

令和 4 年 6 月 12 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03276

研究課題名(和文)産卵基質への適応が引き起こす種分化の遺伝的基盤の解析

研究課題名(英文)Genetic basis of speciation process driven by adaptation to new oviposition substrate

研究代表者

高橋 文(Takahashi, Aya)

東京都立大学・理学研究科・准教授

研究者番号：90370121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：オウトウショウジョウバエ(*Drosophila suzukii*)は他の多くのショウジョウバエと異なり新鮮で硬い果実に産卵するため産卵管が長く伸長している。このような産卵管の形の進化は、産卵だけでなく交尾する時の雌雄交尾器の立体配置にも影響し、種間交尾の際に交尾器がかみ合わないことによって生じる生殖的隔離の要因となっている。このような生殖的隔離に関わる形態を詳しく調べ、ゲノムの中で構造的な変化が起きやすい遺伝領域がこのような形態進化に関与したことを明らかにした。更にどのような遺伝子の変化が原因であったかについて可能性が高い候補遺伝子が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、オウトウショウジョウバエ(*Drosophila suzukii*)とその近縁種*D. subpulchrella*を使って、生物の種が分化していく際に種間での交配を妨げるような生殖器形態の進化が、ゲノム中の構造的な変化が激しい領域に起きる突然変異によって進んできたことが明らかとなった。この成果は、生物の進化を理解する上で、種が分化していく仕組みや昆虫などの動物で生殖器の形が速く進化していることの原因を探究していくために重要な情報となる。

研究成果の概要(英文)：Not like most other *Drosophila* species, *Drosophila suzukii* lays its eggs into firm ripening fruits. Its ovipositor is elongated and have many bristles lined up on the edge to pierce the skin of those fruits. This morphological evolution affects not only egg-laying, but also the spatial configurations of male and female genitalia during copulation resulting in the reproductive isolation caused by the mechanical mismatch during interspecific mating. The morphology involved in such form of reproductive isolation between *D. suzukii* and its closely related species *D. subpulchrella* was investigated in detail. The genetic analyses of those morphological trait revealed that the DNA sequence regions with frequent structural changes were involved in such morphological evolution. Furthermore, strong candidate genes that may have been responsible for the genetic changes occurred between the two species were also identified.

研究分野：進化遺伝学

キーワード：種分化 交尾器 外部生殖器 ショウジョウバエ 遺伝子マッピング ゲノムシーケンス 生殖的隔離 産卵

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

環境への適応が引き金となって種が多様化するという考え方は、ダーウィンフィンチの例にあるように広く受け入れられている。しかし、環境へ適応するために進化した形質が生殖的隔離を直接引き起こした例は非常に少ない。これまでの研究により、オウトウショウジョウバエ (*Drosophila suzukii*) は他の種が利用しない新鮮な果実に産卵するため、産卵管が大型化・硬質化している。この産卵管の形態進化は交尾中の雌雄交尾器の立体配置に多大な影響を与え、同胞種 *D. subpulchrella* との交尾の際に交尾器がかみ合わないことによって生じる生殖的隔離の要因となっていることがわかった。これは産卵管が、産卵と交尾両方の役割を担うことによって生じた生態学的種分化の好例である。

2. 研究の目的

本研究では、産卵基質への適応に関して産卵管のどの形態形質が固い果実に孔をあける機能の獲得に貢献したか、また、生殖的隔離機構への関与に関して同胞種である *D. subpulchrella* との交尾の際、どのような交尾器の形態形質が不適合を生じさせているかを詳細に調べ、この生態学的種分化のメカニカルな側面を解明する。そして、この産卵管や交尾の成功に影響する雄の交尾器の形態進化について、その遺伝的背景を明らかにすることにより、生態学的種分化の過程で自然選択の標的となった遺伝的変異の実態を解明し、進化プロセスについて考察することが目的である。

3. 研究の方法

(1) 本研究材料である *D. suzukii* と *D. subpulchrella* の使用系統について、ゲノム配列を決定し、雌雄外部生殖器官の形態の遺伝学的解析や遺伝子発現解析に用いる。

