

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：63801

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23113007

研究課題名（和文）異種トゲウオ間のゲノム不適合と生殖隔離の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of genomic incompatibility and reproductive isolation in sticklebacks

研究代表者

北野 潤（Kitano, Jun）

国立遺伝学研究所・集団遺伝研究系・教授

研究者番号：80346105

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 79,300,000円

研究成果の概要（和文）：転座領域におけるゲノム上の特徴を明らかにするために、日本海イトヨと太平洋イトヨのゲノムを解読し、ネオ性染色体上のゲノム配列の特徴を明らかにした。また、近縁のイトヨ種間の雑種不妊の候補遺伝子として修飾ヒストンに結合するTRIM類の遺伝子を発見した。この遺伝子は、種間で異なるタイプの修飾ヒストンに結合する。この候補遺伝子の遺伝子操作イトヨの作出に成功した。性染色体融合がどの程度普遍的な現象であるのかを明らかにするために、データベースを作成し解析するとともに、その原因として、メス減数分裂ドライブ、有害融合のdriftと性的葛藤選択の可能性を提唱した。

研究成果の概要（英文）：To characterize the net-sex chromosomes, we conducted whole genome sequencing of the Japan Sea and Pacific Ocean sticklebacks. We also identified a candidate gene encoding a TRIM gene within the QTL causing hybrid male sterility. To investigate the patterns of sex chromosome-autosome fusions, we made a database and analyzed the patterns. To explain the observed patterns, we proposed that female meiotic drive, genetic drift and sexually antagonistic selection may drive the fusions.

研究分野：進化遺伝学

キーワード：種分化 性染色体 トゲウオ 魚

1. 研究開始当初の背景

異種ゲノムが出会った際に生じる雑種異常や異種間交雑を防ぐ生殖隔離の分子機構について、野外動物において解明された例は殆どない。種分化(生殖隔離の進化)の遺伝機構の研究は、特定の昆虫や植物などに限られており、雑種異常を引き起こす原因遺伝子が特定された例も非常に少ない(Coyne and Orr 2004, *Speciation*, Sinauer)。特に、野外脊椎動物における種分化の遺伝機構については殆ど未解明である。いったん原因遺伝子を特定することができる、種分化の原因となった変異の生じた時期を推定したり、異なる分類群の種分化でも同じ原因遺伝子が働いているのか、種分化遺伝子にはどのような選択圧が働いたのかを明らかにしたり、種分化に関わる多くの未解明の問いを明らかにできる。

申請者は、野外動物における種分化研究のモデル系として、トゲウオ科魚類の日本海型イトヨと太平洋型イトヨの系を確立した。日本に生息する日本海型と太平洋型イトヨの間に働く生殖隔離機構の量的形質遺伝子座(QTL)マッピングを行った結果、日本海型と太平洋型は、性染色体転座によって性染色体構造が異なっており、その領域に雑種不妊や行動隔離に重要な遺伝子が集積しているということを明らかにした(Kitano *et al.* 2009, *Nature* 461:1079-1083)。これは、性染色体転座が、種の形成に関わるという可能性を示唆する最初の実証例である。

性染色体転座は、トゲウオ科のみならず、他の魚類、両生類、爬虫類などでも頻繁に見られ、哺乳類や鳥類でも多くの報告がなされている(White 1945, *Animal Cytology and Evolution*, Cambridge University Press ; Kitano and Peichel 2012)。性染色体上には性的拮抗作用(雌雄で有利な性質が異なること)を持つ変異が集積しやすいことが知られている(eg. Rice 1984, *Evolution* 38:735-742)。生殖や求愛

に関わる遺伝子は一方の性にのみ重要であり、他方の性では中立、ないしは、むしろ不利な場合が多いことから、座位内性的拮抗(*intra-locus sexual conflict*)遺伝子の代表と考えられている。従って、近縁種間で性染色体の構成が変化すると、生殖や求愛に関わる遺伝子の分化が促進される可能性が示唆される(Kitano and Peichel 2012)。また、性染色体は、繰り返し配列の蓄積、Y染色体の退縮、それに伴うX染色体の量的補償など常染色体と異なる特徴を有しており(Vicoso and Charlesworth 2006 *Nat Rev Genet* 7:645-653; Bellot *et al.* 2010 *Nature* 466:612-616)、同じ遺伝子が常染色体上から性染色体へ転位した場合に遺伝子発現調節等の点で分化が起こる可能性が考えられる。このように、我々が確立したイトヨの系を用いて種分化の分子機構を解明したり、性染色体転座の機能を解明したりすることは、広い分類群にまたがる種分化の共通機構を理解し、性染色体転座がもたらす「遺伝子機能の多様化」や「エピジェネティクス制御」への効果を明らかにすることができることから「ゲノム・遺伝子相関学」の確立に大きく貢献するものと考えられる。

2. 研究の目的

異種ゲノムが出会った際に生じる雑種異常や異種間交雑を防ぐ生殖隔離の分子機構について、野外動物において解明された例は殆どない。申請者らは、野外動物における種分化研究のモデル系を確立することを目的として、トゲウオ科魚類に着目し、国内外の研究者との必要な共同研究体制を整えてきた。

本研究では、トゲウオにおける生殖隔離の原因遺伝子を単離することによって、異種間ゲノムが引き起こすゲノム軋轢の分子機構を解明する。また、トゲウオ近縁種間の全ゲノム配列比較、RNA-seq比較などを行うことによって、転座によって生じたネオ性染色体

の持つゲノム上の特徴を明らかにするとともに、他の分類群における類似の現象の有無、さらには、共通性と違いを生み出す進化理論の考察を行う。

3. 研究の方法

まず、モデル生物として確立した日本海と太平洋のイトヨについて全ゲノムを解読したり、トランスクリプトームを解析したりすることによって、ネオ性染色体のゲノム上の特徴を明らかにする。具体的には、雌雄5尾ずつの合計20尾についてHiSeq2000で高カバレッジにて配列を読む。配列は、アラスカ湖産の参照配列にマッピングし、SNPコールを実施して、ヘテロ接合度を解析したり、種間、あるいは、X染色体とY染色体間での同義置換・非同義置換率を計算したりする。

2型間で配列が大きく異なっている分子、あるいは、発現量の大きく異なっている分子を候補遺伝子として選定する。この分子について、*in vitro*での生化学実験を行う。具体的には、種々の修飾ヒストンの結合実験を実施して、近縁種間での機能分化の有無を検証する。

ついで、*in vivo*での機能解析を実施する。それに先立って、トゲウオにおけるノックアウトとトランスジェニックの実験系を確立する。具体的には、*tol2*トランスポゾンでの遺伝子導入系、TALENやCRISPR/cas9でのノックアウト系をトゲウオに導入する。ついで、上記の候補遺伝子の遺伝子操作個体を作成する。

性染色体の転換について、広い分類群についてのデータベースを作成し、パターンを解析するとともに、そのパターンを生み出す進化理論を数理モデルとシミュレーションにて構築する。

4. 研究成果

転座領域におけるゲノム上の特徴を明ら

かにするために、日本海イトヨと太平洋イトヨの雌雄5個体ずつについてHiSeq2000を用いて1個体平均80倍以上のカバレッジで、89%以上の領域について配列を決定した。その結果、転座をおこし、組み換えがXとYで抑制されている領域において、neo-X染色体とneo-Y染色体の間で配列レベルでの分化が生じており、アミノ酸置換を起こす変異も多数蓄積していることが分かった(Yoshida et al. 2014)。また、neo-X染色体とneo-Y染色体の間でおそらくシス変異も起こしており、それが原因でネオ性染色体上に発現量の雌雄差を示す遺伝子が濃縮されていることが明らかになった。さらに、雑種で見られる異常を解析するために、雑種を作成し、RNAシーケンスを実施し、いくつかの雑種で異常を示す遺伝子を同定した(Yoshida et al. 準備中)。種間で異なる発現を示すトランスポゾンや低分子RNAも同定した(Kitano et al. 2013など)。

雑種不妊についてエピスタシスを組み込んだモデルを用いてQTL解析を行った結果、X染色体上の2カ所に雑種不妊の原因遺伝子座があり、これらの相互作用でほぼ完全に雑種不妊が説明できることが明らかになった。さらに具体的な雑種不妊の原因遺伝子を絞り込むために、QTL領域内の配列を比較し、同義置換率に比して非同義置換率が高く($Ka/Ks > 1$)、精巣で発現が確認されており、DNA/クロマチン結合能が示唆される遺伝子として修飾ヒストンに結合するTRIM類の遺伝子を発見した。この分子は種間で異なるタイプの修飾ヒストンに結合する。現在、この遺伝子操作トゲウオの機能を解析中である。

性染色体融合が、どの程度普遍的な現象であるのかを明らかにするために、複数の分類群についてX染色体-常染色体融合が起こった種、Y染色体-常染色体融合が起こった種の数をカウントした。その結果、魚をはじめとする多くの分類群ではY染色体-常染色体融

合が X 染色体-常染色体融合に比して多く (Kitano & Peichel 2012; Pennell et al. 2015)、哺乳類のみが例外的に、両方の融合ををほぼ同程度に起こすことを見いだした (Yoshida & Kitano 2012)。さらに、哺乳類において X 染色体-常染色体融合を持つ種と Y 染色体-常染色体融合を持つ種を比較した結果、X 染色体と常染色体の融合は中部動原体染色体を多く持つ哺乳類で起こりやすく、Y 染色体と常染色体の融合は末端動原体染色体を多く持つ哺乳類で起こりやすいことを世界で初めて見いだした。また、X 染色体と常染色体の融合には、メスが卵子を形成する減数分裂の過程に、どのような形の染色体が卵子に伝達されやすいか (メス減数分裂ドライブ; female meiotic drive) が強く影響しているのではないかという仮説を提唱し、*Evolution* に掲載された (Yoshida & Kitano, 2012)。この論文は、査読者とエディターから高く評価されたとともに、読むべき論文としてトップリサーチャーが選定する F1000 論文にも選ばれた。魚類や爬虫類で Y 染色体融合が多い原因として、有害融合の drift と性的葛藤選択の可能性を提唱した (Pennell et al. 2015; Matsumoto and Kitano 2016 in press)。

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 34 件)

1. Kawajiri, M., Fujimoto, S., Yoshida, K., Yamahira, K., and Kitano, J. Genetic architecture of the variation in male-specific ossified processes on the anal fins of Japanese medaka. ***G3: Genes, Genomes, Genetics*** 5: 2875-2884 (2015) (査読有)
2. Yoshida K, Makino T, Yamaguchi K, Shigenobu S, Hasebe M, Kawata M, Kume M, Mori S, Peichel CL, Toyoda A,

Fujiyama A, Kitano J. Sex chromosome turnover contributes to genomic divergence between incipient stickleback species. ***PLoS Genetics*** 10: e1004223. (2014) (査読有)

3. Bachtrog D, Mank JE, Peichel CL, Kirkpatrick M, Otto SP, Ashman TL, Hahn MW, Kitano J, Mayrose I, Ming R, Perrin N, Ross L, Valenzuela N, Vamosi JC. Sex determination: Why so many ways of doing it? ***PLoS Biology*** 12: e1001899. (2014) (査読有)
4. Tamate CS, Kawata M, Makino T Contribution of non-ohnologous duplicated genes to high habitat variability in mammals. ***Molecular Biology and Evolution***, 31: 1779-1786 (2014) (査読有)
5. Ravinet M, Takeuchi N, Kume M, Mori S, Kitano J. Comparative analysis of Japanese three-spined stickleback clades reveals the Pacific Ocean lineage has adapted to freshwater environments while the Japan Sea lineage has not. ***PLoS ONE*** 9: e112404. (2014) (査読有)
6. Kawajiri M, Yoshida K, Fujimoto S, Mokodongan D, Ravinet M, Kirkpatrick M, Yamahira K, Kitano J. Ontogenetic stage-specific quantitative trait loci contribute to divergence in developmental trajectories of sexually dimorphic fins between medaka populations. ***Molecular Ecology*** 23: 5258-5275. (2014) (査読有)
7. Fujimoto S, Kawajiri M, Kitano J, Yamahira K. Female mate preference for longer fins in medaka. ***Zoological Science*** 31: 703-708. (2014) (査読有)
8. Kusakabe M, Ishikawa A, Kitano J.

- Relaxin-related gene expression differs between anadromous and stream-resident stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following seawater transfer. **General and Comparative Endocrinology** 205: 197-206. (2014) (査読有)
9. Ashman TL, Bachtrog D, Blackmon H, Goldberg E, Hahn M, Kirkpatrick M, [Kitano J](#), Mank J, Mayrose I, Ming R, Otto SP, Peichel CL, Pennell MW, Perrin N, Ross L, Valenzuela N, Vamosi JC. Tree of Sex: A database of sexual systems. **Scientific Data** 1:140015. (2014) (査読有)
 10. McLysaght A, [Makino T](#), Grayton H, Tropeano M, Mitchell K, Vassos E, Collier DA. (2014) Ohnologs are overrepresented in pathogenic copy number mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 111: 361-366 (2014) (査読有)
 11. Tomimatsu H, Sasaki T, Kurokawa H, Bridle JR, Fontaine C, [Kitano J](#), Stouffer DB, Vellend M, Bezemer TM, Crutsinger G, Fukami T, Hadly EA, van der Heijden MGA, Kawata M, Kéfi S, Kondoh M, Kraft NJB, McCann KS, Montoya J, Mumby P, Nakashizuka T, Petchey OL, Romanuk T, Suding KN, Takimoto G, Urabe J, Yachi S. Sustaining ecosystem functions in a changing world: a call for an integrated approach. **Journal of Applied Ecology** 50: 1124–1130 (2013) (査読有)
 12. Lema SC, [Kitano J](#). Hormones and phenotypic plasticity: implications for the evolution of integrated adaptive phenotypes. **Current Zoology** 59: 506–525 (2013) (査読有)
 13. [Kitano J](#), Yoshida K, Suzuki Y. RNA sequencing reveals small RNAs differentially expressed between incipient Japanese threespine sticklebacks. **BMC Genomics** 14:214 (2013) (査読有)
 14. Cassidy LM, Ravinet M, Mori S, [Kitano J](#). Are Japanese freshwater populations of threespine stickleback derived from the Pacific Ocean lineage? **Evolutionary Ecology Research** 15: 295–311 (2013) (査読有)
 15. [Kitano J](#), Lema SC. Divergence in thyroid hormone levels between juveniles of marine and stream ecotypes of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). **Evolutionary Ecology Research** 15: 143–153 (2013) (査読有)
 16. Ishikawa A, Takeuchi N, Kusakabe M, Kume M, Mori S, Takahashi H, [Kitano J](#). Speciation in ninespine sticklebacks: reproductive isolation and phenotypic divergence among cryptic species of Japanese ninespine stickleback. **Journal of Evolutionary Biology** 26: 1417–1430 (2013) (査読有)
 17. [Makino T](#), McLysaght A, Kawata M. Genome-wide deserts for copy number variation in vertebrates. **Nature Communications** 4:2283 (2013) (査読有)
 18. Makanae K, Kintaka R, [Makino T](#), Kitano H and Moriya H. (2013) Identification of dosage-sensitive genes in *Saccharomyces cerevisiae* using the genetic tug-of-war method. **Genome Research** 23:300-311 (2013) (査読有)
 19. [Kitano J](#), Mori S, Peichel C. L. Reduction of sexual dimorphism in

- stream-resident forms of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Journal of Fish Biology* 80: 131-146 (2012) (査読有)
20. Yoshida, K. and Kitano, J. The contribution of female meiotic drive to the evolution of neo-sex chromosomes. *Evolution* 66: 3198-3208. (2012) (査読有)
21. Adachi, T., A. Ishikawa, S. Mori, W. Makino, M. Kume, M. Kawata, and J. Kitano. Shifts in morphology and diet of non-native sticklebacks introduced into Japanese crater lakes. *Ecology and Evolution* 2:1083-1098. (2012) (査読有)
22. Kitano, J., Peichel, C. L. Turnover of sex chromosomes and speciation in fishes. *Environmental Biology of Fishes* 94: 549-558. (2012) (査読有)
23. Kitano, J., Ishikawa, A., Kume, M., and Mori, S. Physiological and genetic basis for variation in migratory behavior in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Ichthyological Research* 59: 293-303. (2012) (査読有)

[学会発表] (計 33 件)

1. Kitano, J. Drivers of sex chromosome-autosome fusions and their roles in speciation. American Genetic Association Symposium: Chromosome Evolution. *Seattle, WA, USA*. 2015 August 17-20 (招待講演)
2. Kitano, J. Why are there so many species with Y-autosome fusions? Congress of the European Society of Evolutionary Biology, Lausanne, Switzerland, August 9-14 2015

3. Ishikawa A, and Kitano J. Does a DHA synthesis gene play a key role in stickleback freshwater colonization?" *Stickleback 2015, Eighth International Conference on Stickleback Behavior and Evolution*, Stony Brook, USA, July 26-31, 2015

[図書] (計 6 件)

1. Kitano, J., Ishikawa, A., and Lema, S. C. (2014) Integrated genomics approaches in evolutionary and ecological endocrinology. In: *Ecological Genomics* (Landry, C. and Aubin-Horth, N. Ed.) p. 299-319. Springer

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

北野 潤 (KITANO, Jun)

国立遺伝学研究所・集団遺伝研究系・教授
研究者番号：80346105

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

牧野能士 (MAKINO, Takashi)

東北大学大学院・生命科学研究科・准教授
研究者番号：20443442