

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14769

研究課題名(和文)メダカ科魚類における性的二型多様化の進化遺伝機構

研究課題名(英文)The evolutionary genetic basis of diversified sexual dimorphism in  
Adrianichthyidae fishes

研究代表者

安齋 賢 (ANSAI, SATOSHI)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：20779467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：性的二型の多様化に関わる進化・遺伝メカニズムを解明するため、インドネシア・スラウェシ島のメダカ科固有種のウオウオールメダカが示す雄の婚姻色(胸鰭の赤色)をモデルに研究を行った。QTL解析とRNA-seq解析から同定した常染色体上の候補遺伝子について、CRISPR/Casシステムを用いて変異体を作り出し、赤色の発現に必須であることを示した。またアンドロゲン投与実験から、アンドロゲンシグナルが発現の性差の形成に重要であることを示した。さらに、変異体を用いた配偶行動実験と捕食実験から、赤色の欠失が配偶者選好性を低下させ、捕食者を誘引することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、婚姻色の原因遺伝子を同定し、ゲノム編集技術を適用することで、その適応的な意義を実験的に実証することに成功した。性選択を介した性的二型の多様化は、進化生物学における最も重要な問題の一つとして、数多くの理論や学説が形成されてきた。本研究は、今後これらの理論・学説を検証し、生物の多様化機構を理解していく上で、ゲノム編集技術を用いた原因遺伝子の機能解析が重要なアプローチの一つであることを示す上で重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the evolutionary and genetic mechanisms underlying diversification in sexual dimorphism, we studied on the male nuptial coloration (red pectoral fins) of a medaka fish, *Oryzias woworae*, endemic to Sulawesi, Indonesia. A candidate gene on an autosome, identified by QTL analysis and RNA-seq, was disrupted by CRISPR/Cas system, and the mutant exhibited loss of red pigment cells. Then, androgen administration showed that the differential expression of the gene between two sexes is caused by androgen signaling. Furthermore, a mating experiment and a predator experiment using the knockout fish indicated that loss of the red coloration decreased the female mate preference but increased the preference by the predator.

研究分野：進化遺伝学

キーワード：メダカ 性的二型 婚姻色 性選択 配偶者選択 ゲノム編集 アンドロゲン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

同一種の雌雄間で形質が顕著に異なる現象(性的二型)は、多くの生物の様々な形質において観察される。性的二型は、交配や繁殖の成功率に関わる形質について、性選択や性特異的な自然選択がかかる場合に進化する。その形成過程で、雌雄はそのゲノムの大部分を共有することから、対象となる形質に関わる遺伝子は何らかの方法で性特異的な発現機構を獲得する必要がある(Ellegren & Parsch 2007 *Nat Rev Genet*)。過去の先行研究から、その遺伝基盤の1つとして、性決定・性分化に関連する転写因子に関わる発現制御変異の獲得による多様化が示唆されている(Williams & Carroll 2009 *Nat Rev Genet*)。しかしながら、野外生物の多様な性的二型の原因遺伝子を同定した例は限られており、どのような遺伝的变化が原因遺伝子上に生じ性特異的に遺伝子を発現させるか、またその変化が野外集団中でどのように広まり性的二型の多様化に貢献するかといった、その分子基盤については未解明の課題が多い。

魚類の体色は顕著な性的二型が現れる形質の1つであり、特に成熟雄個体が繁殖期に婚姻色と呼ばれる鮮やかな体色を示す例はよく知られている。インドネシア・スラウェシ地方に生息するメダカ科魚類固有種では、雄が鮮やかな婚姻色を示すが、その色彩やパターンは種間で著しく多様である(Mokodongan & Yamahira 2015 *Mol Phy Evol*)。スラウェシ地方南東部のムナ島に生息するウォウォールメダカ(*Oryzias woworae*)は、婚姻色として雄の胸鰭に鮮やかな赤色を発現する(Parenti & Hadiaty 2010 *Copeia*)。胸鰭の赤色は近縁種には見られないことから、ウォウォールメダカにおいて派生的に獲得された形質であると考えられる。応募者らは、胸鰭の赤色を示さない近縁種セレベスメダカ(*O. celebensis*)との交雑 F<sub>2</sub> 家系を用いた量的遺伝子座(QTL)解析により、この形質が常染色体上の1遺伝子座によって制御されていることを示した(Ansai et al. unpublished)。さらに遺伝子発現解析の結果から、本遺伝子座上に存在する1つの遺伝子が原因遺伝子であることが強く示唆されるとともに、何らかの cis 制御領域の変異を獲得することで、雄の胸鰭において高発現していることが明らかになった。

