

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2010～2011
課題番号：	22770236
研究課題名（和文）	遺伝的に異なる近交系メダカ2系統を用いた嗅覚の適応進化メカニズムの解析
研究課題名（英文）	Evolutionary analysis of olfaction in two genetically diverged medaka strains
研究代表者	
	橋口 康之 (HASHIGUCHI Yasuyuki)
	大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：	70436517

研究成果の概要（和文）：

本研究では、遺伝的に大きく分化したメダカの2系統に由来する近交系 (Hd-rR, HNI)の比較に基づいて、嗅覚に関わる遺伝的・行動的な変異を特定し、その進化メカニズムの解明を目指した。嗅覚受容体 (OR) 遺伝子の系統解析から、2系統に共通する遺伝子を特定すると同時に、各系統に特異的な遺伝子の重複・偽遺伝子化を見いだすことができた。さらに OR 遺伝子の発現解析から、系統間で発現量の異なる遺伝子を複数同定した。また行動実験においては、アミノ酸に対するメダカの誘引・忌避行動を測定することの可能な実験系を確立することができた。これらの研究成果は、魚類における嗅覚の適応進化を理解する上で有用な研究基盤を提供すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

To understand the evolutionary mechanisms of fish olfaction, genetical and behavioral differences in two genetically divergent inbred strains (Hd-rR and HNI) of medaka (*Oryzias latipes*) were characterized by comparative analyses. Phylogenetic analysis of olfactory receptor (OR) genes has shown that most OR genes were common to the two strains, but several strain-specific gene duplications and pseudogenizations were also detected. In addition, qPCR analysis has identified expression differences of OR genes between the two strains. In behavioral analysis, an assay system that measures behavioral responses (i.e. attraction and avoidance) of medaka to amino acid odorants has been established. The results of this study provide valuable insights into the adaptive evolution of olfaction in teleost fishes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：メダカ、嗅覚受容体、魚類、分子進化、定量 PCR、RLM-RACE、行動解析

1. 研究開始当初の背景

生物の環境適応のしくみを理解することは、生物の多様な形態・行動がどのように進化したのかを知る上で重要である。また最近、同種の地域集団が、異なる生息環境に適応した結果生じる形質の分化（生態的分化）が種分化を引き起こす可能性が注目されており、種分化のしくみを理解する上でも適応の研究は重要性を増している。

適応に関する形質のうち「感覚系」は非常に重要なものの一つである。特に「視覚」については、これまで数多くの研究が行われており、環境への適応進化の機構が明らかにされてきた。その一方で、化学感覚である「嗅覚」も、適応に関わる形質として重要である。多くの生物種において、摂餌や繁殖などで嗅覚が果たす役割は大きい。しかし嗅覚は、無限ともいえる化学物質とその組み合わせの認識を行う複雑な感覚であり、視覚などと比較して研究が遅れている。特に、嗅覚の環境適応や進化のメカニズムについての研究は多くない。

匂い物質の認識には、化学物質のセンサーである「嗅覚受容体」が関係している。多様な匂い物質を識別するため、脊椎動物は多数の嗅覚受容体を持つ。その種類数は数十から、生物種によっては千種類以上にも達する。嗅覚受容体は生体外の刺激の入力を直接担う分子であるため、これらに着目することにより、嗅覚の適応進化機構の解明につながる情報が得られると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、モデル魚類であるメダカ *Oryzias latipes* を材料に、嗅覚受容体遺伝子の分子進化的な解析に加えて、嗅覚に関わる形質を行動実験で直接調べることにより、脊椎動物における嗅覚の適応進化メカニズムの解明を目指す。具体的には、以下の2点に焦点を絞って研究を進めることで、そのために必要な研究基盤を確立することを目的とした。

- (1) 匂い物質に対する反応（誘引・忌避）を測定するための行動実験系の確立と、それを用いたメダカ嗅覚の種内変異の探索
- (2) メダカ南日本・北日本系統のゲノム比較および遺伝子発現解析に基づく、同一種内の地域集団間における嗅覚受容体遺伝子群の分子進化メカニズムの解明

3. 研究の方法

(1) 「匂い物質に対する反応」を測定するメダカ行動実験系の確立

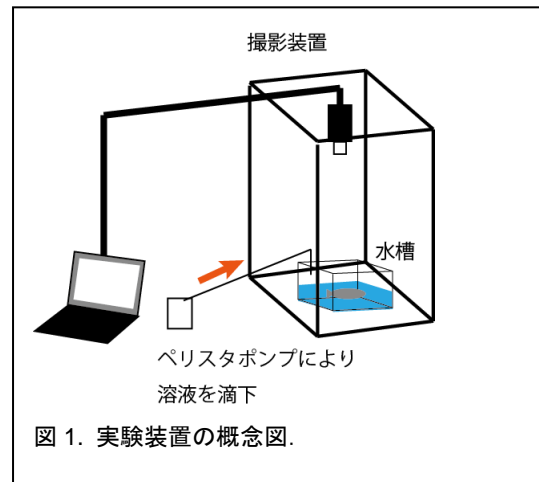
① 実験に使用したメダカ系統

実験に使用する近交系メダカ2系統

(Hd-rR: 南日本集団由来、HNI: 北日本集団由来)は、基礎生物学研究所から分譲を受けた。これらの系統を繁殖し、孵化後3-6ヶ月の個体を実験に使用した。また、HNI系統とHd-rR系統間のF1個体も作成した。

② 行動実験装置の作成・検討

匂い物質に対するメダカの反応を調べるため、以下のような実験を行った。実験用水槽（縦6cm × 横25cm × 高さ15cm）内に750mlの水を入れ、その中にメダカ1個体を入れる。メダカが環境に慣れた後、水槽を上部からビデオ撮影しながら、匂い物質の水溶液を遠隔操作により滴下し、メダカの反応を観察する。視覚による影響を排除するため、水槽の側面は不透明な黒色とし、メダカから外部が見えない状態にした。行動実験には、図1のような装置を作成し、遠隔操作により行った。匂い物質には、魚類における主要な匂い物質である20種類のアミノ酸を使用した。



(2) メダカ嗅覚受容体遺伝子のゲノム配列からの特定

すでにゲノム配列から特定しているメダカ Hd-rR 系統の嗅覚受容体遺伝子 (OR 遺伝子) の塩基配列をもとに、HNI 系統メダカのゲノム配列に対して BLAST 検索を行い、相同性の高い塩基配列を特定した。個々の塩基配列の開始・終止コドンおよび Exon-intron 構造を、独自に作成した Perl スクリプトにより決定した。得られた配列を NCBI の遺伝子データベースに対して相同性検索を行うことで、実際に OR 遺伝子であることを確認した。遺伝子系統樹と BLAST 検索の情報をもとに、Hd-rR と HNI 間での OR 遺伝子のオルソログを特定した。

(3) OR 遺伝子の発現解析

① 定量 RT-PCR による OR 遺伝子の発現量の測定、系統間での比較

Hd-rR, HNI それぞれの系統各 8 個体について、嗅上皮を含む鼻腔部分から total RNA を抽出し、解析に使用した。

オルソログを特定できた Hd-rR と HNI の OR 遺伝子 28 種類および Olfactory marker protein 1 (OMP-1) 遺伝子について、両者の塩基配列が 100% 共通する部分にプライマーを設計した。各個体の total RNA 500ng を逆転写して得られた cDNA を 1/10 に希釈し、リアルタイム RT-PCR 法により各 OR 遺伝子の発現量を測定した。定量は比較 Ct 法による相対定量で行った。相対定量の内蔵性コントロールには β -actin 遺伝子を用いた。検量線を作成することにより、各遺伝子に設計したプライマーの増幅効率を測定し、80-120% の範囲に入ることを確認した。また Hd-rR と HNI 系統間で、PCR の増幅効率がほぼ一致することを確認した。

② RLM-RACE 法による OR 遺伝子の転写開始位置の同定

OR 遺伝子の発現に関わる領域を同定し、系統間で比較するため、Hd-rR のオスと HNI のメスを両親とする F1 個体の鼻腔組織から total RNA を抽出し、Invitrogen 社の GeneRacer を用いて全長 cDNA を合成した。PCR 法により OR 遺伝子の 5' 側非翻訳領域の配列を増幅し、塩基配列を決定した。得られた配列をメダカのゲノム配列データに対して相同性検索を行うことで、転写開始点を同定した。

