

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16232

研究課題名(和文) 集団ゲノミクスによるメダカ野生集団に働く淘汰メカニズムの分析

研究課題名(英文) Population genomics of medaka: analysis of selection pressures in the wild

研究代表者

藤本 真悟 (Fujimoto, Shingo)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・特命研究員

研究者番号：60795102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：メダカ野生集団は繁殖可能な個体の季節的出現パターンが緯度によって変化して、高緯度集団ほど繁殖可能なメスが短い期間に集中して繁殖する。こうした個体群動態の違いは、成長や繁殖に関する生活史特性が適応進化したことでもたらされるだろう。日本のメダカ野生集団における季節性繁殖の実体を、北限近くに分布する青森集団を一例に論文にまとめた。生活史特性の緯度間変異に関する遺伝基盤を探索するため、沖縄と青森の野生個体を交配したF2世代の個体で量的形質遺伝子座を解析した。さらに、野生集団の個体で全ゲノムリシーケンス解析を行って、Tajima's DやFstといった集団遺伝指標を用いて自然淘汰の痕跡の検出を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

野生動物における生活史の適応進化は主に表現型変異に基づいて研究されてきた。近年、ゲノムワイドな遺伝的変異の検出が容易になったことで分子メカニズムも検討できるようになりつつある。メダカ科魚類は熱帯に分布する近縁種を含めたゲノム解読を日本の研究チームが精力的に進めているため、日本のメダカは生活史の適応進化とその遺伝基盤を検証する有効な系である。しかしながら、野外での適応進化を議論するのに必要な野生集団の核ゲノムの対立遺伝子頻度に関する知見に限られることに課題があった。本研究で得られた野生集団の遺伝子変異カタログは生活史に限らず、野外での魚類の適応進化を研究する上で有効な基礎的知見になるだろう。

研究成果の概要(英文)：In the wild medaka population, the reproductive seasonality changes along the latitude, and the population at high-latitude tend to be a shorter time of the reproductive season. The demographic changes may be achieved by adaptive evolution in life histories, such as growth and reproduction. We reported the reproductive pattern of the wild medaka population distributed in the Aomori where is near the northern limit of their distribution. In order to explore the genetic basis for inter-population variation in the life history of medaka populations, we analyzed the quantitative trait loci in F2 individuals crossed from wild individuals in Okinawa and Aomori. Whole-genome re-sequencing were also performed on 6 populations at different latitudes. To detect footprints of natural selection, Fst and Tajima's D were calculated by performing genome scans at 50000 bp intervals.

研究分野：行動生態学、進化生態学

キーワード：生活史適応 季節性 緯度間変異 自然淘汰 メダカ 集団遺伝解析 ゲノムスキャン 量的形質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

熱帯から温帯にかけて分布する魚類の多くは、高緯度の種/集団ほど繁殖は一年の中の特定期間に集中する(Vila-gispert & Moreno-amich 2002. *Environ. Biol. Fishes* 65: 387-400)。高緯度の個体群動態は周期的に変動する温度や餌資源などに由来する生理的制約で繁殖期間が短くなり、その制約下で成長や繁殖といった生活史形質の適応進化が生じた結果だろう。実際、共通環境実験で環境と遺伝の効果を分離すると生活史形質の変異には遺伝基盤が存在することから(e.g. Yamahira et al. 2007. *Evolution* 61(7): 1577-1589)、生活史の進化的応答が個体群動態を理解する上で不可欠な要素とみなされるようになってきた。

緯度の異なる集団における適応進化に関わる自然淘汰のメカニズムを考えると、高緯度集団では、先述したように年周期で変動する温度や日長など物理環境への適応が重要になる(Conover, 1992, *J. Fish Biol.*, 41, 161-178)。他方で、低緯度では気候環境のような外的要因よりもむしろ、オス間の配偶者獲得競争といった個体間競争(Fujimoto et al. 2015. *Evol. Biol.* 42(1): 75-87)、または生存率の性差といった生理的要因が淘汰圧の原因として重要な可能性が高い。

