

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月7日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07177

研究課題名(和文) 小型哺乳類の毛色関連遺伝子群の進化的動態把握と系統地理マーカーの開発

研究課題名(英文) Understanding the evolutionary dynamics of hair color related genes of small mammals and development of phylogeographical markers

研究代表者

鈴木 仁 (SUZUKI, Hitoshi)

北海道大学・地球環境科学研究所・教授

研究者番号：40179239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：日本産マウスにおいて毛色関連遺伝子Mc1rを含む1Mbおよび5Mbの2つの異なる染色体領域を標的とする核DNAハプロタイプ構造解析により、列島北部集団には、平均170kbの南アジア亜種系統Mus musculus castaneus由来断片が存在することが判明し、亜種間交雑後約800世代が経過していると算出された。西ヨーロッパの亜種Mus musculus domesticus由来の長い断片(2～5Mb)も観察され現代の人為的移入の可能性が示唆置換された。沖縄産クマネズミの全身黒色性はAsip遺伝子の1つの非同義置換にあり、ハプロタイプ構造解析により、沖縄島で派生した変異の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nuclear DNA haplotype structure analyses in the Japanese wild mice yielded a possible average fragment length of 170 kb of Mus musculus castaneus haplotypes in the M. m. musculus background genome in northern Japan, providing a rough estimate of its elapsed time of 800 generations under an assumption of continued backcrossing. Our analyses showed sporadic appearance of long fragments (2-5 Mb) from the west European subspecies Mus musculus domesticus, indicating contemporary stowaway introduction. In melanistic rats found on Okinawa, a predicted loss-of-function mutation caused by a cysteine to serine amino acid change at p.124C>S (c.370T>A) in the highly conserved functional domain of Asip was suggested to be responsible for the observed melanism. A haplotype structure analysis suggested the possibility of in-situ mutation of the Asip gene within the population on Okinawa.

研究分野：分子系統学

キーワード：毛色関連遺伝子 系統地理学 Mc1r Asip 多重遺伝子族 ハプロタイプ構造解析 メラニズム

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の毛色は性選択、環境適応、コミュニケーションにおいて意味を持ち、また分類においても表徴形質として用いられている場合が多い。したがって、毛色変異の進化的動態の把握は遺伝的多様性や自然史の理解において重要である。

毛色に関連する遺伝子は現在、400 以上はあるとされているが、多くの例を見る限り、自然下で進化的に貢献している遺伝子は *Mclr* (melanocortin 1 receptor gene) と *Asip* (agouti signaling protein gene) の 2 つの遺伝子である。この 2 つの遺伝子の産物は、色素生産細胞の受容体とリガンドであり、哺乳類が持つ 2 つの色素、ユーメラニン (黒色) とファオメラニン (黄色) のどちらを生産するかにおいて重要な役割を担っている。この 2 つの遺伝子は色素生産に特化した機能を持つため、進化という観点で自由度が高い。実際、*Mclr* 受容体や *Asip* タンパク質の完全な機能消失を導く変異は、妊性のある全身黄色クロテンや全身黒色性クマネズミにおいて観察されており、特に生命を維持する上での問題とはなっていないようである。

ある毛色変異が、自然選択上意味のある変異か否かについては常に議論の対象となっている。我々は、野生ハツカネズミの背部の暗化変異に関与する可能性が示唆された *Mclr* の変異について注目し、周辺の遺伝子領域の遺伝的多様性を調査し、自然選択の証拠とされる selective sweep が認められるか否かを検討した。その結果、selective sweep の傾向が認められ、注目した責任変異が特定の地域集団で自然選択により近年、急速に広がった可能性が示唆された。一般的に、野外で観察される多くの毛色変異において進化過程の詳細については論じられていないのが実情である。

