

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370039

研究課題名(和文) 魚類における性的二型多様化の分子遺伝機構

研究課題名(英文) Molecular genetic mechanisms of diversification of sexual dimorphisms in fishes

研究代表者

北野 潤 (Kitano, Jun)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・特任准教授

研究者番号：80346105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：尻鰭の性的二型の度合いの異なる北日本と南日本のメダカ集団についてQTL解析を行った。その結果、個々の発生ステージで異なるQTLが同定されたこと、鱗間で共通するQTLと共通しないQTLがあること、オスで同定したQTLはメスでは効果が少ないことなどを見いだした。これらの結果は、成長ステージ間、雌雄間、形質間での遺伝的相関が一定程度は解消されていることを示している。また、体型の性的二型の度合いの顕著な海型イトヨと軽微な河川型イトヨのF2雑種についてQTL解析を行い、体型の差異に關与する有意なQTLを同定した。さらに、イトヨにおいて遺伝子操作法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Because sexually dimorphic traits show great diversity and such divergence can contribute to speciation, it is one of the fundamental questions in ecology and evolution what are the genetic mechanisms underlying diversification of sexual dimorphism. Here, we first conducted QTL mapping of variation in a sexually dimorphic trait, anal fin length, between a southern population and a northern population of medaka. The majority of QTL were age-specific. Different fins share only few QTL. QTL detected in males have smaller effects in females. These results indicate that genetic constraints derived from genetic correlations between ages, sexes or traits are resolved to some extent. We next conducted QTL mapping using a marine population and a stream population of threespine stickleback. We identified several significant QTL. We also established genetic engineering methods of sticklebacks, both transgenesis and knockout.

研究分野：進化遺伝学

キーワード：性的二型 変異 多様性 遺伝

1. 研究開始当初の背景

性的二型、即ち雌雄間での表現型の違いは、生物界において広く見られる現象であり、雌雄で最適な表現型値が異なることに由来する(Darwin 1871 *The Descent of Man*; Andersson 1994 *Sexual Selection*)。性的二型が近縁種間で多様化している例は多く見られ、性的二型の分化によって種分化が起こったり、新しい生態環境への適応が可能となったりすることから、性的二型多様化の遺伝機構を理解することは生態学や進化生物学における主要な課題の一つである(Bolnick and Doebeli 2007 *Evolution* 57:2433-2449; Butler et al. 2007 *Nature* 447:202-205)。

雌雄で有利さの異なる遺伝子、すなわち、座位内性的葛藤(intralocus sexual conflict)の状態にある遺伝子が性的二型を生み出す機構として、性ステロイドなどのホルモンを介した遺伝子発現調節経路の変異(Williams and Carroll 2009 *Nat Rev Genet* 10:797-804)、及び、性染色体との連鎖(Rice 1984 *Evolution* 38:735-742; Charlesworth et al. 1987 *Am Nat* 91:327-329; Mank 2009 *Am Nat* 173:141-150)という機構があると考えられる。性ステロイドで性的二型の発現が調節されている例や性的二型の原因遺伝子が性染色体に集積している例が確認されているものの、具体的にどのような遺伝的変異が、近縁種間での性的二型の多様化に関与しているのかという詳細な分子遺伝機構については、ショウジョウバエなどの例(Williams et al. 2008 *Cell* 134:610-623)を除き殆ど明らかになっていない。

申請者らは、イトヨとメダカについて、野外集団における性的二型の変異パターンを明らかにしてきた。北野らは、トゲウオ科のイトヨ属において、日本海型イトヨと太平洋型イトヨの間に求愛行動や背刺長の性的二型の違いがあり、これらが道東の同所域における生殖隔離に関わっていること、および、この性的二型の分化の原因遺伝子がネオ性染色体(常染色体とY染色体の融合によってできた若い性染色体)に存在することを明らかにした(Kitano et al. 2009 *Nature* 461:1079-1083)。また、祖先型である海のイトヨが小河川に陸封化されると、日本と北米で共通して、背隆起の性的二型の度合いが減少することも見いだした(Kitano et al. 2011 *J Fish Biol* 2012)。

一方、連携研究者の山平らは、北日本のメダカ(青森産)と南日本のメダカ(沖縄産)の野外メダカについて尻鰭の性的二型を観察し、南日本集団の方が性的二型の度合いが高いことを見だし、さらに詳細な発生観察に基づいて、この分化は体長が15mmを超えると生じるということを見いだした(Kawajiri et al. 2009 *Biol J Linn Soc* 97:571-580)。これらの結果は、生息環境と性的二型の様式との関連を強く示唆する。

イトヨとメダカは既にゲノム配列が決定

されていること、トランスジェニック法が確立されていること(Kawakami 2007 *Genome Biol* 8 Sup1:S7; Chan et al. 2010 *Science* 327:302-305)、メダカではENUを用いたノックアウト法が確立されていること(Taniguchi et al. 2006 *Genome Biol* 7:R116)などから、遺伝学のモデル生物として確立されている。また、イトヨについては、野外における表現型分化の原因遺伝子、メダカにおいては実験系統における変異原因遺伝子が複数同定されている。

2. 研究の目的

性的二型、即ち雌雄間での表現型の違いは、行動隔離などの種分化や雌雄間での生態的分化の基盤になりうること、進化速度の比較的速い形質であることなどの理由から、近縁種間での性的二型の分化の遺伝機構を解明することは進化生物学や生態学における主要な課題の一つである。性的二型が進化する遺伝機構としていくつかの理論モデルが提唱されているものの、野外生物における詳細な遺伝機構はいまだ多くが不明である。本研究では、遺伝研究のモデルとして理想的なトゲウオとメダカの野生集団を利用して、QTL マッピング、全ゲノムリシーケンス、トランスクリプトーム解析、遺伝子操作法などの遺伝/ゲノム手法を駆使して、性的二型が集団間で多様化する分子遺伝機構を明らかにする。

3. 研究の方法

性的二型の度合いの異なるイトヨ集団及びメダカ集団を用いて以下の実験を行った。(1)尻鰭長の性的二型の度合いに違いのあるメダカ2集団(北日本と南日本のメダカ集団)について尻鰭長の成長曲線の解析を行った。(2)これら2集団を交配して雑種F2世代を作出し、性的二型のQTL解析を行った。QTLの中から候補遺伝子を探索し、これらの遺伝子発現解析を行った。(3)性的二型の度合いの異なるイトヨ2集団(海型と河川型)を利用して、体型のQTL解析を行った。イトヨにおいて、候補遺伝子を強制発現させるトランスジェニック、および、発現抑制するノックアウトの系を立ち上げた。

4. 研究成果

(1)尻鰭長の性的二型の度合いに違いのある2集団(北日本と南日本のメダカ集団)について尻鰭長の成長曲線の解析を行った。沖縄と青森よりメダカを採集し、ラボ育成第1世代のメダカについて、尻鰭長を標準体長に対してプロットして成長速度を計測した。沖縄のオスでは18.63 mmの時に最大の尻鰭の成長スパートが起こること、青森のオスでは16.43 mmで成長スパートが起こること、また、最大成長速度は明らかに沖縄集団で高いことなどを見いだした。メダカは体長約20 mmで成熟すると考えられているので、成熟タイミ

ングとほぼ一致していた。一方、メスではこのような成長スパートは観察されなかった。(2)これら二集団の F2 雑種を作出し、QTL 解析を行った。F2 の遺伝解析のために、親に使った個体のゲノム配列から沖縄と青森の判別 SNP を選定し、SNP デザインシステムを構築し、イルミナのゴールドゲイトテクノロジーにて遺伝解析した。この SNP アッセイデザインは Dryad よりオープンリソースとして入手可能である。表現型解析としては、異なる 11 の発生ステージで写真を撮影し、尻鰭長などの鰭長と標準体長を計測した。また、尻鰭の乳頭状突起の数を計測した。

