

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23247004

研究課題名(和文)表現型可塑性：生態学と分子発生学の統合的研究

研究課題名(英文) Phenotypic Plasticity: integrative study of ecology and molecular developmental biology

研究代表者

西村 欣也 (Nishimura, Kenya)

北海道大学・水産科学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30222186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,300,000円

研究成果の概要(和文)：北海道の固有種であるエゾサンショウウオ(*Hynobius retardatus*)の幼生は、捕食者生物、餌生物、同種幼生の存在に呼応して生態学的機能を有する表現型可塑性を示す。そのため、進化生態学、発生生物学を融合する研究の優れたモデル生物である。本研究では、エゾサンショウウオ幼生が捕食者生物存在下、餌生物存在下で可塑的に発現される形態変化について、幾何学的形態解析法を用いて定量的に明らかにし、その分子発生学的メカニズムを調べる出発点として形態変化と関連するゲノム情報の探索を行った。さらに、生息域全域を網羅する5地域集団間で、表現型可塑性に伴う形態変化の反応規範と、遺伝マーカーの変異を調べた。

研究成果の概要(英文)：The Hokkaido salamander (*Hynobius retardatus*) is an endemic species inhabiting in Hokkaido Japan. Larvae of the Hokkaido salamander exhibit phenotypic plasticity that associate with defense against predators, offense to prey and conspecific larvae. The larval phenotypic plasticity is an eligible phenomenon for the integrative study of evolutionary ecology and molecular developmental biology.

In this project, I tried to investigate, (1) morphological changes associated with the phenotypic plasticity by geometric morphometric analysis, (2) the genomic information about the morphological changes with the phenotypic plasticity by a RNAseq analysis, and (3) variations of morphology and morphological changes (developmental reaction norm) and microsatellite polymorphism among five local populations in the whole distribution area of the endemic species.

研究分野：進化的行動生態学

キーワード：エゾサンショウウオ 表現型可塑性 トランスクリプトーム解析 表現型多形

1. 研究開始当初の背景

捕食-被食は生物間の最も重要な相互作用である。進化的には個体の表現型を作り出す強い選択圧であり、生態的には個体群の数の変動や、生物群集の種の構成や安定性に関係する。たいていの動物は、捕食者による攻撃の危険や餌を利用する機会に、行動や生理状態が何らかのかたちで臨機応変に反応する能力を有するが、形態を可塑的、臨機応変に対応させる能力は有していない。そのため、捕食危機や餌を得る状況で、防御や攻撃の機能を有する形態が可塑的に発現する生物については、その生態、進化の背景や、発現のメカニズムの探求に興味が注がれる。ある種のミジンコ、淡水魚、繊毛虫、節足動物(フジツボ)、両生類でそうした形態の可塑性が知られており、生態学的研究が行われ、その進化のメカニズムについての推論がなされてきた。しかしながら、形態発現を駆動させる内分泌組織の応答メカニズムや、とり分け、それらの仕組みを裏打ちする遺伝情報の構成についての研究は、これまで全くの手づかずの状況にあった。近年、次世代シーケンサーをはじめとした様々な解析技術の革新に伴い、進化生態学的研究で手詰まりとなっていた状況を打開できるようになってきた。

エゾサンショウウオ (*Hynobius retardatus*) は、北海道に分布棲息する固有種で、孵化直後からの発生成長期間に幼生は、捕食者生物、餌生物、同種幼生の存在に呼応して生態学的機能を有する表現型可塑性を示す。捕食者であるトンボのヤゴが存在する棲息環境では、尾鰭が顕著に高さを増した形となる。そうした尾鰭の形によって、遊泳力が増して捕食者から逃れる機能が増すと考えられている。エゾアカガエル (*Rana pirica*) のオタマジャクシが存在するとそれを餌として成長する。その際、オタマジャクシを丸呑みするのに適正した大顎となる。確立した形態は、観察者が視覚によって主観的に

見極めることができる。

形態変化は、組織、器官の位置ごとの発達の違いや、新たな組織の形成や、既存組織の退化などによって幾何学的には不均一な変化であり、その様相を定量的に把握することは難しいため、適当な部位の長さの比などの簡易的な方法によってとらえられている。エゾサンショウウオの尾鰭や頭部の形態変化の評価も、長さとの比によるものであった。しかし、発生過程や形態誘導の刺激-応答を調べる場合、長さ比によって形変化を弁別することは困難である。

