

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24870002

研究課題名(和文)トランスクリプトーム解析によるエゾサンショウウオの表現型可塑性の分子機構の解明

研究課題名(英文)Transcriptome analysis of phenotypic plasticity in the Hokkaido salamander

研究代表者

松波 雅俊(Matsunami, Masatoshi)

北海道大学・大学院水産科学研究院・博士研究員

研究者番号：60632635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：同一のゲノム情報をもつにも関わらず、環境の変化に応じて表現型を変化させる表現型可塑性と呼ばれる。北海道に生息する有尾両生類であるエゾサンショウウオ(*Hynobius retardatus*)の幼生は、被食者であるカエル幼生・捕食者であるヤゴの存在や個体群密度に応じて、明瞭な表現型可塑性を示す。本研究では、このエゾサンショウウオをモデルとして、表現型可塑性の分子基盤を解明することを目的とした。上記の目的を達成するために、生態学的な野外におけるサンプルの採集から、トランスクリプトーム解析まで一通りの実験をおこなった。この実験を通して、可塑性の原因となる可能性がより高い候補遺伝子が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Amphibians display flexible phenotypes depending on environmental conditions. Larvae of the Hokkaido salamander, *Hynobius retardatus*, exhibit two distinct morphs, "attack morphs" and "defense morphs", as an inducible phenotypic response to prey and predators, respectively. The presence of their prey, *Rana pirica* tadpoles, induces a broad-headed attack morph. The presence of predatory dragonfly nymphs (*Aeshna nigroflava*) induces a defense morph, characterized by enlarged external gills and a high tail. However, the molecular mechanisms underlying these phenotypic changes have yet to be elucidated. To reveal the landscape of molecular mechanisms underlying these inducible plastic morphs, we carried out a de novo transcriptome analysis of Hokkaido salamander larvae. We extracted and sequenced RNAs from the sampled tadpoles. Then, we compared the obtained reads and contigs of the treatment samples and identified differentially expressed genes.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生態・環境

キーワード：バイオインフォマティクス 生態発生学 表現型可塑性 両生類 個体群生態学 サンショウウオ RNA-seq 捕食者・被食者

1. 研究開始当初の背景

(1) エゾサンショウウオ幼生の表現型可塑性異なった表現型が単一の遺伝子型から生じることが表現型可塑性と呼ばれている。なかでも環境条件にตอบสนองして不連続な表現型が生じる現象は表現型多型と言われ、様々な分類群に属する生物から報告されている。両生類は大きく体制が変化する変態をおこない、脊椎動物のなかでも特に表現型多型を示すものが多い。北海道原産のエゾサンショウウオ幼生は、環境に応じて様々な表現型多型を生じることが知られている。個体密度が高い場合や被食者であるエゾアカガエル幼生が存在する場合、通常の形態とは異なる捕食に有利な表現型である頭でっかち型と共食いから身を守る防御型を示す。また、捕食者としてヤゴが存在する条件下では、身を守るために外鰓・尻尾が発達した表現型となる。このようなサンショウウオの表現型多型は生態系のなかで適応的に制御され、その変化は被食者や捕食者を含めた個体群や群集全体に影響を及ぼす。個体間相互作用によるその変化の過程は生態学的に広く研究されているが、その遺伝的要因や分子発生の基盤については全く不明である。エゾサンショウウオは、世代時間が長くゲノムサイズも大きいため、従来の遺伝学的実験や配列解析をおこなうのは困難であった。

(2) 塩基配列解読技術の急展開

21世紀に入って主要なモデル生物(ヒト、マウス、ショウジョウバエ、酵母など)の全ゲノム配列決定が完了し、多種間での比較ゲノム解析が可能となった。さらに近年では、塩基配列解読技術とバイオインフォマティクスの急速な進歩により、種間比較のみならず、種内のゲノム・RNAなどを大量に解読することで種内変異や発生過程における転写産物の変化を検出することまでができるようになってきている。このような技術革新は、生態学の分野にも影響を及ぼし、今までの技術では不可能であった変化する環境下における転写産物の変動を定量的にモニターし、表現型変化の分子機構に迫る研究が実現しつつある。

