

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840138

研究課題名(和文) 一夫一妻魚類におけるペアボンド維持機構とその遺伝基盤の解明

研究課題名(英文) Proximate and genetic mechanisms of pair bonding in monogamous fishes

研究代表者

曽我部 篤 (Sogabe, Atsushi)

弘前大学・農学生命科学部・助教

研究者番号：80512714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：多様な配偶システムを示し、他に類をみないほど安定した一夫一妻を維持することが知られるヨウジウオ科魚類をモデル系として、一夫一妻維持の至近的機構として働く神経内分泌とその遺伝基盤を解明する。配偶システムに変異のある4種のヨウジウオ科魚類を対象に、全脳における遺伝子発現パターンの定量比較を行い、ペアボンド維持に働く候補遺伝子の網羅的探索を行った。一夫一妻のイシヨウジを用いてマッピングのためのリファレンス配列を作成したところ、26,383の遺伝子が特定された。4種を対象としたRNA-Seqをおこなったところ、試料あたり平均して6400万リードが得られた。現在、発現量の比較解析を実施している。

研究成果の概要(英文)：The study was conducted to elucidate the neuroendocrine systems as proximate mechanisms for pair bonding in monogamous fishes. Gene expression patterns in the brain were quantitatively compared among four species of syngnathid fishes which show the variation in mating system (i.e., monogamy and polygamy). In total, 26,383 genes were detected in the brain of a monogamous pipefish, *Corythoichthys haematopterus*, and used for the reference sequence for mapping the reads from the RNA-Seq. At present, the RNA-seq analysis of the brain of four species of syngnathid fishes is still ongoing.

研究分野：進化生態学

キーワード：一夫一妻 ペアボンド RNA-Seq 行動 配偶システム 魚類

1. 研究開始当初の背景

動物の配偶システムに見られる著しい多様性は、生態的・社会的環境の変異に依存した雌雄の繁殖形質進化の産物であり、行動生態学はその形質の適応的意義を解き明かすことで、配偶システムに対する理解を深めてきた。しかし、配偶システム多様化のプロセスやメカニズムを仔細に検討するためには、従来の究極要因探索のアプローチに加え、配偶システムの決定に関わる行動の至近的機構とその遺伝基盤を解明し、DNA に刻まれた「進化の足跡」を捉える必要がある。

特定の雄と雌が継続的かつ排他的な配偶関係を維持する一夫一妻は、動物界において稀な配偶システムである。近年、一夫一妻関係の維持（ペアボンド維持）の至近的機構とその遺伝基盤について、神経内分泌系に注目した研究が盛んに行われている。ハタネズミ属を対象とした先駆的な研究では、神経ペプチド類の一種アルギニン・バソプレッシン受容体（V1a）の脳内空間分布が、一夫一妻と一夫多妻の種で異なること、この受容体をコードする遺伝子のプロモーター領域に配偶システムの異なる種間で変異があり、この変異がペアボンドの維持と深く関係していることが報告されている。同様の現象はヒトでも知られているが、我々哺乳類から魚類まで、脊椎動物に広く認められる一夫一妻が、動物群を超えた共通した至近的機構により維持されているのか、それとも個々に独立した進化的起源と至近機構を有するのか、現時点では分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、配偶システムに種間で著しい変異があり、なかでも他に類を見ないほど安定した一夫一妻を維持することで知られるヨウジウオ科魚類を対象として、ペアボンド維持に働く神経内分泌機構とその遺伝的基盤を明らかにする。多くの動物では、配偶システムの変異に応じて、子の保護を行なう性や社会構造なども変化してしまうが、ヨウジウオ科魚類では、配偶システムの違いに関わらず、子の保護を行うのは雄のみであり、その他の社会システムにも配偶システムタイプ間で違いが見られない。そのため、配偶システムの異なる種間で、内分泌系になんらかの差異が認められたなら、この差異が配偶システムの違いに、ひいては配偶システムの決定に関わる行動の違いを導いている可能性が高いと考えられる。加えて、一夫一妻のヨウジウオ科魚類では、非繁殖期中にも「挨拶行動」と呼ばれる、ペアの雌雄に特異的な行動を介してペアボンドを維持していることが知られており、この特性を利用することで、繁殖サイクルに応じた内分泌動態の影響を排除した、純粋にペアボンド維持に働く内分泌動態の検出が可能となる。このように本科魚類は、ペアボンドの維持と神経内分泌系の