4. 研究成果

(1) メダカ行動実験

現時点においては、メダカの系統を飼育・繁殖する設備を確立し、行動実験に使用する個体を定期的に得ることが可能となった。また、実験を遠隔操作で行うための装置 (図 1) を作成し、装置内での温度・照度などの条件を一定にした状態で実験を行うことが可能になった。これまでおもに Hd-rR 系統を用いて行った予備実験では、複数のアミノ酸 (グルタミン酸、アラニン、セリン) に対してメダカは誘引される傾向が見られるものの、まだ定量的なデータの解析には至っていない。また、メダカの系統による性格の違い (水槽に対する順応性など) や、成長段階による反応の違いをどのようにコントロールするかもこれからの課題である。今後は 20 種類のアミノ酸に対するメダカの反応を解析し、系統間で比較することを目指す。また、野外で採集した個体を用いた実験も検討したい。

(2) メダカ OR 遺伝子の分子進化

メダカ Hd-rR および HNI 系統それぞれのゲノム中に存在する OR 遺伝子数を表 1 に示す。

表 1. メダカ OR 遺伝子・偽遺伝子数

系統	遺伝子	部分配列	偽遺伝子
Hd-rR	53	2	4
HNI	28	30	5

Hd-rR と HNI の系統間で 1:1 のオルソログが

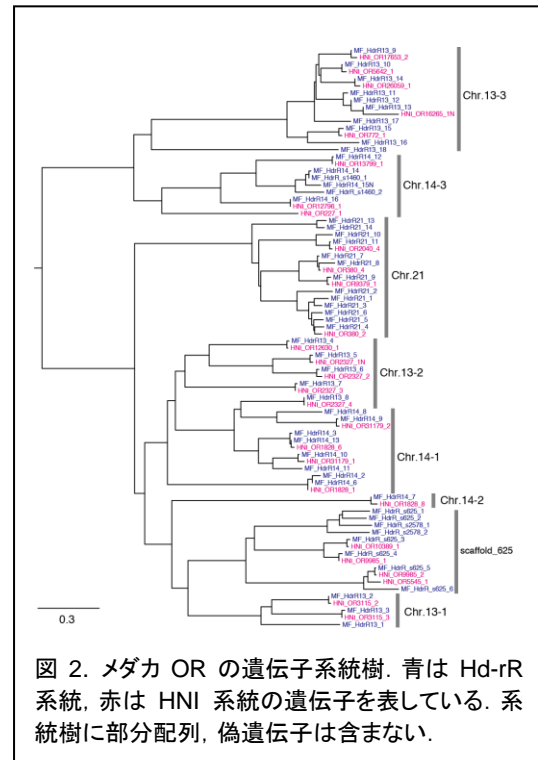


図 2. メダカ OR の遺伝子系統樹。青は Hd-rR 系統、赤は HNI 系統の遺伝子を表している。系統樹に部分配列、偽遺伝子は含まない。

特定できた OR 遺伝子は 38 あり、それ以外はどこらかの種で遺伝子が存在しない、または系統特異的な遺伝子重複が生じていると考えられた。OR 遺伝子の系統樹を作成したところ、特に Hd-rR 系統の 21 番染色体に存在する OR 遺伝子の一部で、Hd-rR 特異的に遺伝子数がやや増加していることが明らかになった (図 2)。また HNI 系統で部分配列が多いのは、HNI のゲノム配列データの冗長度が比較的低い (平均 2.8x, Kasahara et al 2007 Nature) ことに起因すると考えられる。

1:1 のオルソログが特定された遺伝子のうち、両方の系統で全長配列が決定されている 26 遺伝子について、系統間での塩基配列の違いは $2.1 \pm 1.3\%$ で、2 系統のゲノム全体での SNP 頻度 (3.42%, Kasahara et al 2007) よりはやや小さい傾向があった。また、オルソログが片方の系統のみで偽遺伝子化しているものが 3 遺伝子 (うち 2 つは 21 番染色体)、両方の系統で偽遺伝子化しているものが 1 遺伝子存在した。

OR 遺伝子オルソログ間の同義置換速度 (K_S) と非同義置換速度 (K_A) の比 (K_A/K_S) は、ほとんどの OR 遺伝子で 0.5 以下であったが、6 つの遺伝子で 1 を超えるものが見られた (図 3)。特に 21 番染色体の 1 遺伝子では、2.86

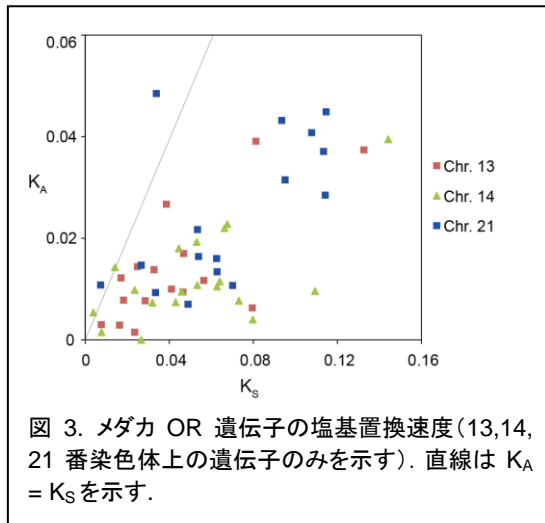


図 3. メダカ OR 遺伝子の塩基置換速度 (13, 14, 21 番染色体上の遺伝子のみを示す)。直線は $K_A = K_S$ を示す。

と高い値を示し、何らかの正の選択がはたしている可能性が示唆された。

(3) メダカ OR 遺伝子の発現

① 定量 RT-PCR 解析

2 系統間で 1:1 のオルソログが特定されている OR のうち 27 遺伝子で、定量 RT-PCR により遺伝子の発現量を測定し、系統間で比較した結果を図 4 に示す。

定量 RT-PCR 解析の結果、多くの遺伝子では系統間での発現量に明確な差異はみられなかったが、一部の遺伝子 (遺伝子 21-9, 13-4, 13-9 など) では HNI 系統での発現が Hd-rR 系統と比較して低い傾向がみられた。また遺伝子 21-12 では逆に、HNI 系統での発現量が相対的に高い傾向があった。しかし、遺伝子の発現量には個体差によるばらつきが大きく、現時点では明瞭な結果が得られているとは言いがたい。発現量のばらつきが大きくなる原因は、OR 遺伝子の発現量自体が少ないためと考えられた (β -actin 遺伝子の 10^{-4} ~ 10^{-5} 程度)。

② RLM-RACE 解析

現在、21 番染色体上の OR 遺伝子の一部について、転写開始位置を同定することに成功している。またそれらの OR 遺伝子では、転写開始位置の近傍 (3' 側) に 20 塩基程度の保存性の高い領域があることが明らかになった。他の OR 遺伝子については、今後解析を進める予定である。特に系統間で発現量に差がある OR 遺伝子 (遺伝子 13-4, 21-9 など) については、系統間での比較を行っていく。

