

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291093

研究課題名(和文)メダカ科魚類における性染色体のターンオーバーと二次性徴形質の進化に関する研究

研究課題名(英文)Studies on sex-chromosome turnover and evolution of secondary sexual characteristics in the family Adrianichthyidae

研究代表者

山平 寿智 (YAMAHIRA, Kazunori)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号：20322589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、スラウェシ島のメダカ科魚類を対象に、性染色体の置換が二次性徴形質の急速な進化をもたらした可能性について検証した。集団構造解析ならびに性連鎖マーカーによる性決定様式の解析の結果、マリリ湖群のメダカ種群は互いに遺伝子流動しながらも6つの集団に分化しており、性決定様式も多型的で近縁種/集団間での性染色体の置換も見られることがわかった。また、種間交配によるQTLマッピングの結果、ムナ種群のオスの二次性徴形質である鰭の赤味の原因遺伝子は常染色体上に存在することがわかったが、同じくムナ種群のオスに特有の体側の青味については、複数の遺伝子座が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tested the possibility that sex-chromosome turnover led to rapid evolution of secondary sexual characteristics in medaka fishes in Sulawesi Island. Analyses of population structures and sex-determination systems using sex-linked markers revealed that the Malili medaka species complex diverged into six populations while being mixed with each other by a certain degree of gene flows, and that sex-determination systems are polytypic with sex-chromosome turnovers among the species/populations. QTL mapping using an inter-specific cross line revealed that male-specific fin reddishness of the Muna medaka species complex is regulated by an autosomal gene, but that multiple loci may be involved in male-specific body blueness.

研究分野：進化生態学

キーワード：進化 生態 性淘汰 スラウェシ

1. 研究開始当初の背景

熱帯はなぜ多様なのか？種多様性の緯度勾配を説明する仮説として、近年‘種分化仮説’が注目を集めている (Mittelbach et al. 2007) . すなわち、熱帯は種分化速度が速いというのである . 申請者を初めとするいくつかの研究グループは、熱帯における強い性淘汰圧が二次性徴形質の急速な進化を促進し、速い種分化の推進力になっている可能性を示してきた (Monteiro & Lyons 2012, Monteiro & Lyons 2012, Fujimoto et al. 2015) . しかし、推進力だけでは多様化は生じない . 二次性徴形質の多様化の起点となるハンドルは、どのようにきられるのだろうか？

オスとメスのゲノムはその多くが共通であることから、オスの二次性徴形質のような性的二型が進化するためには、遺伝子座内性的葛藤が解消される必要がある

(Bonduriansky & Chenoweth 2009) . つまり、性的二型に関わる対立遺伝子が性特異的に発現する機構の進化が必要である . その一つが性決定遺伝子との連鎖である . 例えば、オスの二次性徴形質はオスには有利であるがメスで発現すると通常不利になるため、その原因遺伝子は Y 染色体上の性決定遺伝子近傍にリンクするか、劣性対立遺伝子として X 染色体に集積することが理論的に予測されている (Rice 1984) . よって、性決定遺伝子の転移等によって性染色体のターンオーバー (置換) が起こった場合、新しい性決定遺伝子の近傍にこれまでとは全く違う新たな性的拮抗遺伝子 (群) の連鎖不平衡状態が再構築され、二次性徴形質の質的な変化が急速に生じると考えられる (Kitano & Peichel 2012) . 申請者らは、こうした性染色体の置換が熱帯の生物の多様化に果たした役割に注目している .

メダカ科魚類は、近縁種間で二次性徴形質が大きく多様化している分類群である . 特に、赤道直下のスラウェシ島のメダカは種分化が速く、種間で体色が質的に大きく異なることが知られている (Parenti 2008) . 例えば、マリリ湖の種群のオスは黄色を基調とした体色をしているが、ムナに分布する種群は鮮やかなメタリックブルーをしている (図 1) . 興味深いことに、メダカ科は近縁種間で性染色体のターンオーバーが頻繁に見られる分類群でもある (Takehana 2011) . スラウェシ島の中だけでも、例えば、青い体色の *Oryzias woworae* は 24 番、黄色い *O. profundicola* は 10 番染色体がそれぞれ性染色体に相当する (図 1) (日本のメダカは 1 番) . これらの事実は、性染色体のターンオーバーが‘スラウェシグループ’の多様化の起点となった可能性を強く示唆するが、オスの体色を初めとする二次性徴形質の原因遺伝子のマッピングはなされておらず、その多様化の具体的なプロセスは明らかになっていない .

