

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770270

研究課題名（和文）タンガニイカ湖産シクリッドにおける生殖行動の多様化と精しょうタンパク質の進化

研究課題名（英文）Diversification of reproductive behavior and evolution of seminal plasma protein in Tanganyikan cichlids

研究代表者 守田 昌哉 (MORITA MASAYA)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授

研究者番号：80535302

研究成果の概要（和文）：

カワズメ科魚類(以下シクリッド)の精液中には精しょう糖タンパク質 SPP120 が存在し、このタンパク質はシクリッドに特徴的な口内受精行動において受精成功に寄与するタンパク質と考えられる。一方で、タンガニイカ湖に生息するシクリッドには口内受精行動を示さない種が多くいる。本研究課題では、受精行動の変化と SPP120 の分子進化率の関係性を検討した。その結果、数ある口内受精行動を示さない種の多くでは、複数のコドンの正の選択が明らかとなった。以上の結果は、行動の変化が受精成功に関わる遺伝子の進化に影響を及ぼしたことを示すものである。

研究成果の概要（英文）：

Cichlids in Lake Tanganyika are endemic and show diversified reproductive behavior. Seminal plasma protein 120 (SPP120) is predicted to immobilize and aggregate sperm. Cichlids show unique spawning behavior, “oral fertilization”. Sequence of oral fertilization behavior is as follows; 1) male sends sperm to female mouth, 2) female spawns eggs and picks up to female mouth, 3) fertilization occurs. SPP120 may facilitate to send sperm to female mouth, and immobilize until spawning eggs. On the other hand, many cichlids in Lake Tanganyika do not show oral fertilization. In these species, quick sperm motility activation and diffusion of semen contribute fertilization success. Thus, SPP120 may not contribute fertilization success in these “non-oral fertilization species”. In other words, molecular evolution of SPP120 is related to diversification of spawning behavior, but relationship is still not obscure. In this project, I focused on following topics; 1) description of spawning behavior by underwater observation, 2) molecular analyses of *SPP120* by cDNA cloning and test of rate of molecular evolution (ω : rate of non-synonymous mutation/synonymous mutation). In underwater observation, cichlids that build spawning site by sand called “bower” did not send their sperm directly to female mouth but release sperm to the bower. Female spawned eggs at the bower, and fertilization is supposed to occur by pre-released sperm. In the bower-builders, semen should diffuse thus functional modification of SPP120 is predicted to be favored. To support this prediction, the rates of molecular evolution (ω) in several bower-builders are accelerated in these species. These results suggested that diversification of spawning behavior affect molecular evolution of *SPP120*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・進化生物学

キーワード：遺伝子進化

1. 研究開始当初の背景

タンガニカ湖産シクリッドは適応放散を経て短期間で非常に多様な形態行動を示す多様な種へと分化した。シクリッドの特徴として口内で受精を行う(口内受精)ことが報告されているが (e.g., Mrowka 1987; Grier 1995)、タンガニカ湖産シクリッドでは生殖行動が多様化した結果、口内受精が支持されないと推察される種が多い。シクリッドの精液に含まれる seminal plasma protein 120 (SPP120) という精しょう糖タンパク質は、精子を凝集させる役割を担っており、精子を雌の口内へ効率よく伝達する上で重要な役割を担っていると推察される (Mochida et al., 1999 & 2002)。この SPP120 は、タンガニカ湖産シクリッドの祖先にあたる *Oreochromis* 族で口内受精の出現したと同時に出現した遺伝子であると考えられている (Gerrald & Mayer, 2007)。SPP120 は多くの糖鎖付加サイトを持ち、凝集する役割を担う Von Willbrand type D domain (VWD domain)、C8 domain、Zona pellucida domain (ZP domain) を持つ (Mochida et al., 2002)。口内受精を行う種では、SPP120 は受精の成功率へ寄与するであろうが、口内受精を行わない種では、SPP120 は受精を抑制してしまう可能性もある。従って、上記の口内受精と同じくして、産卵行動に適した *SP120* が選択されてきた可能性がある。例えば、タンガニカ湖産シクリッドにのみ見られる基質産卵魚は、多くの場合、強い精子競争にさらされることが多く、射出された精液が拡散し、卵へ到達することが受精獲得に繋がると予想されるためである。このように産卵行動の多様化が精しょう糖タンパク質 SPP120 の進化に与える影響は強いと推察されるが、全く研究されてこなかった。

2. 研究の目的

精液に含まれる精しょう糖タンパク質は、受精の調節や免疫反応等様々な役割を担っている。多くの精しょう糖タンパク質で配偶行動と適応進化の関係性が論じられている。しかし、比較が科レベル以上であるために、行動の多様化と精しょう糖タンパク質の適応進化の関係性は不明である。本研究課題で

は、適応放散をへて短期間で多様な生殖行動を示すタンガニカ湖産カワズメ科魚類を研究対象に、受精に深く関与する精しょう糖タンパク質の分子進化と生殖行動の多様化との関係性を、1)産卵行動の詳細な観察による受精行動の記載、2)コード配列の進化率(dN/dS 比 = ω 値)に対する生殖行動の多様化が影響を与えたかを検証し、考察した。

3. 研究の方法

本研究課題では、野外での行動観察による行動の変化の詳細な記載と、その行動の多様化に伴う配偶子形質およびその他の形質への副産物的な影響を遺伝子進化の視点から以下のような方法で行った。1) 野外での産卵行動の観察、2) 現地でのサンプルの採集、3) 様々な種から *SPP120* の単離する、4) 最尤法を用いた *SPP120* の進化速度と生殖行動の関係性、を行い、行動と配偶子の進化の関係性を論じた。

4. 研究成果

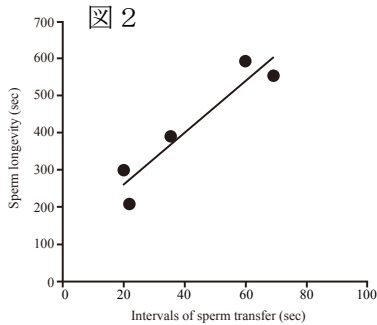
1) 野外での産卵行動の観察

本研究課題では、①口内受精を行うと推察されている尻びれにエッグスポットなる構造を持つ種(以下 Eg 種)、②口内受精行動を示さないと推察されるエッグスポットを持たない Bower と呼ばれる産卵床を作成する種(以下 BbNEg 種)、③エッグスポットを持ちながら Bower を作成する種(以下 BbEg 種)、④岩や貝などの基質に産卵をする種(以下 Sb 種)の4 カテゴリーに分けて合計 9 種の産卵



図 1

行動の観察に成功した。①Eg 種では 4 種 (*Interochromis loocki*、*Ctenochromis horei*、*Petrochromis fasciolatus*、*Ophthalmotilapia ventralis*) の行動を観察した。これらの種では *O. ventralis* を除き、統一的な産卵行動が見られた。まず a) 雄が尻鰭のエッグスポットを激しく揺らし、雌を近くに呼び寄せ、精子を渡し(図 1)、b) 雄が雌の生殖口を刺激し産卵を誘起する、c) 雌が卵を産み、直ちに口にくわえる、を繰り返すものであった。ただし、a) ~b) の精子の受け渡しから産卵までのシークエンスの



長さは種によって異なっており、興味深いことに、このシークエンスの長ささと精子の運動時間は正の相関を示した(図 2)。これは、精子の受け渡し時間の長時間化が、精子の寿命の延長に関係したことを示唆するものであった。② BbNEg 種では、2 種の産卵行動 (*Cyathopharynx furcifer*、*Cyathopharynx foai*)、1 種 (*Cunningtonia longiventralis*) の求愛行動を観察した。この種では、a) 雄が尾鰭を激しく振り雌を Bower へ呼び込む、b) 雄は bower へ呼び込む際に、精子を放出する、c) 雌が bower へ入り産卵する-この際、雄は卵近くへ

生殖口を近づけない(図 3)。a) の直後にシリンジを用いて bower 内の水を採取し顕微鏡で観察した所、精子が発見されたこと、c) 雄が産卵した卵近くに生殖口を近づけないこと(図 3) などから、雄は産卵前に

