

## 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25年 5月27日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23870023

研究課題名（和文） 哺乳類の性染色体における常染色体転座の進化的意義の解明

研究課題名（英文） Evolutionary significance of sex-autosomal translocations in mammals

研究代表者

村田 知慧 (MURATA CHIE)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：00614132

研究成果の概要(和文): オキナワトゲネズミの性染色体に転座した常染色体領域(neo-X, neo-Y)の動原体近位に遺伝的分化が生じていることを明らかにした。このことから、性染色体への転座により少なくとも部分的に neo-Y がオス特異的な領域に分化することを実証した。また、祖先 Y 染色体ユークロマチン領域の構造を部分的に明らかにし、そこに存在する *DDX3Y* と *UTY* が機能配列であるのに対し、隣接する *SRY*、*EIF2S3Y*、*USP9Y* 配列が偽遺伝子化していることを同定した。

研究成果の概要(英文): Genetic differentiation was detected between the proximal part of neo-X and neo-Y in *Tokudaia muenniniki*, showing that the sex-autosomal translocations worked the gain of male-specific region in neo-Y at least near the ancestral Y region. *DDX3Y* and *UTY* as functional sequences and *SRY*, *EIF2S3Y* and *USP9Y* as pseudogene sequences were identified in the proto-Y euchromatic region of *T. muenniniki*.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：Y染色体、進化、neo-Y、偽常染色体領域、オキナワトゲネズミ、分子細胞遺伝学

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳類は、XX/XY型の性染色体構成をもつ。XとY染色体はもともと一対の相同な染色体であったが、進化の過程で生じた組換え抑制によってY染色体は多くの遺伝子を失い、X染色体とは遺伝子数や組成の異なる染色体に分化した。そのため現在ではごく小さな相同領域（偽常染色体領域：PAR）においてのみ組換えを起こす。PARは性染色体に常染色体領域が付加されることで拡大し、Y染色体PARが欠失することで縮小する過程を繰り返し進化したと考えられている（addition-attrition 仮説）。性染色体一常

染色体転座は哺乳類のY染色体進化を解明する上で考慮すべき重要な要因であるが、上述の仮説を実証的に検証した研究はなくその進化的意義はほとんど未解明のままである。そこで有用なモデルとなるのがXおよびY染色体に新たに一対の常染色体が転座した哺乳類である。

著者らはこれまでの研究からトゲネズミ属で唯一Y染色体をもつオキナワトゲネズミ (*Tokudaia muenniniki*) において性染色体に一対の常染色体 (neo-X, neo-Y) が転座したことを明らかにしている。一対の常染色体が性染色体に転座した他の哺乳類としては、

オオデバネズミ、コビトハツカネズミ、ウシ亜科の3種が知られている。このような種において neo-X と neo-Y および祖先 Y 染色体の進化過程を明らかにすることにより、性染色体-常染色体転座を考慮した新たな Y 染色体進化モデルが提唱できると期待される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、neo-X、neo-Y を有する哺乳類において、neo-X と neo-Y および祖先 Y 染色体領域の進化過程を明らかにし、性染色体-常染色体転座が Y 染色体進化にもたらす影響を解明することである。

具体的には、オキナワトゲネズミを用いて以下のことを明らかにする。

(1) neo-X、neo-Y 間の遺伝的分化の有無を確認し、neo-Y 上にオス特異的な領域が生じるかを明らかにする。

(2) 常染色体転座前の PAR (祖先 PAR) の同定および neo-X、neo-Y における PAR の進化的特徴の有無確認により、PAR 機能が neo-X、neo-Y に移行しているかを明らかにする。

(3) 祖先 Y ユークロマチン領域の構造と連鎖遺伝子群の機能性を確認し、祖先 Y 領域の進化過程を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) neo-X、neo-Y 間の遺伝的分化の有無の確認

neo-X、neo-Y 間の遺伝的分化の有無を確認するために、オキナワトゲネズミの neo-X、neo-Y 連鎖遺伝子を対象として雌雄複数個体の DNA サンプルを用いて PCR とシーケンスを行い、オス特異的な多型の有無を確認した。また、多型データをもとに neo-X、neo-Y 由来の各 BAC クローンを単離し、マルチプレックス法を用いた次世代シーケンス解析 (イルミナ HiSeq 1000、100bp paired-end) およびサンガー法によるシーケンス解析 (ABI3500xL) により塩基配列を決定した。Velvet v1.1 を用いた *de novo* アセンブルによって得られた neo-X、neo-Y のコンティグ配列をそれぞれ他種の相同領域と比較し、進化速度を求めた。また両者の進化速度に違いがあるかを明らかにするために Tajima's relative rate test を行った。

### (2) 祖先 PAR の同定および neo-X、neo-Y における PAR の進化的特徴の有無確認

マウスにおいて *MIDI* 遺伝子は PAR に存在する。そこでオキナワトゲネズミの祖先 PAR を同定するために *MIDI* 遺伝子を含む BAC クロンの単離と FISH 法による染色体上の位置の同定、塩基配列決定を行った。

neo-X、neo-Y における PAR の進化的特徴の

有無を確認するために、neo-X、neo-Y の染色体上の位置が異なる2地点 (動原体中位部、遠位部) およびコントロールとして常染色体

(21 番染色体の一部) の BAC クローンを単離し、マルチプレックス法を用いた次世代シーケンサーによって各領域の塩基配列を決定した。PAR は染色体末端部に位置し高頻度に組換えを起こすために、他領域よりも GC 含量が高いことや PAR 連鎖遺伝子は変異率が高いことが知られている。そこでマウスを外群として、オキナワトゲネズミとラットの各遺伝子の変異率を算出し、領域ごとにその平均値を比較した。

### (3) 祖先 Y ユークロマチン領域の構造と連鎖遺伝子群の機能有無の確認

祖先 Y 連鎖遺伝子のうち、*SRF* をはじめいくつもの遺伝子が Y 染色体長腕に多数コピー重複しているのに対し、*DDX3Y* および *UTY* は単一で Y 染色体短腕の動原体近位に存在していることがわかっている。そこで、*DDX3Y* または *UTY* を含む BAC クローンを単離し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列を決定した。Velvet v1.1 を用いて *de novo* アセンブルを行った。さらに PCR とサンガーシーケンス法を用いたゲノムウォーキングによりコンティグ配列を連結し祖先 Y ユークロマチン領域の構造をマウスと比較した。また、祖先 Y 連鎖遺伝子の機能性を予測するために、オキナワトゲネズミのゲノム配列からマウスの遺伝子構造をもとに mRNA 配列を推定した。また RT-PCR により、祖先 Y 連鎖遺伝子の発現有無の確認と mRNA 配列決定を行い、他種配列との比較により機能性を確認した。

## 4. 研究成果

### (1) neo-X、neo-Y 間の遺伝的分化の有無の確認

オキナワトゲネズミの雌雄複数個体を用いて3つの性的拮抗遺伝子 (一方の性に有利な機能をもつ遺伝子) を対象に neo-X、neo-Y 間の遺伝的分化の有無を確認した。その結果、neo-X、neo-Y の動原体近位に位置する *MARF1* と *SOX8* 遺伝子においてオス特異的な多型サイトが検出され、neo-X、neo-Y 間に遺伝的分化が生じていることが明らかとなった (表 1, 図 1, 2)。一方、性染色体の短腕末端部に位置する *CBX2* は、イントロンレスの配列が一对の常染色体に転位していたが、neo-X、neo-Y 配列間において多型は検出されず遺伝的分化はみられなかった (表 1, 図 1, 2)。

次に neo-X、neo-Y 間の遺伝的分化の程度を明らかにするために、*MARF1* と *SOX8* 遺伝子領域を含む neo-X、neo-Y 由来の各 BAC クローン配列を他のトゲネズミやマウス配列と比較した。その結果、オキナワトゲネズミの *MARF1* 遺伝子領域を含む 83 kb のゲノム領域

において、neo-X に比べて neo-Y で有意に変異率が増加していることがわかった ( $p < 0.001$ ,  $\chi^2$  検定; 図 3)。また、*MARF1* のコード領域において、neo-X に比べて neo-Y で有意にアミノ酸置換を伴う非同義置換が増加していた ( $p < 0.05$ ,  $\chi^2$  検定; 表 2)。一方、*SOX8* 遺伝子領域を含む 39 kb のゲノム領域では neo-X と neo-Y 間で変異率に有意差はみられず、コード領域におけるアミノ酸置換率にも差はみられなかった。*MARF1* はメスで重要な機能をもつ遺伝子であるのに対し、*SOX8* はオスに重要な遺伝子であることから、遺伝子機能の性差によって neo-X、neo-Y 間の分化の程度に違いが生じる可能性が考えられた。

以上の結果から、neo-X、neo-Y の動原体近位部 (祖先 Y 領域の隣接領域) において少なくとも部分的に遺伝的分化が生じており、neo-Y 上にオス特異的な領域が獲得されたことが明らかとなった。今回 neo-Y におけるオス特異的な領域 (組換え抑制領域) の全貌を同定するまでには至らなかったため、今後さらなる解析が必要とされる。

表 1. *MARF1*, *SOX8*, *CBX2* 遺伝子領域における雌雄間の多型サイト

対象領域	サイズ (bp)	多型サイト	アマミトゲネズミ		オキナワトゲネズミ		neo-X, neo-Y の遺伝子型		
			♂♀ (n=15)	♂♀ (n=9)	♂♀ (n=4)	neo-Y: C	neo-X: A		
<i>SOX8</i> intron1	600	551 867	A/A G/G	C/A T/G	A/A G/G	neo-Y: C	neo-X: A	neo-Y: C	neo-X: G
<i>MARF1</i> intron3	825	22	T/T	T/G	G/G	neo-Y: T	neo-X: G	neo-Y: T	neo-X: G
		258 356-358	C/C TGT/TGT	T/C TGT/---	C/C ---/---	neo-Y: T	neo-X: C	neo-Y: TGT	neo-X: ---
<i>CBX2</i> intron1-4	4155	None	—	—	—	—	—	—	—

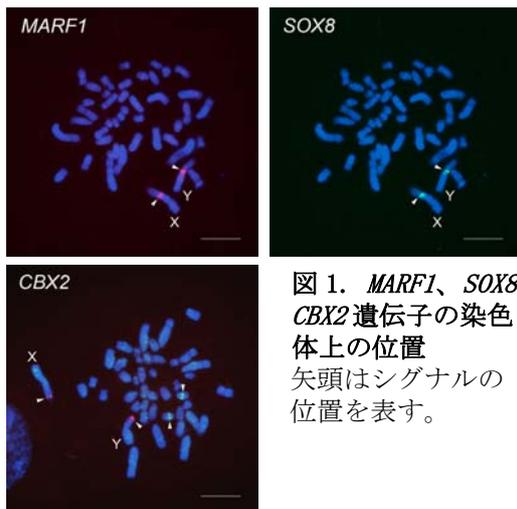


図 1. *MARF1*, *SOX8*, *CBX2* 遺伝子の染色体上の位置  
矢頭はシグナルの位置を表す。

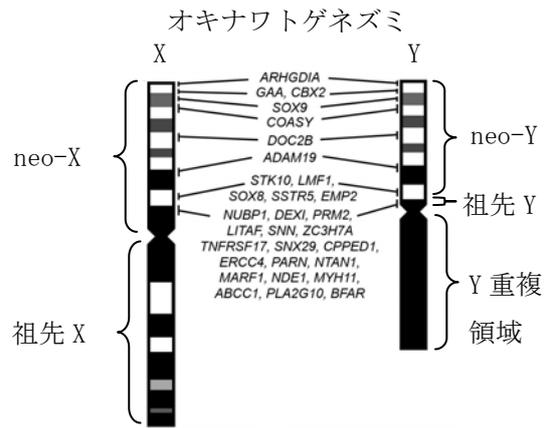


図 2. オキナワトゲネズミの性染色体の構造および neo-X、neo-Y 連鎖遺伝子の配置順

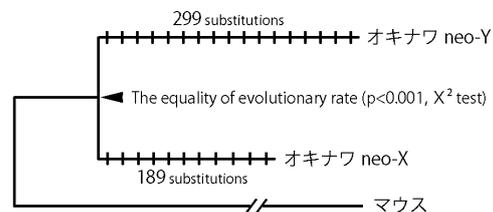


図 3. *MARF1* 遺伝子を含む 83 kb のゲノム領域における neo-X、neo-Y 配列の分子進化  
neo-X、neo-Y 間の進化速度は不均一であった。

表 2. *MARF1* の neo-X、neo-Y 間にみられたアミノ酸置換サイト

種名	<i>MARF1</i> におけるアミノ酸置換サイト															
	116	127	280	321	333	695	738	879	1058	1241	1310	1575	1670	1674		
オキナワトゲネズミ neo-Y	S	N	I	C	P	K	I	A	S	D	G	V	R			
オキナワトゲネズミ neo-X	G	S	N	G	T	L	R	M	V	C	E	A	M	K		
アマミトゲネズミ	G	S	N	G	T	L	R	M	A	C	E	A	V	R		
トクノシマトゲネズミ	G	S	N	G	T	L	R	M	A	C	E	A	?	?		
マウス	G	S	N	G	T	L	R	M	A	C	E	A	V	G		
ラット	G	S	N	G	T	L	R	M	A	C	E	A	V	G		
ヒト	G	S	N	G	T	A	R	M	A	C	D	S	V	H		
ウシ	G	S	N	G	T	V	R	M	A	C	D	S	G	K		
ジャイアントパンダ	G	S	N	G	T	V	R	M	A	C	D	S	I	E		

## (2) 祖先 PAR の同定および neo-X、neo-Y における PAR の進化的特徴の有無確認

オキナワトゲネズミの *MIDI* 遺伝子を含む 6 つの BAC クローンにおいて *MIDI* 遺伝子の部分配列 (1453 bp) は全て一致し、マウス配列との相同性は 92.6% であった。4 つの BAC クローンの染色体上の位置を確認した結果、X 染色体の長腕に存在することが明らかとなり、Y 染色体にはシグナルは観察されなかった (図 4)。さらに、オキナワトゲネズミの *MIDI* の染色体上の位置はラットと一致していた (図 5)。この結果から、オキナワトゲネズミにおいて *MIDI* は PAR 遺伝子ではないと考えられた。また、他のマウス PAR 遺伝子である *STS* はオキナワトゲネズミにおいて PCR 増幅がみられず同定できなかった。

次に、neo-X と neo-Y が PAR としての進化的特徴をもつかを明らかにするために、

neo-X と neo-Y の遠位部と中位部、コントロールとして常染色体 (21 番染色体の一部) において次世代シーケンス解析を行い、それぞれ 1.6 Mb、1 Mb、0.9 Mb の塩基配列を決定した。各領域において、マウスを外群として染色体のシンテニーが高いラットとオキナワトゲネズミの連鎖遺伝子群の変異率を比較した結果、neo-X、neo-Y の遠位部に位置する遺伝子群において、ラットに比べてオキナワトゲネズミで変異率が高い傾向にあることがわかった (表 3)。

本研究においてオキナワトゲネズミの祖先 PAR を同定することはできなかったが、neo-X、neo-Y の遠位部 (末端側) が PAR としての進化的特徴をもつことが示唆された。

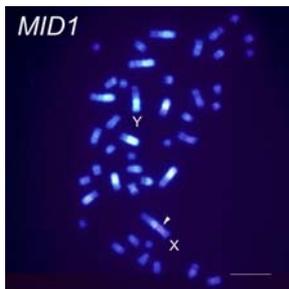


図 4. *MID1* 遺伝子の染色体上の位置  
X 染色体のみにシグナルがみられ、Y 染色体には観察されなかった。

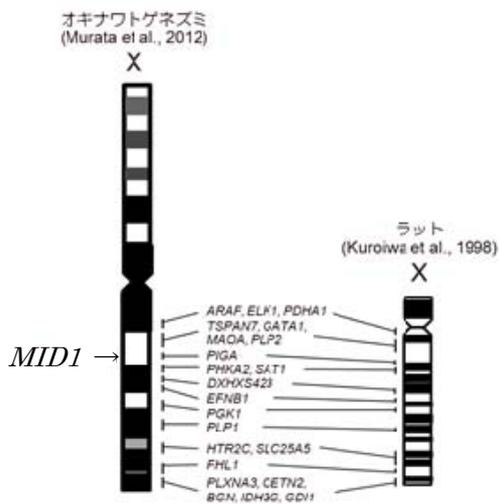


図 5. オキナワトゲネズミとラットの比較染色体マッピング

*MID1* 遺伝子の染色体上の位置はラット X 染色体における位置と一致した。

表 3. 3 領域における連鎖遺伝子群の変異率比較

連鎖遺伝子群の染色体上の位置			遺伝子数	遺伝子群の変異率 (オキナワ/ラット)	
オキナワトゲネズミ	マウス	ラット		平均値	分散
neo-X, neoY 遠位	chr. 11	chr. 10	9	1.0759	0.0187
neo-X, neoY 中位	chr. 11	chr. 10	6	0.8039	0.0091
chr. 21	chr. 8	chr. 19	8	0.8953	0.0194

### (3) 祖先 Y ユークロマチン領域の構造と連鎖遺伝子群の機能有無の確認

次世代シーケンス解析により *DDX3Y* または *UTY* を含む 5 つの BAC クローン配列を決定し、*de novo* アセンブル解析を行い、総コンティグ数=129、総コンティグ塩基数 (bp) = 384453、最大コンティグ長 (bp) = 74726、n50 (bp) (配列全体に含まれる全塩基の半分がこれより長いコンティグに含まれていることを示す) = 46299 のアセンブル結果を得た。PCR およびサンガーシーケンス解析によりコンティグ内、コンティグ間の GAP を取り除き、約 373 kb のセグメント配列を得た。*de novo* アセンブル配列のアノテーションの結果、オキナワトゲネズミの祖先 Y ユークロマチン領域の構造は *SRY* の位置を除きマウスとシンテニーが高いことが明らかとなった (図 5)。

マウスの遺伝子構造からオキナワトゲネズミの Y 連鎖遺伝子配列の機能性を予測した結果、*SRY* はフレームシフトにより中途停止コドンが出現し偽遺伝子化していることがわかった。また *EIF2S3Y* もエクソン 1~4 および 12 を欠失しており、エクソン 7 に 2 塩基の挿入配列が確認され、偽遺伝子化していた。*USP9Y* については BAC クローン配列がエクソン 29 までしか含まなかったためにエクソン 1~28 を決定できなかったが、エクソン 29 内に中途停止コドンが存在することから、偽遺伝子化している可能性が考えられた。一方、*DDX3Y* と *UTY* 配列にフレームシフトや中途停止コドンはみられず機能配列と予測された。*TSPY* はマウスで偽遺伝子化しているためラット配列と比較した結果、フレームシフトや中途停止コドンはみられなかった。

2013 年 3 月の生態調査において死亡して間もない成体オス 1 個体の組織が得られたため、RNA サンプルを用いた解析ができるようになった。そこで mRNA 配列の決定により祖先 Y 連鎖遺伝子の機能性を確認した。RT-PCR の結果、精巣において *DDX3Y*、*UTY*、*EIF2S3Y*、*RBM1A1* の mRNA 発現が確認された。オキナワトゲネズミとマウス間で *DDX3Y*、*UTY* のアミノ酸配列の相同性はそれぞれ 96.8% (637/658 aa)、93.2% (1130/1213 aa) であり、オキナワトゲネズミの *DDX3Y* と *UTY* は機能性を保持していると予測された。また 2 遺伝子の mRNA 配列とゲノム配列は 100% 一致し、マウスと相同なエクソン-イントロン構造をもつことが明らかとなった。*EIF2S3Y* は 2 つの SNP サイトと 5 種類のスプライシングバリエーションによって区別される少なくとも 8 種類の mRNA が発現していることがわかった (図 6)。観察された 2 つの SNP は同義置換であり、variant1~4 のアミノ酸配列は 100% 一致し、*EIF2S3Y* mRNA variant1 の部分配列とマウス、アマミトゲネズミの塩基配列との相同性はそれぞれ 97.5% (836/857 bp)、99.4%

(852/857 bp) と高かった。variant4 はエクソン7を欠失しているがフレームシフトは起こらず、中途停止コドンは出現しなかった。一方で variant5~8 はフレームシフトにより中途停止コドンが出現した。祖先 Y ユークロマチン領域に存在する本遺伝子のゲノム配列には7番目のエクソンに2塩基の挿入配列が存在するが mRNA 配列にはみられず、さらに mRNA 配列とゲノム配列の間には10の塩基置換が観察された。このことから、祖先 Y ユークロマチン領域に存在する *EIF2S3Y* 配列に代わり、遺伝子重複によって生じた少なくとも3種類のコピー配列が精巣で発現していることが明らかとなった。また、*RBM1A1* の mRNA 部分配列を決定した結果、マウスとの相同性は87.0% (107/123 bp) であり、偽遺伝子化しているアマミトゲネズミの *RBM1A1* 配列との相同性は88.6% (109/123 bp) であった。*RBM1A1* の機能有無を確認するために ORF 全長の配列決定が必要とされる。*SRY*、*TSPY*、*USP9Y* については、mRNA の PCR 増幅がみられず、精巣での発現を確認することができなかった。

以上の結果から、*SRY* の位置を除きマウス Y 染色体と高い保存性をもつオキナワトゲネズミの祖先 Y ユークロマチン領域において、単一コピーで存在する *DDX3Y* と *UTY* は機能配列として保存されていたが、*SRY*、*EIF2S3Y*、*USP9Y* は偽遺伝子化していることが明らかとなった。*EIF2S3Y* については重複コピーが機能を代行している可能性が示されたが、*SRY* と *USP9Y* については情報が得られなかった。

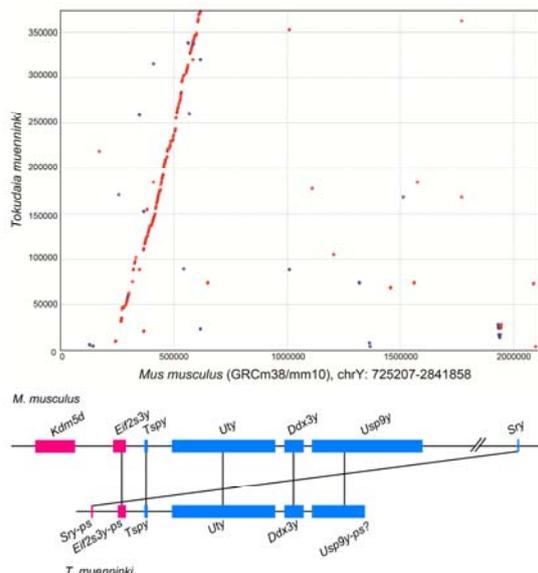


図5. オキナワトゲネズミとマウスの祖先 Y 染色体配列アライメント (上) および Y 連鎖遺伝子の配置模式図 (下)  
赤色：配列の方向性 (+) の遺伝子、青色：配列の方向性 (-) の遺伝子

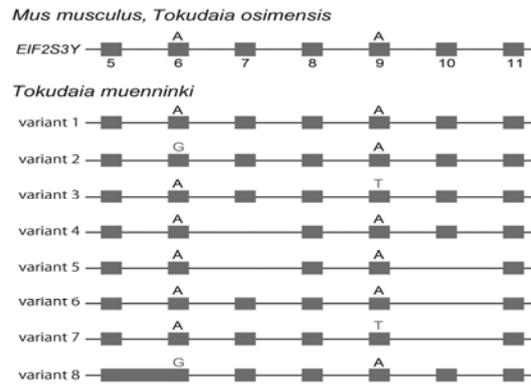


図6. オキナワトゲネズミの *EIF2S3Y* mRNA パリアント

四角はエクソンを表す。エクソン6およびエクソン9にSNPが観察され、そのアレルをエクソン上に示した。

### 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1件)

① Murata C, Yamada F, Kawauchi N, Matsuda Y, Kuroiwa A

The Y chromosome of the Okinawa spiny rat, *Tokudaia muenninki*, was rescued through fusion with an autosome  
Chromosome Research, 査読有, Vol. 20, No. 1, 2012, pp. 111-125  
DOI: 10.1007/s10577-011-9268-6

[学会発表] (計3件)

① 村田知慧、オキナワトゲネズミの性染色体に転座した常染色体領域の進化、日本哺乳類学会 2012 年度大会、2012.9.21~9.23、麻布大学 (神奈川県相模原市)

② 村田知慧、オキナワトゲネズミにおける neo-X、neo-Y 連鎖遺伝子の進化過程、財団法人染色体学会 第63回 (2012 年度) 年会、2012.10.5、旭川市大雪クリスタルホール国際会議場 (北海道旭川市)

③ 村田知慧、オキナワトゲネズミの性染色体に転座した常染色体領域 (neo-X、neo-Y) の分化過程、日本分子生物学会第35回大会、2012.11.12、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tokushima-u.ac.jp/med/culture/jinruiden/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 知慧 (MURATA CHIE)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・助教

研究者番号：00614132

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：