

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770020

研究課題名(和文) 貝食性オサムシの形態分化を導くモジュール機構

研究課題名(英文) Modularity causing morphological divergence in the snail-feeding carabid beetles

研究代表者

小沼 順二 (Konuma, Junji)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：10613838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：巨頭型と狭頭型の形態分化をみせるマイマイカブリに焦点をあて、外部形態多様化の生態的メカニズムや形態の遺伝・発生基盤解明に取り組んだ。マイマイカブリの巨頭型と狭頭型変異は比較的少数の相加遺伝効果によって生じていること、また頭部と胸部の強い形質遺伝相関によって生じていることを示した。行動実験から中間型形態が巻貝採餌において不利な適応形質であることを実証し、マイマイカブリの形態分化において上記の遺伝・発生的特徴が重要な役割を果たしている可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Focusing on the stout-slender morphological divergence in *Damaster blaptoides*, we studied its ecological mechanisms and genetic and developmental bases. We found that relatively small number of additive genetic effects involved in the stout and slender morphologies and that the head and thoracic characters are genetically correlated. We also showed that intermediate morphology is maladaptive in the snail-feeding, and suggested that the above genetic and developmental structures have an important role in the morphological divergence of *D. blaptoides*.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、生態・環境

キーワード：モジュール 量的遺伝 遺伝相関 形態的統合性 トレードオフ 適応放散

1. 研究開始当初の背景

カタツムリを主な餌として利用するオサムシでは「狭頭型と巨頭型」とよばれる形態的2型が世界中にみられる。狭頭型とは頭部と胸部が細長く伸張化した形態型である一方で、巨頭型とは頭部・胸部が横に肥大化した形態型を示す。この形態的2型はカタツムリを主食とするオサムシでのみ見られ、ミミズや昆虫を主食とするオサムシでは報告例がない。なぜカタツムリ食のオサムシでのみこの形態的2型が生じているのだろうか。

申請者は代表的貝食オサムシであるマイマイカブリを用いたトレードオフが存在することを実証した。「狭頭型マイマイカブリは細長い頭部・胸部を殻に突っ込んでカタツムリを食べることができるが、大顎に力がないため殻を壊すことはできない。逆に巨頭型マイマイカブリは大顎に十分な力があり殻を壊してカタツムリを食べることができるが、太短い頭部・胸部を殻に突っ込む上では不利に働く。」このトレードオフが貝食性オサムシの形態分化を引き起こしているのだろうか(Konuma and Chiba 2007 *Am. Nat.*)。さらにマイマイカブリが生息する地域のカタツムリ種構成を調べた結果、大型カタツムリが生息する地域では狭頭型マイマイカブリが分布し、小型カタツムリが生息する地域では巨頭型マイマイカブリが分布する傾向を見つけた。それぞれの地域の巻貝サイズに適応進化することでマイマイカブリ形態の多様化が生じたと考えられる(Konuma et al. 2011 *Evolution*)。

2. 研究の目的

それでは、どのような遺伝・発生基盤によってこのような貝食性オサムシにみられる形態分化が生じているのだろうか。適応放散パターンをみせる生物分類群の適応形質に関する遺伝基盤解明は進化生態学における重要課題の1つといえる。本研究では、形態の遺伝・発生単位であるモジュールに焦点をあて、巨頭型マイマイカブリ亜種と狭頭型マイマイカブリ亜種間にみられる外部形態多様化の遺伝・発生基盤解明を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では巨頭型と狭頭型マイマイカブリ間の形態に関する遺伝・発生基盤解明を目的に、はじめに量的遺伝解析から遺伝基盤の概要を調べたのち、QTL マッピングから分子レベルでの遺伝基盤解明を行う。また中間型形態の適応度を調べるために雑種を用いた行動実験を行う。最後に RNA-seq から形態形成に関わる遺伝子の網羅的解明を試みる。

(1) 量的遺伝解析

巨頭型亜種であるサドマイマイカブリと狭頭型亜種であるアオマイマイカブリを掛けあわせ F1 集団を構築したのち、F1 集団を両親種と交雑させ戻し交雑集団を構築す

る。構築された全個体に関して頭部、胸部、腹部の長さや幅を計測する。形態変量は形態計測法によってサイズとシェイプ変量に分解でき、本研究では Burnaby 法を用いたサイズ調整を行い、シェイプ変量の代表値となり得る形態形質値を下記の解析に用いる。

形態的統合性(Klingenberg 2008)の有無を調べるために、戻し交雑個体を用いて各形態部位の長さや幅の相関関係を調べる。表現型相関を遺伝相関とみなす一方(Cheverud 1988)、F1 雑種集団の表現型分散を環境分散とみなし、戻し交雑集団と F1 雑種集団の分散の差を使って遺伝相関の推定を行う。

joint-scaling test を行い2亜種間の形態変異が相加遺伝効果や優性効果によって説明し得るかを検証する。また Castle-Wright 法から2亜種間の形質変異に関する遺伝効果の数の推定を行う。

(2) 連鎖解析と QTL マッピング

連鎖解析を行うための分離世代構築を目的にサドマイマイカブリ雌1個体とアオマイマイカブリ雄1個体を交雑させ、F1 雑種個体を構築したのち、得られた F1 雑種雌個体にアオマイマイカブリ雄親を戻し交雑させ、分離系統を構築する。両親と戻し交雑個体の精巣または生殖器筋肉をエタノール固定し、gDNA を抽出する。外部形態の頭部・胸部・腹部に関し長さや幅を計測する。

AFLP マーカー構築を目的に、抽出した gDNA を用いて8つの *EcoRI* プライマーと8つの *MseI* プライマーによって選択的増幅を行ったのち、ABI3130 によるシーケンスとジェノタイピングを行う。また5つの核マーカー (*Wingless*, *Enolase*, *PepCK*, *EF-1*, *Carab1*) を用いて同様にシーケンスし、これら AFLP マーカーと核マーカーを用いた連鎖解析を行う。

JoinMap version 4.1 を使って獲得した親個体と戻し交雑個体の遺伝子型の連鎖解析を行う。分離比検定後、LOD 値による遺伝分子マーカーの grouping によって連鎖群を決定したのち、regression mapping 法によって連鎖地図を構築する。

獲得した連鎖地図に対して形態値の QTL マッピングを行う。Composite Interval Mapping (CIM)法を使って連鎖地図上の位置を推定し、permutation test から LOD ピークの統計的有意性を検証する。

(3) 雑種の適応度

雑種個体の適応度を調べるために、上記実験で得られたマイマイカブリ個体を用いてカタツムリの採餌能力を調べる。トレードオフになっている2つの巻貝採餌行動(カタツムリの殻を壊す行動とカタツムリの殻に頭を突っ込む行動)のパフォーマンスを親種と F1・戻し交雑種間で比較する。

(4) RNA-seq

gene catalog 作製を目的に狭頭型亜種のマイマイカブリを用いた mRNA シーケンスを行う。アオマイマイカブリ雌個体を実験室内で産卵させ、様々に発生ステージの異なるサンプルを準備する。マイマイカブリは幼虫での雌雄判別が難しいため、蛹化期以降のサンプルに関してのみ雌雄を区別し、雌雄それぞれを別サンプルをして準備する。構築したサンプル個体の体全組織を用いて RNA の抽出を行う。

巨頭型マイマイカブリと狭頭型マイマイカブリ間の形態変異に関する候補遺伝子の絞り込みを目的に、アオマイマイカブリとサドマイマイカブリを用いた gene expression 実験を行う。上記した 2 亜種の雌個体を実験室内で産卵させ、前蛹と羽化時の 2 発生ステージに関する 3 繰り返し分のサンプルを構築する。得られたサンプルの頭部と胸部を別々の組織として RNA の抽出を行う。

、得られた抽出済み RNA を用いて、1) Poly-A 選択による mRNA の精製と断片化、2) 1st strand, 2nd strand の cDNA 化、3) アデニル酸による End-repair、4) アダプターライゲーションと Enrichment、を行いシーケンス用のライブラリーを作製する。qPCR 濃度測定値をもとに濃度を調製する。調整済みのライブラリーを Illumina 社の HiSeq2500 を用いてシーケンスする。

