

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 5 日現在

機関番号：32670

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23687011

研究課題名(和文) シクリッドとメダカを用いた生殖隔離の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanism for sexual isolation using cichlid and medaka

研究代表者

深町 昌司 (Fukamachi, Shoji)

日本女子大学・理学部・准教授

研究者番号：20323446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,900,000円、(間接経費) 3,270,000円

研究成果の概要(和文)：南米産の淡水魚、フラミンゴシクリッドの体色二型(ゴールドとノーマル)に関わる原因遺伝子座の染色体マッピングを行ったところ、候補領域には約7個の遺伝子が存在した。このうちドーパミンD2型様受容体(drd2-like)の配列を比べたところ、脊椎動物で広く保存されているアミノ酸がノーマルにおいて置換していることがわかった。メダカを用いてdrd2-likeの突然変異系統と過剰発現系統を作出したところ、TILLING法で作出したミスセンス系統は成魚まで育ちににくく、体色を比較するのに十分な個体数が得られなかった。体色とdrd2-likeとの因果関係の解明には、他の系統を用いた更なる検証が必要である。

研究成果の概要(英文)：Chromosomal mapping of the locus responsible for dimorphic coloration (Gold vs Normal) in Midas cichlid was performed. The candidate region contained about 7 genes, and the dopamine D2-like receptor gene could be the most promising candidate as the responsible gene. Indeed, we found an amino-acid substitution between the Gold and Normal alleles, which would affect function of the receptor. Comparison of this amino acid among vertebrates indicated that the Normal allele is derived from the Gold allele. We established genetically modified medaka strains of this gene; namely, missense mutants, frame-shift mutants, and transgenic strains that constitutively express the Gold or Normal allele. In terms of the missense mutants, we found that mutants were less viable than wild-type siblings, but causal relationship between body color and drd2-like remained unknown. Other strains established in this study will be helpful for further investigation of the function of this receptor.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物多様性・分類

キーワード：シクリッド メダカ 交尾前生殖隔離 同所的種分化 色素細胞 遺伝子操作

1. 研究開始当初の背景

「シクリッド」と総称されるカワスズメ科の淡水魚は、驚異的な速度で種分化を遂げたとされ、進化研究における最も代表的なモデルとなっている。それぞれの種がそれぞれに特徴的な形質を示すが、シクリッド類のゲノムは種間でほとんど同一である。従って、シクリッドで定義された「種」とは「突然変異体」と等価である可能性が高い。実際、シクリッドでは別種同士の交配が可能で、子の生存力や妊性も正常である場合が多い。この性質を利用して、これまでに連鎖地図の作成や量的形質の染色体マッピングが盛んに行われてきた [e.g. Strelman et al. 2003 Mol Ecol; Haesler & Seehausen 2005 Proc Biol Sci; Albertson et al. 2005 PNAS]。最近では、シクリッド初のポジショナルクローニングが報告され [Roberts et al. 2009 Science]、この仮説を裏付けると共に、シクリッドを用いた順遺伝学が可能である事が示された。

南米の火山湖に生息するシクリッドの一種、フラミンゴシクリッド (*Amphilophus citrinellus*) には2つの色彩多型 (茶色地に黒い縞模様様の「ノーマル」と、全体が鮮やかなオレンジ色の「ゴールド」) が存在する。このノーマルとゴールドは、実験室内での交雑が可能にもかかわらず、自然界では排他的に繁殖を行い、95%以上が同色個体のペアとなる。すなわち、それぞれが持つ「性的嗜好」により同一種の集団が隔離されている (交尾前生殖隔離)。実際に、ノーマル-ゴールド間で遺伝子流動が抑制されていることが集団遺伝学的に示されており [Elmer et al. 2009 Evolution]、これらの色違い個体間で種分化 (同所的種分化) が進行中であることが強く示唆されている。

先行研究により、このゴールド形質に関して、(1) 優性遺伝をすること、(2) 孵化時・幼魚時はノーマル色であり、成長と共に皮膚中のメラニン産生細胞 (黒色素胞) をアポトーシスにより失っていくこと [Dickman et al. 1988 Cell Tissue Res]、そして、(3) 一遺伝子座の突然変異であること [Fukamachi & Meyer unpublished] が既にわかっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上述の「ゴールド遺伝子」の正体を順遺伝学的に解明すること、および黒色素胞の分化・増殖におけるゴールド遺伝子の役割を、優れたモデル生物であり、近縁種でもあるメダカの実験系を用いて明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) フラミンゴシクリッドにおける、ポジショナルクローニング法を用いたゴールド突然変異の同定。