一方、系統地理学的な観点で、種の集団

構造を把握することが重要である。一般的にはミトコンドリア DNA やマイクロサテライトが活用されているが、母系のみ情報把握に限られていたり、時間情報の把握の曖昧さが指摘されている。したがって、核遺伝子の変異に基づき、系統分化の時間的情報を与えてくれるマーカーが必要となる。我々はすでに染色体の一部領域に注目し、*Mclr* 周辺の 6~7 個の遺伝子座の解析に基づくハプロタイプ構造の位置づけが系統地理学上大変有効なマーカーになりうることを示してきた (Nunome et al. 2010; 桑山ら 2012)。核ゲノムの豊富な情報や、組換え現象を活用した、多面的役割を持つ新しい系統地理学的マーカーの確立が望まれている。

2. 研究の目的

哺乳類において毛色の進化の中核を担うのは *Mclr* および *Asip* である。本研究は、この 2 つの毛色関連遺伝子に注目し、その周辺領域の遺伝子の塩基配列情報を収集することにより、哺乳類の毛色変異に関する進化的動態を探るとともに、得られた塩基配列情報を系統地理学的解析に有効に利用し、さらに分類学的な観点からも有益な情報として活用していくための、便利で汎用性のある新規のアプローチ法を開拓することを目指す。具体的には、1) 毛色変異の遺伝的基盤の解明、2) 毛色変異に関する自然選択の検討、3) 遺伝的構造の推定、4) 浸透交雑現象の時空間把握、そして、5) 毛色を表徴形質とする種における分類学的判断材料の提供、の 5 つの事項に関する研究を 3 つの種群において行い、それぞれの種群で自然史や遺伝子の進化的動態を明らかにしていくとともに、上述のように、新規の系統地理学的解析手法の確立を行う。

3. 研究の方法

(1) 沖縄産クマネズミの全身黒色性の責任

変異探索のために、調査 2500 個体中で観察された 4 匹の黒色性個体において *Asip* の Exon 2, 3, 4 に含まれるタンパク質コード領域を含む遺伝子部位の塩基配列 (~ 1 kb) を解析した。

(2) 毛色変異の定量的把握に関しては、測色計 (CM700D, コニカミノルタ) を用いて明度および彩度を定量的に調査した。*Mc1r* および *Asip* タンパク質コード領域の非同義置換との関連性を調査した。

(3) 非同義置換の特性やアミノ酸置換速度 (dN/dS) の種間比較を通して、2 種の毛色関連遺伝子の進化的動態を把握する。

(4) マダガスカル産ハツカネズミを含め、*Mc1r* および *Asip* に隣接する遺伝子群の遺伝的多様性に関する調査を行った。各地域集団を代表する 10~20 個体を用意する。*Mc1r* においては、*Mc1r* を中心に両側の 3~4 個の遺伝子座に解析サイトを設け、400~600 bp のイントロン領域の塩基配列を決定した。*Asip* においても 50 kb ごとに 1 つ、計 9 個のマーカ―を設置し、約 200 kb 領域を解析した。7~9 個のマーカ―の塩基配列を連結し系統樹およびネットワークを作成した。これにより、進化的に独立な系統の存在を明らかにし、集団の遺伝的構造を把握する。ハプロタイプ構造の比較により、組換え体を探索し、二次的接触の有無を検討した。組換え体ハプロタイプの組換え点の頻度を検討し、浸透交雑が生じた時期を推定した。

4. 研究成果

(1) クマネズミ (*Rattus rattus* species complex) の全身黒色性の責任変異遺伝子および責任変異の探索 :

クマネズミは、通常アグーチパターンを示す沖縄集団において例外的に全身黒色性を示した 4 個体について、*Asip* 遺伝子のアミノ酸コード領域を解析したところ、Exon 4 上のコドン 124 番目のアミノ酸がシステイン

からセリンに変化する非同義置換が認められた。他の地域の個体を含め、3 つのアミノ酸コード領域をマーカ―としてハプロタイプの構造を解析した結果、黒色性を示す変異は外来性ではなく沖縄島で生じた変異である可能性が示唆された。この黒色責任変異は組換え体ハプロタイプ上にも存在したため、遠い過去に変異が生じたか、あるいは、組換えのホットスポットが当該領域間に存在する可能性が示唆された (Sasamori et al., 2017)。今後、*Asip* 遺伝子の組換えの特異性について精査していくことで自然選択に伴う多様性消失の回避機構解明に有益な情報が得られるものと期待された。

(2) マダガスカル産ハツカネズミ (*Mus musculus*) の野生集団を対象とし、毛色変異と 2 つの重要な毛色関連遺伝子との関連を調査した。毛色は分光測色計で測定し、クラスター解析でグループ分けをした。その結果、腹部毛色は “light gray” と “dark gray” の 2 つのグループに分けられた。*Mc1r* の全コード領域 (948 bp) の塩基配列の解析を行ったが多様性はなく、毛色の多型性との関連性はないことが示された。*Asip* の遺伝的変異の解析では、アミノ酸コード領域の上流域にある 2 つのプロモーター領域 exon 1A (317 bp) および exon 1B (499 bp) の塩基配列変異に着目した。その結果、*Asip* の exon 1A および exon 1B 領域は、集団内で連鎖が平衡状態にあり、前者が腹側毛色変異に関連することが示唆された (Sakuma et al., 2016)。

(3) ハツカネズミにおいて、*Asip* の exon 1A プロモーター領域は反復配列構造 (inverted repeat, IR) に組み込まれ、それを含む染色体断片の逆位が起こることで腹部毛色の表現型の変化に關与する可能性が示唆されている。今回、ハツカネズミを含む哺乳類 9 種 (ハツカネズミ、ダカデバネズミ、ヒトなど) を用いて *Asip* の非コード

領域 (約150 kb) の構造比較を行った。その結果、ハツカネズミのIR領域には5つのモチーフ(Conserved Noncoding Element、CNEと呼ぶ)が存在し5対のIRを形成する事が判明した。3つのモチーフについては、哺乳類の種間で塩基配列の高い相同性が維持されていた。5対のIR構造はラットとチャイニーズハムスターにおいても認められたが、他の種では一部のモチーフの配列保存性が失われ、結果、一部のIR構造が欠落する傾向を示した。同一ゲノム内での2つのモチーフ間の配列の相同性は高く、協調進化的動態の存在が示唆された (Sakuma et al., **投稿中**)。

(4) 日本産ハツカネズミの起源の解明：核の変異の解析において、200 kb, 1 Mb, 5 Mbの染色体領域にインターバルの異なるマーカーを設置し、ハプロタイプ構造解析を行った。北海道および東北産のゲノムの主体は北ユーラシア亜種系統(MUS)であり、平均170kbの南アジア亜種系統(CAS)の断片が挿入されていた。北日本においては数百世代前に交雑が始まったことが示唆された。これにより、約2000年前にMUSが九州に移入後、関東以南に定着後、北日本への展開は一定時間(1000年程度)を経て進出したことが示唆された (Kuwayama et al., 2017)。

(5) 黒目白毛個体の責任変異の解明：北海道で採取されたエゾヤチネズミの全身白化(黒目)個体において責任変異の探索を行ったところKit遺伝子の1塩基置換が原因である可能性が示唆された (Murakami et al., **投稿中**)。

(6) リボソームRNA遺伝子の進化的動態を調査し、系統地理学的マーカーとしての活用の可能性を検討した。ハツカネズミ5SrDNA遺伝子のコピー数、亜種系統ハプロタイプ間の組換え頻度を調査した結果、ゲノムあたり130-170コピーを持ち、クラスター間の組換えは抑制されていることが判明

した。5SrDNA遺伝子は同一クラスター内および同一交配集団内で均一化しており、系統地理学的マーカーとして活用できることが示唆された (Isobe et al., **in press**)。

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7件)

Isobe M, Nunome M, Katakura K, Suzuki H. Evolutionary dynamics of copy number and meiotic recombination in murine 5S rDNA: possible involvement of natural selection. *Journal of Molecular Evolution* 2018, **in press**. 【査読有】
<https://doi.org/10.1007/s00239-018-9848-6>

Matsunami M, Endo D, Saitou N, Suzuki H, Onuma M. Draft genome sequence of Japanese wood mouse, *Apodemus speciosus*. *Data in Brief* 2018;16:43-46. 【査読有】
[10.1016/j.dib.2017.10.063](https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.10.063)

Kuwayama T, Nunome M, Kinoshita G, Abe K, Suzuki H. Heterogeneous genetic make-up of Japanese house mice (*Mus musculus*) created by multiple independent introductions and spatio-temporally diverse hybridization processes. *Biological Journal of the Linnean Society* 2017; 122:661-674. 【査読有】
[10.1093/biolinnean/blx076](https://doi.org/10.1093/biolinnean/blx076)

Sasamori S, Wiewel AS, Thomson VA, Kobayashi M, Nakata K, Suzuki H. Potential causative mutation for melanism in rats identified in the Agouti signaling protein gene (*Asip*) of the *Rattus rattus* species complex on Okinawa Island, Japan. *Zoological Science* 2017; 34:513-522. 【査読有】
[10.2108/zs170027](https://doi.org/10.2108/zs170027)

Hanazaki K, Tomozawa M, Suzuki Y, Kinoshita G, Yamamoto M, Irino T, Suzuki H. Estimation of evolutionary rates of mitochondrial DNA in two Japanese wood mouse species based on calibrations with Quaternary environmental changes. *Zoological Science* 2017; 34:201-210. 【査読有】
[10.2108/zs160169](https://doi.org/10.2108/zs160169)

Sakuma Y, Ranoroso MC, Kinoshita G, Shimoji H, Tsuchiya K, Ohdachi DS, Arai A, Tanaka C, Ramino H, Suzuki H:

Variation of the coat color controlling genes *Mc1r* and *Asip* in the house mouse *Mus musculus* from Madagascar. *Mammal Study* 2016; 41:131-140. 【査読有】
10.3106/041.041.0303.

鈴木仁 日本産小型哺乳類の自然史学への誘い *哺乳類科学* 2016;56:259-271. 【査読無】
10.11238/mammalianscience.56.259

〔学会発表〕(計 17 件)

Yuta Inoue, Hitoshi Suzuki Possible factors affecting the time-dependent evolutionary rate of mitochondrial DNA JSPS Core-to-Core Program: 7th International Symposium on Asian Vertebrate Species Diversity (AVIS7) 2017年12月6-7日 Yangon University, Yangon (Myanmar)

井上結太・鈴木仁 ミトコンドリア DNAの進化速度が時間依存的に変化する要因 日本動物学会第88回富山大会 2017年9月21-23日 富山大学(富山県富山市)

鈴木仁 毛色関連遺伝子 *Mc1r* と *Asip* の進化に向けた進化のしくみ 日本遺伝学会第89回大会 2017年9月13-16日 岡山大学(岡山県岡山市)

須田杏子・木下豪太・福本真一郎・大西尚樹・山田文雄・鈴木仁 奄美大島産および徳之島産アマミノクロウサギ (*Pentalagus furnessi*) の系統地理学的解析 日本哺乳類学会 2017年度大会 2017年9月8-11日 富山大学(富山県富山市)

井上結太・花崎香織里・鈴木祐太郎・木下豪太・土屋公幸・鈴木仁 北海道産アカネズミ (*Apodemus speciosus*) のミトコンドリアDNAの遺伝的空間構造とその形成史 日本哺乳類学会 2017年度大会 2017年9月8-11日 富山大学(富山県富山市)

武石透輝・佐久間有希・土屋公幸・三田晃彦・城石俊彦・高田豊行・鈴木仁 ユーラシア産ハツカネズミの腹部毛色と毛色関連遺伝子 *Asip* の地理的変異 日本哺乳類学会 2017年度大会 2017年9月8-11日 富山大学(富山県富山市)

鈴木仁 哺乳類の毛色関連遺伝子の変異と進化するための進化 日本哺乳類学会 2017年度大会 2017年9月8-11日 富山大学(富山県富山市)

小林素子・San Maung Maung・Thida Lay Thwe・片倉賢・鈴木仁 ミャンマー産ナンヨウネズミにおける毛色多型と毛色関連遺

伝子 *Mc1r* と *Asip* の配列多様性の評価 2016年9月23-26日日本哺乳類学会 2016年度大会 筑波大学(茨城県つくば市)

佐久間有希・木下豪太・下地博之・鈴木仁・土屋公幸・田中ちひろ・Hajanirina Ramin・Marie C Ranoroosa ハツカネズミにおける毛色関連遺伝子 *Mc1r* および *Asip* 遺伝子変異の解析 2016年9月23-26日日本哺乳類学会 2016年度大会 筑波大学(茨城県つくば市)

本田明日香・村上翔大・中本あずさ・原田正史・土屋公幸・鈴木仁 ミトコンドリアDNAおよび核遺伝子に基づくコウベモグラの地域系統群の調査 2016年9月23-26日日本哺乳類学会 2016年度大会 筑波大学(茨城県つくば市)

鈴木仁 日本産小型哺乳類進化史学 日本哺乳類学会賞受賞講演 2016年9月23-26日日本哺乳類学会 2016年度大会 筑波大学(茨城県つくば市)

花崎香織里・中本あずさ・鈴木祐太郎・木下豪太・友澤森彦・土屋公幸・鈴木仁 第四紀の環境変動に伴う日本産アカネズミ属2種の集団動態およびミトコンドリアDNAの進化速度の推定 2015年9月19日 日本動物学会第86回大会 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

小林素子・San Maung Maung・Thida Lay Thwe・片倉賢・鈴木仁 ミャンマー産ナンヨウネズミ *Rattus exulans* の毛色多様性および毛色関連遺伝子 *Mc1r* と *Asip* 配列多型 日本動物学会 北海道支部 第61回大会 2016年8月27日(北海道旭川市)

Hitoshi Suzuki Colonization History of the House Mouse *Mus musculus* in East Asia. 2015年7月28日 Vth International Wildlife Management Congress (IWMC) 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

森智子・土屋公幸・Saw Bawm・新井智、Thida Lay Thwe、Myin Zu Min・片倉賢・安田俊平・鈴木仁 Characterization of coat color variation in Bandicoot rats species from Myanmar using *Mc1r* sequence and spectrophotometric data. 2015年7月28日 Vth International Wildlife Management Congress (IWMC) 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Gohta Kinoshita, Irina V. Kartavtseva, Naoki Ohnishi, Hirofumi Hirakawa, Hitoshi Suzuki Phylogenetic history of the northern pika (*Ochotona hyperborea*) inferred from mitochondrial

and nuclear genes. 2015年7月28日 Vth International Wildlife Management Congress (IWMC) 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Gohta Kinoshita, Mitsuo Nunome, Alexey Kryukov, Irina Kartavtseva, San-Hoon Han, Fumio Yamada, Hitoshi Suzuki Ancient introgression and phylogenetic relationships among eastern Asian hares. 2015年7月27日 Vth International Wildlife Management Congress (IWMC) 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

〔図書〕(計 1 件)

Suzuki H, Achimadi AS A comparative zoogeographic view on the animal biodiversity of Indonesia and Japan Tropical Peatland Ecosystems, Edited by Mitsuru Osaki, Nobuyuki Tsuji, 2016; pp. 213-226. Springer Tokyo.

10.1007/978-4-431-55681-7_13

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 仁 (SUZUKI, Hitoshi)

北海道大学・地球環境科学研究所・教授

研究者番号：40179239

(2) 研究分担者

該当者なし

研究者番号：

(3) 連携研究者
該当者なし

研究者番号：

(4) 研究協力者
該当者なし