私達はこれまで日本のメダカ野生集団で(*Oryzias latipes* species complex)、繁殖可能な個体の出現の季節変化を緯度の異なる集団間で比較してきた。国内での分布の南限にあたる沖縄では、繁殖可能なメスの出現は3月から10月まで続いた。オスは一年を通じて多くが繁殖可能な状態にあり、メスが繁殖していない時期でも繁殖可能な個体が見られた(藤本, 未発表)。対照的に青森では、繁殖可能なメスの出現は5月から7月に限られており、繁殖可能なオスの出現もこの時期に集中した。野外における繁殖パターンの違いは、それぞれの集団で生活史適応を促す淘汰圧が異なることを示唆する。

しかしながら、さまざまな形質に変異を示す集団間で表現型の情報からだけでは、何の表現型に淘汰が強く働いたか? また、形質に働く淘汰メカニズムの種類は何か?(例えば、方向性淘汰か平衡淘汰か)といった適応進化の原因となる自然淘汰とその対象となる分子メカニズムに関する疑問に答えることは難しい。そこで、これらを検出する手法として集団ゲノム解析に着目した。

2. 研究の目的

メダカで緯度の異なる野生集団から複数個体の全ゲノムをリシーケンスして生活史適応に関わる表現型と関連する遺伝子を探索することが目的である。この目的を達成するために、(1) メダカ科魚類に着目して生息地の緯度の異なる種間および野生集団間で、繁殖に関連する配偶行動や性的二型を示す形質の変異を定量化した。(2) オスの二次性徴形質や繁殖に関連する産卵数や体サイズなど、生活史特性に関連する量的形質遺伝子座(QTL)の解析に取り組み、様々な表現型を支配する染色体上の候補領域を絞り込んだ。最後に、(3) 日本の緯度の異なるメダカ野生集団から得られた複数個体を全ゲノムシーケンス解析して、個体間および集団間の遺伝的多様性の情報を集積した。これらの遺伝情報を元にして、 F_{st} や $Tajima's D$ といった集団遺伝学的指標に基づいて環境適応に関わる遺伝領域の検討を進めた。特に、生活史形質のような表現型はポリジーン遺伝であると予想されるため、ゲノム全体の変異を把握しながら解析を進める必要がある。

3. 研究の方法

(1) 緯度の異なる種間および野生集団間の繁殖形質に関する表現型変異の計測

メダカ科魚類の背鰭と尻鰭は、二次性徴としてオスがメスより長くなる性的二型を示す形質である。日本のメダカ野生集団を用いた先行研究では、これらの鰭には集団間で遺伝的変異があること、配偶者選択実験で鰭の長いオスほどメスから拒否されにくい配偶シグナルとしての機能が知られていた(Fujimoto et al. 2014. *Zool. Sci.* 31(11): 703-708)。もし、低緯度の種および集団ほど配偶者獲得競争による性淘汰圧が強まるならば、低緯度に分布する種ほど性的二型の程度は過大になり、求愛や競争といった配偶者獲得に関わる行動の頻度が高まるだろう。この仮説を検証するため、メダカ科魚類に含まれる2属32種で形態形質を計測して、Phylogenetic generalized least squares (PGLS)で系統関係を考慮した上で種間比較を行って、低緯度に分布する種ほど鰭の長さや体サイズにおける性的二型の程度が大きいか検討した[成果(1)]。

また、メダカ科魚類の中でも分布域の北限近くにあたる青森のメダカ野生集団に着目して、年間の水温変化と繁殖パターンの関係を解析して、生活史の季節性適応についての知見を得た。野外での成魚の体重や生殖腺指数(Gonad soma index)を毎月計測して年間の詳細な繁殖スケジュールを調べるとともに、オスの二次性徴形質の発現が季節変化するか検討した[成果(2)]。

(2) 繁殖関連形質の量的形質遺伝子座(QTL)の解析

青森と沖縄の野生集団に見られた繁殖特性の違いに影響する遺伝基盤を検討するため、青森

と沖縄の野生個体を飼育下で交雑して作出した F₂ 個体を用いて、QTL 解析を行った。F₂ の遺伝子型はマイクロアレイで決定した(Kawajiri et al. 2014. *Molecular Ecology* 23(21): 5258-5275)。各 F₂ 個体で交配実験を行って産卵まで確認して体長、オスの求愛行動頻度、メスの配偶者選好性、一腹の産卵数を計測して染色体上の候補領域を探索した[成果(3)]。

