

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770210

研究課題名 (和文) 食性の進化

研究課題名 (英文) Evolution of host plant selection in *Drosophila*

研究代表者

松尾 隆嗣 (MATSUO TAKASHI)

首都大学東京・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：70301223

研究成果の概要：セイシエルショウジョウバエの食性決定にかかわる遺伝子として、匂い物質結合蛋白質をコードする二つの遺伝子 *Obp57d* 及び *Obp57e* を同定した。これらの遺伝子をノックアウトしたキイロショウジョウバエは産卵場所選択における嗜好性が変化していた。*Obp57d* と *Obp57e* はキイロショウジョウバエ種群において遺伝子重複により生じ、機能分化していることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

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：機能進化

## 1. 研究開始当初の背景

セイシエルショウジョウバエ *Drosophila sechellia* は形態的には *D. melanogaster*、*D. simulans*、*D. mauritiana* と酷似しており、また系統的には *D. simulans* と最も近縁（56万年前に分岐）であるにもかかわらず、その食性はこれら近縁種とはまったく異なっている。すなわち、*D. sechellia* は一般的なショウジョウバエの採集に用いられるバナナなどの果物トラップには見向きもせず、他のショウジョウバエが決して利用しない *Morinda citrifolia* (和名ヤエヤマアオキ) の成熟した果実のみを繁殖場所としているの

である。*M. citrifolia* の熟果は低分子脂肪酸であるヘキサン酸・オクタン酸を豊富に含むが、*D. melanogaster*、*D. simulans*、*D. mauritiana* のいずれもこれらの酸を忌避する。一方 *D. sechellia* はこれらの酸を忌避しないことから、*D. sechellia* において何らかの遺伝学的な変化が起こって食草に含まれる化合物に対する嗜好性が転換したと考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 食性の進化に関わる遺伝子の同定

昆虫の近縁種間で食性が異なる例は頻繁

に観察され、食性の進化が種分化の原動力になる可能性すら示唆されている。どのような遺伝子が、またいくつの遺伝子が食性の進化に関わっているのかを明らかにすることはその意味で非常に重要である。セイシェルショウジョウバエとキイロショウジョウバエとの交配からは、不妊ではあるが F1 世代を得ることができる。また、それぞれの種について全ゲノム配列が決定されている。これらの利点を生かして、セイシェルショウジョウバエの特異な食性の進化に関わった遺伝子を特定する。

## (2) 食性の進化に関わる遺伝子の進化様式の解明

ショウジョウバエの特長の一つとして、モデル生物として用いられるキイロショウジョウバエの近縁種が多数知られ、それらの間の系統関係がよく研究されているということが挙げられる。また、われわれの研究室ではこれらのキイロショウジョウバエ近縁種を多数飼育している。これらの利点を生かし、食性の進化にかかわる遺伝子をそれぞれの種からクローニングすることにより、食性の進化にかかわる遺伝子がどのように進化してきたか、どのような進化的メカニズムがそこに働いているのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 食性の進化に関わる遺伝子の同定

#### ① 古典的遺伝学による候補遺伝子座領域の決定

セイシェルショウジョウバエとキイロショウジョウバエとの間の F1 雑種個体は、オクタン酸に対してキイロショウジョウバエ型の反応、すなわち忌避を示す。セイシェルショウジョウバエではオクタン酸の忌避に必要な原因遺伝子の機能喪失が起きていると予想し、セイシェルショウジョウバエとキイロショウジョウバエの部分的染色体欠失系統群との間で交配を行い、F1 個体の行動を観察する。原因遺伝子座を含む染色体領域を欠くキイロショウジョウバエ系統との間の F1 個体はセイシェルショウジョウバエ型の行動反応、すなわちオクタン酸に対する選好性を示すと期待される。このような部分的染色体欠失系統を発見することにより、原因遺伝子座が含まれる染色体領域を特定することができる。