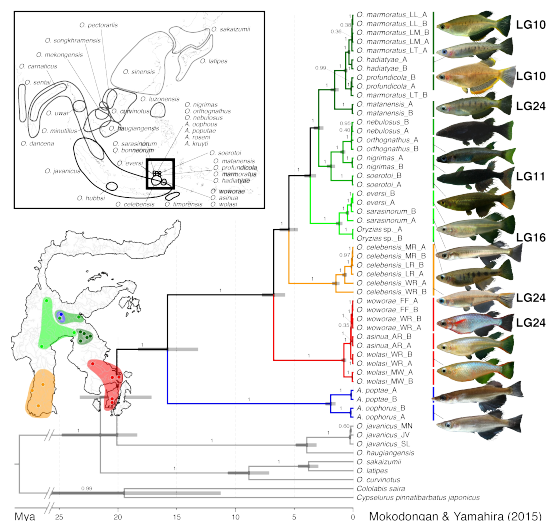


図 1 スラウェシ島のメダカ科魚類の系統進化と性染色体 (LG) の置換

2. 研究の目的

本研究では、まず (A) マリリ湖の体色の黄色いメダカ種群 4 種 6 集団を対象に、ミトコンドリア DNA およびマイクロサテライトマーカーを用いて系統推定および集団構造の解析を行い、系統進化の中での性染色体の置換プロセスを推定する . さらに、(B) 先行研究により明らかになっている 2 種の性決定遺伝子をもとに性連鎖マーカーを開発し、これらマーカーの有効性と性染色体が未知の種 / 集団の性染色体の推定も試みる . また、(C) 青い体色のムナの種群を対象に、異種間交配を用いたゲノムワイドな QTL マッピングも行い、オスの体色の原因遺伝子座がどの染色体上にマッピングされるかの解析も行う .

3. 研究の方法

A. マリリ湖種群の系統進化と集団構造

スラウェシ島のマリリ湖群という 5 つの古代湖群には、この湖群に固有のメダカ近縁 4 種 (*O. matanensis*, *O. marmoratus*, *O. profundicola*, および *O. hadiatyae*) 6 集団が分布しており、性染色体が多様で二次性徴形質も多様である . これら 4 種 6 集団の系統関係と集団構造を明らかにするために、各種各集団から野生個体を採集し、ミトコンドリア DNA の ND2 領域の配列に基づく系統推定を行った . 系統推定には NJ 法を用いた . また、次世代シーケンシングにより開発されたマイクロサテライト 10 座位を用いて、各集団から採集された個体のジェノタイプングも行った . そして各座位の対立遺伝子の頻度情報をもとに、STRUCTURE を用いて集団構造の解析を行った . さらに、分布域が一部重複する 2 種 (*O. marmoratus* と *O. profundicola*) に関しては、採集された個体の画像から幾何学的形態測定学的手法により、種間 / 集団間での形態の差異に関する解析も行った .

## B. マリリ湖種群の性染色体の同定

*O. marmoratus* と *O. profundicola* の飼育システムを用いた先行研究 (Myosho et al. 2015) により、これら 2 種では *Sox3* が雄決定遺伝子で、それは (日本のメダカの) 10 番染色体上に存在することがわかっている。そこで、この性決定遺伝子の配列情報をもとに性連鎖マーカーを開発し、上記 A で採集された野生個体を対象に、表現型の性とのマッチ/ミスマッチの解析を行った。各種各集団につき、オス 5 個体メス 5 個体から DNA を抽出し、これらをタイピングに供した。

## C. ムナ種群の二次性徴形質の QTL 探索

ムナに生息する青い体色の *O. woworae* は、近縁だが体色が青くない *O. celebensis* と交配可能であることが我々の先行研究で明らかとなっていた。本研究では、これら 2 種の野生個体を実験室に持ち帰り、*O. celebensis* メス × *O. woworae* オスの交配システムから多数の F2 を作出した。そして、各 F2 の体色をオーシャンオプティクス製の分光光度計で測定した。測定に際しては、体側の青味および鰭の赤味を、光反射特性 (各波長の反射率) を用いて評価した。また、親魚および各 F2 個体から DNA を抽出し、ddRAD-Seq を用いて、ゲノムワイド SNP の選定と各 F2 個体の SNP ジェノタイプピングを行った。これらジェノタイプの情報をもとに、JoinMap を用いて連鎖地図を作成し、R/QTL を用いて青味と赤味の強さに関わる原因遺伝子座の探索を行った。

## 4. 研究成果

### A. マリリ湖種群の系統進化と集団構造

ミトコンドリア DNA による系統推定によると、マリリ種群の中では *O. matanensis* が最も早くに分岐したことがわかった。*O. matanensis* は 24 番染色体が性染色体であることが知られており、マリリ種群の性染色体の多様化は、24 番染色体を性染色体にもつ祖先種を起点にしていることが示唆された。また、3 つの湖に分布する *O. marmoratus* は互いに単系統的にはならず、トゥティ湖 *O. marmoratus* 集団のみ、同じ湖に同所的に生息する *O. profundicola* とハプロタイプを共有していることがわかった。マイクロサテライトマーカーによる集団構造の解析でも、各湖の種/集団ごとに強い集団構造が見られたが、トゥティ湖の同所的 2 種だけは雑種を形成していることが示された。さらに、これら 2 種の雑種形成は、幾何学的形態測定による体型の解析からも支持された。

マリリ湖群の 5 つの湖は互いに河川で連結し一つの水系を形成しているが、このように一定の遺伝子流動が想定される環境でも種分化が起きて強い集団構造が形成されることことは非常に興味深い。この多様化

プロセスに性染色体の置換がどのように関与したか、今後は各種のデモグラフィの推定などにより、種/集団の進化史の詳細を解明する必要がある。

## B. マリリ湖種群の性染色体の同定

実験室飼育システムでの先行研究から開発した性連鎖マーカーの有効性を、マリリ種群 4 種 6 集団の野生個体を用いて確認した。その結果、ラントア湖とマハロナ湖の *O. marmoratus* は、先行研究での報告通り 10 番染色体上の *Sox3* が雄決定遺伝子として機能していたが、ラントア湖のオスはマーカーとなるバンドの配列長が異なることがわかった。さらに、同じ *O. marmoratus* でも、トゥティ湖の集団では、10 番染色体の *Sox3* が雄決定遺伝子として機能しているオスと、10 番に雄決定遺伝子がない (もしくは 10 番上の別の遺伝子が雄決定遺伝子となっている) オスとが存在することがわかった。また、飼育システムでは同じく 10 番の *Sox3* が雄決定遺伝子であるとされていた *O. profundicola* では、どのオスも特有のバンドが出現せず、10 番に雄決定遺伝子がない (もしくは 10 番上の別の遺伝子が雄決定遺伝子となっている) ことがわかった。

これらの結果は、種間のみならず、同じ種の中でも集団間もしくは個体間で性決定様式が多型的であることを示している。今後は、この多型の遺伝的基盤を解明するとともに、トゥティ湖の 2 種で見られた雑種形成が、性決定様式が多型性にどのように影響しているかの検討も必要であろう。

## C. ムナ種群の二次性徴形質の QTL 探索

*O. celebensis* メス × *O. woworae* オスの交配システムの F2 オスは、個体間で体側の青味も鰭の赤味も大きくばらついた。この変異を用いた QTL 解析の結果、オス特有の鰭の赤味については、その原因遺伝子は常染色体上 (日本のメダカの 7 番染色体上) に存在することが明らかになった。対応するゲノム領域を詳細に解析したところ、その領域は 9.4Mb ほどの塩基から構成され、397 個の遺伝子を含むことが明らかとなった。一方、体側の青味については、青味の属性 (彩度、色相など) によって連鎖が確認できる領域が異なることから、複数の遺伝子座が関与している可能性が示唆された。

本交配システムの親魚に用いた *O. woworae* も *O. celebensis* も、24 番が性染色体であることが知られている。今後は、性染色体が異なる別の種の組み合わせを用いた交配システムを作出し、同様の QTL 解析を行って、様々な二次性徴形質の原因遺伝子と性染色体との関係を網羅的に調べていく必要がある。