(3) メダカ野生集団における集団内の遺伝的多様性の把握

日本のメダカ野生集団は地域間で遺伝的に分化している(Takehana et al. 2003. *Zool. Sci.* 20(10): 1279-1291, Katsumura et al. 2019. *G3: Genes|Genomes|Genetics* 9(1): 217-228)。自然淘汰の痕跡をゲノム上から検出するには遺伝的背景がまとまって、かつ緯度の異なる地域間を比較できるのが望ましい。そうした解析の目的に合致する地域集団として、*O. latipes* (沖縄, 鹿児島, 長崎)と *O. sakaizumii* (福井, 新潟, 青森)の6集団×8個体(計48個体, 雌雄同数)を採集して解析に供した。採集した個体はすべて鱗や体型などの形態計測を行うためにデジタルカメラで写真撮影して記録した。

これらの個体を対象に全ゲノムリシーケンス解析を行った。Illumina Truseq PCR free のキットを用いてライブラリ調整を行い、HiSeq X を用いてゲノムサイズの x30 のカバレッジを目標に塩基配列を決定した。得られた塩基データは、リファレンスゲノム上に bwa mem でマッピングして(Li. 2013. *arXiv:1303.3997v2 [q-bio.GN]*)、Genome analysis tool kit を用いて遺伝子型を決定した(Van der Auwera et al. 2013. *Curr. Protoc. Bioinformatics*, 43:11.10.1-11)。個体ごとの一塩基多型およびインデルを variant call format 形式にまとめて、以下の集団遺伝解析を行った。

(4) 集団遺伝学的指標による自然淘汰が働いた遺伝領域の検出

各集団について染色体領域を 50000bp ごとの領域に区切って、それぞれの領域について集団遺伝指標を計算するゲノムスキャンを試みた。単一集団内で自然淘汰が働いた遺伝領域を検出するため、塩基多様度、Tajima's D および同一集団のオスとメスとの間でのヘテロ接合度(Inter-sexual F_{st})を計算した。Tajima's D は、2 個体間の遺伝距離から中立理論による期待値の差を取った値で、正の値では超優性など平衡淘汰、負の値を取ると純化淘汰やボトルネックが働いた可能性を示唆する。また、Tajima's D と Inter-sexual F_{st} がともに高い遺伝領域は、生存率の性差といった雌雄間での適応度の違い(性的対立)に影響する可能性がある。

4. 研究成果

(1) メダカ科魚類全体での緯度と性的二型の程度との相関

鱗の長さや体サイズといった形質の両方で高緯度に分布する種ほど、性的二型の程度が小さくなる負の相関を示した。しかしながら、PGLS で系統関係を考慮するとこの傾向は統計的に有意ではなくなり、系統関係が性的二型の進化パターンに影響していることが示唆された。メダカ科魚類は東南アジアの熱帯域を中心に分布するが、性的二型の程度の小さい種は多くが日本のメダカを含む単系統の *latipes* グループのクレードに属した。また、それらの種はいずれも温帯に分布することから、熱帯から温帯への進出イベントにともなって性的二型の程度が小さくなる方向へ進化が生じたと解釈した。以上の結果を *Biological journal of the Linnean society* で報告した(<https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa166>)。

(2) メダカ青森集団における繁殖投資の季節変化

青森のメダカ野生集団では生殖腺指数やオスの二次性徴形質の発現の季節変化から、雌雄ともに5~7月の2ヶ月間に集中して繁殖が行われることが示唆された。メスの卵巣の GSI が季節的に増加する時期に対応して、オスの精巣の GSI も増加していた。また、繁殖期間中のみ、オスの GSI は性的二型を示す尻鱗の長さとの正の相関を示したので、鱗の性的二型の程度はオスの繁殖能力と関連する正直な配偶シグナルであることが示唆された。以上の結果を *Environmental biology of fishes* で報告した(<https://doi.org/10.1007/s10641-021-01059-x>)。

(3) 青森と沖縄の野生個体を用いた繁殖関連形質の量的形質遺伝子座(QTL)の解析

F₂ の繁殖に関連する表現型と遺伝子型との関連を調べたところ、いずれも異なる常染色体上に候補領域が検出された。体長は12番、オスの求愛頻度は20番、メスの配偶者選好性の指標である産卵までの経過時間は、13番および18番染色体でそれぞれ有意な関連を示した。