(2) メダカにおける、遺伝子破壊および遺伝子導入技術を用いたゴールド相同遺伝子の

操作と表現型解析。

4. 研究成果

(1) ゴールド候補遺伝子としてのドーパミン D2 型様受容体 (*drd2-like*) の同定

本研究開始時までに、ゴールドとノーマルを交配して得た 246 匹の F₂ と、約 300 個の AFLP マーカー、BAC-end マーカーを用いて、ゴールド突然変異が存在する領域は約 330 kb (塩基配列も解読済み) にまで絞り込まれていたが、ここには約 14 個の遺伝子が含まれていた [深町ら 未発表]。そこで、突然変異の上流側と下流側の最も近い組換え点を同定することで、さらに候補領域を絞り込むことにした。

候補領域中の適当な位置に DNA マーカーを設け、高解像度の連鎖解析を行ったところ、候補領域は約 230 kb にまで絞り込むことができ、この領域に含まれる遺伝子は最大で 7 個と考えられた [図 1 ; 高久ら 未発表]。

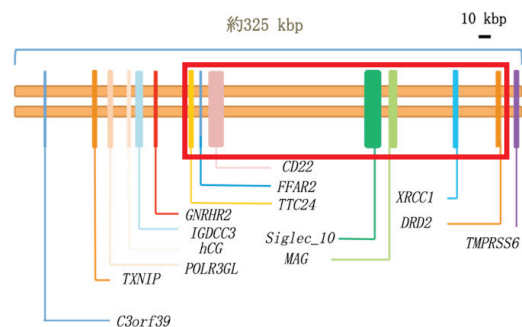


図 1. 候補領域 (赤枠) に存在する遺伝子。

これらのゴールド候補遺伝子のうち、ドーパミン D2 型様受容体 (*drd2-like*) が特に有力であると考えられた。というのは、ドーパミン D2 型受容体 (*drd2*) の機能欠損により体色が暗化することが、既にマウスで報告されているからである [Saiardi et al. 1998 Mol Endocrinol]。実際、*drd2-like* 翻訳領域の全塩基配列をゴールドとノーマルで比較したところ、3 個の一塩基多型 (single-nucleotide polymorphism; SNP) が見つかり、うち 1 個はアミノ酸置換 (R→H) を引き起こすことがわかった。このアルギニン (R) は脊椎動物の *drd2* および *drd2-like* において広く保存されているため、機能的に重要な役割を担うと考えられた [図 2]。

興味深いことに、このアミノ酸置換はゴールドではなくノーマルの方に見つかった。この結果は、ノーマルがゴールドの派生型であることを意味する。ゴールドが優性形質であることを鑑みると、*drd2-like* に劣性のミスセンス変異が起こったことで、ゴールドからノーマルが生じたと考えるのが妥当である。そこで、メダカを用いて *drd2-like* の機能、および R→H のアミノ酸置換の機能への影響を調べる為にメダカを用いて実験することにした。

Homo SFYVPFIVTLLVYIKIYI VLRRRRKRNTK
 Mus SFYVPFIVTLLVYIKIYI VLRKRRKRNTK
 Gallus SFYVPFIVTLLVYVQIYI VLRKRRKRNTK
 Xenopus SFYVPFIVTLLVYVQIYI VLRKRRKRNTK
 Medaka SFYVPFIITLLVYVQIYV VLRKRRKRNTK
 Danio SFYVPFIITLLVYVQIYV VLRKRRKRNTK
 Midas-1 SFYVPFIVTLLVYAQICVVLHKKRRTAPP
 Medaka-1 SFYVPFIVTLLVYAQICVVLRRRRTGPP
 Danio-1 SFYVPFIVTLLVYVQICVVLRRRRTAPT

図2. 脊椎動物における *drd2* および *drd2-like* (-1 と表記) のアミノ酸配列のアライメント図 (一部)。黒字が保存されているアミノ酸。フラミンゴシクリッド (Midas) にはノーマル型の配列を用いた。赤字がアミノ酸置換。

(2) メダカ *drd2-like* 相同遺伝子の単離と系統解析

メダカの相同遺伝子は、フラミンゴシクリッドの配列を用いた blast 検索によりデータベースより入手した後、実際に RT-PCR と direct sequencing により配列を決定した。これが *drd2-like* の相同遺伝子であることを確認するために、アミノ酸配列を用いた系統解析を行ったところ、*drd2-like* は四足動物の *drd2* と最も近縁であるが異なる型、つまり魚類特異的なドーパミン受容体であることが判明した [図3; 本間ら 未発表]。また、GenBank に既存の魚類の *drd2* に関しては、上記の事情から命名に混乱が生じているようだった。なお、メダカのアミノ酸配列でもアルギニンが保存されていた [図2]。

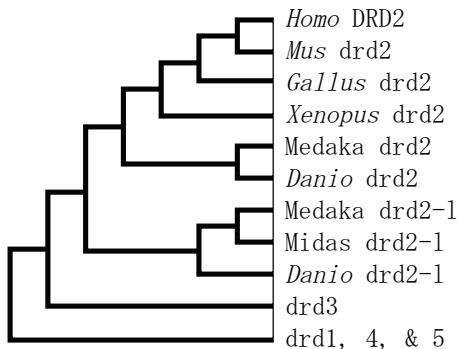


図3. 脊椎動物におけるドーパミン受容体の系統関係の概略図。全ての分岐点は高いブートストラップ値 (90%以上) で支持された。

(3) *drd2-like* 遺伝子改変メダカの作出と表現型解析

メダカには幾つかの遺伝子操作法が確立されており、本研究では以下の3つの方法を用いて *drd2-like* 遺伝子を改変し、その個体影響を評価することとした。

① TILLING 法によるミスセンス変異体

Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) 法は、メダカで最初に導入された遺伝子破壊法である。無数の塩基置

換を起こした凍結精子ライブラリから、目的遺伝子のミスセンス変異あるいはナンセンス変異を持つものを選別し、人工授精を行って系統化する手法である。本研究では *drd2-like* の exon 1, 2, 4 を対象にスクリーニングを行ったところ、25 の凍結精子に塩基置換を同定したが、その内訳はナンセンス変異が 0、ミスセンス変異が 7、サイレント変異が 18 であった。そこで、ミスセンス変異のうち、比較的アミノ酸が保存されているもの3つを選んで系統化を行った (本稿ではそれぞれ T221C, C294T, G337T と呼ぶ)。なお、目的以外の突然変異をゲノムから取り除くため、それぞれ表現型解析を行う前に野生型系統へのアウトクロスを5世代繰り返した。

変異をヘテロで持つ個体同士を交配 (インクロス) すると、変異をホモで持つ個体が 1/4 の割合で得られるはずである。実際、孵化直後の稚魚の遺伝子型を調べると、野生型ホモ : ヘテロ : 変異型ホモが 1:2:1 の割合で得られた。しかし、成魚で同じ解析を行うと、C294T 系統では 23 匹中 0 匹、G337T 系統では 33 匹中 1 匹しか変異型ホモが得られず、これは統計学的に有意な偏りであった ($P < 0.05$, カイ二乗検定)。従って、*drd2-like* にミスセンス変異が導入されると、稚魚から成魚に成長する過程で、同腹子との生存競争を含む何らかの原因により死んでしまうらしかった。T221C に関しては 30 匹中 5 個体の変異型ホモが得られたため体色の比較を行ったが、遺伝子型間で有意な差は検出されなかった [図4]。T221C のミスセンス変異が *drd2-like* の機能を抑制していない可能性が示唆される。

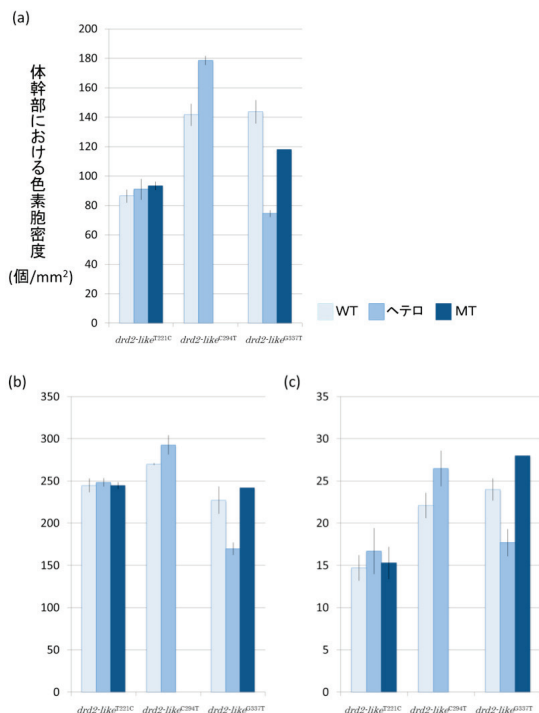


図4. TILLING 系統における皮膚組織中の黒 (a)・黄 (b)・白 (c) 色素胞密度 (平均値と標準誤差)。G337T 系統では変異型ホモが 1 個体しか得られていないため、実測値を示した。

② TALEN 法によるフレームシフト変異体

TILLING 法で得たミスセンス変異系統では *drd2-like* の機能を抑制する保証が得られないため（上記参照）、近年開発された transcription activator-like effector nucleases (TALEN) 法を用いた変異体の作出を行った。TALEN コンストラクトの設計・作成・受精卵への導入は京都大学の木下政人助教に行っていただき、変異がモザイクに導入されている G₀ 個体を 10 匹送っていただいた。これらを野生型と交配して F₁ を得たところ、全 101 匹中 79 個体が変異を有しており、TALEN が極めて効率よく変異を導入できる技術であることが確認出来た。欠失/挿入塩基数は 1~15 が主であるが、56 塩基欠失の変異も見つかった。また、2 種類の TALEN を導入することで、同時に 2 箇所に変異を導入することも確認した。

