

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22370081

研究課題名(和文)両生類と爬虫類に生じたゲノム・染色体再配列過程の分子細胞遺伝学的検証

研究課題名(英文)Molecular cytogenetic studies on the process of genomic and chromosomal reorganization in amphibians and reptiles

研究代表者

松田 洋一 (Matsuda, Yoichi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：70165835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：四肢動物のゲノムと核型の進化過程を調べるため、スッポン、シャムワニ、シマヘビ、バナナオオトカゲ、アフリカツメガエル、ネッタイツメガエルの比較染色体地図を作製した。その結果、四肢動物の祖先核型は、ニワトリのマクロ染色体と相同な10の遺伝連鎖群と多数のマクロ染色体を保有していたことが推察された。アフリカツメガエルの9組すべての同祖染色体を同定し、2種のツメガエルは、一つの染色体融合と一つの逆位を除いて非常に高い染色体相同性を持つことを明らかにした。また、シマヘビでは、マイクロ染色体の遺伝子のGC含量が高く、染色体サイズ依存的なゲノム構造の区画化は鳥類だけでなく爬虫類にも存在することが判明した。

研究成果の概要(英文)：To delineate the process of genomic and karyotypic evolution of tetrapods, we constructed comparative cytogenetic maps of *Pelodiscus sinensis*, *Crocodylus siamensis*, *Elaphe quadrivirgata*, *Varanus salvator*, *Xenopus tropicalis*, and *Xenopus laevis*. Our results provide the possibility that the ancestral karyotype of tetrapods had at least 10 large linkage groups of macrochromosomes and many microchromosomal pairs, which have been conserved in the chicken. We identified all nine homoeologous chromosome groups of *X. laevis*, which were homologous within the same groups except for two inversions, and the genetic linkages were highly conserved between *X. tropicalis* and *X. laevis* except for one fusion and one inversion. In *E. quadrivirgata*, microchromosomal genes showed significantly higher GC content than macrochromosomal genes as in the chicken, suggesting that the chromosome size-dependent GC heterogeneity had already occurred before the lepidosaur-archosaur split, 275 million years ago.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：両生類 爬虫類 FISH ゲノム重複 核型進化 染色体地図 マイクロ染色体 ゲノムの区画化

1. 研究開始当初の背景

両生類は約3億6000万年前のデボン期末期に出現し、約3億1000万年前の石炭紀後期に出現した羊膜類は、哺乳類を生み出した単弓類と、鳥類と爬虫類を生み出した双弓類の二つの大きな系統に分岐した。ニワトリは哺乳類と他の脊椎動物間の進化的なギャップを埋める重要なモデル生物であり、鳥類は三畳紀の終わりからジュラ紀にかけて出現した恐竜と共通の祖先に由来することから、ニワトリ(*Gallus gallus*)のゲノム情報が脊椎動物のゲノム進化研究に新たな展望をもたらすことが期待されている。

鳥類と爬虫類は、哺乳類とは異なるゲノム構造の特徴を持つ。ニワトリ($2n=78$)のゲノムは哺乳類の約40%と小さく、9対のマクロ染色体と数多くの微小なマイクロ染色体から構成され、性染色体は雌ヘテロ(ZZ/ZW)型である。そして、ヒトを含む哺乳類では個々の染色体内でGC含量のモザイク構造が存在するのに対し、鳥類では染色体サイズに依存したGC含量の区画化が存在し、GC-richなフラクションはマイクロ染色体に集約される。そして、この特徴は爬虫類でも保存されている可能性が高い。爬虫類と鳥類が持つこのような特殊な核型とゲノム構造が、いつ、どのようにして獲得され、そして、どのような理由で長い進化時間を経ても高度に保存されてきたかについては、今も進化上の大きな謎とされている。

両生類の有尾目と無尾目の間にも染色体構造の違いが見られる。有尾目の染色体数は22-78本と変化に富み、染色体数の多い核型はマイクロ染色体を持ち、染色体数の少ない核型ではマイクロ染色体は存在しない。一方、ほとんどの無尾目の核型は20-26本の染色体で構成され、マイクロ染色体は見られない。このように両生類は、爬虫類・鳥類を含む双弓類と哺乳類を含む単弓類の両方の核型の特徴を有している。そのため、マイクロ染色体は、羊膜類が分岐した後に双弓類で独自に生じたのか、あるいは羊膜類の共通祖先ですでに存在していたのか、また、さらに遡って両生類が出現する前の四肢動物の祖先においてもマイクロ染色体が存在したのか否かについては、いまだ不明である。

脊椎動物では、その進化過程において2回のゲノム重複が生じたと考えられている。しかし、ゲノム倍数化後のゲノム・染色体再編成の過程はほとんどわかっていない。約4000万年前にゲノム倍数化が生じた異質四倍体種であるアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)($2n=36$)は、発生学を中心に広く研究に使用されているが、四倍体であることが障害となり、そのゲノム・染色体構造に関する研究はほとんどなされてい

ない。したがって異質四倍体化の過程に生じたゲノム・染色体構造の再編成の過程についてはよくわかっていない。

両生類のゲノム・染色体にはGC含量のモザイク構造は存在せず、ゲノム構造の区画化は無羊膜類から羊膜類への進化過程で生じたと考えられている。爬虫類も同様の核型を持つが、ゲノム構造の区画化の有無についてはよくわかっていない。そのため、このゲノム構造の区画化が、マイクロ染色体を持つ種に普遍的に存在するのか、あるいは鳥類特有に見られる現象なのかは不明である。

2. 研究の目的

本研究は、両生類と爬虫類のゲノム・染色体構造の特徴を明らかにし、比較ゲノム学の視点から両生類と羊膜類の進化過程を検証することを目的に、以下の課題に焦点を当て研究を進めた。

1) 爬虫類の祖先核型とそのゲノム構造の推定

スッポン(*Pelodiscus sinensis*)($2n=66$)とシマヘビ(*Elaphe quadrivirgata*)($2n=36$)において高精度の機能遺伝子染色体地図を作製し、ニワトリ染色体との相同性を明らかにする。次に、マイクロ染色体を消失した特殊な核型を持つシャムワニ(*Crocodylus siamensis*)($2n=30$)の機能遺伝子染色体地図を作製し、ワニ類の染色体構造の特徴とマイクロ染色体の消失過程を明らかにする。さらに、トカゲ亜目のバラナスオオトカゲ(*Varanus salvator*)($2n=40$)でも染色体地図を作製してヘビ亜目・トカゲ亜目間の染色体相同性を調べる。

2) 両生類から羊膜類に至る進化過程に生じた染色体再配列の検証

ネットイツメガエル(*X. tropicalis*)($2n=20$)の機能遺伝子染色体地図を作製する。次に、ニワトリの染色体地図、ならびに本研究で作製した爬虫類4種の染色体地図と*X. tropicalis*の染色体地図を比較することによって、両生類と羊膜類の間に存在する染色体相同領域を調べる。そして、羊膜類ならびに四肢動物の祖先核型を推定するとともに、両生類から羊膜類に至る進化過程に生じた染色体再配列を、遺伝連鎖群の保存性から明らかにする。

次に、*X. tropicalis*にマッピングした遺伝子と同じ遺伝子を*X. laevis*の染色体にもマッピングし、*X. laevis*の比較染色体地図を作製する。異質四倍体の*X. laevis*では同一遺伝子が4コピー存在することが想定されるため、起源を同じくする2対の同祖染色体を同定し、四倍体化の過程で生じた染色体再配列の実態を*X. tropicalis*の染色体地図との比較から明らかにする。

3) 両生類から羊膜類に至るゲノムのモザイク構造の変遷過程の検証

マクロ染色体とマイクロ染色体の区別が明確なシマヘビを用いて、マクロ染色体とマイクロ染色体にマップされた遺伝子の第3コドンのGC含量(GC3%)を比較する。そして、GC含量の違いにもとづいて、マクロ-マイクロ染色体間で染色体サイズ依存的なゲノムの区画化が存在するか否かを調べる。さらに、両生類から羊膜類への進化過程に生じたと考えられるゲノム構造の区画化の起源とその変遷過程を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 爬虫類の祖先核型とそのゲノム構造の推定