(2) 雌雄交尾器の接合に関わる形態の詳細な観察を行い、重要な形態形質について、2種の戻し交雑を用いた遺伝的解析、及び種間のトランスクリプトームの比較を行う。種間の形態の違いを生み出してきたゲノム領域および候補遺伝子を明らかにする。

4. 研究成果

(1) *D. suzukii* 及び *D. subpulchrella* のゲノム配列の取得

D. suzukii のゲノムレファレンスゲノムは既にあったが、本研究において実際に材料として使用する系統のゲノム配列を Oxford Nanopore によるロングリードと、Illumina HiSeq によるショートリードを取得し、アセンブルを行なった。また、ゲノム配列情報が整備されていなかった同胞種 *D. subpulchrella* についても同様にゲノム配列を決定した。

(2) 雌の産卵管と雄の外部生殖器官の接合に関与する構造の機能解析

オスの外部生殖器官の中でも surstylus という構造に着目し以下の解析を行った。交尾中のペアを固定し、クチクラを透明化した後に行なった詳細な観察、及び共同研究者の上村氏が行なったマイクロ CT による画像解析の結果、surstylus は産卵管の先端を掴んでおり、その掴み方に2種間で違いがあることが明らかとなった。また、surstylus の先端部分を眼科用超小鋏で切除することで交尾への影響を調べた結果、切除した個体は交尾開始時に生殖器同士がうまくかみ合わず交尾が失敗する確率が高いことが分かった。このような外部生殖器の一部を生かしたまま外科的に切除するのはレーザーでも難しく交尾成功率や交尾行動が観察できたことの意義は大きい。

(3) 雌雄交尾器の接合に重要な形態である pregonite の形態形成

雄の外部生殖器官の一部である pregonite はフック状の形をしており、メスの産卵管の背側にあるクチクラのポケット状構造に引っかかることで、交尾安定化の役割を果たしていると考えられている。先行研究において、*D. subpulchrella* では pregonite が機能していることに対し、*D. suzukii* では機能していないことが示唆された。この2種における pregonite の形態形成を時期を追って解剖することにより調べた結果、蛹化後 50~60 時間に伸長してきた pregonite の先端の形状に種間で違いが生じてくることが、明らかとなった。

(4) Pool-seq 法及び QTL 解析による種間形態の違いの原因となるゲノム領域の特定

D. suzukii と *D. subpulchrella* の戻し交雑個体を雌雄それぞれ約 300 個体ずつ解剖して生殖器の画像の取得及び DNA の抽出を完了させた。また、これら2種間の生殖的隔離に関与

ることがわかっている雄の外部生殖器形態及び雌の産卵管形態 *pregonite* について Gras-Di 法を用いた Pool-seq 法で第 3 染色体の一部に種間差の原因となる領域があることがわかった。その後、先進ゲノム支援の支援課題(16H06279)に採択され、*D. suzukii* と *D. subpulchrella* の戻し交雑個体を雌雄それぞれ約 192 個体ずつ計 384 個体のゲノムライブラリを作成し、Novaseq6000 によるシークエンスリードを得ることができた。この雌雄 192 個体に関する個体ごとのゲノム配列を利用した QTL 解析により、以下の形質に関する種間の違いの原因となるゲノム領域を特定した。

雌の形質：1)産卵管の長さ、2)産卵管の先端の角度、3)産卵管の剛毛数、4)前脚 tibia の長さ、5)翅の長さ。雄の形質：1)生殖器 *pregonite* の長さ、2)*pregonite* の側面積、3)*pregonite* の形、4)生殖器 *surstylus* の先端の形、5)*surstylus* の剛毛数、6)生殖器 *cercus* の面積、7)*cercus* の剛毛数、8)性櫛の色の濃さ、9)性櫛の剛毛数、10)前脚 tibia の長さ、11)翅の長さ、12)翅の黒斑の位置。

その結果、繰り返し配列が多くアセンブルが難しい第 3 染色体の一部にこれらの形質の多くの原因遺伝子が存在することが明らかとなった。また、生殖器の形が作られる蛹期における下記、遺伝子発現解析(RNA-seq)の結果と照らし合わせ、候補となる遺伝子を QTL ピークの情報をもとに選定し、発現部位の特定や *D. melanogaster* の Gal4-UAS システムを用いた RNAi による機能予測を進めた。これらの成果について投稿論文執筆準備中である。

(5) トランスクリプトーム解析

D. suzukii と *D. subpulchrella* の *pregonite* に形態的差が観察される蛹期の発生段階の前後である蛹化後 48 時間と 62 時間において腹部先端組織を用いた RNA-seq を行い、種間で発現量の異なる遺伝子を検出した。また、これら二種について雌の蛹のステージ(蛹化後 48 時間)の腹部先端から RNA を抽出し RNA-seq を行った。その結果産卵管の内側にあり、卵の排出に関わると考えられるうろこ状の形態について種間差をもたらすと考えられる候補遺伝子を同定し、*D. melanogaster* の突然変異体の形態及び in situ hybridization による発現部位を調べた結果、*shavenbaby* 遺伝子がマスターコントロールするトライコーム形成遺伝子制御ネットワークがこの構造の形成に関与していることが明らかとなった(文献¹)。

(6) *D. suzukii* と *D. subpulchrella* を用いたゲノム編集技術の確立

候補遺伝子の機能解析を行うために、これら 2 種を用いたゲノム編集技術の確立を進め、それぞれの種で体色に影響を与える *yellow* 遺伝子のノックアウトに成功した。

(7) *D. suzukii* の産卵特性の分析

D. suzukii や *D. subpulchrella* は、他のショウジョウバエが利用しない落下前の若い果実に産卵する。他個体利用の痕跡に含まれる微生物の影響を分析した結果、利用後の基質に付着した微生物が *D. melanogaster* および *D. suzukii* の近縁種である *D. biarmipes* の産卵を促進するのに対し、*D. suzukii* の産卵を抑制することがハワイ大学と共同研究で明らかとなった(文献²)。産卵培地上の微生物の影響を明確に比較することができる実験系を用いたことで明らかにする事ができた成果である。

(8) *Scaptomyza graminum* のゲノム配列の決定及び外部生殖器接合状態の解析

D. suzukii と同じように伸長した産卵管を持ち、幼虫がリーフマイナーとして成長する草食性の *S. graminum* について、交尾中の生殖器の接合状態の観察を行い、*D. suzukii* や *D. subpulchrella* とは異なる様式で接合していることがわかった。この種についてゲノム情報を整備するため、Nanopore ロングリード及び Illumina ショートリードを用いたゲノムの *de novo* アセンブリを米国研究グループとの共同研究により行った(文献³)。

(9) ショウジョウバエの生殖器研究者のコミュニティとのネットワーク形成

2021 年度 5 月に、仏国 Paris、米国 Pittsburgh、東京の 3 地点を拠点とするオンラインの国際会議(4th Drosophila Genitalia Meeting)を共同開催したことをきっかけに海外研究者とのネットワーク形成が促進され、研究者コミュニティによるショウジョウバエ雌の生殖器部位の名称統一の作業に加わり、共著論文を出版することができた(文献⁴)。

<引用文献>

(文献 1) Tanaka, K.M., Takahashi, K., Rice, G.R., Rebeiz, M., Kamimura, Y., *Takahashi, A. (2022) **bioRxiv** (doi: <https://doi.org/10.1101/2022.01.21.477200>)

(文献 2) Sato, A., Tanaka, K.M., *Yew, J.Y., *Takahashi, A. (2021) **R. Soc. open sci.** 8:201601

(文献 3) *Kim, B.Y., (他 38 名, [Takahashi, A.](#) 32 番目) (2021) **eLife** 10: e66405.

