

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02552

研究課題名(和文) トゲウオ科魚類をモデルとした繁殖行動形質の適応的多様化のゲノム基盤

研究課題名(英文) Genomic basis underlying adaptive differentiation in reproductive-related behavior of the stickleback fish

研究代表者

小北 智之 (Tomoyuki, Kokita)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：60372835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、繁殖縄張り行動をモデル系として、野生動物の本能行動の多様性を生み出す生態遺伝基盤を解明を目的としたものである。当該行動は、多くの動物で普遍的な行動でありながら、その発現強度に近縁種間や種内集団間での変異が存在することが知られている。本研究では、多様な淡水環境へ進出し、各集団が多様な表現形質を進化させている淡水型イトヨを対象としてこの問いを追究した。その結果、流水域と止水域という異なる生態環境に生息する集団間で当該行動発現強度の遺伝的変異と環境依存的な収斂性が確認された。さらに、様々な内分泌学的・ゲノム遺伝学的解析から、その収斂性の背後にある進化遺伝基盤は異なることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物の多様な本能行動の発現機構は生命科学者を魅了する現象であり、マウス等の実験モデル動物では行動発現と関連した脳機能に関わる遺伝子が次々と明らかになっている。その一方で、生物多様性科学の文脈で、遺伝子・ゲノムレベルの枠組みから野生動物に認められる行動進化を理解しよう試みは大きな挑戦であり続けている。本研究が対象とした繁殖縄張り制は動物界に広く存在する行動様式であるものの、この多様性進化の遺伝・ゲノム基盤に関する確固たる実証例はなかった。本研究は、イトヨに認められる雄の繁殖行動の種内変異を利用して、未開拓分野である野生動物における本能行動の多様化機構の一旦を描き出した先駆的な研究となった。

研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate the ecological genetic basis for the diversity of instinctive behavior in wild animals, using reproductive territorial behavior as a model system. Although this behavior is common in many animals, it is known that there is variation in its expression intensity among closely related species and populations within a species. In this study, we explored this question in freshwater threespine stickleback that inhabit various freshwater environments and evolved various phenotypic traits in each population. As a result, genetic variation and environment-dependent convergence in the expression intensity of the relevant behaviors between populations inhabiting different ecological environments (i.e., lentic and lotic ecotypes) were confirmed. Furthermore, various endocrinological and genomic analyses strongly suggest that the evolutionary genetic basis behind the convergence is different.

研究分野：生態遺伝学

キーワード：繁殖戦略 適応進化 行動生態学 行動遺伝学

1. 研究開始当初の背景

地球上の動物は多様な生息環境に進出し、その生存戦略や繁殖戦略と関連して多様な行動様式を獲得してきた。それでは、野生動物が示す興味深い多様な本能行動はいったいどのような進化機構で創出されてきたのであろうか。異なる行動戦略の背後にある究極要因に関しては、行動生態学分野で古くから研究されているが、フィールドにおける行動多様性をもたらす遺伝・ゲノム基盤の追究は、現代の生物多様性科学における大きな挑戦の一つである。近年急速に発展してきたオミクス解析技術やゲノム編集技術は、実験モデル動物での研究に留まっていた行動発現の分子基盤に関する研究を多様な野生動物へ拡張し、動物行動の自然史と進化遺伝機構を結ぶ新たな研究を切り開く可能性を押し広げてきた。

野生動物の多様な本能行動の中で、繁殖関連の行動は個体の適応度に直結するため、異なる環境に進出した近縁種間や種内集団間での適応遺伝分化は珍しい現象ではない。一般に、繁殖と関連した社会行動は内分泌支配 (Hormonal control) を受けており、実験モデル動物を対象とした行動神経内分泌学は一大研究分野になっている。つまり、ホルモンによる脳の遺伝子発現パターンの変化がこのような行動発現の背後にあるといえ、種内や近縁群間における繁殖関連行動の多様性創出においては、広義の内分泌シグナル (ホルモン合成能、感受性、応答性) に関わる遺伝的変異が進化モデルとして強く想定できる。本研究では未開拓領域に挑む上で、自然史研究の文脈における成果達成の現実性が高いモデル系、つまり、進化学的モデル種イトヨ集団間における雄の繁殖縄張り行動の多様性に焦点を当てた。

