

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02542

研究課題名(和文) トゲウオ科魚類における収斂進化のホットスポット遺伝子の決定要因

研究課題名(英文) Determinants of hot spot genes of convergent evolution in sticklebacks

研究代表者

山崎 曜 (Yamasaki, Yo)

国立遺伝学研究所・ゲノム・進化研究系・助教

研究者番号：40816021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：独立な系統で類似の形質が進化することを収斂進化という。収斂進化ではたびたび同じ遺伝子が利用されることが知られるが、これはなぜだろうか？本研究ではトゲウオ科魚類で繰り返し生じた鱗板の欠損をモデルとして、どのような要因が収斂進化の遺伝的基盤の決定要因になるかを追究した。欧米と日本のイトヨ集団、および日本のトミヨ3種の比較解析から、集団間の遺伝的な交流の程度と、遺伝子が持つ多面発現効果とその回避が重要な要因であることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

適応の遺伝的基盤の解明を目的とした研究は近年盛んに行われており、遺伝子が同定される例も増えている。とはいえ、原因遺伝子を同定することは未だ容易ではなく、同定できた場合でも遺伝子名を記載的に報告するに留まる場合が多い。本研究ではその先の課題である、なぜその遺伝子が適応に利用されたのか、という遺伝的基盤の決定機構を問い、その答えとして集団構造と多面発現が大きく影響した可能性を示すことが出来たと考えている。

研究成果の概要(英文)：The evolution of similar traits in independent lineages is called convergent evolution. It is known that the same genes are often used for convergent evolution. However, the mechanism is unknown. In this study, we investigated what factors determine the genetic basis of convergent evolution using the repeated loss of lateral plates in threespine and ninespine stickleback fishes as a model system. Comparative analyses of European and Japanese threespine stickleback populations, and three Japanese ninespine stickleback species, we found that the degree of gene flow between populations, and the pleiotropic effects of genes and their avoidance, are probably important factors.

研究分野：生態遺伝学

キーワード：収斂進化 集団構造 多面発現 鱗板 トゲウオ科

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまでブラックボックスとされていた適応進化の原因遺伝子や場合によっては原因変異を特定し、適応的変異の集団内での振る舞いを知ることが可能となってきた。しかしそもそも、潜在的にいくつかあり得たであろう適応のルートのうち、なぜその遺伝子、あるいは変異が利用されたのか、その要因までを解明した例は少ない(Stern & Orgogozo, 2008)。収斂進化(あるいは平行進化)は、類似した形質が独立な系統で繰り返し進化する現象である。収斂進化でみられる同方向的な進化は、その方向性を決定づける自然選択の存在を強く示唆するため、適応進化の強い証拠と考えられている。そこで収斂進化の複数のルートと比較し、その共通点や相違点を知ることによって、なぜ適応進化のルートが限定されているのかを解明できる。

この収斂進化において観察される表現型の類似性は、その遺伝的基盤においても共通なのか、それとも異なるのか。近縁な種や集団での収斂進化では、ある特定の遺伝子が何度も利用される場合が多く観察されている(Conte et al. 2012)。この結果は、適応進化のホットスポット遺伝子やホットスポット変異が生じる要因の存在を示唆する。しかし、どのような要因が特定の遺伝子に偏った利用を促進しているのかは殆ど不明である。本研究の問いは、収斂進化においてホットスポット遺伝子やホットスポット変異が生じる要因は何か、である。

上記の問いに対し、本研究ではトゲウオ科魚類で見られる鱗板(鱗)の減少の収斂をモデルとする。トゲウオ科魚類は体側に鱗板と呼ばれる、変形した鱗を持つ(Fig. 1)。鱗板は捕食者に対する防御形質として、あるいは水流を感知するセンサーとして、働くことが知られている。一部のトゲウオ科集団ではこの鱗板が適応進化の結果として大きく減少している。例えば欧米のイトヨの淡水集団では、防御へのコストを減らす等の理由で鱗板が減少している(Marchinko, 2009)。

この欧米のイトヨにおける鱗板の減少は、*Ectodysplasin-A (Eda)* という遺伝子により決定している(Colosimo et al. 2005)。欧米では過去に一度生じた欠損型アリルが集団間で共有されることで、同祖的な変異を再利用した収斂的な鱗板減少が生じている(祖先多型)。いっぽうで、日本の欠損型は、欧米とは異なる変異を利用している(Colosimo et al. 2005; Yamasaki et al. 2019)。そこで研究代表者らが日本の欠損型の原因遺伝子を探索したところ、*Eda*とそのレセプターである *Edar*が強い候補として浮上した。つまり日本の欠損型は、欧米と同じ遺伝子の異なる変異、そして異なる遺伝子の変異の両方を利用して収斂進化していた。

鱗板の減少は同じトゲウオ科のトミヨ類でも知られる(Fig. 1)。トミヨ類では、鱗板の有無で感丘の数が異なることから、水流感知に関する適応であると考えられる。研究代表者らがトミヨ属淡水型の鱗板完全型と欠損型の多型集団を対象にゲノムワイド関連解析(GWAS)を行ったところ、その原因遺伝子はまたも *Eda*であることが強く示唆された。日本には4種のトミヨ類が分布し、そのうち3種が近縁である。この3種のうち2種は種内に完全型と欠損型を有し、残りの1種は欠損型のみが見られる。興味深いことに、これらの種の *Eda* 遺伝子は、種よりも、鱗板型をより反映した系統関係を示した。これは同じ変異を利用した鱗板減少の収斂がこの3種で生じたことを示す。

### 2. 研究の目的

以上の研究代表者らの研究などから、トゲウオ科の内部の様々な系統的類縁段階において、*Eda*もしくは *Edar*、あるいはその両方が鱗板減少に使われやすいことが示された。ここで研究代表者らは、なぜ *Eda* や *Edar* が鱗板の減少に頻繁に使われるのか、という疑問を着想した。1つの仮説は集団構造である。一度生じた同祖的な対立遺伝子が、遺伝子流動などで集団間で共有されればそれが繰り返し使用されやすいだろう(Schluter & Conte, 2009)。いっぽうで遺伝子流動が無ければ新規に生じた独立な変異が使用されやすいだろう。もう一つは多面発現である。*Eda* や *Edar* は歯や鱗など、皮骨系組織の発生で中心的役割を担う(Sadier et al. 2014)。そのため突然変異は鱗板のみならず、他の組織の発生にも大きく影響しうる。いっぽうで突然変異が鱗板の枚数をコントロールする調節領域に入った場合には、鱗板以外の形質への多面発現効果が抑えられうる。*Eda* や *Edar* にはそのような調節領域が存在するために多面発現効果を回避しやすく、頻繁に利用されるのかもしれない。

以上から、トゲウオ科のイトヨとトミヨで見られた鱗板減少の収斂進化で *Eda* と *Edar* がホットスポット遺伝子となった要因を、集団構造および多面発現に着目し解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) イトヨにおける研究

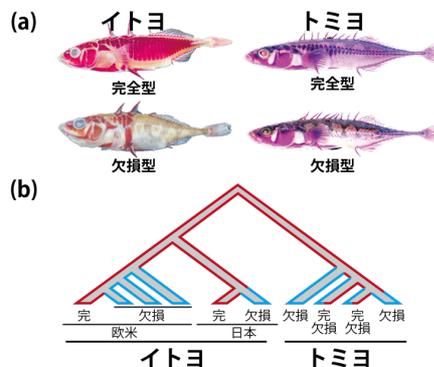


Fig. 1 (a) イトヨ及びトミヨの鱗板完全型と欠損型 (b) 系統関係

### ① 原因領域の絞り込み

日本で見られる鱗板枚数変異の原因遺伝子が *Eda* と *Edar* であることが支持されているが、その原因変異は明らかでは無い。そこで原因変異が存在する領域を QTL マッピングにより詳細に絞り込むため、鱗板完全型と欠損型の F2 を多数作成した。また絞り込んだ領域内の候補変異を探索できるように、両型についてショートリードシーケンスによる SNP 探索と、ロングリードシーケンスによるゲノムアセンブルを行った。ロングリードシーケンスとアセンブルは国立遺伝学研究所の豊田敦特任教授、工樂樹洋教授、理化学研究所の門田満隆博士と共同で行った。

### ② 集団の進化史の推定に基づく集団構造仮説の検証

集団構造仮説が正しければ、欧米の遺伝的変異が日本の集団にまで到達しなかった可能性がある。すなわち、日本の海型と欧米の海型、そして日本の海型と日本の淡水型のそれぞれの間で遺伝的交流のレベルが低かったことが予想される。デモグラフィ解析による遺伝子流動量の推定を行うことで、日本の海型と欧米の海型の遺伝子流動量、日本の海型と淡水型の遺伝子流動量がそれぞれ低かったかを検証した。加えて日本やその周辺地域内に欧米の *Eda* の変異があるかを検証した。日本の道東域、千島列島（ワシントン大学から供与）、ベーリング海のサンプルについて *Eda* の遺伝子型を決定した。

### ③ ゲノム編集による多面発現仮説の検証

*Eda* のノックアウト個体は鱗板以外にも鰭や鰓耙などの形質が欠損することが先行研究で報告されている。*Edar* についても CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集実験によりノックアウト実験を行い、どのような形質に影響が出るかを検討した。

## (2) トミヨにおける研究

### ① 原因領域の絞り込みと同定

トミヨの鱗板減少の原因変異は *Edar* のあるイントロン内に絞られていた。そこでまず *Edar* をゲノム編集実験によりノックアウトし、トミヨにおいても *Edar* が原因遺伝子であることの確認を行った。次にゲノム編集で候補原因領域を欠損させることで原因変異かを検証した。このゲノム編集実験は岡山大学の安齋賢教授との共同研究で行った。

### ② 集団および原因領域の進化史の推定に基づく集団構造仮説の検証

全ゲノムシーケンスにより得られた SNP を用いて Ancestral Recombination Graph 解析を行い、*Edar* の GWAS のピークが確認された原因変異周辺領域の系統関係を推定した。加えて *Edar* 内だけでなく、その近傍にも鱗板枚数を説明する候補原因領域を GWAS により確認していたため、この遺伝子座についても ARG 解析を行った。また野外サンプルにおいてこれら 2 カ所の遺伝子型を決定し、遺伝子型と表現型の対応を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) イトヨにおける研究

#### ① 原因領域の絞り込み

日本の鱗板完全型と欠損型の交配から、現在すでに多数の F2 を得ており、また追加で成長を待っている個体がある段階である。今後 QTL マッピングを行う予定である。ショートリードによる全ゲノムシーケンスより、日本の鱗板欠損型と完全型の間では *Eda* と *Edar* のコード領域にアミノ酸置換は確認されなかったことから、原因変異はシス制御領域であることが示唆された。また日本の鱗板完全型と欠損型のゲノムアセンブルを行い、共に高品質な参照ゲノム配列を得ることができた (Fig. 2)。QTL マッピングが完了した後にこれらのデータを利用し、ピーク内に存在する変異を探索していく予定である。

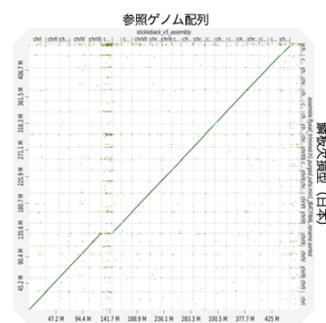


Fig. 2 イトヨの参照ゲノム配列と今回アセンブルした日本の鱗板欠損型の比較。参照配列と大きな違いの無い、高い品質のゲノム配列が得られた。

#### ② 集団の進化史の推定に基づく集団構造仮説の検証

デモグラフィ解析により、欧米の海型から日本の海型への遺伝子流動は存在するものの、世代あたり 1 個体を下回っており、高いレベルではないと推定された (Fig. 3)。また日本の海型から日本の淡水型への遺伝子流動のレベルも低いと推定された (Fig. 3)。加えて日本国内の海型、およびベーリング

海の海型では欧米で見られる *Eda* の鱗板欠損型アリルは発見されなかった (Fig. 4)。しかし一方で千島列島の淡水型と思われる集団において *Eda* の完全型アリルと欧米型の鱗板欠損型アリルを多型的に持つ集団が発見された (Fig. 4)。この結果は当初の予測に反し、少なくとも日本列島の周辺までは欧米の鱗板欠損型アリルが遺伝子流動によりもたらされていたことを示す。そしてこのアリルは結果的に日本の集団の鱗板欠損型の進化には使用されなかったことを示している。この理由は不明だが、集団間の遺伝子流動のレベルが低いために、千島列島以南への拡散が起きなかったのかもしれない。

### ③ゲノム編集による多面発現仮説の検証

CRISPR-Cas9によるゲノム編集実験により、日本の鱗板完全型の *Edar* のノックアウトと正常ゲノムをヘテロに持つ個体を得た。この個体は鱗板を大きく欠損させていたことから、*Edar* が鱗板枚数変異の原因遺伝子であることが強く支持された。ヘテロの個体は鱗板以外の外部形態にも欠損や奇形が見られたことから、*Edar* は多面的な効果を持つことが示された。

#### (2) トミヨにおける研究

##### ①原因領域の絞り込みと同定

トミヨにおいてもイトヨと同様にゲノム編集による *Edar* のノックアウト実験を行った。ノックアウトと正常ゲノムをヘテロに持つ個体はイトヨと同様に鱗板を欠損させ、その他の形質にも異常が見られた。

トミヨの鱗板完全型の *Edar* の候補原因領域について CRISPR によるノックアウト実験を行ったところ、鱗板のみに異常が見られる個体を得られた。この結果は今回ノックアウトした領域が原因領域であることを強く示唆し、*Edar* には多面発現効果を回避しつつ鱗板だけ変化させることが可能な領域が存在することを示唆する。

##### ②集団および原因領域の進化史の推定に基づく集団構造仮説の検証

*Edar* 内と *Edar* の近傍に見つかった二箇所の候補原因遺伝子座と表現型の対応関係を解析したところ、これら間に相互作用が見つかった。次にこれら二つの原因領域のそれぞれで ARG 解析を行ったところ、片側の欠損型のアリルはずいぶん古い一方、もう片側の原因変異領域における ARG 解析では、鱗板型と対応した樹型は解析したトミヨ 3 種のうち 1 種でのみ確認された。この結果はある表現型に対して複数の原因変異がどのような順番で進化するかを理解する上で非常に興味深い結果である。

#### 本研究の位置付けとインパクト

適応の遺伝的基盤の解明を目的とした研究は近年盛んに行われており、遺伝子が同定される例も増えている。とはいえ、原因遺伝子を同定することは未だ容易ではなく、同定できた場合でも遺伝子名を記載的に報告するに留まる場合が多い。本研究ではその先の課題である、なぜその遺伝子が適応に利用されたのか、という遺伝的基盤の決定機構を問い、その答えとして集団構造と多面発現が大きく影響した可能性を示すことが出来たと考えている。

#### 今後の展望

まず日本の鱗板欠損型の原因変異を明らかにするための QTL マッピングを完遂させる。もし候補領域が明らかとなった場合にはゲノム編集実験を行って実際に確認を行う。

イトヨとトミヨの両方において、鱗板枚数変異の原因変異は複数存在することが明らかとなった。どのような効果をもつ変異がどのような順番で進化するのかはこれまで理論的な予測は存在するが、実際の生物で検証された例はほとんどない。トミヨについては既に順番が明らかとなっているが、イトヨについてはまだ不明である。QTL マッピングで原因領域がある程度絞れた段階で ARG 解析を行うことで、原因変異がいつ頃進化したか、また *Eda* と *Edar* の変異のどちらが先に進化したかを明らかにする。

千島列島までは欧米型の鱗板欠損型アリルがもたらされていたことが判明したが、なぜこの

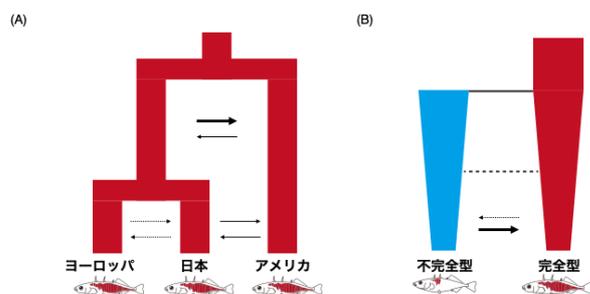


Fig. 3 デモグラフィ推定の結果。(A) 海型を用いた大陸間のデモグラフィ。(B) 日本の鱗板完全型と欠損型の間でのデモグラフィ。矢印の上下の数値は遺伝子流動量を表し、単位は個体/世代。



Fig. 4 各集団におけるアリル頻度。千島列島のみ淡水域、その他は海域で得られたサンプルを解析した。

変異が日本の淡水集団で利用されなかったかは明らかではない。この集団が他集団との遺伝な交流レベルが低かったかを全ゲノム解析から明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 山崎 曜
2. 発表標題 トゲウオ科魚類における鱗板収斂進化とその原因遺伝子
3. 学会等名 2022年度日本魚類学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yo Y. Yamasaki, Tomoyuki Kokita, Koki Kato, Asato Irifune, Mitsuki Kuroda, Hiroshi Takahashi, Yoshiyasu Machida, Asano Ishikawa, Mikiko Tanaka, Seiichi Mori, Atsushi Toyoda, Jun Kitano
2. 発表標題 Contingency and determinism in the genetic basis of stickleback plate evolution.
3. 学会等名 The 10th International Conference on Stickleback Behaviour and Evolution
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yo Yamasaki, Tomoyuki Kokita, Koki Kato, Asato Irifune, Mitsuki Kuroda, Hiroshi Takahashi, Yoshiyasu Machida, Asano Ishikawa, Mikiko Tanaka, Seiichi Mori, Atsushi Toyoda, Jun Kitano
2. 発表標題 Determinism and contingency in the molecular genetic basis of parallel armor plate evolution during stickleback radiation
3. 学会等名 Congress of the European Society for Evolutionary Biology 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎曜, 豊田敦, 小北智之, 森誠一, 北野潤
2. 発表標題 遺伝子流動がトゲウオの平行進化の遺伝基盤に与える影響
3. 学会等名 日本進化学会第23回沖縄大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎曜, 山口諒, Bo-Jyun CHEN, David A BEAUCHAMP, 北野潤
2. 発表標題 短期的進化の予測可能性検証：ワシントン湖におけるイトヨ鱗板数急速進化の事例
3. 学会等名 第71回日本生態学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yo Y. Yamasaki, Tomoyuki Kokita, Koki Kato, Asato Irifune, Mitsuki Kuroda, Hiroshi Takahashi, Yoshiyasu Machida, Asano Ishikawa, Mikiko Tanaka, Seiichi Mori, Atsushi Toyoda, Jun Kitano
2. 発表標題 Contingency and determinism in the genetic basis of stickleback plate evolution.
3. 学会等名 The 10th International Conference on Stickleback Behaviour and Evolution (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yo Yamasaki, Atsushi Toyoda, Tomoyuki Kokita, Seiichi Mori, Jun Kitano
2. 発表標題 Gene flow and the evolution of chromosomal inversion in sticklebacks.
3. 学会等名 The 10th International Conference on Stickleback Behaviour and Evolution (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yo Yamasaki, Tomoyuki Kokita, Koki Kato, Asato Irifune, Mitsuki Kuroda, Hiroshi Takahashi, Yoshiyasu Machida, Asano Ishikawa, Mikiko Tanaka, Seiichi Mori, Atsushi Toyoda, Jun Kitano
2. 発表標題 Determinism and contingency in the molecular genetic basis of parallel armor plate evolution during stickleback radiation
3. 学会等名 Congress of the European Society for Evolutionary Biology 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yo Y. Yamasaki, Atsushi Toyoda, Tomoyuki Kokita, Seiichi Mori, Jun Kitano
2. 発表標題 Increased genetic differentiation at inverted chromosomal regions between parapatric pairs, but no between allopatric pairs of sticklebacks.
3. 学会等名 Gordon Research Seminar “Speciation” The Origin and Persistence of Species (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎曜
2. 発表標題 トゲウオ科魚類における鱗板収斂進化とその原因遺伝子
3. 学会等名 2022年度日本魚類学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yo Yamasaki, Atsushi Toyoda, Tomoyuki Kokita, Seiichi Mori, Jun Kitano
2. 発表標題 Gene flow and chromosome evolution in sticklebacks
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎曜
2. 発表標題 魚類における適応進化と種分化の再現性
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	北野 潤  (Kitano Jun)  (80346105)	国立遺伝学研究所・ゲノム・進化研究系・教授   (63801)	

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
---------	---------