京都大学の阿形清和教授から提供いただいたスッポン、シマヘビ、シャムワニのESTクローンを、FISH法を用いてそれぞれの種の染色体にマッピングし、機能遺伝子の染色体地図を作製する。また、シマヘビの染色体上にマップされた遺伝子のホモログのcDNAクローンを、RT-PCR法を用いてパラナスオオトカゲから単離し、染色体マッピングを行う。

2) 両生類から羊膜類に至る進化過程に生じた染色体再配列の検証

岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所の上野直人教授の協力により、基礎生物学研究所が保有する *X. laevis* の大量のcDNAクローンの中から180個の機能遺伝子cDNAクローンを選抜し、染色体マッピングに用いる。これらのcDNAクローンの選抜に当たっては、ニワトリのゲノムデータベースを用いて遺伝子の染色体上の位置を調べ、ニワトリのゲノム全体をカバーできるように、用いる遺伝子クローンを選抜する。これらのcDNAクローンを *X. tropicalis* の染色体にマッピングし、機能遺伝子の染色体地図を作製する。

次に、*X. tropicalis* の染色体上の位置が決定された60遺伝子のcDNAクローンを *X. laevis* の染色体にマッピングする。

3) 両生類から羊膜類に至るゲノムのモザイク構造の変遷過程の検証

本研究で作製されたシマヘビの高精度染色体地図の情報にもとづき、マクロ染色体とマイクロ染色体にマップされた遺伝子間でGC3%を比較し、シマヘビにおける染色体サイズ依存的なゲノム構造の区画化の有無を調べる。

4. 研究成果

1) 爬虫類の祖先核型とそのゲノム構造の

推定

FISH法を用いて機能遺伝子cDNAクローンを染色体上にマッピングし、スッポンで162、シャムワニで131、シマヘビで183、パラナスオオトカゲで86の機能遺伝子からなる染色体地図を作製した。そして、これら4種の染色体地図とニワトリのゲノム地図を比較し、ニワトリとの間に存在する染色体相同性を調べた。

スッポンでは、162遺伝子中のうち、116遺伝子が8つのマクロ染色体にマップされた。スッポンの1、2、3、4、5、6、7、8番染色体は、それぞれニワトリの1、2、3、4、5、Z、7、6番染色体と一致し、ニワトリ-スッポン間でマクロ染色体の構造変化はほとんど起こっていなかった(図1)。ま

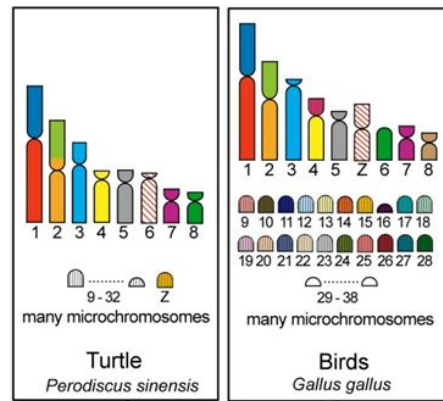


図1. ニワトリとのスッポンの染色体相同性

た、スッポンのマイクロ染色体にマップされた遺伝子は、すべてニワトリのマイクロ染色体、もしくは4番染色体の短腕(Chr 4p)に位置する遺伝子であった。ニワトリ4番染色体の短腕は、鳥類の祖先核型のマイクロ染色体がマクロ染色体に融合して生じたことが判明しているため、マイクロ染色体においても、ニワトリ-スッポン間で高い相同性があることが判明した。

シャムワニでは、Chr 1p、1q、2p、2q、3p、3q、4p、4q、5p、5qが、ニワトリのChr 1q、3、4q、5、Z、2q、7、1p、8q、2pとそれぞれ対応し、シャムワニの大型染色体においては、ニワトリのマクロ染色体との相同性が染色体腕単位で保存されていることが明らかになった。また、ニワトリのマイクロ染色体(Chr 11-15、17-21、23、26、28)に位置する遺伝子はすべて、シャムワニの小型染色体(Chr 8-14)にマップされた(図2)。これらの結果は、主竜形類の祖先核型は、ニワトリ、スッポンの核型と類似した核型を持ち、シャムワニではマイクロ染色体の融合によってマイクロ染色体が消失した可能性を示唆している。

シマヘビでは、183遺伝子のうち、144

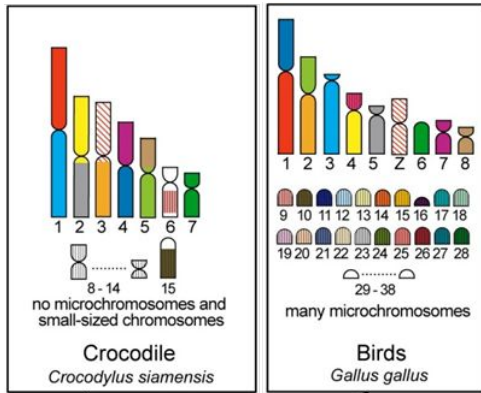


図2. ニワトリとシャムワニの染色体相同性

遺伝子がマクロ染色体（1-7番染色体、Z、W染色体）にマップされ、これらの遺伝子がマップされた染色体領域は、ニワトリの29の染色体領域に対応した。ニワトリのマクロ染色体は、シマヘビの染色体でも高い相同性が見られたが、ニワトリ1、2、4、6、7番染色体の連鎖群は、シマヘビの染色体上で2つ以上の相同領域に分断されていた（図3）。36遺伝子がマップされたシマヘビのマイクロ染色体は、ニワトリの10、11、

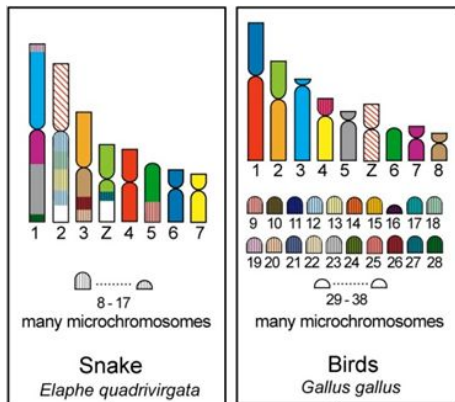


図3. ニワトリとのシマヘビの染色体相同性

14、15、17、21、22、24、25番染色体に対応し、これらのニワトリマイクロ染色体は、シマヘビでもマイクロ染色体として保存されていた。一方、ニワトリの10対のマイクロ染色体（Chr 9、10、12、13、18-20、26-28）に相同な領域は、シマヘビのマクロ染色体にマッピングされた。

シマヘビとバラナスオオトカゲでは高い染色体の保存性が見られ、バラナスオオトカゲの2対のマイクロ染色体がシマヘビのマクロ染色体に融合しているのを除き、2種間での染色体の構造変化は見られなかった。これらの結果は、鱗竜類2種（シマヘビ、バラナスオオトカゲ）のマイクロ染色体は、マクロ染色体との融合によって減少した可能性を示唆している。

2) 両生類から羊膜類に至る進化過程に生じた染色体再配列の検証

FISH法を用いて、*X. laevis*の機能遺伝子cDNAクローンを*X. tropicalis*の染色体にマ

ッピングし、140の遺伝子からなる染色体地図を作製した。その結果、77遺伝子がマップされた、ニワトリのマクロ染色体と対

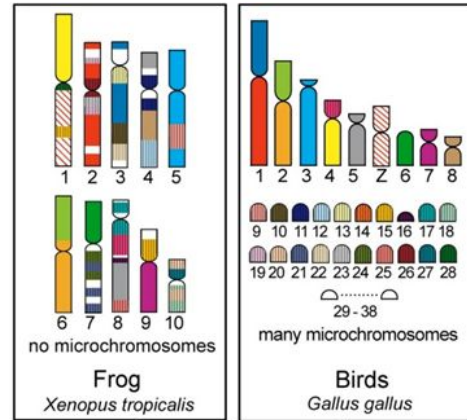


図4. ニワトリとネッタイツメガエルの染色体相同性

応する10の大きな遺伝連鎖群（ニワトリChr 1p、1q、2p、2q、3、4q、6-8、Z）は、*X. tropicalis*染色体でも保存されていた（図4）。また、61遺伝子がマップされた19対のニワトリマイクロ染色体と4番染色体短腕の連鎖群も、すべて*X. tropicalis*において保存されていた。これらの結果から、*X. tropicalis*の核型は染色体数が少なくマイクロ染色体も存在しないにもかかわらず、ニワトリが持つマクロ染色体とマイクロ染色体の連鎖群は、*X. tropicalis*の染色体においても高度に保存されていることが明らかとなった。

これらの結果を、本研究で作製した4種の爬虫類（スッポン、シャムワニ、シマヘビ、バラナスオオトカゲ）の染色体地図と比較した結果、羊膜類の祖先核型は、ニワトリのマクロ染色体を構築する10の大きな遺伝連鎖群と、ニワトリのマイクロ染色体に対応する少なくとも14対以上のマイクロ染色体で構成されていたことが推定された（図5-1）。また、四肢動物の祖先も同様に、ニワトリ染色体の10の大きな遺伝連鎖群を持ち、ニワトリマイクロ染色体と相同なマイクロ染色体を8対以上保有していた可能性が示唆された（図5-2）。そして、*X. tropicalis*では、マイクロ染色体がマクロ染色体と融合することによって、マイクロ染色体が消失したと考えられる。

*X. tropicalis*の染色体にマッピングされた140の遺伝子のうち、*X. tropicalis*の10の遺伝連鎖群全体をカバーする60の遺伝子を*X. laevis*の染色体上にマッピングし、世界初の*X. laevis*の機能遺伝子染色体地図を作製した。その結果、*X. laevis*が持つ9組の同祖染色体を同定し、60遺伝子中50遺伝子(83%)において四倍性が保存されていることを明らかにした。また、同祖染色体間の相同性は極めて高く、異なる同祖染

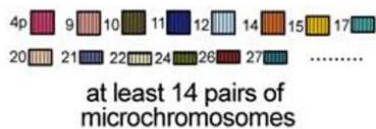


図5-1. 羊膜類の祖先核型

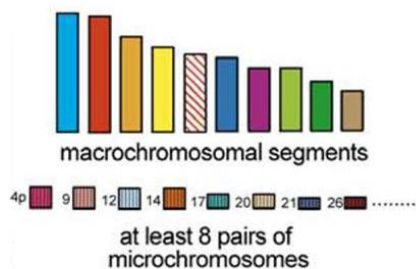


図5-2. 四肢動物の祖先核型

色体間での相互転座は検出されず、染色体の構造変化は2組の同祖染色体間に生じた逆位だけであった。さらに、*X. tropicalis* の1-8番染色体は、*X. laevis* の1-8番染色体と完全に対応し、*X. laevis* の9番染色体は*X. tropicalis* の9、10番染色体と対応した。この結果は、*X. tropicalis* の近縁種であったと考えられる祖先種と*X. laevis* の間で、4000万年以上の時間を経過しても、染色体の構造変化がほとんど起こっていないことを示唆している。そして、*X. laevis* の9番染色体は、*X. tropicalis* の9番染色体と10番染色体の融合によって生じた可能性を示している。

3) 両生類から羊膜類に至るゲノムのモザイク構造の変遷過程の検証

本研究で作製した186個の機能遺伝子からなるシマヘビの染色体地図にもとづいて、解析する遺伝子を、1)シマヘビとニワトリでともにマクロ染色体に存在する遺伝子、2)シマヘビとニワトリでともにマイクロ染色体に存在する遺伝子、3)ニワトリではマイクロ染色体に、シマヘビではマクロ染色体に存在する遺伝子、の3群に分類し、遺伝子の各コドンのGC3%を比較した。その結果、シマヘビのマイクロ染色体上の遺伝子のGC3は50%を超え、一方、マクロ染色体上の遺伝子では50%以下となり、マイクロ染色体上の遺伝子は有意にGC含量が高かった(図6)。一方、マイクロ染色体に由来し、核型進化の過程で染色体融合によってマクロ染色体に挿入されたと考えられるシマヘビの遺伝子群では、GC3が50%以下であるのに対し、ニワトリではマイクロ染色体に存在するそれらの遺伝子ホモログは50%を超える高いGC含量を示した。

これら結果は、爬虫類と鳥類の共通祖先である竜弓類において、すでに染色体サイズ依存的なゲノム構造の区画化が存在していたことを示している。そして、祖先核型が

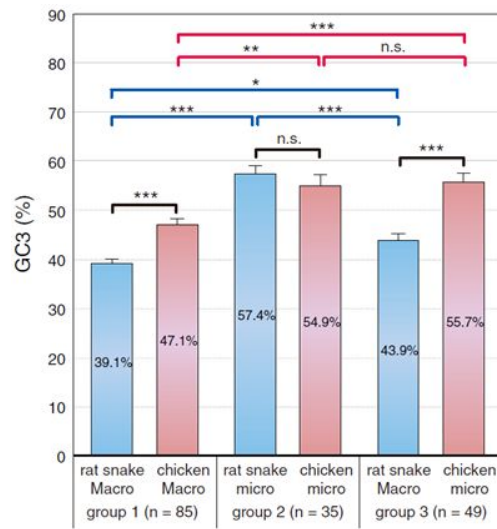


図6. ニワトリとシマヘビにおけるマクロ染色体とマイクロ染色体に連鎖する遺伝子のGC3含量。

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

n.s. 有意差なし

持つマイクロ染色体がマクロ染色体に融合した場合、減数分裂時の遺伝的組換え頻度の減少によって遺伝子のGC含量が低下し、マイクロ染色体特異的なゲノム構造の特徴が消失した可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計19件)

1. Matsubara K, Sarre SD, Georges A, Matsuda Y, Graves JAM, Ezaz T: Highly differentiated ZW sex microchromosomes in the Australian *Varanus* species evolved through rapid amplification of repetitive sequences. *PLoS One* 9: e95226, 2014. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0095226
2. Srikulnath K, Uno Y, Nishida C, Matsuda Y: Karyotype evolution in monitor lizards: cross-species chromosome mapping of cDNA reveals highly conserved synteny and gene order in the Toxicofera clade. *Chromosome Res.* 21: 805-819, 2013. 査読有
DOI: 10.1007/s10577-013-9398-0
3. Chaiprasertsri N, Uno Y, Peyachoknagul S, Prakhongcheep O, Baicharoen S, Charernsuk S, Nishida C, Matsuda Y, Koga A, Srikulnath K: Highly species-specific centromeric repetitive DNA sequences in lizards: molecular cytogenetic characterization of a novel family of satellite DNA sequences isolated from the water monitor lizard (*Varanus salvator macromaculatus*,

- Platynota). *J. Hered.* 104: 798-806, 2013. 査読有
DOI: 10.1093/jhered/est061
4. Uno Y, Nishida C, Takagi C, Ueno N, Matsuda Y: Homoeologous chromosomes of *Xenopus laevis* are highly conserved after whole genome duplication. *Heredity* 111: 430-436, 2013. 査読有
DOI: 10.1038/hdy.2013.65
5. Uno Y, Nishida C, Tarui H, Ishishita S, Takagi C, Nishimura O, Ishijima J, Ota H, Kosaka A, Matsubara K, Murakami Y, Kuratani S, Ueno N, Agata K, Matsuda Y: Inference of the protokaryotypes of amniotes and tetrapods and the evolutionary processes of microchromosomes from comparative gene mapping. *PLoS One* 7: e53027, 2012. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0053027
6. Matsubara K, Kuraku S, Tarui H, Nishimura O, Nishida C, Agata K, Kumazawa Y, Matsuda Y: Intra-genomic GC heterogeneity in sauropsids: evolutionary insights from cDNA mapping and GC₃ profiling in snake. *BMC Genomics* 13: 604, 2012. 査読有
DOI: 10.1186/1471-2164-13-604
7. Kawagoshi T, Nishida C, Matsuda Y: The origin and differentiation process of X and Y chromosomes of the black marsh turtle (*Siebenrockiella crassicollis*, Geomydidae, Testudines). *Chromosome Res.* 20: 95-110, 2012. 査読有
DOI: 10.1007/s10577-011-9267-7
8. Srikanth K, Uno Y, Matsubara K, Thongpan A, Suputtitada S, Apisitwanich S, Nishida C, Matsuda Y: Chromosomal localization of 18S-28S and 5S rRNA genes and (TTAGGG)*n* sequences of butterfly lizards (*Leiolepis belliana belliana* and *Leiolepis boehmei*, Agamidae, Squamata). *Genet. Mol. Biol.* 34: 582-586, 2011. 査読有
DOI: 10.1590/S1415-47572011005000042
9. Katsu Y, Matsubara K, Kohno S, Matsuda Y, Toriba M, Oka K, Guillet Jr. LJ, Ohta Y, Iguchi T: Molecular cloning, characterization and chromosome mapping of reptilian estrogen receptors. *Endocrinology* 151: 5710-5720, 2010. 査読有
DOI: 10.1210/en.2010-0356
10. Ikeda N, Chijiwa T, Matsubara K, Oda-Ueda N, Hattori S, Matsuda Y, Ohno M: Unique structural characteristics and evolution of a cluster of venom phospholipase A(2) isozyme genes of *Protobothrops flavoviridis* snake. *Gene* 461: 15-25, 2010. 査読有
DOI: 10.1016/j.gene.2010.04.001

〔学会発表〕(計 6 件)(招待講演のみ)

Matsuda Y: The origin and evolutionary process of microchromosomes and

chromosome size-dependent genomic compartmentalization in vertebrates. *7th International Chick Meeting*, Nagoya, Japan, November 14-18, 2012.

松田洋一: 核型進化が語るもの - マイクロ染色体とゲノム構造の区画化 - 染色体学会第 62 回年会シンポジウム「染色体構造 - 形態と分子の対話 - 」, 平塚, 2011 年 11 月 11 日 - 13 日 .

松田洋一: ヘビ類のゲノム・染色体構造とその進化 - 四肢動物の比較ゲノム学の視点から - . 第 84 回日本生化学会大会シンポジウム「生物毒素はどうして生まれたか - 二面的多様性とベノミクス - 」, 京都, 2011 年 9 月 21 日 - 24 日 .

Matsuda Y: Comparative genomics: tracking chromosomal evolution in vertebrates. 2011 Biomodulation Symposium: Biotechnology for Future Era, Seoul National University, Seoul, May 26-27, 2011.

Matsuda Y: Origin and evolution of vertebrate sex determination -From a viewpoint of sex chromosomal evolution-. International Workshop 'Evolution of Sex Chromosomes and Sex Determination in Vertebrates', University of Canberra, Canberra, April 20-21, 2011.

Matsuda Y, Uno Y, Nishida C, Matsubara K, Ueno N, Agata K: The protokaryotype of tetrapods and the process of karyotypic evolution in sauropsids and from amphibians to amniotes. International Symposium on Biodiversity Sciences "Genome, Evolution and Environment". Nagoya, August 1, 2010.

〔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

<https://sites.google.com/site/1924537/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松田 洋一 (MATSUDA Yoichi)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号 : 70165835

(2)研究分担者

西田 千鶴子 (NISHIDA Chizuko)
北海道大学・大学院理学研究院・助手
研究者番号 : 50106580

(3)連携研究者

なし