

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570001

研究課題名（和文） ショウジョウバエにおける種分化遺伝子の特定と分子集団遺伝学的な解析

研究課題名（英文） Identification and molecular population genetics analysis of speciation genes in *Drosophila*

研究代表者

澤村 京一 (SAWAMURA KYOICHI)

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号：90247205

研究成果の概要（和文）：本研究以前にわれわれはキイロショウジョウバエのゲノムの一部をオナジショウジョウバエの遺伝子で置換した種間イントログレーション系統の作製に成功していた。種間イントログレーションのホモ接合体は雌雄ともに不妊となり、またオナジショウジョウバエとの交配で劣性致死を示すことから、生殖的隔離の遺伝学的解析に有用である。本研究により、ヌクレオポリン 160 が雑種雌不妊および致死の原因であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Previously we succeeded to make an interspecific introgression line in which a part of the genomes of *Drosophila melanogaster* is replaced by the homologous genes from *Drosophila simulans*. Introgression homozygotes are sterile both in females and males and the introgression results in recessive lethality when crossed to *D. simulans*. Thus, the introgression provides an opportunity to genetically analyze reproductive isolation. In the present research, we indicated that *Nucleoporin 160* is responsible for the hybrid female sterility and inviability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、遺伝・ゲノム動態

キーワード：ショウジョウバエ、種分化、生殖的隔離、雑種致死、雑種不妊、ヌクレオポリン、遺伝的不和合、核孔複合タンパク

1. 研究開始当初の背景

キイロショウジョウバエの雌とオナジショウジョウバエの雄の交配では、雑種雄は致死となり不妊の雌のみが生まれる。雌雄を入れ替えた交配では、雑種雌が致死となり主として不妊の雄が生まれる。雑種は一代限りであるため、雑種致死や不妊の研究は困難であった。これまでに雑種致死や不妊を救済する

遺伝子が発見されており、これらを利用してわれわれはキイロショウジョウバエの第2染色体左腕の一部をオナジショウジョウバエの相同遺伝子で置換した種間イントログレーションの作製に成功している。このイントログレーションはホモ接合体が雌雄ともに不妊であり、オナジショウジョウバエの雑種致死救済遺伝子 *Lhr* との交配において劣性

致死を示すことから、生殖的隔離の遺伝学的解析に有用であると考えた。キイロショウジョウバエの染色体との減数分裂組換えおよび欠失染色体とのヘテロ接合作製（欠失マッピング）によって、雑種雌不妊および致死の原因遺伝子は6個のORFが含まれる17 kbの染色体領域に絞り込まれていた。

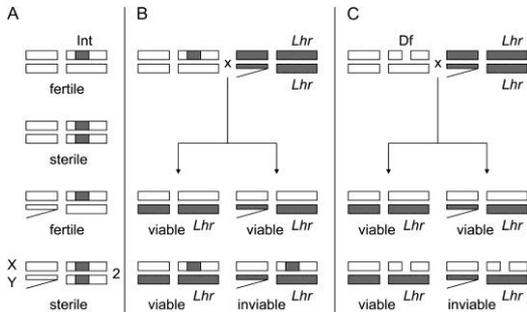


図1 種間イントログレッションによる雑種致死および不妊の効果

2. 研究の目的

上記の雑種雌不妊および雑種致死の原因となる遺伝子を特定することを第1の目的とした。また、これらの生殖的隔離（および本研究で新たに明らかになった形態異常や発生遅延）を発生学的に機能解析することを第2の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 原因遺伝子の特定

種間イントログレッションと様々な欠失染色体および機能欠損変異体とのヘテロ接合体を作製し（相補性検定）、雌の妊性を調査した。また、種間イントログレッション系統とオナジショウジョウバエの *Lhr* 変異体を交配し、雑種雄の致死性を調査した。雌不妊および致死の原因候補遺伝子に関してキイロショウジョウバエの形質転換体を作製し、イントログレッションと組合せたときに表現型が救済されることを確認した。

(2) 遺伝子の機能解析

雑種雌不妊および雑種致死の原因遺伝子の5'UTRに挿入したトランスポゾンP因子を転移させ、様々な新規機能欠損（部分欠失）変異体を作製した。これらを種間イントログレッションと組合せることにより、雌の妊性および雑種の致死性を調査した。さらに、形態異常や発生遅延についても同一遺伝子が原因になっているかどうか検討した。

4. 研究成果

(1) *Nup160* の特定

8種類の欠失染色体（うち1種類は独自に作製）を用いた欠失マッピングにより、原因遺伝子の領域を *Gr32a* - *CG6230* - *CG14921* - *Cs14* - *Nup160* - *Rfc38* に絞り込んだ。さらに、この染色体領域へのトランスポゾン挿入

変異体を用いて、*Cs14* - *Nup160* - *Rfc38* が原因遺伝子の候補として示唆された。すなわち、*PBac{RB}Rfc38⁰⁰⁷⁰⁴* は種間イントログレッションと組合せることで雌不妊および致死を示した。一方、*P{lacW}1(2)SH2055^{SH2055}* は雌不妊のみ示した。また、*P{EP}Nup160^{EP372}* はいずれの表現型も示さなかった。最終的には、*Cs14* - *Nup160* - *Rfc38* の約9 kbのゲノム領域をクローニングし、キイロショウジョウバエの形質転換体を作製した。これによって雑種雌不妊および致死を救済することができた。したがって、調節領域を含めて完全にこの範囲に入っている *Nup160* が原因遺伝子として特定された。

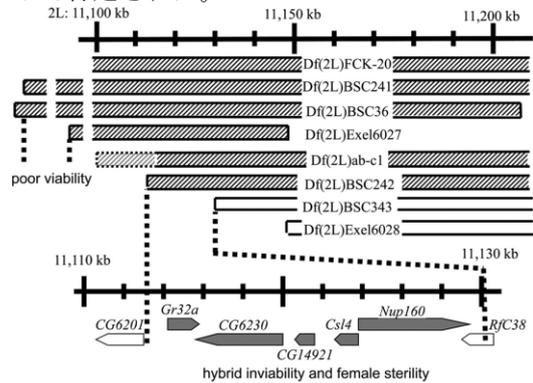


図2 雑種雌不妊および致死の原因遺伝子に関する欠失マッピング

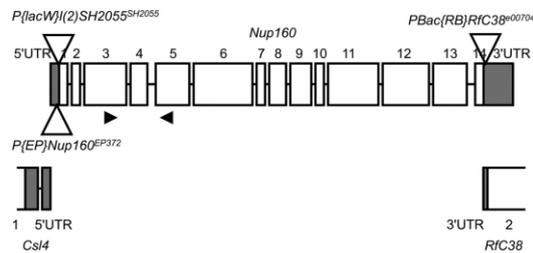


図3 *Nup160* 遺伝子へのトランスポゾン挿入系統

(2) 新規変異体の解析

Nup160 遺伝子の5'UTRにP因子が挿入した *P{EP}Nup160^{EP372}* 系統をトランスポゼース供給系統と交配して、トランスポゾン転移・喪失させた。この過程で生じた15個の劣性致死染色体をスクリーニングした。これら変異体の塩基配列決定および遺伝学的な解析によって、以下のことが明らかになった。

3個は *Nup160* のORFの一部を欠失する機能欠損変異体であった。これらは雑種雌不妊と致死だけではなく形態異常も引き起こした。一方、2個は *Nup160* の復帰突然変異（ただし、P因子の一部は残存している；劣性致死の原因は染色体の他の領域にある）であり、上記の表現型はいずれも回復していた。これらのことから、*Nup160* が雑種雌不妊および致死の原因であることが確認できた。

残りの 10 個 (*Cs14* 側が欠失したもの 1 個を含む; すべて P 因子の一部は残存している) は雑種雌不妊、致死、形態異常のうちいずれかの表現型を示した。これらの系統は今後の生殖的隔離に関する発生学的研究に有用であると思われる。

また、*Nup160* による雑種致死の時期は通常の幼虫期致死とは異なり、早期の蛹期致死であることが分かった。イントログレーションのホモ接合体はヘテロ接合体と比べて発生が遅延し、この原因についても *Nup160* が関与している可能性がある。

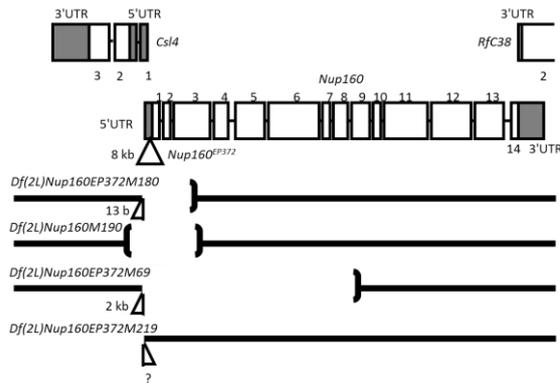


図 4 EP372 系統に由来するヌクレオポリン 160 新規変異体

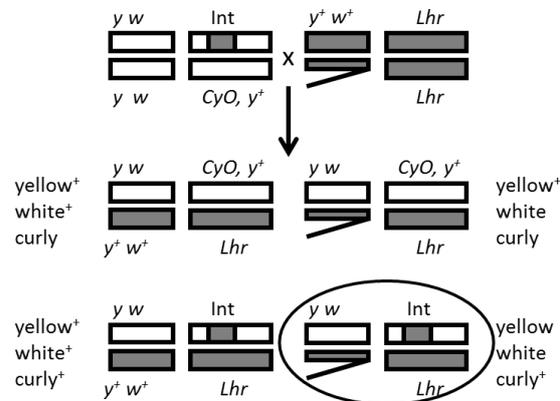


図 5 ヌクレオポリン 160 による雑種致死の時期決定に用いた交配

(3) 種分化モデルの提唱

これまでに分子レベルで特定された接合後隔離に関わる種分化遺伝子のリストを作成し、普遍性を考察した。その結果、ヘテロクロマチンの反復配列は進化速度が速く、これに呼応するようにしてクロマチンタンパクが進化するため、雑種ではこれらに不和合が生じるのではないかとこのモデルを提唱した。雌の減数分裂では 4 個の相同染色体のうち 1 個だけが次世代に伝達されるため競合が起こり、その競合に勝つように反復配列が進化する。また、反復配列とクロマチンタンパクの間に不和合が生じると、染色体の

凝縮が正常に行われなくなり、体細胞分裂や減数分裂が異常になって、雑種致死や不妊に至ると推察される。*Nup160* が属するヌクレオポリンは核膜孔複合体を構成するタンパクではあるが、細胞分裂の際には動原体部位に付着する。このことから、*Nup160* もこのリストに加えていいのではないかと考察した。

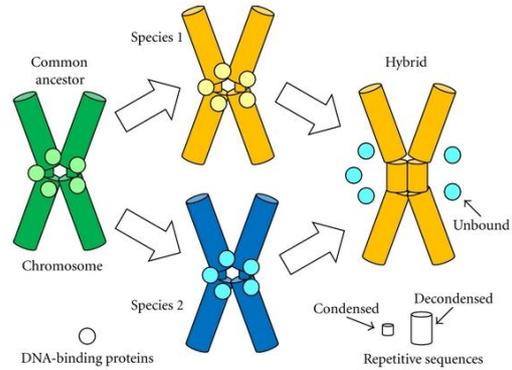


図 6 ヘテロクロマチンの反復配列と結合タンパクの進化に由来する生殖的隔離のモデル

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 4 件)

- ① K. Maehara, T. Murata, N. Aoyama, K. Matsuno, K. Sawamura: Genetic dissection of *Nucleoporin 160 (Nup160)*, a gene involved in multiple phenotypes of reproductive isolation in *Drosophila*. *Genes and Genetic Systems*, 査読有, Vol. 87, 2012, 印刷中
- ② K. Sawamura: Chromatin evolution and molecular drive in speciation. *International Journal of Evolutionary Biology*, 査読有, Vol. 2012, 2012, ID301894
- ③ 澤村京一、前原一慶、村田孝順、種分化の分子生物学-最近の研究から見えてきたこと、査読無、65 巻 3 号、2011、2-4
- ④ K. Sawamura, K. Maehara, S. Mashino, T. Kagesawa, M. Kajiwara, K. Matsuno, A. Takahashi, T. Takano-Shimizu: Introgression of *Drosophila simulans Nuclear Pore Protein 160* in *Drosophila melanogaster* alone does not cause inviability but does cause female sterility. *Genetics*, 査読有, Vol. 186, 2010, 669-676

[学会発表] (計 11 件)

- ① K. Sawamura: Genetics of hybrid inviability and sterility between

- Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. Okazaki Biology Conference, 2012. 3. 21, Okazaki
- ② 澤村京一、モデル生物「ショウジョウバエ」を利用した種分化の研究、日本遺伝学会、2011. 9. 22、京都
- ③ K. Sawamura: Molecular drive and epigenetics in speciation. Society for Molecular Biology and Evolution, 2011. 7. 27, Kyoto
- ④ K. Sawamura: *Drosophila* as a model organism for the speciation study: genetic mechanisms of reproductive isolation. International Interdisciplinary Scientific Research Conference, 2011. 6. 11, Santo Domingo (Dominican Republic)
- ⑤ K. Sawamura: Genetics of hybrid inviability and sterility between *D. melanogaster* and *D. simulans*. Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference, 2011. 5. 25, Taipei (Taiwan)
- ⑥ 前原一慶、増野昭太郎、影沢達夫、梶原三有希、松野健治、高橋文、高野敏行、澤村京一、核膜孔複合体タンパク遺伝子 (*Nup160*) によるショウジョウバエの雑種致死および不妊、北海道大学低温科学研究所共同研究集会、2010. 9. 23、札幌
- ⑦ 澤村京一、キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエを用いた交配後隔離の遺伝学、日本遺伝学会、2010. 9. 22、札幌
- ⑧ K. Sawamura, K. Maehara, S. Mashino, T. Kagesawa, M. Kajiwara, K. Matsuno, A. Takahashi, T. Takano-Shimizu: Introgression of *Drosophila simulans* *Nup160* (*nuclear pore protein 160*) in *Drosophila melanogaster* alone does not cause inviability but does cause female sterility. International BioResource Symposium “*Drosophila*”, 2010. 3. 18, Kyoto
- ⑨ K. Sawamura, S. Mashino, K. Maehara: *Nuclear pore protein 160* (*Nup160*) causes hybrid female sterility and hybrid inviability. European *Drosophila* Research Conference, 2009. 11. 21, Nice (France)
- ⑩ 澤村京一、前原一慶、増野昭太郎、核膜孔複合体タンパク遺伝子 (*Nup160*) はショウジョウバエの雑種雌不妊および雑種致死を引き起こす、日本遺伝学会、2009. 9. 18、松本
- ⑪ K. Sawamura, K. Maehara, S. Mashino, T. Murata: *Nucleoporin* causes not only hybrid inviability but also female

sterility. Japanese *Drosophila* Research Conference, 2009. 7. 6, Kakegawa

[その他]
ホームページ等
International Journal of Evolutionary Biology に Lead Guest Editor として、特集号 Mechanisms of Speciation を組んだ
<http://www.hindawi.com/journals/ijeb/si/568376/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤村 京一 (SAWAMURA KYOICHI)
筑波大学・生命環境系・講師
研究者番号：90247205

(2) 研究分担者

高野 敏行 (TAKANO TOSHIYUKI)
国立遺伝学研究所・集団遺伝学研究部門・准教授
研究者番号：90202150
松野 健治 (MATSUNO KENJI)
東京理科大学・基礎工学部・教授
研究者番号：60318227