精子を放出し、雌はこの bower 内に存在する精子を利用して卵を受精させていると考えられた。また、産卵前に精子を放出すること、産卵が長時間にわたることが影響してか BbNEg 種の精子の運動時間は長かった。③ BbEg 種では、1 種 (*Callochromis macrops*) の産卵行動、一種 (*Ophthalmotilapia nasuta*) の求愛行動を観察した。この 2 種は①Eg 種と同様に、尻鰭もしくは腹鰭に存在するエッグスポットもしくはエッグダミーを求愛に用いていた。一方で、bower を作成することから、この bower 内に精子を放出し、その精子を利用して雌は受精させているようであった。実際、②BbNEg 種と同様に bower 内には精子が存在していた。このことから、BbEg 種も口内受精ではない可能性がある。④Sb 種では一種 (*Boulengerochromis microlepis*) の産卵を観察した。この種では a) 雌が岩もしくは

砂利の上に卵を産み、b) 雄が産みつけられた卵の上に放精し受精する、と考えられた。従って、Sb 種において、口内受精行動は支持されないと考えられた。以上まとめると、1) Eg 種以外は口内受精行動を示さない、2) 口内受精行動以外では、精子は素早く拡散し鞭毛運動を開始することが望ましい、ことが考えられた。

2) 現地でのサンプル採集
タンガニカ湖で、およそ 40 種の種を採集し、精巣を摘出後 RNA later 液にて精巣を保存し、一部を 3) の cDNA クローニングに利用した。

3) SPP120 の cDNA クローニング

採集によって採取されたうち 20 種の精巣から RNA を単離し、SPP120 の cDNA クローニングを行った。NJ 法により系統樹を作成すると、祖先種と推察される *Oreochromis* 族より分化している過程でコピー数が増加し、4 つのクレードにわかれたと考えられた(図 4)。またそれぞれのクレード内には同じ受精行動を示すものが多かった。口内受精行動を示す Eg 種の遺伝子は偽遺伝子化していなかった(緑)。それに対して、口内受精行動を示さない BbNEg 種と BbEg 種(黄色)では、多くのコピーが偽遺伝子化していた(図 4)。

3) SPP120 の cDNA クローニング

これは、1) の行動観察から推察されてように、BbNEg 種および BbEg 種では SPP120 は受精成功に寄与しないために、遺伝子の機能の抑制が支持されたためではないかと考えられた。一方で、口内受精行動を示さない Sb



図 3

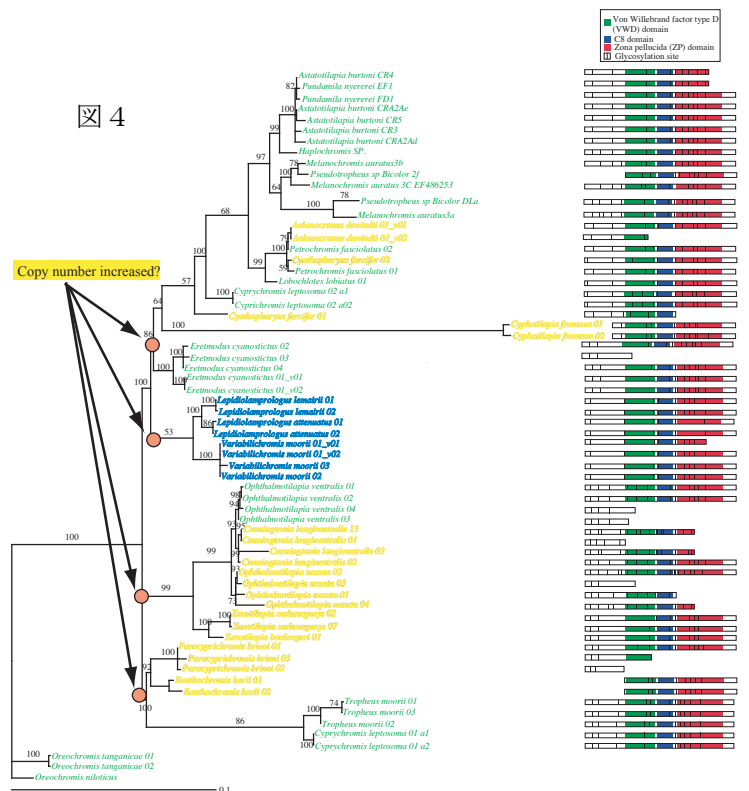


図 4

種(青)では、多くのコピーは偽遺伝子化していなかった。しかしながら、RT-PCR による *SPP120* の mRNA 発現を確認すると、Sb 種では殆ど発現しておらず、さらに抗 *SPP120* 抗体によるイムノブロット解析でも Sb 種では *SPP120* が存在しないことも判明した。以上のことから、1) タンガニカ湖産シクリッドの分化過程で *SPP120* のコピー数が増え、2) 増えたコピーのうち受精行動に適したものがそれぞれの行動を示す種で選択された、3) 口内受精行動を示さない BbNEg 種および BbEg 種では、多くのコピーが偽遺伝子化した、と考えられた。

