

令和 2 年 5 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03856

研究課題名(和文)ホストを乗り換え永続するアイナメ属半クローンゲノムの起源と進化、遺伝子の特定まで

研究課題名(英文)Origin and evolution of hemiclinal Hexagrammos hybrids elongating the lineage lifetime by host-switching

研究代表者

宗原 弘幸 (MUNEHARA, Hiroyuki)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授

研究者番号：80212249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：配偶子形成の際に組み換えをしない半クローンやクローンは、単性生物であるため短期的な増殖速度が高いが、系代間に生ずる悪性変異がゲノムに蓄積し、長く続かないと考えられてきた。しかし、実際には理論値を超えて存続する系統寿命の長いクローンおよび半クローン生物が知られている。にもかかわらず、系統寿命が延長出来る仕組みは、不明であった。本研究では、半クローンの海産魚アイナメ属で半クローンゲノムのクローン世代と有性世代の非周期的なサイクルにより、半クローンゲノムを更新していることを明らかにした。また父種ゲノムの削除に関わる細胞周期と遺伝子の特定も進め、中心体の形成に関わる遺伝子の不働の可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球上には、多くの子孫を残す自然淘汰による進化を通じて様々な生物が生まれてきた。そのひとつがクローンや半クローンで、雌だけで子を残せるため有利なはずである。しかし子孫の遺伝的な多様性を作り出せない欠点があるため、種や系統の寿命が短く、有性生殖に比べて繁栄出来ないと考えられていた。本研究では、交雑起源の海産魚のアイナメ属の半クローンについて、系代飼育と野外調査を実施した集団構造の解析から、有性生殖世代と半クローン世代を非周期的に交互に行うことで長い系統寿命を持つことを明らかにした。生物多様性の新たな側面と希少種の保存に役立つ半クローン遺伝子の特定と発現に関しても部分的に明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Unisexual vertebrates (i.e., those produced through clonal or hemiclinal reproduction) are typically incapable of purging deleterious mutations, and as a result, are considered short-lived in evolutionary terms although high increasing rate. However, most of clonal and hemiclinal vertebrates have existed far longer than expected theoretical generation longevities. This study clarified that hemiclinal Hexagrammos hybrids use two-way backcrossing (clonal genomes are returned to the gene pool where they can undergo recombination plays an important role in increasing the genetic variability of the hemiclinal genome and reducing the extinction risk). In this way, hemiclinal lineages may have survived longer than predicted through occasional recombinant generation. In addition, genes inducing hemiclinal reproduction by discarding of paternal genome during oogenesis have been identified by RNA-seq although not yet being completely analyzed.

研究分野：魚類遺伝生態学

キーワード：遺伝学 トランスクリプトーム解析 二次的遭遇 ハイブリドジェネシス 遺伝学的集団構造 系統寿命 アイナメ属雑種 半クローン遺伝子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な組み合わせの種間雑種が知られている。それらの多くは、両親ゲノムの遺伝的不和合により、遺伝子発現が不全で短命であることや、成体になっても配偶子が不稔のため子を残すことができない。雑種が子孫を残す方法は、まれに成功する減数分裂で父種と母種の混じり合ったゲノムとして残るか、混じらずにクローンまたは半クローンになることである。半クローンとは、個体発生には両親由来の遺伝子を使うが、配偶子を作る際に父親由来のゲノムを捨て、母親由来のゲノムだけを伝える遺伝様式およびその遺伝様式をする個体のことである。アイナメ属雑種は、世界で6例知られる半クローンの一つで、唯一の海産生物である。父種の種名をとってクジメ系雑種、アイナメ系雑種と呼ぶ2つの系統があり、ともに母種がスジアイナメ、雌個体しか生まれず、父種と戻し交配で系代する。

アイナメ属雑種のこれまでの研究から、従来の(半)クローン研究の2つの定説を揺がす研究成果が得られている。一つは、これらの遺伝様式が、遺伝子によって生ずることである。それまでクローンあるいは半クローンなど特殊な遺伝様式は、組み換えするほど親種間が近縁ではなく、ゲノム和合性が絶妙な種間の交雑で生ずると考えられていた(バランス仮説)。アイナメ属半クローンを使った交配実験からゲノム和合性だけでなく、半クローンを引き起こす遺伝子が存在することが示された。

もう一つは、半クローンの永続性についてである。減数分裂しない半クローンは、クローンと同様にそのゲノムには悪性突然変異が次第に蓄積するため何万世代を超えて子孫が生残できないと考えられている。しかし、実際にはクローンのアマゾンモーリーや半クローンの胎生メダカでも理論値よりも長い系統寿命が知られている。この矛盾は、単性生物の大きなナゾとして広く知られている。

2. 研究の目的

アイナメ属半クローンの研究において、配偶種を換える(**ホストスイッチ**)過程で、悪性変異を削減し、ゲノムをリセットできることを見出した。これは交雑に関わる3種と雑種2系統の系統解析の結果から、アイナメ系雑種は、ゲノムを構成するスジアイナメとアイナメの交雑ではなく、クジメ系雑種がクジメからアイナメにホストスイッチして出現した系統で、現存するアイナメ系雑種は全てその子孫であることが示された。半クローンの特性は父親ゲノムを毎世代「置換」できることで、この特性によりアイナメ系雑種の起源を説明することが出来た。また、これは先述した単性生物のナゾをとく大きなヒントになった。つまり、アイナメ属半クローンの起源系統であるクジメ系雑種でも同様なことが起きていれば、母種のスジアイナメと戻し交配すると、半クローン遺伝子を持った純粋種のスジアイナメに戻る。スジアイナメに戻った個体は組み換えをするので、悪性突然変異を持った半クローンゲノムが更新出来るのである。そうした半クローンゲノムがある世代期で組み換えするシステムは、半クローン系統の長寿命化を説明出来る。本研究では、こうしたシステムがアイナメ属の集団の中で実際に起きてきたことを明らかにし、半クローンゲノムの永続性を実証するとともに、半クローンを発現する遺伝子の特定も進める。

3. 研究の方法

3つのテーマの研究を進めた。(1)父親ゲノムを削除する分子基盤の特定、(2)野外におけるクジメ系雑種の交配、(3)半クローンの系代飼育による再現。

(1)については、半クローン生殖細胞の形成過程で、父由来ゲノム削除と母由来ゲノム倍加、少なくとも2つ以上の箇所に変異していると考えられる。減数分裂は、姉妹染色分体の対合に始まり、雌性生殖細胞にとって異物である父由来ゲノムとの共同作業である。通常型は、ゲノム認識の免疫レベルを通常より下げ、父由来ゲノムを許容する。変異型では、父由来ゲノムが自食(autophagy)により削除されると考えられる。細胞周期の各期を組織学的に観察した後、その期をRNA-seqでトランスクリプトーム解析した。

半クローンゲノムの永続性は、野外におけるクジメ系雑種の交配(2)を調べて、クジメ系雑種がスジアイナメとも交配すること、及び飼育下でスジアイナメの中で半クローンゲノムを持った個体がクジメと交雑し、半クローンが再現出来ること(3)を示して実証される。そこで、野外において、これまでの調査で見出した半クローンゲノム特異的大型染色体(ロバートソン型動原体)を遺伝マーカーに、半クローンゲノムを持ったスジアイナメ卵塊を探し出し、クジメ系雑種が母種(スジアイナメ)の雄と交配していること、及びその頻度がどの程度かを調べた。

人工授精により、クジメ系雑種から組み換えて配偶子生産するスジアイナメを作りだし、スジアイナメ間の交配後にクジメと交雑し、新規半クローン系統の再現を目指す。クジメ系雑種とスジアイナメの交配は、両親種と共存するので野外で起こり得ることである。また、交配実験の結果で、人工交配3代目の半クローン出現率から、半クローン遺伝子がいくつの遺伝子座にあるかを推定できる(例えば、25%なら2遺伝子座、10%なら3遺伝子座)。半クローンか組み換えかは、一腹子のマイクロサテライトを使った遺伝子型の比較で決定した。

4. 研究成果

(1)「父親ゲノムを削除する分子基盤の特定」に関する研究では、卵形成過程における増殖期の組織観察で、純粋種と半クローンの相違を見出し、父親ゲノムの削除時期を推定した。この結果をもとに、父親削除に関わる発現変動遺伝子を探し出すためのトランスクリプトーム解析

に進んだ。

卵原細胞の体細胞分裂中期以降に相違が観察されたことから、その時期の純粋種、純粋種間の人為交配 F1 雑種および半クローンの卵巣を取り出した。次世代シーケンサーを使った RNA-seq による解析で、半クローンの卵形成過程において、中心体の形成に関わる遺伝子の不働を見出した。これは、半クローンが突然変異で新たな機能を持った遺伝子を想定していたが、その反対に働かない遺伝子があって、その下流のカスケードが機能しないという仕組みである。減数分裂する際に働くと思われる中心体に関与する遺伝子が働かないことなどから、「分裂を誘導する段階での遺伝子欠損」とする仮説は、むしろ合理的と評価した。しかし、日本魚類学会などで発表した際、トランスクリプトーム解析の分析例数が少ないという指摘を受け、共同研究者とも相談し、重要な発見でもあるため、十分な例数を増やしてから論文公表に進めることとした。繁殖期が冬であることもあり、本研究期間内においては、新たに準備をしたサンプルの解析は未了である。

(2) 「野外におけるクジメ系雑種の交配」に関する研究は、本研究課題で最も成果が上がった部分である。

白尻水産実験所前浜の繁殖場から、スジアイナメとクジメの雄のなわばりにおいて保護中の各卵塊から卵 50 個を採集し、スジアイナメの卵は、染色体の観察に適した発生段階まで飼育し、染色体標本の核型分析を、クジメの卵は孵化まで飼育し、ミトコンドリア DNA とマイクロサテライトマーカーによる母親判別を行った。母親判別の結果、半クローン雑種は両方の親種とほぼ同率で交配しており、雑種の父種選択性はないことが分かった。また、野外戻しスジアイナメの存在は、半クローン遺伝子が母種（スジアイナメ）の遺伝子プールに還元され、組み換えられる。先行研究によって、半クローン生殖は雑種のスジアイナメゲノム上にある複数の遺伝的基盤（半クローン遺伝子）によって引き起こされることが分かっているため、この半クローン遺伝子が、組み換え世代を経由し交雑した後も保持されていれば、半クローン世代が再開され、新たな半クローン雑種は、有害変異の削減と遺伝的多様性を回復した系統となる（半クローンの永続仮説）。この部分までを論文にまとめ、Evolution に掲載された。

(3) 「半クローンの永続仮説」を実証する飼育実験では、4 世代（1 世代 / 2 年）にわたる人工交配を起こった。クジメ系雑種とスジアイナメの交配によって得られた子は、組み換え型の配偶子生産し、半クローンゲノムはスジアイナメ集団に還元される。この中には、雄のスジアイナメもいる。この雄から、同類交配を経てクジメと交雑させることで、新たなミトコンドリアハプロタイプを持った半クローン系統を作りだした。この系統作出実験で、半クローンはかなり低い確率で出ることから、半クローンは、複数の遺伝子座に関わった遺伝子群の働きであることが示唆された。

(2) と (3) の研究結果に加えて、以前に行ったアイナメ属雑種の系統解析によって、半クローン雑種には複数のハプロタイプが観察され、再交雑が複数回起こった可能性が示されていた。これらのことから、アイナメ属半クローンゲノムは、アブラムシで見られるクローン世代と有性世代を一年の中で繰り返す周期性単為生殖と類似するシステムを、長期的な世代交代で行っていることが分かった。ただしアイナメ属の雑種は、クローンゲノムの維持に近縁種のゲノムを借りている点、周期性はなく偶発的な交雑でクローンを再開する点で特異的である。このように、アイナメ属半クローンは、数百年、数千年という幾数世代もの長い間隔で、必要に応じて親種を変えゲノムをリフレッシュしながら、今日まで生きながらえてきたことが分かった。

スジアイナメとクジメの雄は、種を認知する強固な生殖前隔離機構により、普段は交雑が起こらないが、環境攪乱や地球温暖化による藻場の壊滅など、寒冷種のスジアイナメ個体群が崩壊すると同種との遭遇頻度が激減し、温帯種のクジメと交雑せざるを得ない状況も地史的スケールでは起こり得る。そうした時にゲノムを更新した新規半クローン雑種が出現できる。単性世代と有性世代を行き来する生物は、性の意義と種や系統の存続に関わる「性の進化」や「遺伝的多様性の重要度」など、進化生物学の重要な課題を解決する手がかりを提供するので、アイナメ属半クローンは、極めて重要なモデル生物であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamazaki A., Nishimiya Y., Tsuda S., Togashi K., Munehara H.	4. 巻 165
2. 論文標題 Gene expression of antifreeze protein in relation to historical distributions of Myoxocephalus fish species	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Marine Biology	6. 最初と最後の頁 165-181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1007/s00227-018-3440-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Awata S., Sasaki H., Goto T., Koya Y., Takeshima H., Yamazaki A., Munehara H.	4. 巻 166
2. 論文標題 Host selection and the evolution of ovipositor morphology in nine sympatric species of sculpins that deposit their eggs into tunicates or sponges	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Marine Biology	6. 最初と最後の頁 59-71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1007/s00227-019-3506-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki, S., K. Arai and H. Munehara	4. 巻 12
2. 論文標題 Karyological evidence of hybridogenesis in Greenlings (Teleostei: Hexagrammidae)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0180626
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1371/journal.pone.0180626	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 将太・三宅 翔太・宗原 弘幸
2. 発表標題 アイナメ属野外雑種の双方向戻し交配
3. 学会等名 日本魚類学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宗原弘幸・鈴木将太・川原玲香
2. 発表標題 RNA-seqによるアイナメ属半クロンの発現変動遺伝子の抽出
3. 学会等名 日本魚類学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 将太・宗原 弘幸
2. 発表標題 クジメ系半クロン雑種由来の野外組み換え雑種の出現
3. 学会等名 日本水産学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大河内裕典・宗原弘幸・橋爪伸崇・鈴木将太・吉田隼祐・中村陽一
2. 発表標題 非捕獲的手法によるアイナメHexagrammos otakiiなわばり雄の成長と繁殖成功率の経年変化
3. 学会等名 日本水産学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安房田 智司・五十嵐 直・瓜生 知史・古屋 康則・宗原 弘幸
2. 発表標題 海産の卵寄託魚では宿主の種類やサイズの違いが産卵管形態の種内変異を生み出す
3. 学会等名 日本生態学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田隼祐・鈴木将太・宗原弘幸
2. 発表標題 半クローン生殖由来のスジアイナメを用いたF1雑種の遺伝様式の検証
3. 学会等名 日本魚類学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木将太・三宅翔太・荒井克俊・藤本貴史・宗原弘幸
2. 発表標題 半クローンの細胞遺伝学
3. 学会等名 日本魚類学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宗原弘幸
2. 発表標題 人為的環境変化を利用するアイナメの繁殖生態
3. 学会等名 日本魚類学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宗原弘幸・鈴木将太・橋爪伸崇・加藤大棋・吉田隼祐・大河内裕典・東村拓志
2. 発表標題 築港工事根固め材（網袋）で出来るアイナメの繁殖コロニー（ホッケ資源回復へのヒント）
3. 学会等名 日本水産学会北海道支部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋爪伸崇・宗原弘幸
2. 発表標題 3Dデジタルカメラを用いたアイナメなわばり雄の非捕獲的全長測定
3. 学会等名 日本魚類学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤本 貴史 (FUJIMOTO Takahumi) (10400003)	北海道大学・水産科学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	荒井 克俊 (ARAI Katsutoshi) (00137902)	北海道大学・水産科学研究院・特任教授 (10101)	削除：平成30年3月31日
研究分担者	三木 玲香 (三木玲香) (MIKI Ryouka) (30451842)	東京農業大学・生物資源ゲノム解析センター・研究員 (32658)	削除：平成29年9月12日