F₁ のうち、同一の変異を持つ個体同士を交配して得た F₂ を成魚まで育てたところ、24 匹中 6 匹が変異型のホモであり、これはメンデル遺伝で予想される個体数であった。すなわち、この 7 塩基欠失のフレームシフト変異体では *drd2-like* の機能は確実に抑制されているはずであるが、①の結果との整合性がとれなかった。この原因は不明であるが、今後他のフレームシフト系統を確立して結果の再現性を検証することが必要と思われる。なお、詳細な定量はまだ行っていないが、野生型と変異型の体色に大きな違いは見受けられなかった。

③ Microinjection 法による遺伝子組換え体

フラミンゴシクリッドのゴールド-ノーマル間に同定したアミノ酸置換が、機能に影響を及ぼすか否かを調べる為に、 β -actin のプロモーターの下流にゴールド（野生）型とノーマル（変異）型それぞれの *drd2-like* cDNA を連結したコンストラクトを作成した。これらを野生型メダカの受精卵に導入することで、*drd2-like* の過剰発現トランスジェニック系統を作出する。これらの表現型を比較するとともに、①、②で作出する突然変異系統と交配することで、表現型の回復を試みる計画である。

ゴールド型とノーマル型のコンストラクトを、それぞれ 2,070 個と 586 個の受精卵に導入したところ、11 匹と 4 匹の成魚が得られた。うち 2 個体ずつの生殖細胞にコンストラクトが導入されていることを確認し、トランスジェニック系統として確立した（図 5）。現在、これら 4 系統の F₁ を成育中である。

(4) 結論と今後の展望

フラミンゴシクリッドの自然集団における体色二型と生殖隔離の分子基盤を解明するという挑戦的なテーマを掲げて実験を行ってきた 3 年間であった。候補遺伝子を手し、突然変異と思しき塩基を同定するところまでは極めて順調に進んだが、候補遺伝子の

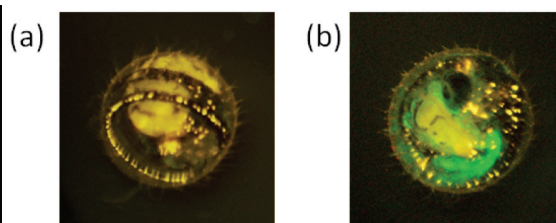


図 5. *drd2-like* 強制発現トランスジェニック系統。(a)野生型胚、(b)強制発現胚。導入したコンストラクトからのレポーターGFP の発現が確認出来る。

機能をメダカで実際に証明する段階で失速したことが否めない。この理由の一つとして、exon 1, 2, 4 を対象とした度重なるスクリーニングにもかかわらず、TILLING においてナンセンス変異が得られず、TALEN をやり直す必要に迫られたことが挙げられる。また、ゴールド形質の特殊性も挙げられるかもしれない。すなわち、現時点の作業仮説は「*drd2-like* の劣性突然変異体がノーマル」だが、これを再現する場合、*drd2-like* の破壊をゴールドのような体色変化を示すメダカ（生まれた時は黒く、成長するとオレンジ色になる金魚のようなメダカ）に対して行わなければならないのかもしれない。

本研究によって TILLING と TALEN による遺伝子破壊系統に加え、2 種類の *drd2-like* の強制発現 transgenic 系統を得ることができた。残念ながら本研究終了時までには *drd2-like* の機能を明らかにすることは出来なかったが、今後その機能を解析するにあたり、これらのメダカは有用なツールとなる。体色や配偶選択との関連のみにとどまらず、広範な表現型を比較すること、魚類手特異的なドーパミン受容体の役割を個体レベルで明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

Ayaka Ohshima, Noriko Morimura, Chizuru Matsumoto, Ami Hiraga, Ritsuko Komine, Tetsuaki Kimura, Kiyoshi Naruse, and Shoji Fukamachi, Effects of body-color mutations on vitality: an attempt to establish easy-to-breed see-through medaka strains by outcrossing, G3 (Bethesda)、査読有、Vol. 3, No. 9, 2013, pp1577-1585、DOI: 10.1534/g3.113.007575

〔学会発表〕（計 1 件）

本間茜、小峰律子、深町昌司、ドーパミン D2 様受容体ノックアウトメダカの作成、日本動物学会第 82 回大会

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深町昌司 (FUKAMACHI, Shoji)

日本女子大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：20323446

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし