

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840130

研究課題名(和文) タンガニカ湖産シクリッドにおける精しょうタンパク質の分子進化

研究課題名(英文) Molecular 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：タンガニカ湖に生息するカワスズメ科魚類(以下シクリッド)は多様な生殖行動を示す。この多様な生殖行動に付随して、受精様式も変化した。この受精様式に適応するように精液に含まれる精しょうタンパク質SPP120は進化した。本課題において、受精行動を3つのタイプ(基質受精、口内受精、貯蓄受精)にクラス分けし、それぞれの受精様式におけるSPP120のコドンサイトでの正の選択の違い、SPP120の糖鎖の付加、SPP120の機能解析を行った結果、SPP120は精子の運動抑制および凝集化に寄与し糖鎖付加が起きていることが判明した。これは口内受精行動の出現に相関しているため、この様式に適した形質であると言える。

研究成果の概要(英文)：Tanganyikan cichlids show variety rich reproductive behavior and also distinctive fertilization manners. Those fertilization manners were categorized into 3 types, oral fertilization, substrate fertilization, and stocked-sperm fertilization. Among those manners, only oral fertilization manner favors aggregation and immobilization of sperm. The seminal plasma protein 120 named SPP120 is suggested to function as a immobilization and aggregation of sperm. In this project, I investigated the relationship between fertilization manners and evolution of SPP120 in terms of molecular sequence evolution and glycosylation. The expressed SPP120 immobilized sperm motility and aggregated sperm. Furthermore, glycosylation enhanced aggregation of sperm via increase in viscosity of semen and PGLS analyses suggested the evolutionary correlation with oral fertilization manner. Those results indicated that SPP120 evolved in response to the changes in fertilization manners.

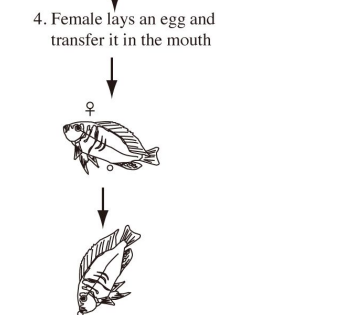
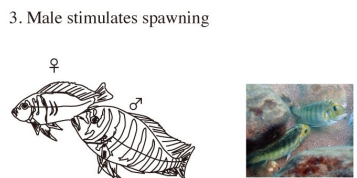
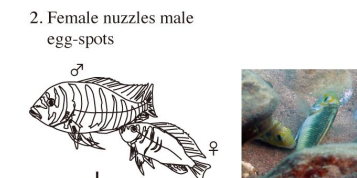
研究分野：生殖生物学

キーワード：受精 生殖行動 精しょうタンパク質 分子進化 精子競争

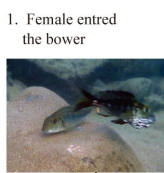
1. 研究開始当初の背景

カワスズメ科魚類は硬骨魚類の中でも種集が非常に多く、多様な形態そして生殖行動を示すことが知られている。中でもアフリカ3大湖のタンガニイカ湖には、およそ250種もの種が生息しており、多様な生殖行動を示す。この生殖行動を大まかに分類すると、1) 口内保育、2) 基質保護に分けられる。口内保育とは口内にて卵からハッチした幼魚になるまで保護するものである。それに対して、

a)



(b)



2. Female brings her mouth close the egg spot and male might release sperm on the bower



3. Female lays eggs



4. Female picks up the eggs



基質保護とは、岩や巻貝等の内部に卵を産みつけて保護するものである。この2つの保護を行う種の中なかでも口内保育を示す種は、保護法は同じでも精子と卵の受け渡し方に違いがある。この受け渡し方を分類すると a) 口内受精 (図 a)、b) 貯蓄型受精 (図

b)、そして c) 岩の上で受精させる基質受精に分けられる。なかでも口内受精行動はオスが精液を直接メスの口内へ受け渡す。メスは精液を受け取った後卵を放出し口の中へ運び、受精が起こる。従って、精液はメスの口内へ長く留まるほど受精成功は

高まると考えられる。それに対して、他の受精方法は卵に直接精液をかける、もしくは、産卵床に精液をあらかじめ放出し、貯蓄された精子を用いて受精していると考えられる。以上3つの方法の違いは、口内受精行動では精液の粘度は高い方がより受精成功が高まり、それ以外では精液は素早く拡散したほうが受精成功は高まると考えられる点である。

この受精方法の違いによって受精成功に関与する精液の性質も異なることが推察される。この違いを産み出すタンパク質として精しょうタンパク質 SPP120 が考えられる。この SPP120 は糖タンパク質であり、3つのドメインからなることが知られており、精子の運動抑制に関与しうる可能性を言及されていた。またこのタンパク質はシクリッドに特異的に存在しているタンパク質であり進化速度の速い遺伝子でもある。このタンパク質の進化と生殖行動の関係性は研究が全くなされていなかった。

2. 研究の目的

精液に含まれる精しょうタンパク質は、受精成功に関与すると推察されている。なかでもカワスズメ科魚類(以下シクリッド)に含まれる精しょう糖タンパク質は、シクリッドに特徴的な口内受精行動に適応するように、精液を凝集化し、精子の運動を抑制すると考えられている。さらに、この遺伝子は非常に進化率が高い事も知られており、配偶行動の変化に伴う受精様式の変化が特定のコードンの正の選択と関連している事も申請者の研究により明らかになりつつある。しかしながら、この変異がどのような機能変化を生み出すのかまでは検証されていない。本研究では、配偶行動の変化に伴う受精様式の変化が関連した正の選択が、どのような機能変異をもたらすのかを検証する事を目的とする。