個々の発生ステージでの鰭長の QTL 解析を行った結果、個々の発生ステージで異なる QTL が同定されたこと、鰭間で共通する QTL と共通しない QTL があること、オスで同定した QTL はメスでは効果が少ないことなどを見いだした。

ついで、成長曲線を解析するためにルジャンドル多項式を利用した手法を応用し、曲線に効果を与える QTL を同定した。その結果、鰭間で共通する QTL と共通しない QTL があること、オスで同定した QTL はメスでは効果が少ないことなどを見いだした。また、乳頭状突起数の QTL と尻鰭長の QTL にはオーバーラップが少ないことも明らかにした。

これらの結果は、成長ステージ間、雌雄間、形質間での遺伝的相関が一定程度は解消されていることを示しており、これが、メダカ科において、実に多様な性的二型を生み出す背景になっていることが示唆された。尻鰭長の QTL については既に論文として報告した。乳頭状突起の QTL については論文を準備中である。

QTL 内に鰭の発生とホルモンシグナルに関わる複数の候補遺伝子を同定した。成長途上の鰭より RNA を精製し、これらについていくつかの候補遺伝子の定量 PCR を行ったが、いまのところ顕著な発現差を示す遺伝子は見つかっておらず、異なる発生ステージでの解析や発現部位の比較などを行う必要がある。

(3) 体型の性的二型の度合いの顕著な海型イトヨと軽微な河川型イトヨの F2 雑種を作出した。これらの親は、野外採集した個体をラボで継代飼育した個体である。これらについても、メダカと同様にイルミナ社の SNP アッセイシステムを構築し、約 400 個体について幾何学的形態解析法を用いて体型を解析した。その後、連鎖地図を作成し、QTL 解析を行った。その結果、体型の差異に關する有意な QTL を同定した。

イトヨにおいて、tol2 トランスポゾンを利用したトランスジェニック構築法を導入し、全身に GFP が発現するイトヨの作出に成功した。また、TALEN 法と CRISPR/Cas9 法にて、ノックアウトの作出にも成功した。

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 2 件)

Kawajiri, M., Yoshida, K., Fujimoto, S., Mokodongan, D., Ravinet, M., Kirkpatrick, M., Yamahira, K., and Kitano, J. (2014) Ontogenetic stage-specific quantitative trait loci contribute to divergence in developmental trajectories of sexually dimorphic fins between medaka populations. *Molecular Ecology* 23: 5258-5275 (査読有)

Fujimoto, S., Kawajiri, M., Kitano, J., and Yamahira, K. (2014) Female mate preference for longer fins in medaka. *Zoological Science* 31: 703-708 (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

北野潤: “メダカ尻鰭の性的二型の進化遺伝機構”日本魚類学会(2014.11.14-2014.11.17) 小田原

川尻舞子, 吉田恒太, Mark Ravinet, 藤本真悟, 山平寿智, 北野潤: “メダカ野生集団における性的二型の緯度間変異をもたらす遺伝的基盤”日本生態学会第 61 回全国大会.(2014.03.14-2014.03.18). 広島

Kawajiri M, Kohta Y, Fujimoto S, Mokodongan DF, Yamahira K, Kitano J: "The genetic architecture of the latitudinal variation in sexual dimorphism of medaka" ESEB2013. (2013.08.19-2013.08.24). Lisbon, Portugal

川尻舞子: “メダカ野生集団における性的二型の緯度間変異をもたらす遺伝的基盤”日本生態学会第 60 回全国大会. (20130307). グランシップ静岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北野 潤 (KITANO, Jun)
国立遺伝学研究所
新分野創造センター
特任准教授
研究者番号：80346105

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

山平寿智 (YAMAHIRA, Kazunori)
琉球大学・熱帯生物圏研究センター
教授
研究者番号：20322589