

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02566

研究課題名(和文) 比較ゲノミクスと進化発生学から紐解く機械的生殖隔離の強化と種分化

研究課題名(英文) Speciation via reinforcement as revealed by evolutionary developmental biology and comparative genomics

研究代表者

高見 泰興 (Takami, Yasuoki)

神戸大学・人間発達環境学研究科・教授

研究者番号：60432358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,700,000円

研究成果の概要(和文)：雌雄交尾器形態に生殖的形質置換が見出されているイワキオサムシとマヤサンオサムシについて、種間交尾実験により、生殖的形質置換に関わる強化自然淘汰を検出した。また、交尾器形態分化の背景にあるゲノム分化の解析のため、合計25個体のゲノムリシーケンスデータを取得し、解析を進めつつある。

マヤサンに近縁で巨大な交尾器を持つドウキョウオサムシについて、マイクロCTにより雌雄交尾器形態の形成過程を解明した。また、形態測定と統計解析により、交尾器の巨大化に関わる制約を検討した。交尾器形態の発生過程に関わる遺伝子発現を解析するための、in situ hybridizationのプロトコルを完成させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生物多様性を創出する根源的過程である種分化に関わる、交尾器形態の分化、多様化の進化機構と、その背景にある遺伝発生学的基盤を明らかにしようとするものである。材料であるオサムシは昆虫の中でも進化生態学的研究が進んでおり、一般にも良く知られている生物であるため、このような対象についての新たな知見は、社会全体の生物に対する知的好奇心を高め、自然環境に対する認識や理解を涵養することにつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：We detected reinforcing selection possibly responsible for reproductive character displacement between *Carabus maiyasanus* and *C. iwawakianus* based on interspecific mating experiments. For analyzing genomic differentiation concerning such a morphological differentiation, we sequenced genomes of a total of 25 individuals throughout the distributional ranges. We analyzed morphogenetic processes of extremely enlarged male and female genitalia of *C. uenoi* by micro-CT analyses. In addition, we examined constraints on genital exaggeration in *C. uenoi* by morphometric and comparative analyses. To reveal the genes responsible for such morphological differentiation and enlargement in the genitalia, we developed a protocol for in situ hybridization that is optimized for ground beetles.

研究分野：進化生態学

キーワード：エボデボ 交尾器 種分化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

種分化は、生物多様性を生み出す根源的過程である。今世紀に入り、種分化を加速する原動力が、自然淘汰や性淘汰によって生じる表現型の多様化であることが実証されつつある。現在は、マクロレベルの力学(淘汰、遺伝子流動)とマイクロレベルのメカニズム(遺伝発生基盤)を統合し、種分化現象の多角的、総合的理解を目指す段階にある。

交尾器形態の多様化は、雌雄交尾器の形態的不適合(機械的生殖隔離)を通じて種分化を推進する可能性がある。動物の交尾器形態は種間で多様であるため、交尾器形態の分化による種分化は普遍的であると信じられてきたが、実証例が少なく、20世紀末には否定的にとらえられていた。しかし近年、申請者らの研究を含む証拠が蓄積されつつあり、再評価の気運が高まっている。申請者らは、機械的生殖隔離の先駆的研究対象であるオオオサムシ類を用い、交尾器形態の分化から種分化に至るまでの進化過程について、多角的な研究を行ってきた。オオオサムシ類の雌雄交尾器は錠と鍵のように対応し、形態の異なる種間・亜種間の交尾が物理的に妨げられることが、すでに実証されている。

過去20年ほどの間に、オオオサムシ類の交尾器形態の進化・多様化をもたらす性淘汰に関する研究が多く行われ、性淘汰による形態の多様化機構と雌雄間の共進化機構についての理解が進んだ。申請者はこれまで、精子競争による性淘汰が交尾器形態の多様化に関連することを明らかにした。さらに、雌雄交尾器の共進化が、雄による雌の産卵活性の操作によって生じる性的対立によって駆動されることを見いだした。

交尾器形態は、種間交雑を避けるように分化する可能性もある。申請者らは、交尾器形態が異なる姉妹種マヤサンオオオサムシとイワワキオオオサムシの側所的な接触域で、種間の遺伝子流動が生じながらも、マヤサンの交尾器サイズが増加し、イワワキとの種間差が増加する生殖的形質置換を発見した。サイズ増加の程度は集団ごとに異なり、マヤサンの一系統であるドウキョウオオオサムシは、巨大化した交尾器のためイワワキと交配せず共存している。よってこれらの集団間変異は、種分化が完成に至る各段階に相当すると考えられた。これは、交雑に対する負の自然淘汰が、交尾器形態の種間差を増加させ、種間の生殖隔離を強化した可能性を示す。