2. 研究の目的

目的 本研究は、アンドロゲン (雄性ホルモン) による内分泌支配が知られている雄繁殖縄張り行動をモデル系として、表現型変異を内分泌シグナルの変異に還元させ、オミクス関連解析とゲノム編集技術を駆使し、行動の多様性進化の背後にある遺伝的変異の実態を追究しようとするものである。そのためのモデル系としてトゲウオ科魚類のイトヨ (*Gasterosteus aculeatus*) を選定した。

モデル系としてのイトヨ イトヨは、雄が繁殖縄張りを形成し、営巣・求愛するという一連の繁殖様式を示す。ノーベル賞学者のニコ・ティンバーゲン以来の行動学の伝統があり、雄の繁殖行動発現の内分泌基盤に関する知見も蓄積されている。さらに、淡水型イトヨの縄張り・攻撃行動の発現に集団間の変異が広く存在するとともに、これらの現象には、生態学的研究からその進化の究極要因も示唆されており、適応的多様化の一例と言える。本研究では、この多様性を対象に、次の3項目を中心に研究を展開した。(1) 雄繁殖行動の性ホルモン支配の逆遺伝学的実証、(2) 攻撃的縄張り行動発現の QTL 解析、(3) 収斂進化に背後にある内分泌遺伝機構の多様性。



図. トゲウオ科魚類の繁殖縄張り発現パターン

3. 研究の方法

(1) 繁殖行動の性ホルモン支配の逆遺伝学的検証

イトヨ雄の攻撃的縄張り・営巣行動発現のアンドロゲン支配自体は内分泌学的に判明しているが、本研究での想定進化モデルの一つの前提として「アンドロゲンレベルの変異が行動形質の発現レベルを変える」ことをゲノム編集による逆遺伝学的な検証を試みた。本項目の対象集団としては、ハリヨ岐阜集団 (日本産淡水型イトヨの一地理的系統で高い攻撃的縄張り行動を示す) を用いた。縄張り行動発現の背後にあるアンドロゲンである 11-KT (11-ケトテストステロン) の生合成経路の最終段階で働く酵素遺伝子の一つを CRISPR-Cas9 処理し、F0 ノックアウト個体、および F2 ノックアウト個体を作成し、11-KT の合成レベルに依存した行動の変化を検証した。

(2) 攻撃的縄張り行動発現の QTL 解析

ハリヨ岐阜集団 (日本産淡水型イトヨの一地理的系統で高い攻撃的縄張り行動を示す) とイトヨ苫小牧集団 (低い攻撃的縄張り行動を示す) を対象として、その行動的差異の遺伝基盤を探

索した。まず、両集団を孵化後から共通環境で育成し、この行動的差異が遺伝支配されているかどうかを共通環境実験（Common-garden experiment）によって検討した。次に、両集団の交雑家系を人工授精により作出し、F2 個体の攻撃的縄張り行動の発現レベルを表現型とした QTL（量的形質遺伝子座）解析を実施した。QTL 解析のための遺伝子型決定は、次世代シーケンサーによる ddRAD-seq を用いた。

（3）収斂進化に背後にある内分泌遺伝機構の多様性

研究代表者による先行研究で、日本産淡水型イトヨの一地理的系統であるハリヨの岐阜集団（止水型の生態型集団）と滋賀集団（流水型の生態型集団）の間に認められる繁殖縄張り行動の適応分化には精巣でのアンドロゲン合成能の差異が関与していること、さらにこの差異を引き起こす原因候補遺伝子が明らかになっている（現在投稿準備中）。このハリヨクレードと同様の進化的パターンがイトヨクレードに認められるかどうかを検討するために（全ページの図参照）、イトヨ那須集団（止水型の生態型集団）とイトヨ苫小牧集団（流水型の生態型集団）を新たなモデル系として選定した。この両集団間で繁殖縄張り行動の発現レベルが異なるかどうかを確認する共通環境実験を行うとともに、EIA による血中アンドロゲン（11-KT）濃度の集団間比較、脳におけるアンドロゲン合成系と応答系の RNA-seq 解析及び定量 PCR 解析を行い、行動発現の集団間差異の背後にある内分泌基盤とトランスクリプトーム基盤を探索した。さらに、両集団の F1 交雑個体を用いて、繁殖縄張り発現フェーズにおける脳のアリル特異的発現（Allele-Specific Expression: ASE）解析を行い、cis 変異が存在する遺伝子群を探索した。

4. 研究成果

（1）繁殖行動の性ホルモン支配の逆遺伝学的検証

F0 ノックアウト個体とコントロール個体の雄を用いて、繁殖縄張り獲得能に関するコンバット型の行動アッセイを実施したところ、F0 ノックアウト個体は全てのアッセイにおいて、縄張り獲得できなかった。さらに、F0 ノックアウト個体の中には全く営巣しない個体が多数認められた。さらに、モザイク性の F0 ノックアウト個体の血中アンドロゲン（11-KT）濃度を定量したところ、11-KT の合成は確認されたものの、コントロール個体に比べて大幅に濃度が減少していることが確認された。以上の点から、本種の雄の繁殖行動発現における 11-KT 支配と濃度依存性が明瞭に確認された。また、F2 ノックアウト個体の作成も本研究期間内に実施したが、現在、成熟サイズになるのを待っている段階（育成している段階）であり、本研究期間内には同様の行動アッセイは実施できなかった。これは今年度中に実施する予定である。

（2）攻撃的縄張り性の QTL 解析

共通環境実験からハリヨ岐阜集団とイトヨ苫小牧集団の間の攻撃的縄張り性の差異に遺伝因子が関与していることが判明した。さらに、両集団の雄の攻撃性に関する QTL 解析を実施したところ、16 番染色体に有意な原因領域が検出され、この領域には、いくつかの行動関連遺伝子が存在していた。本研究では 100 個体程度の F2 個体で表現型アッセイを実施したため、この個体数での検出力を考慮すると、全ての原因遺伝子座を網羅できていないと考えられる。しかし、検出された一つの領域は今後のさらなる解析の基盤となる。

（3）収斂進化に背後にある内分泌遺伝機構の多様性

止水型の生態型集団であるイトヨ那須集団は、野生個体および共通環境育成個体ともに、流水型の生態型集団であるイトヨ苫小牧集団よりも繁殖縄張り行動発現が高く、両集団で当該行動発現が遺伝的分化していることが確認された。また、ハリヨクレードでの先行研究の結果と合わせて考えると両クレードにおいて、生息環境特性に応じた当該行動発現の収斂性が強く示唆された。その一方で、那須集団と苫小牧集団の間に血中 11-KT 濃度に有意な差は認められず、精巣でのアンドロゲン合成能に差異がないことが示唆された。両集団の全脳を用いた RNA-seq を行ったところ、攻撃性に関与することが知られているいくつかの遺伝子群、およびニューロステロイド合成系遺伝子群に有意な差異が認められた一方、アンドロゲン感受性や応答性に関わることが知られている遺伝子群には有意な発現量の差異は存在しなかった。両集団の F1 交雑個体を用いた ASE 解析から、上記の発現量差異を示す遺伝子群のほとんどは trans 制御であることが判明したが、脳でのニューロステロイド合成に関わることが知られている 2 つの酵素遺伝子に cis 変異の存在が見出された。これらの結果は、これら集団間における当該行動発現の差異には、局所的なニューロステロイド合成が関与している可能性を示している。つまり、ハリヨクレードでは精巣におけるアンドロゲン合成能の変異が当該行動発現の変異に関与しているのに対し、本研究で用いたイトヨクレードでは脳における局所的なニューロステロイド合成能の変異が関与している可能性が考えられ、収斂進化に背後にある内分泌遺伝機構の多様性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎遥・森誠一・岸田治・小北智之
2. 発表標題 日本産淡水型イトヨ集団における攻撃的縄張り行動発現の変異特性
3. 学会等名 2022年度日本魚類学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎遥
2. 発表標題 多様な淡水型イトヨ集団を用いた縄張り行動進化研究
3. 学会等名 第39回個体群生態学会大会・大会企画シンポジウム「現代河川生態学研究」
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎遥・森誠一・岸田治・三品達平・小北智之
2. 発表標題 繁殖縄張り行動発現の収斂進化における多様な内分泌遺伝基盤
3. 学会等名 第71回日本生態学会大会
4. 発表年 2024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
研究分担者	平瀬 祥太郎 (Hirase Shotaro) (90635559)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教 (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
---------	---------