## < 引用文献 >

Mittelbach et al. (2007) *Ecol Lett* 10:315-331; Kawajiri et al. (2009) *Biol*

*J Linn Soc* 97:571-580; Monteiro & Lyons (2012) *PLoS ONE* 7:e44251; Fujimoto et al. (2015) *Evol Biol* 42:75-87; Bonduriansky & Chenoweth (2009) *Trends Ecol Evol* 24:280-288; Rice (1984) *Evolution* 38:735-742; Kitano & Peichel (2012) *Environ Biol Fish* 94:549-558; Parenti (2008) *Zool J Linn Soc* 154:494-610; Takehana (2011) in: *Medaka: A Model for Organogenesis, Human Disease, and Evolution* 229-240; Myosho et al. (2015) *Genetics* 195:2685-2691

#### 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 28 件)

Mokodongan DF, Montenegro J, Mochida K, Fujimoto S, Ishikawa A, Kakioka R, Yong L, Mulis, Hadiaty RK, Mandagi IF, Masengi KWA, Wachi N, Hashiguchi Y, Kitano J, Yamahira K (2018)

Phylogenomics reveals habitat-associated body shape divergence in *Oryzias woworae* species group (Teleostei: Adrianichthyidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 118:194-203 (査読有)

Ooyagi A, Mokodongan DF, Montenegro J, Mandagi IF, Koizumi N, Machida Y, Inomata N, Shdedko SV, Hutama AA, Hadiaty RK, Yamahira K (2018)

Phylogeography of the eight-barbel loach *Lefua nikkonis* (Cypriniformes: Nemacheilidae): how important were straits in northern Japan as biogeographical barriers?

*Ichthyological Research* 65:115-126 (査読有)

Kume M, Mori S, Kitano J, Sumi T, Nishida S (2018) Impact of the huge 2011 Tohoku-oki tsunami on the phenotypes and genotypes of Japanese coastal threespine stickleback populations. *Scientific Reports* 8:168 (査読有)

Fujimoto S, Yamahira K (2017) Male courtship activeness of *Oryzias latipes* in Okinawa Island. *Biological Magazine Okinawa* 55:11-17 (査読有)

Matsumoto T, Yoshida K, Kitano J (2017) Contribution of gene flow to the evolution of recombination suppression in sex chromosomes. *Journal of Theoretical Biology* 431:25-31 (査読有)

Ishikawa A, Kusakabe M, Ravinet M, Yoshida K, Makino T, Toyoda A, Fujiyama A, Kitano J (2017) Different

contributions of local- and distant-regulatory changes to transcriptome divergence between stickleback ecotypes. *Evolution* 71:565-581 (査読有)

Yoshida K, Makino T, Kitano J (2017) Accumulation of deleterious mutations on the neo-Y chromosome of Japan Sea stickleback (*Gasterosteus nipponicus*). *Journal of Heredity* 108:63-68 (査読有)

Yamahira K, Mochida K, Fujimoto S, Mokodongan DF, Montenegro J, Kaito T, Ishikawa A, Kitano J, Sue T, Mulis, Hadiaty RK, Mandagi IF, Masengi KWA (2016) New localities of the *Oryzias woworae* species group

(Adrianichthyidae) in Sulawesi Tenggara. *Indonesian Journal of Ichthyology* 16:125-131 (査読有)

Sasaki T, Yamahira K (2016) Variation in male courtship activeness between latitudinal populations of Northern medaka. *Ichthyological Research* 63:302-306 (査読有)

Yoshida K, Miyagi R, Mori S, Takahashi A, Makino T, Toyoda A, Fujiyama A, Kitano J (2016) Whole-genome sequencing reveals small genomic regions of introgression in an introduced crater lake population of threespine stickleback. *Ecology and Evolution* 6:2190-2204 (査読有)

Mokodongan DF, Yamahira K (2015) Origin and intra-island diversification of Sulawesi endemic Adrianichthyidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 93:150-160 (査読有)

Mokodongan DF, Yamahira K (2015) Mitochondrial and nuclear phylogenetic trees and divergence time estimations of Sulawesi endemic Adrianichthyidae. *Data in Brief* 6:281-284 (査読有)

