

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：23401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780180

研究課題名（和文）

非モデル魚における集団特異的適応遺伝子の検出：網羅的遺伝子発現解析と自然選択解析

研究課題名（英文）Exploring population-specific adaptive genes in the non-model fish species: comprehensive gene expression and population genomic analyses

研究代表者

小北 智之（KOKITA TOMOYUKI）

公立大学法人福井県立大学・海洋生物資源学部・講師

研究者番号：60372835

研究成果の概要（和文）：自然集団の適応的分化に関与した候補遺伝子群を検出する研究において、比較トランスクリプトーム解析は重要な研究手法の一つである。本研究では、ゲノミックリソースが乏しい *de novo* 生物においても利用可能とされる網羅的遺伝子発現解析法（cDNA-AFLP 法の一つである HiCEP 法）の適用可能性について、遡河回遊魚シロウオをモデル系として検討した。日本列島に広く分布するシロウオには2つの地理的系統が存在し、日本海系統と太平洋系統の間に対照的な表現型分化が存在するが、HiCEP 法によって両系統の間に有意な発現量変異を示す多数の遺伝子群が存在することが明らかとなった。また、コイ科魚類であるタモロコ属ペア種において同様の解析を行い、非モデル生物における網羅的遺伝子発現解析法として HiCEP 法が有効であることも示した。

研究成果の概要（英文）：To detect candidate genes that caused adaptive divergence in natural populations, a screening method of comprehensive gene expression divergence for the non-model species was investigated using the anadromous goby *Leucopsarion petersii* as a model system. Limited transcriptome profiles obtained by an AFLP-based gene expression profiling method called “high coverage expression profiling (HiCEP)” were compared between the Japan Sea and Pacific Ocean populations of this species. Some genes showed striking and stable expression differences between these populations. Thus, this study clarified that HiCEP is a useful method for exploring gene expression divergence in the nonmodel species whose genomic information is not available.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：適応進化、魚類、海洋生態系、網羅的遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

自然集団の適応的分化（自然選択による適応的な集団分化）に関与した遺伝子、つまり

“適応遺伝子”の探索は、近年の生物学の技術革新によってアプローチが可能となった生態学・集団遺伝学・進化生物学上の重要課

題であるのに加えて、水圏における集団特異的適応遺伝子の同定は、水圏遺伝資源の探索や資源生物の地域集団の管理・保全と関連した水産学上の重要課題でもある。近年のゲノム科学の発展に伴い、全ゲノム情報が利用できるモデル生物（ショウジョウバエ、シロイヌナズナ、イトヨなど）の自然集団において、適応遺伝子が次々と同定されるようになった。しかし、全ゲノム情報を含めたゲノミックリソースが乏しい非モデル生物では、適応遺伝子のスクリーニングは未だ困難であることが少なくない。現状では、ほとんどの魚類資源においてゲノミックリソースは乏しく、このような非モデル生物における集団特異的な適応遺伝子の探索には、それぞれのモデル系において利用可能な手法の検討が不可欠である。

2. 研究の目的

研究代表者は水圏、特に海洋の自然集団の適応的分化にアプローチする絶好のモデル系として、日本海-太平洋間の遺伝的変異、に注目してきた。日本海は過去の氷期・間氷期サイクルによる気候変動の影響を顕著に受けた代表的な水域であり、特に、最終氷期最盛期には極端な海水準の低下による外側海域との分断化が生じ、低水温化・低塩分化などの大きな環境変動を経験したとされている。このような氷期の寒冷化を含む歴史的変動環境の中で日本海集団固有の適応進化は生じたのかを、日本各地で春告魚として珍重されているハゼ科の遼河回遊魚シロウオ *Leucopsarion petersii* をモデル系として研究を進めてきた。研究代表者は、分布域全体を網羅した採集（33 地点）とミトコンドリアゲノムと核ゲノムを用いた分子系統地理学的解析からシロウオには2つの地理的集団（日本海型と太平洋型）が存在すること、日本海型が派生的な集団であること、2型の推定分岐年代は最終氷期よりも前にあること、2型の分布接触帯には雑種群が存在し、生殖隔離は生じていないことを明らかにした。さらに、共通環境下の飼育実験によって、日本海型は、成長速度が速く体サイズが大きいこと、脊椎骨数が多いこと、摂餌行動が活発で、摂餌量も多いこと、高い低温耐性を保有することなどを明らかにした。このような適応度に関連すると考えられる多くの形質群に遺伝的分化が存在するという事は、日本海型のゲノム中に多くの適応遺伝子が存在する可能性を示唆している。実際、本研究の先行研究として、多数のマイクロサテライト（STR）マーカーと形質変異の候補遺伝子マーカーを用いたゲノムスキャンによる自然選択スクリーニング（集団ゲノミクス解析）を行い、日本海集団特異的な適応進化に関与した候補ゲノム領域を検出することに成功

した。この中には、成長を促進する作用を持つことが知られている成長ホルモン（GH）遺伝子と食欲亢進性作用を持つことが知られているニューロペプチドY（NPY）遺伝子が含まれていた。しかし、本種のゲノミックリソースが乏しいため、その他の候補領域にはどのような遺伝子群が存在するのかは不明のままである。このような背景のもとに、日本海型の適応進化と関連した候補遺伝子群のさらなる探索のために、本研究では、（1）GH遺伝子とNPY遺伝子のアミノ酸配列の集団間変異の有無を検討するとともに、これらの遺伝子発現量の集団間比較を実施し、先行研究の結果をさらに検証すること、（2）シロウオのような非モデル生物において、効果的な手法であると考えた網羅的遺伝子発現解析のアプローチ（HiCEP法）の適用可能性を詳細に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

（1）GH 遺伝子と NPY 遺伝子のアミノ酸配列及び遺伝子発現量の集団間比較

福井県敦賀市産日本海型集団と和歌山県那智勝浦産太平洋型集団の下垂体を含む脳から RNA を抽出・精製し、mRNA から cDNA を逆転写した。研究代表者の先行研究において既に本種の配列情報が得られている GH と NPY の mRNA 配列における両 UTR 両域に PCR プライマーを設計し、シークエンスによってそれぞれの集団の複数個体における ORF 領域の塩基配列を取得し、両型間におけるアミノ酸配列の変異を探索した。

次に、敦賀市産日本海型集団と那智勝浦産太平洋型集団の遼上親魚を飼育繁殖させ、得られた孵化仔魚を水温や餌量を同一化した共通環境下で育成した。育成したそれぞれの集団からサンプリングを行い、脳組織から RNA を抽出した。GH 遺伝子と NPY 遺伝子の発現量を RT-qPCR によって定量し、日本海型と太平洋型で比較した。

（2）高カバー率遺伝子発現解析法 “HiCEP” 法による網羅的遺伝子発現解析

HiCEP 法は放射線医学総合研究所が開発したトランスクリプトーム解析のための cDNA-AFLP 法の一つであり (Fukumura et al., 2003)、ゲノムの事前情報が必要なく、網羅性が高いことから、本種のような非モデル生物の網羅的遺伝子発現解析の手法として有力な候補の一つである。しかし、これまでの研究では、培養細胞を対象とした解析が多く、動物組織から得られた RNA を用いた研究例はほとんどなかった。そこで、本研究のように動物組織を対象とした場合の HiCEP 法の有効

性を検討した。

共通環境で育成した敦賀市産日本海型集団と那智勝浦産太平洋型集団のシロウオから RNA を抽出し、調整した RNA 試料から cDNA を合成し、制限酵素処理の後に、アダプターライゲーションを行った。その後、複数のプライマーセットによる選択的 PCR を行い、ABI3130x1 シーケンサーによるフラグメント解析に供した。

4. 研究成果

(1) GH 遺伝子と NPY 遺伝子のアミノ酸配列及び遺伝子発現量の集団間比較

先行の集団ゲノミクスアプローチによってシロウオ日本海型の適応進化に関与した候補遺伝子として検出された GH と NPY 両遺伝子において、日本海型と太平洋型の間にアミノ酸配列の変異は存在せず、構造的・機能的な変異は生じていないことが判明した。一方で、遺伝子発現量の比較において、GH 遺伝子では有意な差は認められなかったが、NPY 遺伝子では日本海型集団の発現量が有意に高いことが判明した。

先行のゲノムスキャン解析において、GH 遺伝子がアウトライアー遺伝子座としての検出されない統計解析手法も存在したことから、GH 遺伝子が部分的にアウトライアー遺伝子座としての検出されたのは false positive であるか、近傍に存在する別の遺伝子への自然淘汰の可能性（ヒッチハイク効果）が考えられた。その一方で、様々な統計手法において安定したアウトライアー遺伝子座として検出された NPY 遺伝子においては、その調節領域への自然淘汰の可能性が本研究の結果、より強く示唆された。

(2) 高カバー率遺伝子発現解析法 “HiCEP” 法による網羅的遺伝子発現解析

得られた prePCR 産物から、数多くのバンドが得られたプライマーセットを用い、選択的 PCR を実施した。得られたフラグメントをアラインメント後、発現量の指標となるフラグメントのピーク高を両型間で比較した。各型 8 個体の解析の結果、約 8% のフラグメントに有意なピーク高の差異が認められ、日本海型で高発現の遺伝子群と太平洋型で高発現の遺伝子群の頻度には有意な差は認められなかった。これらの一部のフラグメントに関しては、高分解能を有するゲルを用いて分離し、塩基配列情報を得たが、相同性のある既知遺伝子を見出すことはできなかった。しかし、これらの配列情報を用いて qRT-PCR 解析を行ったところ、その発現量変異は HiCEP の結果と一致し、本手法の精度の高さが明らか

かとなった。今後、HiCEP の prePCR 産物の塩基配列情報を次世代シーケンサーを用いて網羅的に得ることによって、日本海環境への適応遺伝子の候補を網羅的に探索できるものと期待される。

また、生息場所特性と関連して様々な生理形質が遺伝的に分化しているタモロコ属魚類ペア種において同様の解析を行ったが、このモデル系においても発現量がペア種間で分化している遺伝子群の検出に HiCEP 法が有効であることが示され、HiCEP 解析は、非モデル魚における網羅的遺伝子発現解析においてに有効な手法の一つであると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Kokita T., K. Nohara, Phylogeography and historical demography of the anadromous fish *Leucopsarion petersii* in relation to geological history and oceanography around the Japanese Archipelago, *Molecular Ecology*, 査読有, 20 巻, 2011, 143-164, doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04920.x
- ② 小北智之、山平寿智、自然集団の適応的分化の検出—モデル系としての日本在来魚—、月刊海洋、査読無、42 巻、2010、317 — 322、<http://www.kaiyo-chikyu.com/>
- ③ 小北智之、歴史的変動海洋環境におけるシロウオ集団の適応的分化—エコゲノミクスからのアプローチ—、月刊海洋、査読無、42 巻、2010、353-362、<http://www.kaiyo-chikyu.com/>

[学会発表] (計 3 件)

- ① Kokita T., Ecological genetics of parallel adaptive evolution to the limnetic trophic niche in Japanese lakes, The 5th International Symposium of the Biodiversity and Evolution Global COE project (招待講演), 2011 年 7 月 10 日, Kyoto Univ., Kyoto
- ② 小北智之、熊田裕喜、柿岡諒、奥田昇、湖沼適応と関連した網羅的遺伝子発現パターンの変化: タモロコ属魚類の場合、日本生態学会第 58 回大会、2011 年 3 月 9 日、北海道大学 (札幌市)
- ③ 熊田裕喜、奥田昇、小北智之、“琵琶湖” 適応遺伝子の探索: タモロコ属ペア種を

用いた比較トランスクリプトーム解析、
2010 年度日本魚類学会年会、2010 年 9
月 24 日、三重県総合文化センター（津
市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小北 智之 (KOKITA TOMOYUKI)

公立大学法人福井県立大学・海洋生物資源学
部・講師

研究者番号：60372835

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：