体長と産卵数に関しては、最近傍の遺伝子マーカーで青森型ホモの遺伝子型を持つ個体は沖縄型ホモの個体よりも増加した。また、産卵数に関する遺伝子マーカーは体長との間に相互作用を示し、沖縄型ホモの遺伝子型を持つ個体は体長が大きくなっても一腹あたりの産卵数がほと

んど増加しなかった(図1)。このような体長と産卵数の関係は野生個体の集団間変異の傾向と一致するので(藤本, 未発表) これらの領域は季節性繁殖など野生集団における生活史の適応進化に関連する遺伝基盤である可能性があるだろう。これらの内容について、第39回動物行動学会で報告した。

(4) ゲノム上での自然淘汰の痕跡の検出

すべての染色体を 50000 bp の区間に分けて、それぞれの領域について、Tajima's D と Inter-sexual F_{st} を計算して、ゲノム全体でのそれぞれの統計量の分布を得た。この分布における 95%点から外れた領域を、自然淘汰が働いた可能性のある領域とみなした(図2)。これらの領域は平衡淘汰や性的対立といった淘汰メカニズムが働くことで、集団内の塩基多様度が高まっている可能性がある。

緯度の異なる集団間では環境の違いで、自然淘汰が働く領域もまた異なった可能性がある。集団間で異なる対立遺伝子が固定した領域を検出するため、集団間の F_{st} を計算した。また、正の自然淘汰が働くときに生じる selective sweep を検出する統計量 XP-CLR を計算して、それぞれの集団における局所適応と関連する遺伝領域の探索をさらに進めている。

ゲノム上の自然淘汰の痕跡を遺伝的変異から検出する場合、その解釈の妥当性は、過去の集団サイズの変動、個体の移出入や集団が遺伝的に分化した後に生じた二次的接触といった集団遺伝構造に強く依存する。過去の集団動態や集団遺伝構造を推定するため、コアレセント理論に基づいて対立遺伝子頻度スペクトラムを用いて過去の有効集団サイズの変動を推定する SMC++ を適用して(Terhorst et al. 2017. *Nat. Genet.*, 49(2), 303-309)、各集団の有効集団サイズの変化および集団間の分岐時間を推定した。この結果について、第68回日本生態学会で報告した。

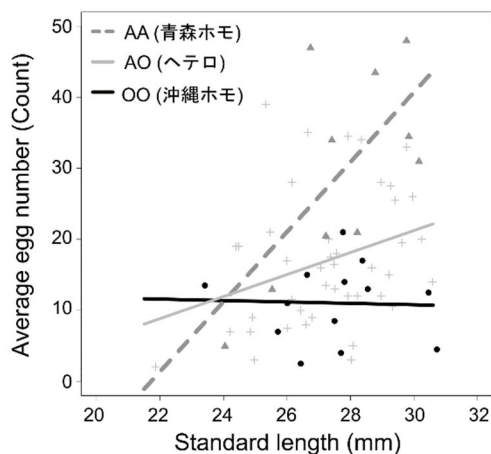


図1. 23 番染色体の遺伝子マーカーと産卵数との関係

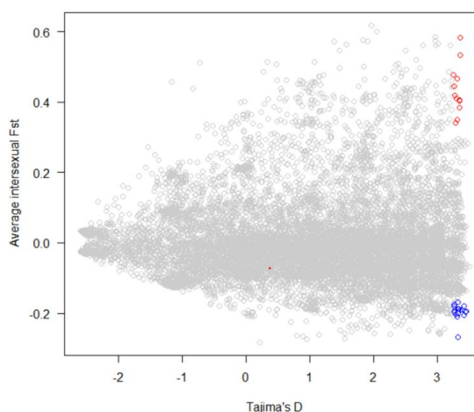


図2. 5000 bp 区間のゲノムスキャンで得られた淘汰が働いた可能性のある領域(青:平衡淘汰、赤:生存率にかかる性的対立)