関係を検証する上で、他の動物群では替えの利かない絶好のモデル系である。

ペアボンド維持のような複雑な社会行動の制御には、神経内分泌系の様々な遺伝子が行動の発現や調整に関わっていると予想され、また、先行研究で示された V1a 以外にも動物群特異的なペアボンド維持の機構が存在する可能性がある。そのため本研究では、まず配偶システムの異なるヨウジウオ科魚類の間で、脳内の遺伝子発現パターンを網羅的に比較することにより、配偶システムタイプ間で発現パターンに大きな差異のある遺伝子を、ペアボンドの維持に働く遺伝子の候補としてリストアップする。次にこれら候補遺伝子が、実際にペアボンドの維持の至近的機構として機能しているかどうかを、2 種類の行動実験を行ない検証する。以上により、ペアボンド維持の至近的機構として働く神経内分泌系の遺伝子の特定を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、一夫一妻のヨウジウオ科魚類 2 種（イシヨウジ *Corythoichthys haematopterus* とポットベリーシーホース *Hippocampus abdominalis*）および複婚のヨウジウオ科魚類 2 種（オクヨウジ *Urocampus nanus* とヨウジウオ *Syngnathus schlegelii*）の計 4 種の雌雄を対象とした。これら 4 種では、一夫一妻から複婚への進化が独立に生じていることから、研究上の Evolutionary replicate として利用することで、検証度の高い研究を行うことが可能である。

まずは、サンプリングに先立って詳細な行動観察を行い、繁殖ステータスを確認したこれら 4 種の雌雄の全脳を試料として、RNA-Seq による比較トランスクリプトーム解析を行い、配偶システム間で発現量が異なる遺伝子を探索する。取得したトランスクリプトームの *de novo* アセンブリを行い、遺伝子発現行列を得ることで、配偶システムタイプ間で発現量が大きく異なる遺伝子を、ペアボンド維持に関係する候補遺伝子としてリストアップする。

比較トランスクリプトーム解析の結果、発現量に配偶システムタイプ間で変異のなかった遺伝子についても、脳内における発現部位の空間的な変異がペアボンド維持行動に影響している可能性は否定できない。そこでゲノム解読の進んだモデル生物（ゼブラフィッシュ、メダカ、トゲウオなどの魚類）のゲノムデータベースから先行研究により社会行動との関連が強く示唆されている神経内分泌の遺伝子をピックアップする。これら遺伝子について、脳の組織切片 *in situ* ハイブリダイゼーションにより、遺伝子発現の脳内空間パターンを配偶システムタイプ間で比較する。

続いて、以上に上げた候補遺伝子が、実際にペアボンドの維持機能しているか検証するために、一夫一妻のイシヨウジを対象にし

た2つの行動実験を実施する。1つ目の実験では、ペア関係にある雌雄の一方を除去することで、人為的にペアボンドを崩壊させ、残された個体が、新規配偶者の獲得を経て新たな一夫一妻関係を構築する過程で起こる、一夫一妻維持候補遺伝子の発現動態を qPCR を用いて追跡する。2つ目の実験では、ペアボンド遺伝子の発現を変化させた時に、一夫一妻の安定性やペアボンド維持行動に現れる変化を確かめる。本種のような非モデル生物では、RNA 干渉や CRISPR/Cas9 のような逆遺伝学的手法を適用することは現状において非常に困難である。そこで、先行研究で魚類の社会行動を制御することが報告されており、本研究でもペアボンド維持の候補遺伝子になると予測される神経ペプチド類（バソトシンやイソトシンなど）について、化学合成させた神経ペプチド類や神経伝達を阻害するアンタゴニストを投与した時に、イシヨウジの一夫一妻の安定性やペアボンド維持行動の変化を行動観察することで、これら神経ペプチドの機能を追跡する。これら2つの実験を複婚でペアボンドを形成しないヨウジウオについても行い、一夫一妻のイシヨウジと内分泌動態および行動を比較する。

