

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370096

研究課題名(和文) 温帯への分布拡大に伴うアカシヨウジョウバエ適応進化の実験室内再現

研究課題名(英文) Experimental estimation of evolutionary adaptation to cooler climate by *Drosophila albomicans* during distribution expansion to the temperate zones

研究代表者

田村 浩一郎 (Tamura, Koichiro)

首都大学東京・理工学研究科・教授

研究者番号：00254144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円、(間接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、近年、分布を熱帯から温帯に急速に広げたアカシヨウジョウバエについて、低温環境への進化的適応の分子機構を明らかにすることを目的とした。温帯産と熱帯産の系統の間で低温耐性を比較したところ、平均して温帯産の低温耐性は熱帯産よりも高く、その大きな要因として低温順化の効果が高いことが分かった。そこで、アカシヨウジョウバエで低温順化によって発現量が変化する遺伝子を調べ、その発現量の変化をキイロシヨウジョウバエで遺伝子操作技術を用いて再現したところ、いくつかの遺伝子の発現量の変化が実際に低温耐性を向上させることが分かった。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed at clarifying molecular mechanisms of evolutionary adaptation to low temperature environment, using a fruit fly species (*Drosophila albomicans*) which has rapidly expanded their geographic distribution from the tropics to temperate zones during a recent few decades. It was shown that a cold tolerance of temperate zone strains was higher than that of tropical strains and that the effect of cold acclimation was an important factor. We then found the genes whose expression level was largely changed during the cold acclimation. Finally, using gene manipulation techniques in *Drosophila melanogaster*, we simulated the gene expression changes observed during the cold acclimation in *Drosophila albomicans* and showed that the changes in expression level of some of the genes were responsible for the improvement of cold tolerance.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：ゲノム 遺伝子 進化 環境適応 トランスクリプトーム 次世代シーケンサ 遺伝子強制発現 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

(1) 従来、生物進化の研究は、もっぱら進化の産物である現存生物種の比較から過去の進化過程を推定する方法が用いられ、一部の微生物を用いる以外、繰り返し再現可能な実験的手法が適用できないことが大きな弱点であった。長い時間をかけてできあがった現存生物種の進化過程を、実験室内で繰り返し再現することは原理的に不可能だからである。しかし、オオシモフリエダシヤク蛾の工業暗化のように、まさに進化の途上にある現象であれば、短時間におこる一局面を実験的に繰り返し再現できる可能性もある。

(2) アカシヨウジョウバエ (*Drosophila albomicans*) は、1981 年までの調査では、タイ、ビルマ、台湾、沖縄など東南アジアの熱帯・亜熱帯域にのみ分布していた。しかし、1980 年代後半になると関西地方で生息が確認され、現在では関東甲信越の広い範囲で生息が確認されている。すなわち、近年、分布を熱帯・亜熱帯から温帯に急速に拡大してきた。一方その間、アカシヨウジョウバエが属するテングシヨウジョウバエ亜群の他種の分布は変わっていない。つまり、アカシヨウジョウバエの分布拡大は、地球環境の変化によるものではなく、アカシヨウジョウバエ固有の理由によると予想される。そこで予備実験として、いくつかの地域に由来するアカシヨウジョウバエ系統について、1 における生存時間を測定した結果、日本産、台湾産の系統は東南アジア産の系統に比べ統計的に有意に長い生存時間を示した。すなわち、アカシヨウジョウバエの温帯への分布拡大には、低温耐性の向上がともなっていることが示唆された。

2. 研究の目的

(1) 予備実験によって得られたアカシヨウジョウバエの低温耐性向上と地理的分布拡大の関係を検証するため、様々な地点で採集されたアカシヨウジョウバエ系統について、低温耐性を測定する。

(2) アカシヨウジョウバエの低温耐性向上の要因を明らかにするため、低温順化の効果、および低温耐性と代謝量との関連を調べる。

(3) 低温耐性を司る遺伝子を同定するため、低温順化によって発現量が変化する遺伝子を、トランスクリプトーム解析によって網羅的に探索する。

(4) (3) で見つけた低温耐性の候補遺伝子について集団内変異の解析を行い、日本への分布拡大に伴って正の自然選択を受けたかどうかを検討する。

(5) モデル実験生物としてのキイロシヨウジョウバエの利点を生かし、(3) で見つけた低

温耐性の候補遺伝子を、キイロシヨウジョウバエで強制発現またはノックダウンすることによって低温順化に伴う遺伝子発現の変化を人工的に再現し、低温耐性向上の分子機構を実験的に検証する。