4) *SPP120* の分子進化と行動の関係性

行動の多様化が *SPP120* の遺伝子の進化と関係があるか非同義置換率/同義置換率 (ω) を指標に検定を行った。まず、行動の多様化が種分化の過程(適応放散の過程)で起きたのであれば、その多様化は非常に短期間に起きたと推察され、当然 *SPP120* も同様に短期間で機能が多様化したと考えられる。言い換えると、*SPP120* の分子進化率は 1 以上の正の選択を受けたと推察される。実際、タンガニカ湖産シクリッドより後に分化したシクリッドの *SPP120* は正の選択が支持される遺伝子であることが判明していた(Gerrald & Mayer 2007)。タンガニカ湖産シクリッドから単離された遺伝子のうち機能遺伝子のみを選択し、正の選択が支持されるか PAML を用いて検討したところ、正の選択が支持された。次に、行動の多様化と分子進化率の加速の関係性を調べた。3) で述べた過程でコピー数が上昇し、それぞれのコピーは同じ受精行動を示す種でクレードを形成していた。そこで、コピー数が上昇した際に、口内受精行動が変化した種で分子進化率(ω)が加速したか検討した。その結果、BbNEg 種および BbEg 種が属するクレードの枝は他の背景樹より

も進化率が早いことが支持された(図5)。これは、1) 産卵行動において *SPP120* の機能変化が好まれる予測を支持するものであった。また、口内受精行動を示す Eg 種が多く含まれるクレード内に位置している BgNEg 種の枝は他の種の枝よりも進化率が高いことも判明した(図5)。以上のことから、受精行動の変化が、*SPP120* の分子進化率に影響を及ぼしたと推察出来た。今後、この進化がどのような機能変化を生み出したか、機能解析を行って行く予定である。

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 1 件)

Ota, K., Aibara, M., Morita, M., Awata, S., Hori, M and Kohda, M. Alternative reproductive tactics in the shell-brooding Lake Tanganyika cichlid *Neolamprologus brevis*. Int. J. Evol. Biol. 査読あり 10, (2012) doi:10.1155/2012/193235

[学会発表] (計 1 件)

守田昌哉 タンガニカ湖産シクリッドにおける配偶子形質の可塑性に関する研究 日本動物学会 第83回大会 2012年9月13日 大阪 豊中市 大阪大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

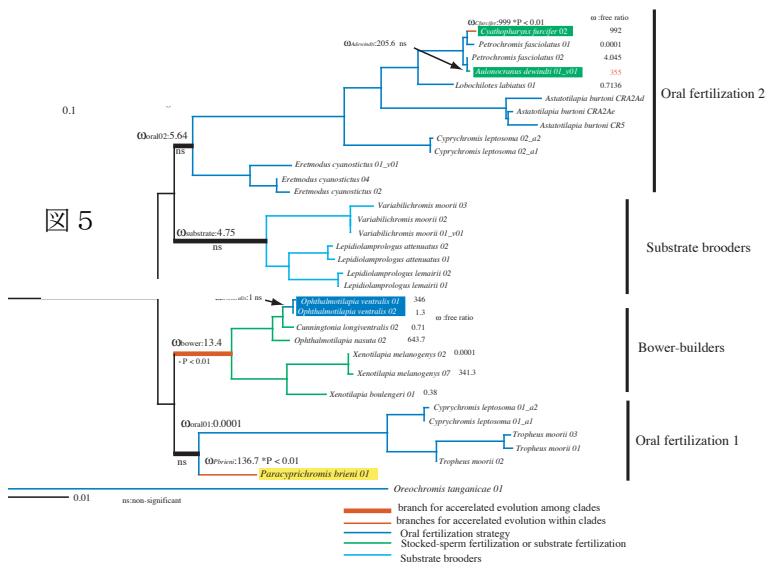


図 5

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

守田 昌哉 (MORITA MASAYA)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授

研究者番号：80535302

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：