## 2. 研究の目的

本研究では、どんな遺伝的变化が性特異的な遺伝子発現を引き起こし、発生・生理機構や適応度の変化を経て集団中に広まるのかを解析することで、性的二型の多様化機構を解明することを目的とする。そのために、ウォウォールメダカにおいて獲得された胸鰭色彩の性的二型をモデルとして、その原因遺伝子の機能解析を中心として研究を行う。本研究における最大の独自性は、メダカ科魚類をモデルとすることで最新の遺伝子工学的手法を駆使し、原因遺伝子における遺伝的变化やその機能、胸鰭色彩の適応的意義といった多岐に渡る課題を実験的に検証する点にある。体色の性的二型については、グッピーやシクリッド等の野外生物を用いた生態・行動レベルの解析から、その機能や進化機構に関する理解が進んでいる(Maan & Seehausen 2011 *Ecol Lett*)。しかし、これらの生物では遺伝子改変技術の適用が困難であり、原因遺伝子の同定や、その細胞・組織レベルでの機能解析はほとんど行われていない。メダカ科魚類は、多様な形質を持つ野外集団と高度な遺伝子改変技術の両方にアクセスが可能な数少ない実験系である。本研究により得られる成果から、性的二型の多様化機構に関して、分子から集団まで様々な階層を結びつけた統合的な理解を可能になる。

## 3. 研究の方法

### (1) 胸鰭での色素細胞発生における原因遺伝子の機能解析

ウォウォールメダカ雄の胸鰭における赤色発現の原因遺伝子を実証するため、CRISPR/Cas システムを用いてノックアウト(KO)システムを作成し、胸鰭の赤色発現を担う色素細胞が欠失するかどうかを確認した。また、CRISPR/Cas システムを用いた GFP ノックイン(KI)システムを作成し、蛍光観察により原因遺伝子の発現細胞を同定した。

### (2) 遺伝子のウォウォールメダカ雄における高発現を引き起こす分子基盤

アンドロゲンはその受容体による発現制御を介して、脊椎動物における雄の様々な二次性徴発現に関与する(Ogino et al. 2011 *Evol. Dev.*)。ウォウォールメダカ雄における赤色原因遺伝子の高発現がアンドロゲンの制御下にあるかを確認するため、成熟雄に合成アンドロゲン(メチルテストステロン)を投与し、胸鰭における原因遺伝子の発現を qPCR 法により定量した。

### (3) ウォウォールメダカ雄の胸鰭色彩が適応度に与える影響

胸鰭の赤色が性選択形質であることを実証するため、ウォウォールメダカ雌の配偶者選好性に対する胸鰭色彩の影響を、社会選好性行動テストにより定量化した。胸鰭の赤いウォウォールメダカ雄との比較対象として、赤色発現原因遺伝子のノックアウトシステムを用いることで、婚姻色の配偶者選択における役割を検証した。その後、同所的に生息する捕食者(サヨリ)による捕食圧における婚姻色の影響を評価するため、行動実験を行なった。

### (4) 野外集団の DNA 多型データを用いた赤色変異獲得年代の推定と選択圧の検出

ウォウォールメダカとその近縁種(*O. wolasi*及び*O. asinua*)には性的二型の程度に変異があり、近縁種では雄の胸鰭に赤色を発現しない(Parenti et al. 2013 *Copeia*)。これらの3種において Illumina HiSeq X を用いた全ゲノムシーケンシングを行い、配列情報を得た。既に取得済みの ddRAD-seq 法による SNP データと合わせて、各集団の系統関係の解析や各種の集団遺伝学的指標の算出を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 胸鰭での色素細胞発生における原因遺伝子の機能解析

CRISPR/Cas システムを用いて作出した KO 系統では、全身の赤色素細胞が欠損した (図 A)。これにより、当該候補遺伝子が赤色婚姻色の原因遺伝子であることが強く示唆された。また、GFP-KI 系統の発現パターンから、当該遺伝子の発現に明確な性差があり、特に雄胸鰭の背側領域で強く発現することが明らかとなった。

##### (2) 遺伝子のウォウォールメダカ雄における高発現を引き起す分子基盤

メチルテストステロンを投与したウォウォールメダカ雄について、胸鰭における原因遺伝子の発現を定量した所、投与群において発現量の有意な上昇が確認された。このことから、当該遺伝子の発現の性差にはアンドロゲンシグナルが関与していることが示唆された。

##### (3) ウォウォールメダカ雄の胸鰭色彩が適応度に与える影響

野生型と KO 系統を用いた配偶行動実験から、赤色を持たない KO 雄は交配までにかかる時間が有意に長くなることが明らかになった。このことから、婚姻色が雌の配偶者選好によって進化した可能性が示唆される。一方、婚姻色の発現は捕食者の誘引を促すと考えられて来たが、今回行った捕食実験では、期待とは逆に捕食者は赤色を持たない KO 系統をより好むことが明らかとなった。結果の解釈にはさらなる検討が必要であるものの、これらの結果は、ゲノム編集技術を用いた性選択に関わる適応度の実験的な測定が重要であることを示唆している。

##### (4) 野外集団の DNA 多型データを用いた赤色変異獲得年代の推定と選択圧の検出

ウォウォールメダカとその近縁種の 8 集団について計 16 個体の全ゲノムリシーケンスを行った。いくつかの集団遺伝学統計 (FST, Dxy, Tajima's D など) について検討したが、当該原因遺伝子座における選択の痕跡は検出できなかった。分岐年代の古さや、集団履歴が影響している可能性があり、今後解析方法についてさらなる検討が必要である。

