

平成21年 5月29日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770056

研究課題名 (和文)

シクリッドフェロモンとその認知に関する研究

研究課題名 (英文)

The pheromone of cichlid and its recognition by individuals

研究代表者

二階堂雅人 (NIKAIIDO MASATO)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：70432010

研究成果の概要:本研究において魚類ゲノム中に6コピー存在すると考えられているV1R型嗅覚受容体遺伝子を全て、シクリッドから単離した。さらにこれらをビクトリア湖産シクリッド種間で比較したところ、V1R2遺伝子において顕著に配列の異なるアレルの多型を発見し、さらなる解析を進めた。その結果、このアレル多型は850万年以上前から維持されてきたものであることが判明した。配列の大きく異なる2種類のアレル型を集団中に維持することで潜在的な遺伝子数を増やすような自然選択「超優性」が働いていた可能性を強く示唆するものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：行動生理

1. 研究開始当初の背景

シクリッドにおいては、視覚研究が主導的におこなわれてきており、実際、視覚を介した配偶者選択が行われていることを示唆する行動学的な実験や、視覚受容体遺伝子が光環境に適応して種毎に変化していることなどを明らかにした研究も報告されている。その状況の中で、嗅覚に関しては未知な部分が多かった。その原因として、嗅覚受容体遺伝子は多重遺伝子族を形成しているために、その単離が非常に難しいためでもあった。しかしながら、水中で生活する魚類においては、化学物質を用いた嗅覚コミュニケーションは非常に有効な手段であることから、シクリッドにおいても何らかの重要な機能を果たしていると考えられるようになってきた。その中で、いくつかのモデル魚種においてゲノム計画が進み嗅覚受容体遺伝子群の全貌も明らかになってきたために、実際に DNA レベルで嗅覚研究を進められる状態となった。ただ、シクリッド嗅覚受容体遺伝子に関しては、これまでに報告例がなく、本研究を始めるにあたっては、まずシクリッドの嗅覚関連遺伝子群の単離からおこなうこととなった。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、生物多様性の根幹となる「種分化」が、フェロモン受容を始めたとする「嗅覚コミュニケーション」で達成されている可能性を分子レベルで明らかにすることである。その目標を達成するためにモデル生物として選んだのが、ビクトリア湖産シクリッド(淡水魚)である。種分化の原動力となった「嗅覚受容体」およびそのリガンドとなる「フェロモン」を探索する。ビクトリア湖産シクリッドは、今からおよそ 14000 年前に爆発的な放散を遂げたグループでありお互いに非常に近縁であるため、DNA 配列にほとんど違いが観察されない。しかし、実際には形態・生態の異なる多くの種が存在していることから、種に違いをもたらすような DNA 変異は集団に固定しているはずであり、逆にその様な DNA 変異を探し出すことによって、種の分化や形成に重要な遺伝的変異を探索することができるのである。そこで私は近年に魚類のフェロモン受容体の候補として単離された V1R 受容体に着目し、こ

の遺伝子に種を分けるような遺伝的変異が存在するか否かを研究の出発点とした。

3. 研究の方法

2005 年に報告された魚類 V1R 型嗅覚受容体遺伝子は、2007 年の時点で計 6 コピー存在することがわかった。そこで、本研究では、V1R1~V1R6 遺伝子それぞれを、ビクトリア湖産シクリッドである *Haplochromis chilotes* の BAC ライブラリーをスクリーニングして単離し、その配列に基づいて種間比較・進化解析をおこなった。進化解析に使用した software は、MEGA, DNASP, TCS, PAUP, Phyml, Modeltest, Genetyx である。また、着目する遺伝子に関しては、シクリッド嗅上皮における *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現の確認や、遺伝子数の確認のためのサザンハイブリダイゼーションもおこなった。実験に使用したビクトリア湖産シクリッドは、計 271 個体にのぼり、これらはすべて 2004~2007 年の間、計 4 回に渡るビクトリア湖遠征によって収集してきたものである。

4. 研究成果

本研究においては V1R2 遺伝子において特筆すべき発見があった。ビクトリア湖産シクリッドの V1R2 遺伝子座において、大きく配列のかけ離れた大きく分けて 2 つのアリル型が多型状態で集団中に存在することが明らかとなった。また、ビクトリア湖産シクリッドの各集団中における塩基多様度 π を比較すると、V1R2 遺伝子では 1% を超えるのに対し、その他これまでに報告のある遺伝子 LWS, Tyr, Hag, MC1R などでは π が 0.4% を超えなかった。さらに sliding window 解析によると、V1R2 遺伝子のタンパクコード領域に加えて、その近傍の領域でも顕著に塩基多様度 π の上昇が見られ、同時に Tajima's D の値が有意に正の値をとることから、この遺伝子座においては古くから存在するアリルが集団中に混在することが示唆された。さらに、この多型がどのようにして獲得されたものであるかを調べるために、ビクトリア湖に加えて、マラウイー湖、タンガニカ湖のシクリッドに関しても V1R2 遺伝子を単離し、系統