Kawajiri M, Uchida K, Chiba H, Moriyama S, Yamahira K (2015) Variation in the ontogeny of sex steroid levels between latitudinal populations of the medaka. *Zoological Letters* 1:31 (査読有)

Fujimoto S, Miyake T, Yamahira K (2015) Latitudinal variation in male competitiveness and female choosiness in a fish: are sexual selection pressures stronger at lower latitudes? *Evolutionary Biology* 42:75-87 (査読有)

Kawajiri M, Fujimoto S, Yoshida K, Yamahira K, Kitano J (2015) Genetic

architecture of the variation in male-specific ossified processes on the anal fins of Japanese medaka. *G3-Genes Genomes Genetics* 5:2875-2884 (査読有)

White MA, Kitano J, Peichel CL (2015) Purifying selection maintains dosage-sensitive genes during degeneration of the threespine stickleback Y chromosome. *Molecular Biology and Evolution* 32:1981-1995 (査読有)

Pennell MW, Kirkpatrick M, Otto SP, Vamosi J, Peichel CL, Valenzuela N, Kitano J (2015) Y fuse? patterns of sex chromosome fusions in fishes and reptiles. *PLoS Genetics* 11:e100523 (査読有)

Mokodongan DF, Tanaka R, Yamahira K (2014) A new ricefish of the genus *Oryzias* (Belontiiformes, Adrianichthyidae) from Lake Tiu, Central Sulawesi, Indonesia. *Copeia* 2014:561-567 (査読有)

Fujimoto S, Kawajiri M, Kitano J, Yamahira K (2014) Female mate preference for longer fins in medaka. *Zoological Science* 31:703-708 (査読有)

Kawajiri M, Yoshida K, Fujimoto S, Mokodongan D, Ravinet M, Kirkpatrick M, Yamahira K, Kitano J (2014) Ontogenetic stage-specific quantitative trait loci contribute to divergence in developmental trajectories of sexually dimorphic fins between medaka populations. *Molecular Ecology* 23:5258-5275 (査読有)

#### その他査読付き原著論文 8 件

[学会発表] (計 21 件) (研究代表者のみ)

Mandagi IF, Lawelle SA, Masengi KWA, Mokodongan DF, Nagano AJ, Matsunami M, Kimura R, Yamahira K. Highly-structured freshwater fish populations within a single river system. 第 65 回日本生態学会大会 2018 年 3 月 16 日, 札幌コンベンションセンター (ポスター発表)

Nobu S, Mokodongan DF, Nagano AJ, Matsunami M, Kimura R, Yamahira K. Just-completed sympatric speciation in an ancient lake. 第 65 回日本生態学会大会, 2018 年 3 月 16 日, 札幌コンベンションセンター (ポスター発表)

山平寿智. メダカの緯度ラインの研究: 生活史から種分化へ. 自由集会 ' 外温動物にみられる生活史形質の緯度ク

ライン '第 65 回日本生態学会大会, 2018 年 3 月 14 日, 札幌コンベンションセンター

Montenegro J, Mochida K, Matsui K, Mokodongan DF, Hadiaty RK, Masengi KWA, Inomata N, Irie T, Terai Y, Hashiguchi Y, Kitano J, Yamahira K. Parallel evolution of body coloration between sympatric freshwater fishes with non-parallel evolution of visual sense. Biodiversity Symposium 2017 by the Society for Coastal Ecosystems Studies - Asia Pacific, 2017 年 12 月 8 日, フィリピン・セブ

Yamahira K, Mokodongan DF, Lawelle SA, Masengi KWA. Species and genetic diversity of medaka fishes (the family Adrianichthyidae) in Southeast Sulawesi. The 1st International Seminar on Sustainability in the Marine Fisheries Sector 2017, 2017 年 9 月 16 日, インドネシア・クンダリ (招待講演)

Yamahira K. Population structures of adrianichthyids in the Malili Lakes System. 3rd Southeast Asian Gateway Evolution Meeting, 2017 年 8 月 30 日, インドネシア・ボゴール

Montenegro J, Mochida K, Sugiuchi S, Matsui K, Fujimoto S, Mokodongan DF, Ishikawa A, Kitano J, Yong L, Mandagi IF, Masengi KWA, Hadiaty RK, Yamahira K. Convergent evolution of body coloration in genus *Oryzias* and *Nomorhamphus* in Sulawesi-tenggara, Indonesia. The 2017 Congress of the European Society for Evolutionary Biology, 2017 年 8 月 21 日, オランダ・フローニンゲン. (ポスター発表)

安齋賢・持田浩治・藤本真悟・Mokodongan DF・永野惇・山平寿智・北野潤. メダカ科魚類における性的二型の多様化をもたらす遺伝基盤. 第 64 回日本生態学会大会, 2017 年 3 月 15 日, 早稲田大学

山平寿智. メダカの湧き出る魔法の島スラウェシ. シーラカンスワークショップ一般講演, アクアマリンふくしま. 2016 年 11 月 3 日 (招待講演)

Montenegro J, Mochida K, Sugiuchi S, Matsui K, Fujimoto S, Mokodongan DF, Ishikawa A, Kitano J, Mandagi IF, Masengi KWA, Hadiaty RK, Yamahira K. Evolution of body coloration in two sympatric freshwater fishes: a test of the sensory-driven hypothesis. 21st Evolutionary Biology Meeting, 2016 年 9 月 23 日, フランス・マルセイユ

Yamahira K. Life-history adaptations and the latitudinal diversity gradient in medaka fishes. The 2016

(26th) Annual Meeting of the Japanese Society for Mathematical Biology. 2016年9月8日,九州大学  
Yamahira K. Diversity and evolution of Sulawesi endemic Adrianichthyidae. IKAN-9 (9th Meeting of Indonesian Society of Ichthyology). 2016年5月24日,インドネシア・ジャカルタ(招待講演)  
藤本真悟・持田浩治・杉内信哉・松井久実・北野潤・Mokodongan DF・石川麻乃・Hadiaty RK・Masengi AKW・山平寿智・メダカ属魚類における体色の多様化をもたらす生理生態メカニズム(Ⅰ). 第63回日本生態学会大会, 2016年3月21日, 仙台市国際センター  
持田浩治・杉内信哉・松井久実・北野潤・藤本真悟・Mokodongan DF・石川麻乃・Mandagi IF・Masengi AKW・Hadiaty RK・山平寿智・メダカ属魚類における体色の多様化をもたらす生理生態メカニズム(Ⅱ). 第63回日本生態学会大会, 2016年3月21日, 仙台市国際センター  
Yamahira K. Diversity and evolution of Sulawesi endemic Adrianichthyidae. International Seminar at Sam Ratulangi University, 2016年1月17日, インドネシア・マナド(招待講演)  
Mokodongan DF, Yamahira K. Origin and intra-island diversification of Sulawesi endemic Adrianichthyidae. 第48回日本魚類学会年会, 2015年9月6日, 近畿大学奈良キャンパス  
藤本真悟・山平寿智・高緯度における繁殖の季節的集中がもたらす実効性比の偏りの消失. 第59回日本生態学会九州地区会, 2014年5月24日, 琉球大学

#### その他学会発表 4件

##### 〔図書〕(計7件)

山平寿智(2018)メダカ科魚類の鰭の形態と機能の多様性について. 月刊アクアライフ 2018-5:58-59  
山平寿智(2017)メダカ科魚類の鰭の形態と機能の多様性について. 月刊アクアライフ 2017-11:66-67  
山平寿智(2016)メダカ科魚類の系統進化と地理的分布について. 「メダカ飼いたい新書」pp.100-101  
山平寿智(2016)なぜ熱帯のメダカは派手で多様なのか? 「メダカ飼いたい新書」pp.108-119  
山平寿智(2015)インドネシア・スラウエシ島から発見されたティウメダカ(*Oryzias soerotoi*)の形態的特徴と系統的位置について. 月刊アクアライフ 2015-2:44-45

山平寿智(2015)チモール島のチモールメダカについて. 月刊アクアライフ 2015-8:49  
山平寿智(2014)メダカの配偶者選好性の集団間変について. 月刊アクアライフ 2014-5:42-43

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山平 寿智(YAMAHIRA, Kazunori)  
琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授  
研究者番号: 20322589

##### (2) 研究分担者

北野 潤(KITANO, Jun)  
国立遺伝学研究所・集団遺伝研究系・教授  
研究者番号: 80346105