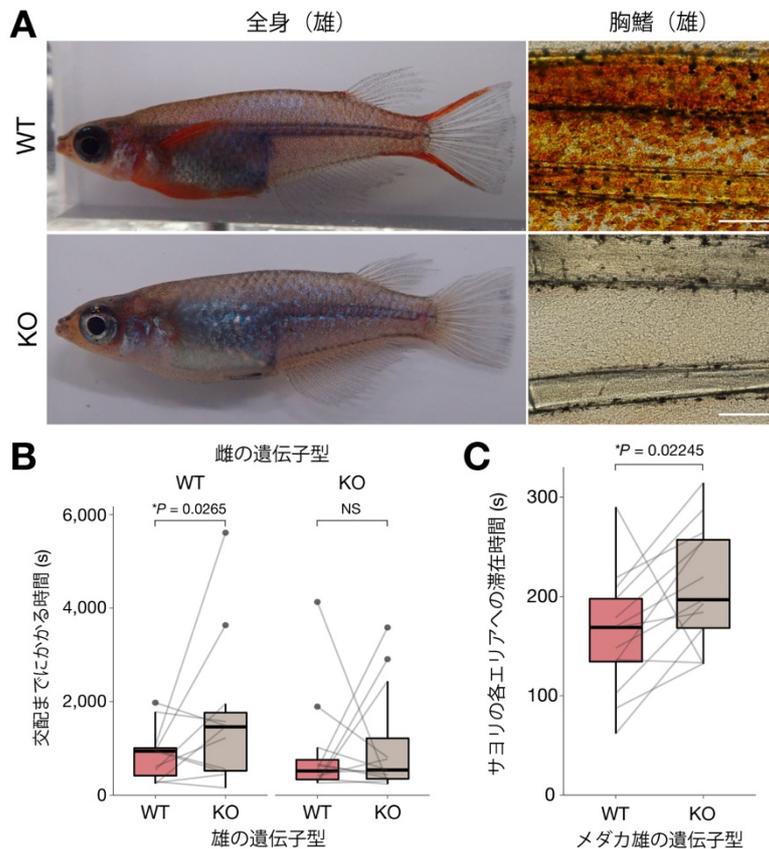


図 ウォウォールメダカにおける原因遺伝子ノックアウト (KO) の表現型 (A) KO 系統は胸鰭を含む全身の赤色素細胞を欠損する。(B) 配偶行動実験の結果、KO は雌との交配にかかる時間が有意に長くなる。(C) 捕食実験の結果、捕食者 (サヨリ) は KO 系統の前により長く滞在する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Satoshi Ansai
2. 発表標題 The molecular genetic basis of diversified sexually dimorphic traits in <i>Oryzias</i> species endemic to Sulawesi, Indonesia
3. 学会等名 4th Strategic Meeting for Medaka Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Ansai
2. 発表標題 The molecular genetic basis of diversification in sexual dimorphism of medaka species endemic to Sulawesi, Indonesia
3. 学会等名 2018 International Zebrafish Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Ansai
2. 発表標題 The molecular genetic basis of diversification in sexual dimorphism of medaka species endemic to Sulawesi, Indonesia
3. 学会等名 9th International Conference on Stickleback Behavior and Evolution (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安齋賢, 持田浩治, 藤本真悟, Daniel Mokodongan, 永野惇, 豊田敦, 成瀬清, 山平寿智, 北野潤
2. 発表標題 メダカ科魚類における性的二型 の多様化をもたらす分子基盤
3. 学会等名 日本進化学会第20回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Ansaï
2. 発表標題 Adrianichthyidae species in Sulawesi as a model system to explore the molecular genetic basis of diversification in sexual dimorphism
3. 学会等名 第24回小型魚類研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Ansaï
2. 発表標題 The molecular genetic basis of diversification in sexual dimorphism of medaka species endemic to Sulawesi, Indonesia
3. 学会等名 THE 46th NAITO CONFERENCE ON Mechanisms of Evolution and Biodiversity
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安齋 賢
2. 発表標題 インドネシア・スラウェシ島のメダカ固有種群から探る婚姻色の多様化メカニズム
3. 学会等名 第13回バイオイメージングフォーラム & 基礎生物学研究所重点共同利用合同シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安齋 賢, 成瀬 清, 山平 寿智, 北野 潤
2. 発表標題 スラウェシ島メダカ科固有種群における性的二型の多様化
3. 学会等名 性スペクトラム 連続する表現型としての雌雄 第 1 回 若手研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安齋寛, 持田浩治, 藤本真悟, Daniel Mokodongan, 永野惇, 豊田敦, 成瀬清, 山平寿智, 北野潤
2. 発表標題 メダカ属における赤色婚姻色の多様化をもたらす遺伝基盤
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----