(文献 4) McQueen, E.W., (他 22 名, [Takahashi, A.](#) 17 番目) (2022) **Fly** 16:128–151.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Sato Airi, Tanaka Kentaro M., Yew Joanne Y., Takahashi Aya	4. 巻 8
2. 論文標題 Drosophila suzukii avoidance of microbes in oviposition choice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 R. Soc. open sci	6. 最初と最後の頁 201601
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsos.201601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Takahashi Aya	4. 巻 2020
2. 論文標題 Analysis of the genetic basis of speciation induced by adaptation to new oviposition substrates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 62 ~ 64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21820/23987073.2020.6.62	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Massey Jonathan H., Akiyama Noriyoshi, Bien Tanja, Dreisewerd Klaus, Wittkopp Patricia J., Yew Joanne Y., Takahashi Aya	4. 巻 10
2. 論文標題 Pleiotropic effects of ebony and tan on pigmentation and cuticular hydrocarbon composition in <i>Drosophila melanogaster</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2019.00518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Miura Mai, Takahashi Aya	4. 巻 32
2. 論文標題 Starvation tolerance associated with prolonged sleep bouts upon starvation in a single natural population of <i>Drosophila melanogaster</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Evolutionary Biology	6. 最初と最後の頁 1117 ~ 1123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jeb.13514	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 高橋 文、田中 健太郎	4. 巻 69
2. 論文標題 種分化の遺伝学を目指して：モデル生物キイロショウジョウバエの利点と難点	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本生態学会誌	6. 最初と最後の頁 183 ~ 190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18960/seitai.69.3_183	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kim Bernard Y, (他38名、Takahashi Aya 32番目)	4. 巻 10
2. 論文標題 Highly contiguous assemblies of 101 drosophilid genomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e66405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.66405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Akiyama Noriyoshi, Sato Shoma, Tanaka Kentaro M, Sakai Takaomi, Takahashi Aya	4. 巻 12
2. 論文標題 The role of the epidermis enhancer element in positive and negative transcriptional regulation of ebony in <i>Drosophila melanogaster</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 G3 Genes Genomes Genetics	6. 最初と最後の頁 jkac010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/g3journal/jkac010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Eden McQueen, (他22名、Takahashi Aya 17番目)	4. 巻 16
2. 論文標題 A standardized nomenclature and atlas of the female terminalia of <i>Drosophila melanogaster</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fly	6. 最初と最後の頁 128 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19336934.2022.2058309	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Sato Airi, Tanaka Kentaro M, Yew Joanne Y, Takahashi Aya
2. 発表標題 Drosophila suzukii avoid commensal acetic acid bacteria in oviposition choice.
3. 学会等名 62nd Annual Drosophila Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤愛莉, 田中健太郎, Yew Joanne Y, 高橋文
2. 発表標題 オウトウショウジョウバエの産卵基質選好性：基質上の微生物と硬さの影響
3. 学会等名 日本進化学会第22回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤近敬子, 田中健太郎, 高橋文
2. 発表標題 ショウジョウバエの生殖休眠の進化
3. 学会等名 日本進化学会第22回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤愛莉, 田中健太郎, Yew Joanne Y, 高橋文
2. 発表標題 産卵基質上の微生物と産卵基質の硬度がオウトウショウジョウバエの産卵基質選好性に与える影響
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤愛莉, 田中健太郎, Yew Joanne Y, 高橋文
2. 発表標題 オウトウショウジョウバエの産卵基質選択時における微生物の忌避に関わる遺伝子の探索
3. 学会等名 日本遺伝学会第92回大会 (要旨集出版による発表)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤近敬子, 田中健太郎, 高橋文
2. 発表標題 オウトウショウジョウバエの生殖休眠に関与する遺伝子の解析
3. 学会等名 日本遺伝学会第92回大会 (要旨集出版による発表)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahashi Aya
2. 発表標題 Ecologically triggered mechanical isolation between <i>Drosophila suzukii</i> and its sibling species.
3. 学会等名 The 5th Asia Pacific <i>Drosophila</i> Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sato Airi, Yew Joanne Y, Takahashi Aya
2. 発表標題 Influence of microbial deposits from other individuals on oviposition site preference in <i>Drosophila suzukii</i> .
3. 学会等名 The 5th Asia Pacific <i>Drosophila</i> Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujichika Takako, Takahashi Aya
2. 発表標題 Reproductive diapause in <i>Drosophila suzukii</i> .
3. 学会等名 The 5th Asia Pacific <i>Drosophila</i> Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujichika Takako, Takahashi Aya
2. 発表標題 Reproductive diapause in <i>Drosophila suzukii</i> .
3. 学会等名 International Symposium on Evolutionary Genomics and Bioinformatics 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato Airi, Yew Joanne Y, Takahashi Aya
2. 発表標題 Influence of signals from other <i>Drosophila</i> individuals on oviposition site preferences of <i>Drosophila suzukii</i> .
3. 学会等名 日本進化学会第21回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujichika Takako, Takahashi Aya
2. 発表標題 Ovarian diapause in <i>Drosophila suzukii</i> .
3. 学会等名 日本進化学会第21回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋山礼良, 高橋文
2. 発表標題 CRISPR-Cas9システムによるシス発現調節機構の解析
3. 学会等名 日本進化学会第21回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋佳乃子, 上村佳孝, 田中健太郎, 高橋文
2. 発表標題 オウトウショウジョウバエにおける産卵管形態進化の遺伝的基盤の解明
3. 学会等名 日本進化学会第21回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋佳乃子, 上村佳孝, 田中健太郎, 高橋文
2. 発表標題 オウトウショウジョウバエの特異な産卵機能に関する遺伝的基盤の解明
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤近敬子, 扇山魁人, 高橋文
2. 発表標題 キロショウジョウバエにおける飢餓時の卵巣発達抑制機構に関わる遺伝子の解析
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahashi Aya
2. 発表標題 Mechanical incompatibility and reproductive isolation between a pair of fruit-damaging <i>Drosophila</i> species
3. 学会等名 The 2nd AsiaEvo Conference 2021 (online) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fujichiika Takako, Asano Tsunaki, Takahashi Aya
2. 発表標題 Variation in ovarian diapause phenotype within a natural population of <i>Drosophila suzukii</i>
3. 学会等名 The 2nd AsiaEvo Conference 2021 (online) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tanaka Kentaro M, Takahashi Kanoko, Kamimura Yoshitaka, Takahashi Aya
2. 発表標題 Rapid evolution of ovipositor scale
3. 学会等名 4th <i>Drosophila</i> Genitalia Meeting (online) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Muto Leona, Sakai Kyoka, Kumagai Tatsuyuki, Kamimura Yoshitaka, Tanaka Kentaro M, Takahashi Aya
2. 発表標題 Genital structures involved in mechanical incompatibility between <i>Drosophila suzukii</i> and <i>D. subpulchrella</i>
3. 学会等名 4th <i>Drosophila</i> Genitalia Meeting (online) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋山礼良, 佐藤翔馬, 田中健太郎, 坂井貴臣, 高橋文
2. 発表標題 ゲノム編集を用いたebony遺伝子シス発現制御因子の解析
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会 (オンライン)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤近敬子, 田中健太郎, 高橋文
2. 発表標題 アウトウショウジョウバエを用いた生殖休眠誘導時に発現変動する遺伝子の解析
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会 (オンライン)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Aya Takahashi HP https://sites.google.com/view/aya-takahashi Aya Takahashi HP https://sites.google.com/view/aya-takahashi</p>

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
研究分担者	上村 佳孝 (Kamimura Yoshitaka) (50366952)	慶應義塾大学・商学部(日吉)・准教授 (32612)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分担者	野澤 昌文 (Nozawa Masafumi) (50623534)	東京都立大学・理学研究科・准教授 (22604)	

	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
研究 協力者	田中 健太郎 (Tanaka Kentaro)		
研究 協力者	田村 浩一郎 (Tamura Koichiro)		
研究 協力者	佐藤 愛莉 (Sato Airi)		
研究 協力者	藤近 敬子 (Fujichika Takako)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
	米国	University of Hawaii at Manoa	University of California, Berkeley	Stanford University
ドイツ	University of Munster			