

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：22604

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23113008

研究課題名(和文) 体色の多様化が生む脳遺伝子の発現変化と性行動不適合性の解析

研究課題名(英文) Analyses of behavior incompatibility triggered by expression changes of pigmentation genes

研究代表者

高橋 文(Takahashi, Aya)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：90370121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 76,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、環境適応が引き金となって新たな生殖的隔離が生じるという種分化機構のモデルケースとしてショウジョウバエの体色と行動の両方に関与するドーパミン生合成系の遺伝子群の種内発現変異を研究材料とし、新たなシス制御領域の存在や体色と行動の両方に影響を与える遺伝的な変異の存在が明らかとなった。また、新たな実験デザインによるゲノムワイドなトランスクリプトーム解析を行い、遺伝子発現制御に関わるゲノム因子の間の様々な相関関係が浮き彫りになった。

研究成果の概要(英文)：This study focused on dopamine biosynthesis pathway genes, which has a pleiotropic effect on both body pigmentation and behavior, as genes potentially involved in reproductive isolation triggered by environmental adaptation. We found unexpectedly complex cis-regulatory polymorphisms in these genes and a genetic variant that is likely to change both pigmentation and behavior.

From a wider viewpoint of the "Correlative gene systems", another contribution of this study was to elucidate various associations between cis/trans-regulatory variations and genomic factors by conducting a novel type of genome-wide transcriptome analysis.

研究分野：進化遺伝学

キーワード：体色変異 性行動 ドーパミン代謝系 多面発現 ショウジョウバエ 種分化 シス遺伝子発現制御  
トランス遺伝子発現制御

## 1. 研究開始当初の背景

異種ゲノム間の軋轢により生じる生殖隔離には、環境適応による種内ゲノムの多様化が引き金となって起こるケースがある。しかし、種内ゲノムの多様化のどのような側面が、ゲノム間の軋轢を生むのかという問題は、これまでに十分明らかとなっていない。

申請者らはこれまで、環境適応による昆虫の体色変異に関連して、ショウジョウバエ種内で体を黒くする遺伝子が、性行動に深く関わるドーパミン生合成経路にある脳遺伝子であることを明らかにしてきた。その中で、環境適応形質である体色の多様化がゲノム内の遺伝子発現相関を通して性行動の不適合性というゲノム間の軋轢を生むという新しい考え方に至った(図1)。

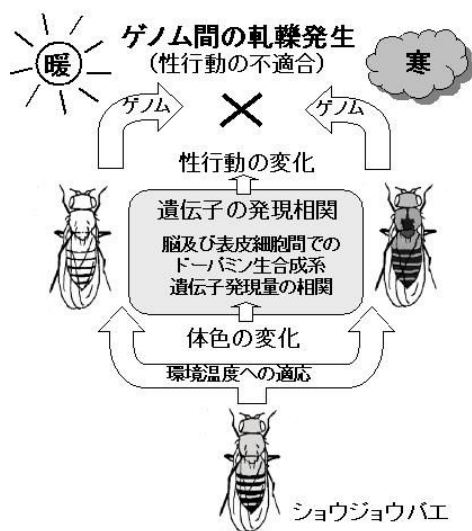


図1. 研究計画概念図

## 2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエの体色と行動の両方に関与するドーパミン生合成系の遺伝子群をモデルケースとして、環境適応の副次的な影響として起こる性行動の不適合性により新規生殖隔離が生じる分子機構を解明することを目的としてきた。また、より広範な視点からゲノムワイドなトランスクリプトームの遺伝子ネットワークにおける「ゲノム・遺伝子相関」の全体像を把握し、その重要性について定量的な議論を展開することを目標としてきた。

## 3. 研究の方法

### (1) ショウジョウバエの体色変異と性行動を制御するドーパミン生合成系脳遺伝子の解明

ドーパミン生合成系の既存遺伝子全てにつ

いて、定量 PCR 及び、次世代を利用したアンプリコンシーケンスによる方法を用いて、発現量の種内変異の定量を行う。また、これらの遺伝子発現と体色、ストレス耐性、性行動などの表現型との関連性を明らかにするため、キイロショウジョウバエ種内の近交系統パネル DGRP (*Drosophila* Genetic Reference Panel; Mackay et al. 2012)を用いて関連解析を行う。

### (2) 体色と行動を制御する多面発現遺伝子のゲノム進化過程の解明

上記のドーパミン生合成系遺伝子群について、発現制御領域の DNA 塩基配列を決定し、その配列情報から、性行動の不適合性を生む可能性のあるゲノム進化過程に関する集団遺伝学的な解析を行う。特に複数組織で発現する多面発現遺伝子について、発現調節の進化過程がゲノム間の相性に与える影響を明らかにする。

### (3) 次世代シーケンサーを用いたシス制御領域の転写制御の「ゲノム・遺伝子相関」解析

次世代シーケンサーを用いて対立遺伝子を区別したトランスクリプトーム定量データから、種内トランスクリプトームに及ぼすシス及びトランス遺伝子発現制御の影響を明らかにする。また、組織間、雌雄間の遺伝子発現相関解析を行う。これにより、「ゲノム・遺伝子相関」が、遺伝子発現ネットワークを介してどのように集団内ゲノムの不適合性を引き起こしているのかについて明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) キイロショウジョウバエの体色変異と行動変異に関わるドーパミン代謝系遺伝子群のシス発現解析

キイロショウジョウバエの自然集団では体色に多型が見られるが、ドーパミンの代謝系であるメラニン合成系に関連する遺伝子のうち、*ebony* のシス領域の DNA 塩基配列変異に伴う遺伝子発現量の変異が、これら体色多型の形成に関わることが知られている (Takahashi et al. 2007; Rebeiz et al. 2009)。

本研究では新たに開発した方法により、メラニン合成系遺伝子群のシス因子により制御された遺伝子発現量 (シス発現量) の定量解析を行った。定量には、標準系統とかけ合わせた F<sub>1</sub> 個体を用い、PCR 増幅したアンプリコンを次世代シーケンサーで読み、得られたリード数をアレル間で比較する方法を用いた

(図2)

この方法により得られたアンプリコンシーケンスデータを解析した結果、*ebony* のシス発現量変異にはコアエンハンサー領域として知られていた領域の外に位置する複数のシス領域にある塩基配列変異が関わること、またこれら複数のシス領域が体色適応に伴い集団内で協調的に進化してきた可能性を明らかにした。このように、シス遺伝子発現制御領域の種内塩基配列変異の詳細な解析結果から、シス遺伝子発現制御配列の種内での進化様式は、これまで種間のシス遺伝子制御配列の進化モデルになってきた、モジュール型エンハンサーが独立に変化していく進化様式とは、対照的なパターンであることを明らかにすることができた(Miyagi et al. 2015, Molecular Ecology)。

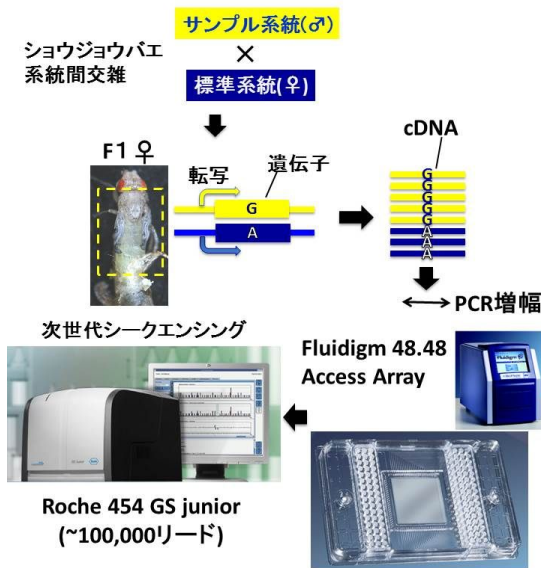


図2. アンプリコンシーケンスを利用したアレルを区別した遺伝子発現定量法

更にこの複数の領域に散在した変異の中には、脳での発現にも影響を与えると考えられるものが含まれていた。*ebony* の脳での発現は日周活動性と関連が強いことが知られており、アクトグラムを比較した結果、この変異を持つ系統は性行動に影響を与える日周活動性リズムがやや弱いことが示された。このことより、体色と性行動の両方に影響を与える可能性のある突然変異が、自然集団内に実際に存在することが示唆されたことは、多面発現遺伝子を介したゲノム間の軋轢の一端をあらわす結果であると考えられる。

