

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06790

研究課題名(和文) 日本産近縁ヤモリ種間における性決定・性分化機構の多様性および比較解析

研究課題名(英文) Comparative study on intraspecific diversities of sex determination systems in Japanese geckos

研究代表者

松原 和純 (Matsubara, Kazumi)

中部大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：90399113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：性決定様式の変遷および性染色体の進化のメカニズムを解明することを目的として、ニホンヤモリとミナミヤモリの種間や個体群間において性染色体の構造の比較解析を行った。沖縄島系統ミナミヤモリ雌個体のドラフトゲノムからDMRT1のZもしくはWホモログを含むコンティグを同定し、それらを比較することでDMRT1の下流域にW特異的塩基配列を検出した。また、ミナミヤモリ4系統間の比較解析からミナミヤモリの石垣島系統と沖縄島系統では共通祖先においてZとWホモログ間の分化が生じた事が推定された。一方で、北トカラ系統と南九州系統では、同領域のZとW間の分化は同定されず、独自に性染色体の進化が起きたと推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミナミヤモリ4系統の性染色体の比較解析から、沖縄島系統と石垣島系統の性染色体は共通祖先に端を発し、一方で北トカラ系統と南九州系統では独自に性染色体の進化が起きたと推定された。この様に、島嶼など小さな隔離地域に生息する個体群では独自の性染色体の進化や生物学的特徴の獲得が起きている可能性があり、これら隔離個体群の調査や保護の重要性が示された。ミナミヤモリ沖縄島系統と石垣島系統の性染色体の分化の開始には、脊椎動物の性分化関連遺伝子であるDMRT1の対立遺伝子間での分化が切掛となったことが改めて示唆された。この事は、性染色体の誕生には性分化関連遺伝子の収斂進化といった共通原理があることを支持する。

研究成果の概要(英文)：To infer the evolutionary process of the sex chromosomes and sex determination systems, I investigate diversities of sex chromosomes in Hokou gecko and Japanese gecko. Contigs that includes Z and W homologs of DMRT1 were screened from draft genome sequence of a female from Okinawa strain. By comparison of nucleotide sequences of these contigs, W chromosome specific sequences were identified on downstream of DMRT1. As these sequences were also identified in Ishigaki strain, differentiation of Z and W homologs initiated in the common ancestor between Okinawa and Ishigaki strains. This suggests that an initial step of sex chromosome differentiation was allelic differentiation of DMRT1 (a sex determining gene in Vertebrate) in the common ancestor of two strains. On the contrary, the common W chromosome specific sequences were not detected in North Tokara and South Kyushu strains. This suggests that sex chromosomes of the two strains have independently evolved.

研究分野：細胞遺伝学

キーワード：性染色体 温度依存性決定 ヤモリ 進化 種内多様性 DMRT1

1. 研究開始当初の背景

哺乳類や鳥類は遺伝性決定 (GSD: genotypic sex-determination) を示し、個体の性は遺伝性染色体の組み合わせによって決定される。哺乳類は雄ヘテロ型 (XX/XY 型) の性染色体をもち、鳥類はそれとは反対の雌ヘテロ型 (ZZ/ZW 型) の性染色体をもち、一方、脊椎動物全体に目を向けると GSD だけでなく、環境に依存して性が決まる種も見られる。その代表例が爬虫類で見られる温度依存性決定 (TSD: temperature-dependent sex-determination) であり、TSD では卵の温度によって性が決まる。カメ目と有鱗目 (トカゲやヘビ) には TSD、雄ヘテロ型 GSD、雌ヘテロ型 GSD を持つ種が混在しており、時には近縁種間や個体群間でも性決定様式が異なる事例が見られる。このことは、爬虫類の進化過程において性が決定される仕組みは非常に移り変わりやすく、系統分化の様々な分岐で性決定様式の変遷が起きた事を示している。しかし、進化の過程でこのような性決定様式の多様性が生じた詳細なメカニズムについては不明なままである。

日本産 *Gekko* 属ヤモリにおいても近縁種間で異なる性決定様式が見られ、ニホンヤモリ (*G. japonicus*) やオキナワヤモリ (*Gekko* sp.) は TSD をもつものに対して、ミナミヤモリ (*G. hokouensis*) は雌ヘテロ型の GSD をもつ (図 1)。図 1 においてこれら 3 種の外群にあたる種の性決定様式は不明であるが、系統樹に沿って推定するとミナミヤモリの系統において比較的最近に ZW 型の GSD に変遷した可能性が高い。また、ニホンヤモリとミナミヤモリでは各種内の個体群間でも性決定様式や性染色体の形態の多様性が報告されている (Yoshida and Itoh, Chromosome Information Service 17:29-31 (1974); Shibaike et al., Cytogenet Genome Res 127:182-190 (2009))。例えば、ニホンヤモリの福岡個体群では雄ヘテロの XY 型の性染色体が同定されている。ミナミヤモリは中国、台湾、南西諸島、九州南部にかけて分布するが、その中で沖縄島などの個体群では明確に形態の異なる ZW 型性染色体が同定されている (図 2)。また、台湾や石垣島などの個体群においては G 分染を施した核型の比較から形態的に未分化な ZW 型の性染色体が同定されている。これらの事から、両種において平行して TSD から GSD への変遷が起き、それに伴って性染色体の分化が生じたと考えられる。申請者の先行研究において、ミナミヤモリ沖縄島産個体と石垣島産個体において性決定候補遺伝子 *DMRT1* の塩基配列を比較した結果、両個体群に共通して W ホモログ特異的な多型が同定された。従って、両個体群の共通祖先において *DMRT1* の対立遺伝子が分化したことにより ZW 型の始原染色体が誕生し、その後、沖縄島の個体群で形態的分化が進んだと考えられた。ミナミヤモリは南西諸島の各島々に生息しており、他の個体群においても独自の性染色体の進化が見られる可能性がある。

先行研究において、ミナミヤモリの ZW 性染色体はニワトリの性染色体と相同性を持つことが判明している (図 2)。申請者の先行研究において、ニワトリにおける性決定遺伝子である *DMRT1* がミナミヤモリにおいても ZW ホモログ間で分化していることが示唆された。本研究では、ミナミヤモリにおける *DMRT1* の Z と W ホモログの詳細な構造解析と機能解析を行い、性決定機能を検証する。*DMRT1* が性決定遺伝子として同定された場合、ヤモリ科と鳥類は遠縁な関係にあるため、共通祖先のゲノム中の特定の染色体領域が両系統で性染色体に収斂進化したと証明される。

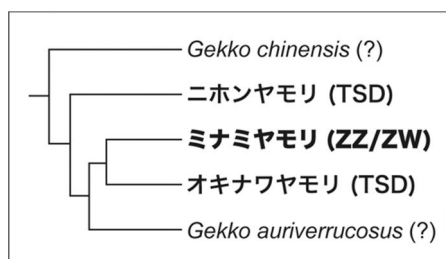


図 1. *Gekko* 属 5 種の系統樹と性決定様式。系統樹は Pyron et al. (2013) を参考に作成。

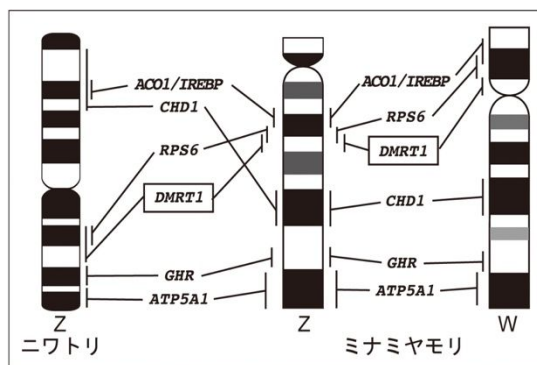


図 2. ミナミヤモリとニワトリにおける性染色体の比較地図。Kawai et al. (2009) より改変。

2. 研究の目的

本研究では、ニホンヤモリとミナミヤモリの種間や個体群間において性染色体の構造を比較解析する。それによって、両種で生じた性決定様式の変遷および新たな性決定遺伝子・性染色体の誕生のメカニズムを解明することを目的とする。特に、ミナミヤモリにおける *DMRT1* の Z と W ホモログの詳細な構造解析を行う。また、ミナミヤモリ個体群間で *DMRT1* やその周辺配列の塩基配列を比較し、その進化過程を推定する。

3. 研究の方法

(1) 沖縄島産ミナミヤモリにおけるゲノム解析

Pacbio を用いた次世代シーケンス解析で得られた沖縄島産ミナミヤモリ雌 1 個体のドラフトゲノムデータを用い、Z 染色体に由来する contig の選抜を行った。データベースからニワトリの全遺伝子のタンパク質コード塩基配列を取得し、ミナミヤモリのドラフトゲノムに対して blast 検索を行った。ニワトリの性染色体連鎖遺伝子がヒットした contig を選抜した。

(2) W 染色体由来 contig の選抜

NovaSeq 次世代シーケンサーを用いて雌雄各 1 個体のゲノム DNA を解読した。得られたショートリードの配列を Pacbio で得られたドラフトゲノムデータにマッピングし、各 contig 上のマッピング率を雌雄間で比較した。

(3) 沖縄島産ミナミヤモリにおける *DMRT1* 周辺領域のゲノム解析

ミナミヤモリのドラフトゲノムデータから *DMRT1* やその近傍の遺伝子の Z と W ホモログを同定するために、ニワトリやニホンヤモリの *DMRT1* 塩基配列を用いてミナミヤモリのドラフトゲノムデータに対して blast 検索を行った。

(4) *DMRT1* 周辺領域の個体群間比較

(3) で設計したプライマーを用い、沖縄島系統、石垣島系統、北トカラ系統、南九州系統の雌雄のゲノム DNA に対して PCR を行い、系統間、各系統の雌雄間で増幅産物を比較した。

(5) ニホンヤモリの核型分析

愛知県春日井市、福岡県福岡市、岡山県岡山市、静岡県静岡市など日本各地でニホンヤモリを捕獲し、尻尾から細胞培養を行った。分裂期の細胞を集め、スライドグラスに展開し、染色体標本を作製した。ギムザ染色した染色体標本を検鏡、撮影し、個体群間、各地域の雌雄間で核型比較を行った。

4. 研究成果

(1) 沖縄島産ミナミヤモリにおけるゲノム解析

ニワトリの全遺伝子のタンパク質コード塩基配列を用いてミナミヤモリのドラフトゲノムに対して blast 検索を行った結果、358 のニワトリの性染色体連鎖遺伝子がミナミヤモリの contig 配列に有意な相同性を示した。ニワトリの性染色体連鎖遺伝子がヒットした 93 個のミナミヤモリの contig 配列の総長は約 193 Mb であり、核型における Z 染色体の相対的な長さで推定された全ゲノムサイズ(2.65 Gb)から推測される Z 染色体の長さに匹敵した。従って、この 93 個の contig 配列は Z 染色体由来であると推測された。

(2) W 染色体由来 contig の選抜

雌雄のショートリードの配列をドラフトゲノムデータにマッピングし、各 contig 上のマッピング率を雌雄間で比較した結果、雌のマッピング率が著しく高いコンティグが 41 個同定された。これらの contig は W 染色体由来であると推定される。しかし、これらの contig にはタンパク質コード配列が同定されなかったことから、W 染色体上の反復配列を含む contig と推定された。

(3) 沖縄島産ミナミヤモリにおける *DMRT1* 周辺領域のゲノム解析

ミナミヤモリのドラフトゲノムデータに対し、ニワトリの *DMRT1* 塩基配列を用いて blast 検索を行った。その結果、著しくスコアが高く、*DMRT1* の全長を含む contig (contig1556) が同定された。続いて、その contig1556 を用いてミナミヤモリの全ゲノムデータに対して blast 検索を行ったところ、*DMRT1* は含まないが、塩基配列の大部分で contig1556 に対して類似性を示す contig (contig2879) が同定された。二つの contig の配列の違いを利用して PCR によって各 contig の性特異性を調べた結果、contig2879 は雌特異的な配列であった。従って contig1556 が Z 染色体、contig2879 が W 染色体に由来する配列であることが判明した。また、これによって PCR による胚の性別判別が可能となった。

contig2879 は *DMRT1* の下流域に相当する。contig1556 に対するマッピング率に雌雄間で差は見られなかったことから、*DMRT1* のコード領域では ZW 間で分化が進行していないことが推定された。

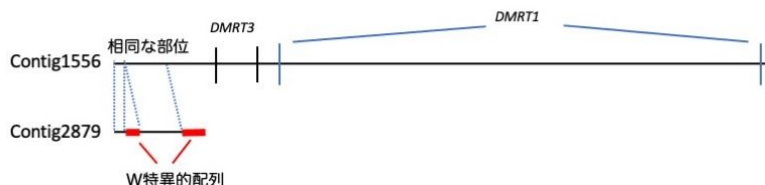


図 3. Contig1556 と contig2879 の比較図

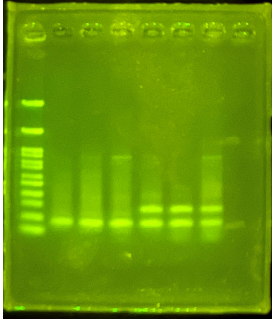


図 4. 沖縄系統個体における PCR 産物の電気泳動像(左からサイズマーカー、オス 3 個体、メス 3 個体)。短い増幅産物は Z 染色体由来、長い増幅産物は W 染色体由来となる。

(4) *DMRT1* 周辺領域の個体群間比較

(3)で設計したプライマーを用い、沖縄島系統、石垣島系統、北トカラ系統、南九州系統の雌雄のゲノム DNA に対して PCR を行った。その結果、沖縄島と石垣島系統では contig2879 の雌特異的な配列の増幅が確認されたが、北トカラと南九州系統では対応する配列の増幅は見られなかった。このことから、沖縄島と石垣島系統の共通祖先において *DMRT1* の周辺配列の雌雄間の分化が生じており、各島で個体群が形成された後に、沖縄島産個体群で性染色体の形態的な分化が生じた事が示唆された。一方、北トカラや南九州系統では独自に性染色体の分化が進行した可能性が考えられる。

(5) ニホンヤモリの核型分析

これまでに解析した個体においてはペア間で形態が著しく異なる相同染色体を持つ個体は同定されていない。今後はゲノム配列レベルでの種内変異を探っていく。



図 5. 春日井市産のニホンヤモリ雄個体の核型

< 引用文献 >

- Kawai et al. (2009) Chromosoma, 118: 43-51.
- Pyron et al. (2013) BMC Evolutionary Biology, 13: 93.
- Shibaike et al. (2009) Cytogenet Genome Res 127:182-190
- Yoshida and Itoh (1974) Chromosome Information Service 17:29-31

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------