

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14803

研究課題名(和文)体サイズの進化に伴って変化する性質と独立な性質：遺伝子改変線虫を用いて

研究課題名(英文) Traits changing associated with the evolution of body size

研究代表者

河田 雅圭 (KAWATA, MASAKADO)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：90204734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年発見された*C. elegans*の姉妹種である*C. inopinata*を用いて、体長の進化に寄与した遺伝子を特定することを目的とした。二種間で大きな体長の差が生じるL4幼虫期と成虫期で、発現パターンが、種間で異なる遺伝子として2699遺伝子が検出された。6種の線虫のうち、*C. inopinata*の系統でのみ正の選択圧が42の遺伝子で検出され、その中に、*daf-2*があった。*daf-2*は細胞膜で発現するインスリン受容体で、*C. elegans*の変異体は体サイズが大きくなることが知られ、*daf-2*遺伝子の進化が体サイズの進化に対して大きな影響をもつ可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We purpose to determine candidate genes responsible for the evolution of larger body size of *C. inopinata*. *C. inopinata* became larger during developmental L4 to adult stages comparing with *C. elegans*. Then, we detected 2699 genes which expression patterns differed between *C. inopinata* and *C. elegans*. We also detected 42 genes which have been subject to positive selection during the evolution of *C. inopinata* from other related species. Among them, *daf-2* could be detected and this gene encodes the insulin-like growth factor 1 receptor and variant of *def-1* in *C. elegans* became larger. Thus, the results suggest that *daf-2* is as an important genes affecting the evolution of large body size of *C. inopinata*

研究分野：進化生態学

キーワード：体サイズ進化 線虫

1. 研究開始当初の背景

体サイズの大きい種ほど、より摂食量が増え、代謝率が増加し、大きな子どもを産み、寿命が長くなるなど、体サイズの進化は生態学的に重要な様々な性質に影響する。生態学・進化学において、体サイズとのアロメトリックな関係や体サイズとのトレードオフなどに関して重要なテーマとして様々な研究がなされてきた。しかし、体サイズの進化に伴って変化する様々な性質は、物理的・生理学的な制約、遺伝子の多面発現など体サイズの変化と必然的な制約で変化するのか、体サイズとは独立に進化したのかを区別することは困難である。これらの問題を解明することは、近縁種間あるいは個体群間で、体サイズが大きく異なる生物を用い、遺伝子操作でサイズを変化させることができれば可能である。

線虫 *Caenorhabditis elegans* は、生物学の様々な分野での重要な実験モデル生物として用いられている。しかし、生態学的な研究は少なく、生態学の材料としてはあまり用いられていなかった。これまで、*Caenorhabditis* 属には、何種か記載されているが、*C. elegans* と特に近い種は知られていなかった。しかし、近年、日本の石垣島で、*C. elegans* と姉妹グループを構成する *C. inopinata* が発見された(図1)。この線虫は、オオバイヌピアの花序の中で発見され、体長が *C. elegans* の 1.5 から 2.5 倍もあり、他の様々な特徴が異なっているが、詳しい生態調査は他グループによって現在進行中である。*C. inopinata* は *C. elegans* と極めて系統的に近いことから、この種がもつ生態的な特徴の進化的機構を *C. elegans* での知見や技術を利用して解明することが可能になるとと思われる。



図1. *C. elegans* と *C. inopinata*

2. 研究の目的

本研究では、体長の進化にともなって進化する性質の関係を明らかにするために、まず *C. inopinata* と *C. elegans* を用いて、体長の進化に寄与した遺伝子を特定することを目的とした。そのために、(1)2種の成長を比較し、体長の変化が大きく生じる発育段階を特定する。(2)特定した、発育段階の個体を用いて RNA-seq を実施し、2種で異なる発現を示す遺伝子を特定する。(3)線虫6種の遺伝子配列を用いて、*C. inopinata* で正の選択を受けた遺伝子を特定する。

3. 研究の方法

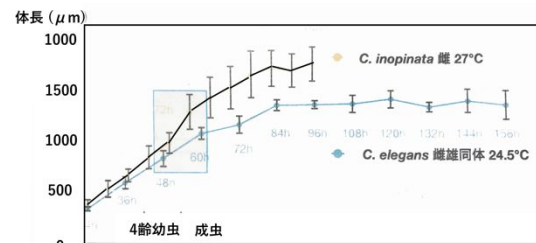
(1) *C. elegans* の雌雄同体個体、姉妹グループを構成する *C. inopinata* 姉の雌個体を用いて、12時間ごとに、体長を測定し、2種の成長を比較した。(2)4齢幼虫期と成虫期の間で2種の体長が大きくことなるため、この2つの発育段階の個体から RNA を抽出し、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を実施した。(3) *C. inopinata*, *C. elegans*, *C. brenner*, *C. iremanei*, *C. briggsae*, *C. nigoni* 6種をもいてオーソログが取得できた 9835 遺伝子について、PAML の枝サイトモデルを使用し、*C. inopinata* で進化速度の速い遺伝子を検出した。

4. 研究成果

C. inopinata と *C. elegans* 成長

二種は孵化直後や幼虫期には大きな体長の差はみられなかったが、4 齢幼虫から成虫への成長時に *C. inopinata* が急速に成長し、二種間で大きな体長の差が生じた(図2)。

図2. *C. elegans* と *C. inopinata* の成長曲線



RNA-seq によるトランスクリプトーム解析

L4 幼虫期と成虫期で、ともに *C. elegans* の方が発現量の多い遺伝子群として 2277 遺伝子が検出された。有意な GO term として、translation, regulation of cell shape, metabolic process, regulation of cell proliferation などが検出された。L4 幼虫期と正中期で、ともに *C. inopinata* の方が発現量の多い遺伝子群として 2423 遺伝子が検出された。有意な GO term として、multicellular organism development, cell cycle, negative regulation of vulval development などが検出された。L4 幼虫期と成虫期で、発現パターンが、種間で異なる遺伝子として 2699 遺伝子が検出された。GO term として、oxidation-reduction process, regulation of cell shape, metabolic process, phosphorylation などが検出された。体サイズを抑制あるいは促進する遺伝子として、*lon-1*, *lon-3*, *lon-8*, *sma-5*, *sma-4*, *sma-10* などが検出された(図3)

C. inopinata で正の選択を受けた遺伝子

342 遺伝子で選択圧が検出された(q-value < 0.05)。Enrichment 解析の結果、複数の GO term が取得できた(表1)。

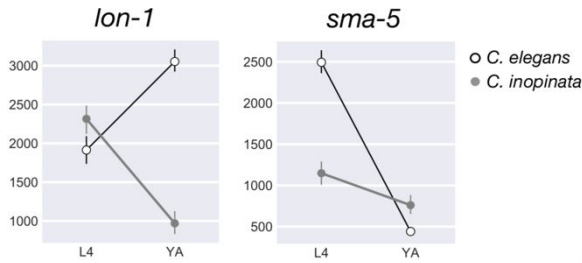


図 3. L4 幼虫期と成虫期で、発現パターンが、種間で異なる遺伝子。lon-1:体サイズ成長を抑制する、sma-5:体サイズ成長を促進す

表 1 C. inopinata で選択を受けた遺伝子の GO term.

-
- Negative regulation of vulval development
- reproduction
- locomotion
- body morphogenesis
- response to heat
- determination of adult lifespan
- dauer larval development
- negative regulation of transcription from RNA polymeras II promoter
- hermaphrodite genitalia development

検出された遺伝子として daf-2, sma-9, pdk-1, let-363 などがあった。daf-2 は細胞膜で発現するインスリン受容体で、C. elegans の変異体は体サイズが大きくなることが知られている。daf-2 は MARK signaling pathway, FoxO signaling pathway, Longevity regulating pathway, mTOR signaling pathway の上流に位置する。また、pdf-1 は daf-2/insulin 経路の下流に位置する。daf-2 で検出されたサイトは機能的に重要なサイトであった(表 2)。

