

機関番号：15301  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2010  
 課題番号：19370011  
 研究課題名（和文）繁殖タイミングの変異を介した生殖隔離の生態遺伝学的解析  
 研究課題名（英文）Ecological genetic analyses for reproductive isolation via variation of reproductive timing

## 研究代表者

宮竹 貴久 (MIYATAKE TAKAHISA)

岡山大学・大学院環境学研究科・教授

研究者番号：80332790

研究成果の概要（和文）：開花、サンゴの配偶子放出、昆虫の交尾など生殖を行う時刻や季節が決まっている生物は多い。1つの集団内に生息する個体どうしても、おたがいが生殖するタイミングがずれると交配が妨げられ生殖的な隔離が生じる。このような時間的生殖隔離に関与すると考えられる生態分子遺伝基盤を解明した。具体的には交尾時刻が5時間異なるミバエの集団間で体内時計を支配する遺伝子を調べた結果、クリプトクローム遺伝子のアミノ酸置換サイトに変異が生じていた。

研究成果の概要（英文）：Timing of reproduction including flowering, spawning, or mating of many organisms has restricted time-zone during a successive organism action, for example, particular seconds, hours, days, seasons or years. We cloned the clock gene *period* from two strains of melon fly, in one individuals mate early in the day, whilst in the other individuals mate later. The deduced amino acid sequences of PERIOD proteins for these two strains were reported to be identical. We cloned another clock gene *cryptochrome* (*cry*) from the two strains, and found two stable amino acid substitutions in the strains. The results suggest the influence on allochronic reproductive isolation of clock gene.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2008年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
総計	12,700,000	3,810,000	16,510,000

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：環境・生態

キーワード：種分化、生殖隔離、交尾行動、時計遺伝子、クリプトクローム、交尾時刻

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子の多面発現が表現型進化に及

ぼす影響は、今後の生態学において解明すべき重要課題である。近年、生活史フェノロジーのシフトが、生活史を支配する遺伝子の多面発現を介して交尾のタイミングを変え、結果的に生殖隔離を導くという種分化メカニズムが植物と動物において議論されている。

(2) 発育タイマーと概日時計を多面的に支配する遺伝子は、繁殖タイミングの変化を介して生殖隔離の進化を引き起こしうる。発育速度などの生活史タイミングを支配する発育タイマーは、野外において常に自然選択にさらされている。たとえば、ある昆虫が新しい寄主植物上で生活し始めると(=寄主転換)、発育期間が延長したり、逆に短い発育期間が有利になったりするだろう。発育タイマーを支配する遺伝子が交尾リズムに多面的に影響するなら、寄主転換した個体群の交尾リズムは元の個体群のものとは異なるだろう。交尾リズムに大きな差が生じれば2つの個体群間では交配が成り立たない。かくして生殖隔離の進化が生じる。それによって生殖隔離を引き起こす多面発現効果を持つ原因遺伝子の探索が大事である。

## 2. 研究の目的

(1) 一日のうちに交尾する時刻が5時間以上も異なり、その結果、たがいに交配上の隔離が生じているウリミバエの2つの集団を時間的な生殖隔離のモデルとして、体内時計を支配している遺伝子のどれが交尾時刻の違いと関連するのか調べる。

(2) 体内時計を支配する遺伝子は、近年急速にその分子メカニズムが解明されつつあり、それらは、分類群によってある程度変異が認められるものの、ほ乳類

からハエまで動物ではほぼ似通った分子システムで体内時計を駆動していることがわかってきた。したがって、ハエで解明した時計のシステムは、ほ乳類にも適用できる可能性がある。本研究では、キイロショウジョウバエですでに解明されている時計遺伝子について、ウリミバエでのホモログを明らかにし、交尾時刻の違いに關与する時計遺伝子の徹底的なスクリーニングを行う。まず基本的な時計遺伝子であるピリオドを調べ、次にピリオド遺伝子のフィードバックループに關与する時計遺伝子について交尾時刻の異なる2つの集団間でアミノ酸置換が生じていないか調べる。

(3) とくにウリミバエでは、発育期間が短くなる方向に人為的に選抜されたショート系統と、発育期間が長くなる方向に人為的に選抜されたロング系統の複数の繰り返し集団において、いずれも発育期間の長短と、一日のうちに成虫が交尾する時刻の早遅が高い相関関係にある。そこで、線虫において発育タイマーを支配するとされている時計遺伝子ダブルタイムに焦点をあて、アミノ酸置換を調べる。

(4) ウリミバエ以外にも、生物の繁殖のタイミングの違いがもたらす生態学的な影響について、いくつかの昆虫をモデルとして研究解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 冷凍保存したウリミバエのサンプルから頭部を切断し、mDNAを抽出して、キイロショウジョウバエとのホモログを利用して、ウリミバエの時計遺伝子の配列を解析した。

(2) 交尾時刻の異なるウリミバエの2

つの集団について、上記(1)で解明した配列にアミノ酸置換を生じさせる塩基配列の存在の有無について、スクリーニングを行った。

(3) 集団間でアミノ酸配列に置換が見られた場合には、キイロショウジョウバエの組み替えに有効な GAL4 システムを用いて、リズムをロックダウンしたキイロショウジョウバエの系統に人為的にその塩基配列を導入し、ウリミバエで発現していた特有のリズムが、導入したキイロショウジョウバエで復元されるかアクトグラフを用いて調べた。

(4) あるいは、沖縄県で飼育されている交尾時刻にバリエーションを持つウリミバエの複数の系統について、その塩基置換サイトの SNIP 解析を行って集団レベルでの交尾開始時刻、発育期間、体内時計の自由進行周期の解析を行い時計遺伝子の交尾時刻への関与について調べる。

(5) 繁殖のタイミングに関連する昆虫類の配偶行動について、配偶季節のタイミング、交尾のタイミング、交尾前性選択のタイミング、射精のタイミングなどの生物学的事象について精査した。

#### 4. 研究成果

(1) 交尾する時刻(繁殖のタイミング)が大幅にずれたため生殖隔離の認められるウリミバエのショート系統(S)とロング系統(L)について時計遺伝子の塩基配列を比較した。まずピリオド遺伝子について比較したが、2つのウリミバエ集団でピリオド遺伝子にアミノ酸配列の違いは見られなかった。

(2) 次に線虫では発育タイマーとして機能する時計遺伝子、ダブルタイムについて調べたところ、特定の領域にアミノ酸置換を生じさせる塩基配列が見つかった。

そこでリズムを欠損させたキイロショウジョウバエにウリミバエ時計遺伝子を導入し、ウリミバエのダブルタイムを持つキイロショウジョウバエの概日リズムを作成し解析したが、概日リズムの変化が認められなかった。このことから、ウリミバエの繁殖のタイミングを左右する時計遺伝子がダブルタイム遺伝子ではないことが示唆された。

(3) その他の時計遺伝子、クライ、サイクル、シャギー等を解析した。その中で光入力系に関与するクリプトクローム遺伝子(*cry*)においてウリミバエの2集団間でアミノ酸置換が見いだされた。すなわち*cry*遺伝子では2個のアミノ酸置換

(285番目がSではArg、LではLys、502番目がSではLys、LではAsn)がコード領域内に見られた。この2サイトについて、交尾時刻にバリエーションの見られるたぐさんのウリミバエ集団を用いて、SNIP解析を行い、ミバエ飼育集団のアミノ酸置換率を推定した結果、*cry*遺伝子502番目アミノ酸がLysに置換した集団は、Asnである集団に比べ概日周期長と発育期間が長く、交尾時刻が遅いことが明らかとなった。また表現型変異が中間に位置する集団では、この2サイトはヘテロであり、交配隔離への関与が強く示唆された。

(4) 不妊化したウリミバエのS系統とL系統を岡山大に空輸し、*cry*遺伝子の脳内発現量の定量的PCR解析を行った。その結果、*cry*遺伝子の脳内発現周期はS系統とL系統で有意に異なった。この結果は、*cry*遺伝子がウリミバエの繁殖タイミングに関与することを示唆する。

(5) そのほか別の時計遺伝子(*cyc*; *cycle*)についてもcDNAの全長のクローニングを行った。その結果、S系統の5'側

の5クローン中4クローンにおいて、533番目と534番目の塩基の間に65の塩基挿入箇所が見られた。この変異は別の時計遺伝子*clock*との二量体結合に関与するPAS領域も含んでいる。よって、これらのアミノ酸が翻訳されないとタンパク質が正常に機能せず、ウリミバエの繁殖タイミングに影響を与える可能性も示唆された。

(6) ウリミバエ以外の昆虫についても、繁殖のタイミングに関連した生物リズムと行動生態学的な事象に関連する現象について解析を行った。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計41件)

①Harano T, Miyatake T (2011)

Independence of genetic variation between circadian rhythm and development time in the seed beetle, *Callosobruchus chinensis*. Journal of Insect Physiology in press. 査読有

②Harano T, Okada K, Nakayama S, Miyatake T, Hosken DJ (2010) Intralocus sexual conflict unresolved by sex-limited trait expression. Current Biology 20: 2036-2039. 査読有

③Yamane T, Miyatake T (2010) Induction of oviposition by injection of male-derived extracts in two *Callosobruchus* species. Journal of Insect Physiology 56: 1783-1788. 査読有

④Okada K, Yamane T, Miyatake T (2010) Ejaculatory strategies associated with experience of losing. Biology Letters 6: 593-596. 査読有

⑤Okada K, Miyatake T (2010) Plasticity of size and allometry in multiple sexually selected traits in an armed beetle

*Gnatocerus cornutus*. Evolutionary Ecology 24: 1339-1351. 査読有

⑥Yamane T, Okada K, Nakayama S, Miyatake T (2010) Dispersal and ejaculatory strategies associated with exaggeration of weapon in an armed beetle. Proceedings of the Royal Society B 277 (1688): 1705-1710. 査読有

⑦Harano T, Miyatake T (2010) Genetic basis of incidence and period length of circadian rhythm for locomotor activity in populations of a seed beetle. Heredity 105: 268-273. 査読有

⑧ Miyatake T, Ohno T (2010) Seasonal abundance of exotic leaf beetle *Ophraella communa* LeSage (Coleoptera: Chrysomelidae) on two different host plants. Applied Entomology and Zoology 45: 283-288. 査読有

⑨Okada K, Miyatake T (2010) Effect of losing on male fights of broad horned flour beetle, *Gnatocerus cornutus*. Behavioral Ecology and Sociobiology 64: 361-369. 査読有

⑩Nakayama S, Miyatake T (2010) Genetic trade-off between abilities to avoid attack and to mate: a cost of tonic immobility. Biology Letters 6: 18-20. 査読有

⑪ Fuchikawa T, Sanada S, Nishio R, Matsumoto A, Matsuyama T, Yamagishi M, Tomioka K, Tanimura T, Miyatake T (2010) The clock gene *Cryptochrome* of *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) in strains with different mating times. Heredity 104: 387-392. 査読有

⑫Sasaki T, Okada K, Kajiwara T, Miyatake T (2010) On the optimal duration of memory

of losing a conflict - a mathematical model approach. *Journal of Biological Dynamics* 4: 270-281. 査読有

⑬ Katsuki M, Miyatake T (2009) Effects of temperature on mating duration, sperm transfer and remating frequency in *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Insect Physiology* 55: 112-119. 査読有

⑭ Okada K, Miyatake T (2009) Genetic correlations between weapons, body shape and fighting behaviour in the horned beetle *Gnatocerus cornutus*. *Animal Behaviour* 77: 1057-1065. 査読有

⑮ Harano T, Miyatake T (2009) Bidirectional selection for female propensity to remate in the bean beetle, *Callosobruchus chinensis*. *Population Ecology* 51: 89-98. 査読有

⑯ Matsumoto A, Ohta Y, Itoh TQ, Sanada-Morimura S, Matsuyama T, Fuchikawa T, Tanimura T, Miyatake T (2008) Period gene of *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) among strains with different mating times and sterile insect technique. *Annals of the Entomological Society of America* 101: 1121-1130. 査読有

⑰ Okada K, Miyatake T, Nomura Y, Kuroda K (2008) Fighting, dispersing, and sneaking: body-size dependent mating tactics by male *Librodor japonicus* beetles. *Ecological Entomology* 33:269-275. 査読有

⑱ Harano T, Nakamoto Y, Miyatake T (2008) Sperm precedence in *Callosobruchus chinensis* estimated using the sterile male technique. *Journal of Ethology* 26: 201-206. 査読有

⑲ Yamane T, Miyatake T (2008) Strategic ejaculation and level of polyandry in

*Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Ethology* 26: 225-231. 査読有

⑳ Okada K, Nomura Y, Miyatake T (2007) Relations between allometry, male-male interactions and dispersal in a sap beetle, *Librodor japonicus*. *Animal Behaviour* 74: 740-755. 査読有

▪ Harano T, Miyatake T (2007) No genetic correlation between the sexes in mating frequency in the bean beetle, *Callosobruchus chinensis*. *Heredity* 99: 295-300. 査読有

▪ Harano T, Miyatake T (2007) Interpopulation variation in female remating is attributable to female and male effects in *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Ethology* 25: 49-55. 査読有

[学会発表] (計12件)

① 宮竹貴久ほか、発育タイマーと概日リズムの相関：選抜実験とゲノムワイドスクリーニングの結果から、個体群生態学会 第26回年次大会、横浜、2010年9月22日-23日 (ポスター発表)

② 宮竹貴久ほか、キイロショウジョウバエにも見られた発育期間と概日リズムの遺伝相関：人為選抜実験とゲノムワイドスクリーニングの結果から、日本進化学会第12回 東京大会、東京工業大学、2010年8月2日～5日 (ポスター発表)

③ 宮竹貴久ほか、メダカナガカメムシの長時間交尾と短時間・長時間の交尾器挿入がもつ機能、日本応用動物昆虫学会第54回大会、千葉大学西千葉キャンパス (千葉市)、2010年3月26-28日 (口頭発表)

④ 宮竹貴久、不妊化法の効率を左右する昆虫時計遺伝子の生態遺伝学的研究。日

本応用動物昆虫学会 学会賞授賞講演、  
日本応用動物昆虫学会第54回大会、千葉  
大学西千葉キャンパス（千葉市）、2010  
年3月26-28日（授賞講演）

- ⑤ 宮竹貴久ほか、キイロショウジョウバエ  
における発育期間に関する選抜実験とゲ  
ノムワイドスクリーニング。第57回日  
本生態学会東京大会、東京大学駒場キャン  
パス（東京都）、2010年3月15-20日（ポ  
スター発表）
- ⑥ 宮竹貴久、ミバエの場合—面白い昆虫行  
動の研究：遺伝リンクと環境変化。平成  
21年度生物系三学会中国四国支部合同大  
会公開シンポジウム「虫たちと環境変  
動」（コーディネーター 原田哲夫）、  
高知大学朝倉キャンパス（高知市）、2009  
年5月16日（招待講演）
- ⑦ 宮竹貴久ほか、交尾開始時刻の異なるウ  
リミバ2系統における時計遺伝子：  
shaggyとcycleの塩基配列解析。第53回  
日本応用動物昆虫学会大会、北海道大学  
高等教育機能開発センター（札幌市）、  
2009年3月28-30日（口頭発表）
- ⑧ 松本 颯ほか、ウリミバエの分子時計機  
構：交尾開始時刻を左右する遺伝変異の  
解明に向けて。第53回 日本応用動物昆虫  
学会大会、北海道大学高等教育機能開発  
センター（札幌市）、2009年3月28-30日  
（口頭発表）
- ⑨ 宮竹貴久ほか、交尾時刻が異なるウリミ  
バエ2系統間における時計遺伝子の解析。  
第56回日本生態学会盛岡大会、岩手県立  
大学（滝沢村）、2009年3月17-21日（ポ  
スター発表）
- ⑩ 宮竹貴久、時間のすみわけによる生殖隔  
離：イントロにかえて。ワークショップ  
「様々な時間軸の生態リズムと生物多様  
性」、第15回日本時間生物学会学術大会、

岡山大学（岡山市）、2008年11月8-9日  
〔招待講演〕

- ⑪ 宮竹貴久、選択から開放された時計と低  
頻度で維持される遺伝相関。個体群生態  
学会第24回年次大会、東京大学（本郷）、  
2008年10月18日～19日（ポスター発表）

〔図書〕（計3件）

- ① 宮竹貴久、東海大学出版会、時間のすみ  
わけによる生殖隔離（リズム生態学：体  
内時計の多様性とその生態機能、清水  
勇・大石正編集）、2008、p. 115-138.
- ② 宮竹貴久、NTS、行動の制御機構と遺伝  
子の多面発現（昆虫ミメティクス：昆虫  
の設計に学ぶ、下澤楯夫・針山孝彦監修）、  
2008、p. 564-570.
- ③ 宮竹貴久、海遊舎、ウリミバエの体内時  
計を管理せよ！—大量増殖昆虫の遺伝的  
虫質管理—（不妊虫放飼法：侵入害虫根  
絶の技術、伊藤嘉昭編）、2008、p. 177-214.

○出願状況（計0件）

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.agr.okayama-u.ac.jp/LAPE/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮竹 貴久 (MIYATAKE TAKAHISA)  
岡山大学・大学院環境学研究科・教授  
研究者番号：80332790

### (2) 研究分担者

松本 颯 (MATSUMOTO AKIRA)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：40229539

### (3) 連携研究者

松山 隆志 (MATSUYAMA TAKASHI)  
沖縄県農業研究センター  
研究者番号：なし