3. 研究の方法

(1) 東南アジア、中国、台湾、日本の合計 23 地点で採集されたアカシヨウジョウバエ (*Drosophila albomicans*) 29 系統およびテングシヨウジョウバエ亜群に属する近縁種 6 種の合計 31 系統について、1 に 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、36 または 48 時間置いた後、生存個体を計測し、50%の個体が死亡する温度 (LT50) を推定し、低温耐性の指標とした。

(2) 低温順化による低温耐性向上の効果を測定するため、卵から 25 で飼育した成虫を 20 に数日間置いて順化させた後、1 での LT50 を測定し、順化しない場合と比較した。低温順化の効果をより詳細に調べるため、卵から 25 で飼育した成虫を 20 に置き、再度 25 に置いた場合、また、20 で飼育した成虫を 25 に置いた場合、さらにそれを再度 20 に置いた場合についても、低温耐性 (LT50) を測定した。

一方、低温耐性と代謝量の関係を調べるため、低温順化した場合としない場合について、成虫個体の 1 における呼吸量を測定し、低温順化による呼吸量の変化と低温耐性の変化との関連を調べた。

(3) 低温順化による低温耐性向上の分子機構を明らかにするため、低温順化によって発現量が変化する遺伝子の探索を行った。低温順化した成虫 20 個体、低温順化していない成虫 20 個体、それぞれから mRNA を精製、cDNA ライブラリーを作成し、Illumina DNA シーケンサーを用いて試料ごとに 3000 万リード以上の配列を決定し、RNA-seq 法によって遺伝子発現量を網羅的に測定した。

(4) RNA-seq 法により得られた、低温順化によって発現量が大きく変わる遺伝子の中、特に代謝に関わると考えられる遺伝子 (*Lip3*、*Pepck*) およびキイロシヨウジョウバエで低温耐性に関わることが知られている *desat2* に関して、集団内の変異を調べた。具体的には、分布拡大前に熱帯で採集された集団、分布拡大時に日本で採集された集団および最近日本で採集した集団の 3 集団間で、塩基多様度 (π)、純塩基置換率 (d_f) および分子系統樹の樹形パターンの比較を行った。

(5) RNA-seq 法により得られた、低温順化によって発現量が大きく変わる遺伝子の中、キイロシヨウジョウバエの Gal4/UAS、Gal4/RNAi 系統が存在する遺伝子について、それらの系統を用いて強制発現またはノック

クダウンした後、低温耐性を測定し、候補遺伝子の発現の変化が実際に低温耐性に及ぼす効果を検証した。

4. 研究成果

(1) アカシヨウジョウバエが分布を熱帯から温帯に広げてきた要因として、低温耐性の向上が背景にあったと考えられる。この仮説を検証するため、熱帯、温帯それぞれで採集されたアカシヨウジョウバエおよび、アカシヨウジョウバエが属するテングシヨウジョウバエ亜群の近縁種について、1 に 16 時間置いた後の生存率を測定した。

その結果、温帯産アカシヨウジョウバエの低温耐性は熱帯産アカシヨウジョウバエよりも統計学的に有意に高く、また、アカシヨウジョウバエの低温耐性は、熱帯・亜熱帯にのみ生息する近縁種よりも高いことが分かった(図1)。このことは、アカシヨウジョウバエの熱帯から温帯への分布拡大には、本種の低温耐性の向上がともなったことを示唆する。

一方、地域集団間、種間の差よりも大きな低温耐性の差が、低温順化した場合としない場合の間で観察された。いずれの地域集団、種においても、低温耐性は低温順化によって大きく向上することが分かった(図1)。すなわち、低温耐性は低温順化に大きく依存することが明らかになった。

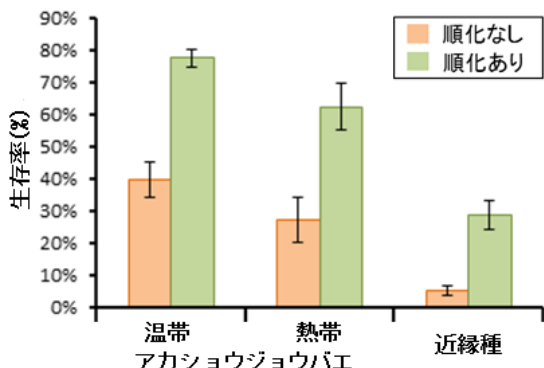


図1. 1 に 16 時間置いた後の生存率

(2) 低温順化が低温耐性に及ぼす影響をより詳細に調べるため、(1)で順化の効果が最も大きかった系統について、いろいろな温度変化を経験させた成虫の低温耐性を測定した。

その結果、25 で卵から成虫まで飼育し、20 で低温順化した場合、低温耐性 (LT50) は高くなるが、その後、数日間 25 に置くと、低温順化の効果はほぼ消失することが分かった。一方、20 で卵から成虫まで飼育した場合、低温耐性は高いが、数日間 25 に置くことによって 25 で飼育した場合と同程度の耐性に低下し、その後 20 で低温順化すると、順化の効果によって低温耐性は向上することが分かった(図2)。この結果から、数日間の中に温度変化に反応して低温耐性が変化することが分かり、遺伝子発現の調節が

その背景にあることが推測された。

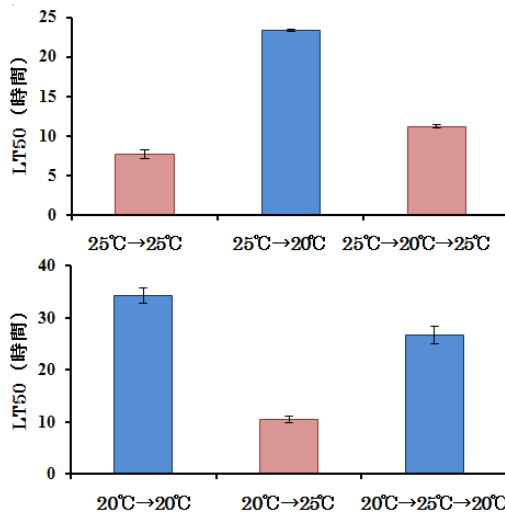


図2. 各温度変化を経験した成虫の 1 で 50% の確率で生き残る時間 (LT50)

一方、アカシヨウジョウバエの 12 地域系統について、系統ごとに 1 における低温耐性 (LT50) および呼吸量 (酸素消費量) を、低温順化した場合としない場合について測定し、その差を取って低温耐性と呼吸量の関係を調べたところ、両者の間には強い正の相関がみられた(図3)。すなわち、低温順化によっておこる低温耐性の向上と呼吸量の増加の背景には、共通の分子機構があることが示唆された。

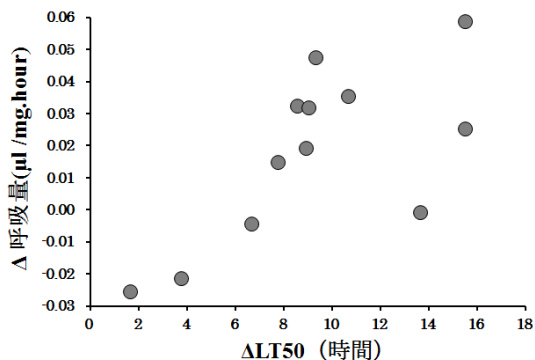


図3. アカシヨウジョウバエ 12 系統における低温順化による低温耐性の変化と呼吸量の変化

(3) 低温順化による低温耐性の向上を司る分機構を解明するため、低温順化した場合としない場合について、RNA-seq 法を用いてトランスクリプトーム解析を行い、低温順化によって発現量が大きく変化する遺伝子を探索した。その結果、*Lip3*, *Pepck*, *CG12374*, *Prx*, *LysD*, *CG1887*, *Sdr* などの遺伝子の発現量が大きく上昇、*CG14153*, *Lsp2*, *tim*, *CG16762* などの遺伝子の発現量の低下が著しいことが分かった。

(4) (3)で得られた低温耐性を司る候補遺伝子の中、*Lip3*, *Pepck* について、集団遺伝学

的方法によって、自然選択が働いた可能性を検証した。同時に、キロショウジョウバエで低温耐性に関わることが知られている *desat2*、比較対象として順化によって発現量があまり変化しなかった *und*、*RnrS*、*Gpdh*、*RpL4*、*GstS1* についても同様の解析を行った。

その結果、*Pepck* において、特定の対立遺伝子が温帯に高頻度で存在するパターンが観察され、自然選択が働いた可能性が示唆された。しかし、タンパク質コード領域におけるアミノ酸配列を比較した結果、機能に関係すると考えられるアミノ酸置換は観察されなかった。そこで、上流約 1.6kb の塩基配列を比較した結果、開始コドンから上流約 800bp 付近、および第 2 エクソン開始直前のイントロン内に、1980 年代の温帯集団と 2011 年の温帯集団の間で相同性が高い一方、それらと熱帯集団の間では大きく分化している領域が検出された (図 4)。この領域における配列の差が遺伝子発現量の調節に関わっている可能性が考えられる。

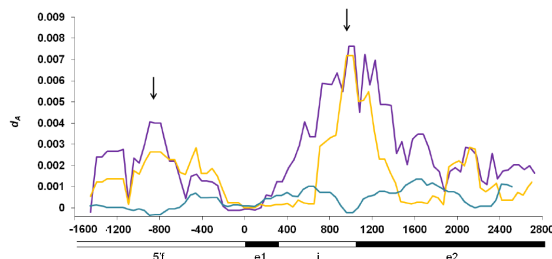


図 4 . *Pepck* 5'-UTR、第 1、第 2 エクソンにおける配列の集団間分化 (d_n)。紫：温帯集団 (1980 年代) - 熱帯集団間、黄：温帯集団 (2011 年) - 熱帯集団間、緑：温帯集団 (1980 年代) - 温帯集団 (2011 年) 間

(5)(3) で得られた低温耐性を司る候補遺伝子の中、RT-qPCR 法によって発現量の有意な変化が確認され、キロショウジョウバエで対応する UAS 系統が存在し、なおかつ Gal4 による遺伝子発現の誘発が実際に確認できたものは、発現量が上昇した候補遺伝子で 6 遺伝子、低下した候補遺伝子で 1 遺伝子のみだった。発現量が上昇した候補遺伝子については、キロショウジョウバエで Actin-Gal4/UAS-候補遺伝子のヘテロ接合体を作製して候補遺伝子を強制発現し、発現量が低下した遺伝子については Actin-Gal4/UAS-候補遺伝子-RNAi のヘテロ接合体を作製して候補遺伝子をノックダウンし、低温耐性および呼吸量を測定した。

その結果、*Sdr* を強制発現した場合、および *CG14153* をノックダウンした場合に低温耐性が有意に向上することが分かった (図 5)。一方、いずれの遺伝子の発現を変化させた場合も、呼吸量の変化は見られなかった。また、キロショウジョウバエにおいても低温順化によって低温耐性は向上したが、*Sdr*、*CG14153* いずれの遺伝子も発現量は変化しな

かった。この結果は、少なくとも *Sdr*、*CG14153* の両遺伝子は、アカショウジョウバエにおける低温順化による低温耐性の向上に関わることを示唆するが、同時に、低温耐性の向上に呼吸量の増加は必ずしも必須ではないこと、アカショウジョウバエとキロショウジョウバエで、低温耐性向上のメカニズムには異なる遺伝子が関与していることを示唆する。

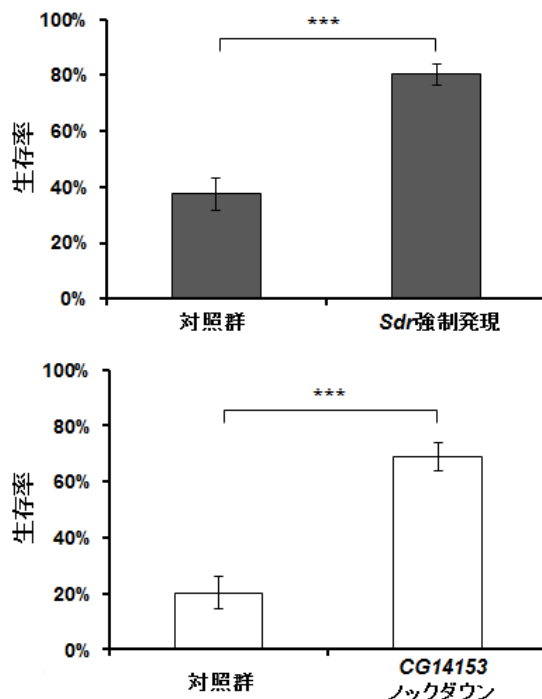


図 5 . Gal4/UAS, Gal4/RNAi 系統における 1 24 時間後の生存率

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 1 件)

Isobe K, Takahashi A, Tamura K. Cold tolerance and metabolic rate increased by cold acclimation in *Drosophila albomicans* from natural populations. *Genes & Genetics Systems* 88:289-300. 2013. 査読有

[学会発表](計 20 件)

田村浩一郎、アカショウジョウバエの低温耐性に関する *Pepck* 遺伝子の集団遺伝学的解析、日本遺伝学会第 85 回大会、2013 年 9 月 20 日、慶応大学 (神奈川県)

磯部琴葉、Gal4-UAS を用いたアカショウジョウバエの低温耐性候補遺伝子の機能解析、日本遺伝学会第 85 回大会、2013 年 9 月 20 日、慶応大学 (神奈川県)

里村和浩、アカショウジョウバエの Neo-X, Neo-Y 染色体の遺伝的多様性、日本遺伝学会第 85 回大会、2013 年 9 月 20 日、慶応大学 (神奈川県)

磯部琴葉、アカショウジョウバエにおける

低温耐性向上の遺伝学的解析、日本進化学会第 15 回大会、2013 年 8 月 28 日、筑波大学(茨城県)

里村和浩、アカショウジョウバエの Neo-X, Neo-Y 染色体における DNA 配列の遺伝的多様性、日本進化学会第 15 回大会、2013 年 8 月 28 日、筑波大学(茨城県)

TAMURA, Koichiro. Genetic Analysis for Cold Adaptation in *Drosophila albomicans*. SMBE 2013 - Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution. 2013 年 7 月 10 日. Chicago (USA)

SATOMURA, Kazuhiro. Genetic diversity of DNA sequences on the neo-X and neo-Y chromosomes of *Drosophila albomicans*. SMBE 2013 - Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution. 2013 年 7 月 10 日. Chicago (USA)

磯部琴葉、アカショウジョウバエにおける低温耐性向上の遺伝学的解析、日本遺伝学会第 84 回大会、2012 年 9 月 25 日、九州大学(福岡県)

里村和浩、アカショウジョウバエの Neo-X, Neo-Y 染色体における DNA の分子進化、日本遺伝学会第 84 回大会、2012 年 9 月 25 日、九州大学(福岡県)

鳥居侑史、集団遺伝学的手法を用いたアカショウジョウバエ温帯適応の検証、日本遺伝学会第 84 回大会、2012 年 9 月 25 日、九州大学(福岡県)

磯部琴葉、アカショウジョウバエにおける呼吸量の増加に伴う低温耐性の向上、日本進化学会第 14 回大会、2012 年 8 月 22 日、首都大学東京(東京都)

里村和浩、アカショウジョウバエの Neo-X, Neo-Y 染色体における DNA の分子進化、日本進化学会第 14 回大会、2012 年 8 月 22 日、首都大学東京(東京都)

鳥居侑史、集団遺伝学的手法を用いたアカショウジョウバエ温帯適応の検証、日本進化学会第 14 回大会、2012 年 8 月 22 日、首都大学東京(東京都)

SATOMURA, Kazuhiro. Molecular Evolution of DNA Sequences on Neo-X and Neo-Y Chromosomes in *Drosophila albomicans*. SMBE 2012 - Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution. 2012 年 6 月 24 日. Dublin (Ireland).

磯部琴葉、アカショウジョウバエにおける呼吸量の増加に伴う低温耐性の向上、日本遺伝学会第 83 回大会、2011 年 9 月 20 日、京都大学(京都府)

里村和浩、アカショウジョウバエの Neo-X, Neo-Y 染色体における DNA の分子進化、日本遺伝学会第 83 回大会、2011 年 9 月 20 日、京都大学(京都府)

磯部琴葉、Genetic mechanisms of evolutionary cold adaptation of *Drosophila albomicans*. 日本進化学会第 13 回大会、2011 年 7 月 30 日、京都大学(京都

府)

里村和浩、アカショウジョウバエの Neo-X, Neo-Y 染色体における DNA の分子進化、日本進化学会第 13 回大会、2011 年 7 月 30 日、京都大学(京都府)

ISOBE, Kotoha. Genetic mechanisms of evolutionary cold adaptation of *Drosophila albomicans*. SMBE 2011 - Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution. 2011 年 7 月 28 日. 京都大学(京都)

SATOMURA, Kazuhiro. Molecular Evolution of DNA Sequences on Neo-X and Neo-Y Chromosomes in *Drosophila albomicans*. SMBE 2011 - Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution. 2011 年 7 月 28 日. 京都大学(京都)

[その他]

<http://www.biol.se.tmu.ac.jp/labo.asp?ID=evogen>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

首都大学東京・理工学研究科・教授
田村浩一郎(TAMURA, Koichiro)
研究者番号: 00254144

(2) 研究分担者

東京大学・農学生命科学研究科・准教授
松尾隆嗣(MATSUO, Takashi)
研究者番号: 70301223

(3) 研究協力者

首都大学東京・理工学研究科・准教授
高橋文(TAKAHASHI, Aya)
研究者番号: 90370121

首都大学東京・理工学研究科・大学院生
磯部琴葉(ISOBE, Kotoha)

首都大学東京・理工学研究科・大学院生
里村和浩(SATOMURA, Kazuhiro)

首都大学東京・理工学研究科・大学院生
阿部祐樹(ABE, Yuki)

首都大学東京・理工学研究科・大学院生
鳥居侑史(TORII, Yuji)

首都大学東京・都市教養学部・4年生
中村遥(NAKAMURA, Yo)