2. 研究の目的

本研究は、(1) 生殖隔離が不完全な種間の交雑において生じる自然淘汰と遺伝子流動が、表現型の分化とゲノムの分化、すなわち種分化の過程にどのように影響するのかを解明し、(2) 表現型の分化の背景にある遺伝発生学的要因を解明することで、表現型の適応的な分化が駆動する種分化機構を多角的、総合的に理解することを目的とする。

申請者を含む研究グループは、複数の近縁種ペアの比較ゲノミクス研究によって、交尾器形態の種間差に関わる遺伝領域を特定し、ゲノム分化のパターンを解明した。その結果、交尾器形態の種間差に関わる遺伝領域の分化は大きいことが、ゲノムのごく一部であることが、それ以外の遺伝領域は遺伝子流動により種間で共有されやすいことを示した。このような、淘汰と遺伝子流動が拮抗しながら進む種分化過程を理解するために、(1) 種間の接触域において、交尾器形態とその遺伝領域の分化をもたらす淘汰は、どのようなものか、(2) 種分化が完成するまでの過程で、ゲノムレベルの遺伝的分化は、交尾器形態に関わる一部の領域からそれ以外の領域へとどのように広がるのか、を問う。

交尾器形態の発生基盤について、近縁種間の多様化に注目した研究はこれまでほとんどなかった。そこで申請者らは、交尾器形態が異なる近縁種のマイクロCTを用いた形態形成過程の解析により、雄交尾器では形態形成の開始時期の差(異時性)が、雌交尾器では形態の成長速度の差が種間の形態差をもたらすことを明らかにした。また、上の比較ゲノミクス研究により、雌雄交尾器の種間差に関わるいくつかの候補遺伝子を特定した。以上の発生過程と候補遺伝子の情報を統合し、交尾器形態の種間差が生じる発生過程に、候補遺伝子の発現タイミングと発現強度の違いがどのように関与しているのか、を問う。

3. 研究の方法

種間交雑に伴う形態とゲノムの分化機構の解明

-1 交尾器形態の分化をもたらす淘汰の検出:

マヤサンの交尾器形態変異に見いだされた生殖的形質置換を対象に、これをもたらした自然淘汰の検出を試みる。イワワキと分布を接するマヤサン集団の雌雄交尾器は、異所的に分布する集団に比べて長い。特に、長い交尾片は一部が膜状化して柔軟性が高まるため、別種の雌交尾器を感知する「探針」である可能性がある。対応する雌の長い膈盲嚢も、交雑コストを低減する機能をもつ可能性がある。これを以下の実験により検証する。

(1) マヤサン8集団(イワワキと分布を接する4集団、異所的分布の2集団)とイワワキ1集団(マヤサンの変異に注目するため統一)から成虫を採集。

(2) 正逆の種間交尾において、マヤサン個体について時間的コスト(交尾時間)、物質的コスト(精包重量)、生存・繁殖コスト(雌雄交尾器の破損)を記録。

(3) マヤサン交尾器の形態変異を定量．

(4) 各交雑コストを目的変数、交尾器形態を説明変数とする選択勾配分析を行い、結果を集団間で比較する．

交尾器形態の生殖的形質置換をもたらした自然淘汰は、交尾器が長いほど交雑コストを低減するような形で検出されると期待される．また、交尾器が長い接触集団ほどより強い淘汰がはたしている、あるいは結果的に交雑コストが低下している可能性がある．

-2 ゲノム分化過程の解明：

申請者は比較ゲノム研究により、分布を接する種間の遺伝的分化が、ゲノム領域ごとに大きく異なることを示した．これは、分化を促進する淘汰と、分化を減少させる遺伝子流動のバランスが、ゲノム領域ごとに異なるためであると考えられる．淘汰と遺伝子流動のバランスの中でゲノム分化が進行する過程は、淘汰による分化領域の近傍からゲノム全体へと、連鎖によって分化が広がる可能性や、直接淘汰の働かない他領域との間の相互作用が、より複雑なゲノム分化をもたらす可能性などがある．これらの可能性を、集団ゲノミクス解析により検証する．

(1) マヤサンとイワキの分布域（異所的集団と接触集団）を網羅するようにサンプリングし、次世代シーケンサーによるゲノムリシーケンスを行う．

(2) ドウキョウの既知ゲノム配列にマッピングし、個体ごとのドラフトゲノムを構築すると共に、一塩基多型（SNP）をリストしたデータを取得する．

(3) マヤサン集団とイワキ集団、加えて、マヤサン接触集団とそれぞれ分布を接するイワキの集団をペアとし、FST によるゲノム領域ごとの遺伝的分化の評価と、異所的分布集団を加えたARGweaver 解析によるゲノム領域ごとの種の単系統性の評価により、淘汰により分化している領域と、遺伝子流動により種間で共有されている領域を識別する．

以上の結果を、異所的集団～接触集団～共存集団の間で比較し、交尾器形態の種間差（＝生殖隔離）が増加するにしたがって、遺伝的分化がゲノム内にどのように広がるかを可視化することで、生殖隔離の強化を伴う種分化過程におけるゲノム分化動態を解明する．

遺伝発生の基盤の解明

-1 マイクロ CT を用いた交尾器形態の発生過程の解明：

交尾器形態の種間差が形成される発生過程を解明する．雌雄交尾器形態が異なる姉妹種イワキとマヤサンについては、解析がすでに完了し論文発表済みである．ここでは、この確立した手法に基づき、マヤサンの一系統であり巨大な交尾器を持つドウキョウについて、さらに解析する．

(1) 採卵、幼虫を飼育し、前蛹と蛹の隔日齢サンプルを得る（7段階、雌雄各3サンプル）．

(2) FAE で固定、ヨウ素染色の後に X 線 μ CT で撮影．

(3) ソフトウェア Amira で立体構築し、発生段階間で比較することで、雌雄交尾器（特に、機械的生殖隔離に関わる雄の交尾片と雌の腔盲嚢）の形態形成過程を解明する．

イワキと比較して、マヤサンでは交尾片の発生タイミングが早まり、腔盲嚢の成長率が増加することで、雌雄の長い交尾器の発生を可能にしていた．ドウキョウは極端に大きな交尾器を持つため、これらの要因に加え、甲虫の角の発生に見られる蛇腹構造のような別の要因が関与している可能性がある．以上の結果を元に、交尾器形態の種間差に関わる発生過程を把握すると共に、次の遺伝子発現解析の対象となる発生段階を特定する．

-2 in situ hybridization による候補遺伝子の発現解析：

交尾器形態の種間差に関わる発生過程における、候補遺伝子の関与を明らかにする．これまで、雌雄交尾器形態の種間差に関与する可能性が高い6つの遺伝子（pns, Klp61F, ZFYVE1, TMEM53, dpp, rn）が見いだされている．また、本計画のゲノム分化過程の解析により、新たな候補遺伝子が見つかる可能性もある．交尾器形態が分化する段階における候補遺伝子の発現を、in situ hybridization により検出する．

(1) 各発生段階の蛹をパラホルムアルデヒドで固定．交尾器部位を摘出、洗浄し、サンプルとする（上記3種、2～3発生段階（-1の結果に依存）、雌雄各3サンプル）．

(2) DIG 標識した候補遺伝子のプローブ（配列は既知）を用いて、ターゲットの mRNA にハイブリダイズ．免疫染色により可視化．

(3) 各遺伝子の発現の有無を確認する．発現があれば、発現量と部位を発生段階間で比較し、遺伝子発現の時空間動態を明らかにすると共に、形態の種間差との関連を検討する．

交尾器形態の種間差をもたらす発生過程に関わる遺伝子は、種によって異なる形態形成のタイミングに合わせて発現する、あるいは、大きな交尾器を持つ種では発現量が多くなると期待される．

4．研究成果

種間交雑に伴う形態とゲノムの分化機構の解明

-1 交尾器形態の分化をもたらす淘汰の検出：

種間交雑実験の結果、接触集団のうち最も長い交尾片をもつ2集団と、異所的集団の1集団において、長い交尾片ほど生存・繁殖コストを低下させるような自然淘汰が検出された（図1）．

また、接触集団のうち最も長い交尾片をもつ2集団と、異所的集団の2集団において、長い交尾片ほど時間的コストを低下させるような自然淘汰が検出された（図1）．これは、交尾器

形態の形質置換をもたらす強化淘汰を検出した初めての例である。

一方、雄交尾器形態変異と物質的コスト（精包サイズ）との関係、ならびに雌交尾器形態変異と各種コストの間には、有意な関係は見出されなかった。よって、マヤサンオサムシで検出されている雌雄交尾器形態の生殖的形質置換は、雄交尾器の進化が先行し、雌がそれに合わせて共進化することで生じたと考えられた。

以上の結果を、2024年度日本生態学会大会において発表した。引き続き論文の執筆を進めている。

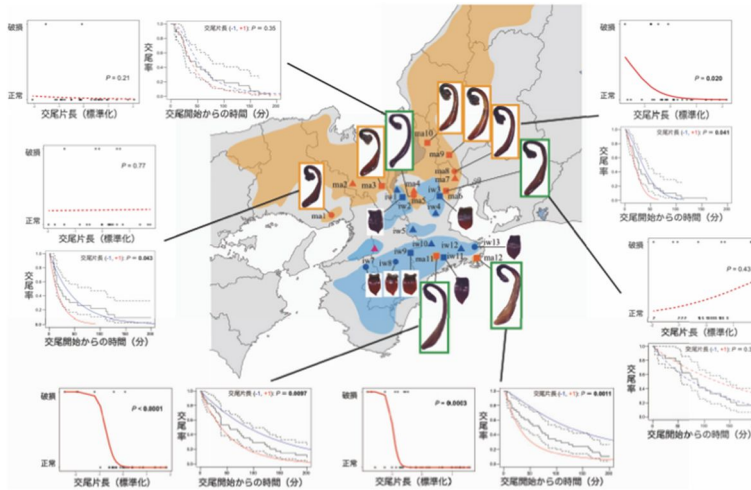


図1. マヤサンオサムシ（オレンジ）とイワキオサムシ（青）の分布と交尾片と地理的変異（オレンジ枠は異所的集団、緑枠は接触集団）。各グラフは、種間交尾（マヤサン雄×イワキ雌）における雄交尾器形態（交尾片長）の変異と生存・繁殖コスト（交尾片の破損）と時間的コスト（交尾時間）との関係を示す。

種間交尾コストの集団平均を比較したところ、雄交尾器

サイズの増加にともなって種間交尾コストは単調に減少するわけではなく、中間的なサイズの集団ではコストがむしろ増加していることが見出された（図2）。これは、生殖的形質置換の進化過程には、「適応の谷」が存在することを示唆する。

また、雌交尾器サイズと平均コストの関係では、交尾器サイズの増加にともなうコストの現象は見られなかった。これは、雌交尾器形態変異に強化淘汰が検出されなかった事実と整合的であり、雌雄交尾器形態の生殖的形質置換は雌主導で生じたわけではないことを補強するものである。

以上の結果は、Nishimura et al. (2023)として Biological Journal of the Linnean Society に発表済みである。

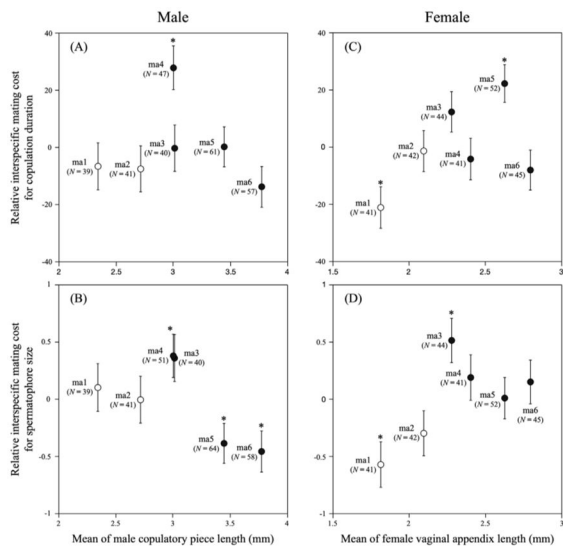


図2. マヤサンオサムシ各集団の雌雄交尾器サイズの平均と、イワキオサムシとの種間交尾における時間的コスト（A, C）と物質的コスト（B, D）との関係（Nishimura et al. 2023）。

加えて、生殖的形質置換によって生じたマヤサンオサムシ種内の交尾器形態変異が、異所的集団間の機械的生殖的隔離として働いていることを、交尾実験により明らかにした。これは、他種との接触による生殖的隔離の強化が、種内変異として2次的に派生して更なる種分化を引き起こすという、cascade reinforcement hypothesis を支持する結果である。これを、Xia et al. (2023)とし

