパラツキが大きい (Artemov et al. 2017)。

先行研究や私たちの研究により、低い遺伝的多様性を示す集団が高いレベルのエピジェネティックな変化を有することによって、新しい環境に適応できる表現型多様性を維持するという仮説が立てられる。しかしながらこれまでに、遺伝的多様性が低い集団が高いエピジェネティック多様性を示すことを実証した研究は殆どない。上述のトゲウオの先行研究では、副次的に前述の仮説を導いただけで、2つの集団でしか調べていないことと、人為的に操作した環境下でのメチル化変動パターンの観察であること、技術的な制限からごく少数の及び限られた領域しか調べてないことから、そのメチル化変動に生物学的な意味があるのかは、ほとんど不明なままである。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、自然集団における遺伝的多様性の程度とエピジェネティックな多様性の程度を、ゲノム網羅的に取得する DNA 配列と DNA メチル化の変動領域から求め、それら多様性が相互に関連し合うのか、それとも独立なのかを検証することを目的とした。そこで、これまで私たちが調査してきた野生メダカ集団を対象に、次世代シーケンサー (NGS) を用いたゲノムワイド塩基配列解析とメチローム解析により、集団ごとの遺伝的多様性とエピジェネティック多様性を推定することとした。

## 3. 研究の方法

遺伝的多様性が高い集団は低い集団に比べ、様々なゲノム領域で DNA メチル化が変動し、環境変化に対応している可能性が考えられる。そこで本研究では、冬と夏で採取した野生メダカ集団を対象に、季節で大きく変動する DNA メチル化領域からエピジェネティック多様性を集団ごとにも評価し、ゲノムワイド SNP から算出する遺伝的多様性の程度との関連を調べた。

### (1) 消化管 DNA を用いた MBD-seq による DNA メチル化変動領域の同定

香川県において冬と夏(2年間4季節)に採集したメダカを用いて、DNA メチル化が変動するゲノム領域を検出する目的で、6集団(KSH, KEJ, KHT, KAO, KKB, KSM)より4個体ずつで4季節、計96個体の消化管からDNAを抽出した。それらDNAを、EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit (TaKaRa Bio.)により、MBD-seqライブラリを作成した。MBD-seqとは、メチル化シトシンを認識するMBDタンパク(Methyl-CpG binding domain protein)を使い、DNA断片をキャプチャし、次世代シーケンシングする方法である。作成したライブラリをMacrogen

Japan の次世代シーケンサーレーン買取の受託解析に出し，解析に供するデータ（80M reads/sample 程度）を取得した．

#### （II）RAD-seq によるゲノムワイド SNP による遺伝的多様性の評価

DNA メチル化を調べた集団を対象に，冬と夏（2年間4季節）の遺伝的多様性をゲノムワイド SNP に基づいて算出するために，6 集団（KSH, KEJ, KHT, KAO, KKB, KSM）48 個体ずつの4季節計 1145 個体を用いて，RAD-seq を実施した．RAD-seq（Restriction-site Associated DNA sequencing）とは，ゲノム中に存在する特定の制限酵素サイト付近の塩基配列を網羅的に取得し，多個体間で SNP を比較できる方法である．さらに，これまで本研究室で用いてきた RAD-seq 法を最適化することで最大で 1152 個体の分析を可能にした．

### 4．研究成果

#### （1）【消化管 DNA を用いた MBD-seq による DNA メチル化変動領域の同定】

DNA メチル化が変動するゲノム領域を見つけるために，香川県において冬と夏（2年間4季節）に採集したメダカ（6 集団 [KSH, KEJ, KHT, KAO, KKB, KSM] より 4 個体ずつで4季節，計 96 個体を用いて，ゲノム網羅的 DNA メチル化データを得た．それぞれの集団において，季節で DNA メチル化が変化する領域を 1,710 - 2,178（20,122 - 26,636）領域を検出した（括弧内は統計的に有意であるもののサンプル間で値にばらつきが大きく検出された DNA メチル化領域数を示す）．KSH, KKB, KSM 集団では，夏にメチル化する領域が冬にメチル化する領域よりも多かった．一方で，KHT では夏と比べ冬にメチル化する領域が多かった．これら結果はこれまでの先行研究と異なる条件で配列取得されたことから，結果の詳細な検討が必要であるが，総じて MBD-seq によってゲノム網羅的に DNA メチル化変動領域の同定に成功した．

#### （2）【RAD-seq によるゲノムワイド SNP による遺伝的多様性の評価】

上記 MBD-seq による DNA メチル化変動領域の同定に用いた 6 つの集団（KSH, KEJ, KHT, KAO, KKB, KSM）から各季節で約 50 個体ずつ抽出し，計 1145 個体の RAD-seq データを取得した．その結果，約 450,000 SNPs が 6 つの集団かつ 4 季節で共通して検出された．この SNPs データを使い，主成分分析（PCA）と ADMIXTURE 解析を実施した．その結果，PCA では各集団の地理的關係が良く反映され，ADMIXTURE 解析では 7 つの祖先集団由来のゲノム要素を仮定してクラスタリングされる可能性が示された．また一部の集団では，他集団の祖先要素が見られた．

#### （3）【メダカ地域集団のゲノムリシーケンス】

DNA メチル化の集団間比較には，メチル化されうるシトシンの位置とそのサイトでの DNA 多型情報が重要である．そこで，「先進ゲノム支援」の支援を受け，東京大学で系統維持されている 81 地域由来のメダカ（雄）のゲノムリシーケンスを実施し，SNP とショート InDel が存在するゲノム上の位置を同定した．

#### （4）【遺伝的多様度と DNA メチル化変動】

解析結果を統合して統計解析を実施した結果，遺伝的多様性の低い KSM 集団において，他の集団と比較して DNA メチル化が大きく季節変動していたことを見出した．今後様々な解析条件を検討する必要があるが，遺伝的多様性と DNA メチル化変動との間に，弱いながらも負の相関関係が示唆された．

