

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：82657

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770097

研究課題名（和文）亜種間コンソミック系統をモデルとした生殖隔離の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of genetic mechanism of the reproductive isolation between mouse subspecies by using consomic strains.

研究代表者

木曾 彩子 (AYAKO KISO) (岡彩子・AYAKO OKA)

大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構 新領域融合研究センター・融合プロジェクト特任研究員

研究者番号：80425834

研究成果の概要（和文）：

生殖隔離は、動植物において広く観察される現象であるが、様々な遺伝的機構が明らかにされつつある植物に対して、動物では未だその全容は未知である。本研究では、マウスの亜種間に成立した生殖隔離を対象に、その遺伝的機構を明らかにすることを目的とした。解析の結果、生殖隔離は従来想定されてきたような単一、もしくは少数の「種分化遺伝子」によって引き起こされるのではなく、異なる亜種由来のゲノムが同時に存在することにより生じるゲノム全体の転写調節機構における不調和が原因である可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

The reproductive isolation is a phenomena generally observed in organisms including plants and animals. Though some genetic mechanisms have been elucidated in plants, genetic mechanisms in animals are still obscure. Here we showed that the reproductive isolation between mouse subspecies is not likely caused by one or few “speciation genes” but by the extensive misexpression of genes due to the genetic incompatibility in transcriptional regulatory networks.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、生物多様性・分類

キーワード：種分化

1. 研究開始当初の背景

種は、互いに生殖を行うことのできない異なる生物集団として定義される。祖先種から新たな種が形成される過程で、分岐した集団の間には様々な程度の繁殖障害が起こり、これを生殖隔離(reproductive isolation)と呼ぶ。生殖隔離の中でも、雑種個体の繁殖力や生存力が低下する交配後隔離は、複数の遺伝子からなる遺伝子ネットワークにおいて、分岐した両方の集団由来の多型アリルが雑種個体内に同時に存在するために、遺伝子間の相互

作用が適切に起こらない「遺伝子間不和合(genetic incompatibility)」が原因と考えられている。生殖隔離は、動植物に広く見られる普遍的現象であり、動物ではマウスとショウジョウバエで最もよく研究されている。近年、マウス亜種間の F1 雑種の生殖能力欠失(hybrid sterility)の原因遺伝子の一つとして、精子形成期に発現するメチル基転移酵素 *Prdm9* が同定されたが(Mihola *et al.*, Science, 2009)、*Prdm9* 遺伝子の機能を含め、その分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。

生殖隔離の研究では、研究対象とする進化的分化を遂げた集団の選択が最も重要である。なぜなら時間経過とともに、分岐したそれぞれの集団に突然変異が集積し、多数の遺伝子間不和合が蓄積するために遺伝学的解析が困難になるからである。本研究で対象としているマウス亜種は、約 50 万年前に分岐した *Mus musculus domesticus* と *M. m. molossinus* である。これらの亜種に由来する近交系同士では、自然交配による繁殖が可能であるが、兄妹交配 4-5 世代でオスの生殖能力が顕著に低下する。本研究では、実験用近交系 C57BL/6J (*M. m. domesticus* 由来) の遺伝的背景に日本野生マウス (*M. m. molossinus*) 由来の近交系 MSM の染色体を一組ずつ導入したコンソミック系統を用いて解析を行っている。多くの場合、種 (亜種) 間には複数の遺伝子間不和合が蓄積しているが、コンソミック系統を用いることで、置換した染色体に限局した遺伝子間不和合の解析が可能となるため、種分化を研究する上で有用である。

本研究では、雄特異的に生殖関連の顕著な表現型を示す X 染色体のコンソミック系統 B6-ChrX^{MSM} 系統と B6-ChrXT^{MSM} 系統を用いて研究を行ってきた (Oka *et al.*, GENETICS 2004, 2007)。B6-ChrX^{MSM} 系統は、X 染色体の全長が MSM 系統のものに置き換えられており、生殖能力が完全に欠失する。一方、B6-ChrXT^{MSM} 系統は、X 染色体の遠位側 86Mb 以降の領域が MSM 系統に置き換わったもので、生殖能力の低下を示す。これまでの研究から、これらの系統で減数分裂期の精母細胞の数が顕著に減少していることが示され、減数分裂開始時に異常が起きていることが示された (Oka *et al.*, GENETICS 2010)。減数分裂へ移行する生殖細胞の顕著な減少は、精子産生量の減少を引き起こし、最終的に精子重量にも影響を与える。これまでの遺伝学的解析から、精巣重量低下を引き起こす原因遺伝子は、X 染色体の末端付近の約 5Mb の領域に存在することが示されている (Oka *et al.*, GENETICS 2004)。興味深いことに、B6-ChrXT^{MSM} 系統の表現型は、B6-ChrXT^{MSM} 系統の雌と第 1 番染色体のコンソミック系統である B6-Chr1^{MSM} 系統の雄を交配して得られた F1 個体で有意に回復する。

