

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660158

研究課題名(和文) 回遊現象の遺伝学的研究

研究課題名(英文) The genetic architecture of anadromous migration in pufferfish

研究代表者

菊池 潔 (Kikuchi, Kiyoshi)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：20292790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：海と河をめぐる回遊機構(遡河回遊)に関しては、これまでに多くの生理・生態学的な知見が集積しているが、回遊を可能ならしめたゲノム上の変異は同定されていない。トラフグ属魚類の多くは純海産魚であるが、その近縁2種は淡水適応に成功し、河に遡って産卵する。本研究では、これまでの回遊研究とは異なった切り口、すなわち順遺伝学的手法を採用した。その結果、遡河性2種に共通の淡水耐性遺伝子座を見出した。次に、トラフグ属魚類合計10種のゲノムDNA配列を用いて、淡水で生息可能な2種にのみ共通するDNA配列を探索したところ、回遊を可能ならしめた変異候補をさらに絞り込むことができた。

研究成果の概要(英文)：Relatively little is known of the genetic basis of migration, despite the knowledge for migration from physiological and ecological studies has been accumulated. The Takifugu genus consists of ~20 species and has diverged in many traits. Notably two species have evolved anadromy, a diversification from marine ancestors—a trait seen in the rest of this genus. As these species are amenable to genetic mapping study, the Takifugu genus provide an excellent opportunity to gain insight into the genetic basis of migration. Using crosses derived from anadromy pufferfish and marine pufferfish, we perform a quantitative trait locus analysis to identify the number, position, and relative contribution of genetic effects on the tolerance for freshwater that is associated with the anadromy life history. We also performed comparative genomic analyses of Takifugu fish containing two anadromy species and nine marine species, to search for anadromy-specific changes in genomic DNA sequences.

研究分野：魚類遺伝学

キーワード：遺伝 回遊 浸透圧調節 進化 比較ゲノム

1. 研究開始当初の背景

一部の水棲生物がおこなう海と川の定期的移動、すなわち、通し回遊は、自然界に認められる最もダイナミックな生命現象のひとつである。その起源は、祖先的な海産生物が新規環境を求めて川へ進出すること、あるいは、河川の生物が海へ進出することに端を発する。その初期過程において生物は劇的な環境の変化に直面したはずであるが、この変化に耐えつつ移動する新しい遺伝的プログラムの獲得に成功したのが回遊生物である。回遊現象に関する研究の歴史は古く、膨大な量の生理・行動・生態学的な知見が集積している。しかし、新規環境への進出を可能ならしめ、回遊の発端となったゲノム上の変異は同定されていない。その理由は、遺伝学的解析に適した回遊生物が少なく、さらにその解析が困難であったからである。トラフグ属魚類は約 20 の近縁種で構成され、そのほとんどは純海産魚であるが、メフグとメガネフグは淡水環境への進出に成功し、河に遡って産卵する。研究代表者とその共同研究者は、トラフグがメフグと交配可能であることを最近見いだした。さらに、トラフグ属魚類の全ゲノム配列が比較的容易に得られることも見出ししている。つまり、この交配家系を用いれば、遡河回遊現象を「詳細な順遺伝学的研究」の俎上に載せることが可能となるのである。

2. 研究の目的

(1) 近縁 2 魚種における淡水耐性遺伝子座の探索と比較

メフグとメガネフグは姉妹種ではないが、ともに遡河回遊性を獲得している。両者の淡水耐性遺伝子座が同祖的である可能性を検討するため、両種の淡水耐性遺伝子座を同定し、そのゲノム上の位置を比較する。

(2) 比較ゲノム解析による淡水耐性責任変異の絞り込み

遡河回遊種 2 種の淡水耐性遺伝子座が同祖的であるならば、その原因遺伝子の DNA 配列は両者で共通し、かつ、他の海産種とは異なるはずである。遡河回遊性の 2 種と海産の 9 種からなる近縁種群の全ゲノム配列を比較して、淡水耐性責任変異の候補リストを作成する。

(3) 淡水移行に伴って発現が変動する遺伝子の網羅的な解析

淡水移行に伴い発現が変動する遺伝子は、淡水耐性に関与している可能性があり、そこに淡水耐性遺伝子座の本体が含まれる可能性もある。そこで、淡水適応能をもつ種と、もたない種を材料として、淡水移行に伴うトランスクリプトームの変動を調べて、そのパターンを比較する。

3. 研究の方法

(1) 近縁 2 魚種における淡水耐性遺伝子座の探索と比較

(i) メフグの淡水耐性遺伝子座の探索

淡水中でも海水中でも生存可能なメフグと淡水下では生存できないトラフグを交配して、雑種第 2 世代を作出し、汽水および海水中で育成した。次に、これらを淡水へ移して、個体毎に生存日数を調べ、表現型値とした。その後、各個体よりゲノム DNA を抽出し、全ゲノムレベルの多型座情報を取得した。多型座としては、既報のトラフグ連鎖地図から選抜したマイクロサテライト座と、次世代シーケンサーを用いた RAD-seq 法で得た SNP 座を利用した。得られた遺伝子型情報と表現型値を併せて、量的遺伝子座の解析をおこない、淡水耐性に寄与する遺伝子座のゲノム上の位置を明らかとした。

(ii) メガネフグの淡水耐性遺伝子座の探索

淡水中でも海水中でも生存可能なメガネフグと淡水下では生存できないショウサイフグを交配して雑種第 2 世代を作出し、上記 (i) と同様にして、淡水耐性に寄与する遺伝子座のゲノム上の位置を解析した。

(2) 比較ゲノム解析による淡水耐性責任変異の絞り込み

淡水耐性獲得に寄与した変異を絞り込むため、遡河回遊性の 2 種と海産の 9 種からなる近縁種群の全ゲノム配列を比較する。6 種の海産フグの全ゲノム配列は既に得ているため、遡河回遊性の 2 種と海産の 3 種の全ゲノム配列を、次世代シーケンサーにより取得し、これをトラフグゲノム配列に貼り付けることで、全ゲノム配列を得る。

次に、トラフグゲノム配列をリファレンスとして、近縁 10 種の変異座リストを作成する。このリストを比較して、遡河回遊性の 2 種で共通し、かつ、トラフグを含む海産 9 種とは異なる変異座を抽出する。さらに、(1) の解析で得られた量的遺伝子座の位置情報を考慮して、変異座のさらなる絞り込みをおこない、これを、淡水耐性責任変異の候補とする。

(3) 淡水移行に伴って発現が変動する遺伝子の網羅的な解析

淡水適応能をもつメガネフグと、もたないトラフグおよびショウサイフグを淡水に移し、24 時間後に腎臓を摘出して RNA を得た。これを次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析に付した。発現遺伝子のアノテーションは、NCBI のプロテオームデータセットを参照データとして、Blast2GO プログラムによりおこなった。

4. 研究成果

(1) 近縁 2 魚種における淡水耐性遺伝子座の探索と比較

(i) メフグの淡水耐性遺伝子座の探索

メフグとトラフグの種間交配第 1 世代から、種間交配第 2 世代とトラフグへの戻し交配世代を得た。これらを 3-4cm 程度まで育成し、淡水適応能を評価したところ、種間交配魚の淡水耐性の平均はトラフグより高く、メフグ由来の遺伝的影響が認められた。量的遺伝子座解析の結果、両家系に共通する遺伝子座が見つかった。この遺伝子座がメフグの遡河回遊性獲得に大きく貢献したと考えられる。

(ii) メガネフグの淡水耐性遺伝子座の探索

メガネフグとショウサイフグの種間交配第 1 世代から、ショウサイフグへの戻し交配世代を得た。これらを 3-4cm 程度まで育成し、淡水適応能を評価したところ、種間交配魚の淡水耐性の平均はトラフグより高く、メガネフグ由来の遺伝的影響が認められた。量的遺伝子座解析の結果、淡水耐性能の寄与する遺伝子座が見つかった。そのゲノム上の位置をメガネフグのそれ (i) の結果) と比較したところ、両者は重なっていた。したがって、メガネフグとメフグの淡水適応能獲得には、同じ遺伝子座が関与したと考えられた。この結果は、同じ突然変異が交雑などを通じて繰り返し利用された可能性や、同じ遺伝子に独立に突然変異が生じた可能性を示しているが、トラフグ属魚類が現在でも交雑できることから、前者の蓋然性が高いと考えられる。

(2) 比較ゲノム解析による淡水耐性責任変異の絞り込み

同じ突然変異がメフグとメガネフグで利用されている場合、淡水適応能に寄与する塩基サイトは両者で共通し、かつ、他の海産フグとは異なるはずである。こういったサイトを抽出するための準備として、遡河回遊性の 2 種と海産の 3 種の全ゲノム配列を、次世代シーケンサーで得た。ゲノム被覆率は 20-30x 程度で、信頼性の高い変異座の抽出が可能であった。