解析をおこなった。その結果、このV1R2において存在する2つのアレル型(clade I, clade II)が全ての湖においてモザイク状に混在していることが明らかとなった。これは系統樹上では大規模な種間多型として検出された。サザンハイブリダイゼーションの結果、この遺伝子は単一の遺伝子であることを証明しており、この多型が遺伝子重複に伴う可能性は否定できている。MEGAを使用してV1R2遺伝子の系統樹上の分岐年代を推定したところ、このV1R2遺伝子座における多型は今から850万年以上も前から維持されてきたものであることが判明した。このような現象は平衡淘汰(balancing selection)、もしくは超優性(overdominance)と呼ばれ、1つの遺伝子座において2種類のアレルを保持することが個体にとって極めて有利な際に働く自然選択である。つまりV1R2受容体を介した嗅覚コミュニケーションがシクリッドにおいて何らかの非常に重要な役割を果たしているものと予想できる。魚類V1R型嗅覚受容体のリガンドはこれまでのところ明らかにされていないが、いくつかの報告を考慮すると、おそらくは生殖行動の誘引などに関わるステロイド系のpheromonal hormoneなのではないかと予想されており、尿中に含まれているいくつかの代謝されたステロイドに関して、より多くの種類のものを感じることが出来る個体が集団中において有利であるために、このような自然選択が働いた可能性がある。本研究は、脊椎動物の化学受容体遺伝子において超優性が働いた初めての例を示したのもでもあり、この分野においても大きな成果を遂げたと考えている。本研究結果は現在、論文として投稿中である。今後は、この結果に基づいて、V1R2受容体のリガンド探索に向けて研究を進めていきたいと考えている。その際にリガンドの候補物質として、conjugated steroidのいくつかを準備しているところである。

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7件)

① Murata Y, Yonezawa T, Kihara I, Kashiwamura T, Sugihara Y, Nikaido M, Okada N, Endo H, Hasegawa M. (2009) Chronology of the extant African elephant species and case study of the species identification of the small African elephant with the molecular phylogenetic method. GENE 441:176-186. (査読あり)

② Nishihara H, Kuno S, Nikaido M, Okada N (2007) MyrSINEs: A novel SINE family in the anteater genomes. Gene 400(1-2):98-103. 31. Munemasa M, Nikaido M, Nishihara H, Donnellan S, Austin CC and Okada N (2008) Newly discovered young CORE-SINEs in marsupial genomes. Gene 407(1-2):176-85. (査読あり)

③ Munemasa M, Nikaido M, Nishihara H, Donnellan S, Austin CC and Okada N (2008) Newly discovered young CORE-SINEs in marsupial genomes. Gene 407:176-185. (査読あり)

④ 二階堂雅人, Oliver Piskurek, 岡田典弘 (2008) 「歯鯨亜目の単系統性に関するこれまでの研究と SINE 法によるその再検証」統計数理 Vol. 56:117-131. (査読あり)

⑤ 大原 海, 二階堂 雅人, 伊藤 敦子, 茂木 一孝, 岡村 裕昭, 岡田 典弘, 森 裕司, 山岸 公子 (2008) 日本味と匂い学会誌 15 (3) 529-530. (査読あり)

⑥ Onami J, Nikaido M, Okada N. (2007) Genomic expansion of the Bov-A2 retroposon relating to phylogeny and breed management. Mammal. Genome. 18:187-96. (査読あり)

⑦ Yonezawa T, Nikaido M, Kohno N, Fukumoto Y, Okada N, Hasegawa M. (2007) Molecular phylogenetic study on the origin and evolution of Mustelidae. Gene 396:1-12 30. (査読あり)

[学会発表] (計11件)

① 二階堂雅人, 平田直, 相原光人, 溝入真治, 山岸公子, 岡田典弘 「シクリッド嗅覚受容体 V1R2 遺伝子において観察された大規模な種間多型」第10回日本進化学会 (2008年8月23日、東京)

② 鈴木彦有, 二階堂雅人, 岡田典弘 「硬骨魚類における OMP の進化学的解析」第10回日本進化学会 (2008年8月23日、東京)

③ 大原 海, 二階堂 雅人, 伊藤 敦子, 茂木 一孝, 岡村 裕昭, 岡田 典弘, 森 裕司, 山岸 公子 「鯨偶蹄類1型鋤鼻受容体の進化」第10回日本進化学会 (2008年8月23日、東京)

④ Mzighani SI, Nikaido M, Takeda M, Aibara M, Mizoiri S, Tachida H, Okada N. Population genetics of Lake Victoria slender body Haplochromine Cichlids. 第1

0回日本進化学会 (2008年8月23日、東京)

⑤Hiraoka K, Nikaido M, Okada N. Evolution of Dopamine D2-like Receptors in Teleost species. Asia Africa Evolution Meeting (7th Dec., 2007, Chiba Japan)

⑥Sasaki T, Nikaido M, Wada S, Yamada TK, Cao Y, Hasegawa M, Okada N. Molecular phylogenetics and evolutionary history of Balaenoptera omurai inferred from the combined analysis of mitochondrial genome and SINE method. Asia Africa Evolution Meeting. (7th Dec., 2007, Chiba Japan).

⑦ Suzuki H, Nikaido M, Okada N. Two Olfactory Marker Protein genes in Teleost Fish. Asia Africa Evolution Meeting. (7th Dec., 2007, Chiba Japan).

⑧Watanabe M, Nikaido M, Tsuda TT, Mindell DP, Murata K, Cao Y, Hasegawa M, Okada N. Phylogenetic analyses of Sphenisciformes based on complete sequences of mtDNA and insertion patterns of Chicken Repeat 1. (7th Dec., 2007, Chiba Japan).

⑨二階堂雅人、岡田典弘「ビクトリア湖産シクリッドにおける V2R 型嗅覚受容体の進化」第9回日本進化学会 (2007年9月1日、京都)

⑩平岡乾、二階堂雅人、岡田典弘「東アフリカ産シクリッドの進化とドーパミン受容体との関連性の探索」第9回日本進化学会 (2007年9月1日、京都)

⑪ Nikaido M, Okada N “ Evolution of V1R-type olfactory receptor genes of cichlid fishes from east Africa ” Evolution Meeting 2007 17th June 2007, Christchurch NewZealand.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二階堂 雅人 (NIKAIDO MASATO)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教
研究者番号：70432010

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし