

機関番号：12608

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770076

研究課題名 (和文) シクリッドフェロモンとその受容体の同定

研究課題名 (英文) Identification pheromone and its receptor in cichlids

研究代表者

二階堂 雅人 (Nikaido Masato)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：70432010

研究成果の概要 (和文)：本研究において私はシクリッド V1R2 遺伝子において、大きく配列の異なる 2 つのアリル型を見出し、それらが東アフリカ産シクリッドの進化過程において、長期にわたって多型を維持してきたことを示した。また、これらの異なる 2 つのアリル型は、今からおよそ 900 万年前に強い正の淘汰圧を受けて分岐したことを進化統計学的な解析によって明らかにした。つまり、機能的な多型がシクリッド集団で維持されてきたことになり、これが東アフリカ三大湖における急速な多様化を可能にしたと予想される。

研究成果の概要 (英文)：I found a long standing polymorphism on protein encoding gene of haplochromines that may, in general, contribute to faster and dynamic diversification. In V1R2 receptor gene, two highly divergent allele groups, which were estimated to have diverged about 9 MYBP under the force of positive selection, are observed as polymorphism in Lake Victoria cichlids. In addition to V1R2 gene, functionally distinct polymorphisms on ecologically important genes and QTLs were likely to be existed in ancestral populations. Lineage sorting of such polymorphisms may have enabled the extremely rapid radiations and parallel evolutions of haplochromines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：シクリッド、V1R 受容体、進化、正の淘汰、多型維持

## 1. 研究開始当初の背景

シクリッドにおいては、体表が多様であることから、婚姻色が種の認知や維持に重要であることが予想され、視覚研究が主導的におこなわれてきており、実際、視覚を介した配偶者選択が行われていることを示唆する行動学的な実験や、視覚受容体遺伝子が光環境に適応して種毎に変化していることなどを明

らかにした研究も報告されている。その状況の中で、嗅覚に関してはあまり研究が進んでいない。しかしながら、水中で生活する魚類においては、化学物質を用いた嗅覚コミュニケーションは非常に有効な手段であることから、シクリッドにおいても何らかの重要な機能を果たしていると考えられるようになってきた。つまり、ウナギやサケにおいてよく

知られた母川回帰現象で代表されるような、鋭敏な嗅覚がシクリッドにも備わっており、それらが多様化に寄与しているのではないかと予想している。その状況の中で、いくつかのモデル魚種（ゼブラフィッシュ、トゲウオ、メダカ、フグ、ミドリフグなど）においてゲノム計画が進み、嗅覚受容体遺伝子群の全貌も明らかになってきたために、実際に DNA レベルで嗅覚研究を進められる状態となった。魚類嗅覚受容体には V1R 型、V2R 型、Taar 型、OR 型が存在することが分っており、V2R 型はアミノ酸、Taar 型は Trace Amine、OR 型はペプチドなどを受容すると予想されている。その中で、私は V1R 型受容体に着目した。魚類 V1R 型受容体は哺乳類における揮発性フェロモン受容体のホモログである。魚類においては、水中で不揮発性の化学物質を受容するはずである。そのリガンドは現在のところ明らかにされていないが、近年におけるいくつかの論文中で、V1R 受容体のリガンドはおそらく生殖行動を誘発するホルモナルフェロモンなのではないかと予想されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、東アフリカ産シクリッドにおいて生殖行動を引き起こす化学物質（フェロモン）とその受容体遺伝子を単離することであり、最終的にはそれが種の分化や多様化に関わっているか否かを明らかにすることである。近年の研究でシクリッドの成熟雌尿中に含まれる成分が、雄の攻撃性や雌追尾行動を誘発することが示されており、これはシクリッドにおいてもホルモナルフェロモンが存在する可能性を示唆している。そこで私はホルモナルフェロモンを受容する可能性が高いと予想されている V1R 型受容体に着目し、その進化を明らかにする。

## 3. 研究の方法

V1R 型受容体遺伝子は、2007 年の時点で計 6 コピー存在することがわかった。そこで、本研究では、V1R1~V1R6 遺伝子それぞれを、ビクトリア湖産シクリッドであるの BAC ライブラリーをスクリーニングして単離し、その配列に基づいて種間比較・進化解析をおこなった。進化解析には、MEGA, DNASP, TCS, PAUP, Phylml, Modeltest, Genetyx, MCMCcoal を用いた。また、特に着目している遺伝子 V1R1, V1R2 に関しては、シクリッド嗅上皮における *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現の確認や、遺伝子数の確認のためのサザンハイブリダイゼーションもおこなった。In situ やサザンハイブリダイゼーションのプロローブのラベリングには、Roche 社のラベリングミックスを使用した。本研究の実験に使用したビクトリア湖産シクリッドは 2004~2007

年の間、計 4 回に渡るビクトリア湖遠征によって収集してきたものである。それら以外のシクリッドはペットショップで流通しているもの、もしくは共同研究によって提供されたものを使用した。各筋肉組織、もしくはヒレ組織は 100%エタノール内に保存し、必要に応じて適時 QIAGEN 社の DNeasy tissue kit を用いて DNA 抽出をおこない、実験に使用した。

## 4. 研究成果

私はシクリッドにおいて性行動を誘発するホルモナルフェロモンの受容を担うことが予想されている V1R 受容体遺伝子群について、それらが進化にどのように寄与してかを明らかにすべく研究を進めてきた。本年度においては、6 コピー存在することが知られている V1R1 から V1R6 までの中でも特に、V1R2 アリルにおいて、ビクトリア湖産シクリッド内にて極めて配列の異なるアリルを発見した。ビクトリア湖産シクリッドは、今からおよそ 14000 年程度に放散した進化的には非常に新しいグループであることから、そのグループ内において遺伝的にかけ離れたアリルが存在することは、V1R2 遺伝子座において何らかの特別な自然選択が働くか、もしくは祖先集団が特別な構造を作っていたことが示唆される。そこで、ビクトリア湖だけでなく、マラウィ、タンガニカ湖のシクリッドも解析に加えたところ、興味深いことに、この大きく異なる 2 グループに分かれる V1R2 アリルは、東アフリカ三大湖全てで共有されていることが分った。つまり、このアリルの起源はもっとも古い放散イベントである 900 万年よりもさらに古いことが予想された。そこで、V1R2 のアリルの Gene genealogy を詳細に解析し、これらの分岐年代を推定するとともに、各分岐における祖先配列の推定をおこなった。その結果、今から 1000 万年ほど前に分岐したアリルであることが分り、さらには、祖先的アリルから派生的なアリルができる際に、非同義置換が 14 サイトであるのに対し、同義置換が 1 サイトにとどまり、 $\omega$  は 5.8 にもなることが分った。さらに PAML による two ratio test を用いて、V1R2 における派生型アリルができる際に、正の淘汰圧が働いたこと（この枝において  $\omega$  値が 1 を超えること）を進化統計学的に明らかにすることに成功した。また、正の淘汰によってできた新しいアリルと、既存の古いアリルが 1000 万年の間、維持されてきたこともわかった。つまり機能的に異なるアリルがシクリッドの祖先集団中に長期間維持されてきたことになる。この原因を探るために、我々はビクトリア湖、マラウィ湖、タンガニカ湖に生息するシクリッドの中立領域の 28 遺伝子座の配列を決定し、最尤法とベイズ法を用いてシク

リッドの分岐に伴う集団サイズの推定をおこなった。その結果、各湖の祖先となる集団の有効集団サイズが100万を超え、非常に大きかったことが予想された。また、その大きな祖先集団はいくつかの小集団に分かれていた可能性も示唆された。つまり、1000万年前に正の淘汰によって生じた機能的に異なるアリルが、非常に大きな祖先集団においてどちらか一方に固定することなく長期間維持され、それらが各湖に分配されたことで現在の三大湖産シクリッドにおいて高いV1R2の多様性が保持されているといえる。祖先集団中において多様性が維持される機構としては、大きな集団中に存在するそれぞれの小集団中に異なるアリルが固定し、湖に流入した小集団間で交雑を起こしながら放散したことがもっとも大きな要因となったのではないかと考えている。このようなMetapopulationにおいては、通常よりも古いアリルが集団中に維持される傾向にあることが過去の理論的な研究によっても予想されてきていた。

本研究で我々は、V1R2だけでなく、V1R1においても、Tropheini族のシクリッドの祖先集団において、非常に強い正の淘汰が働いたことも明らかにすることに成功した( $\omega$ 値は無限大で、PAMLによる統計学的なテストでも支持された)。おそらく、今回着目したV1R1,2遺伝子には、機能的に異なるアリルをもつ集団が分かれるような分断選択が働いたのではないかと予想される。今後の研究では、その機能的差異や分断選択が働いたか否かについて研究を進めることで、シクリッドにおける嗅覚を解した種もしくは集団分化のメカニズムを明らかにすることができるかも知れない。

#### 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5件)

- ① Mzighani SI, Nikaido M, Takeda M, Seehausen O, Budeba YL, Ngatunga BP, Katunzi EFB, Aibara M, Mizoiri S, Sato T, Tachida H, Okada N (2010) Genetic Variation and Demographic History of the Laparogramma Cichlid Species Group of Lake Victoria—An Analysis Based on SINES and Mitochondrial DNA. GENE 450:39-47. 査読有
- ② Akasaki T, Nikaido M, Nishihara H, Tsuchiya K, Segawa S, Okada N (2010) Characterization of a novel SINE superfamily from invertebrates: “Ceph-SINEs” from the genomes of Squids and Cuttlefish. GENE. 454:8-19. 査読有
- ③ Sugawara T, Imai H, Nikaido M, Imamoto Y, Okada N (2010) Vertebrate Rhodopsin Adaptation to Dim Light via Rapid Meta-II Intermediate Formation. Mol. Biol. Evol. 27:506-519. 査読有
- ④ Ohara H, Nikaido M, Date-Ito A, Mogi K, Okamura H, Okada N, Takeuchi Y, Mori Y, Hagino-Yamagishi K. (2009) Conserved repertoire of orthologous vomeronasal type 1 receptor genes in ruminant species. BMC Evol. Biol. 9:233. 査読有
- ⑤ Murata Y, Yonezawa T, Kihara I, Kashiwamura T, Sugihara Y, Nikaido M, Okada N, Endo H, Hasegawa M. (2009) Chronology of the extant African elephant species and case study of the species identification of the small African elephant with the molecular phylogenetic method. GENE 441:176-186. 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 鈴木彦有、二階堂雅人、山岸公子、岡田典弘「真骨魚類特異的ゲノム重複に伴う真骨魚類OMP遺伝子の重複と機能分化」第12回日本進化学会(2010年8月2日-5日、東京工業大学)
- ② 大田 朋槻、二階堂 雅人、山岸 公子、岡田 典弘「タンガニーカ湖産シクリッド・トロフェイニ族のV1R1 遺伝子における正の淘汰」第12回日本進化学会(2010年8月2日-5日、東京工業大学)
- ③ 齋藤曜平、二階堂雅人、大田朋槻、山岸公子、岡田典弘「東アフリカ産シクリッドにおけるV1R6 嗅覚受容体遺伝子の多型状態の解析」第12回日本進化学会(2010年8月2日-5日、東京工業大学)
- ④ 二階堂雅人、平田直、齋藤曜平、相原光人、溝入真治、Semvua I. Mzighani、山岸公子、岡田典弘「シクリッド集団中における長期間の多型維持とその後の分断選択」第12回日本進化学会(2010年8月2日-5日、東京工業大学)
- ⑤ Nikaido M, Okada N. Nose and Lip: Recent Progress in my Cichlid Research. Asia Africa Science Platform Program, Joint Meeting. (6th Oct. 2009, Yokohama, Japan)

⑥二階堂雅人、豊田敦、山岸公子、藤山秋佐夫、岡田典弘「シクリッドV2R型嗅覚受容遺伝子群の進化：lineage specific expansionの進化的役割は？」第11回日本進化学会（2009年9月2日-4日、北海道大学）

⑦平田直、二階堂雅人、山岸公子、岡田典弘「近縁種シクリッド間におけるV1R2 嗅覚受容体遺伝子の多型状態の解析」第11回日本進化学会（2009年9月2日-4日、北海道大学）

[その他]

ホームページ等

<http://www.evolution.bio.titech.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

二階堂 雅人 (Nikaido Masato)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：70432010