

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570105

研究課題名(和文)性ホルモンシグナリングの集団分化から探る魚類の繁殖システム多様化の遺伝基盤

研究課題名(英文)Genetic basis of adaptive population divergence in androgen signaling for a fish in relation to mating system

研究代表者

小北 智之(KOKITA, Tomoyuki)

福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授

研究者番号：60372835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の繁殖戦略は近縁種間・集団間で著しい多様性を示すが、多様化のメカニズムを詳細に検討する上でその遺伝基盤の解明は欠かせない。本研究ではゲノムリソースが既に充実しており、繁殖システムに对象的な集団分化が存在する日本産淡水型イトヨ類をモデル系として、ほとんど解明されていない雄の繁殖戦略の集団間変異の遺伝基盤に切り込んだ。雄繁殖戦略変異のプロキシとしての性ホルモン合成量の集団間変異をターゲットとし、変異の原因遺伝子座、原因候補遺伝子、ひいては原因候補DNA変異を生態ゲノミクスのアプローチ(比較トランスクリプトーム解析、pQTL、eQTL)と様々な分子生物学実験を駆使して同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Extreme diversity in male reproductive strategy is found in fishes. Elucidating genetic basis of such diversity is important for understanding its evolutionary mechanism. Androgen is a key hormone for the expression of multiple male reproductive traits that are important for male reproductive success. Therefore, selection on androgen-mediated traits might result in the adaptive evolution of androgen titers themselves. We used natural variation in androgen-mediated traits and androgen production between different ecotype populations of the Japanese freshwater threespined stickleback as a model system. Ecological genomic analyses including comparative transcriptome and QTL mapping and a variety of molecular biology experiments were conducted to examine this prediction. This study suggests that adaptive divergence in androgen production between these populations occurred by regulatory mutations of a gene that encodes an important enzyme for androgen synthesis.

研究分野：生態ゲノム学

キーワード：生態ゲノミクス 行動生態学 繁殖システム 繁殖戦略 適応進化 雄性ホルモン 自然選択 魚類

1. 研究開始当初の背景

動物の繁殖行動、二次性徴や配偶システムは近縁種間や種内集団間においても大きく異なることはなく、この著しい多様性は生態的・社会的条件の変異に依存した雌雄の適応的な形質進化の産物であると考えられている。一般に、基本的性差の観点から、雄の適応度は配偶相手数に強く依存することから、雄は雌をめぐる雄間競争や雌からの配偶者選択に望ましい行動形質や性的形質を進化させると予測される。このような雄の繁殖戦略は、古くから、その究極要因の理解を目的とする行動生態学の主要テーマの一つとなってきた。しかし、このような繁殖戦略の多様化機構に関する仮説を検証する上で、行動生態学からの究極要因の探索と同時に、多様化の背後にある進化遺伝基盤の理解することの意義は極めて大きい。これまで、表現型としての定量評価の困難さといった技術的な問題から、繁殖行動形質の遺伝基盤に関する知見はほとんどなかった。しかし、近年の技術革新によって、自然集団における繁殖戦略の多様化をもたらした“繁殖戦略”遺伝子の検出はもはや夢物語ではなくなっている。

雄性ホルモン(アンドロゲン)は、脊椎動物全般で雄の配偶子形成と同時に、雄の性的形質、繁殖時の攻撃的なわばり行動、及び求愛行動の発現という多面的な機能を持つ。したがって、雄の基本的な繁殖戦略の背後にある内分泌シグナルであり、近年では行動生態学の分野でも、このホルモン量の適応度への影響が盛んに研究されるようになってきた。つまり、雄間競争の程度や配偶者選択の基準といった繁殖システムに依存して、雄性ホルモンの産生・分泌量自体が自然・性選択の対象となることが予測されている。このように、雄性ホルモン量の遺伝的分化が雄の繁殖行動形質の多様化を生み出す重要なプロキシであると考えられる。それでは雄性ホルモン量の適応的分化に関与する遺伝的背景はどのようなものであろうか。

2. 研究の目的

研究代表者は、このような雄の繁殖戦略の多様化の進化遺伝基盤にアプローチする絶好のモデル系として、行動生態学のモデル魚類の1つであり、ゲノム情報が充実しているイトヨ類を対象として、異なる繁殖戦略を示す集団間に存在する雄性ホルモン量の遺伝的変異に着目した。イトヨ類は海洋の祖先集団から北半球高緯度地域の陸水域に広く適応放散した魚類として有名であるが、近年では、種分化や新規環境への適応進化の遺伝機構を探るモデル脊椎動物となっている。また、古くから繁殖に関する生理生態・行動学的知見が集積されていることから、性ホルモン依存的な雄繁殖戦略の多様化の遺伝基盤の探索において、他の動物には類を見ない研究上の利点を備えている。

世界最南限の淡水型イトヨ類であるハリ

ヨは伊吹山地・鈴鹿山脈の東側(岐阜県)と西側(滋賀県東部)に生息しているが、両県産集団の生息場所の環境特性は対照的である。滋賀集団(S集団)の生息域は河川傾斜度が大きい溪流様河川で、降雨などと関連して河床変動が激しい環境である一方、岐阜集団(G集団)は緩やかで安定した湧水地帯に生息している。両生態型(湧水型と溪流型)間には、このような生息場所特性の変異と関連した興味深い雄繁殖戦略の適応的分化が認められ、G集団は攻撃的なわばり防衛行動、求愛行動、婚姻色の発現の程度が高く、高い繁殖努力を示すが、寿命は短い。研究代表者は共通環境実験から一連の繁殖行動形質変異には、遺伝因子が関与していることを既に見いだしている。さらに、縄張り営巣フェーズの雄の血中アンドロゲン量(魚類において最重要なアンドロゲンである11-ケトテストステロン:11-KT)は、G集団がS集団に比べてきわめて高いこと、マイクロアレイによる比較トランスクリプトーム解析によって、アンドロゲン合成シグナル系であるHPG軸の各種遺伝子群の発現量がG集団のほうが高いことも明らかとなっている。このことは雄の繁殖戦略の集団間変異をもたらす進化遺伝基盤が、アンドロゲン量の変異を生み出す遺伝的変異であることを強く示唆している。

本研究は、ゲノムリソースが充実した生物の自然集団が対象という利点を最大限に活かし、様々なゲノム科学的手法を駆使して、雄繁殖戦略の変異のプロキシとなるアンドロゲンシグナリングの集団間変異の原因遺伝子を検出することにより、雄繁殖戦略の多様化をもたらした進化遺伝基盤の解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) QTL解析による原因遺伝子座の同定

アンドロゲンはコレステロールから精巢で発現する各種生合成酵素によって合成されるが、その生合成には、HPG軸に関係するペプチドホルモン、ホルモン受容体、ステロイド合成酵素、及び転写因子やホルモン感受性に関わる因子など多数の遺伝子も関与している。したがって、まずQTLマッピングによって、アンドロゲン量の集団間変異をもたらす原因遺伝子(群)の染色体上の位置を特定し、候補を絞り込んだ。G集団とS集団のF₂交雑家系を作出し、F₂世代の雄を個別に水槽に導入し、縄張り営巣フェーズの状態にさせた後に、血液の採取、婚姻色の測定、精巢の摘出を行った。採取した血漿からステロイドホルモンを抽出し、ELISA法によって11-KT濃度を定量した。さらに、これらの表現型計測したF₂個体において、RAD-seqによるゲノム全体をカバーするSNPマーカーのジェノタイピングを行なった。このようなRAD-seqは次世代シーケンサーHiSeq2000を用いて実施した。これらの表現型と遺伝子型

のデータセットを用いて、11KT量と婚姻色変異の原因遺伝子座の検出を行った。

(2) 候補遺伝子の分子生物学的解析

(1) の QTL 解析の結果、LG20 に存在する QTL 領域に重要な候補遺伝子 (精巣における 11KT の生合成に関わる酵素遺伝子) が存在することが判明した。したがって、G 集団と S 集団間でこの候補遺伝子のコード領域の塩基配列情報の比較を行うとともに、qPCR によって発現量の比較を行った。さらに、G 集団と S 集団の F₁ 交雑個体を用いたこの候補遺伝子のアリル特異的発現解析も実施した。また、(1) の家系を用いて、F₂ 世代におけるこの遺伝子の発現量を定量して、eQTL 解析を実施した。最後に、この候補遺伝子のプロモーターアッセイも行い、両集団間でプロモーター活性の比較を行った。

4. 研究成果

(1) QTL 解析による原因遺伝子座の同定

QTL 解析の結果、LG20 に 11-KT 量の集団間変異を説明する有意な QTL を見出した。イトヨのゲノム情報を用いて、この QTL の 95% 信用区間に存在する遺伝子群をリストアップしたところ、精巣における 11KT の生合成に関わる重要な酵素遺伝子がこの信用区間 (特に、QTL のピーク近傍) に存在することが判明した。また、この QTL は婚姻色発現の程度や巣サイズの変異も同時に説明することが明らかとなり、アンドロゲンによる多面発現性が検出された。

(2) 原因候補 DNA 変異の検出

上記の酵素遺伝子には、両集団間でコード領域の配列変異は認められなかったが、G 集団のほうが有意な発現量が高いことが判明した。さらにアリル特異的発現、eQTL 解析の結果は、この酵素遺伝子が原因遺伝子であること、さらに、その調節領域の変異が原因 DNA 変異であることを支持した。さらに、ほ乳類のライディッヒ細胞 (この酵素遺伝子が発現する細胞) を用いた *in vitro* におけるプロモーターアッセイは、プロモーター領域に見出された両集団間の顕著な変異が原因 DNA 変異であることを示唆した。今後、ゲノム編集を用いた *in vivo* での解析によって、原因 DNA 変異を確定させる予定である。

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)

Kakioka, R., T. Kokita, H. Kumada, K. Watanabe, N. Okuda, A RAD-based linkage map and comparative genomics in the gudgeons (genus *Gnathopogon*, Cyprinidae), *BMC Genomics*, 44, 2013,

32, doi:10.1186/1471-2164-14-32

小北智之、エコゲノミクスにおける網羅的遺伝子発現解析-魚類における研究例から-、*生物科学*、査読有、64 巻、2013、141-150

、<http://www.ruralnet.or.jp/seibutsu/>
小北智之・渡辺勝敏、2014 年度日本魚類学会シンポジウム「魚類における適応と種分化の進化遺伝機構：研究最前線と今後の展望」の開催報告、*魚類学雑誌*、査読無、62 巻、2015、93-96
<http://www.fish-isj.jp/publication/index.html>

[学会発表] (計 6 件)

小北智之、石川麻乃、北野潤、森誠一、Challenge hypothesis の背景にある進化遺伝機構、日本生態学会第 62 回大会、2015 年 3 月、鹿児島大学 (鹿児島市)
小北智之、行動生態ゲノミクス：イトヨ類における雄繁殖戦略の進化遺伝基盤、日本魚類学会 2014 年度年会シンポジウム「魚類における適応と種分化の進化遺伝機構」、2014 年 11 月、神奈川県立生命の星・地球博物館 (小田原市)

小北智之、繁殖システムと関連した性ホルモン量の適応分化：イトヨを用いた生態ゲノミクス、日本動物学会第 85 回大会シンポジウム「性と生殖-繁殖システム多様化の遺伝・生理機構」、2014 年 9 月、東北大学 (仙台市)

小北智之、野々垣初音、森誠一、雄の繁殖戦略を決める原因遺伝子座の同定：ハリヨを用いた QTL 解析、日本魚類学会 2013 年度年会、2013 年 10 月、宮崎大学 (宮崎市)

小北智之、野々垣初音、森誠一、ハリヨの雄性ホルモン量における適応的分化の遺伝基盤、日本進化学会第 15 回大会、筑波大学 (つくば市)

小北智之、ハリヨ集団間における繁殖システム変異のエコゲノミクス、日本進化学会第 14 回大会ワークショップ「エコゲノミクスで挑む進化学～次の 10 年～」、首都大学東京 (八王子市)

[図書] (計 1 件)

小北智之、東海大学出版会、*魚類行動生態学入門* (桑村哲生・安房田智司編) 第 9 章 行動生態ゲノミクス - 適応進化の遺伝基盤を探る (pp. 222-239) 2013 年、265 ページ

[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：なし

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・准教授
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：