

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02558

研究課題名(和文) グッピーにおける色彩装飾形質の進化：csf1r遺伝子に着目して

研究課題名(英文) Evolution of colour ornamentation traits in guppies: focus on the csf1r gene.

研究代表者

河田 雅圭 (Kawata, Masakado)

東北大学・高度教養教育・学生支援機構・総長特命教授

研究者番号：90204734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、csf1r/csf1遺伝子が、雄の装飾形質であるオレンジスポットに影響すると同時に、細菌抵抗性などの免疫能に影響することを示すことで、csf1r/csf1の変異遺伝子が性選択説における「良い遺伝子」である可能性を検証した。Csf1シグナル伝達阻害剤を用いた実験から、Csf1シグナル伝達活性とオレンジスポットの面積と彩度の発現の関係が示された。また、Csf1シグナル伝達阻害剤とグラム陰性細菌の外膜構成成分であるリポ多糖(LPS)を用いた実験により、Csf1シグナルが免疫細胞の活性化や病原体認識を促進し、細菌などの病原体に対する防御を強化する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、雄の派手な装飾形質がなぜ進化するのか、について幾つかの理論が提唱されてきたが、まだ確定的な結論にいたっていない。理論の一つであるメスが「よい遺伝子」をもつ雄を選ぶという仮説についても、具体的な遺伝子を特定した研究はこれまでなかった。本研究では、csf1/csf1r遺伝子が、雄の装飾形質であるオレンジスポットに影響すると同時に、病原体などへの抵抗性にも影響することを示し、これらの遺伝子が「よい遺伝子」の候補であることを示した。これらの成果は、生存率を低下させるような生物の性質をなぜメスが嗜好するのか、という長年の問題への解決へ繋がるものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study tested the possibility that the csf1r/csf1 genes are candidate for 'good gene' in the sexual selection theory by showing that the csf1r/csf1 genes affect the male ornamental traits (orange spot), and also affects immunocompetence, such as bacterial resistance, using Csf1 signalling inhibitors. Experiments showed a relationship between Csf1 signalling activity and the expression of orange spot area and saturation. Experiments with Csf1 signalling inhibitors and lipopolysaccharide (LPS), a component of the outer membrane of Gram-negative bacteria, suggested that Csf1 signalling may enhance defence against pathogens such as bacteria by promoting immune cell activation and pathogen recognition.

研究分野：進化生態学

キーワード：性選択 雄の装飾性 質 mate choice グッピー *Poecilia reticulata*

## 1. 研究開始当初の背景

雄の派手な「色彩装飾形質」を雌が交配相手に選ぶという性質(Mate choice)がなぜ進化、維持されているのかという性選択の問題は、理論や実証研究が多数だされているにも関わらず、依然未解決の進化学・生態学の重要課題である。特に、雌が派手な形質を選ぶことで子どもの適応度を増加させるような遺伝子を引き継ぐという「良い遺伝子」仮説が有力な説として取り上げられることが多いが、近年の総説やメタ解析では、「良い遺伝子」仮説を強く支持するような結果はほとんどないと指摘されているグッピーは性選択と生態学に関わるモデル生物として、多くの研究がなされてきた。オレンジスポットの「色彩装飾形質」の進化を説明する主要な仮説として、ランナウィ仮説、「良い遺伝子」仮説が提唱されているが、確実な証拠は得られていない。私たちは、グッピーの野生集団を用いた研究において雌に選択的に交配によって選ばれた候補遺伝子として *csf1r* を検出した。ゼブラフィッシュの研究から、*csf1r* は、オレンジスポットの主要成分である黄色素胞の分化と胎児のマクロファージの体内への拡散に影響していることが示されていることから、色彩装飾形質と適応度に関わる免疫能に同時に影響する「良い遺伝子」の候補であると考えられる。

## 2. 研究の目的

グッピーにおいてオレンジスポットに対するメスの選好性がどのように進化したのかを明らかにするには、まずオレンジスポットの形成に関与する遺伝子を特定し、それらの遺伝子が生存力にも同時に影響することを示す必要があると考えた。そこで (1) オレンジスポット形成の遺伝的基盤を調査し、関与する遺伝子の推定を行なった。推定された遺伝子の中には、他の生物において病原体に対する生体防御能にも関与することが知られる *Csf1* シグナルのリガンドと受容体遺伝子が含まれていたことから、次に (2) オレンジスポットと生体防御能に対する *Csf1* シグナル経路活性の作用を調査した。また、オレンジスポット面積が大きいオスがメスから好まれる傾向があるにも関わらず、なぜオレンジスポットの多様性が維持されているのか、その遺伝的基盤を明らかにするため、(3) GWAS(Genome-Wide Association Study) によるオレンジスポットの多様性に関与する変異の検出を行った。

## 3. 研究の方法

(1)ではオレンジスポット形成に関与する遺伝子を、RNA-seq によるオスの皮膚の遺伝子発現解析から推定した。まずオレンジスポットとスポット以外の部分での遺伝子発現の比較から、オレンジ部分に特異的な遺伝子発現を検出した。次に、体色形成を基準に設定した3つの成長段階において、体表全体の遺伝子発現を比較することで、オレンジスポットの発達に伴い発現量が変化する遺伝子を検出した。オレンジ部分で高発現していた遺伝子を対象として GO (Gene Ontology) エンリッチメント解析を行い、遺伝子機能の偏りを検出した。また、2通りの比較それぞれから検出された発現変動遺伝子の中で、オレンジ色を構成する黄色素胞への関与が知られる遺伝子に注目して発現パターンを確認することで、オレンジスポットの形成時に特に大きく影響すると思われる遺伝子を推定した。

(2)ではオスのグッピーを *Csf1* シグナル活性の阻害剤で処理した際の体色と生体防御能への影響をそれぞれ調査した。まず体色への影響を明らかにするため、オスのグッピーを阻害剤で2週間処理、その後2週間処理を停止し、処理前後の画像から算出したオレンジスポット面積と彩度を比較した。さらに、体色の変化がどのような遺伝子発現の変化に由来するか調査するため、2週間阻害剤あるいはコントロールとして DMSO で処理をしたオスの皮膚の遺伝子発現を、RNA-seq により比較した。次に、生体防御能への影響を調査するため、同様に2週間の阻害剤処理の後、グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポポリサッカライドで6時間処理を行った。その後 RNA-seq による皮膚での遺伝子発現解析を行い、*Csf1* シグナルの阻害によって病原体への応答が変化する遺伝子を検出した。

(3)ではオス 88 個体を用い、オレンジスポットの面積と相関する一塩基多型(SNP)を GWAS の手法で検出した。まず個体ごとの全ゲノムシーケンスを取得し、グッピーのリファレンスゲノムへのマッピング、SNP 検出の後、クオリティコントロールを行い、基準を満たした SNP をデータとして利用した。一方でオレンジスポットの測定にあたっては、全個体の体表の画像の体型を一定に補正した後に 505 の座標を設定し、オレンジ部分の座標を記録した。各座標についてオレンジであるか否かと座標の位置情報をもとにクラスタリングを行い、4つのオレンジスポットを分離した。体表部分全体のオレンジ座標数と、分離された各4つのオレンジスポット部分の座標数を表現系値とし、一般化線型モデルによる回帰分析から P 値を算出した。閾値を 1/解析 SNP 数 1,030,414 から求めた  $9.7E-07$  と設定し、この値を下回る P 値が算出された SNP を各形質と相関する SNP として検出した。

## 4. 研究成果

### (1)オレンジスポット形成の遺伝的基盤

オレンジスポット部分に特異的な遺伝子発現を検出するため、オレンジスポットとスポット以外の部分の皮膚の間で遺伝子発現を比較した結果、1102 の発現変動遺伝子が検出され、そのうち 630 遺伝子はオレンジ部分で高発現、472 遺伝子は低発現していた。一方、体色の発達に伴い発現量が変化する遺伝子を、3 つの成長段階間での体表全体での遺伝子発現の比較から検出した結果、2247 遺伝子が検出された。オレンジ部分で高発現していた遺伝子を対象として GO エンリッチメント解析を行った結果、色素沈着、IMP とプリンヌクレオチド合成、小胞輸送の 4 つの GO term が検出された。黄色素胞に含まれるプテリジンなどの色素は IMP などのプリンヌクレオチドから合成され、またそのような色素はリソソーム様の細胞小器官が合成や保持を行うことから、オレンジスポット部分では体色形成に関連する遺伝子が多く発現することが推定された。黄色素胞に関与する遺伝子に注目すると、オレンジ部分では神経堤細胞から幼生期の薄い色の黄色素胞への一次分化に関与する 3 遺伝子と、幼生期の黄色素胞から成魚期の濃いオレンジ色の黄色素胞への二次分化に関与する 7 遺伝子とが高発現していた。これらの一次分化に関与する遺伝子には、黄色素胞と共にオレンジスポットを構成する色素細胞である虹色素胞では常時発現している 2 遺伝子と、黄色素胞内で色素の合成や保持を行う小胞の拡散にも関与する 1 遺伝子が含まれていた。このことから、オレンジ部分でのこれら一次分化関連遺伝子の発現は、必ずしもオレンジ部分での一次分化を表していないと考えられる。一方、成長段階の間で発現量を比較すると、一次分化に関与する 1 遺伝子は成長に伴って発現が減少することに対し、二次分化に関与する 3 遺伝子はオレンジスポットの形成が始まる頃から形成が完成する時期にかけて増加することが明らかになった。このことから、オレンジスポットは黄色素胞の一次分化よりも主に二次分化から形成されることが推定された(図 1)。

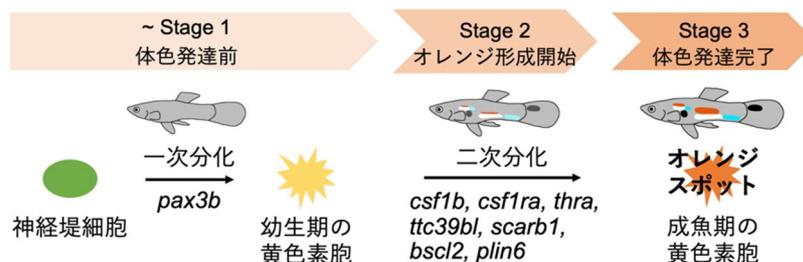


図1 オレンジスポット形成の遺伝的基盤の概要

(2) オレンジスポットと生体防御能に対する Csf1 シグナル経路活性の作用  
黄色素胞の二次分化を誘導するシグナル経路の一つが Csf1 シグナルであり、(1)の結果このリガンドと受容体遺伝子(*csf1b*, *csf1ra*)がオレンジスポット部分で高発現していることが明らかになった。そこで、まず Csf1 シグナルの活性とオレンジスポットとの関係を明らかにするため、Csf1 シグナル阻害剤での処理前後でオレンジ面積と彩度を比較した。その結果、2 週間の処理後には面積、彩度の値が有意に減少し、その後 2 週間処理を停止すると各値が処理前と同程度まで増加した。阻害剤とコントロールとして DMSO で 2 週間処理した群とで皮膚の遺伝子発現を比較した結果、651 の遺伝子が発現変動遺伝子として検出された。阻害剤処理により発現が増加した 183 遺伝子については、GO エンリッチメント解析において有意な GO タームは検出されなかった一方、発現量が減少した 468 遺伝子については 21 の GO term が検出された。検出された中には細胞分裂・周期の制御や染色体の凝縮・分離、DNA 複製といった、細胞分裂に関連する GO term が含まれており、Csf1 シグナルの阻害が皮膚での細胞分裂を抑制した可能性が示された。また、阻害剤処理で発現量が減少した遺伝子の中から、黄色素胞に関連する遺伝子を抽出した結果、黄色素胞の発達や分化、色素の合成や取り込みに関連する 7 遺伝子が含まれていた。これらの 7 遺伝子は、(1)においてオレンジスポット部分で高発現していた黄色素胞関連の 15 遺伝子の中に含まれており、オレンジスポット部分の黄色素胞関連遺伝子の少なくとも一部は Csf1 シグナルの制御下にあることが推定された。以上の結果から、Csf1 シグナル経路の活性は黄色素胞の数やその中に含まれる色素の量の制御を介してオレンジスポットに反映され、オレンジ色の維持に寄与することが示唆された。