2. 研究の目的

本研究プロジェクトでは、エゾサンショウウオ幼生の表現型可塑性について、(1) 形態変化の反応規範(Reaction Norm)を定量的に捉える。(2) 形態発現の関連遺伝子をスクリーニングする。(3) 形態とその反応規範の地域変異と系統地理的關係を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 同種個体の高密度環境で生じる形態可塑性の反応規範を対象として、生じる形態変化を幾何学的形態解析法(Geometric Morphometrics, GM)によって定量的に解析した。10個の水槽を用い、各水槽に孵化直後の幼生を30個体入れ、12日間飼育し、その間に起こった共食いの件数を記録した。生き残った個体をデジタルカメラにより写真撮影した。個体の像に形を捉えるためのマークを付し(図

1)、形と大きさをGMによって解析し、各水槽中の集団における形態の分化と共食いの関

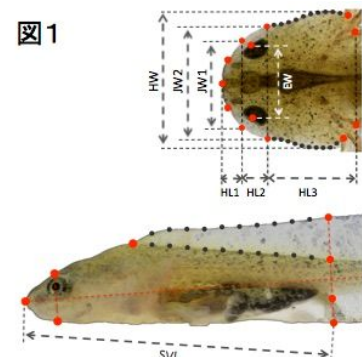
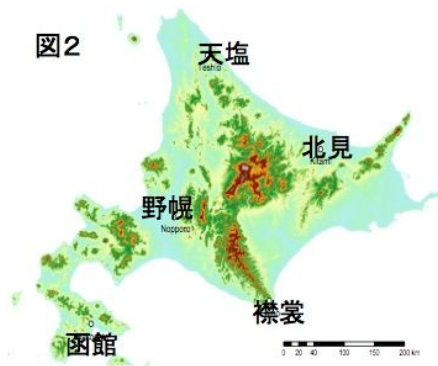


図1

係を調べた。

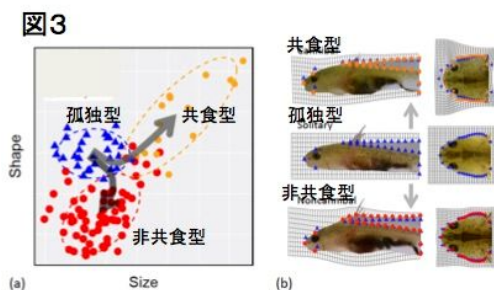
(2) 多様な環境状況、生活ステージで飼育した幼生から RNA を抽出し、次世代シーケンサーにより cDNA ライブラリーを作成し、捕食者生物(ヤゴ)存在下、餌生物(オタマジャクシ)存在下で形態発現した幼生の遺伝子の発現量を調べるための RNAseq を行い、組織部位ごとに、それぞれの形態発現の関連遺伝子のスクリーニングを行った。

(3) 生息域全域を網羅する 5 地域から卵塊を採集し(図 2)、孵化幼生を餌生物であるオタマジャクシを利用できる環境で飼育した。発生成長に伴い生じる形態変化を GM 解析法によって分析した。また、5 地域集団について利用可能なマイクロサテライト多型マーカーの探索を行い、それらを用いて地域集団間の系統関係を調べた。



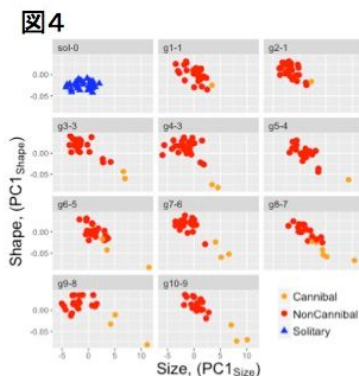
4. 研究成果

(1) 共食が起こった集団の個体の形態を、単独で生育した個体の形態と比較した。図 3 の左図の横軸は個体のサイズ変数、縦軸は形態解析によって得られた形の要約変数である。図 3 の右図は、単独飼育した個体の形(孤独型)を基準として、共食環境での 2 型化における共食型と非共食型の個体の形の変化



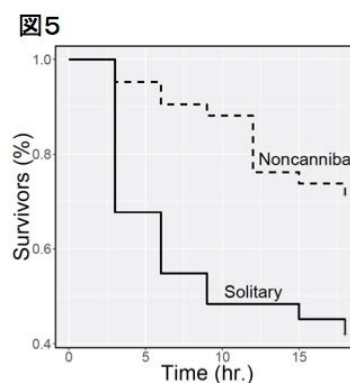
を示したものである。2 型化では、共食型が大顎化により形態を変化させ大型化するばかりでなく、非共食型は、孤独型と体サイズが同じでも異なる形となっていることが分かった。

集団中の共食件数と 2 型分化の程度に関連があるかを調べた。図 4 中の小グ



ラフの横軸は体サイズ変数、縦軸は形の要約変数である。小グラフは、左上隅から右へ、共食件数が少なかった水槽から多かった水槽の順に並べてある。左上隅の小グラフは単独飼育の孤独型の様子である。共食件数が多いほど、集団の形とサイズの 2 型化が進行することが示された。

非共食型と孤独型について、共食型個体と 1 対 1 にして生存能力を測ったところ、非共食型は生存能力が高いことが分かった(図 5)。



(2) 尾鰭、外鰓、脳、脳以外の頭部の各組織部位毎、環境ごとに、遺伝子の発現量を調べた。例えば、外部環境に対する周辺組織の応答を制御する脳において、対象区(コントロール)環境に比して、捕食者生物存在環境、餌生物存在環境で特異的に発現量が変化した遺伝子(Differentially Expressed Genes, DEG)は、それぞれ、605、103 だった。そのうち 39 の DEGs は、2 つの環境で共通していた。

そのうち 29 遺伝子は発現量が増加、8 遺伝子は抑制、2 遺伝子は変動的なパターンを示した。

脳以外の周辺組織における餌生物存在環境での DEGs の数の関係は図 6 の通りとなった。周辺組織において、共通に変化した 14 の DEGs が検出された(図 6)。Gene ontology analysis によると、それらは形態形成や異化作用に関連する遺伝子だった。

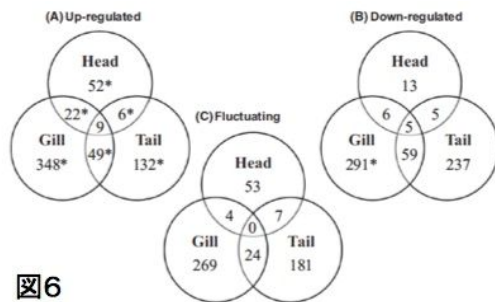
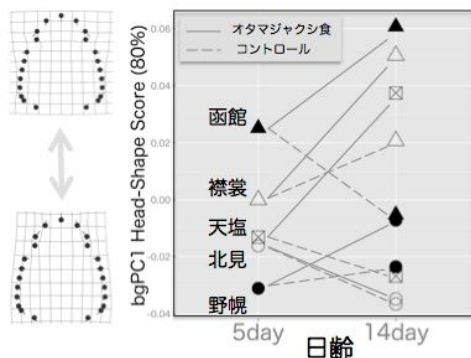


図6

捕食者存在下の DEGs の数は、餌生物存在下のおおよそ 5 倍だった。他の両生類でも知られている誘導防御形態と同様、エゾサンショウウオ幼生の防御形態の誘導も、攻撃形態の誘導に比して迅速なため、素早く多くの組織改編が実行され、関与する遺伝子数が多いのだと推察される。捕食者存在下では、ストレスホルモンのシグナル応答に関連した遺伝子の増加が見られたことは、特筆すべき知見だった。

図7

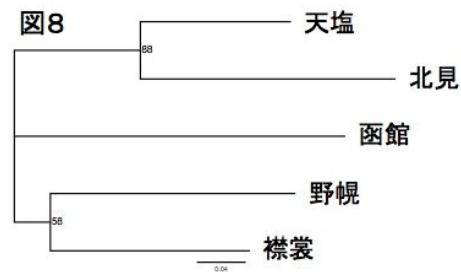


(3) エゾサンショウウオ幼生の孵化時の形態と、環境条件に呼応する形態変化の反応規範は、北海道の生息域全域からの 5 地域において変異を示した(図 7)。図 7 の縦軸は形の要約変数である。軸の上ほど大顎的な形である