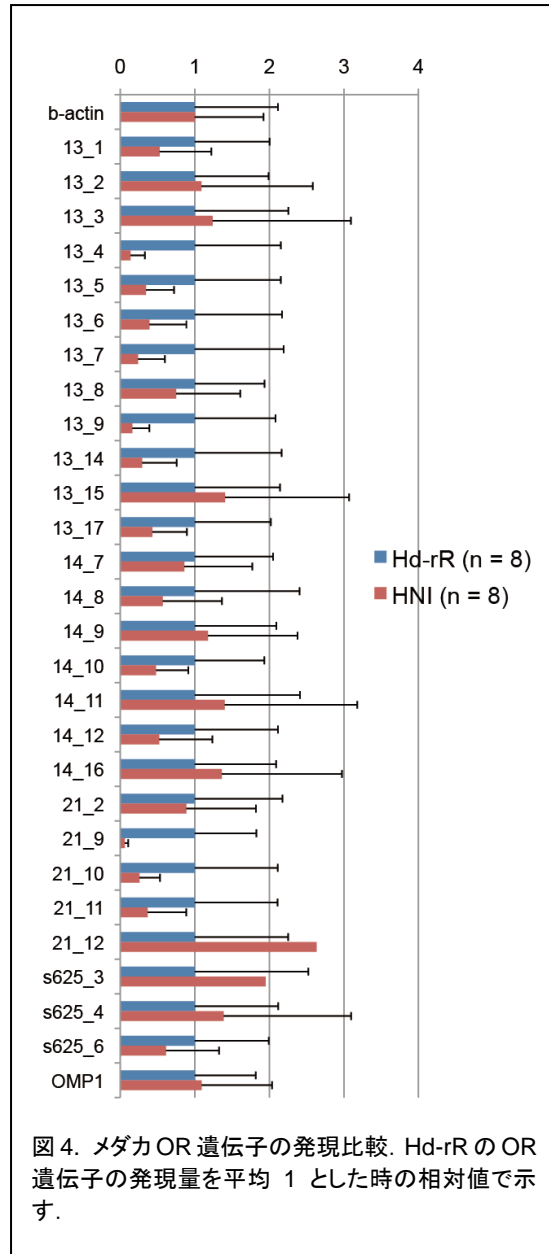


図 4. メダカ OR 遺伝子の発現比較。Hd-rR の OR 遺伝子の発現量を平均 1 とした時の相対値を示す。

(4) 今後の展開および課題

本研究では、メダカの嗅覚を調べる行動実験系を確立することができた。また、異なる地域集団に由来する遺伝的に異なるメダカ系統間での OR 遺伝子の変異を特定し、それらの遺伝子発現の違いもある程度明らかにすることが出来た。しかし、行動実験に関しては、実験系の立ち上げに試行錯誤したため、当初予定していた「匂い物質に対する反応性の系統間での比較」に至ることは出来なかった。今後は、メダカ系統間での嗅覚に起因する行動レベルでの違いを調べるため、さらに実験を進めたい。また、OR 遺伝子の発現解析については、個々の OR 遺伝子の発現量が低いこともあり、測定のばらつきがやや大きくなる傾向があった。遺伝子発現の系統間比較に関しては、Hd-rR と HNI の F1 雑種を使用

するなど、別の方法も現在検討中である（2系統間の F1 雑種はすでに作成済み）。また、これまでの解析で見つかった「系統間で機能に関わるアミノ酸配列や発現量が異なる OR」に着目し、それらの遺伝子の野外集団での動態を調べていきたい。今後、これらの解析をさらに進めることで、脊椎動物における嗅覚の環境適応や進化について、さらに興味深い知見が得られることが期待される。

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 5 件）

- ① Dehara Y., Hashiguchi, Y., Matsubara K., Yanai, T., Kubo, M., Kumazawa, Y. Characterization of squamate olfactory receptor genes and their transcripts by high-throughput sequencing approach. **Genome Biology and Evolution** 4: 602-616, 2012. [doi: 10.1093/gbe/evs041]
- ② Jonniaux, P, Hashiguchi Y., Kumazawa Y. Mitochondrial genomes of two African gechos of genus *Hemitheconyx* (Squamata: Eublepharidae). **Mitochondrial DNA**. (印刷中)
- ③ 鹿野雄一、中島淳、水谷宏、仲里裕子、仲里長浩、楫善継、黄亮亮、西田伸、橋口康之。西表島におけるドジョウの危機的生息状況と遺伝的特異性。 **魚類学雑誌** 59: 37-43. 2012. [http://www.fish-isj.jp/publication/index.html]
- ④ Oba Y., Yamauchi A., Hashiguchi Y., Satone, H., Miki, S., Nassef, M., Shimasaki, Y., Kitano, T., Nakao, M., Kawabata, S-i., Honjo, T., Oshima, Y. Purification and characterization of tributyltin-binding protein of tiger puffer, *Takifugu rubripes*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. 153: 17-23, 2011. [doi: 10.1016/j.cbpc]
- ⑤ 橋口康之・西田睦。日本のイトヨ自然集団における嗅覚受容体遺伝子ファミリーの適応進化。 **月刊海洋** 42: 372-378 2010. [http://www.kaiyo-chikyu.com/]

〔学会発表〕（計 7 件）

- ① 橋口康之, L. Jaeman, 白石真、小松正治、三木志津帆、島崎洋平、日下部宣宏、大嶋雄治。フグ科魚類におけるフグ毒結合タンパク質の分子進化。日本水産学会, 2012.3.27, 東京海洋大学。

- ② Y. Hashiguchi. Nucleotide and copy number differences of olfactory receptor (OR) genes in two inbred strains of medaka fish. SMBE 2011, Jul. 26, 2011, Kyoto University.

- ③ 橋口康之。魚類ゲノムにおける「逆転写に由来する遺伝子重複」の網羅的探索。日本遺伝学会, 北海道大学, 2010.9.21.

- ④ Y Hashiguchi. A comparison of odorant receptor gene repertoires between two genetically different strains of medaka fish. International Symposium of Biodiversity Sciences, Nagoya City University, 2010.8.1.

〔図書〕（計 2 件）

- ① 橋口康之。現代の生態学 7 エコゲノミクス - 遺伝子からみた適応 - (森長真一・工藤洋編), 分担執筆, 共立出版。(印刷中)
- ② 橋口康之。生物の事典 (石原勝敏・末光隆志 編), 37-41, 2010, 朝倉書店。(分担執筆)。

〔その他〕

ホームページ

<https://sites.google.com/site/hashiyuki0909/home>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋口 康之 (HASHIGUCHI Yasuyuki)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：70436517