さらに、Csf1 シグナル活性と生体防御能との関係を調査するため、阻害剤処理後にリポポリサッカライドで免疫刺激を与えた際の皮膚での遺伝子発現解析を行った。まず Csf1 シグナルを阻害していないコントロール群、阻害剤処理群のそれぞれにおいて、リポポリサッカライドで免疫刺激を与えた群と与えていない群とで遺伝子発現を比較した。その結果、コントロール群では 89 遺伝子が、Csf1 シグナル阻害群では 608 遺伝子が免疫刺激時に発現量が変化する遺伝子として検出された。また、免疫刺激を受けているときの発現量が Csf1 シグナル活性に影響される遺伝子を検出するため、免疫刺激を与えたときのコントロール群と Csf1 阻害群とで遺伝子発現を比較した結果、124 遺伝子が検出された。Csf1 阻害剤で処理をしていないコントロール群でのみ免疫刺激にตอบสนองし、かつ免疫刺激下での遺伝子発現が Csf1 シグナル阻害で変化する 5 遺伝子を、Csf1 シグナル阻害により免疫刺激への応答が抑制された遺伝子として、また Csf1 阻害剤処理群でのみ免疫刺激にตอบสนองし、かつ免疫刺激下での遺伝子発現が Csf1 シグナル阻害で変化する 13 遺伝子を、Csf1 シグナル阻害により免疫刺激への応答が促進された遺伝子として検出した。検出された遺伝子の既知の機能を確認すると、まず T 細胞の活性に関与する遺伝子について、活性を誘導する遺伝子は Csf1 シグナル阻害によって免疫刺激時の発現量増加が抑制されたことに對

し、活性を抑制する遺伝子については発現量増加が誘導されていた。このことから、Csf1 シグナルは免疫刺激時の T 細胞の活性化に必要であることが推定された。また、検出された遺伝子には活性酸素種の産生や DNA 損傷に關与する遺伝子も含まれていた。活性酸素種の産生の減少にはたらく遺伝子については Csf1 シグナルの阻害で免疫刺激時の発現量増加が抑制された一方、活性酸素種や DNA 損傷によって発現が抑制される遺伝子については免疫刺激時の発現量が減少、さらに、活性酸素種や DNA 損傷を誘導する遺伝子は免疫刺激時に発現量が増加していた。このことから、Csf1 シグナルは免疫刺激を受けた際の活性酸素種産生や DNA 損傷の抑制にも機能することが予想された。過剰な活性酸素は DNA 損傷を誘導し、また免疫細胞の活性阻害を誘導することから、これらの遺伝子発現の変化は免疫細胞の活性の低下を表している可能性がある。さらに、細菌を凝集させるはたらきをもつレクチン遺伝子が、Csf1 シグナル活性の阻害時には免疫刺激に応答した発現量の増加が抑制されたことに対し、リポポリサッカライドの認識に關与する遺伝子は免疫刺激時に発現量が減少していた。このことから、Csf1 シグナルは免疫刺激時の病原体認識にも影響することが考えられる。以上の遺伝子発現の変化から、Csf1 シグナルは免疫刺激時の免疫細胞の活性や病原体の認識を調節することで、生体防御能を高めるはたらきをもつ可能性が考えられる。

以上の結果から Csf1 シグナル活性とオレンジスポットの関係、Csf1 シグナルと生体防御能との関係がそれぞれ示され、オレンジスポットは Csf1 シグナル活性を反映することで、生体防御能の高さの指標として機能することが示唆された(図2)。

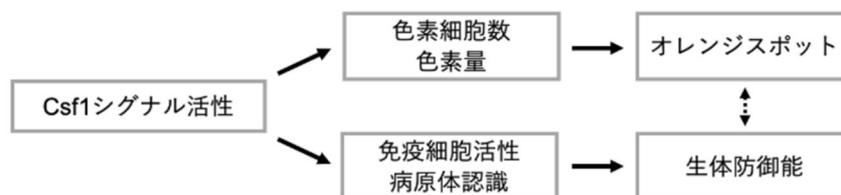


図2 Csf1シグナルとオレンジスポット、生体防御能の関係

### (3) GWAS によるオレンジスポットの多様性に關与する変異の検出

85 個体から検出された 1,030,414 SNP から、体表部分全体のオレンジ座標数、4 つのオレンジスポット部分の座標数それぞれと相関する SNP が検出された(図3)。体表全体のオレンジ座標数と相関する SNP としては 22 番染色体に 3 SNPs が検出され、近傍 20 kbp には 23 遺伝子が位置していた。オレンジスポット 1 の座標数では 1, 3, 4, 7, 9, 12, 13, 19 番染色体と染色体状に配置されていない配列上に 88 SNPs が、オレンジスポット 2 では 3, 5, 6, 7, 8, 13, 14, 17, 19, 20, 21, 23 番染色体と染色体状に配置されていない配列上に 168 SNPs が、オレンジスポット 3 については 12 番染色体上に 17 SNPs が、オレンジスポット 4 では 2, 3, 12, 13, 21, 23 番染色体と染色体状に配置されていない配列上に 528 SNP が検出され、近傍 20 kbp にはそれぞれ 319, 544, 56, 470 遺伝子が位置していた。各解析で一致した SNP は検出されず、体表全体のオレンジスポット面積と個々のそれぞれのオレンジスポット面積は異なる変異によって制御されることが示唆された。一方、一部の解析間では染色体上の比較的近い領域にピークが検出された。オレンジスポット 1 と 2 の座標数の間には有意な負の相関が、1 と 3 の間についても負に相関する傾向が確認され、個々のスポット面積は全く独立して制御されている訳ではなく、その一部についてはトレードオフの関係にある可能性が示された。特に 12 番染色体ではオレンジスポット 1, 3, 4 において共通してピークが検出された。グッピーの 12 番染色体は性染色体であり、Y 染色体の一部の配列がオス特異的に多様化していることが知られている。このことから、オスに特異的な配列の多様性とオレンジスポットの多様性との関係が示唆された。以上の結果から、オレンジスポットの多様性は個々のオレンジスポット間のトレードオフと、オス特異的な Y 染色体の配列多様性により形成される可能性が示された。

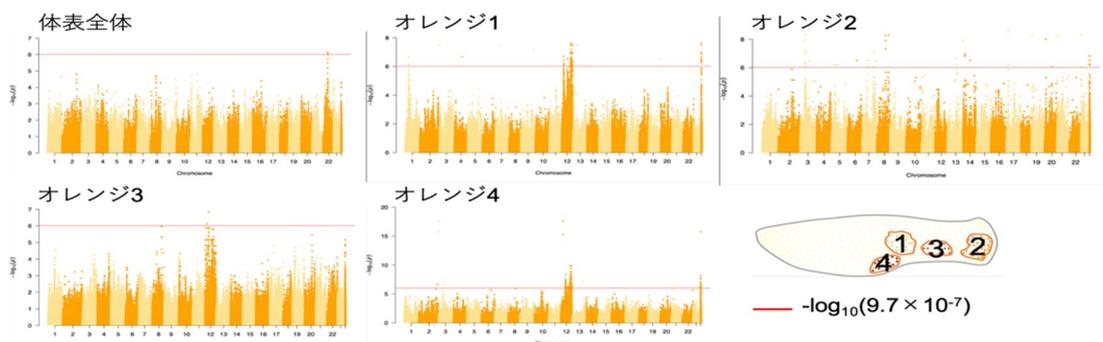


図3 GWAS結果の概要

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawamoto, M., Y. Ishii, M. Kawata	4. 巻 21
2. 論文標題 Genetic basis of orange spot formation in the guppy ( <i>Poecilia reticulata</i> ).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12862-021-01942-2	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川本 麻祐子・石井悠・河田雅圭
2. 発表標題 Csf1シグナル経路の多面的作用を介したグッピーの色彩装飾形質の進化
3. 学会等名 日本生態学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川本 麻祐子・石井 悠・阿部 玄武・河田 雅圭
2. 発表標題 グッピーにおける色彩装飾形質の遺伝的・分子的基盤
3. 学会等名 日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kawamoto, M., Y. Ishii, and M. Kawata
2. 発表標題 Genetic and cellular basis of orange spot formation in the guppy ( <i>Poecilia reticulata</i> )
3. 学会等名 The 2nd AsiaEvo Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川本麻祐子・石井悠・河田雅圭
2. 発表標題 グッピーの色彩装飾形質の進化におけるCsflシグナル経路の多面的作用の役割
3. 学会等名 日本動物学会第94回山形大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川本麻祐子・石井悠・河田雅圭
2. 発表標題 グッピーの色彩装飾形質の進化：Csflシグナル経路がオレンジスポットと免疫応答に与える影響
3. 学会等名 第23回日本進化学会沼津大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川本麻祐子・内田悠奈・石井悠・河田雅圭
2. 発表標題 GWASによるグッピーの色彩装飾形質の多様性に 関与する変異の検出
3. 学会等名 日本進化学会第25回沖縄大会 2023年9月
4. 発表年 2023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

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