

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15143

研究課題名（和文）メダカ黒色婚姻色の多様化をもたらす性的葛藤遺伝子の同定

研究課題名（英文）Identification of the sexually antagonistic gene responsible for diversified black nuptial coloration in medaka fishes

研究代表者

安齋 賢 (Ansai, Satoshi)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：20779467

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：性的二型の多様化をもたらす性的葛藤遺伝子の実体を同定し、その進化に関わる詳細な遺伝機構の解明を目的とし、インドネシア・ポソ湖に固有のメダカ科魚類3種をモデルとして、多様化した黒色婚姻色の原因遺伝子および性染色体の解析を行った。種間雑種家系を用いたQTL解析から、黒色婚姻色に関連する1遺伝子座を同定した。また、全ゲノム解析により3種のうち2種の性染色体を同定した。これらの結果から、3種間で性染色体が異なること、発見した黒色婚姻色関連遺伝子座は常染色体上に存在することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ポソ湖固有の3種のメダカ科魚類は、異なる性染色体を有することが明らかとなった。このことは、先行研究により示唆されている、種分化における性染色体転換の重要性を強調する研究成果である。さらなる解析により、黒色婚姻色の原因遺伝子や性決定遺伝子の実体が解明できれば、性染色体転換と種分化がどのように関連しているのか、その詳細を様々なレベルで解明することが可能となる。

研究成果の概要（英文）：To identify the sexual conflict gene responsible for the diversification of sexual dimorphism and to elucidate the detailed genetic mechanism involved in its evolution, we analyzed the causative gene for the diversified black nuptial coloration and sex chromosome turnover among three species of medaka fishes endemic to Lake Poso, Indonesia. QTL analysis using interspecific hybrid families revealed one locus associated with black nuptial color. Whole genome sequencing also revealed sex chromosomes in two of the three species. These results indicate that the sex chromosomes differ among the three species and that the locus related to black nuptial color is located on an autosomal chromosome.

研究分野：進化遺伝学

キーワード：性的葛藤 性淘汰 性染色体 性的二型 メダカ 古代湖 種分化 ゲノム解析

### 1. 研究開始当初の背景

性的二型とは同種の雌雄間に見られる多型現象であり、雌雄間で表現型の最適値が異なる場合に進化する (Darwin 1871; Anderson 1994)。この時、雌雄がゲノムの大部分を共有することによる遺伝相関のため、性的二型の原因遺伝子・アレルにおいて雌雄間の利害対立が生じる (Cox & Casbeck 2009 *Am. Nat.*)。このいわゆる性的葛藤状態を解消し、原因アレルを性特異的に発現させる遺伝機構として、性染色体への連鎖 (Rice 1984 *Evolution*; Mank 2009 *Am. Nat.*) や性特異的な発現をもたらす調節領域変異 (Ellergren & Parsch 2007 *Nat. Rev. Genet.*; Williams & Carroll 2009 *Nat. Rev. Genet.*) の重要性が示唆されてきた。しかしながら、性的葛藤形質の原因遺伝子 (性的葛藤遺伝子) の実体を同定し、当該遺伝子が本当に性的葛藤状態にあるのかどうか、また性的葛藤状態がどんな遺伝機構によって解消されて性的二型の多様性が生じるのか、これらの詳細な分子基盤を解明した例は存在しない。

東～東南アジアに生息するメダカ科魚類のうち、インドネシア・スラウェシの固有種群は、急速に種分化し、特にオスの二次性徴形質が顕著に多様化したグループである (Mokodongan & Yamahira 2015 *Mol. Phyl. Evol.*)。このうちスラウェシ島中部のポソ湖には、ニグリマスメダカ、オルソグナサスメダカ、ネブローサスメダカの3種が生息しており、それぞれ異なる婚姻色パターンを有している (図1)。黒色の発現に顕著な性的二型のあるニグリマ

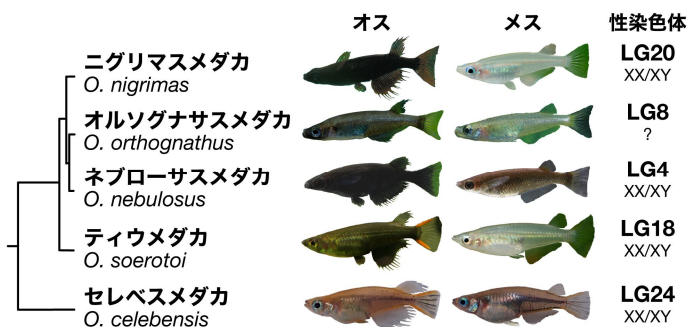


図1 ポソ湖固有種群の黒色婚姻色と性染色体転換

スメダカおよびオルソグナサスメダカでは黒色が性的葛藤形質である一方、雌雄ともに黒いネブローサスメダカではメスの適応度が変化して性的葛藤形質ではなくなり、その違いが黒色婚姻色の種間多様性が生み出したことを示唆する。これに加えて申請者は、Pool-seq による予備的なゲノムワイド性連鎖解析から、3種が異なる独自の性染色体を有しておりその全てが外群と異なる新規性染色体であることを明らかにした (図1; Ansai et al. unpublished)。理論研究 (von Doorn & Kirkpatrick 2007 *Nature*) から示唆される通り、新たに生じる性的葛藤とその解消が、ポソ種群における頻繁な性染色体転換の推進力である可能性がある。これらの点からポソ固有種群は性的葛藤と性的二型進化の関係を探るのに最適な研究モデルであるが、これら3種の婚姻色の多様性に関わる原因遺伝子は同定されておらず、その遺伝子が雌雄の適応度に与える影響やその種間差、性染色体転換との関係性は全く明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、ポソ湖固有のメダカ種群3種が示す多様な黒色婚姻色を対象に、その形質が本当に性的葛藤状態にあるのか、またその性的葛藤状態がどんな遺伝機構で解消されるのか、という疑問について、主にその原因遺伝子の同定と機能解析により解明することを目指す。まず、3種間の性染色体転換の詳細を明らかにするために、続いて3種それぞれを親種とした複数の種間交雑 F<sub>2</sub> 家系を作り出し、QTL 解析や比較トランスクリプトーム解析、性染色体上候補遺伝子の機能解析から、3種に特有な婚姻色パターンの発現を担う原因遺伝子候補を同定する。遺伝子が同定できた場合、ゲノム編集による候補遺伝子の改変により黒色婚姻色の発現における機能を解明した上で、同定した原因遺伝子が適応度に及ぼす影響の性差や種差の解明を進める。

### 3. 研究の方法

種間交雑家系や親種純系の繁殖・育成に時間を要したため、研究期間内には以下の2つの実験を実施した。

#### (1) 全ゲノムシーケンスデータを用いた性染色体の同定

まず、ポソ湖固有種3種の野生個体のうち、雌雄各10個体から個体別にゲノムDNAを抽出し、各サンプルを等量ずつ混合した。得られた Pool DNA サンプルを鋳型として、NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina でライブラリー調製後、HiSeq X によりシーケンスを行い、ゲノム30倍程度のデータを得た。得られたリードは BWA MEM によりセレベスメダカ (*Oryzias celebensis*) の参照ゲノム配列にマッピングした後、PSASS v3.1.0 を用いて雌雄間の遺伝的分化の程度 (F<sub>ST</sub>) や雌雄特異的な SNP の数を推定した。この時、ゲノムを複数の異なる幅 (200-kb, 100-kb, 50-kb, 20-kb, 10-kb) のウィンドウに区切り、遺伝的分化や SNP 数の多いウィンドウ (上位 0.5% に位置するもの) の数をカウントし、他の染色体と比べて分化ウィンドウ数が有意に多い染色体を各種の性染色体とした。

続いて、別プロジェクトで取得した、ポソ湖固有種3種野生個体の個体別全ゲノムシ

ーケンスデータを用いたゲノムワイド関連解析を行い、性染色体の同定を試みた。ニグリマスメダカ（雄 10 個体、雌 20 個体）、オルソグナサスメダカ（雄 15 個体、雌 17 個体）、ネブローサスメダカ（雄 20 個体、雌 11 個体）それぞれの全ゲノムシーケンスデータを新規に作製したネブローサスメダカの参照ゲノム配列にマッピングし、elprep で多型情報を取得した後、GEMMA によるゲノムワイド関連解析を実施した。

#### (2) 量的遺伝子座解析による黒色婚姻色の原因遺伝子座同定

オルソグナサスメダカの雌 1 個体とネブローサスメダカの雄 1 個体からなる F<sub>2</sub> 家系を作出し、125 個体（雄 40 個体、雌 85 個体）の写真から体色表現型を取得した。具体的には、明るい・中間・暗いの 3 段階に分けた上、3 つそれぞれを明るいと暗いに分けた計 6 グループに分け、その暗さ指数 1 から 6 を表現型数値として用いた。各個体の遺伝子型は MAAS 法によって取得し、ネブローサスメダカの参照ゲノム配列を用いて SNP 情報を取得した。連鎖地図作成および QTL 解析は R/qtl を用いて実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 全ゲノムシーケンスデータを用いた性染色体の同定

はじめに実施した Pool-seq 解析では、有意に雌雄間の遺伝的分化が見られる染色体が検出できなかった (Ansai et al. 2022 *J. Evol. Biol.*)。予備実験との結果の違いは、統計的に有意に多いウィンドウで雌雄間の遺伝的分化が見られる染色体を性染色体と定義したため、分化領域が小さい(連鎖不平衡が低いままの)性染色体の検出がうまくできなかったことにより生じたと考えられる。

より小さな分化領域も含め、高精度に性染色体の候補領域を検出するため、個別に取得した全ゲノムシーケンスデータを用いたゲノムワイド関連解析を実施した。その結果、ネブローサスメダカではミナミメダカの 4 番染色体に相当する領域が、ニグリマスメダカではミナミメダカの 22 番染色体に相当する領域が、それぞれ性染色体であることが明らかとなった。一方で、オルソグナサスメダカでは有意に性と相関する SNP は検出できなかった。現在、これらの領域の中で、性決定遺伝子の候補となる遺伝子の探索や、QTL 解析等他の手法での絞り込みを進めている。

#### (2) 量的遺伝子座解析による黒色婚姻色の原因遺伝子座同定

体色表現型について、性を interactive covariate として QTL 解析を行った所、 $P < 0.1$  の suggestive QTL がミナミメダカの 10 番染色体上に検出された。この染色体上に、既知のメラニン合成関連遺伝子を探索したが、有力な原因遺伝子候補は得られなかった。今後、さらなる詳細な表現型解析や、別家系データを用いた解析を行うことで、より説明力の高い QTL の同定を行い、原因遺伝子座の同定を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ansai Satoshi, Montenegro Javier, Masengi Kawilarang W. A., Nagano Atsushi J., Yamahira Kazunori, Kitano Jun	4. 巻 35
2. 論文標題 Diversity of sex chromosomes in Sulawesi medaka fishes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Evolutionary Biology	6. 最初と最後の頁 1751 ~ 1764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jeb.14076	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 Ansai Satoshi, Kitano Jun	4. 巻 377
2. 論文標題 Speciation and adaptation research meets genome editing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences	6. 最初と最後の頁 20200516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rstb.2020.0516	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 5件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Satoshi Ansai
2. 発表標題 The evolutionary basis of diversified sexually selected traits in Indonesian medaka fishes
3. 学会等名 日本発生物学会第55回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安齋 賢
2. 発表標題 メダカにおける遺伝子ノックイン・染色体編集技術の開発とその利用
3. 学会等名 日本動物学会 第93回 早稲田大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoshi Ansai
2. 発表標題 Toward understanding the genetic basis of phenotypic diversities of Sulawesian and Japanese medaka fishes
3. 学会等名 EMBL-EBI Training - Using fish models to explore the impact of Gene by Environment (GxE) 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安齋 賢, 山平 寿智, 北野 潤
2. 発表標題 インドネシアのメダカ科固有種群における性的二型多様化の分子機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoshi Ansai, Kawilarang W. A. Masengi, Kazunori Yamahira, Jun Kitano
2. 発表標題 Sex chromosome turnover in Sulawesian medaka fishes
3. 学会等名 ESEB Satellite Symposia 2021 - The remarkable diversity in the rate and mechanisms of sex chromosome evolution (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoshi Ansai
2. 発表標題 Genome editing reveals fitness effects of a gene for sexual dichromatism in Sulawesian fish
3. 学会等名 Japan-Norway Symposium on Fish Endocrinology and Genomics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 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
---------	---------