表2. daf-2で選択を受けたアミノ酸サイトと機能的に重要なサイト

アミノ酸番号	1098	1099	1100	1106	1132
C. inopinata	S	V	K	M	N
C. elegans	P	P	T	I	G
C. brennneri	P	P	Q	I	G
C. remanei	E	P	T	I	G
C. nigoni	H	P	D	V	G
C. briggsae	H	P	D	V	G
Provean_Score	-0.635	-8.625	0.469	-2.739	0.133
機能的に重要なサイト		*		*	
選択圧の検出されたサイト		*			*

考察

L4 期から成虫期にかけて、C. elegans では、繁殖に関わる遺伝子群や、アポトーシスに関連する遺伝子群がより発現していた。また、C. inopinata では、産卵口形成を抑制する遺伝子群の発現量が全体的に高くなっており、EGF、IGF などの成長因子の受容体が多く発現していた。これらのことは、この時期の C. inopinata が、C. elegans と比べて、繁殖より成長に投資していることを示しているかもしれない。また、発現パターンが種間で異

なる遺伝子群として、酸化還元プロセス、代謝、リン酸化など、生体における基本的な反応に関連する遺伝子群が多く検出された。

選択の検出では C. inopinata 系統でのみ進化した遺伝子として、生殖器形成に関連する遺伝子群が多く検出され、生殖器形成に関して何らかの進化をしていると考えられる。また、選択圧が検出された daf-2 遺伝子に関して、先行研究より、インスリンの受容体であり、複数のシグナル伝達経路の入力部分を担っていること、C. elegans の daf-2 変異体系統は、体サイズが大きくなる傾向があること、また、選択圧が検出されたサイトに、機能的に意味があると予測されるものがあることから、daf-2 遺伝子の進化が体サイズの進化に対して大きな効果量をもつ可能性が示唆された daf-2 は、多くの遺伝子シグナル経路の上流に位置することから、この遺伝子に選択をうけ、C. inopinata で体サイズが大きく進化した可能性がある。今後は、daf-2 の遺伝子編集あるいは RNAi による遺伝子ノックアウトなどで表現型の変化を確かめる必要がある。

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 2 件)

- ①Takahashi, Y, R. Tanaka, D. Yamamoto, S. Noriyuki and M. Kawata (2018) Balanced genetic polymorphism improves a population fitness. **Proceedings of Royal Society of London B** 285: 20172045 DOI: 10.1098/rspb.2017.2045
- ②Kanzaki et al. ... A. Sugimoto and T. Kikuchi. (著者 25 名中 24 番目責任著者) Discovery, biology and genome of Caenorhabditis inopinata, a sibling of C. elegans. **Nature Communications** (in press)

[学会発表](計 2 件)

稲田垂穂(代表)・津山研二・牧野能士・杉本亜砂子・河田雅圭、体サイズ進化の遺伝基盤 | モデル生物 C. elegans と近縁種 C. inopinata の比較」第 65 回日本生態学会大会, 2018 年

稲田垂穂・津山研二・牧野能士・杉本亜砂子・河田雅圭、Caenorhabditis 属における体サイズの進化、日本進化学会第 19 回大会, 2017 年

6. 研究組織

(1)研究代表者

河田 雅圭 (KAWATA, Masakado)

東北大学・生命科学研究科・教授
研究者番号：90204734

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
杉本 亜砂子 (SUGIMOTO, Asako)
東北大学・生命科学研究科・教授
研究者番号：80281715

牧野 能士 (MAKINO, Takashi)
東北大学・生命科学研究科・准教授
研究者番号：20443442

丸山 真一郎 (MARUYAMA, Shinichro)
東北大学・生命科学研究科・助教
研究者番号：50712296

横山 潤 (YOKOYAMA, Jun)
山形大学・理学部・教授
研究者番号：80272011

(4)研究協力者
なし