

平成30年6月9日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18555

研究課題名(和文) 鳥類の水かきをモデルとした収斂進化のゲノム基盤の解明

研究課題名(英文) Genomic basis of convergent evolution of the interdigital web in Aves

研究代表者

関 亮平 (SEKI, Ryohei)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・特任研究員

研究者番号：40746624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、鳥類の多系統群で見られる水かきをモデルとして、形態の収斂の要因をゲノム配列中に見出すことである。まず48種のトリゲノムの比較解析を行い、水かきを持つ種において特異的かつ高度に保存されている非コード配列を多数特定した。また、水かきを持つが系統的に独立した2種(アヒルおよびペンギン)と水かきを持たない種(ニワトリ)の胚の後肢指間部のトランスクリプトーム解析を実施した。これらの結果を照らし合わせ、水かきを持つ種において共通かつ特異的に保存された配列を近傍に持つ、水かき形成に関わり得る遺伝子を複数特定した。本研究によって、形態の収斂進化に共通のゲノム配列が関与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：I aimed to reveal genomic basis of convergent evolution of the interdigital web, which is observed in polyphyletic groups in birds. I conducted comparative genomics using whole genome sequences of 48 birds and identified non-coding sequences that are specifically conserved in webbed bird species. To screen the candidate genes associated with the formation of the interdigital web, I compared transcriptomes of interdigital regions in the leg bud of chicken (non-webbed), duck and penguin (webbed, belonging to phylogenetically independent clades). Taken these results together, I successfully identified candidate genes which are located close to the genomic elements specifically conserved in webbed birds and possibly associated with development of the interdigital web. My study suggests that common genomic sequences could contribute to emergence of convergent morphological traits.

研究分野：発生進化学

キーワード：発生 四肢 鳥類 収斂進化 比較ゲノム

1. 研究開始当初の背景

動物のかたちの違いは様々な分類階級で観察される。極端な例を挙げれば、魚と鳥の間にも、マウスとラットの間にも、形態差は存在する。いずれの場合でも、形態差の要因は、究極的にはゲノム配列の違いとして見出すことができるはずである。私はこれまでに、鳥類という比較的大きな分類群に着目し、鳥類に共通して見られる特異的な形態（翼や羽毛など）の形成要因を、鳥類にのみ高度に保存されたゲノム配列中に見出すことを試みた。その成果として、鳥類がその進化の過程で新たに獲得したエンハンサーが鳥に特徴的な形態を生み出す基盤となっていることを明らかにした (Seki et al., 2017, Nat. Commun.)。では、より下位の分類群、例えば目 (もく、order) の間で見られる形態差は、どのようなゲノム情報の違いに起因するのだろうか。

鳥類の中に見られるわかりやすい形態差のひとつに、水かきの有無が挙げられる。水かきの有無にかかわらず、指ははじめ団扇のように互いに繋がった状態で発生する。水かきを持たない種では、その後の細胞死により指間部が消失し指が分離するが、水かきを持つ種では細胞死が抑制され、指同士が皮膜 (= 水かき) で繋がったままとなる。水かきを持つ種としてこれまで実験に用いられてきたアヒルでは、指間部に *Gremlin* という BMP 阻害因子が発現し、細胞死を誘導する BMP シグナルの活性が低下することが水かき形成の要因であると明らかとなっている (図 1、Merino et al., 1999, Development)。しかしながら、どのようなゲノム配列の改変 (進化) がアヒル特異的な *Gremlin* の発現をもたらしたのかは不明のままである。

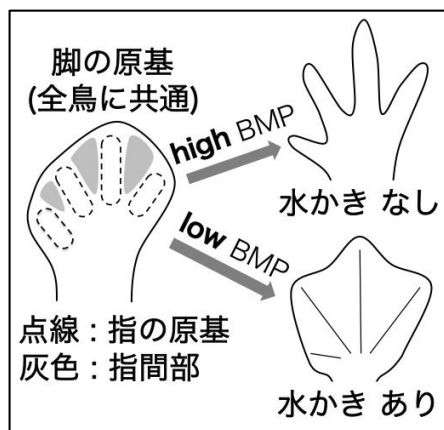


図 1 . 水かきの形成メカニズム
指間部の BMP 活性の程度が水かきの有無を決める。

水かきはアヒルだけでなく、ペリカンやカモメ、ペンギンなどにも存在する。興味深いのは、アヒルを含むカモ目とそれ以外の水鳥は系統的に大きく離れているという点である (図 2)。すなわち、水かきは収斂進化した形質であると考えられる。幸いアヒルとペ

ンギンの有精卵を日本国内で入手できるため、水かきは収斂進化のゲノム基盤を明らかにするための優れたモデルとなり得る。

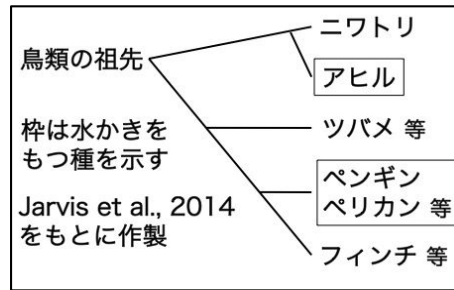


図 2 . 水かきの有無に着目した鳥類の系統関係の簡略図

アヒルと記した箇所にはカモ目が含まれる。その他の多くの水鳥は、カモ目とは系統的に独立している。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では、水かきを収斂進化させた多系統群の鳥同士の間にもどのようなゲノム配列レベルの共通性があるのかを解析することで、形態の収斂進化のゲノム基盤を明らかにすることを目的とした。

具体的には、水かきを持つ種と持たない種の間でゲノムの比較解析を行い、水かきを持つ種において特異的に保存されている非コード配列を特定する。加えて、後肢指間部における遺伝子の発現状態も網羅的に比較する。水かきを持つ種と持たない種の間で明確な発現の差を示し、かつ上で特定した非コード配列を近傍に持つ遺伝子を水かき形成に関わる有力な候補として特定する。

3. 研究の方法

(1) 比較ゲノム解析による候補ゲノム配列の特定

既に公開されている 48 種のトリゲノムの情報を用いて比較ゲノム解析を実施する。この中にはアヒルやペンギンを含む 9 種の水かきを持つ鳥が含まれる。本研究では、系統的に独立していながらも、水かきを持つ鳥であればどの種でも共通に保存されているような配列に特に着目することとした。

(2) トランスクリプトームの比較による水かき形成に関わる候補遺伝子の特定

水かきを持たない鳥 (ニワトリ) と水かきを持つが系統的に独立した鳥 (アヒル、ペンギン) の後肢芽指間部領域の遺伝子の発現状態を RNA-seq により網羅的に比較する。その前段階として、RNA をどの発生段階のどの領域からサンプリングすれば良いかを決定するために、TUNEL 法により上記 3 種の後肢芽における細胞死領域を可視化する。

RNA-seq を実施した後、アヒルとペンギンで共通かつニワトリとは異なる発現変動パターンを示す遺伝子を見つけ出す。

(3) 候補遺伝子の発現解析

(2) で得られた遺伝子の中で、(1) で特定した非コード配列を近傍に持つものは、水かきを作り出す原因遺伝子の有力な候補と考えられる。これに当てはまる遺伝子を探した後に、その詳細な発現パターンを *in situ* hybridization により可視化し、RNA-seq の結果から予想されるような、水かきを持つ鳥において特異的な発現を示すかどうかを検証する。

4. 研究成果

(1) 比較ゲノム解析による候補ゲノム配列の特定

まず、ゲノムが公開されている 48 種の鳥を、水かきを持つ 9 種、持たない 35 種、その他 (文献や写真で水かきの有無を確認できなかった種) 4 種に分類した。水かきを持つグループについてアライメントを実施し、配列の保存度を算出するプログラム phastCons を用いて保存性の高い非コード配列 (highly conserved elements, HCEs) を特定した。得られた HCEs が水かきを持つ鳥に特異的に保存されているかどうかを判定するために、各 HCE を 48 種のトリゲノムに対して相同性検索にかけ、鳥ごとに bitscore (相同性の指標となる数値) を算出し、降順に並べた。本研究では、水かきを持つ鳥のうち 7 種以上がこのスコアの上位を占め、かつその 7 種にアヒルが含まれるものを「水かきを持つ鳥に特異的な高度保存配列」(webbed bird specific highly conserved elements, WeSHCEs) として扱うこととした。

解析の結果、現在までに、20bp 以上の長さを持つ WeSHCEs を 1966 個特定することができた。この結果は、系統的に独立しているにも関わらず、水かきを持つ鳥だけに共通する配列が存在することを示している。WeSHCEs が各クレードにおいて独立に獲得されたのか (収斂なのか) あるいは鳥類の祖先において既に存在していた配列が水かきを持つ種でのみ失われずに残ったのかは、今後の興味深い研究対象である。

(2) トランスクリプトームの比較による水かき形成に関わる候補遺伝子の特定

TUNEL 法による細胞死領域の可視化

鳥類の後肢には第 1 指 (親指) から第 4 指 (薬指) までの 4 本の指が存在する。つまり、指間部 (interdigit, ID) は 3 領域存在し、本研究では、第 1 指側から順に ID1、ID2、ID3 と呼ぶことにする (図 3)。ニワトリ、アヒル、ペンギンの胚を用いて、これら 3 領域の細胞死の状態を発生段階ごとに TUNEL 法により可視化した。

発生段階 29 (HH29 と記す。以下同様) では、3 種の胚のいずれの指間部でも細胞死はほとんど検出されなかった。HH31 では、ニワトリの ID2,3 では広範囲で細胞死が検出されたが、

アヒルおよびペンギンの ID2,3 では先端部に限局していた。アヒル、ペンギンにおいても水かきがない ID1 においては、ニワトリと同程度の細胞死が観察された。

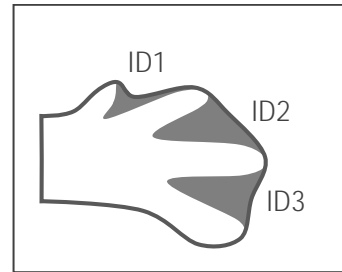


図 3. 後肢芽の指間部領域

ニワトリでは、いずれの領域でも細胞死が同程度に起こる。アヒル・ペンギンでは ID2,3 の細胞死の程度が明らかに小さい。

トランスクリプトームの比較による水かき形成に関わる候補遺伝子の特定

以上の結果をもとに、(A) HH29 の ID2,3、(B) HH31 の ID2,3、(C) HH31 の ID1 の 3 サンプルを各動物胚から採取し、RNA-seq を行うこととした。(A) と (B) を比較することにより発生段階間の発現動態の違いを、(B) と (C) の比較により領域間の発現動態の違いを、それぞれ明らかにすることが目的である。

具体的には、アヒルとペンギンでは同じ発現動態を示し、かつニワトリではそれとは異なる発現動態を示すような遺伝子を探した。その結果、合計で約 650 個の候補遺伝子に絞り込むことに成功した。

(3) 候補遺伝子の発現解析

(2) で得られた候補遺伝子の中で、その近傍に (1) で特定した WeSHCEs が存在するものを探索したところ、最終的に 160 個の遺伝子まで絞り込むことができた。この中から、ニワトリとアヒル・ペンギンの間で顕著な違い (例えば、両方で発現量が大きく異なる) を示すいくつかの遺伝子について、その詳細な時空間的発現パターンの解析を、*in situ* hybridization により進めているところである。3 種の動物から該当遺伝子をクローニングするところまでは既に完了している。

現時点で有力と考えられる遺伝子として、BMP 阻害因子である *CHRD1* が挙げられる。この遺伝子の発現量は、HH31 のニワトリの ID1、ID2,3 のいずれにおいても少ない。その一方で、アヒル・ペンギンでは ID1 と比較して ID2,3 で有意に発現量が多いことがわかった (図 4)。指間部の細胞死には BMP 活性の上昇が重要であるため、この遺伝子が水かき形成に関与する可能性は十分にあると考えている。*CHRD1* 遺伝子座近傍の WeSHCE がこの遺伝子の発現制御を担っているかという点は、今後の最優先の課題である。

本研究により、水かきという収斂進化した形質に、共通のゲノム配列と発生メカニズムが関与している可能性が示唆された。

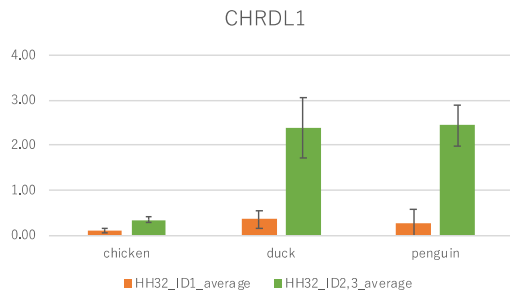


図4 . *CHRD1* の発現動態の種間差
縦軸は RNA-seq 解析より得られた FPKM 値を表す。エラーバーは標準偏差を示す。

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

関亮平、「鳥はいかにして進化してきたか? 鳥だけがもつゲノム配列からのアプローチ」, 第 10 回 Evo-Devo 青年の会 (招待講演) 2017 年 6 月 17 日

関亮平、Cai Li、松原遼、近藤眞央、佐藤智彦、江川史朗、齋藤大介、林真一、入江直樹、Guojie Zhang、田村宏治、城石俊彦、「鳥類の形態的特徴を生み出すゲノム配列とその機能」, 日本遺伝学会第 89 回岡山大会 (招待講演) 2017 年 9 月 14 日

宮腰拓、米井小百合、関亮平、阿部玄武、Sean D. Keeley、工樂樹洋、牧野能士、田村宏治、「鳥類において収斂進化した水かきの形成に関わる、保存されたゲノム配列と発生メカニズムの探索」, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017、2017 年 12 月 8 日

[図書](計 0 件)

[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

researchmap

https://researchmap.jp/SEKI-R_CV

6 . 研究組織

(1)研究代表者

関 亮平 (SEKI, Ryohei)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・