次に、メフグとメガネフグに 9 種の海産フグを加えて合計 11 種の全ゲノム配列を比較したところ、淡水耐性遺伝子座 (95%信頼区間のゲノム配列領域) に、遡河回遊特異的なアミノ酸置換をもたらす変異座を 2 個同定することができた。驚いたことに、この 2 個の変異は同じ遺伝子上にあり、本遺伝子が淡水適応能の獲得に寄与した可能性が考えられた。ただし、アミノ酸置換をもたらさない変異が、発現変動等により淡水耐性能の獲得に寄与した可能性も考えられるので、それらも含めて、機能解析により、淡水適応能との関連を調べていく必要がある。

(3) 淡水移行に伴って発現が変動する遺伝

子の網羅的な解析

腎臓の遺伝子発現量解析の結果、淡水移行に伴って変動する遺伝子 (発現変動遺伝子) はメガネフグには 29 個、トラフグには 268 個、ショウサイフグには 516 個存在した。GO エンリッチメント解析の結果、メガネフグでは浸透圧調節に関わる一連の遺伝子が発現変動していると考えられたが、トラフグやショウサイフグでは異化作用等に関わるものが多く、浸透圧調節との直接的な関連は見いだせなかった。一般に、環境変動に伴う発現変動遺伝子は補償機能を持つと仮定されるが、メガネフグ以外のフグの発現変動遺伝子の多くは淡水耐性に関与せず、恒常性の破綻により発現変動が引き起こされている可能性が示めされた。メガネフグで淡水環境に適応するよう進化した結果、浸透圧環境の変動に対するトランスクリプトームの安定性が生じていると解釈した。

トランスクリプトーム解析により得られたメガネフグの発現変動遺伝子の中で、淡水耐性遺伝子座 (95%信頼区間のゲノム配列領域) にあるものを探索したところ、2 つの遺伝子が該当した。これらも淡水適応能の獲得に寄与した可能性が考えられた。今後、機能解析により、淡水適応能との関連を調べていく必要がある。

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 1 件)

Suzuki M, Wakui H, Itou T, Segawa T, Inoshima Y, Maeda K, Kikuchi K. Two isoforms of aquaporin 2 responsive to hypertonic stress in bottlenose dolphin. J. Exp. Biol. 査読有, 219, 2016, 1249-1258 DOI: 10.1242/jeb.132811

[学会発表] (計 7 件)

伊藤洸太郎, 内田琢也, 菅原康平, 濱崎将臣, 宮木廉夫, 土井啓行, 城夕香, 細谷将, 菊池潔, 遡河回遊性進化の遺伝基盤の探求-メフグ淡水適応遺伝子座のゲノムワイド解析-. 日本水産学会秋季大会, 2014 年 09 月 21 日 ~ 2014 年 09 月 24 日, 福岡

菊池潔, 細谷将, 連鎖および連鎖不平衡マッピングによる表現型原因遺伝子の同定. 2014 年度日本魚類学会年会シンポジウム (招待講演). 2014 年 11 月 17 日 ~ 2014 年 11 月 17 日, 神奈川

伊藤洸太郎, 細谷将, 菊池潔, 海と河をめぐる魚の秘密を探る-近縁フグの比較. 浜名湖をめぐる研究者の会, 2014 年 12 月 06 日 ~ 2014 年 12 月 06 日, 静岡

菊池潔, 有用遺伝子の探索・同定・選抜・

編集. 平成 27 年度日本水産学会水産増殖懇話会第 1 回講演会 (招待講演). 2015 年 03 月 27 日 ~ 2015 年 03 月 27 日, 東京

細谷将, 田角聡志, 小林久人, 菊池潔, ゲノム情報から推定する種分化と交雑の歴史-トラフグ近縁 12 魚類の全ゲノム比較-. 日本水産学会春季大会, 2015 年 03 月 27 日 ~ 2015 年 03 月 31 日, 東京

Sho Hosoya, Satoshi Tasumi, Hisato Kobayashi, Kiyoshi Kikuchi, GENOME SEQUENCING OF 12 PUFFERFISHES. The International Symposium on Aquaculture Genetics XII, 2015 年 07 月 22 日 ~ 2015 年 07 月 26 日, Santiago de Compostela, Spain

伊藤洸太郎, 中村政裕, 藤田真志, 小山喬, 田角聡志, 細谷将, 菊池潔, トランスクリプトーム解析による淡水適応関連遺伝子の探索. 日本水産学会秋季大会, 2016 年 03 月 26 日 ~ 2016 年 03 月 30 日, 東京

〔その他〕

研究紹介ホームページ

<http://www.se.a.u-tokyo.ac.jp/hybrid.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 潔 (KIKUCHI, Kiyoshi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号: 20292790

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

廣井 準也 (HIROI, Jyunya)

聖マリアンナ医科大学・准教授

研究者番号: 20350598

田角 聡志 (TASUMI, Satoshi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号: 90359646