4. 研究成果

(1) 量的遺伝解析

交雑実験の結果、F1 雑種 106 個体、サドマイマイカブリ側の戻し交雑 54 個体、アオマイマイカブリ側の戻し交雑 77 個体を構築した。加えて、実験室内で両親種の飼育も行い、サドマイマイカブリ 196 個体、アオマイマイカブリ 75 個体を構築し、合計 508 個体のサンプルを解析に用いた。

主成分分析の結果、2 亜種のマイマイカブリには頭部と胸部形態に著しい遺伝変異が存在することがわかった。サドマイマイカブリは頭胸部が太く短い形態をしている一方で、アオマイマイカブリは頭胸部が細長い形態をしていた。2 亜種の掛けあわせから得られた F1 雑種は両親種の間形態をしており、戻し交雑集団は両親種と F1 雑種の間形態をしていた。さらに joint-scaling test の結果、相加遺伝効果と優性効果を含んだモデルが 2 亜種の外部形態変異を最もよく説明した。以上の結果、サドマイマイカブリとアオマイマイカブリ間の外部形態変異はポリジーン支配の遺伝基盤に起因していると思われた。

また、形質間の相関を調べた結果、頭部と胸部形態には著しい遺伝相関が存在することが示された。特に、頭部幅と胸部長間には強い逆相関が存在した。この結果は、「太い頭部をもつ個体は長い胸部をもち、細い頭部をもつ個体は短い胸部をもち」という傾向が遺伝的に生じやすい可能性を示唆している。

すなわち頭部と胸部間に形態的統合性が存在していることを示しており、頭胸部が独立した遺伝的モジュールとなっている可能性を示唆している。さらに Castle-Wright 法から各形質の遺伝効果の数を見積もった結果、8 つ程の遺伝効果が 2 亜種のマイマイカブリ形態変異に関与している可能性が示唆された。

以上の結果を *Heredity* 誌に発表した (Konuma et al. 2013)。

(2) 連鎖解析と QTL マッピング

アオマイマイカブリ雄 1 個体とサドマイマイカブリ雌 1 個体を掛けあわせ F1 雑種を構築した後、雄親のアオマイマイカブリと F1 雑種の雌個体を交雑させ合計 134 個体の戻し交雑個体を獲得した。そのうち、132 個体を連鎖地図解析用の分子実験に用い、84 個体を形態解析に用いた。

AFLP と核マーカーを用いた解析の結果、両親間で遺伝的多型がみられる遺伝子座を 347 特定することができた。そのうち、戻し交雑の分離比に従う遺伝子座が chi-square test によって 110 に絞られた。これらの分子マーカーを用いて連鎖関係の grouping と ordering をした結果、19 連鎖群 93 分子マーカーをもつ遺伝的連鎖地図を作製することができた。

作製した連鎖地図に対し QTL マッピングを行った結果、統計的に有意な 6 つの QTL を特定することができた。そのうち、腹部幅と体サイズに関わる QTL が第 3 連鎖群の同じ場所に位置し、胸部幅、腹部長、腹部幅の QTL が第 12 連鎖群の同じ場所に位置した。また興味深いことに、第 12 連鎖群の QTL 地点では頭部長、頭部幅、胸部長、体サイズなども含めた全形質の LOD がピーク値を示していた。この第 12 連鎖群の遺伝領域における各形質の相加遺伝効果は、全ての形質で正の遺伝効果をもっていた。これらの結果は、この第 12 連鎖群上の QTL が外部形態全体を狭頭型から巨頭型に変化させる多面発現的效果をもった QTL である可能性を示唆する。

さらに本研究において構築した同親由来の戻し交雑家系においても形質相関を調べた結果、多くの形質間に強い相関がみられた。特に頭部幅と胸部長に逆相関の関係がみられた。この結果は、上記した量的遺伝解析の結果とも調和的であり、マイマイカブリ形態は遺伝的に統合している傾向があるといえる。

(3) 雑種の適応度

親種と F1・戻し交雑種間でカタツムリの採餌能力を調べた結果、中間形態を持つ雑種は巨頭型と狭頭型の親種に比べ、カタツムリを採餌する能力が低いことがわかった。この結果は、中間形態に不利になる分断選択が生じやすい傾向を示しており、マイマイカブリの適応分化が生態的特殊化によって生じてい