本研究では、これらの X 染色体コンソミック系統や表現型回復個体などを用いて、生殖隔離の遺伝的メカニズムの解明と、その分子基盤を明らかにすることを旨とする。

2. 研究の目的

本研究では、B6-ChrX^{MSM} 系統や B6-ChrXT^{MSM} 系統において、精子形成の最

も早いステージに現れる表現型である精母細胞の減少に注目し、その発生のメカニズムを明らかにすることを目的とする。具体的には、遺伝学的アプローチにより、第 1 染色体に連鎖している原因遺伝子の存在領域を絞り込み、さらに X 染色体と遺伝的不和合を起こしているその他の常染色体を、QTL マッピング法などを用いて決定する。また、マイクロアレイや RT-PCR 法を用いた発現解析から、減数分裂へ移行する以前のステージの細胞で、核内の転写活動に何が起きているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 1 番染色体上の原因遺伝子の探索

B6-ChrXT^{MSM} 系統と B6-Chr1^{MSM} 系統を組み合わせた下記の交配 A により、第 1 番染色体に組換えを持った雄個体を 300 匹程度作製し、1 番染色体上の原因遺伝子の QTL マッピングを行う。QTL 解析の形質 (trait) として、体重に対する精巣重量の比率 (RTW) を用いる。

交配 A : B6-ChrXT^{MSM} x (B6-Chr1^{MSM} x B6)F₁

(2) X と相互作用するその他の染色体の探索

B6-ChrX^{MSM} 系統と B6-Chr1^{MSM} 系統を組み合わせた下記の交配 B により、X 染色体と第 1 番染色体以外のゲノム領域に組換えを持った雄個体を 300 匹程度作製し、原因遺伝子の存在領域のゲノムワイド QTL マッピングを行う。

交配 B : {(B6-ChrX^{MSM} x MSM)F₁ x B6-Chr1^{MSM}}F₁

(3) 減数分裂開始前後の生殖細胞の詳細な解析

マウスにおいて、減数分裂の開始にはレチノイン酸による刺激と、それに反応して *Stras8* 遺伝子 (*stimulated by retinoic acid gene 8*) の発現が上昇することが、その後の関連遺伝子の転写開始に重要であることが知られている。そこで、B6-ChrX^{MSM} 系統や B6-ChrXT^{MSM} 系統で、減数分裂前後の精巣細胞を用いて、これらの関連遺伝子の発現解析を行う。さらに減数分裂関連遺伝子の転写量に変化が起これ始めるステージを目安に、全精巣組織の total RNA を用いたマイクロアレイ実験を実施し、正常個体と発現プロファイルを比較する。

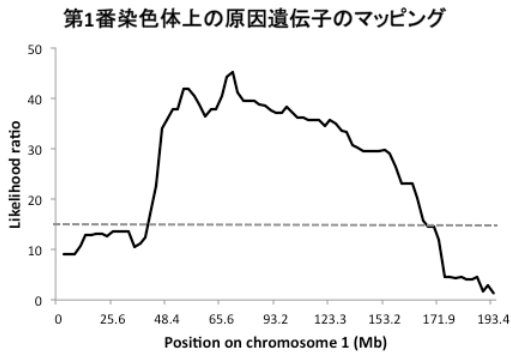
4. 研究成果

(1) 第 1 番染色体上の原因遺伝子の探索

交配 A : B6-ChrXT^{MSM} x (B6-Chr1^{MSM} x B6)F₁ により、312 匹の雄個体を作製した。精巣重量の体重に対する割合 (RTW) を trait として、QTL 解析ソフトウェア Cartographer (<http://statgen.ncsu.edu/qlcart/WQTLCart.htm>) を

