

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650162

研究課題名（和文） 行動特性の個体差を規定する遺伝的要因の同定と社会形成における生態学的意義の解明

研究課題名（英文） Identification of genetic factors that define behavioral differences, and study on their ecological significance for social formation

研究代表者

竹内 秀明 (TAKEUCHI HIDEAKI)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：00376534

研究成果の概要（和文）：行動の「個性」には、生後の環境だけでなく遺伝的要因も影響すると考えられている。しかし、責任遺伝子の同定や、行動の多様性を産み出す遺伝子基盤の解析はあまり進んでいない。本研究では種内の遺伝的多様性の高いメダカ (*Oryzias latipes*) を用いて、行動形質に関わる遺伝子座を探索した。視覚刺激依存の逃避様反応に系統差が見られたため、2つの近交系、HNI-II と HdrR-II に視覚刺激を呈示し、反応を比較した。その結果、HNI-II は HdrR-II に比べて反応率が高く、馴れも生じにくかった。2つの近交系間で F2 世代を作出し、量的形質遺伝子座 (QTL) 解析を行った結果、刺激への馴れにくさに関わる領域が 16 番染色体上に存在することが示唆された。近交系間の行動特性の違いは、行動の種内多様性を反映すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Intraspecific variety of behavioral properties is affected by not only postnatal environments, but also genetic factors. Little attention, however, has been paid on the genetic basis underlying intra-species behavioral difference. Medaka (*Oryzias latipes*) has high intraspecific genetic variety. We have searched for genetic loci related to behavioral traits, as there are some behavioral differences among medaka strains. Here we presented visual stimuli to two inbred strains, HNI-II and HdrR-II, and compared their responses. As a result, HNI-II showed higher response rate and lower adaptation than HdrR-II. Next, we performed quantitative trait loci (QTL) analysis with F2 individuals between HNI-II and HdrR-II. The result suggested the presence of “un-adaptivity” related loci on chromosome 16.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域，分科：脳神経科学，細目：神経科学一般

キーワード：社会性行動・メダカ・近交系

1. 研究開始当初の背景  
ヒトや高等霊長類、社会性昆虫の集団において明確な役割分担が生じることは古くから知られていたが、近年、鳥類や魚類の群においても役割分担が生じていることが分かっ

てきた。例えば、伝書鳩の群れの移動において、集団内に行動を率いるリーダーが存在する (Nature 464, 890-893, 2010)。またトゲウオでは「大胆な」個体と「臆病な」個体が存在し、両者をペアーにして採餌行動をする

と前者がリーダーになる傾向があることが示された (Current Biology 19, 248-252, 2009)。また役割の異なるペアで採餌を行うことで捕食リスクを下げて適応度を上げているという理論も提唱されている (Nature 423, 432-434, 2003)。しかしながら、行動特性の個体差を生み出す機構については全く分かっていない。

本研究では近交系メダカを用いて行動特性の個体差を生み出す遺伝的要因を同定し、社会的行動におけるその意義を解明することを目的とした。メダカは「メダカの学校」に代表される多彩な社会性行動が観察され、モデル生物として既に分子遺伝学的手法が確立されている。またメダカの群れを誘導する実験系 (PLoS ONE, 5 e11248, 2010) やメダカ脳の条件的遺伝子操作法が確立されている (FEBS letters. 584, 3545-3549, 2010)。

またメダカは 10 種類ほど近交系が整備されている。近交系は兄妹交配を繰り返すことにより作出される系統で、系統内の遺伝的背景がほとんど同一である。さらにメダカでは遺伝子マーカーが十分に整備されており、近交系間による形質の違いを定量化できれば、形質の差を生み出す遺伝子座を数ヶ月で同定可能であり (Genetics 177, 2379-2388)、メダカコンジュニック系統も約 1 年で作製可能である。研究開始当初、視覚刺激に対するメダカ集団の反応様式が二つの近交系間で顕著に異なることを見出していた。HNI-II 近交系では全ての個体が視覚刺激の 20 ミリ秒後に一斉に逃避様反応 (C スタート) するのに対して、HdrR 近交系では視覚刺激の 20 ミリ秒後に集団の一部の個体のみが反応し、別の個体が近接した個体の動きに数ミリ秒ほど遅延して次々に反応することで、集団として逃避様反応が誘導されることが分かった。よって HNI-II 近交系は全ての個体が一斉に逃避様反応を示すが、HdrR 系統は個体間相互作用を介して集団反応が誘起されることが示唆された。また一個体を用いて同様の実験を行うと HNI-II 系統は視覚刺激に対して高頻度で逃避様反応を示し、HdrR 系統はあまり反応を示さないことがわかった。このことから、HdrR 系統と HNI-II 系統は一個体レベルで外界刺激に対する逃避様反応の違いがあることが分かった。

## 2. 研究の目的

(1) 逃避様反応の系統差を生み出す遺伝子座を QTL 解析、メダカコンソミック利用、メダカコンジュニック系統作製より同定する。

(2) メダカの集団逃避行動の実験系を確立し、外的刺激に対して反応性の高い個体 (HNI 型) が見張りとして機能し、他の個体 (HdrR 型) は見張りの反応を感知して逃避する可能性を検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) 行動実験系

行動実験では、水槽上部に設置した液晶ディスプレイを用いて上方からメダカに映像を提示した。提示中のメダカの様子を下からビデオカメラで撮影し、各個体の反応を観察したところ、視覚刺激を提示した時に、メダカは C スタート (逃避様反応) を示す。自作動画解析ソフトを用いてメダカの位置と速度を計算し、速度変化のパターンと視覚刺激のタイミングから、逃避様反応を自動抽出して、その頻度を求めた。これまでに 5 つの近交系 (HNI-I, HNI-II, HdrR, Kaga, HB32D) を用いて、視覚刺激に対する反応頻度を定量化し、系統間の比較を行った。

### (2) HdrR 近交系と HdrR 近交系の F2 個体を用いた行動アッセイとジェノタイピング

ジェノタイピングには視覚刺激への反応性に差のある 2 つの近交系、HNI-II と HdrR 間で作出した F2 世代を用いた。HNI-II と HdrR 近交系はゲノムプロジェクトが終了しているので、2 系統間のゲノム配列を直接比較することも可能である。本研究課題ではまず 170 組のジェノタイピングマーカー

(Genetics 177, 2379-2388) を用いて目的ゲノム領域を約 30-40cM 程度に絞り込む。

次は目的遺伝子が特定の染色体に存在するか、またエピスタシスが存在するかを確認する目的で、染色体が系統間置換されたコンソミック系統を作製した。基礎生物学研究所ではコンジュニック系統を高速で作成できるように、HdrR 系統 (レシピエント系統) と HNI-II 系統 (ドナー系統) の戻し交配オスからジェノタイピング済の凍結精子ライブラリー (戻し交配の F1) が作製されている。本研究ではコンジュニック系統作製のために、凍結精子ライブラリーから目的ゲノム領域が HNI-II 系統になっている精子を選択して人工受精を行い、4 世代 HdrR 系統と戻し交配をした。

### (3) 集団行動実験

液晶ディスプレイに落下物や外敵を模倣した動画を提示したときに生起される集団逃避の様式を高速ビデオカメラで測定し、視覚対象物からの「逃避」を生起する行動実験系を確立を試みた。この行動実験系において、HNI-II, HdrR 近交系の混合集団を用いたときには HNI-II 近交系が「見張り」として最初に逃避し、HdrR 近交系が近接した個体に反応して逃避するか否かを検定する。また視覚対象物からの逃避成功率を定量化し、集団内における「見張り」の存在が集団レベルでの逃避を効率化しているか否かを調べる。

## 4. 研究成果

### (1) HdrR 近交系と HdrR 近交系の F2 個体を

## 用いた行動アッセイとジェノタイピングの結果

HNI-II 系統は視覚刺激に対して平均 8 割程度の頻度で逃避様反応を示すが、HdrR 系統では平均 1 割程度の頻度でしか反応しない。また繰り返しの視覚刺激で HNI-II 系統の反応頻度に変化はない。一方で HdrR 系統は最初の視覚刺激で 5 割程度の反応頻度を示すが、その後、急激に反応頻度が落ちるため、馴れが生じていると考えられる。

HNI-II と HdrR-II の交配により作出した F2 個体を用いて、QTL 解析により、「敏感さ」、「馴れにくさ」の指標と相関の高いゲノム領域を探索した。遺伝的距離算出プログラム Antmap を用い、ジェノタイピングデータから、マーカー間の組み換え価、遺伝的距離を算出した。得られた遺伝地図と、行動形質のデータから、QTL 解析用プログラム R/qtl 1.14-2 (<http://www.rqtl.org/>) で simple interval mapping (SIM) 法による解析を行った。

対数オッズ (LOD) スコアの有意水準は、各形質について、1000 回の permutation test から決定した。このテストでは、各個体の遺伝型-形質値データの組み合わせをランダムに入れ替え、各マーカーについて偽の LOD スコアを求める。全マーカー、全試行から得られた LOD スコアの分布において、上位 5% に含まれる値を、有意に相関が高いスコアとした。Permutation test に基づいて算出された LOD スコアの有意水準は、「敏感さ」については 3.75、「馴れにくさ」については 4.13 となった。QTL 解析の結果、「敏感さ」と有意に相関のある領域は検出されなかった。一方、「馴れにくさ」については、相関のある領域が 16 番染色体上に検出された。

HNI-II、HdrR-II 間の比較では、「敏感さ」、「馴れにくさ」の指標のいずれにおいても、有意な系統差が認められていた。しかし、「敏感さ」については、QTL 解析で有意な相関のある領域検出されなかった。2 系統間の遺伝的差異が大きいことから、影響力の小さな複数の責任遺伝子群が関与し、今回の解析ではそれらを検出できなかった可能性がある。

しかし、それ以上に大きな要因となっている可能性があるのは、形質の性差である。HNI-II、HdrR-II 両系統において、「馴れにくさ」の分布は雌雄で似ているのに対し、「敏感さ」は、メスがオスよりも高い値をとる傾向があった。今後、個体数を増やして検定を行い、形質値の性差を、HNI-II、HdrR-II において確かめる必要がある。

性差がある形質については、QTL 解析に用いる F2 を作出する際に、交配の組み合わせ (親系統の組み合わせ、F1 の組み合わせ) を考慮しなければならない。また、解析の際も、個体の雌雄を区別する必要がある。今回の実

験では、HNI-II オス×HdrR-II メス間の F1 から得られた F2 と、HNI-II メス×HdrR-II オス間の F1 から得られた F2 のみを用い、解析時にも個体の性別を考慮していない。このことが本研究で、「敏感さ」に関わる領域を検出できなかった主な要因であると推測している。

## (2) メダカコンソミック利用、メダカコンソミック系統作製

QTL 解析の結果、16 番染色体上に視覚刺激に対する「馴れにくさ」の指標と相関の高い領域が検出された。領域の幅は約 35cM であり、塩基配列の上では 18Mbp ほどに相当する。高速コンソミック作製法を用いて、16 番染色体が HNI-II 由来、それ以外の染色体は HdrR-II 由来になっているメダカ系統を作製した。今後このコンソミック系統を用いて行動実験を行い、エピスタシスがなかったことを確認する。

## (3) 集団行動実験

様々な視覚刺激を試したが、集団逃避行動を再現性よく誘導できる条件が見つからなかった。

## (4) 野生集団を用いた行動実験

HNI-II 近交系は新潟由来の野生メダカから作製されたが、同じ北日本の石川県由来 Kaga 近交系はより HdrR 型と近い反応特性を示した。さらに HNI-II 近交系と同じ新潟由来の野生メダカから作製された HNI-I 近交系は HNI-II 近交系との間に「敏感さ」及び「馴れにくさ」に顕著な差があり、HNI-II 近交系の行動特性は地域固有の行動特性でなく、集団内のサブポピュレーションの持つ行動特性を反映していることを示唆した。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

①発表者：坪子理美、新屋 みのり、木村 哲晃、末廣 勇司、奥山 輝大、島田 敦子、武田 洋幸、成瀬 清、久保 健雄、竹内 秀明  
発表課題：メダカ近交系を用いた視覚刺激依存の驚愕反応特性に影響する遺伝子の探索  
学会名：第 35 回日本神経科学大会

発表年月日：2012 年 09 月 18 日~2012 年 09 月 21 日

発表場所：名古屋国際会議場(名古屋)

②発表者：坪子理美、木村 哲晃、末廣 勇司、奥山 輝大、島田 敦子、武田 洋幸、成瀬 清、久保 健雄、竹内 秀明

発表課題：Searching for genes affecting visually-evoked startle response properties in Medaka (*Oryzias latipes*)

学会名：第 34 回日本分子生物学会年会

発表年月日：2011 年 12 月 13 日

発表場所：パシフィコ横浜 (横浜市)

③発表者：坪子理美、木村 哲晃、末廣 勇司、奥山 輝大、島田 敦子、武田 洋幸、成瀬 清、

久保 健雄、竹内 秀明

発表課題：Searching for genes affecting  
visually-evoked startle response properties  
in Medaka.

学会名：第 17 回小型魚類研究会

発表年月日：2011 年 9 月 9 日

発表場所：東レ研修センター（三島市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://researchmap.jp/Takeuchi/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹内 秀明 (TAKEUCHI HIDEAKI)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：00376534

### (3) 連携研究者

成瀬 清 (NARUSE KIYOSHI)

基礎生物学研究所・バイオリソース研究室・

准教授

研究者番号：50208089