ことを示している。

5 地域とも、オタマジャクシを餌とするとコントロール(アカムシ食)に比べ、大顎形態となることは共通している。孵化直後(5 日齢)の形と、それを起点とする 14 日齢の 2 つの発生形態への反応規範は多様だった。函館集団、襟裳集団は孵化直後から大顎傾向で、オタマジャクシ食でさらに大顎化した。14 日齢において、函館集団ではコントロールでは大顎性は減退するが、襟裳集団では大顎性は促進された。現時点で、これら形態と反応規範の変異性の進化的発達を直接探ることはできない。

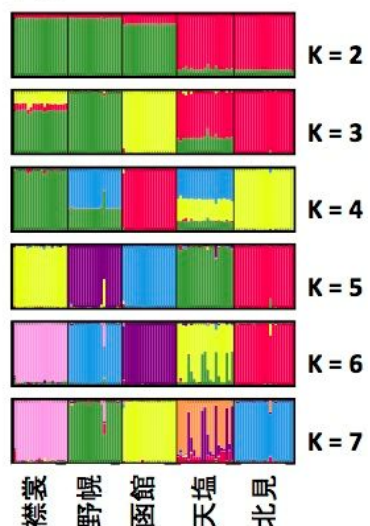
図8



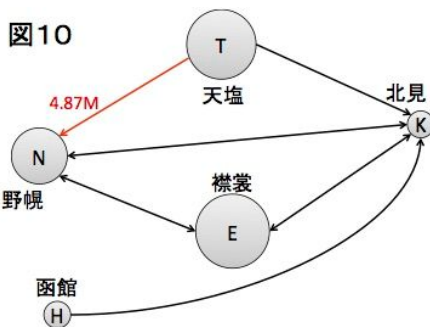
これら 5 地域集団の遺伝的関係と地誌的考察を行うため、マイクロサテライトマーカーを用いて系統関係の解析を行った。5 地域集団に対して 12 の多形マーカーが利用可能であった。5 地域集団、合計 103 個体についてマーカー配列を調べた。座位当たり平均 8.667 個の対立遺伝子が存在した。集団間の遺伝距離は、Nei's D_A で 0.613 から 1.166 だった。Nei's D_A に基づく系統樹は図 8 の通りである。

図9

地域集団を幾つのもとりと見るべきか、集団構造解析を行った。その結果、5 地域集団はそれぞれ別々の遺伝子集団とみ



なすことが儉約的に適切であることが分かった(図9で $K=5$ で最も集団間で色の混合が少ない)。さらに $K=2$ でも、上位のまとまりとして、襟裳+野幌+函館と天塩+北見で集団を比較的うまくまとめて分けられた(図9参照)。



Coalescent 理論から、有効集団サイズと集団間の移住率を推定した。図10で丸の大きさが有効集団サイズを相対的に表している。天塩集団から野幌集団へ極めて大きな遺伝子流入があったことが推定された(図中の単位 M は、移出入効果を突然変異率で規格化したものである)。

むすび - エゾサンショウウオ幼生が、捕食者生物による危機や餌生物の利用機会に、表現型可塑性の能力によってどのように形態を応答させるかを定量的に把握した。新たなゲノム解析技術により、形態発現を制御している責任遺伝子のスクリーニングを行った。表現型可塑性の地域変異とその系統地理関係について明らかにした。

本研究から以下のような、数々の科学的に重要な発展的課題が提出される。形態変化を引き起こす体外からのシグナル(化学シグナル、物理シグナル)は何か。シグナルの受容と情報伝達のメカニズムは何か。形態を作り出す組織構造はどう変化するのか。こうした形態可塑性の仕組みが遺伝子にどうコードされているのか。どのような進化ダイナミクスによってこの仕組みができたのか。

バイオインフォマティクスを始めとする基盤的生物学を活用し、進化生態学と分子発生学を統合したさらなる研究展開が必要で

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 5件)

Matsunami, M., Igawa, T., Michimae, H., Miura, T., and Nishimura, K. (in press) Population structure and evolution after speciation of the Hokkaido salamander (*Hynobius retardatus*). PLoS One (peer-reviewed)

Matsunami, M., Kitano, J., Kishida, O., Michimae, H., Miura, T., and Nishimura, K. (2015) Transcriptome analysis of predator- and prey-induced phenotypic plasticity in the Hokkaido salamander (*Hynobius retardatus*). Molecular Ecology (peer-reviewed) 24: 3064-3076.