3. 研究の方法

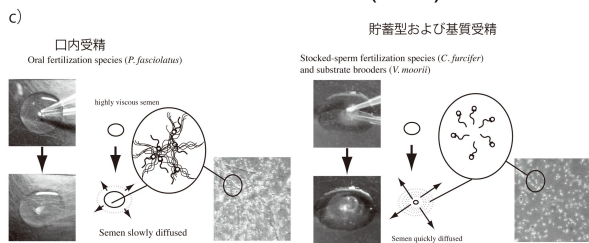
本研究課題では、野外での行動観察による行動の変化の詳細な記載と、その行動の多様化に伴って起きた変異がどのような機能変化を生み出したか、以下の方法で行う。

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) 発現ベクターを用いた SPP120 の機能解析 (pGEX, pCold ベクター使用)、4) 糖鎖付加の有無 (レクチンプロット)、5) 糖鎖付加と口内受精行動の進化的な相関関係解析 (BayesTraits 使用) を行い、行動と配偶子の進化の関係性を検討した。

4. 研究成果

野外での行動観察の結果、口内保育魚の受精様式は3タイプに分けられることが判明した。なかでも、産卵床(Bower)を作る種では、精液を産卵前に射出し、産卵床の中に貯蓄された精子を利用していることが判明した (Morita et al., 2014)。また、口内受精行

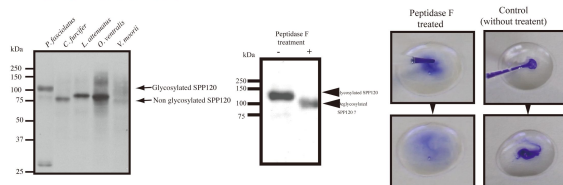
動を示す種ではオスが直接メスの口内へ受精させているようであった。これらの種の精液の粘度を調べた結果、口内受精行動を示す種では精液の粘度が高く、それに対して、基質受精および貯蓄型の受精を行う種では精液は希釈後素早く拡散した(図 C)。この粘度



精液の粘度が高く精子が凝集化している 精液の粘度が低く精子は凝集化していない

と SPP120 の関係を調べた所、粘度の高い精液では SPP120 に糖鎖付加がなされており、粘度の低い精液では糖鎖の付加がなされていなかった。この糖鎖付加と粘度の関係性を確認するために、口内受精を行うティラピアの精しょうを Peptidase F で糖鎖を除く処理を行った所、精液の粘度が著しく減少した。

d) 口内受精を行う種で糖鎖が付加した SPP120 が見られる e) 口内受精を行う tilapia の精しょうを Peptidase F 処理して糖鎖を除くと誠意液の粘度が下がる



精しょうに含まれるタンパク質で糖鎖が付加されているものは SPP120 だけであることから、糖鎖付加と精液の粘度は深く関係していることが判明した。そこで、SPP120 の糖鎖付加の有無を 4 3 種のタンガニカ湖産シクリッドで調べた結果、口内受精を示す種でのみ糖鎖付加が見られたが、それ以外の種では糖鎖付加が見られなかった。口内受精行動と糖鎖付加の進化的関係性を phylogenetic generalized least square 解析 (PGLS 解析) を R の Caper パッケージで調べた。その結果、口内受精行動と糖鎖付加は正の相関 ($P, 0.001$) を示し、 r の値が 1 であることから、口内受精が固定化したトロフェニー族で固定化したものと推察された。

SPP120 の機能を、発現タンパク質を用いて検討した。SPP120 の断片をそれぞれ調べた所、N 末端は精子の運動抑制を行う機能を担っており、vWD ドメインと C8 ドメインは SPP120 のポリマー化に関係していることが判明した。また、far-western 解析により SPP120 と精子が相互作用することも判明した。SPP120 の分子進化を PAML の Codeml で調べた所、正の選択を受けているコドンサイトが N 末端に多く見られること、貯蓄型受精の種で特異的に見られる正の選択を受けたサイトが N 末端と vWD ドメインであることが判明した。これらの箇所が SPP120 の機能に重要であると推察された。実際、vWD ドメインに点変異を加えると、精子の運動抑制に変化は見られなかつ

たが、精子の凝集が見られなくなった。これは、vWD ドメインが SPP120 のポリマー化に関与することから、このコドンサイトに変異を加えることで SPP120 がポリマー化せず、精子の運動抑制をした後、精子と相互作用した SPP120 がポリマー化していないために精子が凝集しないためであると推察された。

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 3 件)

Ota, K., Awata, S., Morita, M. and Kohda, M. (2014)

Sneak males are not necessarily similar to females in colour in a sexually monochromatic cichlid. *J. Zool.* 査読あり, 293巻, 2014年, 63-70

Ota, K., Awata, S., Morita, M., Yokoyama, R., and Kohda, M. (2014)

Territorial males can sire more offspring in nests with smaller doors in the cichlid *Lamprologus lemairii* *J. Hered.* 査読あり, 105巻, 2014年, 416-422.

Morita, M., Awata, S., Yorifuji, M., Ota, K., Kohda, M., and Ochi, H. Bower-building behaviour is associated with increased sperm longevity in Tanganyikan cichlids. *J. Evol. Biol.* 査読あり, 27 巻, 2014 年, 2629-2643.

〔学会発表〕(計 2 件)

守田昌哉 精しょうタンパク質 SPP120 と生殖行動の関係 第 8 4 回 日本動物学会 2013 年 9 月 2 7 日 岡山

Ugwu Stanley, 守田昌哉, 精しょう糖タンパク質 SPP120 の糖鎖と受精行動の関係 第 8 4 回 日本動物学会 2013 年 9 月 2 7 日 岡山

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔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：