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Sutra Nobu, Kusumi Junko, Montenegro Javier, Kobayashi Hirozumi, Fujimoto Shingo, Masengi Kawilarang W. A., Nagano Atsushi J., Toyoda Atsushi, Matsunami Masatoshi, Kimura Ryosuke, Yamahira Kazunori	4. 巻 73
2. 論文標題 Evidence for sympatric speciation in a Wallacean ancient lake	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Evolution	6. 最初と最後の頁 1898 ~ 1915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/evo.13821	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 Fujimoto Shingo, Takeda Satoshi, Yagi Mitsuharu, Yamahira Kazunori	4. 巻 104
2. 論文標題 Seasonal change in male reproductive investment of a fish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Biology of Fishes	6. 最初と最後の頁 107 ~ 118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10641-021-01059-x	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 Ansai Satoshi, Mochida Koji, Fujimoto Shingo, Mokodongan Daniel F., Sumarto Bayu Kreshna Adhitya, Masengi Kawilarang W. A., Hadiaty Renny K., Nagano Atsushi J., Toyoda Atsushi, Naruse Kiyoshi, Yamahira Kazunori, Kitano Jun	4. 巻 12
2. 論文標題 Genome editing reveals fitness effects of a gene for sexual dichromatism in Sulawesian fishes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-21697-0	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 該当する

1. 著者名 Sumarto Bayu K A, Kobayashi Hirozumi, Kakioka Ryo, Tanaka Rieko, Maeda Ken, Tran Hau D, Koizumi Noriyuki, Morioka Shinsuke, Bounsong Vongvichith, Watanabe Katsutoshi, Musikasinthorn Prachya, Tun Sein, Yun L K C, Anoop V K, Raghavan Rajeev, Masengi Kawilarang W A, Fujimoto Shingo, Yamahira Kazunori	4. 巻 131
2. 論文標題 Latitudinal variation in sexual dimorphism in a freshwater fish group	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological Journal of the Linnean Society	6. 最初と最後の頁 898 ~ 908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolinnean/blaa166	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 Sumarto Bayu K. A., Nofrianto Andy B., Mokodongan Daniel F., Lawelle Sjamsu A., Masengi Kawilarang W. A., Fujimoto Shingo, Yamahira Kazunori	4. 巻 38
2. 論文標題 Variation in Mating Behaviors Between a Tropical and a Temperate Species of Medaka Fishes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 45 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs200114	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

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤本真悟
2. 発表標題 気候適応がもたらす繁殖の季節性がメダカ科魚類の性淘汰圧を変える
3. 学会等名 第67回日本生態学会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 Sumarto B, Fujimoto S, Kobayashi H, Yamahira K
2. 発表標題 Are tropical medaka fishes sexually more dimorphic than temperate ones?: tests by phylogenetic comparative methods.
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 明正大純, 藤本真悟, 小林亨
2. 発表標題 新旧性決定遺伝子DmyとGsd f neoYが共存する長崎県平戸産野生ミナミメダカ個体群
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 藤本真悟, 八木光晴, 山平寿智
2. 発表標題 キタノメダカ野生集団における精巣サイズと性的二型の季節変化
3. 学会等名 三学会合同長崎大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 明正大純, 藤本真悟, 小林亨
2. 発表標題 長崎県平戸産ミナメダカ個体群におけるRet rot ransposonの挿入による新規性決定遺伝子GsdfNeoYへの進化
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 藤本真悟, 北野潤, 山平寿智
2. 発表標題 メダカ野生集団における季節性繁殖に関連する量的形質遺伝子座の探索
3. 学会等名 第39回日本動物行動学会大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Sumarto,B.K.A., Fujimoto,S., Kobayashi,H, Yamahira,K.
2. 発表標題 Latitudinal Variation in Sexual Dimorphisms in a Freshwater Fish Group
3. 学会等名 第68回日本生態学会大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 安齋賢, 持田浩治, 藤本真悟, Daniel F. MOKODONGAN, Bayu Kreshna Adhitya SUMARTO, Kawilarang W. A. MASENGI, Renny K. HADIATY, 永野惇, 豊田敦, 成瀬清, 山平寿智, 北野潤
2. 発表標題 ゲノム編集から明らかにする性的二型原因遺伝子の適応度への影響
3. 学会等名 第68回日本生態学会大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 藤本真悟, 木村亮介
2. 発表標題 全ゲノム解析によるメダカ野生集団の過去の有効集団サイズ変動の推定
3. 学会等名 第68回日本生態学会大会
4. 発表年 2020年～2021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

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			
インドネシア	LIPI	Sam Ratulangi University	Museum Zoologicum Bogoriense	
ベトナム	Hanoi National University of			
ラオス	Living Aquatic Resources			
ミャンマー	MONREC			
インド	Kerala University			