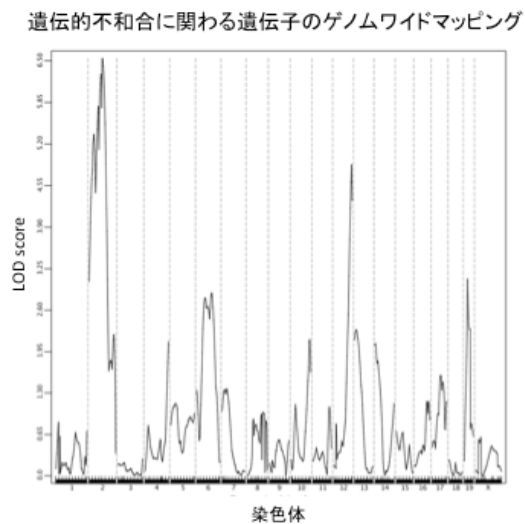
用いて、single marker analysis を行った。図 1 に示すように、第 1 番染色体の中央付近で特に高い信頼値が示されたものの、染色体の殆どの領域が significant なレベルを超えており、第 1 番染色体上に複数の原因遺伝子が存在する可能性が示唆された。

図 1



(2) X と相互作用するその他の染色体の探索交配 B: {(B6-ChrX^{MSM} x MSM)F1 x B6-Chr1^{MSM}}F1 により、331 匹の雄個体を作製した。(1)と同様に RTW を trait として single marker analysis による QTL マッピングを行った。その結果、特に第 2 番染色体と第 12 番染色体に、関連遺伝子が存在している可能性が示された (図 2)。

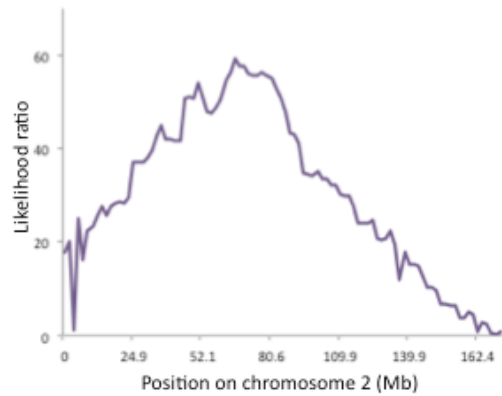
図 2



さらに第 2 番染色体について、遺伝的マーカーの数を増やして、詳細な QTL マッピングを行ったところ、27~106Mb の領域に最も高い可能性が示された (図 3)。

図 3

第2番染色体上の原因遺伝子のマッピング



(3)減数分裂開始前後の生殖細胞の詳細な解析
減数分裂開始に重要な *Stra8* 遺伝子の mRNA 発現量を比較するため、精母細胞がまだ出現していない 7 日齢から、出現する 12 日齢までのいくつかのステージで、精巣を用いて RT-PCR による解析を行った (図 4)。その結果、7 日齢において、B6-ChrX^{MSM} 系統ですでに *Stra8* 遺伝子の発現量が有意に低下していることが示された。そこで、何らかの発現異常が始まっていると考えられる 7 日齢とさらに遡って 5 日齢の精巣を用い、マイクロアレイによる網羅的発現解析を行った。

興味深いことに、B6-ChrX^{MSM} 系統と B6-ChrX^{MSM} 系統では、B6 系統と比較して発現が変化している遺伝子の多くが MSM 系統に置換された X 染色体上の染色体領域に集中していることが示された。また、5 日齢と比較して、7 日齢では、ゲノム全体に発現異常が広がっている様子が認められた (図 5、図には B6-ChrX^{MSM} 系統の結果のみを示したが、B6-ChrX^{MSM} 系統の結果についても同様である)。

