

平成22年5月20日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19770209

研究課題名（和文） 地下生活への適応度合いによる視物質遺伝子の適応進化に関する研究

研究課題名（英文） Analyses of adaptive evolution of opsin genes in the family Talpidae

研究代表者

篠原 明男（SHINOHARA AKIO）

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・助教

研究者番号：50336294

研究成果の概要（和文）：本研究においては、地下への適応度が異なるモグラ科の視物質遺伝子の解析を行った。地下生活を行うコウベモグラと半地下生活を行うヒミズのオプシン遺伝子を同定した結果、オプシン遺伝子のエクソン領域内は高度に保存されている事が明らかになった。自然選択の検出を試みたところ、負の自然選択を検出した。以上の結果から、地下生活を行うモグラ科のオプシン遺伝子にはなんらかの機能的な役割があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this research, I determined the opsin gene sequences from two talpid species, true mole and shrew-mole that adopted to fully fossorial and semi-fossorial life styles, respectively. The results indicated that the family Talpidae maintained some functions in the opsin genes, because of the genes showed functional constraint.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,000,000 | 0 | 1,000,000 |
| 2008年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 660,000 | 3,860,000 |

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：遺伝子進化、適応進化、モグラ科、オプシン、地下生活、ヒミズ

1. 研究開始当初の背景

生物は異なる光の波長を感じる視細胞によって色覚を有している。視細胞には光を感じる視物質が存在し、視物質はオプシンとレチナールによって構成されている。脊椎動物においては大きく分けて5種類のオプシンが発見されており、色覚の差異はオ

プシン遺伝子によって左右されていることが明らかとなっている。脊椎動物のうち哺乳類は主に、赤緑型（M/LWS型）、青型（SWS-1型）および桿体型（RH-1型＝ロドプシン：明暗に対する反応）の3種類が発見されている。光のない環境で生活する哺乳類の光受容感覚器官は、一般的には形態学的

に退化していくことが知られている。しかしながら、近年になりメクラネズミのオプシン遺伝子の一部が機能しており光を感受しているという報告や、夜行性のコウモリにおいてSWS-1オプシン遺伝子が紫外線感受性として機能していると報告されるなど、盲目であると考えられてきた哺乳類の光受容感覚器官が、なんらかの機能を果たしている分子生物学的な証拠が明らかとなってきた。しかしながら、オプシン遺伝子が解析された哺乳類の種数は多くはなく、完全地下生活を行うモグラ類のオプシン遺伝子は解析されていない。

モグラ科は一般に知られている完全地下生活を行うモグラ類のみならず、地上と地下を行き来する半地中生活型のヒミズ類や、主に高山地域で地上生活を行うミミヒミズ類などの多様な生活スタイルで構成されている。これまでの申請者の研究により、モグラ科の進化は東アジア地域においては、地上生活型から半地中生活型を経て完全地下生活型へと徐々に適応してきたことが明らかとなっている。モグラ科は、地下に適応する過程において他の哺乳類では見られない様々な形態学的変化を遂げてきた。その結果獲得した形質としては、地下を掘るのに必要な前腕部の頑強化が最も顕著であるが、地下生活にとって不要な形質の遺棄（外耳の消失や尾部の矮小化）も特徴的である。当然ながら完全地下生活を行う上で視覚は不要となり、モグラにおいては眼球が形態学的に矮小化しているばかりか、眼球自体が薄い皮膚に覆われてしまっている。しかし、これまでの研究により眼球内には視細胞が存在していることが示されてきた。そこで本研究においては、地下への適応度が異なるモグラ科の視物質遺伝子を調べることによって、徐々に地下生活に適応してきた哺乳類の視物質遺伝子の適応進化の過程を明らかに出来るのではないかと考えた。

2. 研究の目的

光を必要としない環境に適応することによって、視物質遺伝子が自然選択圧から解放されて機能しなくなるのではないかという疑問から、洞窟に生息する魚類や夜行性哺乳類などで研究が行われてきた。しかしながら、これらの研究は対象動物の進化史が未だ明

