

## 発生システムの多様化と進化の研究

◆岡田典弘

東京工業大学・大学院生命理工学研究科

### 〈研究の目的と進め方〉

東アフリカ大地溝帯に位置する三大湖、ヴィクトリア湖・マラウイ湖・タンガニカ湖にはそれぞれの湖に固有なシクリッド（カワスズメ科に属する魚類）が数百種も生息していることが知られ、その形態的・生態的な多様性は多くの生物学者から注目を浴びている。その多様性獲得の進化的道筋を分子レベルで明らかにすることは、まぎれもなく、我々ヒトを含めた地球上の生物群が如何にして現在の繁栄を築きあげてきたかという大きな疑問を謎解く一助となることは間違いないだろう。それら東アフリカ三大湖の中でも特にヴィクトリア湖は、一万数千年前に湖が完全に枯渇し、その後周辺河川から少数のシクリッドが流入、その子孫が現在の700種にもものぼる種多様性を誇るグループにまで爆発的な放散を遂げたと考えられている。つまり、ヴィクトリア湖に生息するシクリッドの莫大なる種多様性は、わずか一万数千年の間に獲得されたことになるのである。分子進化生物学的なスケールで考えると一万年と言うのは極めて短い期間であり、その短い間で蓄積されるDNAの変異は極めて少ないと予想される。したがってヴィクトリア湖産シクリッドのお互いのゲノム構造はほぼ均一だと考えられる。にもかかわらず、実際には形態的・生態的に非常に多様化したシクリッドが700種も存在するという事実が認められているのである。つまり、ほぼ均一なゲノムではあるが、それぞれの種間に内在する極めて少数のDNAの違いによってお互いの種が形成され、その状態が維持されているということになる。ということは、それぞれのシクリッド種内では固定し種間では違いのあるDNAレベルでの差を見出すことができれば、それがダイレクトに種形成や種レベルにおける形態的な違いへと還元できるのである。これが我々の研究室が世界的にもオリジナリティを発揮することのできる中心的な戦略でもあり、我々の研究は主にこのアイデアを中心に計画を立てられている。また研究室からヴィクトリア湖へ長期の調査隊を派遣し、その生態学的な観察やDNA実験に用いる膨大な量のサンプルを収集している。

我々がシクリッド研究をする上で注目すべき点は、湖の多様な環境に適応するための形態形質、もしくは種多様性を獲得・維持するための遺伝的機構などが挙げられる。以下に我々が重点をおく遺伝子群を列挙すると1. 同種における相互認知、様々な水環境への適応に必須なオプシン遺伝子群 2. 多様な資源を有効に活用するために必須な採餌器官「顎」の形態形成遺伝子 3. 種の分化・多様化の源ともいえる性選択に必須な体色模様に関連した遺伝子群、となっている。また我々はヴィクトリア湖産シクリッドの一種*Paralabidochromis chilotes*のBACライブラリーの構築にも成功しており、候補遺伝子の単離をしたり、機能解析をする際にこのライブラリーを使用する流れをとっている。

ヴィクトリア湖産シクリッドは世界的にもまだ研究が十分に進んでおらず、種の定義や生態的情報に乏しいのが現状である。それに対し、タンガニカ湖・マラウイ

湖のシクリッドは種の定義や生態的情報が豊富であり、主軸となるヴィクトリア湖産シクリッド研究の重要な基盤となりうる事が予想される。よって我々はヴィクトリア湖産シクリッドの進化的な比較対象として、さらには研究基盤として、タンガニカ湖およびマラウイ湖のシクリッドをもその研究対象として、研究を進めている。以上の流れをもち、最終的には生態的・形態的多様化の分子メカニズムの解明を目指す。

### 〈研究開始時の研究計画〉

研究開発時の計画として、我々は前項にある通り、大きく3つの枠にあてはまる標的遺伝子群を順次単離、比較解析していくことを基本的なスタンスとした。

標的遺伝子は、1. オプシン遺伝子群であるRH1、LWS 2. 形態形成遺伝子であるBMP2、BMP4、Dlx1、Dlx 2、Pax9、Otx1、Otx2、GDF5 3. 体表模様決定遺伝子と考えられるhagoromo、tyrosinase、endothelin receptor b1、mitf、Aim1である。研究が進展していくにあたり、1のオプシン関連遺伝子群に関しては、さらにSWS1、SWS2、RH2Aなども解析対象として付け加えられ、さらには配列比較だけでなくタンパク機能解析まで進められていくこととなった。

また候補遺伝子を絞っていく方法に加えて、DNAチップを用いた網羅的な発現解析をおこない、ヴィクトリア湖シクリッドの種間の差を産み出していると考えられるような遺伝子の探索をおこなうこととした。

さらには候補遺伝子の単離やその後の機能解析、さらには大規模なゲノム構造の探索に不可欠なBACライブラリーを、ヴィクトリア湖産シクリッドの一種*Paralabidochromis chilotes*に関して構築することとした。

### 〈研究期間の成果〉

#### 視覚関連遺伝子の多様化とシクリッドの多様化

##### RH1遺伝子

シクリッドは、様々な光環境に適応している。シクリッドの種の多様化、環境適応に関与した遺伝子を明らかにするため、視覚に関する遺伝子群に着目した。

視覚に関する遺伝子として、まずオプシン蛋白質の1種で、桿体視細胞で発現し、薄明視に関係しているRH1蛋白質遺伝子について、湖のシクリッドとその祖先系統にあたる河川のシクリッド合わせて数十種から配列を決定し、解析を行った。その結果、湖の系統において優位にアミノ酸の進化速度が上がっていることが明らかとなった。次にこれら進化速度の上昇の原因を調べるため、同義置換率と非同義置換率を用いてこれらの遺伝子が進化してきた過程を解析した。湖の系統において、RH1が正の選択（同義置換率<非同義置換率）を受けて進化し、シクリッドの種形成において重要な働きをしてきたことが明らかとなった。またこれらの遺伝子では、湖に生息しているシクリッドの進化の過程で、視物質の波長感受性の変化に関わると予想されるアミノ酸部位において繰り返し置換が起こっており、これは光環境への適応

の際にアミノ酸置換が収斂的に起こったためと考えられた。例えば、湖の深部に生息する数種で、吸収波長が短波長側に変化すると報告があるアミノ酸残基の置換が独立にそれぞれ起こっており、光環境が短波長側である深い水深の環境への適応により、このアミノ酸置換が起きたと考えられた(6)。

続いてシクリッドの多様化とシクリッドの視覚機能の多様化との関係を解明するため、RH 1 蛋白質遺伝子の比較解析をおこなった。まず、シクリッド56種、233個体からRH 1の配列を決定し、アミノ酸配列を比較した。また、アミノ酸配列の違いと波長感受性の関係を探るため、この中から典型的な配列を示す28種類のRH 1蛋白質を培養細胞系により発現し、レチナルと再構成することによりロドプシンの波長感受性をもとめた。(RH 1蛋白質とレチナルの結合により生成する視物質はロドプシンと呼ばれる。)

その結果、これらのロドプシンの最大吸収波長は、484 ± 1 nmから505 ± 1 nm間に分布していることがわかった。これまでの様々な脊椎動物のロドプシンの波長感受性の比較から、多くのロドプシンは500 nm前後に最大吸収波長を持つことが明らかにされている。28種類中8種類のロドプシンは、500 nmより10 nm以上短波長側に最大吸収波長がシフトしていた。波長感受性の短波長シフトの原因となっているアミノ酸残基を決定するため、アミノ酸残基を変異させたロドプシン変異体を構築し、その波長感受性を測定した。その結果、292番目のアミノ酸残基の置換により、実際に10 nm以上ロドプシンの吸収波長帯がシフトすることが明らかとなった。292番目のアミノ酸残基の重要性は、このアミノ酸残基が種内において固定していることから伺えた。短波長シフトが観察されたロドプシンをもつ種は、カワスズメ科魚類の中でも比較的、湖の深層に生息している(図1)。今回観察されたロドプシンの短波長シフトは、表層とは異なる湖の深層の光環境への適応であると考えられた。すなわち、深層では光量は深度と共に減少するが、短波長の光の減衰は他の波長に比べると少ないため、このような環境に適応したロドプシンが光を受容するという視細胞の機能面からは有利であると推定された。また、カワスズメ科魚類の系統関係から、このアミノ酸置換は進化の過程において繰り返し起こっていることがわかった。すなわち、カワスズメ科魚類の湖の深層への適応は、平行進化の結果起こったことが本研究から明らかとなった(図2、30)

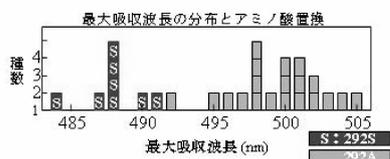


図1 最大吸収波長の分布

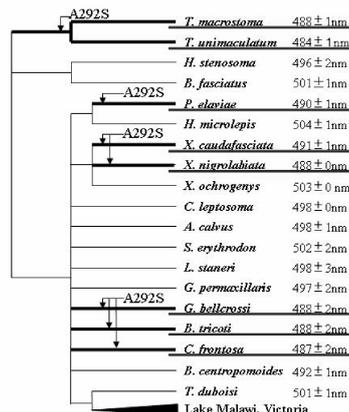


図2 カワスズメ科RH1遺伝子の系統樹と平行進化

ロドプシンの機能は連続する2つの側面に分けることができる。すなわちロドプシンの機能とはまず、1) 光受容、外界からの光を高感度で受容し、次に2) 光情報伝達、受容した光を効率よくGtに伝えることである。光情報伝達過程における種間の違いを調べるため、タンガニイカ湖の浅瀬に生息している*Altolamprologus calvus*と、マラウイ湖の深場に生息している*Diplotaxodon macrops*の2種間でロドプシンのMeta-II中間体の生成速度・崩壊速度を比較した。視物質の光反応過程の比較解析は、照射後のスペクトルの経時変化を分光光度計で測定することでおこなった。

光情報伝達過程の比較をするために以下の解析をおこなった。Meta-IIの生成過程を比較するために、0-1秒までの380 nmにおける吸光度の変化を時間でプロットした。吸光度は、ロドプシンの反応量で標準化した。A. calvus、D. macropsともにこの変化は2つの成分に分けられ、その早いほうの成分はMeta-IaからMeta-Ibへの変化、遅いほうの成分はMeta-IbからMeta-IIへの変化であると考えられた。2種間の時定数を比較すると、A. calvusはMeta-IaからMeta-Ibへの変化が40ミリ秒、Meta-IbからMeta-IIへの変化が250ミリ秒であり、D. macropsはMeta-IaからMeta-Ibへの変化が4ミリ秒、Meta-IbからMeta-IIへの変化が60ミリ秒となった。分光光度計の解像度が9.7ミリ秒であることを考えると、4ミリ秒という値は短すぎると考えられたため、D. macropsはMeta-IaからMeta-Ibへの変化は10ミリ秒以下とした。以上の結果から、Meta-IからMeta-IIへの過程は2種間で大きく異なると考えられた。また、1秒以降の380 nmにおける吸光度の経時変化に2種間で大きな違いが見られないことから、Meta-IとMeta-IIの平衡状態、Meta-IIの崩壊過程については、2種間でほぼ変わらないと考えられた。

シクリッド2種間の中間体の解析から、Meta-IIの生成速度においてD. macropsのロドプシンはA. calvusのロドプシンより速いことが示唆された。Meta-IIの生成速度は、視覚機能にどのような影響を与えるのか。桿体細胞の光応答の開始時における、活性化効率がその下流の細胞の光応答に重要であることを示唆している。本研究で見られたD. macropsのロドプシンがA. calvusのロドプシンよりもMeta-IIの生成が速いという結果は、D. macropsのロドプシンが光の少ないこの深層の光環境で効率よく光情報を増幅することを意味すると考えること

ができる。

シクリッドのロドプシンにおける中間体の性質の違いに関係しているアミノ酸残基として、83番目のアミノ酸残基に注目した。D. macropsのロドプシンの83番目のアミノ酸残基はアスパラギン、A. calvusのロドプシンの83番目のアミノ酸残基はアスパラギン酸である。この2種のMeta-II生成速度の差に関与しているアミノ酸として83番目のアミノ酸残基は、シクリッドで独立に起こっていることや、過去の研究結果から有力な候補であると考えられた。点変異を導入した解析によって、実際にどのアミノ酸残基が関わっているか解明されると期待される。このアミノ酸置換は、異なる湖において独立に起こっている。これら平行進化の発見から、シクリッドの多様化においては、少数の適応的なアミノ酸置換が繰り返し起こってきたことが考えられた。

#### 錐体視物質のオプシン蛋白質遺伝子

ヴィクトリア湖に生息しているシクリッド、*Paralabidochromis chilotes*において、錐体細胞で発現しているSWS1 (UV感受性)、SWS2A (青感受性)、SWS2B (青緑感受性)、RH2A・ (緑感受性)、RH2A・ (緑感受性)、RH2B (緑感受性)、LWS (赤感受性)、桿体細胞で発現しているRH1の8つのオプシン蛋白質遺伝子の配列を決定した。次に、SWS2A、SWS2B、RH2A・、RH1蛋白質を、哺乳類の培養細胞系により発現し、11-シス-レチナールと再構成することにより視物質を再生させ、波長感受性を測定した。結果、SWS2A、SWS2B、RH2A・、RH1の視物質の波長感受性は、それぞれ454 nm、421 nm、522 nm、501 nmとなった。測定した結果を、これまでに報告されているマラウイ湖に生息している3種のシクリッドにおける視物質の波長感受性と比較した。マラウイ湖におけるそれぞれの遺伝子に由来する視物質の最大吸収波長は、本研究で明らかとなった*Paralabidochromis chilotes*における相同遺伝子に由来する視物質の最大吸収波長とほぼ一致した。

脊椎動物の錐体細胞、桿体細胞に存在するオプシン蛋白質について、アミノ酸配列に従って系統的に解析すると、大きく分けて次の5つのグループに分けられる：L (LWS/MWS)、S (SWS1)、M1 (SWS2)、M2 (RH2)、ロドプシン (Rh、RH1)。それらの分類は、波長感受性とほぼ相関している。ロドプシンは、錐体視物質のひとつM2 (RH2) グループから進化したと考えられる。これらの遺伝子は、遺伝子重複と分化によりさらに多様性を増している。例えば、ゼブラフィッシュでは、L (LWS) が2遺伝子座、M2 (RH2) が4遺伝子座存在し、それぞれ波長感受性が異なる。また、哺乳類ではL (LWS/MWS)、S (SWS1) の2種類の錐体視物質遺伝子とRH1の1種類の桿体視物質遺伝子を持つが、霊長類においてL (LWS) が重複し、3種類の錐体視物質遺伝子を持つようになったことが報告されている。ヒトにおいては、L (LWS/MWS) が560nm、530nmに最大吸収波長を持つ2種類、S (SWS1) が440nmに最大吸収波長を持つ1種類存在している。カメレオンは、桿体を持っておらず、L (LWS)、S (SWS1)、M1 (SWS2)、M2 (RH2)、RH1を持ち、アフリカツメガエルは、L (LWS)、S (SWS1) を持つことが知られている。

オプシン蛋白質は、このように機能分化と重複を繰り返して機能を進化させてきたと考えられるが、シクリッドにおいては、遺伝子構成、波長感受性に関しては種間で大きく異なることがわかった。マラウイ湖のシクリッドにおいて、色覚における視覚の種間での多様化に

関しては、オプシン蛋白質そのものの機能ではなく、オプシン蛋白質の発現が種間で異なることによって色覚が調節されている可能性が示唆されている。本研究から、ヴィクトリア湖のシクリッドに関しても同様の波長感受性調節機構が考えられた。シクリッドにおける色覚の多様化を研究するに当たっては、オプシン蛋白質の発現機能の解明、オプシン蛋白質の上流配列の比較をおこない、これらオプシン蛋白質の発現様式を個体の発生段階、種間で比較解析をおこなうことが重要であると考えられた。

#### LWS遺伝子

光受容体のタンパク質成分であるオプシンの長波長領域に吸収帯をもつLWSがシクリッドの多様化にどのように関与してきたかを調べるために、ヴィクトリア湖、及びマラウイ湖のシクリッドからLWS遺伝子の配列の解析を行った。また短波長領域に吸収帯をもつSWS2B遺伝子も同様に配列の解析を行った。

ヴィクトリア湖より58個体、マラウイ湖より40個体のLWS遺伝子の膜貫通領域の配列を決定した。その結果、ヴィクトリア湖では非常に多様化していたにもかかわらず、より古いマラウイ湖ではほとんど多様化していなかった。ヴィクトリア湖より得られた14のアリルの間には25の塩基置換が見られ、この中でアミノ酸置換を伴う非同義置換は19であった。次にこれらのアリルが種特異的に適応的に進化してきたかを調べるためにLWS遺伝子のエキソン4の配列を184個体について決定した。その結果、これらのアリルは種、もしくは地域集団ごとに適応的にアミノ酸が置換していた。LWS遺伝子のアミノ酸置換は次の6つの理由より強い正の選択を受けてきたと考えられた。1、遺伝子の多様化はLWSにのみ見られる。SWS2Bではヴィクトリア湖の種において配列は同一であった。2、マラウイ湖産の種ではLWS遺伝子の多様化が見られなかった。これは光環境の違いによると考えられる。3、配列の多様化はエキソンだけで見られた。約800bpのLWS遺伝子イントロン1を40個体より決定したが配列はほぼ同一であった。4、多くの塩基置換が非同義置換であった。5、少なくとも6つのアミノ酸置換が吸収波長の変化に影響を及ぼすと考えられる。6、アリルの系統樹を作成することによりアミノ酸置換が繰り返し起きてきたと考えられ、また収斂進化も起きている。

LWS遺伝子が強い正の選択を受けて種、もしくは地域集団ごとに適応的に進化してきたことより、この遺伝子がシクリッドの多様化に強く関与してきたことが明らかとなった(3)。

LWS遺伝子がどのように種の分化、形成へ関与してきたかを明らかにするため、ヴィクトリア湖のシクリッドの近縁種で異なる透明度に生息する集団を用い解析を行った。また透明度の影響を比較するため、生息水深の異なる種を解析に用いた。始めに解析に用いた全個体よりLWS遺伝子の膜貫通領域をコードする配列を決定した。その結果、生息水深が比較的深く、透明度が光環境に影響を及ぼす種の集団間でLWS遺伝子の配列が異なっており、透明度の高い集団と低い集団が遺伝的に大きく分化していることが明らかになった。しかし、生息水深が浅い、もしくは岩の割れ目に生息し光環境が透明度の影響をあまり受けない種ではLWS遺伝子の配列に集団間の分化は見られなかった。この結果からLWS遺伝子の集団間の分化は光環境への適応のために起こったこと示唆された(図3)。

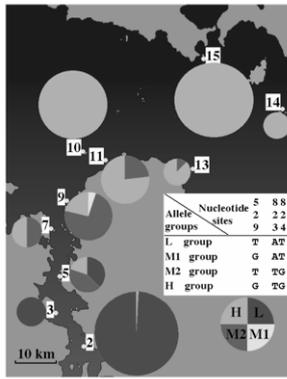


図3 LWSアリの集団間の分化

次にLWS遺伝子の集団間の分化がどのような分子レベルでの機構で起きたのかを調べるために、LWS遺伝子の上流配列及び下流配列を光環境の異なる集団の個体から決定した。決定した配列について集団遺伝学的な解析を行った結果、LWS遺伝子の領域だけが集団間で分化しており周辺領域では分化が見られないことが明らかになった。この結果からLWS遺伝子に断断選択圧が働き集団の分化が起こったことが明らかになった。また同種で生息光環境が異なる集団間ではLWS遺伝子の分化が見られたが、異種であっても生息光環境が類似している集団間ではLWS遺伝子の分化が見られなかった。この結果からLWS遺伝子の集団間の分化は光環境への適応のために起こったこと示唆された。

次に透明度の高い集団と低い集団からのLWS遺伝子の配列の機能的な差異を明らかにするために、それぞれの配列からタンパク質を発現させ視物質を再構築し吸収波長の測定を行った。その結果、透明度の低い集団の配列由来の視物質で吸収波長が長波長側にシフトしていることが明らかになった(図4)。ヴィクトリア湖の低い透明度では長波長の光の成分が多くなることが報告されており、本研究で観察された長波長シフトは光環境への適応のためであると考えられる。また、本研究では透明度の低い集団では赤やオレンジの婚姻色を呈するオスの頻度が高くなることが明らかになった。これは透明度の低い、長波長の光の成分が多い環境で効率よく光を反射するためであると考えられ、LWS遺伝子の分化とともに性選択による生殖的隔離に重要な役割を果たしていると考えられる。

これらのことを総合して、LWS遺伝子の多様化と分化はヴィクトリア湖のシクリッドの適応と種分化に重要な役割を持ち、その多様化に寄与して来たと考えられた。

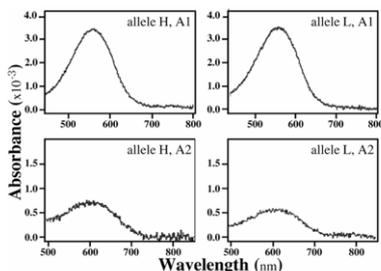


図4 LWSの機能的多様化

### 形態形成関連遺伝子の多様化とシクリッドの多様化

近年、モデル生物を用いて様々な分子発生的な研究が進められ、個体発生に関与する遺伝子群の動態が明ら

かにされつつある。これらの知見の中から特にゼブラフィッシュおよびマウスによる研究から脊椎動物の頭部形成・歯形成等で関与が示されている遺伝子に注目した。シクリッドの形態の多様化と形態形成遺伝子の多様化に関連が深いと予想されるDlx1, Dlx2, Pax9, Otx1, Otx2, Bmp2, Bmp4の相同遺伝子を単離し、アミノ酸配列の進化の解析を行った。

### BMP4遺伝子

その結果、Pax9, Otx1, Otx2ではアミノ酸配列がシクリッドの種間で極めてよく保存されていた。他方でBmpのグループ、特にBmp4ではアミノ酸置換が観察された。そこでアフリカ産シクリッドの多くの種を解析に加えBmp4の進化的解析を行った。解析に用いたシクリッドの種を短期間に形態の多様化を起こした湖産のシクリッドのグループと分岐してから長い時間を経ているがほとんど形態の多様化を起こしていない河川産のシクリッドのグループに分けた。Bmp4の配列から同義置換率(Ds)と非同義置換率(Dn)を求めアミノ酸の進化速度の指標としてDn/Dsの値を用いた。その結果、湖産の種のグループのDn/Dsの値が河川産のグループの値より5倍以上大きく、Bmp4のアミノ酸が急速に形態の多様化を起こしたシクリッドの系統で多様化していることが明らかになった。アミノ酸の進化速度が湖産のシクリッドで上がっていたことによりBmp4が湖産のシクリッドの形態の多様化に関与してきたことが示唆された。次にアミノ酸配列の多様化がBmp4のドメイン特異的であるか調べるためにBmp4のドメインの構造を予測し、機能ドメインとプロドメインに分けて解析を行った。その結果、アミノ酸の多様化はプロドメインに集中していた。プロドメインは機能ドメインの働きの制御に重要な働きをしていることが知られており、プロドメインのアミノ酸が多様化していることは、この系統のシクリッドの形態の多様化に関連していることが予想される(7)。

### GDF5遺伝子

またTGF- $\beta$  superfamilyに属する遺伝子であるGDF5遺伝子は、マウスでは四肢が短くなる原因遺伝子として知られている。具体的には軟骨の分化や関節の形成に関与する軟骨分化と関節形成に関与すると考えられている。

そこで、シクリッドより単離したGDF5遺伝子の配列比較解析をおこなった。その結果、GDF5遺伝子が魚類進化にともなって機能的に進化してきた事実が明らかになった。成熟GDF5タンパクのアミノ酸配列は、四足動物では比較的保存性が高いのに対し、魚類の進化過程で多様化が著しい分類群(新真骨類-コイやサケのグループを除くほとんどの硬骨魚)において、タンパクの拡散性に関わると推定されているN末領域に著しい配列の伸長と置換が確認された。

新真骨魚類においては咽頭骨格の関節が機能的に進化したと考えられている。また一方で関節が形態形成においてシグナルセンターとして機能しているのではないかという仮説がある。これらを踏まえ、魚類進化の過程では咽頭骨格の関節において発現するGDF5タンパクの拡散性の変化が多様な形態を生み出したと推測される。この仮説を検証するための実験系を構築中である。

### 顎部形態形成遺伝子の網羅的な解析

シクリッドの頭部・顎部形態の多様化に関わる遺伝子の単離と解析のために、頭部・顎部形態の異なるシクリッド種間でDNAchipを用いた遺伝子発現の比較をおこな

った。当研究室のシクリッドESTより約1,800クローンを  
用いたDNAchipを作成し、頭部・顎部形態の異なる2種、  
*Haplochromis parvidens* と *Haplochromis* sp. “red tail  
sheller” の稚魚顎部における遺伝子発現を比較した。そ  
の結果、3つのクローンについて種間で発現に差が見られ  
た。そのうちの一つは、アスタシンファミリー遺伝子に  
相同性が見られ、この遺伝子、新規メタロプロテアーゼ  
*cimp1* について詳細に解析した。in situ hybridization の結  
果、*cimp1* は顎部と鰓で発現していた。シクリッド種間  
で塩基配列に違いは見られなかったが、qPCRの結果、そ  
の発現は種間で量・時期が異なっていた (図5)。アスタ  
シンファミリー遺伝子に相同性があることから、CIMP1  
は細胞外マトリックス (ECM) を分解し、ECMの再構築に  
関与している可能性が予想されている。ECMの再構築は  
組織の形態形成に非常に重要な役割を果たしており、  
*cimp1* もシクリッド頭部においてその発現量・時期を変  
化させることにより、頭部形態の多様化に関与している  
可能性が示唆された (kijimoto et al. 2005)。

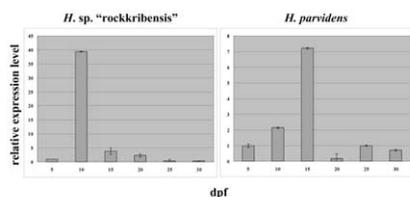


図5 種間で異なるステージごとの遺伝子発現の変化

さらに我々はEST約6,400クローンをを用いてDNAchipを  
改良し、同様に顎部形態の異なるシクリッド2種間で遺伝  
子発現の比較をおこなった。比較には *H. chilotes* と *H. sp.*  
“rockkribensis” を用いた。その結果、シクリッド種間で  
発現の異なる遺伝子に、形態形成異常を症状にもつヒト  
遺伝病関連遺伝子と相同性のある遺伝子 (*ci-magp4*) が得  
られた。*ci-magp4* は顎部・鰓・ひれの付根で発現しており  
、顎部における遺伝子発現は、種間で量・時期に差が  
見られた。この遺伝子はECMの構成要素の一つと考えら  
れており、関連の報告されているヒト遺伝病の形態形成  
異常の症状と考え合わせると、シクリッドにおいても種  
間の顎部における遺伝子発現の差がシクリッド顎部形態  
の多様化に関与している可能性が考えられる (ref 36, 図  
6, 7)。

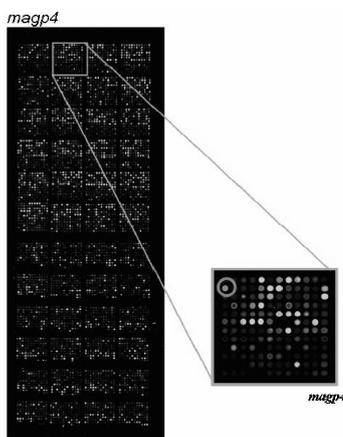


図6 DNAチップを用いた顎部発現遺伝子の解析

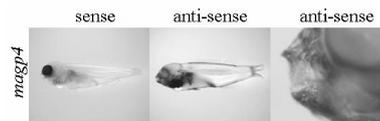


図7 magp4遺伝子の顎部における発現

### 骨形成・顎部多様化に関する研究

DNAチップを用いた顎骨骨化過程における網羅的遺伝子  
発現解析

ヴィクトリア湖産シクリッド *Haplochromis parvidens*  
の個体発生における顎部形成・成熟の過程の顎部での遺  
伝子発現システムを見出すために、以下のように網羅的  
に解析した。

まず、標準的な飼育下での *Haplochromis parvidens* の  
個体発生を観察したところ、受精後約4日で孵化し、受  
精後12日目付近まで卵黄による栄養で一定の成長がみら  
れた。この過程で顎部領域が形成され、受精後12日目  
付近から顎骨の骨化が開始し顎骨が機能するようになり  
、さらに約4ヶ月後に性成熟により種を特徴づける形態  
が形成されていくと考えている。そこで、まず卵黄がな  
くなり顎骨の開始が認められた受精後12日目を基準とし  
てその後16日目、30日目を、さらに顎骨の骨化が開始す  
る前の8日目を加え、計4点をサンプリングポイントとし  
た。

次に、それぞれのサンプリングポイントにおける稚魚  
の whole body を、顎弓由来の顎部・顎弓を除いた舌弓鰓  
弓由来の内臓頭蓋である舌鰓部・眼や脳を含む神経頭蓋  
である上頭部・内臓を除去した体幹部という4つの部位  
に区分けし、それぞれより total RNA を精製し、cDNA プ  
ローブを作成した。シクリッド稚魚の顎部領域から得ら  
れた約6,000ESTクローンがのったDNAチップを用いて  
、アゴとその他の部位による、すなわち顎部vs舌鰓部・顎  
部vs上頭部・顎部vs体幹部という組み合わせの競合的な  
ハイブリダイゼーションをおこなうことにより、スポッ  
トされている遺伝子の発現量の相対比を検出した。

各サンプリングポイントにおいてそれぞれ競合的ハイ  
ブリダイゼーションをおこなうことにより、DNAチップ  
の各スポットについて計12回分の相対的な発現比データ  
が得られ、この発現比データのパターンに基づきクラス  
タリング解析をおこなった。

クラスタリング解析によって、以下2つのことが明ら  
かになった。一つは顎部領域において膜性骨骨化過程に  
相対的に強く発現する既知遺伝子は約200種類であるこ  
と。もう一つは発現比パターンが似ているものは同じ発  
現調節機構によって調節され、顎部形態の形成・成熟に  
対して遺伝子群として機能していることが示唆されるこ  
と。種間でこの発現比パターンが異なるようなデータも  
得られており、遺伝子発現システムの多様化が、形態の  
多様化をうみだしていることを支持する結果を得られた。

### ナイルティラピアを用いた顎骨形成過程の記述および組 織学的解析

平成16年度より繁殖性の高いシクリッドであるナイル  
ティラピア *Oreochromis niloticus* を用い、膜性骨の形成  
を中心として顎部骨格形成過程を解析することにした。  
まず、シクリッドの分子発生的な情報の収集さらに種  
間比較による進化発生的な解析をおこなう上で必要と  
なる発生ステージを記載した。シクリッドの頭蓋顔面形  
成、とりわけ顎部骨格の分化形成は受精後30日までに進

行する。実際に受精後30日までにたいの頭蓋骨の骨化が確認される。そこで、*Oreochromis niloticus* (ON)を用いて受精後30日目までを32ステージに分類した。これをもとに、ヴィクトリア湖産の*Haplochromis*属についても発生ステージを分類した。*Oreochromis*属と*Haplochromis*属の両者は、ともに口内保育種であり、今回記載した発生ステージを用いて進化発生学的な比較解析が可能となった。

次に顎骨形成過程の組織学的解析をおこなった。発生ステージに従って*Oreochromis niloticus*における軟骨形成および骨形成を確認した。ONSt.17で顎部領域の軟骨の凝集・分化が開始し、ONSt.18でその近傍において類骨Osteoidと呼ばれる基質が将来膜性骨が形成される部位に沈着し、その後ONSt.25において顎骨の骨化が開始することが明らかになった。

以上の結果は、今後の進化発生学的解析の重要な基盤となるものである。

## 体表模様関連遺伝子の多様化とシクリッドの多様化

### hagoromo遺伝子

シクリッドで最も多様化している形態の一つに体表模様がある。シクリッドではまだ体表模様関係の遺伝子は単離されていないが、ゼブラフィッシュでは多くの体表模様変異体と幾つかの原因遺伝子が報告されている。そのうちのひとつhagoromo遺伝子はゼブラフィッシュの体表パターン変異体から単離され、この変異体は色素細胞には異常を起さず成体の体表パターンのみがみだれる。そこでhagoromo遺伝子をシクリッドから単離し、体表模様の進化との関連を明らかにすることを試みた。

解析に用いたシクリッドの種は短期間に種分化を起こした湖産のシクリッドのグループと、分岐してから長い時間を経ているがほとんど種分化を起こしていない河川産のシクリッドのグループに分けた。これらのシクリッドの種からhagoromoタンパクが他のタンパクと相互作用すると予想されるWD40 repeatドメイン配列を決定した。得られた配列から同義置換率(Ds)と非同義置換率(Dn)を求めアミノ酸の進化速度の指標としてDn/Dsの値を用いた。その結果、湖産の種のグループのDn/Dsの値が河川産のグループの値より二倍以上大きく、hagoromoのアミノ酸が急速に種分化を起こしたシクリッドの系統で多様化していることが明らかになった。湖産のシクリッドは河川産のシクリッドに比べ体表模様が多様化しており、このことが性選択による急速な種分化と関係していると考えられている。アミノ酸の進化速度が湖産のシクリッドで上がっていたことによりhagoromo遺伝子が湖産のシクリッド体表模様の多様化に関係してきたことが示唆された(9)。

また、ゼブラフィッシュとは異なりシクリッドではhagoromo遺伝子に選択的スプライシングが見られ、合計9種類のcDNAが単離された。それぞれのmRNAの転写量は大きく異なることはなく、上皮組織の色素細胞の局在する部位で発現が見られた。次に9種類のmRNAの発現を三大湖及び河川産15種のシクリッドで調べた。その結果、種分化の頻度が高い系統ほど多くの種類のmRNAを発現していることが明らかとなった。これらのことより種分化の頻度の高い系統ではhagoromo遺伝子の選択的スプライシングのメカニズムを複雑化させ、体表模様の多様化を生み出しているのではないかと考えられた(12)。

### その他体表模様関連遺伝子

体表模様の多様化のメカニズムのさらなる解明へ向け

てhagoro遺伝子に加えてtyrosinase, endothelin receptor b1, mitf, Aim1などこれまで他の小型魚類で体表模様形成に関与することが報告されている遺伝子を単離しアミノ酸の進化速度の解析を行った。アミノ酸の進化速度の指標として、同義置換率(Ds)と非同義置換率(Dn)を求めDn/Dsの値を用いた。

その結果、tyrosinase, endothelin receptor b1, Aim1ではシクリッドの体表模様の異なる種間で非常によく保存されていた。これに対し、mitfにおいて体表模様が多様化している系統でmitfのアミノ酸の進化速度が上昇していることが見られ、体表模様の多様化にmitfが関与していることが示唆された。またこれまで哺乳類や魚類では知られていないシクリッド特異的な選択的スプライシングが見られ、そのmRNAからDNA結合能の異なるmitfアイソフォームが産生されることが予想された。次にmitfの進化とシクリッドの婚姻色の多様化を調べるために、婚姻色を呈する系統とない系統間でmitfの比較を行った。その結果、mitfは婚姻色の多様化には関わっていないことが推定された(21)。

### シクリッドの生態的多様化と生体防御の多様化

lysozymeはファージから脊椎動物まで自然界に広く分布する酵素で、細菌の細胞壁を分解する溶菌活性を持つ。魚類においては腎臓、肝臓、脾臓、皮膚、粘液、腸、卵巣、卵などに存在している事が報告されており、細菌などの感染に対する生体防御として重要な役割を果たしている。

既に当研究室の予備的な実験によりシクリッドのc-type lysozyme遺伝子が遺伝子重複を複数回起こしながら多様化してきた事が示唆されており、本研究では解析に用いる種、個体を増やすことでより詳細な解析を行い、その進化の過程での適応的な役割を明らかにすることを目的とした。

その結果、この遺伝子のコピー数が従来予測されていた数よりも多い事が明らかになった。また、この遺伝子群には数多くのアミノ酸置換が蓄積しており、正の選択圧を受けている事が予想された。そこで選択圧解析を行った結果、この遺伝子群に対してアミノ酸を変えるような正の選択が働いてきた事が明らかになり、遺伝子重複に伴いタンパク質の性質を変えている事が予想された。これらの事より、シクリッドの多様化の過程でこの遺伝子が適応的に進化し多様化してきたことが考えられる。

また本研究では大腸菌の発現系を用いたc-type lysozymeリコンビナントタンパク質の強制発現に成功した。タンパク質は大腸菌内で不溶化し、活性がある状態のリコンビナントを得る事はできなかったが、今後、このタンパク質の可溶化に成功すれば、配列ごとにその至的條件や基質特異性を測定する事ができるようになり、シクリッドの多様化の過程におけるc-type lysozyme遺伝子重複の生体的意味やアミノ酸置換が蓄積してきた理由が明らかになると考えられる。

### シクリッドの集団遺伝学的なレベルでの多様性

シクリッドの形態的、生態的多様性の遺伝的背景を明らかにするために、アフリカ産シクリッドの系統解析を行った。始めにSINEの挿入を指標とし東アフリカの三大湖、西アフリカ、及びアフリカに広く分布するシクリッドを用いて行った。

その結果、東アフリカに生息する千種ものシクリッドが単系統群を形成することが7遺伝子座により支持された。この単系統群の外群はTilapia属とSteatocranus属であ

ることも明らかとなったが、この三者の関係は遺伝子座ごとに異なっていた。この理由として祖先種が遺伝的多型を保持した状態で急速に種分化を起こしたことが考えられる(13)。

次に三大湖とその周辺湖沼のシクリッドを用いた同様の解析を行った。その結果、東アフリカ産シクリッドが、タンガニカ湖に生息するグループ、Astatoreochromisのグループ、マラウイ湖のグループ、ヴィクトリア湖、エドワード湖、ジョージ湖、アルバート湖、ルクワ湖、及び東アフリカ河川のグループに分かれた。この4番目のグループの種では、どの種でもSINEの挿入が多型であり、また同じ種内多型が他の種でも保持されていた。このSINE挿入多型の頻度や配列情報より、ヴィクトリア湖のシクリッドの祖先集団及び、その集団サイズが明らかとなった(25)。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

生物多様性は研究者ばかりでなく、一般の人々にも幅広く興味を持たれる分野である。しかし、本研究が始まる以前は進化や生物多様性の研究は理論的、数学的なものが多く、また分子レベルの研究の研究であってもミトコンドリアや核DNAを用いた系統関係の解析が主であった。そして実際にどのような遺伝子が働き、種の多様性を生み出しているかを明らかにすることは望まれていたが、その研究方法がない状況であった。

本研究はこのような状況を変えた研究であり、国内外で高い評価を受けてきた。特にLWS遺伝子の研究に関しては、この研究が新たな試みであったため開始当時より注目され、最初の国際学会での発表をScience誌にも紹介された(Science 294:2282)。また、論文が掲載されると国内外の進化の研究者に反響を呼び、間もなくしてこの論文についての総説が掲載された(Heredity, 90:116-117)。そして外国の研究グループも同様な研究を行い始めた(Carleton et al. Mol. Eco. 14, 4341)。

hagoromo遺伝子の研究に関しても、国内外で注目され、当研究室の寺井らによる学会発表において学会賞を受賞した(第二回 日本進化学会)。また論文発表後、サンゴ礁魚類の仲間のアイゴ科魚類で同様の研究が始まり、現在共同研究を行っている。

これらの研究によって、シクリッドを種の多様化の研究に用いることの有用性を提示してきた。そのため、シクリッドを進化の研究のモデル生物として紹介した総説も数多く引用されている(Nature Review, 5:1-11)。

我々の研究系が国内外から高い評価を受けている特色として、主に以下の2点が挙げられる。第一に、当研究室が独自にヴィクトリア湖に調査隊を長期間派遣し、カワスズメ科魚類の採集および生態調査をおこなっている。その結果、様々な生態的ニッチをもつカワスズメ科魚類の中から、注目する特徴を持つカワスズメ科魚類を、世界的にみても最も豊富な種数、個体数をもって解析することが可能となっている。

第二に、視細胞の中では桿体、視物質の中ではウシロドプシンの研究がGPCR全体を見渡しても研究がよく進んでいるが、錐体の視物質分子やその発現機構については試料の入手しにくさもあって比較的研究が進んでいない点である。共同研究をおこなっている研究室においては、ロドプシンに加えて様々なオプシン類の分光学的、生化学的、分子生物学的研究を行っているが、その中で多種多様なカワスズメ科魚類の桿体・錐体視物質を解析し、カワスズメ科魚類視物質間、または他の視物質との比較解析を行うことにより、視物質やGPCRの機能や進

化について新たな知見が得られると期待された。実際、今までは吸収波長測定にとどまっていた解析が、視物質の光反応速度やG蛋白質との相互作用などの機能的側面に発展することにより、視覚機能を波長・速度両面から推定することができた。

これまで視覚とシクリッド種分化の関係は取りざたされてきたが、その解析はDNAレベルにとどまっていたが、本研究においては蛋白質レベルでのより詳細解析ができたことが高い評価につながったと考えられる。

#### シクリッドの形態進化と発生に関する評価

形態的多様化が著しいシクリッドを用いた進化発生学的解析は世界で主に3つのグループによって始まったばかりである。なかでもアメリカのTom Kocherらのグループがマラウイ湖のシクリッドを用いたQTL解析をもとに精力的に研究されている。

魚類のみならず脊椎動物における形態進化および多様化を考える上で非常に注目を集めている。本研究室の藤村らの研究にて「シクリッドGDF5遺伝子の進化」というタイトルで2003年8月日本進化学会福岡大会においてポスター発表をおこない、大会最優秀ポスター賞を受賞したことからも注目されていることがわかる。「魚類の進化史上大きな革新の一つとなった顎の形態形成に対して、遺伝子のレベルからアプローチし、GDF5遺伝子の3'末端に見られる固有の配列の分布が、新真骨と一致していることを見出した。魚類において、形態形成と進化を結びつける大きなきっかけとなる画期的な研究である。」という評価を受け、さらには基礎生物学研究所上野直人教授により雑誌「実験医学」(2005 Vol.23 No.1 p85)に「アミノ酸置換と形態進化をつなぐ興味深い事実」として紹介していただいた経緯がある。

またkijimoto et al. 2005 およびKobayashi et al. 2006の2報は、シクリッドを用いた超近縁種間のDNAchipを用いた遺伝子発現比較の初めての研究成果であり、DNAchipを用いて、効果的に種間で発現量の異なる遺伝子を検出することに成功し、今後のシクリッド発現解析の足がかりとなる研究である。超近縁種シクリッド種間におけるDNAchipの有用性を示したとともに、シクリッド種間の遺伝子発現解析を進める手法を確立したことが評価されたの出版となったと考えている。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

シクリッド視覚機構の多様化と進化に関する研究に関して錐体視物質の波長感受性測定上の困難

錐体視物質の解析については、色覚の多様化の分子機能解明のため、それぞれの遺伝子ごとの波長感受性の解析を試みてきた。まずLWS遺伝子に関して言及すると、これまでの研究ではLWS遺伝子の吸収波長はあまり測定された経緯がなく、特に魚類は測定された例がなかった。そのため、タンパク質の発現の系を構築するための発現ベクターや培養細胞の選択から始め条件を検討する必要があった。次に問題であったのが実験を行う「光」であった。通常、光受容体の実験は暗室内で長波長領域の光の元で実験を行うが、シクリッドLWSの場合、長波長領域に吸収を持つため、それが不可能であった。そのため赤外線発光ダイオードを光源として用い、赤外線はヒトには見えないため赤外線暗視カメラを用いて実験を行った。LWS光受容体は不安定であるため、微小な吸収でも正確に測定できる方法を構築することも困難であった。最終的にLWS遺伝子の最大吸収波長の測定は可能となったが、現在でも最も困難な実験の一つである。

またロドプシンと比較すると錐体視物質の中でも特にSWS1、LWSについてはその蛋白質が不安定であり、実験的解析が困難であることが判明した。つまりロドプシンは、発現から凍結融解をおこなっても測定は可能であったのに対し、SWS1、LWSについては発現から測定までの間に凍結融解をおこなったことで、波長感受性を測定できなくなった可能性が大きいのである。

#### 光情報伝達に関わる実験上の困難

シクリッドの視覚機能多様化の分子機構解明を目的に、シクリッドのオプシン蛋白質8種類の機能について総合的な解析を試みた。中でも波長感受性に関わる重要なアミノ酸残基の同定に続く解析として、「光情報伝達」における重要なアミノ酸残基の同定を試み、その候補としてMeta-II中間体の動態の違いに関わると考えられる83番目のアミノ酸残基に注目した。現在までは2種間での比較のみであり、この解析に用いる種数を増加させる、また、83番目のアミノ酸部位に変異を導入したロドプシンを作成し解析する必要があると考えられた。しかし、これら実験的解析には大量の蛋白質が必要であることや、配列によって蛋白質の発現量が異なること、さらには変異導入によって発現量が減少するなどの困難があった。

#### 視覚多様化における配列や構造以外での因子の可能性

あるシクリッドの種間では、使用しているオプシン蛋白質の組み合わせを変えることによって、種間での色覚が異なっているとの報告がある。錐体視物質の波長感受性を測定した後は、それぞれのオプシン蛋白質の発現量の違い、網膜上における発現パターンの違いなどの解析をおこないたいとも考えているが、これらの解析には、シクリッドの生体が大量に手に入る環境を整えることが不可欠であり、さらには困難な問題となるだろう。

#### 同所的種分化機構の研究に関して

本研究で明らかにできなかったことに同所的種分化の遺伝的メカニズムがある。同所的種分化は理論的には起こるであろうことが提唱されており、一つの湖で爆発的に種分化を起こしてきたヴィクトリア湖のシクリッドで、この問題が明らかにされることが期待されていた。これまでの本研究でLWS遺伝子が生息環境への適応に関与して集団が分化したことが明らかになった。しかし、用いたサンプルが異所的に生息する集団であったため、同所的な集団の分化については検証することができなかった。また、本研究で明らかにできなかったこととして系統関係の推定も挙げられる。種の多様性の研究をするにあたり種が生じてきた道筋、つまり種の系統関係が明らかであると研究が容易になる。しかし、ヴィクトリア湖のシクリッドでは中立的な変異が種内で固定していないため通常のミトコンドリアや核DNAを用いた系統解析法を用いることができなかった。また、中立的変異の集団内での頻度を用いて集団間の系統関係を明らかにすることも試みたが、頻度の差が大きくなり系統関係を推定するには至らなかった。

#### チップによる網羅的解析後の機能解析における困難

今回、DNACHIPにより検出されたシクリッド2種間で発現の異なる遺伝子は、それぞれ機能未知の遺伝子であった。そのため、これらの遺伝子の発現差がシクリッドの形態の多様化に直接的にどのような影響を与えているのか詳細に予想することは困難であった。また、シクリッドはいわゆるモデル生物ではないため、そのゲノム情

報も不足しており、これらの遺伝子の機能解析をシクリッドでおこなっていくことはかなりの困難が考えられる。現在、シクリッド河川種である*Oreochromis Noticus*においてゲノム計画が進行しており、解読が待たれる。また、種間で発現差のあった遺伝子について、シクリッド形態の多様化に関与していることを直接示すためには発生的解析が必要になってくる。しかし、現在シクリッドにおいては発生的解析の基盤が希薄である。そのため、これらの遺伝子について発生的手法による解析が困難であった。現在、当研究室で*O. Niloticus*を用いてシクリッド発現情報の基盤整理がおこなわれており、これらの研究は今後の課題となる。

#### シクリッド研究全般における困難

##### シクリッドの分子発生的情報の不十分さ

シクリッドの遺伝子を多数単離されてきているものの、発現解析および機能解析は現在までに多くはおこなわれていないのが現状である。

発現解析に関してはこれまで正確な発生段階の記述がおこなわれてきていなかったのが主因であると考えられる。我々が記述した発生段階をもとに今後は情報が整理されるものと考えられる。

機能解析に関しては順遺伝学がおこなわれてきていない現在、逆遺伝学的手法の確立が急務であると考えられる。繁殖が容易なナイルティラピアをもとに今後実験系の確立を目指す予定である。

##### シクリッドゲノム情報の取得が容易ではないこと

シクリッドのゲノム計画が進展しておらず、またゼブラフィッシュやフグのゲノム配列をそのまま使えるほど近縁ではないため、多くの遺伝子のシス調節領域を用いて比較ゲノム解析をおこなうことが容易ではない。魚類のゲノム情報を駆使し、効率よく発現調節領域を解析することが今後の課題である。

#### <今後の課題>

##### 同所的種分化による多様化のメカニズム解明を目指して

今後の課題としてヴィクトリア湖での種の多様性を明らかにするためには、同所的種分化が実際に起きたかどうかを明らかにする必要がある。そのためにも、同所的に生息する種を研究対象にする必要がある。そこで一つの採集地点より、生態的に異なる種を複数用い研究を行うことによりこの問題を明らかにできると考えている。この研究を行うためには、始めに一つの採集地点より生態的に異なる種を複数用いLWS遺伝子の解析を行う。この場合、なるべく生態、形態、特にオスの婚姻色の異なる種を選択して以後の研究に用いる。種間でLWS遺伝子の配列に分化が見られる場合、その分化が選択圧を受けて起こったかを選択圧解析により明らかにする。次に配列の分化と機能的関連を明らかにするために、それら配列よりタンパク質を発現させ視物質を再構築し機能を解析する。機能解析の後に視物質の機能と生態との関連を調べる。最後に視物質と性選択の関連を調べ、生殖的隔離への関与を明らかにする。このためにはオスの婚姻色の反射光とメスの光受容体の吸収波長を想定し、その関連を明らかにする必要がある。これらの研究により、同所的に生息する種の視覚の分化を通じた生殖的隔離、つまり同所的種分化が明らかにされると予想され、種の多様化のメカニズムに分子レベルで迫ることができると考えている。

## ビクトリア湖シクリッドの系統推定は可能か？

次の課題として系統関係の推定が挙げられる。種の多様性の研究をするには種の系統関係を明らかにする必要がある。ビクトリア湖のシクリッドでは中立的な変異が種内で固定していないため、これまで行われてきた系統関係推定法とは異なる方法を用いる必要がある。そのためには中立的変異ではあるが、種の分化とともに急速に集団内に固定してきた変異を用いなければならない。選択を受けて種内に急速に固定してきた遺伝子の周辺領域の変異は先に述べたような挙動で進化すると考えられるので、選択を受けた機能遺伝子の周辺領域を解析に用いることで種間の系統関係を推定できるのではないかと考えている。

## ビクトリア湖シクリッドのオプシン蛋白の解析へ

これまでは、LWSを除くオプシタンパクに関しては主にタンガニカ湖シクリッドを中心として解析を行ってきたが、今後は、ビクトリア湖に生息するカワスズメ科魚類まで幅を広げて詳細に解析することにより、光受容体蛋白質の機能の解析、機能的に重要なアミノ酸残基の同定をおこなう。実験としては、SWS1、RH2A、RH2B、LWSの蛋白質の発現、それぞれの視物質の波長感受性測定をおこなう。ロドプシンについて様々な種で発現を行い、Meta-II中間体の発現をおこなう。ビクトリア湖のカワスズメ科魚類においては、まず、生息環境の違いによる光受容体蛋白質の波長感受性の違いが予想される。ビクトリア湖は、非常に濁っており、湖の場所によって、水の色、透明度が異なることが知られている。これら水質の違いに相応したオプシン蛋白質の性質の変化を種間、同種別地域の集団間で比較解析する。また、ビクトリア湖のカワスズメ科魚類においては、婚姻色が顕著に現れることで知られ、メスがオスの体色を認識することによる生殖的隔離の可能性が示唆されており、婚姻色の違いが種の多様性を生み出した要因の一つであると考えられている。しかし、実際に、婚姻色の違いと分子的な要因を関連付けた報告はされていない。本研究において、婚姻色の異なる種間、似た婚姻色を提示する種間においてその体色を認識する色覚がどのように変化しているのか調べ、ゲノム情報の変化による色覚の変化と生殖的隔離の関係性を明らかにすることが出来ると考えられる。

Meta II中間体は、三量体G蛋白質トランスデューシンを活性化する中間体である。トランスデューシンがホスホジエステラーゼを活性化することで細胞に過分極応答が起こり、光の情報が電気信号となって伝わる。活性化状態のMeta IIの生成速度・崩壊速度の違いが、光に対する反応の速度・感度に重要である。つまり、Meta II中間体が安定であれば、活性化できるトランスデューシンの量が多くなり、信号の増幅能力が高く、光の感度が高くなる。逆に、Meta II中間体の崩壊速度が速い場合、活性化できるトランスデューシンの量が少なくなり、信号の増幅能力が低く光の感度が低くなる。夜行性の動物には桿体が多く、昼行性の動物には錐体が多いことが知られている。本研究においては、これら光に対する感度の違いを、昼行性、夜行性のカワスズメ科魚類種間で比較し、異なっているのか調べる。また、この性質の相違に関連したアミノ酸残基を同定する。ロドプシンの光活性化中間体の研究は、様々なGPCRの活性化機構に結びつくと考えられることから、カワスズメ科魚類の視物質の詳細な機能解析により、GPCRの信号伝達機構に重要なアミノ酸残基の特定、信号伝達機構の解明にも結びつくと考

えられる。

光受容体の機能の違いが実際に視覚機能の違いに影響を与えているのか解析するため、MSPなどを用いて視細胞の波長感受性を測定する、また、電気生理学的手法を用いて、細胞の光応答性を確かめるなどの実験をおこなう。また、光受容体蛋白質そのものの性質に加え、種間での光受容体蛋白質遺伝子の構成、視物質の発現様式、つまり、遺伝子の数や発現している視物質の種類、量、網膜上での配置などを種間で比較する。カワスズメ科魚類には今のところ7種類の錐体視物質の光受容体蛋白質遺伝子を持つと報告されている。これらの中からいくつか選択されて使われており、発生の段階によって使い分けられているという報告もある。これら、光受容体蛋白質の発現様式を個体の発生段階、種間で比較解析をおこなう。具体的には、ビクトリア湖に生息しているカワスズメ科魚類において、光受容体タンパク質の発現の種類、発現量をリアルタイムPCRを用いて調べる、網膜上の錐体細胞の並び、錐体細胞桿体細胞の割合、分布をin situ hybridization、抗体染色を用いてmRNAレベル、蛋白質レベルで調べ比較解析する。

## 調節領域の比較解析

これまでに我々はDNAchipを用いて、シクリッド超近縁種間で発現の異なる遺伝子を効率よく検出することに成功した。発現の異なるこれらの遺伝子についてはタンパクコード領域だけでなく、プロモーターやエンハンサー領域の解析が必要と考えられる。今後はDNAchipにより検出された、シクリッド種間で遺伝子発現の異なる遺伝子について、上流配列の取得とその比較をおこなっていく。当研究室はビクトリア湖産シクリッド *Haplochromis chilotes* のBAC libraryを所有しているので、これを用いて上流配列の取得することができこの領域の解析も比較的容易におこなうことが可能である。

また、シクリッドは超近縁種のため種間でほぼ同一のゲノム構造をしていると考えられる。そのため、種内で固定している変異が存在すれば、その遺伝子が種特異的形態・生態に関与している可能性が高い。一方で、種間・種内で多くの多型が保持されており、個体比較では多型を検出してしまいう可能性が考えられる。そこで、複数個体における解析が必要となってくるが、当研究室はビクトリア湖で現地サンプルの収集をおこなっており、各種の野生固体を複数入手可能である。これらを用いて少数固体でおこなった解析において種間で見られた変異が種内で固定しているかの確認をおこなっていく。

今回種間で発現差の見られた遺伝子について、その遺伝子がシクリッドの形態の多様化に関与しているかを調べるため、遺伝子導入実験など発生学的手法による解析をおこなうことが有効であると考えられる。しかしシクリッドはいわゆるモデル生物ではないため、発生学的研究の基盤が乏しくノックアウトやノックダウンは難しい。そこで、*H. chilotes*のBACライブラリーを利用し、*H. chilotes*の目的遺伝子を含むBACクローンを他の種へインジェクションすることを試み、表現形の変化を調べる。現在、基盤整理が進んでおり、今後発生学的手法による詳細な解析をおこなうことが可能となると考える。

## 骨形成・顎部の多様化に研究に関するこれから

1. 遺伝子発現解析 現在までにDNAチップを用いた顎骨骨化過程における網羅的遺伝子発現解析によって、膜性骨骨化過程に関連する約200個の候補遺伝子を絞り込んでいる。これらの遺伝子発現を組織レベルで詳細に解析

する必要があり、それらをマーカー遺伝子として定義する。

2. 発生分化モデルの構築 ナイルティラピアを用いた詳細な顎骨形成過程の記述をもとに、顎骨の発生分化モデルを構築する。

3. 候補遺伝子の比較ゲノム解析 問題点として指摘したように多くの遺伝子のシス調節領域を用いて比較ゲノム解析をおこなうことが容易ではないため、組織レベルでの遺伝子発現解析によって得られた情報をもとに候補遺伝子を選択し、発現調節領域の配列解析をおこなう。そのさい、魚類のゲノム情報をレファレンスとして、保存性の高い調節領域を検出する。またDNAチップを用いた顎骨骨化過程における網羅的遺伝子発現のクラスタリング解析を見直すことによって、包括的な発現調節機構の推定をおこなう。

4. 遺伝子機能解析 遺伝学的手法を確立することにより、発生分化モデルにおける各遺伝子の顎骨骨化過程における役割を解明するために機能解析をおこなう。これらを順次おこなうことにより、シクリッドの顎部形態多様化に関する分子の基盤を明らかにするという目的を達成できるものと思われる。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1.0310062144

Takahashi, K., Terai, Y., Nishida, M., and Okada, N., Phylogenetic relationships and ancient incomplete lineage sorting among cichlid fishes in Lake Tanganyika as revealed by analysis of the insertion of retroposons, *Mol. Biol. Evol.*, 18, 2057-2066 (2001)

2.0310062147

Takahashi, K., Nishida, M., Yuma, M., and Okada, N., Retroposition of the AFC family of SINEs (short interspersed repetitive elements) before and during the adaptive radiation of cichlid fishes in Lake Malawi and related inferences about phylogeny, *J. Mol. Evol.*, 53, 496-507 (2001)

3.0304281302

Terai, Y., Mayer, W. E., Klein, J., Tichy, H., and Okada, N., The effect of selection on a long wavelength-sensitive (LWS) opsin gene of Lake Victoria cichlid fishes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 15501-15506 (2002)

4.0211061903

Kajikawa, M., and Okada, N., LINEs Mobilize SINEs in the Eel through a Shared 3' Sequence, *CELL*, 111, 433-444 (2002)

5.0304281132

Nishihara, H., Terai, Y., and Okada, N., Characterization of Novel Alu- and tRNA-Related SINEs from the Tree Shrew and Evolutionary Implications of Their Origins, *Mol. Biol. Evol.*, 19, 1964-1972 (2002)

6.0210102048

Sugawara, T., Terai, Y., and Okada, N., Natural selection of the rhodopsin gene during the adaptive radiation of East African great lakes cichlid fishes, *Mol. Biol. Evol.*, 19, 1807-1811 (2002)

7.0210102053

Terai, Y., Morikawa, N., and Okada, N., The evolution of the pro-domain of bone morphogenetic protein 4 (bmp4) in an explosively speciated lineage of East African cichlid fishes, *Mol. Biol. Evol.*, 19, 1628-1632 (2002)

8.0210102051

Takahashi, K., and Okada, N., Mosaic structure and retropositional dynamics during evolution of subfamilies of short interspersed elements in African cichlids, *Mol. Biol. Evol.*, 19, 1303-1312 (2002)  
9.0206261226

Terai, Y., Morikawa, N., Kawakami, K., and Okada, N., Accelerated Evolution of the Surface Amino Acids in the WD-Repeat Domain Encoded by the hagoromo Gene in an Explosively Speciated Lineage of East African Cichlid Fishes, *Mol. Biol. Evol.*, 19, 574-578 (2002)  
10.0304281138

Ogiwara, I., Miya, M., Ohshima, K., and Okada, N., V-SINEs: a new superfamily of vertebrate SINEs that are widespread in vertebrate genomes and retain a strongly conserved segment within each repetitive unit, *Genome Res.*, 12, 316-324 (2002)  
11.0405121834

Ohshima, K., Hattori, M., Yada, T., Gojobori, T., Sakaki, Y., and Okada, N., Whole-genome screening indicates a possible burst of formation of processed pseudogenes and Alu repeats by particular L1 subfamilies in ancestral primates, *Genome Biol.*, 4 (11) R74 (2003)  
12.0404092013

Terai, Y., Morikawa, N., Kawakami, K., and Okada, N., The complexity of alternative splicing of hagoromo mRNA is increased in an explosively speciated lineage in East African cichlids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 28, 12798-12803 (2003)  
13.0310062142

Terai, Y., Takahashi, K., Nishida, M., Sato, T., and Okada, N., Using SINEs to Probe Ancient Explosive Speciation: "Hidden" Radiation of African Cichlids?, *Mol. Biol. Evol.*, 20, 924-930 (2003)  
14.0404092005

Piskurek, O., Nikaido, M., Boeadi, Baba, M., and Okada, N., Unique mammalian tRNA-derived repetitive elements in Dermoptera: The t-SINE family and its retrotransposition through multiple sources, *Mol. Biol. Evol.*, 20, 1659-1668 (2003)  
15.0404160846

Murata, Y., Nikaido, M., Sasaki, T., Cao, Y., Fukumoto, Y., Hasegawa, M., and Okada, N., Afrotherian phylogeny as inferred from complete mitochondrial genomes, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 28, 253-260 (2003)  
16.0404160844

Nikaido, M., Cao, Y., Harada, M., Okada, N., and Hasegawa, M., Mitochondrial phylogeny of hedgehogs and monophyly of Eulipotyphla, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 28, 276-284 (2003)  
17.0404160835

Kawai, K., Nikaido, M., Harada, M., Matsumura, S., Lin, L. K., Wu, Y., Hasegawa, M., and Okada, N., The status of the Japanese and East Asian bats of the genus *Myotis* (Vespertilionidae) based on mitochondrial sequences, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 28, 297-307 (2003)  
18.0404092027

Nikaido, M., Nishihara, H., Fukumoto, Y., and Okada, N., Ancient SINEs from African Endemic Mammals, *Mol. Biol. Evol.*, 20, 522-527 (2003)  
19.0304281146

Watanabe, M., Kobayashi, N., Fujiyama, A., and Okada,

- N., Construction of a BAC library for Haplochromis chilotes, a cichlid fish from Lake Victoria, *Genes and Genet. Syst.*, 78, 103-105 (2003)  
20.0404160839
- Nikaido, M., Cao, Y., Okada, N., and Hasegawa, M., The phylogenetic relationships of insectivores with special reference to the lesser hedgehog tenrec as inferred from the complete sequence of their mitochondrial genome, *Genes and Genet. Syst.*, 78, 107-112 (2003)  
21.0501231955
- Sugie, A., Terai, Y., Ota, R., and Okada, N., The evolution of genes for pigmentation in African cichlid fishes, *GENE*, 343, 337-346 (2004)  
22.0501232009
- Watanabe, M., Kobayashi, N., Shin-i, T., Tateno, Y., Kohara, Y., and Okada, N., Extensive analysis of ORF sequences from two different cichlid species in Lake Victoria provides molecular evidence for a recent radiation event of the Victoria species flock, *GENE*, 343, 263-269 (2004)  
23.0501232000
- Shedlock, A. M., Takahashi, K., and Okada, N., SINEs of speciation: tracking lineages with retroposons, *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 545-553 (2004)  
24.0501232003
- Sasaki, T., Takahashi, K., Nikaido, M., Miura, S., Yasukawa, Y., and Okada, N., First Application of the SINE (Short Interspersed Repetitive Element) Method to Infer Phylogenetic Relationships in Reptiles: An Example from the Turtle Superfamily Testudinoidea, *Mol. Biol. Evol.*, 21, 705-715 (2004)  
25.0404092021
- Terai, Y., Takezaki, N., Mayer, W., E., Tichy, H., Takahata, N., Klein, J., and Okada, N., Phylogenetic relationships among East African haplochromine fishes as revealed by short interspersed elements (SINEs), *J. Mol. Evol.*, 58, 64-78 (2004)  
26.0501231957
- Okada, N., Shedlock, A. M., and Nikaido, M., Retroposon mapping in molecular systematics, *Methods. Mol. Biol.*, 260, 189-226 (2004)  
27.
- Ohshima, K., and Okada, N., SINEs and LINEs: symbionts of eukaryotic genomes with a common tail, *Cytogenet Genome Res.*, 110, 475-490 (2005)  
28.
- Nishihara, H., Satta, Y., Nikaido, M., Thewissen, J. G., Stanhope, M. J., and Okada, N., A Retroposon Analysis of Afrotherian Phylogeny, *Mol Biol Evol.*, 22, 1823-1833 (2005)  
29.
- Kijimoto, T., Watanabe, M., Fujimura, K., Nakazawa, M., Murakami, Y., Kuratani, S., Kohara, Y., Gojobori, T., and Okada, N., cimpl, A Novel Astacin Family Metalloproteinase Gene from East African Cichlids, Is Differentially Expressed Between Species During Growth, *Mol Biol Evol.*, 22, 1649-1660 (2005)  
30.
- Sugawara, T., Terai, Y., Imai, H., Turner, G. F., Koblmuller, S., Sturmbauer, C., Shichida, Y., and Okada, N., Parallelism of amino acid changes at the RH1 affecting spectral sensitivity among deep-water cichlids from Lakes Tanganyika and Malawi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 5448-5453 (2005)  
31.
- Sasaki, T., Nikaido, M., Hamilton, H., Goto, M., Kato, H., Kanda, N., Pastene, L. A., Cao, A., Fordyce, R. E., Hasegawa, M., and Okada, N., Mitochondrial phylogenetics and evolution of mysticete whales, *Syst Biol.*, 54, 77-90 (2005)  
32.
- Kajikawa, M., Ichyanagi, K., Tanaka, N., and Okada, N., Isolation and characterization of active LINE and SINEs from the eel, *Mol. Biol. Evol.*, 22, 673-682 (2005)  
33.
- Watanabe, M., Nikaido, M., Tsuda, T. T., Inoko, H., Mindell, D. P., Murata, K., and Okada, N., The rise and fall of the CR1 subfamily in the lineage leading to penguins, *Gene* (in press)  
34.
- Akasaki, T., Nikaido, M., Tsuchiya, K., Segawa, S., Hasegawa, M., and Okada, N., Extensive mitochondrial gene arrangements in coleoid Cephalopoda and their phylogenetic implications, *Mol. Phylogenet. Evol.* (in press)  
35.
- Nikaido, M., Hamilton, H., Makino, H., Sasaki, T., Takahashi, K., Goto, M., Kanda, N., Pastene, L. A., and Okada, N., Baleen whale phylogeny and a past extensive radiation event revealed by SINE insertion analysis, *Mol. Biol. Evol.* (in press)  
36.
- Kobayashi, N., Watanabe, M., Kijimoto, T., Fujimura, K., Nakazawa, M., Ikeo, K., Kohara, Y., Gojobori, T., and Okada, N., magp4 gene may contribute to the diversification of cichlid morphs and their speciation, *Gene* (in press)