#### ② ゲノム情報を利用した候補遺伝子座の絞り込み

キイロショウジョウバエとセイシェルショウジョウバエでは全ゲノム配列が決定されており、また特にキイロショウジョウバエでは染色体各部位と塩基配列との対応関係がきわめて高い確度で整理されている。これ

を利用し、原因遺伝子座を含む欠失系統における染色体断点を塩基レベルで決定する。この情報を元にゲノム地図と比較することにより、欠失染色体で失われている遺伝子、すなわち候補遺伝子が具体的に特定できる。

#### ③ 候補遺伝子座における突然変異体の作成と行動試験

キイロショウジョウバエでは遺伝子ターゲットングによる機能欠失突然変異体の作成が可能になっており、これを用いて候補遺伝子の機能を失った突然変異系統を作成する。この系統はセイシェルショウジョウバエ同様、オクタン酸に対する忌避を示さなくなっているはずであり、このことを行動試験によって確認する。

## (2) 食性の進化に関わる遺伝子の進化様式の解明

### ① 食性の進化に関わる遺伝子のキイロショウジョウバエ近縁種からのクローニング

食性の進化に関わる遺伝子座周辺のゲノム配列を決定する。その際、全ゲノム配列の決定された種を手掛かりとする。すなわち、対象遺伝子座周辺の他の遺伝子のうち、特に種間で保存性の高い部分に注目して PCR 用プライマーを設計する。系統学的にこれらの種に近い種では、同様に周辺遺伝子の構造が保存されていることを期待して、これら近縁種から精製したゲノム DNA をテンプレートに PCR によりゲノム配列を増幅し、塩基配列を決定する。

### ② 食性の進化に関わる遺伝子の進化様式の解析

クローニングした遺伝子の塩基配列を比較・解析することにより、食性の進化に関わる遺伝子自身がどのようなメカニズムに従って進化しているかを明らかにする。その際、ショウジョウバエ種間の系統関係に関する情報を最大限に活用する。

## 4. 研究成果

### (1) 食性の進化に関わる遺伝子の同定

雑種による行動実験から、原因遺伝子座を欠くと思われる欠失染色体系統を 2 つ、およびそのごく近傍に欠失を持ちながらも原因遺伝子座は保持していると思われる系統 1 つを得た。これらの欠失染色体の細胞遺伝学的な記載によれば原因遺伝子座の範囲として微小な染色体領域が限定されることになっていた。確認のため、直接塩基配列の決定を行うことにより欠失染色体の断点を決定することにした。ところがその結果、細胞遺伝学的な記載が誤りであることが判明し、原因遺伝子座を欠くと思われる二つの欠失染色体の間で共通に失われている染色体領域は

存在しないことが分かった。そこで注意深く欠失染色体の塩基配列を吟味した結果、染色体レベルでの欠失とは別に、ある遺伝子のORFに10塩基対の小さな欠失があることが分かった。この遺伝子は匂い物質結合蛋白質の一つをコードしている *Obp57e* であり、10塩基対の欠失によるフレームシフトで生じたストップコドンによりタンパクコード部分の3分の2が失われていた。匂い物質結合蛋白質は昆虫の化学感覚子に存在する分泌タンパクで、疎水性化合物の化学感覚受容において機能すると考えられている。オクタン酸も難溶性の化合物であることから、この *Obp57e* がセイショウジョウバエの特異的な食性の進化に関わっている可能性が高いと考えられた。

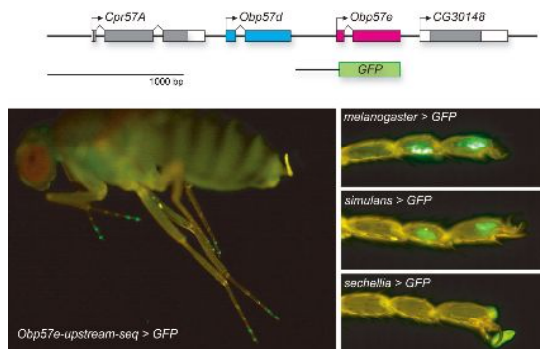


図1. GFP レポーターより可視化した *Obp57e* 遺伝子の発現様式

そこでキイロショウジョウバエにおける遺伝子ターゲティング技術により、*Obp57e* および隣接する *Obp57d* をノックアウトした突然変異系統を作成した。この突然変異系統のオクタン酸に対する行動反応を調べたところ、元のキイロショウジョウバエ野生型系統よりもオクタン酸を忌避しなくなっていたことから、これら2つのOBP遺伝子がオクタン酸の受容と忌避に関わっていることが確認された。

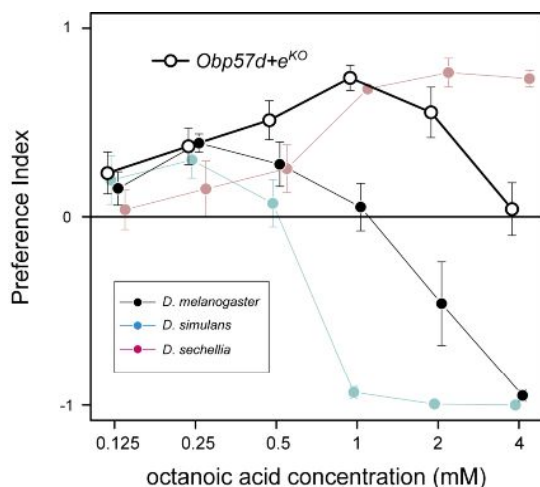


図2. OBP 突然変異系統のオクタン酸に対する反応

## (2) 食性の進化に関わる遺伝子の進化様式の解明

*Obp57d* と *Obp57e* の近傍にはハウスキーピング遺伝子と考えられる *Cpr57A* および *CG30145* が存在する。ゲノム配列が整備されたウスグロショウジョウバエにおいてもこれら遺伝子間の位置関係は保存されていた。そこで、キイロショウジョウバエとウスグロショウジョウバエのゲノム塩基配列を比較し、*Cpr57A* および *CG30145* において両種間で保存されている部分にPCRプライマーを設計した。このプライマーを用いて、系統的にウスグロショウジョウバエとキイロショウジョウバエの間に位置する25種から *Obp57d/e* ゲノム領域を増幅し、塩基配列を決定した。

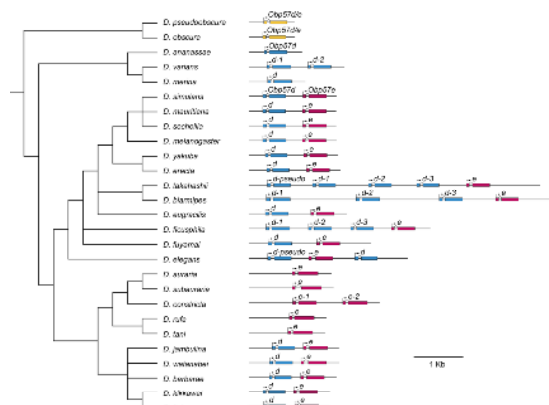


図3. 27種のショウジョウバエにおける *Obp57d/e* 遺伝子座の構造

この遺伝子座に存在するOBP遺伝子の数は種間で大きく異なっていた。アミノ酸配列の系統的解析により、これらの遺伝子は3つのグループに分けられることが示された。種間の系統関係と照らし合わせると、この遺伝子座におけるOBP遺伝子の進化の過程として次のようなシナリオが示唆された。すなわち、祖先種ではこの領域には一つのOBP遺伝子しか存在しなかったが、キイロショウジョウバエ種群の進化の初期に遺伝子重複により2つのOBP遺伝子が生じた。その直後にこの2つのOBP遺伝子は異なる構造に分化し、さらにその後特定の系統ではいずれかのOBP遺伝子を失っていることが分かった。また、構造の分化を伴わない遺伝子重複もいくつかの種で観察された。これらはヒトのゲノムなどで知られているコピーナンバーバリエーションに相当するものと考えられる。これらの構造分化を伴わない遺伝子コピーのうちいくつかはすでに偽遺伝子化していた。

*OBP57d* と *OBP57e* の間に機能的な違いが生じているかを調べるため、各アミノ酸サイトごとの進化速度を比較した。その結果、これら二つの遺伝子の間で大きく進化速度の異

なるサイトがいくつか存在することが分かった。サイト特異的進化速度解析ソフトウェア DIVERGE v2.0 により、全体として各アミノ酸サイトの進化にかかる機能的制約は OBP57d と OBP57e の間で有意に異なること、すなわちこの二つの遺伝子が機能的に分化していることが示された。

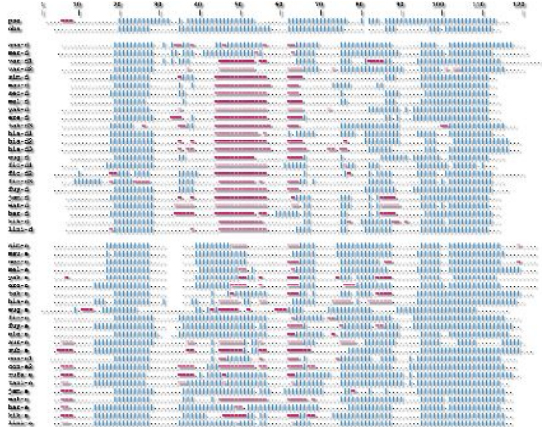


図4. OBP57dおよびOBP57eの2次構造予測

## 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6件)

- ① 松尾隆嗣 (2008) ショウジョウバエの食性の進化 細胞工学 27:1112-1117 (査読無)
- ② Matsuo, T. (2008) Rapid evolution of two odorant-binding protein genes, *Obp57d* and *Obp57e*, in the *Drosophila melanogaster* species group. *Genetics* 178:1061-1072 (査読有)
- ③ Harada, E., Haba, D., Aigaki, T., Matsuo, T. (2008) Behavioral analyses of mutants for two odorant-binding protein genes, *Obp57d* and *Obp57e*, in *Drosophila melanogaster*. *Genes Genet. Syst.* 83:257-264 (査読有)
- ④ Matsuo, T. (2008) Genes for host-plant selection in *Drosophila*. *J. Neurogenetics* 22:195-210 (査読無)
- ⑤ 松尾隆嗣 (2007) 匂い物質結合蛋白質と食性の進化 蛋白質 核酸 酵素 52:1980-1986 (査読無)
- ⑥ Matsuo, T., Sugaya, S., Yasukawa, J., Aigaki, T., Fuyama, Y. (2007) Odorant-Binding Proteins OBP57d and OBP57e Affect Taste Perception and

Host-Plant Preference in *Drosophila sechellia*. *PLoS Biology*. 5(5):e118 (査読有)

[学会発表] (計5件)

- ① 松尾隆嗣 (2008) ショウジョウバエにおける食性の進化. 第2回昆虫ゲノム研究会, 3月, 東京大学弥生講堂
- ② 松尾隆嗣 (2008) ショウジョウバエの味覚変異と食草転換. 日本進化学会 第10回東京大会, 8月, 東京大学駒場キャンパス
- ③ 松尾隆嗣 (2008) キイロショウジョウバエとその近縁種の味覚・嗅覚受容に関わる遺伝子群と食性の進化. 日本動物学会第79回大会, 9月, 福岡大学七隈キャンパス
- ④ Matsuo T. (2007) Genetic basis of host-plant preference in *Drosophila*. 4th Asia-Pacific conference on chemical ecology, September, Tsukuba
- ⑤ 松尾隆嗣 (2007) ショウジョウバエにおける匂い物質結合蛋白質の多様性と食性の進化. 遺伝研研究集会「多様化する生物多様性の遺伝情報」, 12月, 遺伝学研究所

[その他]

ホームページ等

<http://fly.biol.metro-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 隆嗣 (MATSUO TAKASHI)

首都大学東京・大学院理工学研究科・助教

研究者番号: 70301223