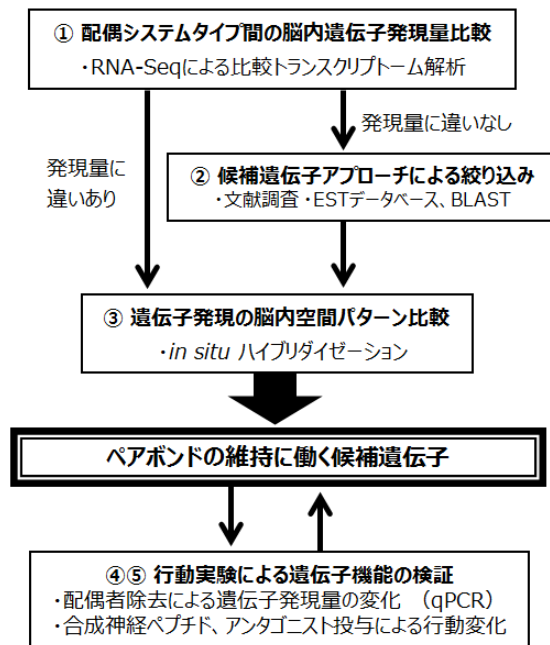


図1：研究の全体像。

4. 研究成果

上記計画のもと研究を実施したが、4種のヨウジウオ科魚類のうち1種で、サンプルを得るための飼育実験に想定していたよりも大幅に時間を要したことに加え、RNA-Seqにより得られた短いリード(100bp)を効率的にマッピングするためのリファレンス配列を作成するために、イシヨウジの雌雄、計4個体の全脳を試料として、ロングリードのRNA-Seq(250bpのペアエンド)を行ったため、当初計画に大幅な遅滞が生じ、現時点では研究計画の一部が完了したのみである。ヨウジ

ウオ科魚類4種を対象とした脳内発現遺伝子の比較トランスクリプトーム解析による候補遺伝子の探索を現在も継続している。

比較トランスクリプトーム解析における効率的なマッピングのため、イシヨウジ4個体(雄2匹と雌2匹)の全脳を試料に、MiSeq(イルミナ社)によるロングリードのRNA-Seqを行い、リファレンス配列を作成した。およそ4000万リードからde novoアセンブリによりおよそ18万のコンティグが得られ、アノテーションの結果、48,055の配列から26,383の既知の遺伝子が特定された。推定された遺伝子の多くは、細胞機能の維持や増殖、代謝に働いいわゆるハウスキピング遺伝子であったが、本研究でターゲットとするペアボンド維持に働く遺伝子の候補であるイソトシンやバソトシンのレセプター遺伝子なども検出されている。

続いて、4種を対象としたRNA-Seqを行い、イシヨウジ雌雄4個体、Hippocampus abdominalis雌雄2個体、オクヨウジ雌雄4個体、ヨウジウオ雌雄4個体から、サンプルあたり平均して6400万リードが得られている。現在得られたシーケンスデータをリファレンス配列にマッピングし、配偶システムタイプ間で遺伝子発現量比較解析を行い、ペアボンド維持に働く候補遺伝子の特定を進めているところである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

1. Sogabe, S., Kato, S. & Takata, H. 2014. Estimating the mode of egg production in the spotted seahorse *Hippocampus kuda* to establish optimal captive breeding conditions. *Aquaculture Science* 62: 199-201. (査読あり)
2. Tsuboi, M., Shoji, J., Sogabe, A., Ahnesjö, I. & Kolm, N. 2016. Within species support for the expensive tissue hypothesis: a negative association between brain size and visceral fat storage in females of a Pacific seaweed pipefish. *Ecology and Evolution* 6: 647-655. (査読あり)

[学会発表](計1件)

1. 曾我部篤 ヨウジウオ科魚類における配偶システム多様化の至近要因と系統的制約. 日本動物行動学会第33回大会, 長崎, 2014年11月.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/staff/atsushi-sogabe>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

曾我部篤 (SOGABE ATSUSHI)

弘前大学農学生命科学部・助教

研究者番号：80512714