らかにされていない種が多い。すなわち、その生物群の適応進化としての最終段階を明らかにしているだけであり、その対象動物の適応進化の変遷までは明らかに出来ていないのである。申請者は、これまでにモグラ科における分子系統学的研究を行ってきた。そして、モグラ類がアジア地域においては地上生活型から半地中生活型を経て、完全地下生活へと移行した進化史を明らかにしてきた。したがって本研究によって、異なる地下への適応度を持つ動物から視物質遺伝子が同定されたならば、適応進化の最終段階のみならず、その前段階の遺伝子の適応進化度を明らかにすることが出来る。そこで本研究は、完全な地下生活という生態学的に特異な環境に生息するモグラ類を用いるだけではなく、その進化の前段階である半地中生活型のヒミズ類と比較して、適応進化過程を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

モグラ科の異なる地下適応度を持つ種からオプシン遺伝子をクローニングし、生息環境によるオプシン遺伝子の適応進化を明らかにすることを目的としていることから、本研究課題においては、宮崎大学近郊でサンプル入手が可能である日本産モグラ類のうち、完全地下生活に適応しているコウベモグラ (*Mogera wogura*) および半地中生活を行うヒミズ (*Urotrichus talpoides*) を主な実験材料として研究を行った。モグラ類は地下生活という特異的な環境に適応したことによって、視覚に関連する遺伝子が自然選択圧から解放されて、オプシン遺伝子の発現を阻害するような突然変異が固定している可能性も考えられる。そこで本研究課題においては、DNAレベルでの解析を行った。まず、これまでに同定している哺乳類のオプシン遺伝子の配列をDNAデータベース上から取得し、特にイントロン領域も含めた遺伝子が登録されているヒト・マウス・ラットおよびマーモセットの遺伝子配列から、高次に保存されているエクソン領域にPCRプライマーを設計した。PCRプライマーは試行錯誤を繰り返しながら複数種類が作成され、妥当な長さが得られた増幅産物は、アガロースゲル電気泳動に用いたゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社) を用いて精製した。

精製したPCR産物は、pGEM-T Vectorおよび大腸菌株JM109 (DH5 α) High Efficiency コンピテントセル (Promega社) を用いてサブクローニングを行った。その後、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (ABI社) を用いてサイクルシーケンス反応を行なうことにより、抽出したインサートDNAに蛍光を標識し、オートシーケンサー (ABI PRISM 310, ABI社) を用いて塩基配列を決定した。得られた遺伝子の塩基配列から、適応進化の度合いを明らかにするために進化遺伝学的な解析を行い、自然選択圧の有無を確認すると共に、これまでの成果である分子系統樹と共に解析を行った。

4. 研究成果

地中生活型のコウベモグラおよび半地中生活型のヒミズの SWS-1 オプシン遺伝子を PCR クローニングし塩基配列を決定した。その結果、コウベモグラおよびヒミズの SWS-1 オプシン遺伝子は、DNA レベルにおいて得られた配列のエクソン領域 (コウベモグラ 932bp、ヒミズ 864bp) には、ストップコドン等は発見されなかった。その一方で、アミノ酸レベルにおいては 3.1% (9/288 個) の違いが観察され、DNA レベルにおいては 5.2% の変異が観察された。より長い配列を決定することの出来たコウベモグラ SWS-1 オプシン遺伝子と、DNA データベース上から取得したヒトおよびマウスの SWS-1 オプシン遺伝子の塩基配列を比較すると、アミノ酸レベルにおいて、それぞれ 10.0% および 8.7% の変異が検出された (表 1)。

| 塩基 アミノ酸 | モグラ | ヒミズ | マウス | ラット | ヒト |
|------------|------|------|------|------|------|
| モグラ | — | 5.4 | 12.7 | 13.9 | 11.0 |
| ヒミズ | 3.1 | — | 15.2 | 15.0 | 11.3 |
| マウス | 8.7 | 9.0 | — | 5.7 | 13.4 |
| ラット | 8.7 | 8.7 | 4.0 | — | 13.8 |
| ヒト | 10.7 | 10.8 | 11.3 | 10.7 | — |

表 1 : SWS オプシン遺伝子 (エクソン領域) の遺伝距離

地上生活を行う同じ分類群のマウスとラット間の変異が 5.7% 程度しかない (表 1) ことを考慮すると、地下生活型のコウベモグラと半地中生活型のヒミズのエクソン領域

は高度に保存されていると考えられた。したがって、地下適応度の異なるヒミズおよびコウベモグラの SWS-1 オプシン遺伝子が高次に保存されていることが示された。

次に、DNA データベース上に存在する様々な動物の SWS-1 オプシン遺伝子を用いて系統解析を行った (図 1)。

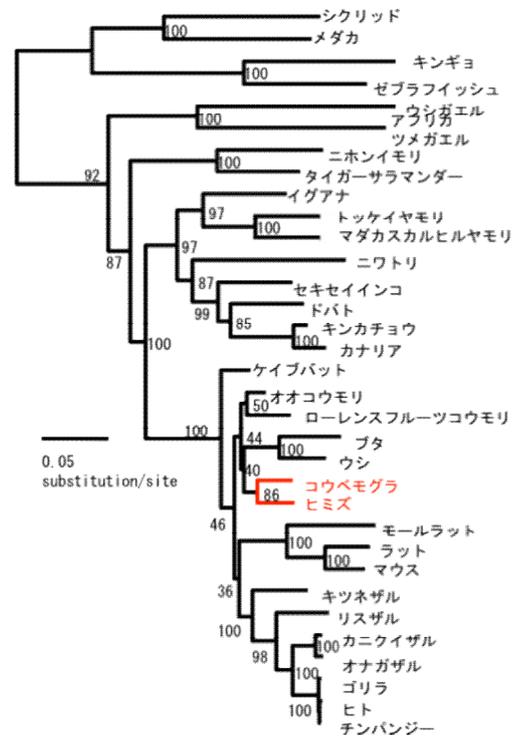


図 1 : SWS-1 オプシン遺伝子 (エクソン領域) の遺伝子系統樹 : 各ノードの数字はブートストラップ値を示す

その結果、コウベモグラとヒミズは高い支持率で単系統を形成し、進化的な位置も妥当であった。このことから、コウベモグラとヒミズの SWS-1 オプシン遺伝子のエクソン領域の進化に、地下適応による大きな変化があったとは考えにくいことが示された。

そこで、両種のオプシン遺伝子の進化的特性を明らかにするために、マウス、ラットおよびヒトのオプシン遺伝子と比較することによって自然選択 (d_N/d_S) の検出を試みた (表 2 および表 3)。その結果、 $d_N/d_S < 1.0$ (負の自然選択) が検出され、すなわちヒミズとコウベモグラのオプシン遺伝子には機能的な制約があることが示唆された。この結果から、半地下生活を行うヒミズ類から地下生活を行うモグラ類にいたる進化の過程において、オプシン遺伝子はなんらかの重要な機能

(例えば、サーカディアンリズムなど)を保持してきたことが明らかになった。

| d_N/d_S | モグラ | ヒミズ | マウス | ラット | ヒト |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| モグラ | — | 0.016 | 0.044 | 0.047 | 0.057 |
| ヒミズ | 0.180 | — | 0.045 | 0.045 | 0.055 |
| マウス | 0.444 | 0.588 | — | 0.019 | 0.058 |
| ラット | 0.508 | 0.586 | 0.182 | — | 0.060 |
| ヒト | 0.289 | 0.311 | 0.413 | 0.430 | — |

表2：SWS オプシン遺伝子 (エクソン領域)の進化速度の比較

| d_N/d_S p-value | モグラ | ヒミズ | マウス | ラット | ヒト |
|----------------------|-----|-------|-------|-------|-------|
| モグラ | — | 0.089 | 0.099 | 0.093 | 0.197 |
| ヒミズ | * | — | 0.077 | 0.077 | 0.177 |
| マウス | * | * | — | 0.104 | 0.140 |
| ラット | * | * | * | — | 0.140 |
| ヒト | * | * | * | * | — |

表3：SWS オプシン遺伝子 (エクソン領域)における自然選択の検出 (Z-test)

*P<0.05

今後の展望として、得られた塩基配列情報をより詳細に分析し、視物質タンパクの吸光度を推定することで、モグラ科の視物質遺伝子の進化の詳細がより明らかになると考えている。また、オプシン遺伝子の発現を、得られた塩基配列情報から RT-PCR 法を用いて眼のみならず脳において調べることで、視物質遺伝子の持つ機能についても情報を得られるかもしれない。これらの研究成果により、完全地下生活という暗所への適応における遺伝子の進化過程がより明らかになるであろう。

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4件)

- ① 篠原明男、日本のモグラはどこからきたか?モグラ科動物の分布の謎をとく、どうぶつと動物園、平成22年冬号 pp 20-23 (2010) 査読無
- ② A. Kashimura, K. Moteki, D. Hayashi, Y.

Shimoyokkaichi, A. Shinohara, T. Morita, K. Tsuchiya (2010) The mode of subterranean spatial utilization by the lesser Japanese mole, *Mogera imaizumii* (Kuroda, 1957), *Japanese Journal of Environmental Entomology and Zoology* (in press) 査読有

- ③ A. Shinohara, S. Kawada, M. Harada, K. Koyasu, S. Oda, and H. Suzuki (2008) Phylogenetic relationships of the short-faced mole, *Scaptochirus moschatus* (Mammalia: Eulipotyphla), among Eurasian fossorial moles, as inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences, *Mammal Study* **33**: 77-82 査読有

- ④ 篠原明男、モグラ科の進化史の復元、国立科学博物館ニュース 463: 6-7 (2007) 査読無

[学会発表] (計5件)

- ① 篠原明男、越本知大 (2009年11月) コウベモグラおよびヒミズのオプシン遺伝子の解析、日本哺乳類学会 2009年度台北大会、台湾大学 (台北市)
- ② 榎村敦、茂木邦人、篠原明男、土屋公幸、高橋俊浩、森田哲夫 (2008年11月) コウベモグラの地中利用様式、日本環境動物昆虫学会創立20周年記念大会、京都市
- ③ 茂木邦人、榎村敦、篠原明男、土屋公幸、高橋俊浩、森田哲夫 (2009年3月) コウベモグラ *Mogera wogura* の生物リズムに関する研究、第114回宮崎大学農学部獣医学科集談会、宮崎大学 (宮崎市)
- ④ 茂木邦人、榎村敦、篠原明男、土屋公幸、高橋俊浩、森田哲夫 (2008年9月) コウベモグラの活動・体温の概日リズムと光周期への同調、2008年度日本哺乳類学会山口大会、山口
- ⑤ 篠原明男、川田伸一郎、Nguyen Truong Son, Dang Ngoc Can, 遠藤秀紀、越本知大 (2007年9月) ベトナム産モグラの分子系統学的解析、2007年度日本哺乳類学会東京大会、東京

[図書] (計1件)

- ① 篠原明男、多様性と系統進化 (本川雅治編: 日本の哺乳類学 第一巻 小型哺乳類、

pp33-58)、東京大学出版会 (2008)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

アウトリーチ活動

- ① 篠原明男 (2009 年 6 月) モグラのきた道
-DNA からみた日本産モグラ科の系統進化、
モグラサミット 2009、一般公開シンポジウ
ム (モグラシンポジウム)、多摩動物公園
(東京都多摩市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 明男 (SHINOHARA AKIO)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合セン
ター・助教

研究者番号 : 50336294

(2) 研究分担者

なし