

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06368

研究課題名(和文) フェロモン認識・受容機構の進化的変遷から探る魚類の繁殖行動の多様性と進化

研究課題名(英文) Diversity and evolution of reproductive behaviors in teleost fishes explored by the evolution of the pheromone recognition and perception mechanisms

研究代表者

橋口 康之 (Yasuyuki, Hashiguchi)

大阪医科薬科大学・医学部・講師

研究者番号：70436517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：プロスタグランジンF2a (PGF2a)は、多くの魚類で共通のフェロモンであり、異性の誘引に関与している。フェロモンとしてのPGF2a受容体であるOR114-1, OR114-2について魚類のゲノム配列を網羅的に調べたところ、OR114の起源、OR114-1とOR114-2の分岐時期(コイ目・カラシン目・ナマズ目の共通祖先)およびOR114-1, OR114-2の系統特異的な重複・消失などが明らかになった。またアブラボテ及びドジョウのドラフトゲノムを決定してOR114の多様性を調べた。アブラボテではin situ hybridizationによりOR114遺伝子の嗅上皮での発現を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、魚類のフェロモン受容体候補であるOR114の起源と進化を明らかにし、系統ごとの多様性を明らかにした。これらの結果は、魚類の繁殖形態の多様性に嗅覚・フェロモン認識が関与していることを示唆しており、魚類の繁殖行動の進化を理解する上での基礎的な知見となる。また、魚類の比較ゲノミクスにおける基礎的なデータを提供するものである。また、本研究で得られたこれらの基礎的な知見は、個体数の減少や絶滅が危惧される魚類の保全において、遺伝的多様性を維持すべきゲノム領域の同定や、個体数の回復につながる保全方策の決定などへの応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Prostaglandin F2a (PGF2a) is a fish pheromone that is involved in the attraction of mates, and commonly used in many teleost species. Surveys of the genes coding for PGF2a receptor (OR114) in teleost fish genomes showed that 35 teleost species possessed one or more OR114 genes in their genomes. Evolutionary analysis of OR114 genes indicated that 1) OR114 originated from the common ancestor of Osteriophysii and Osteoglossomorpha, 2) OR114-1 and OR114-2 have diverged in the common ancestor of Cypriniformes, Siluriformes, and Characiformes, and 3) lineage-specific duplications and losses of OR114-1 and/or OR114-2 have occurred repeatedly in these lineages. In bitterling (*Tanakia limbata*) and weather loach (*Misgurnus anguillicaudatus*), repertoires of OR114 genes were identified by sequencing their draft genomes. In bitterling, the expressions of OR114 genes in the olfactory epithelium were confirmed by in situ hybridization.

研究分野：進化生物学

キーワード：分子進化 ゲノム 嗅覚 フェロモン 魚類

### 1. 研究開始当初の背景

一部の魚類では、体内で分泌されホルモンとして働く物質が、体外に放出されてフェロモンとしても機能する例がいくつか知られており、このような物質は「ホルモナルフェロモン」と呼ばれる。Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>)は、魚類ではメスの排卵に関わるホルモンであるが、一部の魚種ではオスに対する誘引作用を示すホルモナルフェロモンであり、コイ科・サケ科の複数種でその効果が知られている。

図1は代表的な魚類について、PGF<sub>2α</sub>のフェロモン効果及びPGF<sub>2α</sub>受容体の有無を表にまとめたものである。ホルモンとしてのPGF<sub>2α</sub>受容体FPは基本的にすべての種に存在するが、フェロモンとしてのPGF<sub>2α</sub>の受容体であるOR114は、PGF<sub>2α</sub>をフェロモンとして用いる種とそれらの近縁種のみが存在する。つまり、魚類ではPGF<sub>2α</sub>をフェロモンとして使う性質が一度進化した後、一部の種では失われたこと、またOR114はそのことに対応して出現・消失したことが推測される。このPGF<sub>2α</sub>とOR114の対応関係は、魚類の嗅覚と繁殖行動の進化を理解する上で興味深い系であると考えられる。

しかし、PGF<sub>2α</sub>が実際にフェロモンとして機能している魚種、およびOR114の起源及び魚類の系統ごとでの機能の違いについては、不明な点も多い。

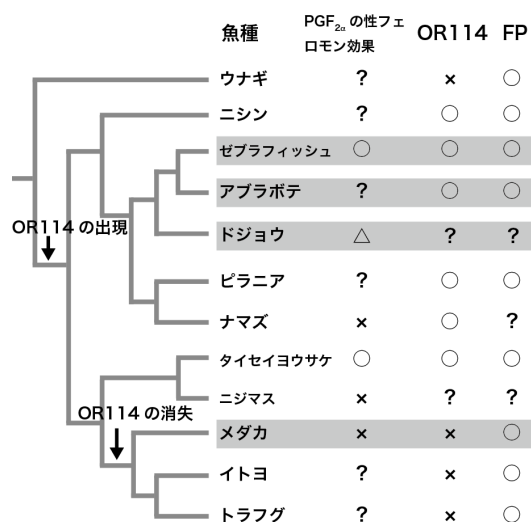


図1. PGF<sub>2α</sub>のフェロモン効果、OR114及びFP遺伝子の有無(2018年時点での情報を元に作成)。

### 2. 研究の目的

本研究では、OR114の魚類における出現・消失過程を分子進化学的な方法で再構成し、同時に複数の異なる魚種でのPGF<sub>2α</sub>に対する嗅覚応答の有無及び反応性を行動学的に明らかにする。これらの結果を魚類の系統樹上にマッピングし、魚類の進化過程におけるPGF<sub>2α</sub>の機能的変遷と、OR114の出現・消失との関連を考察したいと考えた。また、異なる系統に属する複数の魚種において、OR114遺伝子の嗅上皮における発現を細胞レベルで確認することも目的としている。具体的には、以下の2つのテーマについての解明を進めることを目指し、研究を行なった。

(1) PGF<sub>2α</sub>のフェロモンとしての機能は、魚類の進化の中でいつ・どのように生じたのか?

複数の魚種について、OR114の存在/非存在及び嗅上皮での発現を調べると同時に、PGF<sub>2α</sub>に対する嗅覚応答を行動学的に確認することで、魚類におけるフェロモンとしてのPGF<sub>2α</sub>の起源や機能的な変遷を明らかにする。

(2) 異なる繁殖様式を持つ魚種間では、PGF<sub>2α</sub>のフェロモンとしての機能に何らかの違いがあるのか? もしあるなら、それは何を反映しているのか?

異なる産卵行動を示す複数の魚類を比較することで、産卵行動の様式とPGF<sub>2α</sub>の機能との関連を探る。

### 3. 研究の方法

(1) 魚類におけるPGF<sub>2α</sub>受容体(OR114)遺伝子の網羅的な同定及び分子進化

魚類の系統全体のうち、OR114遺伝子を持つ種を同定するため、NCBI Genomeデータベースにドラフトゲノムが登録されている魚類137種について、OR114遺伝子の有無を調べた。これらの魚種のゲノム配列情報をダウンロードし、自身の作成したPerlスクリプトを用いてすべての嗅覚受容体(OR)遺伝子・偽遺伝子を同定し、TBLASTN検索を用いてOR114遺伝子・偽遺伝子の有無を確認した。また、アブラボテ(コイ科)およびドジョウ(B1系統)(ドジョウ科)の2種については、それらのドラフトゲノム配列を決定し、同様にOR114遺伝子の同定を行なった。得られた魚類のOR114遺伝子を用いて遺伝子系統解析を行い、OR114遺伝子の起源、2種類の受容体(OR114-1, OR114-2)の分岐時期、および系統ごとのOR114-1, OR114-2遺伝子の分子進化過程を解析した。

## (2) PGF2 $\alpha$ に対する反応性の行動実験による検証

OR114を持つ魚類のPGF2 $\alpha$ に対する反応性を調べるため、以下の方法で行動解析を行なった。実験にはアブラボテ（野生個体：京都府南丹市で採集）未成魚を用いた。小型水槽（縦 60 mm × 横 250 mm × 高さ 150 mm）に入れた実験個体を上面からビデオカメラで撮影しながら、PGF2 $\alpha$ のDMSO溶液（10<sup>-4</sup> M）を、ペリスタポンプを用いて水槽の右および左端に滴下し、個体の遊泳行動を撮影した。撮影した動画に基づいて、水槽の右及び左半分に滞在した時間をそれぞれ算出し、PGF2 $\alpha$ に対する個体の誘引・忌避を測定した。

## (3) OR114 遺伝子の嗅上皮における発現解析

解析を行う対象として、全く異なる繁殖様式を示す2種の淡水魚であるアブラボテとドジョウに着目し、嗅上皮でのOR114遺伝子の発現を調べた。2種について、採取した嗅上皮からtotal RNAを抽出し、以下の方法で遺伝子発現を調べた。

