

平成30年6月27日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26251044

研究課題名(和文)生態ゲノミクスによる適応的種分化の遺伝的基盤解明

研究課題名(英文)Ecogenomics studies for the genetic basis of adaptive speciation

研究代表者

曾田 貞滋 (Sota, Teiji)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：00192625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,100,000円

研究成果の概要(和文)：種分化をもたらす生殖隔離形質の遺伝的基盤をゲノムレベルで解明することは、進化生態学の主要な課題である。本研究ではオオオサムシ亜属において、接合前生殖隔離をもたらす交尾器形態と体サイズの遺伝的基盤を探求した。まず交尾器形態差が顕著な近縁種3種を用い、ドウキョウオサムシのゲノム配列を参照してイワキオサムシとマヤサンオサムシの交尾片、膣盲嚢のサイズ差に関するQTL領域と候補遺伝子を特定した。体サイズ変異に関しては、ヒメオサムシの地理的個体群間の体サイズ差に関するQTL領域と候補遺伝子を、ヒメオサムシのゲノム配列を参照して特定した。いずれの場合も少数の大きい効果を持つQTLが見いだされた。

研究成果の概要(英文)：Revealing the genetic basis of traits for reproductive isolation based on the analysis of the whole genome is an important subject in evolutionary ecology. In *Carabus* (*Ohomopterus*) beetles, differences in genital morphology and body size contribute to pre-zygotic reproductive isolation, and diversification in these traits contributes to species the richness and formation of multi-species assembly. We sequenced the whole genome of representative species and searched for QTLs and candidate genes for species-specific genital morphology and body size differences. For genital morphology, we investigated QTLs for species-specific genital dimensions between *C. iwawakianus* and *C. maiyasanus*, referring to the whole genome sequence of *C. uenoi*. For body size, we investigated QTLs for body size dimensions using a crossing between two populations in *C. japonicus*. For both traits, we found a few QTLs with large phenotypic effects and revealed candidate genes located in the QTL regions.

研究分野：進化生態学

キーワード：種分化 生殖隔離 適応進化 体サイズ 交尾器形態 ゲノム解読 QTL解析 オサムシ

1. 研究開始当初の背景

生殖隔離に関連する形態や生活史特性の適応的な分化は、近縁な個体群間の遺伝的分化を促進し、種分化をもたらす。このような「適応的種分化 (adaptive speciation)」は、生物の種多様性を増加させてきた主要な過程のひとつと考えられる。大きな適応的分化は必ずしも複雑な遺伝的变化を必要とするのではなく、ゲノムの限られた領域の中での変異によって引き起こされることが近年の研究で明らかにされているが、適応的種分化についても同様のことが予想される。適応的種分化の原因となる遺伝子、ゲノム構造を解明することは、進化生態学者にとって困難な課題であったが、急速なゲノム解析技術の進展により、全ゲノム配列解読をもとにした研究が、非常に有効なアプローチとなってきた。

オサムシ属オオオサムシ亜属 *Carabus* (*Ohomopterus*) は北海道から九州に生息する日本固有の地表性甲虫で、更新世の間に、3つの種群から多様な種、亜種に分化した (Sota and Nagata 2008)。著しい地理的分化を示す一方で、同じ場所に体サイズの異なる2種~3種が共存することが多く、共存する種の体サイズはハッチンソン則にしたがう (Sota et al. 2000)。この亜属の種の多様化は、体サイズ分化による交尾前生殖隔離と、交尾器形態の多様化による接合前生殖隔離によって促進されたと推測される (Sota and Nagata 2008)。体サイズの変異には、温度条件と餌条件が自然選択要因として関与していると推測されるが (Ikeda et al. 2012; Tsuchiya et al. 2012)。種間の体サイズ分化は種間交尾を通じた繁殖干渉の回避に役立ち、種の共存を可能にしている (Okuzaki et al. 2010)。従って環境適応に加え種間相互作用が体サイズの多様化を促進している可能性がある。一方、交尾器形態は一般に性選択によって進化し、精子競争、性的対立が主要な選択圧であると考えられている。本亜属では、雄と雌の交尾器部分に「錠と鍵」の対応関係があり、その対応部分が相関して進化している。個体群内での雌雄交尾器形態の進化の結果、近縁個体群(種)間で交尾器形態の差が大きくなると、授精、あるいは交尾器の結合そのものが困難になり、接合前の生殖隔離が生じる (Sota & Kubota 1998)。

上記のように、体サイズと交尾器形態はこの亜属の種多様化の鍵となる。申請者はこれらの形質の変異の遺伝的基盤について、交雑を用いた解析を行ってきた。体サイズについては、シコクオサムシの大型亜種と小型亜種の交雑実験から、体サイズの違いが遺伝的であることと、関与する遺伝子が常染色体および性染色体にあることが示唆された (文献6)。交尾器形態に関しては、姉妹種で大きく交尾器形態の異なるイワワ

キオサムシとマヤサンオサムシを用いて、量的遺伝解析、QTL解析を行い、比較的少数の遺伝子座が種間変異に関与していることを示した (Sasabe et al. 2007, 2010)。種分化に関わる形質進化を支配する遺伝子をつきとめることは、種分化の仕組みを理解する上で不可欠である。オオオサムシ亜属の種分化の遺伝的基盤研究を飛躍的に進展させるためには、ゲノム解読を基軸にした研究を実施することが必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、オオオサムシ亜属の種多様化の鍵となる体サイズ・交尾器形態の変異の遺伝的基盤を、ゲノム解析によって解明するために、次の項目の研究を行うことを目的とする。

(1)ゲノム解読:リファレンスゲノム(ドウキョウオサムシ)の解読とゲノムアノテーション、および、注目する形質変異を代表する種・個体群のゲノムのリシーケンシング(イワワキオサムシ、マヤサンオサムシ、ヒメオサムシ大型・小型個体群)。

(2)RADシーケンスを用いた連鎖地図作成とQTLマッピング:体サイズの異なるヒメオサムシ個体群間のF2雑種、交尾器形態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F2種間雑種を用いる。

(3)種間・個体群間のトランスクリプトーム比較による、体サイズ・交尾器形態変異に関連した発現変動遺伝子検出と、その遺伝子の、ゲノム上の位置の同定、種間・個体群間の配列比較、転写調節領域の配列変異検出。

(4)RAD配列で示されるQTLのゲノム上の存在領域(種分化原因領域)を特定し、その領域の遺伝子および転写調節領域の変異を検討。発現変動遺伝子との関係も調べる。

(5)RNAi法による遺伝子機能の解明:候補遺伝子のうち、ノックダウンによる効果が期待されるものについて行う。

以上の研究から、ゲノム上に局在すると想定される適応的種分化の原因領域の性質を明らかにする。

3. 研究の方法

・ゲノム解読:ドウキョウオサムシ雄1個体の精巣からゲノムDNAを抽出し、イルミナのHiSeq2000を用いて、180bp、500bpのペアエンドライブラリー、2~20kbのメイトペアライブラリーを各1レーンずつシーケンスする。得られたシーケンスを

Platanus, プログラムを用いてアSEMBルする。アSEMBル後に、遺伝子予測等のゲノムアノテーションを行う。同様のゲノム解読をヒメオサムシについても行う。

・連鎖地図作成と QTL 解析: 体サイズと交尾器形態に関して QTL 解析を行うために、連鎖地図作成を行うが、遺伝マーカーとして、Restriction site Associated DNA (RAD) シーケンスを用いる。制限酵素は PstI を用いる。

・交尾器形態 QTL 解析に関しては、姉妹種で交尾器形態（雄の交尾片とそれに対応する雌の膣盲嚢）が大きく異なる、イワキオサムシ（三重県亀山市産）とマヤサンオサムシ（京都市左京区産）を用いる。種間交雑で得られた F2 世代について、RAD シーケンスを用いた連鎖地図作成・QTL マッピングを行う。F2 個体は Sasabe et al. (2010) の実験で得られたものを使用する。

・体サイズ QTL 解析に関しては、九州北部の個体群間で大きな体サイズ変異がみられるヒメオサムシを用いる。大型個体群と小型個体群の交雑で得られる F2 世代について、交尾器の場合と同様の実験を行う。交雑の F1 は 2013 年に得られており、F2 個体を 2014 年に得る。

・RAD シーケンスは、HiSeq2000 で行う。得られたデータについて、RAD シーケンス解析用プログラム stacks を用いて genotyping を行う。JoinMap を用いて連鎖地図を作成し、QTL cartographer で QTL マッピングを行う。

・候補遺伝子の RNA 干渉実験: 交尾器形態に関する候補遺伝子の一部について、幼虫期の dsRNA 接種による RNA 干渉実験を行う。一度に飼育できる個体数が限られるため、マヤサンオサムシを 1 年あたり 100 個体飼育して、複数種類の dsRNA を導入して効果のある遺伝子を段階的にスクリーニングする。

4. 研究成果

(1) ゲノム解読・トランスクリプトーム
ドウキョウオサムシとヒメオサムシのゲノムを解読した。また、イワキオサムシ、マヤサンオサムシのペアエンドシーケンスのみのデータを得た。

ドウキョウオサムシの 3 齢幼虫から RNA を抽出し、mRNA をシーケンスした。このデータはゲノムシーケンス上での遺伝子予測に用いた。

(3) 交尾器形態の QTL 解析

イワキオサムシとマヤサンオサムシの交雑 F2 個体から DNA を抽出し、RAD シーケンスを行った。RAD シーケンスデータを用

いて連鎖地図を作成し、雄雌別に交尾器形態の QTL 解析を行った。その結果、雄の交尾片長について 4 つ、交尾片幅について 3 つ、雌の膣盲嚢長について 2 つ、膣盲嚢幅について 3 つの QTL が検出された。とくに雄の交尾片長と幅に大きい効果を持つ QTL 領域が見つかり、同じ連鎖群の別の場所に雌の膣盲嚢の長さの QTL が見つかった。ゲノムシーケンスデータを用いて、QTL が検出された scaffold の SNP とその近傍に存在する遺伝子を調べ、いくつかの候補遺伝子を決定した。

(4) 遺伝子発現比較

イワキオサムシとマヤサンオサムシの交尾器形態の違いに関連する発生遺伝子を検出するために、3 幼虫後期（前蛹）と蛹期の腹部もしくは交尾器部分から RNA を抽出し、mRNA をシーケンスした。個体数は各ステージ各種について、雄 3 個体、雌 3 個体である。合計 14820 遺伝子座について、性別・ステージ別に種間比較を行い、発現変動遺伝子を決定した。とくに昆虫の交尾器や付属肢の発生に関与する遺伝子、体サイズの制御に係る遺伝子について、発現変動があるかどうかを調べ、いくつかの候補遺伝子を決定した。

(5) RNA 干渉実験

交尾器形態に影響する可能性のあるいくつかの遺伝子の配列を基に作成した dsRNA をマヤサンオサムシの 3 齢幼虫に接種したところ、rotund 遺伝子をノックダウンした場合に、雄の内袋およびそれに付属する交尾片の形成が阻害される場合や交尾片が変形する場所が見られた。また、雌雄ともほとんどの個体で、さやばねの伸長が抑制された。

(6) 体サイズの QTL 解析

ヒメオサムシ佐賀県加部島個体群（大型）と福岡県油山個体群（小型）の交雑 F2 個体から DNA を抽出し、RAD シーケンスを行った。また加部島産の雄の全ゲノムを解読し、それを参照して RAD シーケンスからの SNP 検出を行った。このデータを基に連鎖地図を作成し、体サイズ測定値を用いて QTL 解析を行った。体長に関しては 2 つの主要な QTL が検出されたが、そのうちのひとつは *wingless* 遺伝子を含む領域に存在しており、QTL 付近には細胞増殖等に関連する体サイズ制御の候補遺伝子が存在していた。

< 引用文献 >

Sota, T. and Nagata, N. (2008) *Phil. Trans. R. Soc. B* 363: 3377-3390.
Sota, T. et al (2000) *Popul. Ecol.* 42:279-291.
Ikeda, H. et al (2012) *Pedobiologia* 55: 67-73;

Okuzaki, Y. et al (2010) *J. Anim. Ecol.* 79: 383-392
Sota, T. & Kubota, K. (1998) *Evolution* 52: 1507-1513
Tsuchiya, Y. et al (2012) *J. Evol. Biol.* 25: 1835-1842
Sasabe, M. et al. (2007) *Heredity* 98: 385-391;
Sasabe, M. et al. (2010) *Mol. Ecol.* 19: 5231-5239;

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

Okuzaki, Y., H. Sugawara & T. Sota (2015) Body size evolution under character release in the ground beetle *Carabus japonicus*. *Journal of Biogeography* 42: 2145-2158. doi: 10.1111/jbi.12575

Okuzaki, Y. & T. Sota (2017) Factors related to altitudinal body size variation in the earthworm-eating ground beetle *Carabus japonicus*. *Zoological Science* 34: 229-234. doi:10.2108/zs160182

Komurai, R., T. Fujisawa, Y. Okuzaki & T. Sota (2017) Genomic regions and genes related to inter-population differences in body size in the ground beetle *Carabus japonicus*. *Scientific Reports* 7: 7773. DOI:10.1038/s41598-017-08362-7

Okuzaki, Y. & T. Sota (2018) Predator size divergence depends on community context. *Ecology Letters* doi: 10.1111/ele.12976

[学会発表] (計4件)

奥崎穰・曾田貞滋・餌サイズと繁殖干渉を淘汰圧としたヒメオサムシの体サイズ分化．第63回生日本生態学会大会．2016年3月21日～24日．仙台市 仙台国際センター．

奥崎穰・曾田貞滋．生息地の餌サイズに依存するヒメオサムシの形質解放．日本生態学会第64回大会 2017年3月14日～18日．東京都 早稲田大学．

野村翔太・曾田貞滋．種特異的交尾器形態をもつオオオサムシ亜属における遺伝子発現比較．日本進化学会第19回大会．2017年8月24日～26日．京都市 京都大学．

奥崎穰・曾田貞滋．群集構造に依存した捕食者の体サイズ分化：気候・餌サイズ・近縁種の相対的重要性．日本生態学会第65回

大会 2018年3月14日～18日 札幌市 札幌コンベンションセンター．

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：なし

(3) 連携研究者

新美輝幸 (NIIMI, Teruyuki)
基礎生物学研究所・進化発生研究部門・教授
研究者番号：00293712

(4) 研究協力者

奥崎穰 (OKUZAKI, Yutaka)
藤澤知親 (FUJISAWA, Tomochika)
小村井亮平 (KOMURAI, Ryohei)
菅原悠 (SUGAWARA, Hisashi)
野村翔太 (NOMURA, Shota)