

平成 30 年 4 月 4 日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2017

課題番号：25711023

研究課題名(和文) ショウジョウバエの近縁種比較に基づく遺伝子量補償機構の分子進化過程の解明

研究課題名(英文) Molecular evolutionary processes of dosage compensation based on the comparisons of closely-related species in *Drosophila*

研究代表者

野澤 昌文 (Nozawa, Masafumi)

首都大学東京・理工学研究科・助教

研究者番号：50623534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,300,000円

研究成果の概要(和文)：性染色体が一对の常染色体から進化すると、通常Y染色体は組換えの機会を失い退化する。この潜在的不利を補うため、多くの生物はオスのX染色体上の遺伝子の発現量が上昇してY染色体遺伝子の退化による発現量の減少を補っている(遺伝子量補償)。しかし、遺伝子量補償がどのような分子進化過程を経て発達するのがは不明であった。

本研究では、約100万年前に新たに性染色体を獲得したミランダショウジョウバエとその近縁種のゲノム・トランスクリプトームを比較解析することで、この謎に迫った。その結果、性染色体になるとY染色体だけでなくX染色体も退化しうること、遺伝子量補償は個々の遺伝子にも作用することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：When sex chromosomes emerge from a pair of autosomes, the Y chromosomes highly degenerate due to recombination suppression in many cases. To overcome this potential disadvantage, many organisms acquire the so-called dosage compensation by which X-linked genes in males are upregulated to compensate the decrease of gene dosage due to the loss of Y-linked homologs. However, how dosage compensation evolves at the molecular level largely remains unknown.

To tackle this question, I have focused on *Drosophila miranda* that acquired the sex chromosomes around 1 million years ago. Comparing the genomes and transcriptomes of *D. miranda* and its closely-related species without young sex chromosomes, I found that not only Y but also X degenerate in the early stage of sex chromosome evolution. I also found that dosage compensation operates on each gene at the initial evolutionary stage (i.e., gene-by-gene dosage compensation).

研究分野：進化遺伝学

キーワード：性染色体 ショウジョウバエ 遺伝子量補償 遺伝子発現 ゲノム トランスクリプトーム 偽遺伝子化

1. 研究開始当初の背景

性染色体は、オスで組換えが抑制される (XY 型の場合) 子孫への伝達様式が性によって異なる、など常染色体と比べて様々な違いが存在する。性染色体は生物の進化過程で何度も独立に生じてきたが、その分子進化過程には以下のような疑問が残されていた。

多くの生物において、Y 染色体にはわずかな遺伝子しか残っていないが、多くの遺伝子はなぜ、いつ、どのようにして消失したのか？

Y 染色体上の遺伝子が消失すると、X 染色体上の相同遺伝子はオスで 1 個、メスで 2 個となるが、その違いを相殺するための遺伝子量補償機構は存在するのか？ 遺伝子量補償が存在する場合、それはいつ、どのようにして進化したのか？

ショウジョウバエは、その共通祖先 (約 6000 万年前) においてすでに性染色体を持っていたが、その後少なくとも 4 回独立に性染色体と常染色体が融合し、新たな性染色体が進化している (Brosseau 1960)。したがって、ショウジョウバエは性染色体の進化を研究する上で格好の材料である。すでにマイクロアレイ法、RNA-seq 法による網羅的な遺伝子発現解析 (Gupta et al. 2006 など) によって、遺伝子量補償の存在が示唆されてきた。

ただし、この結論は「X 染色体の平均遺伝子発現量が同種の雌雄でほぼ等しい」という結果から得られたものに過ぎない。本来、遺伝子量補償の有無を調べるには、性染色体が常染色体であった時の遺伝子発現量 (祖先) と、性染色体になってからの発現量 (子孫) を比較すべきである。申請者は、約 1500 万年前に性染色体を新たに獲得した *D. pseudoobscura* (Pse) の X 染色体右腕 (XR) と *D. melanogaster* (Mel) の相同常染色体上の遺伝子の発現量を RNA-seq 法を用いて網羅的に比較した。その結果、Pse と Mel の相同遺伝子の平均発現量比 (Pse:Mel) はメスで約 1.0、オスにおいても約 0.9 (補償がなければ 0.5) であり、Pse においては多くの遺伝子に遺伝子量補償が作用していることが示唆された。

しかしながら、遺伝子量補償機構がどのように発達してきたかは未だ明らかではない。例えば、X 染色体の遺伝子量補償は Y 染色体の減衰 (すなわち偽遺伝子化) と共に発達してきた可能性があるが、Pse の Y 染色体はすでに減衰がほぼ完了しているため、両者の関係を調べることができない。このことが、より最近性染色体が進化したショウジョウバエのゲノム・トランスクリプトーム解析を行いたいという本研究の着想につながった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、約 100 万年前に性染色体 (以後 Neo 性染色体とよぶ) が新たに進化したショウジョウバエ *D. miranda* (Mir、図 1) のゲノム及びトランスクリプトームを、近縁

種 *D. pseudoobscura* (Pse) と比較し、Y 染色体の減衰が X 染色体の遺伝子量補償発達の引き金になっているかどうかを検証することを目的とする。具体的には、4 年間の研究期間内に以下のことを明らかにする。

Mir と Pse 両種のゲノム配列、トランスクリプトーム配列を解読する。また、複数の発生ステージ、組織における網羅的な遺伝子発現解析も行う。

で得られたデータをもとに、Mir の Neo-X 染色体の遺伝子量補償の程度を明らかにする。

もし Y 染色体の減衰が X 染色体の遺伝子量補償発達の引き金になっているとすると、Y 染色体遺伝子が偽遺伝子化したとき、それを補うために X 染色体の相同遺伝子の転写 (もしくは翻訳) 活性が上昇するはずである。そこで、上記の発現データから、X-Y 相同遺伝子の転写活性に負の相関があるかを調べる。

遺伝子量補償機構の保存性と多様性: 補償の誘導に関わる遺伝子量補償複合体 (通称 DCC) の認識モチーフ配列をこの 2 種で同定し、すでに分かっている Mel の認識モチーフ (Alekseyenko et al. 2008) と比較する。

個々の遺伝子の遺伝子量補償の程度を決定する要因: 各遺伝子の遺伝子量補償の程度と、染色体上の位置、遺伝子の機能、MSL モチーフからの距離、などとの相関を調べ、個々の遺伝子の遺伝子量補償の程度を決定している要因を明らかにする。

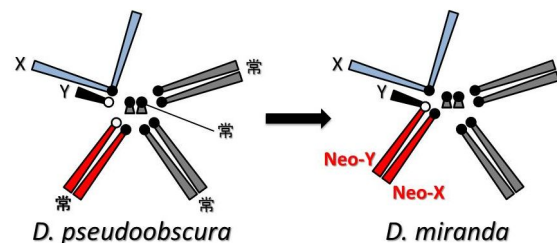


図 1. 本研究に用いたショウジョウバエ 2 種の核型

3. 研究の方法

ゲノム配列の決定

Y 染色体の減衰と X 染色体の遺伝子量補償との関係を調べるためには、まず対象種のゲノム配列を明らかにする必要がある。そこで、Mir のゲノム配列の決定を行った。Pse のゲノム配列はすでに決定・公開されている。また、当初計画にはなかったが外群種である *D. obscura* (Obs) のゲノム配列も新規に決定した。まず、これらの種をストックセンターから入手し、兄妹によるペア交配を 3~8 世代継続した。これにより、ゲノム内のヘテロ領域をできる限りホモ化した。オスとメスから別々に DNA を抽出し、配列決定はイルミナ HiSeq を用いて雌雄別々に行った。Mir については雌雄それぞれの DNA から約 500 bp の

インサートのペアエンドライブラリ、Obs については *De novo* アセンブリが必要であるため、メスの DNA を用いて約 180 bp、3 kbp、8 kbp という 3 つのインサートサイズのペアエンド (3 kbp と 8 kbp ライブラリに関してはメイトペア) を作成した。

得られたリードは、Mir についてはメスのリードを用いてリファレンスゲノムにマッピングし、SNP や INDEL を置き換えてゲノム配列とした。さらにオスのリードをメスゲノムにマッピングした。Neo-X 上で検出された SNP や INDEL は Neo-Y に由来すると考えられるため、Neo-X をこれら変異に置き換えることで Neo-Y のアセンブリを得た。

Obs についてはアセンブラ Allpaths-LG を用いて *De novo* アセンブリを行った (表 1)。

表 1. *D. obscura* ゲノムアセンブリの概要

最長 Scaffold (bp)	3,524,470
Scaffold N50 (bp)	472,512
平均 scaffold 長 (bp)	93,988
Scaffold 数	1,935
総塩基数 (bp)	181,868,570
N の割合 (%)	4.8

トランスクリプトーム配列の決定

遺伝子量補償を正確に検証するためには、各遺伝子の発現量を近縁種間で網羅的に比較する必要がある。組織特異性を考慮し、幼虫全身、蛹全身、成虫 (頭部、胸部、腹部) の雌雄各サンプルから RNA を抽出し、イルミナシーケンサーを用いて 100 bp のペアエンドシーケンスを行った。

得られたリードを TopHat2 および Cufflinks を用いてゲノム配列にマッピングし、トランスクリプトーム配列を決定した。

遺伝子発現量の推定

幼虫 (全身、成虫原基、それ以外)、蛹 (全身)、成虫 (全身、頭部、胸部、腹部、腹部から生殖器を除いた部分、精巢、副精巢、卵巣) の雌雄各サンプルを用いて RNA-seq を行い、得られたリードを BLASTN を用いてトランスクリプトーム配列にマッピングし、遺伝子ごとにマッピングされたリード数を計算した。また FPKM 値も計算した。

Mir の Neo-X 染色体における遺伝子量補償複合体 (DCC) の認識モチーフの同定

ChIP-seq 法を用いて Mir における認識モチーフの決定を試みた。まず、この DCC を形成する 5 つのタンパク質のうち、MLE と MSL3 に対するポリクローナル抗体を作成した。

また、ChIP 用として市販されているショウジョウバエ用 H3K4me3 (転写活性領域のヒストンマーク)、H3K27me3 (転写不活性領域のヒストンマーク)、H4K16Ac (遺伝子量補償のヒストンマーク) 抗体を用いて ChIP-seq を行った。

4. 研究成果

Neo-Y 遺伝子の約 3 分の 2 は偽遺伝子である

Mir、Pse、Obs の 3 種のゲノム・トランスクリプトームデータから各ゲノムの遺伝子をアノテーションし、それぞれの遺伝子が機能遺伝子かそれとも偽遺伝子かを判定した。その結果、Mir の Neo-Y 上の遺伝子の約 3 分の 2 の遺伝子が偽遺伝子であることが分かった。また、多くの偽遺伝子の ORF は壊れておらず、非発現遺伝子であった。このことは偽遺伝子化がおもに遺伝子制御領域に生じた突然変異やエピジェネティック変異により生じていることを示唆している (図 2)。

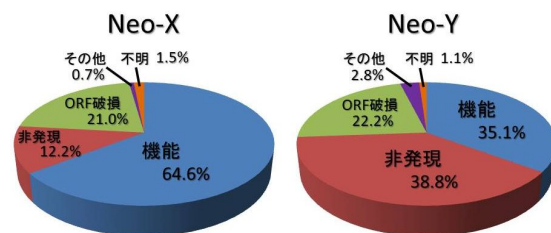


図 2. *D. miranda* の Neo 性染色体上の遺伝子の分類

精巢、副精巢で発現する Neo-Y 遺伝子は偽遺伝子になりにくい

ではどのような遺伝子が Neo-Y において偽遺伝子になりやすい、またはなりにくいのでしょうか。このことを調べるため、Neo 性染色体に存在する全ての遺伝子を 4 つのカテゴリー (Neo-XY 共に機能遺伝子、Neo-X でのみ機能遺伝子、Neo-Y でのみ機能遺伝子、Neo-XY 共に偽遺伝子) に分類して比較した。その結果、Neo-Y でのみ機能遺伝子であるような遺伝子は精巢や副精巢で最も多く発現する遺伝子の割合が他のカテゴリーに比べて有意に大きいことが分かった (図 3)。したがって、Neo-Y にはオスで機能する遺伝子が機能遺伝子として保持されやすいものと考えられる。

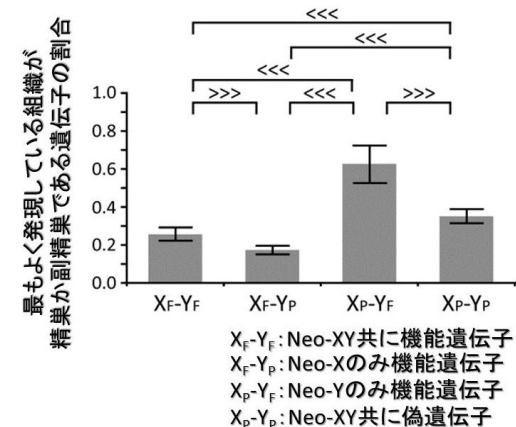
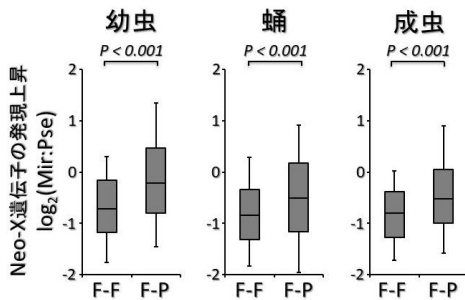


図 3. Neo 性染色体遺伝子の機能と精巢・副精巢で発現する遺伝子の割合の関係

Neo-Xの遺伝子量補償機構は個々の遺伝子に対して作用する

Neo-Yの退化とNeo-Xの遺伝子量補償に関連があるとすると、Neo-Y遺伝子が偽遺伝子で合った場合、そのNeo-X相同遺伝子は発現上昇しているはずである。そこで、MirのNeo-X遺伝子とPseの常染色体上の相同遺伝子の発現量比(Mir:Pse)を計算した。その結果、調べた全ての組織において、Neo-Y遺伝子が偽遺伝子である場合、Neo-Y遺伝子が機能遺伝子である場合と比べてNeo-X相同遺伝子の発現が上昇する傾向にあることが分かった(図4)。このことは、Neo-Y遺伝子の偽遺伝子化とNeo-X相同遺伝子に生じる遺伝子量補償(発現量上昇)に関連があることを示唆する。つまり、個々のNeo-X遺伝子に作用する何らかの遺伝子量補償機構が存在すると考えられる。



遺伝子量補償あり: $\log_2(\text{Mir:Pse}) = 0$ F-F: Neo-XY共に機能遺伝子
 遺伝子量補償なし: $\log_2(\text{Mir:Pse}) = -1$ F-Y: Neo-Yのみ偽遺伝子

図4. Neo-Y遺伝子の機能性とNeo-X相同遺伝子の発現上昇の関係。他の組織においても同様の結果が得られた。

Neo-X遺伝子の発現上昇がNeo-Y相同遺伝子の偽遺伝子化を促進している可能性がある

では、性染色体の進化過程においてNeo-Y遺伝子の退化とNeo-X遺伝子の発現上昇のどちらが先に生じているのだろうか。可能性としては、ア) Neo-Y遺伝子が退化するとそれに呼応する形でNeo-X相同遺伝子の発現が上昇するメカニズムが進化する、イ) 何らかの形でNeo-X遺伝子に発現上昇メカニズムができると、そのNeo-Y相同遺伝子は偽遺伝子化しやすくなる、の2つが考えられる。ア) が正しいとすると、Neo-Y遺伝子が最近偽遺伝子化している場合、Neo-X相同遺伝子の遺伝子量補償機構が発達しきっていない可能性がある。いいかえると、Neo-Y遺伝子が偽遺伝子化してからの時間とNeo-X相同遺伝子の発現上昇の程度には正の相関があると予想される。一方イ) では、まずNeo-X遺伝子が潜在的に発現上昇する機構を獲得するため、そのような相関はみられないことが期待される。

解析の結果、Neo-Y遺伝子が偽遺伝子化してからの時間とNeo-X相同遺伝子の発現上昇の間に有意な相関はみられなかった(図5)。このことから、性染色体の初期進化過程では、

まず個々のNeo-X遺伝子が何らかの潜在的な発現上昇機構を獲得し、そのような機構を獲得した遺伝子のNeo-Y相同遺伝子は偽遺伝子化しやすい傾向にあると考えられる。

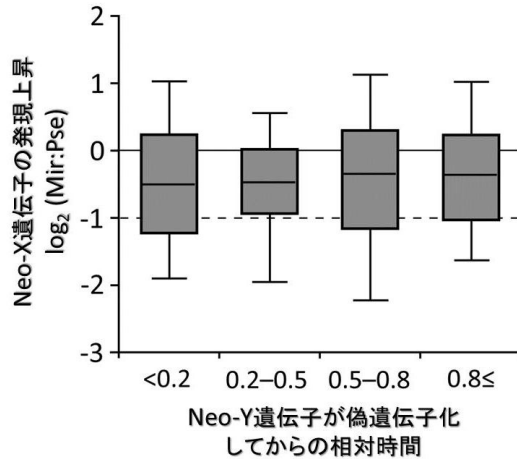


図5. Neo-Y遺伝子が偽遺伝子化してからの時間とNeo-X相同遺伝子の発現上昇の関係。全てのカテゴリ間で発現上昇の程度に有意差はみられなかった。

D. miranda においてはNeo-YのみならずNeo-Xも退化している

図2をみると、Neo-Xにおいても約3分の1の遺伝子が偽遺伝子である。このことは、性染色体になるとY染色体だけでなくX染色体も退化する可能性を示唆している。

そこでこの可能性をより詳細に検証するために、3種のオーソログ遺伝子を用いて、各系統で生じた偽遺伝子化の回数を最節約的に推定した(図6)。その結果、Neo-Xにおける偽遺伝子化の速度はNeo-Yの約3分の1であったが、近縁種でNeo性染色体を持たないPseの相同常染色体(第3染色体)における偽遺伝子化の速度に比べて約2倍(242/Myr vs. 229/2Myr)に上昇していた。また、MirがPseと分岐した後Neo性染色体を獲得する前の枝と比べてもやはり2倍以上の速度(242/Myr vs. 84/Myr)で偽遺伝子化が生じていることが分かった。以上の結果から、少なくともMirにおいてはNeo-YのみならずNeo-Xも退化していることを示唆している。

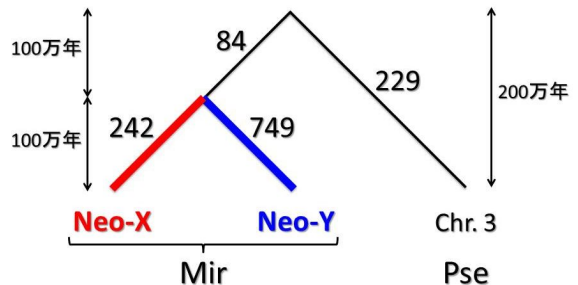


図6. *D. miranda* と *D. pseudoobscura* 分岐後の各系統における偽遺伝子化の数。この2種の分岐前は各遺伝子が機能遺伝子であったという仮定のもと、最節約的に推定した。

精巣、副精巣で発現する Neo-X 遺伝子は偽遺伝子になりやすく、卵巣で発現する Neo-X 遺伝子は偽遺伝子になりにくい。ではどのような遺伝子が Neo-X において偽遺伝子になりやすいまたはなりにくいのであろうか。そこで全ての Neo-X 遺伝子を最も多く発現している組織で分類し、それぞれのカテゴリーで偽遺伝子数と機能遺伝子数の比を計算した。その結果、精巣や副精巣で最も多く発現する遺伝子は偽遺伝子になりやすく、逆に卵巣で最も多く発現する遺伝子は偽遺伝子になりにくい傾向があることが分かった(図 7)。このことは Mir の Neo-X はその初期進化過程においてメス化(脱オス化)していることを示唆している。

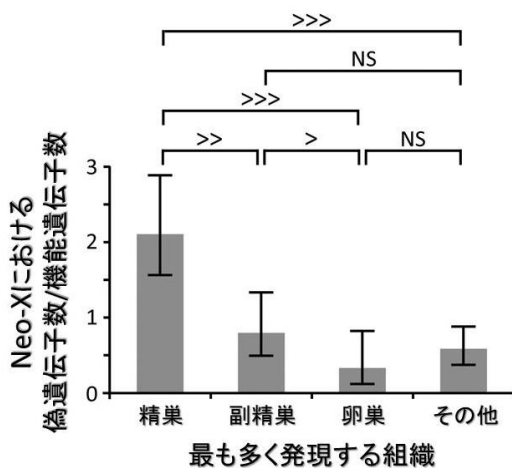


図 7. Neo-X 遺伝子における発現組織と遺伝子機能の関連

結論

本研究により、*D. miranda* の Neo 性染色体はその初期進化過程において多くの遺伝子が偽遺伝子化していることが分かった。Y 染色体が退化するというはこれまでよく知られていたが、X 染色体も退化するというは本研究によって初めて明らかになったことである。これは、性染色体を獲得することがこれまで考えられていた以上に潜在的に不利であることを示唆している。

一方で、Neo-X、Neo-Y 染色体ともに退化しつつもその影響が最小限になるような形で進化していることも明らかになった。つまり、Neo-X ではオスでのみ機能する遺伝子が偽遺伝子化する傾向にあり、逆に Neo-Y ではオスで機能する遺伝子は機能遺伝子として保持されやすい、ということである。

ショウジョウバエには *D. miranda* 以外にも Neo 性染色体を独立に獲得した種が複数存在する(例えば *D. albomicans* や *D. americana*)。今後これらの種についても同様の解析を行うことで、性染色体進化の初期過程における共通性と独自性を見出していけるものと考えている。また、将来的には異なる分類群における Neo 性染色体を研究することで、性染色体進化の共通解を得たいと考えている。

課題

本研究では、当初遺伝子量補償複合体(DCC)の認識モチーフを同定し、進化過程における DCC の保存性と独自性についても明らかにしようと考えていた。しかし、作成した抗 DCC 抗体のクオリティチェックに手間取り、この解析を行うことができなかった。また、これを補うため、市販されているいくつかのクロマチン修飾抗体を用いた ChIP-seq を試みたものの、明確な結果を得ることは出来なかった。これらの分野のエキスパートを連携研究者や研究協力者(分担研究者は若手研究なので不可)として招くことで解決できたのではないかと反省している。

最後に、本研究課題を支援してくださった関係者の皆様と日本学術振興会に心より感謝申し上げます。

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)

Nozawa M, Onizuka K, Fujimi M, Ikeo K, Gojobori T. (2016) Accelerated pseudogenization on the neo-X chromosome in *Drosophila miranda*. *Nat. Commun.* 7:13659. 査読有 DOI:10.1038/ncomms13659

Nozawa M, Fujimi M, Iwamoto C, Onizuka K, Fukuda N, Ikeo K, Gojobori T. (2016) Evolutionary transitions of microRNA-target pairs. *Genome Biol. Evol.* 8:1621-1633. 査読有 DOI:10.1093/gbe/evw092

Nozawa M and Kinjo S. Origin and evolution of non-coding RNAs. (2016) *Encyclopedia for Evol. Biol.* 3:130-135. 査読有 ISBN: 978-0-12-800426-5

Nozawa M, Fukuda N, Ikeo K, and Gojobori T. (2014) Tissue- and stage-dependent dosage compensation on the neo-X chromosome in *Drosophila pseudoobscura*. *Mol. Biol. Evol.* 31:614-624. 査読有 DOI:10.1093/molbev/mst239

[学会発表](計30件)

Nozawa M (2018) How have sex chromosomes become a major sex-determination system in spite of their potential disadvantage? 2017 UOS-TMU Joint Conference, Seoul, South Korea (Invited talk)

野澤昌文(2017)ショウジョウバエにおける Neo 性染色体の進化: 性染色体化は有害か? *ConBio2017・多細胞動物における性決定システムの多様性と進化*, 神戸(ワークショップ, 共同企画者)

野澤昌文(2017)ショウジョウバエゲノムと遺伝学で性染色体の進化をどこまで理解できるか? *遺伝研究集会・進化遺伝学における実験的研究と理論的研究の融合*, 三島

(ワークショップ, 共同企画者)

Nozawa M (2017) Accelerated pseudogenization on the neo-X chromosome in *Drosophila miranda*. *SMBE satellite meeting on Molecular Evolution and Medicine*, Philadelphia, USA (Invited talk)

野澤昌文 (2017) ミランダショウジョウバエにおける Neo-X 染色体の退化. 第19回日本進化学会, 京都 (ポスター)

Nozawa M (2017) Not only the neo-Y chromosome but also the neo-X chromosome is under accelerated pseudogenization in *Drosophila miranda*. *The 2017 SMBE conference*, Austin, USA (Poster)

野澤昌文 (2017) 性染色体化は Y 染色体だけでなく X 染色体の退化も引き起こす? : ショウジョウバエ Neo 性染色体を用いた検証. 性と生殖の懇談会, 名古屋 (ワークショップ, 招待講演)

野澤昌文 (2016) 性染色体の進化: なぜ多くの生物が性染色体を持つのか? 第88回日本遺伝学会, 三島 (ワークショップ)

野澤昌文 (2016) 性染色体の退化過程の解明: ORF の破損? それとも転写の停止? 第18回日本進化学会, 東京 (一般口演)

野澤昌文 (2016) 性染色体と性的拮抗の進化. 遺伝研研究集会・分子進化学の現状と今後の展望, 三島 (ワークショップ, 企画代表者)

Nozawa M (2016) Evolution of sex chromosomes: Why are they so pervasive? *Department Seminar*, Tokyo Metropolitan University, Hachioji, Japan (Seminar)

野澤昌文 (2015) ショウジョウバエにおける性染色体の進化: 性染色体は進化の袋小路か? 首都大学東京生物学教室セミナー, 八王子 (招待セミナー)

野澤昌文 (2015) メス化およびオス化がショウジョウバエ Neo 性染色体の偽遺伝子化を促進する. 第87回日本遺伝学会, 仙台 (一般口演)

野澤昌文 (2015) ショウジョウバエにおける遺伝子量補償の進化 - 異型性染色体の進化過程解明を目指して -. 遺伝研研究集会・ビッグデータ時代の分子進化, 三島 (ワークショップ, 共同企画者)

野澤昌文 (2015) 遺伝子発現からみる表現型進化. 宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センターセミナー, 宇都宮 (セミナー)

野澤昌文 (2014) 遺伝子量補償機構の分子進化. 遺伝研シンポジウム・木村資生博士生誕90周年記念シンポジウム, 三島 (シンポジウム)

野澤昌文 (2014) ショウジョウバエ種間比較から探る遺伝子量補償機構の進化. 第86回日本遺伝学会, 長浜 (ワークショップ)

Nozawa M (2014) Tissue- and stage-dependent dosage compensation on the neo-X chromosome in *Drosophila pseudoobscura*. *SMBE Satellite Meeting/NIG International*

Symposium: The Causes of Genome Evolution, Mishima, Japan (Poster)

野澤昌文 (2013) 種間比較から遺伝子量補償機構の進化を探る. 第42回東北大学インシリコメガバンクセミナー, 仙台 (招待講演)

野澤昌文 (2013) ショウジョウバエの種間比較から遺伝子量補償機構を明らかにする. 第15回日本進化学会, つくば (一般口演)

野澤昌文 (2013) ショウジョウバエにおける遺伝子量補償機構の進化. 遺伝研研究集会・新機能獲得の分子進化, 三島 (ワークショップ, 共同企画者)

Nozawa M (2013) Re-evaluation of dosage compensation in *Drosophila* species. *Symposium on "Where did junk go?" at the 2013 SMBE conference*, Chicago, USA (Symposium, invited).

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]
ホームページ等

<http://www.geocities.jp/nozabey/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野澤 昌文 (NOZAWA, Masafumi)
首都大学東京・理工学研究科・助教
研究者番号: 50623534

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし