

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05743

研究課題名(和文) 半クローン雑種の総括研究-永続性の実証(究極要因)とゲノム削除機構(至近要因)

研究課題名(英文) Comprehensive research on hemiclone hybrids - Demonstration of persistence and genome deletion mechanism

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ホスト種を換えることによって半クローンと組換え世代を繰り返し、系統寿命を伸ばすことを実証した。

半クローンとともっとも寒冷域にまで分布するエゾアイナメ雄と交配させて得られた子を孵化させ、さらにその子を成熟させて孫世代を作出した。その結果、半クローンはエゾアイナメとも交配可能で、子は全て雌で、その子が生産する卵は、半クローン母種のスジアイナメゲノムのみを持つことがわかった。さらに、父種ゲノムが卵形成の際に削除される過程を調べ、発生初期の段階で半クローンでは父親ゲノムがヘテロクロマチン化(不活性化)され、減数分裂前に発現が抑制され不活性化されることを観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

半クローンやクローンは雌だけを産むため個体群増殖速度が速いが、遺伝的な多様性を作り出せない欠点から系統寿命は短いと考えられてきた。しかし、アイナメ属雑種は、一世代で父親ゲノムを「置換」できる半クローンの特性を使い、同種雄を含み交雑相手の種を変えることで、半クローンと組換え世代を繰り返す(ホストスイッチ仮説)ことを実証した。本研究の成果は、ホストスイッチ仮説がこれまで知られていなかった種でも可能であることを示し、アイナメ属が北太平洋でもっとも繁栄する属の一つである要因を実証したとともに、様々な種で見られる自然クローン集団の出現と、それが維持される仕組みの一端を解明した。

研究成果の概要(英文)：By changing the host species, we demonstrated that the lifespan of the strain was extended through repetition of hemiclone and recombinant generations. Hemiclone was mated with a male white-spotted greenling, which is distributed even in the coldest regions, and the resulting offspring were incubated, and the offspring were allowed to mature to create a grandchild generation. The results showed that the half-clones were able to interbreed with white-spotted greenling, all of the offspring were female, and the eggs they produced contained only the hemiclone hybrid genome. Furthermore, we investigated the process by which the paternal genome is deleted during oogenesis. At the early stage of development, the paternal genome becomes heterochromatinized (inactivated) in hemiclones, and its expression is suppressed and inactivated before meiosis.

研究分野：魚類生態学、遺伝生態学

キーワード：半クローン 染色体不適合 交雑 ゲノム削除 ホストスイッチ ヘテロクロマチン アイナメ属

1. 研究開始当初の背景

生物に見られる現象は、どのような仕組みが作られ(至近要因)、なぜそのような機能を獲得してきたのか(究極要因)、この2つの観点から解明することで深い理解が得られる。単性生殖から進化した有性生殖は、種や系統を長く維持するために遺伝的な多様性が必要となり、組換えして減数分裂を行って生産された半数体の卵と精子が受精することで新たな子孫を作り出せる。しかし、単性生殖に関する近年の研究で、クローンや半クローンの系統寿命が理論的に算出された年代よりも古くから存在し、免疫関連遺伝子が他の近縁な生物と比べて際だって多いことが明らかになった(Warren *et al.*, 2018 アマゾンモリー in Nature; Gutekunst *et al.*, 2018 ミステリークレイフィッシュ in Nature)。これらの研究は、「単性生物が如何にして遺伝的多様性を高めているか」という課題と「性と遺伝的多様性の創出」という基本的な生命現象の理解に大きなインパクトを残した。

本研究で対象とするアイナメ属雑種は、世界で6例(淡水魚4例、カエル1例、昆虫ナナフシ1例)知られる半クローンの一つで、唯一の海産生物である。父種の種名からクジメ系雑種、アイナメ系雑種と呼ぶ2つの系統があり、母種がともにスジアイナメである(Crow *et al.*, 2010; Kimura-Kawaguchi *et al.*, 2014)。雌個体しか生まれず、父種と戻し交配で半クローンを維持する(Munehara *et al.*, 2016; Suzuki *et al.*, 2017; 2020)。

2. 研究の目的

究極要因においては、半クローンは母種の雄と交配し、母種のゲノムセットを2対持つ子が生まれ、成熟すると減数分裂するのではないかと発想し、系代飼育と野外調査で確かめた。つまり、半クローンゲノムは母種集団の中で世代交代する間に遺伝的な多様性が生まれ、再度近縁種の雄と交雑した時にリフレッシュしたゲノムを持つ新たな系統の半クローン雑種が出現するということである。このように代替的に組換え世代を持つことで、単性生物の遺伝的多様性は無限に上げられる可能性を示した。

至近要因に関しては、次世代シーケンサーを使った RNA-seq により半クローン雑種の卵形成で細胞分裂において重要な役割を果たす中心体に関する遺伝子が働かないことを見出した。この結果は、半クローンが新たな機能を持った遺伝子変異によるのではなく、不働化した遺伝子があって、その下流が機能しなくなり、正常な減数分裂に至らないことを示唆する。シス因子かトランス因子によるかは不明であるが、細胞分裂を制御する遺伝子発現の機序について大きなヒントを入手したことを意味する。このように半クローンは、減数分裂の仕組みを検証するモデルとして極めて有用である。

染色体を組換えなく繁殖できる半クローンやクローンは、雌だけを産むため個体群増殖速度が速いが、遺伝的な多様性を作り出せないこと、世代を重ねて蓄積する悪性変異をゲノムから排除できないなどの欠点から、系統寿命は短いと考えられてきた。しかし、海産魚類のアイナメ属半クローン雑種を用いた研究から、一世代で父親ゲノムを「置換」できる半クローンの特性により、母種の雄と交配することで組換えできる子を作り出せる。そのため半クローンと組換え世代を繰り返すことで、単性生物の欠点を補い系統を永続できる(クローンでは三倍体が半数体の卵を産む世代を経る)。本研究では、この仮説がアイナメ属の系統進化の過程で頻繁に起きていたことを実証するとともに、半クローン配偶子が形成されるメカニズムを細胞学的に解明する。

3. 研究の方法

半クローン雑種の卵形成は、卵原細胞期のゲノム間不和合により、父種ゲノムが削除され、卵母細胞には母種ゲノムだけが残ると考えられる。すなわち減数分裂前の細胞周期(M期)の染色体動態を観察することで、この仮説は確かめられる。そこで、共焦点レーザー顕微鏡を使い、卵原細胞から卵母細胞になるまでの染色体動態を明らかにした。

人工授精した半クローンとウサギアイナメ(あるいはエゾアイナメ)の交雑卵は、受精、ふ化、成長など、各段階で純粋種の卵と比較し、さらに卵形成過程を組織学的に観察し、最終的には成熟させて配偶子が半クローンかどうかを確かめる。

これらの研究により、組換え世代を経由して、分布を上げ永続する半クローン-仮説の実証ができる。本研究は半クローンを対象としているが、この仮説はクローン生物までも適用できる。クローン発生するドジョウで、三倍体世代で組換え二倍体配偶子を生産する個体がまれに出現する Meiotic hybridogenesis と呼ばれる現象が知られている。三倍体クローンと組換え世代が交互に繰り返すことで永続性が起こり得る。本研究で明らかにできる半クローンの永続仮説は、単性生物全般に広く適用できるシステムと考えている。

4. 研究成果

本研究を通じて以下のことが明らかになった。

1. 父種ゲノムの削除機構の細胞学的観察

父種ゲノムが排除される仕組みを明らかにするため、半クローンと純粋親種の卵原細胞から卵母細胞になるまでのゲノム動態を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、発生初期の段階で半クローンでは父親ゲノムがヘテロクロマチン化(不活性化)され、減数分裂前に発現が抑制され、不活性化された状態で卵黄蓄積に進むことが示唆され、ゲノムの選択的抑制が半クローン

に関わっていると考えられた。当初は半クローン遺伝子検索の遺伝マーカーを作出する予定であったが、この部分は未遂だった。しかしゲノム動態の観察結果は、原著論文としてまとめ外国雑誌に投稿中である。

2. 半クローン遺伝子のホストスイッチを経由した永続性の実証

スジアイナメゲノムの半クローン雑種には、アイナメを宿主にするアイナメ系とクジメを宿主にするクジメ系が北海道南部とロシア沿海州で見つかっている。スジアイナメは北太平洋東岸で起源し極東まで分布を広げた。その過程には、多様な環境があったが、そこを近縁種のゲノムを宿主にして乗り越えて極東にたどり着いたと考えられる。これを『ホストスイッチ仮定』とよんでいる(宗原, 2020)。これを実証するために、もっとも寒冷域にまで分布するエゾアイナメを厚岸町から入手した。エゾアイナメの精子で半クローンの卵を人工受精した。その結果、受精し、孵化仔魚も他の純粋種と比較して順調に育つことがわかった。最終年には、この雑種が成熟し、すべて雌であること、人工授精に供した8個体がすべて半クローンであることをマイクロサテライト分析で確認した。孫個体は祖父のエゾアイナメの遺伝子がなかった。以上のことから、半クローンゲノムは、従来知られていなかったエゾアイナメもホストにできることが実証できた。

1. Warren et al: Clonal polymorphism and high heterozygosity in the celibate genome of the Amazon molly. *Nature Ecology & Evolution* 2: 669-679 (2018).
2. Gutekunst, E. et al: Geneticists unravel secrets of super-invasive crayfish. *Nature Ecology & Evolution* 2: 567-573 (2018).
3. Crow, K., H. Munehara and G. Bernardi: Sympatric speciation in a genus of marine reef fishes. *Molecular Ecology*, 17:16-23 (2010).
4. Kimura-Kawaguchi, M., Horita, M., Abe, S., Arai, K., Kawata, M. & Munehara H. Identification of hemi-clonal reproduction in three species of *Hexagrammos* marine reef fishes. *J. Fish Biol.*, 85: 189-209 (2014). DOI: 10.1111/jfb.12414.
5. Munehara, H., M. Horita, M. R. Kimura-Kawaguchi and A. Yamazaki. Origins of two hemiclinal hybrids among three *Hexagrammos* species (Teleostei: Hexagrammidae): genetic diversification through host switching. *Ecology & Evolution* 6: 7126-7140. doi: 10.1002/ece3.2446 (2016).
6. Suzuki, S., K. Arai and H. Munehara. Karyological evidence of hybridogenesis in Greenlings (Teleostei: Hexagrammidae). *PLoS ONE* 12(7): e0180626. doi: [10.1371/journal.pone.0180626](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180626) (2017).
7. Suzuki, S., S. Miyake, K. Arai and H. Munehara. Unisexual hybrids break through an evolutionary dead end by two-way backcrossing. *Evolution* 74-2: 392-403. Doi: 10.1111/evo.13903. (2020).
8. 宗原弘幸:「北海道の磯魚たちのグレートジャーニー」pp128, 海文堂(2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 1件）

1. 著者名 Takeshi I., Morita M., Okuno S., Inaba H., Shiba K., Munehara H., Koya Y., Homma M., Awata S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Fertilization modes and the evolution of sperm characteristics in marine fishes: Paired comparisons of externally and internally fertilizing species.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 e9562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ece3.9562	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 Munehara H., Togashi K, Yamada S, Higashimura T, Yamazaki A, Suzuki S, Abe T, Awata S, Koya Y, Tsuruoka O.	4. 巻 70
2. 論文標題 Rhamphocottus nagaakii (Cottoidea: Rhamphocottidae), a new species of grunt sculpin from the Northwestern Pacific, with notes on the phylogeography of the genus Rhamphocottus.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Ichthyological Research	6. 最初と最後の頁 268-285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10228-022-00885-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 東大聖・宗原弘幸	4. 巻 71
2. 論文標題 北海道函館市白尻からSCUBA潜水によって採集された初記録4種を含む稚魚	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 北大水産科学研究彙報	6. 最初と最後の頁 51-67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14943/bull.fish.71.2.51	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 根来晃祐・宗原弘幸	4. 巻 44
2. 論文標題 記録的猛暑の2023年に北海道函館市白尻からSCUBA潜水によって採集された北限記録13種を含む初記録14種の魚類	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Ichthyo	6. 最初と最後の頁 1-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34583/ichthy.44.0_1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐藤長明・関勝則・宗原弘幸	4. 発行年 2022年
2. 出版社 北海道大学出版会	5. 総ページ数 350
3. 書名 北の磯魚生態図鑑	

〔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 Takafumi) (10400003)	北海道大学・水産科学研究院・教授 (10101)	

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
---------	---------