Matsunami, M., Igawa, T., Nozawa, M., Michimae, H., Miura, T., and Nishimura, K. (2015) Development and characterization of 12 micro satellite markers for the Hokkaido salamander (*Hynobius retardatus*). Current Herpetology (peer-reviewed) 23: 177-181.

Mori, T., Yanagisawa, Y., Kitani Y., Sugiyama, M., Kishida, O., and Nishimura, K. (2015) Gene expression profiles in *Rana pirica* tadpoles following exposure to a predation threat. BMC Genomics (peer-reviewed) 16: 258-274 doi: 10.1186/s12864-015-1389-4.

Mori, T., Kitani, Y., Ogihara J., Sugiyama, M., Yamamoto G., Kishida, O., and Nishimura, K. (2012) Histological and MS spectrometric analyses of the modified tissue of bulgy form tadpoles induced by salamander predation. Biology Open (peer-reviewed) 15: 308-317 doi: 10.1242/bio2012604.

[学会発表](計 11件)

松波雅俊、北野潤、岸田治、道前洋史、三浦徹、西村欣也 (2016) エゾサンショウウオにおける表現型可塑性の地域集団比較 日本生態学会 2016/3/20-24 東北大学(宮城県、仙台市)

松波雅俊、北野潤、岸田治、道前洋史、三浦徹、西村欣也 (2015) 被食者・捕食者によって引き起こされるエゾサンショウウオ幼生の表現型可塑性についてのトラ

ンスクリプトーム解析 日本進化学会
2015/8/20-23 中央大学 (東京都、文京区)

Nishimura, K. (2015) Integrative shape variations in phenotypic plasticity. European Society of Evolutionary Biology ESEB 2015/8/10-15 Lausanne (Swiss)

松波雅俊、北野潤、岸田治、道前洋史、三浦徹、西村欣也(2014) 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 2014/8/21-23 高槻現代劇場 (大阪府、高槻市)

Nishimura, K. (2014) How does shape, a higher dimensional trait, tell us the organismal adaptive evolution? The joint annual meeting of JSMB/SMB 2014/7/28-8/1 大阪国際会議場 (大阪府、大阪市)

西村欣也 (2014) エゾサンショウウオ幼生の表現系可塑性による部位の形態解析 日本生態学会 2014/3/14-18 広島国際会議場 (広島県、広島市)

道前洋史、西村欣也 (2014) 音響情報を引き金とする表現系可塑性 日本生態学会 2014/3/14-18 広島国際会議場 (広島県、広島市)

松波雅俊、北野潤、岸田治、道前洋史、三浦徹、西村欣也(2013) 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 2013/8/28-31 筑波大学 (茨城県、つくば市)

Nishimura, K. (2013) Modularity of polyphonic developmental reaction norm. ESEB 2013/8/19-24 Lisbon (Portugal)

Matsunami, M., Kishida, O., Kitano, J., Michimae, H., Miura, T., and Nishimura, K. (2013) Transcriptome analysis of predator- and prey-induced phenotypic plasticity in the Hokkaido Salamander (*Hynobius retardatus*) ESEB 2013/8/19-24 Lisbon (Portugal)

西村欣也 (2013) エゾサンショウウオ幼生の可塑的形態の形態計測学的分析 日本生態学会 2013/3/5-9 静岡コンベンションセンター (静岡県、静岡市)

〔図書〕(計 1 件)

Nishimura, K. (in press). Kleptoparasitism and Cannibalism. 2nd.

Ed., in Breed, M. D. & Moore, J.(eds) Encyclopedia of Animal Behavior, vol.2. Academic Press.

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 欣也 (NISHIMURA Kinya)
北海道大学・水産科学研究院・准教授
研究者番号：30222186

(2) 研究分担者

三浦 徹 (MIURA Toru)
北海道大学・地球環境科学研究院・准教授
研究者番号：00332594

岸田 治 (KISHIDA Osamu)
北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授
研究者番号：00545626

道前 洋史 (MICHIMAE Hirofumi)
北里大学・薬学部・助教
研究者番号：70447069

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：