2. 研究の目的

本研究では生態学と分子発生学の統合を目指し、フィールドワークによるサンプルの採取から、分子生物学的手法による機能解析まで一通りの実験をおこなう予定である。まず、北海道各地でエゾサンショウウオ卵のサンプリングをおこなう。次に、これを様々な環境で飼育することで表現型多型を誘導する。誘導された個体からRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて遺伝子の発現量の変動を調べる。そのなかから異なる多型間で発現量が大きく異なる遺伝子を形態的变化を引き起こす候補遺伝子として明らかにする。

3. 研究の方法

(1) エゾサンショウウオ卵の採取

まずサンプルとなる卵を入手した。エゾサンショウウオは4月から6月の北海道各地で雪解けによって生じた林道近くの水たまりや池に個体あたり30~100個の卵を産む。エゾサンショウウオの卵が採取できるのは一年をとおしてこの時期だけであるので、迅速に道内各所をまわり、できるだけ多くの卵を採取した。得られた卵は孵化させて表現型多型の誘導実験をおこなうまで冷蔵保存した。

(2) 実験室における表現型多型の誘導

卵を孵化させ、異なる環境下で飼育することで表現型多型を誘導した。誘導にはエゾサンショウウオと関係の深いヤゴ(捕食者)とオタマジャクシ(被食者)の2つの生物を用いた。外鰓・尻尾の発達した表現型を誘導するときはヤゴと共存させて飼育し、捕食に有利な表現型である頭でっかち型と共食いから身を守る防御型を誘導するときには、オタマジャクシと共存させて飼育した。このほかにエゾサンショウウオのみで飼育することで通常の表現型をもつ個体もつくった。誘導実験を通じて、RNA-seq用のサンプルを確保した。

(3) RNA-seqによる発現解析

本計画の要はRNA-seqによる遺伝子発現変動の観察であるので、それぞれの多型の時期・組織特異的に発現するRNAも極力すべて配列決定する必要がある。時期については、誘導後の各段階で形態形成に重要な遺伝子ができるだけ網羅的に配列決定するため、誘導直後・誘導から一週間後・誘導から二週間後の3つの時間軸で採取した。組織に関しては、可能な限りそれぞれの時期で切り分け保存する。得られた組織から特に形態の変化が顕著な外鰓・尻尾・頭部、形態形成を制御している脳などのサンプルから順次、配列を決定する。シーケンサーは、廉価で大量の配列決定が可能なイルミナ社のHiSeqを使用し、既存のアセンブラを用いて、新規RNAアセンブリをおこなった。アセンブリによって得られたエゾサンショウウオの全RNA配列に対して、それぞれのリードをマッピングすることで、多型間における転写産物の変動を調べた。これらの解析で、多型の要因となる可能性が高い候補遺伝子が絞られた。

(4) 候補遺伝子の機能推定

Gene ontologyやEnsemblなどの既存のデータベースを活用し、候補遺伝子の機能推定をおこなった。

4. 研究成果

まず操作飼育実験により表現型可塑性の誘導をおこなった。産卵期に道内各所をまわり、卵を採取した。次に、卵を孵化させ、異なる

環境下で飼育し、同一集団内で表現型可塑性を誘導した。外鰓・尻尾の発達した防御型を誘導するときにはヤゴと、捕食に有利な表現型である攻撃型を誘導するときにはエゾアカガエル幼生と、それぞれ共存させて飼育した。このほかにエゾサンショウウオのみで飼育することで通常の表現型をもつ個体も飼育した。この誘導実験を通してトランスクリプトーム解析用の RNA を確保した。次にそれぞれの表現型個体の発育時期・組織得的な遺伝子発現変動を観察するためにトランスクリプトーム解析をおこなった。時期については、形態形成に重要な遺伝子をできるだけ網羅的に配列決定するため、誘導直後・誘導から 12 時間後・明瞭な表現型の違いが観察された誘導から 1 週間後の 3 つの時間軸で採取した。組織に関しては、形態の変化が顕著な外鰓・尻尾・頭部、形態形成を制御している脳をサンプルとして使用した。配列決定の結果、合計で 44.2 Gbp の RNA が解読された。これらから適切な RNA 配列を再構築するために、Trinity による de novo assembly をおこない、740,933 contigs (average: 540 bp) が得られた。これらの配列を用いて異なる表現型間における転写産物の変動を調べた。サンプル間の多重比較・二群間比較による統計解析の結果から各処理・control 間で有意に発現量が変化していた遺伝子を DEG (Differentially Expressed Gene) として定義した。結果として 32 個の DEG が同定された。このなかには甲状腺ホルモン合成を制御する可能性のある HSDL1 や形態形成に重要なコラーゲン・ケラチンなどの遺伝子が含まれており、これらの可塑性発現における重要性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 11 件)

Matsunami M, Kishida O, Kitano J, Nozawa M, Igawa T, Michimae H, Miura T, Nishimura K. Eco-evo-devo study of phenotypic plasticity in the Hokkaido salamander (*Hynobius retardatus*). International Symposium “Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing”, P-26, Hiroshima (Japan), 27th. Mar. 2014.

松波 雅俊, 岸田 治, 北野 潤, 道前 洋史, 三浦 徹, 西村 欣也 トランスクリプトーム解析で迫るエゾサンショウウオの表現型可塑性の分子機構. 日本生態学会第 61 回全国大会, 広島(広島), D2-08, 2014 年 3 月 18 日

松波 雅俊, 岸田 治, 北野 潤, 道前 洋史, 三浦 徹, 西村 欣也 トランスクリプトーム

解析で迫るエゾサンショウウオの表現型可塑性の分子機構. 第 5 回生命情報科学若手の会, 検見川(千葉), LT2, 2014 年 2 月 18 日

松波 雅俊, ゲノム情報から探る脊椎動物の進化. 第 8 回 EZO ゼミ, 札幌(北海道), 2013 年 10 月 31 日

松波 雅俊, 岸田 治, 北野 潤, 道前 洋史, 三浦 徹, 西村 欣也 トランスクリプトーム解析で迫るエゾサンショウウオの表現型可塑性の分子機構. 第 29 回個体群生態学会大会, 堺(大阪), P04, 2013 年 10 月 12 日

松波 雅俊, 岸田 治, 北野 潤, 道前 洋史, 三浦 徹, 西村 欣也 トランスクリプトーム解析で迫るエゾサンショウウオの表現型可塑性の分子機構. NGS 現場の会第 3 回研究会, 神戸(兵庫), 3-24-A, 2013 年 9 月 4 日

松波 雅俊, 岸田 治, 北野 潤, 道前 洋史, 三浦 徹, 西村 欣也 トランスクリプトーム解析で迫るエゾサンショウウオの表現型可塑性の分子機構. 日本進化学会第 15 回大会, つくば(茨城), 3B-04, 2013 年 8 月 30 日

Matsunami M, Kishida O, Kitano J, Michimae H, Miura T, Nishimura K. Transcriptome analysis of predator- and prey-induced phenotypic plasticity in the Hokkaido Salamander (*Hynobius retardatus*). XIV Congress of the European Society for Evolutionary Biology, Lisbon (Portugal), 22th. Aug. 2013

松波 雅俊, 岸田 治, 北野 潤, 道前 洋史, 三浦 徹, 西村 欣也 トランスクリプトーム解析で明らかになったエゾサンショウウオの表現型可塑性の分子機構. 日本生態学会第 60 回全国大会, 静岡(静岡), W34, 2013 年 3 月 7 日

松波 雅俊, 岸田 治, 北野 潤, 道前 洋史, 三浦 徹, 西村 欣也 トランスクリプトーム解析で明らかになったエゾサンショウウオの表現型可塑性の分子機構. 第 4 回生命情報科学若手の会, 岡崎(愛知), LT2, 2013 年 3 月 2 日

松波 雅俊, 北野 潤, 岸田 治, 道前 洋史, 三浦 徹, 西村 欣也 トランスクリプトーム解析によるエゾサンショウウオの表現型可塑性の分子機構の解明. 平成 24 年度新学術領域「ゲノム・遺伝子相関」若手の会, 米原(滋賀), #22, 2012 年 11 月 1 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松波 雅俊 (MATSUNAMI Masatoshi)

北海道大学・大学院水産科学研究院・博士研究員

研究者番号：60632635