#### < 引用文献 >

- Artemov, Artem V., Nikolai S. Mague, Sergey M. Rastorguev, Svetlana Zhenilo, Alexander M. Mazur, Svetlana V. Tsygankova, Eugenia S. Boulygina, et al. 2017. "Genome-Wide DNA Methylation Profiling Reveals Epigenetic Adaptation of Stickleback to Marine and Freshwater Conditions." *Molecular Biology and Evolution* 34 (9): 2203-13.
- Katsumura, Takafumi, Suguru Sato, Kana Yamashita, Shoji Oda, Takashi Gakuhari, Shodai Tanaka, Kazuko Fujitani, et al. 2020. "DNA Methylation Site Loss for Plasticity-Led Novel Trait Genetic Fixation." *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.07.09.194738>.
- Levis, Nicholas A., and David W. Pfennig. 2016. "Evaluating 'Plasticity-First' Evolution in Nature: Key Criteria and Empirical Approaches." *Trends in Ecology & Evolution* 31 (7): 563-74.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takafumi Katsumura, Toshiyuki Nishimaki, Kogen Okita, Keita Ishii, Toshinori Takashi, Toshifumi Yamatogi, Motoyuki Ogawa, Tomoyuki Shikata	4. 巻 -
2. 論文標題 A Frozen-section Procedure for Detecting Red-tide Algae on the Gills of Aquaculture Fish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CYTOLOGIA	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) 10.1508/cytologia.87.67	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 Nishinarita R., Niwano S., Niwano H., Nakamura H., Saito D., Sato T., Matsuura G., Arakawa Y., Kobayashi S., Shirakawa Y., Horiguchi A., Ishizue N., Igarashi T., Yoshizawa T., Oikawa J., Hara Y., Katsumura T., Kishihara J., Satoh A., Fukaya H., Sakagami H., Ako J.	4. 巻 10
2. 論文標題 Canagliflozin Suppresses Atrial Remodeling in a Canine Atrial Fibrillation Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	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) 10.1161/JAHA.119.017483	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 Katsumura Takafumi, Sato Suguru, Yamashita Kana, Oda Shoji, Gakuhari Takashi, Tanaka Shodai, Fujitani Kazuko, Nishimaki Toshiyuki, Imai Tadashi, Yoshiura Yasutoshi, Takeshima Hirohiko, Hashiguchi Yasuyuki, Mitani Hiroshi, Ogawa Motoyuki, Takeuchi Hideaki, Oota Hiroki	4. 巻 -
2. 論文標題 DNA methylation site loss for plasticity-led novel trait genetic fixation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	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) 10.1101/2020.07.09.194738	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 Ogita Yusaku, Mawaribuchi Shuuji, Nakasako Kei, Tamura Kei, Matsuda Masaru, Katsumura Takafumi, Oota Hiroki, Watanabe Go, Yoneda Shigetaka, Takamatsu Nobuhiko, Ito Michihiko	4. 巻 23
2. 論文標題 Parallel Evolution of Two dmrt1-Derived Genes, dmy and dm-W, for Vertebrate Sex Determination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100757 ~ 100757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.100757	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19件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 勝村啓史
2. 発表標題 野生メダカ集団を対象としたエピゲノム解析-消化管長の季節変動に着目して
3. 学会等名 2022年度魚類学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 勝村啓史
2. 発表標題 遺伝的多様性とエピジェネティック多様性の相互補償性の検証
3. 学会等名 日本進化学会年大会 第24回沼津大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村文昭, 笠原麗美, 太田博樹, 小川元之, 竹内秀明, 勝村啓史
2. 発表標題 新奇性追求の遺伝基盤とその進化的意義の解明に向けた取り組み
3. 学会等名 日本進化学会年大会 第24回沼津大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村文昭, 笠原麗美, 太田博樹, 小川元之, 竹内秀明, 勝村啓史
2. 発表標題 メダカ地域集団を用いたアルツハイマー病関連遺伝子と新奇性追及との関連性の検証
3. 学会等名 第76回日本人類学会大会・第38回日本霊長類学会大会連合大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村文昭, 尾田正二, 笠原麗美, 太田博樹, 小川元之, 竹内秀明, 勝村啓史
2. 発表標題 メダカにおけるApolipoprotein Eの欠失によっておこる新奇性追求行動変化の解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takafumi Katsumura
2. 発表標題 An approach to understand the phenotypic diversity of human populations using local medaka populations as a model
3. 学会等名 The 2nd AsiaEvo Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村文昭, 太田博樹, 小川元之, 竹内秀明, 勝村啓史
2. 発表標題 ApoE K0メダカの行動解析
3. 学会等名 日本進化学会第23回東京大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 勝村 啓史
2. 発表標題 メダカ集団でヒト集団の多様性の進化を探る
3. 学会等名 第11回定例研究会：社会性の起原と進化
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上田るい, 金岩稔, 照井慧, 瀧本岳, 武島弘彦, 勝村啓史, 橋口康之, 山崎曜, 佐藤拓哉
2. 発表標題 森と川のつながりが維持するアマゴの生活史多様性: 野外操作実験とゲノム解析の融合へ
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 メダカ地域集団間でみられる新奇性追求の違いに関連する遺伝基盤の探索
2. 発表標題 木村文昭, 太田博樹, 小川元之, 竹内秀明, 勝村啓史
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西槇俊之, 小賀厚徳, 千葉洋明, 清水恵子, 長坂剛志, 清水勇一, 勝村啓史, 小川元之
2. 発表標題 サケ(Oncorhynchus keta)におけるメス化顔貌を伴う精巢網乳頭状嚢胞腺腫の一例
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 勝村啓史, 島田直英, 西槇俊之, 内田健太郎, 高相晶士, 小川元之
2. 発表標題 wavyメダカにおける脊柱弯曲の定量解析と原因遺伝子変異の探索
3. 学会等名 第35日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡部遼馬, 勝村啓史, 安齋賢, 御輿真穂, 竹内秀明
2. 発表標題 ヒメダカ集団のヒエラルキー形成に関わる脳の分子基盤の解明
3. 学会等名 日本動物学会 第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下 萌絵, 渡部遼馬, 安齋賢, 勝村啓史, 御輿真穂, 竹内秀明
2. 発表標題 ヒメダカ集団においてヒエラルキー形成がオスとメスの社会関係に与える影響
3. 学会等名 日本動物学会 第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takafumi Katsumura, Naohide Shimada, Kentaro Uchida, Toshiyuki Nishimaki, Masashi Takaso, Motoyuki Ogawa
2. 発表標題 Quantification of spinal curvature and identification of its candidate genes in wy medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshiyuki Nishimaki, Takafumi Katsumura, Noriko Nemoto, Kazuko Fujitani, Hiroki Oota
2. 発表標題 Rosette agent ( <i>Sphaerothecum denstruens</i> ) infection in laboratory medaka
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 Toshiyuki Nishimaki, Kentaro Uchida, Minoru Yamada, Shoji Oda, Atsunori Oga, Hiroki Oota, Takafumi Katsumura, Masashi Takaso, Motoyuki Ogawa
2. 発表標題 The fine structural approach to clarify the pathophysiological mechanism of orthopedic diseases by analyzing the spinal excurved Medaka mutant, wavy (wy)
3. 学会等名 The 19th IFAA Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 勝村啓史, 尾田正二, 上岡史享, 三谷啓志, 小川元之, 太田博樹, 竹内秀明
2. 発表標題 メダカ集団を用いたヒト新奇性追求行動に関わるゲノム領域の探索
3. 学会等名 日本進化学会第21回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 勝村啓史, 内田健太郎, 山田稔, 西横俊之, 尾田正二, 小賀厚徳, 太田博樹, 高相晶士, 小川元之
2. 発表標題 新規側彎症モデルとしてwyメダカの有用性の検討
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	笠原 麗美  (Kasahara Remi)		

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
研究協力者	斉藤 亜由美  (Saito Ayumi)		
研究協力者	木村 文昭  (Kimura Fumiaki)		

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