

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370011

研究課題名(和文) 交尾器進化による種分化：種間差をもたらす性選択と遺伝子

研究課題名(英文) Speciation by genital evolution: sexual selection and genes producing species differences

研究代表者

曾田 貞滋 (Sota, Teiji)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00192625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では「性選択を介した交尾器形態の進化による種分化」のシナリオを検証するために、オオオサムシ亜属を研究対象とし、交尾器形態への性選択の検証と、交尾器形態の種間差をもたらす遺伝子に関する研究を行った。種内で交尾器の機能部分に大きいサイズ変異を示す2集団を用いた交尾実験では、精子競争に関する雌雄交尾器サイズのマッチングに選択がかかることが分かり、交尾器の長大化に関しては性的対立もしくは異種との繁殖干渉を考慮する必要があると示唆された。交尾器形態が大きく異なる姉妹種のトランスクリプトーム比較においては、発現量が種間で異なる遺伝子の中には交尾器形態の種間差に関する有力な候補遺伝子は見出されなかった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to reveal sexual selection for exaggerated genital morphology and genes related to species-specific genital morphology in the ground beetle group *Ohomopterus*, which exhibited a marked interspecific divergence in shape and size in male and female genitalia. In an experiment to study selection on genital size using within-species variations, matching in genital sizes between the sexes was favored for sperm competition, and it was suggested that sexual conflict or reproductive interference with another species needs to be considered for an explanation of exaggeration of genital morphology. In a comparison of transcriptomes between two sister species with marked differences in genital morphology, some genes with differential expressions between the species were found, but these were unlikely to be the genes affecting species-specific genital morphology.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 生態・環境

キーワード：性選択 交尾器 種分化 適応 精子競争 性的対立 トランスクリプトーム 遺伝子発現比較

1. 研究開始当初の背景

性選択は生物の形質多様化に大きく影響を及ぼしていると考えられているが、生物の種分化において、性選択が直接的な役割を果たしているかについては異論がある。これまでの研究代表者らの研究で、節足動物の集団間の交尾器形態の多様化が、機械的生殖隔離をもたらす、種分化を引き起こす原因となることが示唆されてきた (Sota & Kubota 1998; Nagata et al. 2008; Sota & Nagata 2008; Sota & Tanabe 2010)。体内受精を行う動物にみられる交尾器の多様化は、性選択を主要因として起こると考えられ、近年それを検証した研究も多い。一方、性選択が繁殖にかかわるさまざまな形態・行動・生理的形質の多様化に影響していることは広く認識されているが、「種分化において性選択が主導的な役割を果たしているか」については、懐疑的な見解が多い (Ritchie 2007 Annu. Rev. Ecol. Syst.)。すなわち、生殖隔離に係る形質分化は、多くの場合、生態的分化を通して分化し、付随する性選択によって生殖隔離が成立すると考えられている。しかし、交尾器の多様化は通常、生態適応に付随したものではない。したがって交尾器多様化による種分化は、「性選択が直接種分化につながる例」と考えられる。

交尾器形態の進化をもたらす選択と遺伝的基盤を明らかにすることは、性選択と種分化の直接的関係を実証する上で重要である。しかしながら、内部形態である交尾器にかかる選択を直接測定することは困難である。また交尾器形態の遺伝的基盤に関する研究は少なく、種間差をもたらす遺伝子についての決定的な知見はまったくない。

2. 研究の目的

本研究では、著しい交尾器の多様性を示すオオサムシ属オオサムシ亜属 *Carabus (Ohomopterus)* を対象として、交尾器形態への性選択を検証し、さらにその部分の進化をもたらす遺伝子の候補を明らかにして、その遺伝子への選択が種分化につながってきたことを実証することを目的とする。本研究ではこの亜属の中でもっとも顕著な交尾器の多様性がみられるイワワキ-アオサムシ種群に焦点をあてる (図1)。この種群は近畿・東海・中部を中心に分布し、一部の種を除いて、側所的分布を示しており、交尾器の多様化は集団ごとに独自に起こったと考えられる。

この亜属の交尾器の特徴として、雄の内袋にキチン化した交尾片があり、雌の膣の底部に

は膣盲嚢という袋状の部分がある。交尾片は膣盲嚢に挿入され、この状態で精包が適切な位置に形成される。交尾片・膣盲嚢の形態適合は授精成功に関わり、集団間では関連した変異を示す。これは雌雄間の共進化を示唆している。しかし、交尾片・膣盲嚢間の適合に関する安定化選択があるとしても、交尾片・膣盲嚢の伸長あるいは拡張、という進化傾向をもたらした方向性選択が存在するはずである。これについては明らかになっていない。さらに、これらの進化的変化には、限られた遺伝子座における変異が影響していると推測される。姉妹種で交尾器が大きく異なるイワワキオサムシとマヤサンオサムシの種間交雑を用いた量的遺伝解析と QTL マッピングによって、少数の大きい効果をもつ遺伝子が、交尾片・膣盲嚢の種間差に関係していることが推定されている (Sasabe et al. 2007, 2010)。しかし、実際にどのような遺伝子が関与しているかは全く分かっていない。

本研究では、「性選択を介した交尾器形態の進化による種分化」のシナリオを検証するために、交尾器形態への性選択の検証と、交尾器形態の種間差をもたらす遺伝子の特定という2点に絞って、研究を行う。本亜属に特異的な交尾器形態の機能を解明した上で、形態に働く選択について実験的に検証する。さらに、次世代シーケンサーを利用して、交尾器形成に関与する発現遺伝子を種間で比較し、交尾器形態の種間差に関わる遺伝子を明らかにする。

遺伝子を特定できた場合、その遺伝子の効果を検証し、さらに遺伝子配列の種間・亜種間比較によって、交尾器形態遺伝子での進化によって種分化が起きたことを検証する研究へと展開する。

3. 研究の方法

3-1. 交尾器進化に関わる選択圧

オオサムシ亜属のオスの交尾片とメスの膣盲嚢の長さは相関して進化し、極端に長くなっている種がいる。雌雄の交尾器部分の長大化に関わる選択を探求するために、マヤサンオサムシ *Carabus maiyasanus* の種内個体群間 (亜種間) の変異を用いた実験を行った。

マヤサンオサムシ原名亜種 (*C. m. maiyasanus*; 京都市産) とシガラキ亜種 (*C. m. shigaraki*; 滋賀県阿星山産) は、平均体長には差がないが、交尾片および膣盲嚢の平均長には12%程度の差がある。個体変異の幅は亜種間で重なっており、2つの個体群を合わせて1回交尾および精子競争が生じる2回交尾の実験を行い、オスの繁殖成功 (授精成功) に交尾器形態がどう影響するかを検討した。

1回交尾実験は、亜種内ペアと亜種間ペア

で合計 59 ペア行い、交尾終了後にメスの腔内の精包形成を確認した。2 回交尾実験では、最初に亜種内のペアに交尾をさせ、続いて同亜種の別のオスもしくは異亜種のオスと交尾をさせ、終了後にメスの腔内にある精包（1 個または 2 個）の位置を確認し、それぞれの精包の射精オスを精包から採取した DNA のマイクロサテライトで同定した。

3-2. 交尾器形態変異から見た選択の形

オオオサムシ亜属の多様な交尾器形態をもたらし淘汰の形と種間差を、集団内変異から明らかにするために、イワキオサムシ（鈴鹿市産）、マヤサンオサムシ（神戸市産）、ドウキョウオサムシ（大阪府金剛山産）を用いて、雌雄交尾器形態と外部形態の集団内変異を定量した。

測定部位は、雄交尾器における交尾片長、交尾片幅、陰茎長、陰茎先端長、雌交尾器における交尾囊長、腔盲囊長、腔盲囊幅とした。加えて、比較のために右後脛節長と触角第 5 節長、体サイズの指標として前胸背板長と幅、上翅長を測定した。測定個体数は雌雄各 30 個体とした。

測定誤差を見積もるために、各部位を 5 回ずつ測定し、分散分析によって個体間変異と測定誤差を分離した。体サイズ変異に対する相対的な変異量を推定するため、各部位のアロメトリー値（体サイズに対する直線回帰の傾き）を求めた。さらに、測定部ごとの絶対的な変異量を見積もるため、変動係数を求めた。

3-3. 交尾器形態の種間差に関わる遺伝子

オオオサムシ亜属の姉妹種間の顕著な交尾器形態差に関連する遺伝子を推定するために、大阪府金剛山に生息するイワキオサムシとドウキョウオサムシを対象として、終令幼虫・蛹の腹部のトランスクリプトーム解析を行った。

飼育によって得られた 3 齢幼虫（前蛹、性別不明）の腹部末端、蛹（性別）の交尾器部分を RNAlater で固定し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。さらに Oligotex-dT30 Super mRNA Purification Kit (TAKARA) を用いて mRNA を精製し、この mRNA から cDNA ライブラリーを作成して、Roche GS FLX Titanium シーケンサーでシーケンスを行った。

得られたシーケンスデータを TGICL (Pertea et al. 2003) を用いてアセンブルし、さらに 2 種間で同じ遺伝子の配列に由来するコンティグをクラスタリングした。こうして得られたクラスターについて、既知の昆虫遺伝子と比較してアノテーションを行った。

種間の遺伝子配列を比較するとともに、蛹の交尾器部分で発現する遺伝子の発現量比較を行った。また、ショウジョウバエ類で交

尾器形態の種間差に関わることが示唆されている遺伝子についてその相同遺伝子を探索した。

3-4. オオオサムシ亜属の系統進化からみた交尾器進化

オオオサムシ亜属の種の系統関係を詳細に解明し、交尾器形態の進化過程を明確にするために、制限サイト関連 DNA シーケンス (restriction site associated DNA sequence; RAD sequence) のデータを取得し、最尤法による系統解析を行った。亜属内の全種 31 個体、外群のタイリクオオオサムシ亜属のタイリクオオオサムシ *Isiocarabus fiduciarius* の 1 個体からゲノム DNA を抽出し、制限酵素 PstI によって断片化した RAD シーケンスライブラリーを Etter et al. (2011) に従って作成し、イルミナ HiSeq2000 シーケンサーでシーケンスデータを取得した。

得られたシーケンスを、プログラム pyRAD (Eaton 2013) を用いてオーソログスなローカスに分類し、系統解析用のシーケンスデータマトリクスを作成した。系統解析は最尤法で行い、プログラム RAxML (Stamakis 2014) を用いて、100 回のラピッドブートストラップ解析および系統樹推定を行った。

4. 研究成果

3-1. 交尾器進化に関わる選択圧

1 回交尾においては、交尾器形態はオスの授精成功（精包形成）に影響しなかった。交尾片の長さに関わらず、ほとんどのオスが授精に成功した。ただし、交尾時間は、陰茎が長いオスほど短い傾向があった。2 回交尾実験においては、2 番目のオスが 1 番目のオスの精包をはがし、自分の精包を腔奥部に射精できた場合を「精包置換」とみなした。精包置換なしに精包を形成した場合は、精包置換とともに「授精」とした。2 番目のオスの「授精」、「精包置換」は、交尾片が短く、腔盲囊が長いとき、すなわち交尾片と腔盲囊の差が小さいときに成功しやすかった。このことは、精子競争においても、雌雄の交尾器形態のマッチングがオスに有利に働くことを示唆している。それと同時に、長い交尾片の進化は精子競争では単純に説明できないことを意味する。

3-2. 交尾器形態変異から見た選択の形

各部位の測定誤差はおおむね 5% 以下であり、厳密な測定ができていたことが確認できた。アロメトリー値における 3 種に共通の傾向として、陰茎長のアロメトリー値は 1 より小さく、相対的に小さな変異を持つこと；雌交尾器の各部位の値は 1 と有意に変わらない

か、しばしば1より大きな値をとること；外部の付属肢の値は1と有意に変わらないことが見いだされた。また、陰茎先端長や交尾片長と幅については、直線回帰が有意にならず、アロメトリー値を求めることができなかった。

変動係数を部位間で比較したところ、雄交尾器部位の変異は、ほぼ全ての場合で体サイズの変異よりも小さいことが明らかとなり、Eberhard et al. (1998)による one size fits all 仮説（平均的な雌に対応することが雄の交尾成功を高めるため、雄交尾器には安定化淘汰がはたらく）を支持する結果を得た。しかし、対応する雌交尾器の変異は雄交尾器よりも大きく、しばしば外部形態の変異よりも大きかった。これは、雄は平均的な雌に対応するように進化するが、雌は雄に対応せず、むしろ雄の操作を回避することで繁殖成功を高めようという、性的対立仮説(Gavrilets 2000)を支持する結果であると考えられた。このような傾向は3種に共通して見られ、顕著な種間の違いは見られなかった。

3-3. 交尾器形態の種間差に関わる遺伝子

454 パイロシーケンシングによって合計約160万の良質なリードを得た。これをアセンブルして、約176000のユニークシーケンスとし、2種のデータを統合して、12662の遺伝子クラスターを推定した。このクラスターデータをnrなどのmRNA配列のデータベースと比較して、アノテーションを行った。性別が分かっている蛹期について、性ごとに発現比較を行い、種間で有意に発現量の異なる遺伝子を、雄では4、雌では5見いだした。しかし、この中には交尾器の発生に関与すると推測される遺伝子は含まれていなかった。また、タンパク質を指定する配列を、種間で比較し、非同義置換/同義置換比(dn/ds)が1より大きい14個見いだした。そのうち4つだけが既知のタンパク質に該当したが、それらはシグナル伝達に関わるタンパク質を含んでいた。また、ショウジョウバエ類で、雄交尾器形態の種間差に関与すると推定されている交尾器形成関係の遺伝子9つについて、オオオサムシ亜属のオーソログを探索し、雌雄の蛹におけるその発現量を比較した。しかし種間で発現量の異なるものは見出せなかった。この実験では、交尾器形態の種間差に関わる遺伝子の有力候補を見つけることはできなかったが、多数の遺伝子配列を得ることができ、将来の遺伝子発現比較に有用な、基礎データを構築できた。

3-4. オオオサムシ亜属の系統進化からみた交尾器進化

合計1億4200万のRADシーケンスリードが得られ、そのうち精度の高い1億2300万を解析に利用した。個体あたりのリード数は

97万から9400万、カバレッジは8.7から141と変異があった。オーソログシーケンスの判定閾値 W_{clust} を50%から95%まで変化させ、各シーケンスの個体のカバレッジの閾値 Min_{taxa} を4から28まで変化させて、合計42のデータマトリクスを作成した。最尤法による系統樹では、クロオサムシ種群とイワキ・アオオサムシ種群の単系統性が一貫して支持されたが、ダイセンオサムシ、ヒメオサムシ、ヤコンオサムシ、シコクオサムシ、オオオサムシの5種(Sota and Nagata 2008のダイセンオサムシ種群)については、単系統になる場合と多系統もしくは側系統になる場合があった。しかし単系統になる場合は W_{clust} を低く設定し、種間変異の大きいオーソログシーケンスが別のもので判定される可能性を低くした場合であることから、ダイセンオサムシ種群が単系統であることがもっともらしい。交尾器の多様性が顕著なイワキ・アオオサムシ種群の内部では、東(アオオサムシ、シズオカオサムシ、カケガワオサムシ、ミカワオサムシ)と西(イワキオサムシ、マヤサンオサムシ、ドウキョウオサムシ)の分化が明確であり、また東の中では4種がそれぞれ単系統となった。しかし、西のイワキオサムシ、マヤサンオサムシは互いに単系統にはならなかった。地理的に近い別種個体が系統的に近い傾向があることから、種間交雑による遺伝子浸透が系統樹に影響していることが示唆された。全体としては核遺伝子に基づく従来の系統進化仮説(Sota and Nagata 2008)が支持され、細部が明らかになった。交尾器の進化に関しては、イワキ・アオオサムシ種群の内部で、長短の交尾片・膈盲囊の進化が繰り返し起こったことが示唆された。

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)

(1) Okuzaki Y, Sota T (2014) How the length of genital parts affects copulation performance of a carabid beetle: implications for correlated genital evolution between the sexes. *Journal of Evolutionary Biology* 27: 565-574. (査読有)

(2) Fujimaki K, Fujisawa T, Yazawa S, Nishimura O, Sota T. Comparative transcriptomic analysis of two closely related ground beetle species with marked genital divergence using pyrosequencing. *Zoological Science* (accepted) (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 奥崎穰・曾田貞滋. 長い交尾片は有利か: マヤサンオサムシ雌雄交尾器サイズの精

子競争への影響．第 61 回日本生態学会大会
(2014, 3/14-18, 広島)

(2) 高見泰興・林直緒．クロナガオサムシの
再交尾抑制をもたらす精液物質は濃すぎると
効かない．日本動物行動学会第 32 回大会
(2013, 11/29-12/1, 広島)

(3) 高橋颯吾・高見泰興．オオオサムシ亜属
の雌雄交尾器形態変異に基づく進化仮説の
検証．日本動物行動学会第 32 回大会
(2013, 11/29-12/1, 広島)

(4) 丸山航・高見泰興．多様な交尾戦略を持つ
オオオサムシ亜属の雄の精子投資調節．日
本動物行動学会第 32 回大会
(2013, 11/29-12/1, 広島)

(5) 高見泰興・福原知彦・横山潤・河田雅圭．
性的対立の人口学的帰結：雌雄交尾器の不
均衡が集団サイズを低下させる．第 61 回日
本生態学会大会 (2014, 3/14-18, 広島)

〔図書〕(計 1 件)

(1) 曾田貞滋 (編著), 池田紘士・奥崎穰・
小沼順二・雀部正毅・高見泰興・長太伸章 (著)
(2013) 新オサムシ学-生態から進化まで．北
隆館．(高見泰興「オオオサムシ亜属の交尾
器と交尾行動」を含む)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾田 貞滋 (SOTA, Teiji)
京都大学大学院理学研究科・教授
研究者番号：00192625

(2) 研究分担者

高見 泰興 (TAKAMI, Yasuoki)
神戸大学大学院人間発達環境学研究科・准
教授
研究者番号：60432358

(3) 研究協力者

奥崎穰 (OKUZAKI, Yutaka)
京都大学大学院理学研究科・研究員

藤巻光太郎 (FUJIMAKI, Kotaro)
京都大学大学院理学研究科・博士後期課程

藤澤知親 (FUJISAWA, Tomochika)
京都大学大学院理学研究科・研究員

西村理 (NISHIMURA, Osamu)
京都大学大学院理学研究科・研究員

矢澤重信 (YAZAWA, Shigenobu)
京都大学大学院理学研究科・研究員

高橋鉄美 (TAKAHASHI, Tetsumi)
京都大学大学院理学研究科・研究員

長太伸章 (NAGATA, Nobuaki)
東北大学大学院生命科学研究科・研究員

高橋颯吾 (Takahashi, Sogo)
神戸大学大学院人間発達環境学研究科・博
士前期課程

丸山航 (Maruyama, Wataru)
神戸大学大学院人間発達環境学研究科・博
士前期課程