て、Journal of Evolutionary Biology に発表した。

-2 ゲノム分化過程の解明：

これまで、マヤサンオサムシ 12 集団（12 個体）、イワキオサムシ 13 集団（13 個体）からゲノムリシーケンスデータを得た。それぞれのデータは 10Gb 程であり、オサムシのゲノムサイズ（200Mb）から判断すると、十分な精度で広範囲のデータが得られていると考えられる。これを元に、現在解析を進めつつある。

遺伝発生の基盤の解明

-1 マイクロ CT を用いた交尾器形態の発生過程の解明：

巨大な交尾器を持つドウキョウオサムシの雌雄交尾器形態の形成過程を、 μ CT により明らかにした（図3, 4）。雄交尾器の発生開始は、小さな交尾器を持つ姉妹種マヤサンオサムシと同

様、2~4日目であり、発生の前倒しは巨大化に寄与していなかった（図5）。また、ドウキョウの蛹期はマヤサンよりも1日長い、この期間の交尾片の成長はほとんど見られず、発生期間の延長も巨大化には寄与していなかった。一方、ドウキョウの交尾片の成長率はマヤサンよりも有意に高く、高い成長速度が巨大化に寄与していることが明らかとなった。

興味深いことに、蛹化後8日目には交尾片サイズが外側の陰茎サイズに迫り、その際に交尾片が折りたたまれることが見出された（図3, 5）。その後、陰茎の成長にともなって交尾片も並行的に成長した。さらに、他の種とは異なり、羽化時に雄交尾器サイズが大きく増加した。これらは、雄交尾器の大型化に対する空間的制限の元で、それを回避するような発生過程が生じていることを示唆する。

雌交尾器（膈盲囊）の発生は、先行研究におけるマヤサン、イワワキと類似したものであったが、8日目以降に著しく成長し、折畳み構造が形成された（図4）。結果として膈盲囊のサイズを定量することが困難となったため、量的比較はできなかった。これらの結果は、Terada et al.として Evolution & Development に投稿し、改訂中（minor revision）である。

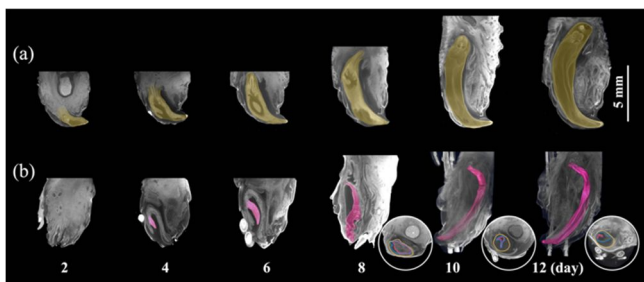


図3. ドウキョウオサムシの雄交尾器の形態形成過程。陰茎(a)と交尾片(b)を示す。

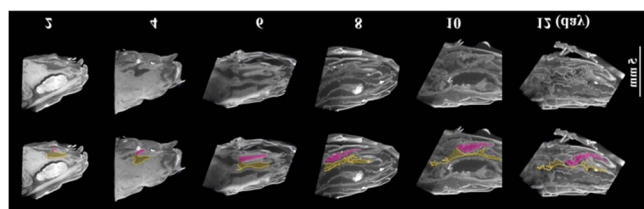


図4. ドウキョウオサムシの雌交尾器の形態形成過程。黄色は交尾囊、ピンクは膈盲囊を示す。

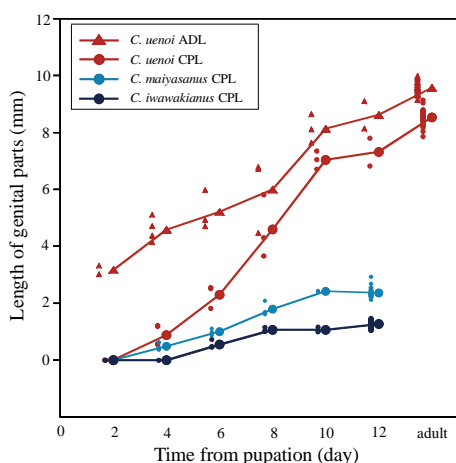


図5. ドウキョウオサムシ(*C. uenoi*)の陰茎長(ADL)と交尾片長(CPL)の成長と、近縁種マヤサンオサムシ(*C. maiyasanus*)とイワワキオサムシ(*C. iwawakianus*)の交尾片長の成長との比較。