(i) RNA-seqによる発現量の定量：RNA-seqリードをHISAT2でドラフトゲノムにマッピングし、stringtie2を用いてマッピングされたリード数から遺伝子ごとのFPKM値を算出し、発現量を定量した。また複数の異なる組織（脳・ひげ・鰓・心臓・肝臓）由来のRNAについても同様にRNA-seqを行い、組織ごとに発現量を比較した。配列決定は100 bpのペアエンドで、サンプルあたり約5,000万リードの配列を決定した。

(ii) *In situ* hybridization: アブラボテのtotal RNAから、遺伝子特異的なプライマーを用いてOR114-1遺伝子の一つ（TL\_OR7）を増幅し、その配列を基にセンス及びアンチセンスプローブを作成した。アブラボテの嗅上皮組織切片を作成し、*in situ* hybridizationを行い、OR114-1遺伝子が発現する細胞を顕微鏡下で観察・撮影した。

## (4) 魚類の嗅覚関連遺伝子群の雌雄での発現比較

アブラボテ（京都府南丹市で採集）の性成熟した雌3個体、雄4個体の嗅上皮からtotal RNAを抽出し、RNA-seqを行なった。配列決定は100 bpのペアエンドで、サンプルあたり約5,000万リードの配列を決定した。各個体のRNA-seqリードをHISAT2でドラフトゲノムにマッピングし、stringtie2を用いてFPKM値を算出した。Rパッケージであるballgownを用いて、遺伝子ごとの発現量を雌雄で比較し、発現量に差のある遺伝子を同定した。

## 4. 研究成果

### (1) 魚類におけるPGF2 $\alpha$ 受容体遺伝子の分子進化

ドラフトゲノムが公開されている137種の魚類およびアブラボテ、ドジョウのゲノム配列を調査した結果、このうち36種においてOR114遺伝子または偽遺伝子の存在を確認することができた（図2）。これらの魚種の多くは骨鰓上目Ostariophysi（ニシン、ネスミギス、コイ、カラシン、デンキウナギの各目）に属していたが、アロワナ目やサケ目、キュウリウオ目に属する種も、OR114遺伝子を持っていた。遺伝子の系統解析から、OR114-1とOR114-2はコイ目・カラシン目・ナマズ目の共通祖先で生じた遺伝子重複に由来し、それら以外の系統では祖先的な配列のOR114遺伝子（偽遺伝子含む）を1-4種類持つことがわかった。カラシン目とナマズ目ではOR114-

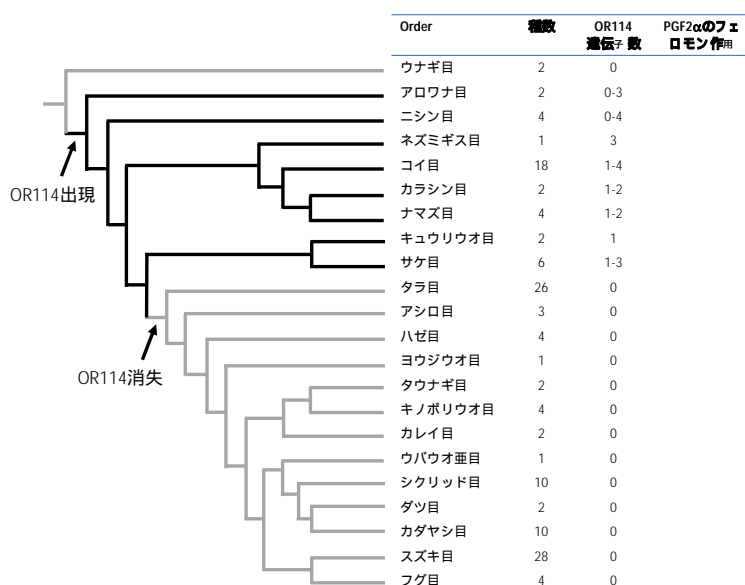


図2. 魚類137種におけるOR114遺伝子数と、魚類の系統進化との関係。

2 が二次的に消失しており、コイ目では種によって OR114-1, OR114-2 の遺伝子数は様々であった。なお本研究でドラフトゲノムを決定したコイ目の 2 種(アブラボテ・ドジョウ)では、アブラボテが OR114-1 のみを、ドジョウが OR114-1, OR114-2 をそれぞれ持っていた。

#### (2) PGF2 $\alpha$ に対する反応性の行動実験

小型水槽を上方から撮影しながら、PGF2 $\alpha$  の DMSO 溶液 (10<sup>-4</sup> M) を遠隔で滴下し、水槽内の魚の PGF2 $\alpha$  に対する誘引・忌避行動を観察する実験装置を作成し、アブラボテ(未成魚)を用いた予備実験を行なった。しかしながら、結果として有意な誘引・忌避反応はみられなかった。現状では、この実験において明確な結果を得られていないが、原因の一つとして実験に使用した個体が十分に成熟していないことが考えられた。そのため、飼育下で成熟させた雌雄を用いた行動実験を行うため、人工授精で作成したアブラボテを研究室で飼育・成熟させることを試みた。試行錯誤の結果、飼育条件下でアブラボテの雌雄を性成熟させることが可能となったので、今後はアブラボテが性成熟するのを待って、さらに実験を進める予定である。またドジョウでも同様の実験を行う計画である。

#### (3) 嗅上皮における OR114 遺伝子の発現

RNA-seq の結果、アブラボテ、ドジョウいずれの種でも OR114 遺伝子の嗅上皮での発現を確認することができた。ドジョウでは 2 種類の OR114 遺伝子のいずれも嗅上皮で特異的に発現し、調べた他の組織での発現はみられなかった。アブラボテでは、*in situ* hybridization の結果、OR114-1 遺伝子の嗅細胞での発現を確認することができた。OR114-1 遺伝子は、アブラボテ嗅上皮の全域の嗅細胞で広く発現していた。なお今後はドジョウでも *in situ* hybridization を行う予定であり、現在実験を進めている。

#### (4) アブラボテの嗅上皮で発現する遺伝子の雌雄間比較

RNA-seq データを用いた雌雄間の発現比較解析の結果、アブラボテ雌雄間で有意に発現の異なる遺伝子が 6 種類同定された ( $q$ -value < 0.1)。それらの遺伝子には、神経系や細胞骨格の形成に関わるタンパク質や転写因子、色素細胞の形成に関わる受容体などが含まれていた。

#### (5) まとめ

本研究により、魚類のフェロモン受容体候補である OR114 の起源と進化、非モデル魚類における嗅上皮での遺伝子発現などが明らかになった。PGF2 $\alpha$  のフェロモン物質としての普遍性と、OR114 遺伝子の進化との関係については、行動実験の結果がまだ得られていないために現状では議論が難しいが、実験系の確立はほぼ完了しているため、今後、行動実験をアブラボテとドジョウを含む複数の魚種で実施することにより、PGF2 $\alpha$  の作用と受容体との対応関係を明らかにし、魚類の多様な繁殖行動の進化の理解に繋げていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 橋口康之	4. 巻 53
2. 論文標題 二枚貝に産卵する魚：タナゴ類の多様性と進化．	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本の科学者	6. 最初と最後の頁 30-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima J, Hashiguchi Y	4. 巻 5162
2. 論文標題 A new species of the genus <i>Misgurnus</i> (Cypriniformes, Cobitidae) from Ryukyu Islands, Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zootaxa	6. 最初と最後の頁 525-540
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11646/ZOOTAXA.5162.5.4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hata H, Taniguchi R, Yamashita N, Hashiguchi Y, Nakajima J, Takeyama T	4. 巻 -
2. 論文標題 Genotyping of two congeneric bitterling fish species by nuclear SNP markers and the detection of hybridization in a sympatric region	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Ecological Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1440-1703.12387	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋口康之
2. 発表標題 硬骨魚類における嗅覚受容体遺伝子の多様性：生活史との関連に着目して．
3. 学会等名 日本進化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋口康之・井上順治・中島淳
2. 発表標題 魚類におけるフェロモン受容体OR114の起源と分子進化.
3. 学会等名 日本魚類学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋口康之・三品達平・武島弘彦・中山耕至・田上英明・竹下直彦・高橋 洋
2. 発表標題 アカメ <i>Lates japonicus</i> における高い遺伝的多様性を示すゲノム領域の探索
3. 学会等名 日本魚類学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋口康之・斉藤憲治
2. 発表標題 ゼニタナゴのドラフトゲノム決定及び食性関連遺伝子群の解析
3. 学会等名 日本魚類学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 橋口康之	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 718
3. 書名 味覚と嗅覚に関わる遺伝子 pp.458-459. 魚類学の百科事典(日本魚類学会編)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	善方 文太郎  (Zempo Buntaro)  (90758541)	大阪医科薬科大学・医学部・助教    (34401)	削除：2020年3月18日
研究分担者	井上 順治  (Junji Inoue)  (20814859)	大阪医科薬科大学・医学部・助教    (34401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関