る可能性を示唆している。そのような形態分化が生じる適応進化過程では、遺伝基盤解析から解明された頭部と胸部の形態的統合性が大きな役割を果たしたのかもしれない。

以上の結果を *Ecology* 誌に発表した (Konuma et al. 2013)。

(4) RNA-seq

gene catalog 実験では、アオマイマイカブリを材料に以下の8発生ステージからなるサンプルを構築することができた: 卵、1齢幼虫、2齢幼虫、前蛹、蛹、成虫(羽化直前)、成虫(羽化時)、成虫(羽化1週間後)。卵と幼虫に関してはそれぞれ各1個体ずつサンプルを用意し、蛹と成虫に関しては雌雄それぞれ1個体ずつサンプルを用意した(合計14サンプル)。gene expression 実験では、甲虫の形態形成に最重要と考えられている前蛹ステージのサンプルとその後の羽化ステージのサンプルを準備することができた。両ステージのサンプル個体に関し、頭部と胸部を別々に摘出した。従って、2亜種、2組織部位、2発生ステージ、3繰り返しから構成される合計24のサンプルを準備することができた。

上記のサンプルからRNAを抽出後、濃度、RIN値、断片化を計測して抽出サンプルに問題がないことを確認したのち、RNA-seq用のライブラリー調整を行った。gene catalog 実験では、発生ステージと雌雄ごとで異なるバーコードシーケンスをライゲートさせ全体をプールしてHiSeq2500の1レーンを用いてシーケンスした。gene expression 実験では、発生ステージ、種間、組織ごとにバーコードシーケンスで識別し、繰り返しごとに別レーンに分けシーケンスを行った。

現在、得られたシーケンスデータを用いたトランスクリプトームアセンブリと遺伝子発現解析を進めている。これらのデータは、マイマイカブリ形態変異に関わる遺伝子を発生学的知見から網羅的に解明できる点で将来的に重要な結果につながることを期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

(1) Konuma, J., Sota, T., and Chiba, S. (2013) A maladaptive intermediate form: a strong trade-off revealed by hybrids between two forms of a snail-feeding beetle. *Ecology* 94: 2638-2644. (査読有)

(2) Konuma, J., Sota, T., and Chiba, S. (2013) Quantitative genetic analysis of subspecific differences in body shape in the snail-feeding carabid beetle *Damaster blaptoides*. *Heredity* 110: 86-93. (査読

有)

(3) Sota, T., J. Konuma, M. Fujiwara and E. Shoguchi (2013) Genome sizes of three species in the subtribe Carabina (Coleoptera: Carabidae). *Entomological Science* 16: 122-124. (査読有)

(4) 小沼順二 (2013) マイマイカブリの形態変異: 適応と遺伝的背景. 曾田貞滋・高見泰興編「Eco 選書 オサムシ学の新展開」頁192-205. 北隆館. (査読無)

(5) 曾田貞滋、小沼順二、藤澤知親 (2013) マイマイカブリのゲノムと適応形態遺伝子 COMPLEX ADAPTIVE TRAITS Newsletter 4(1): 23. (査読無)

(6) 曾田貞滋、小沼順二 (2012) マイマイカブリのゲノムと適応形態遺伝子 COMPLEX ADAPTIVE TRAITS Newsletter 3(1): 21. (査読無)

(7) 小沼順二、千葉聡 (2012) 繁殖干渉によって生じる生態的形質置換. 日本生態学会誌 62:247-254. (査読有)

(8) 小沼順二、千葉聡、曾田貞滋 (2012) マイマイカブリ外部形態の遺伝基盤 COMPLEX ADAPTIVE TRAITS Newsletter 2(8): 4. (査読無)

[学会発表](計3件)

(1) 小沼順二. マイマイカブリにみられる形態分化とその遺伝基盤. 日本生態学会第60回全国大会第60回(2013年3月5日, グランシップ静岡)

(2) 曾田貞滋、土屋雄三、小沼順二. オサムシにおける高度勾配上の適応と種分化. 日本生態学会第60回全国大会第60回(2013年3月7日, グランシップ静岡)

(3) 小沼順二. 繁殖干渉と隔離強化、形質置換、種分化. 第14回日本進化学会進化学会(2012年8月21日, 首都大学東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小沼 順二 (KONUMA JUNJI)
京都大学・理学(系)研究科(研究院)・研究員
研究者番号: 10613838

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号：