また、ドウキョウ、マヤサン、イワワキの雄交尾器サイズと他の外部形態サイズを測定し、サイズ間の相関関係の解析から、交尾器の巨大化に関わる機能的制限、遺伝的制限、空間的制限の有無を種間比較により解析した。その結果、ドウキョウの巨大な雄交尾器は、機能的制限の緩和によって進化した結果、空間的制限に達していることを明らかにした。この結果は、Terada et al. (2023)として、Entomological Science に発表し、2024年の優秀論文賞を受賞した。

-2 in situ hybridization による候補遺伝子の発現解析：

オサムシの蛹は大型であり、試薬の浸潤などの条件を検討する必要があること、また固い外骨格をもつ昆虫は切片化がしばしば難しいこと、さらに、オサムシの蛹は強い自家蛍光を発すること、等の点を検討しながら、in situ hybridizationのプロトコルを検討、開発し、完成させた。解析用の蛹の隔日サンプルを、イワワキ、マヤサン（異所的、接触、各1集団）、ドウキョウについて3繰り返すことなく作成、固定済みであり、解析を始められる状態までこぎ着けた。

対象とする候補遺伝子の検討のため、既存のトランスクリプトームデータを統合し、ローカルでBLAST検索できるデータベースを構築した。これらを用いて、候補遺伝子の発現解析を進めつつある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Xia Tian, Nishimura Taira, Nagata Nobuaki, Kubota Kohei, Sota Teiji, Takami Yasuoki	4. 巻 36
2. 論文標題 Reproductive isolation via divergent genital morphology due to cascade reinforcement in <i>Homopterus</i> ground beetles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Evolutionary Biology	6. 最初と最後の頁 169 ~ 182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jeb.14116	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 Nishimura Taira, Terada Karen, Xia Tian, Takami Yasuoki	4. 巻 138
2. 論文標題 Relationships between reproductive character displacement in genital morphology and the population-level cost of interspecific mating: implications for the Templeton effect	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological Journal of the Linnean Society	6. 最初と最後の頁 14 ~ 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolinnean/blac126	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 Terada Karen, Takahashi Sougo, Takami Yasuoki	4. 巻 26
2. 論文標題 Functional, genetic, and structural constraints on the exaggeration and diversification of male genital morphology in <i>Homopterus</i> ground beetles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Entomological Science	6. 最初と最後の頁 e12538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ens.12538	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 Nishimura Taira, Nagata Nobuaki, Terada Karen, Xia Tian, Kubota Kohei, Sota Teiji, Takami Yasuoki	4. 巻 199
2. 論文標題 Reproductive Character Displacement in Genital Morphology in <i>Homopterus</i> Ground Beetles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The American Naturalist	6. 最初と最後の頁 E76 ~ E90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1086/717864	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6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高見泰興
2. 発表標題 性的対立をもたらす交尾器形態が野生個体群動態と分布域形成におよぼすインパクト
3. 学会等名 日本進化学会第23回大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村太良, 高見泰興, 井上真理
2. 発表標題 生殖的形質置換に伴う雄交尾器の柔らかさの進化
3. 学会等名 日本生態学会第69回全国大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺田夏蓮, 高橋颯吾, 高見泰興
2. 発表標題 雄交尾器の巨大化に伴うボディパーツ間の相関構造の変化
3. 学会等名 日本生態学会第69回全国大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高見泰興
2. 発表標題 異種と対立とカタチ：種間相互作用と性淘汰が織りなす交尾器形態の多様化
3. 学会等名 日本生態学会第69回全国大会 自由集会「一寸の虫にもラブの魂 IV（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古本知奈美, 寺田夏蓮, 高見泰興
2. 発表標題 オオオサムシ亜属における交尾器の巨大化に関わる進化発生的要因
3. 学会等名 日本生態学会第71回全国大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 西村太良, 寺田夏蓮, 井上真理, 高見泰興
2. 発表標題 交尾器形態の生殖的形質置換：壊れにくく異種を識別しやすい柔らかい雄交尾器の進化
3. 学会等名 日本生態学会第71回全国大会
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	小笠原 道生 (Ogasawara Michio) (00343088)	千葉大学・大学院理学研究院・准教授 (12501)	

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