また、上記アンプリコンシーケンスによる方法について、北野班とのイトヨに関する共同研究にも同様の方法を用い、その成果について論文を発表した(Yoshida et al. 2016, Ecological Evolution)。

## (2) キイロショウジョウバエ体色変異と関連

## する生態的要因の解析

体色変異は、行動の他にも多くの生理的状态と関連が深いことが明らかとなった。本研究により、体色変異に關与する *ebony* 遺伝子をノックダウンした体色の濃い個体は、これまでの常識的見解に反して、乾燥耐性が低く、脱水スピードが速いことが分かった。また、これまで知られていなかった体色と飢餓耐性についても強い関係性があることが相關解析により示唆された (Sunaga et al. 2015, GGS)。

## (3) キイロショウジョウバエ集団内アレルサンプルを用いたトランスクリプトーム解析

キイロショウジョウバエ自然集団由来(DGRP)のアレルサンプルについて、その発現変異を調べるため、各 18 系統をまず標準系統に掛け合わせ、得られた F<sub>1</sub> ヘテロの状態を発現量を定量した(図3)。DGRP 系統は、ゲノム情報が公開されているため、そこから得られる SNP 情報を利用してアレルを区別した。雌雄別々に、頭部と胸腹部の RNA サンプルを抽出した後、HiSeq2000 による RNAseq から得られたシーケンスリードデータについて解析を行った。

この解析は、これまで行われてきた一組の親系統とその F<sub>1</sub> ヘテロを用いた解析ではなく、図3に示した通り、同じアレルを持つ標準系統にサンプル(DGRP)系統それぞれを掛け合わせて F<sub>1</sub> 個体を得るといった交配デザインに特徴がある。このような交配デザインによる掛け合わせにより生じた F<sub>1</sub> ヘテロのアレル毎の発現量を定量し、その分散を比較することにより、遺伝子発現変異に対するシス、及びトランス変異量を推定することができた。このような交配デザインにより、シス、トランス遺伝子制御効果を区別して推定する試みを行ったのは、本研究が初めてであった。

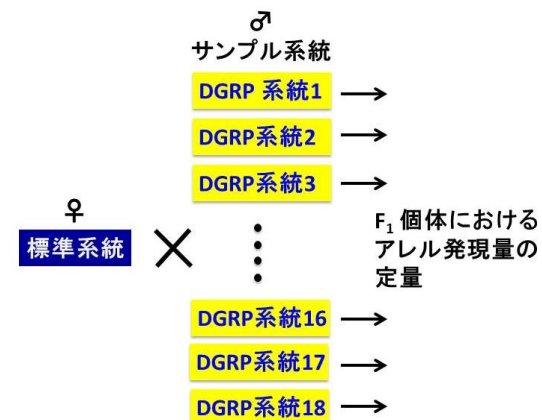


図3. シス・トランス遺伝子制御効果を定量するための交配デザイン

このような新たな方法によるアレル発現データ解析の結果、これまでの見解同様、種内トランスクリプトームに対するシス遺伝子制御の貢献度は、トランスのそれと比べて大きいことが示された。またこれまで全く解析されてこなかったトランス変異量について、ローカルな組み換え率と負の相関があることや、シス変異量は遺伝子の複製タイミングとも関連があることなどが明らかとなった。

更に、近傍領域のトランスポゾンの挿入頻度と卵巣発現遺伝子のシス変異量の間に正の相関があることから卵巣特異的な転写とトランスポゾン挿入の関係性が明らかとなった。また、雌雄の遺伝子発現相関と性バイアス遺伝子発現との関係性も示されるなど、ゲノム因子の間の様々な相関が浮き彫りとなった (Osada, Miyagi, Takahashi, in preparation)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 34 件)

Sunaga, S., Akiyama, N., Miyagi, R., and \*Takahashi, A. Factors underlying natural variation in body pigmentation of *Drosophila melanogaster*. **Genes Genet. Syst.** (in press) 査読有

<http://doi.org/10.1266/ggs.15-00061>

Miyagi, R., Akiyama, N., Osada, N., and \*Takahashi, A. Complex patterns of cis-regulatory polymorphisms in *ebony* underlie standing pigmentation variation in *Drosophila melanogaster*. **Mol. Ecol.** 24: 5829-5841 (2015) 査読有

DOI: 10.1111/mec.13432

\*Takahashi, A. Pigmentation and behavior: potential association through pleiotropic genes in *Drosophila*. **Genes Genet. Syst.** 88:165-174 (2013) 査読有

<http://doi.org/10.1266/ggs.88.165>

\*Takahashi, A., Fujiwara-Tsujii N., Yamaoka R., Itoh M., Ozaki M. and Takano-Shimizu T. Cuticular hydrocarbon content that affects male mate preference of *Drosophila melanogaster* from West Africa. **Int. J. Evol. Biol.** 2012: Article ID 278903 (2012) 査読有

<http://dx.doi.org/10.1155/2012/278903>

\*Takahashi, A. and Takano-Shimizu T. Divergent enhancer haplotype of *ebony* on inversion *In(3R)Payne* associated with pigmentation variation in a tropical population of *Drosophila melanogaster*. **Mol. Ecol.** 20: 4277-87 (2011) 査読有

DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05260.x

[学会発表] (計 58 件)

Takahashi, A. Nucleotide polymorphism and physiological diversity underlying

pigmentation variation in *Drosophila melanogaster*. Symposium 31: "Melanism" at 2015 Meeting of the European Society of Evolutionary Biology. Lausanne (Switzerland), Aug. 14, 2015.

Osada, N., Miyagi, R., Takahashi, A. Quantification of cis-regulatory variation in *Drosophila melanogaster*. International Symposium: "Establishing Next-Generation Genetics". Nara Kasugano International Forum (Nara-ken, Nara-shi), May 28, 2015.

Takahashi, A. Genome-wide expression analyses using allelic samples from *Drosophila* Genomic Resource Panel constructed from a natural population of *Drosophila melanogaster*, The 2<sup>nd</sup> Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference, Seoul (Korea), May 13, 2013

Takahashi, A. Association between Color and Behavior due to Expression Variants of a Pleiotropic Gene, *ebony*, in *Drosophila*. The 8<sup>th</sup> Okazaki Biological Conference, Okazaki Conference Center (Aichi-ken, Okazaki-shi) March 21, 2012

Takahashi, A. (2011) Association between Color and Behavior in *Drosophila*. Society for Molecular Biology and Evolution, Kyoto University (Kyoto-fu, Kyoto-shi), July 27, 2011

[図書] (計 8 件)

高橋文、国立遺伝学研究所編、悠書館『遺伝子が語る生命 38 億年の謎-なぜ、ゾウはネズミより長生きか?』第 7 章「遺伝子多型の謎-ABO 式血液型はなぜ生き残ったのか?」227(pp.70-79) (2014)

長田直樹、勁草書房『ヒトは病気とともに進化した』第 2 章「ダーウィンの視点を越えて」232(pp.21-65) (2013)

高橋文、日本生態学会編、共立出版『エコゲノミクス - 遺伝子からみた適応 -』第 15 章「生殖隔離と種分化遺伝子」302(pp.231-245) (2012)

[その他]

ホームページ等

新学術研究領域「ゲノム・遺伝子相関」HP  
<http://www.ige.tohoku.ac.jp/prg/genetics>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 文 (TAKAHASHI, Aya)

首都大学東京理工学研究科・理工学研究科・准教授

研究者番号: 90370121

(2) 研究分担者

長田直樹 (OSADA, Naoki)

北海道大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号: 70416270