図 4

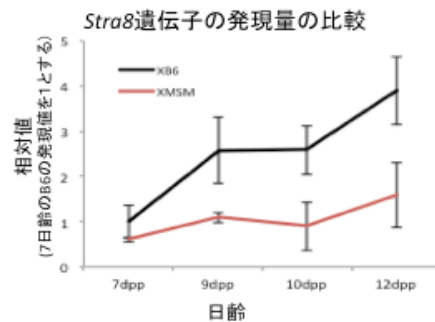


図 5

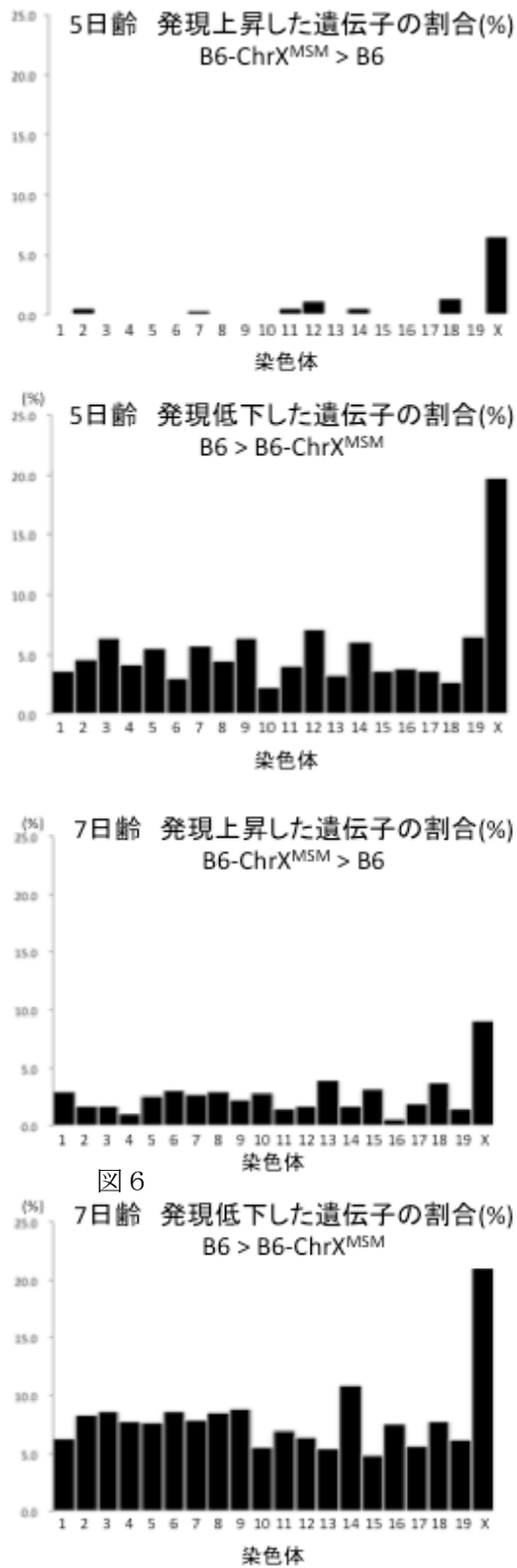
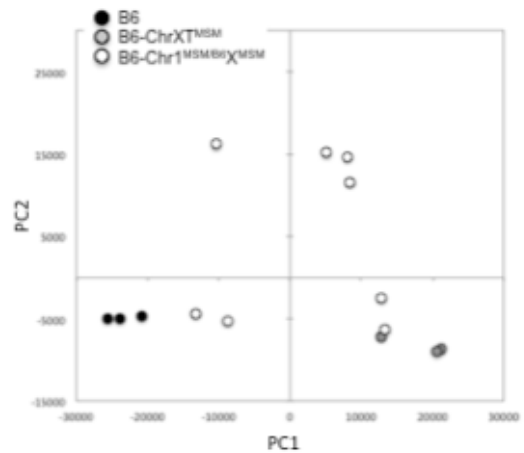


図 6

興味深いことに、7日齢の(B6-ChrX^{MSM} x B6-Chr1^{MSM})F1 精巢では、ゲノム全体の発現異常が有意に軽減された。そこで、B6 系統、B6-ChrX^{MSM} 系統、F1 個体の発現プロファイルを用いて、主成分解析を行ったところ、F1 個体の一部で、B6 系統の発現プロファイルに非常に近い回復個体が出現することが分かった (図 6)。

図 6

マイクロアレイによる発現プロファイルを用いた主成分解析



以上の結果から、B6-ChrX^{MSM} 系統および B6-ChrX^{MSM} 系統における、遺伝子発現の異常は、減数分裂が開始される前の発生ステージですでに起こっていることが分かった。現時点で、そのメカニズムは不明であるが、MSM 系統から導入された染色体領域で、発現している遺伝子の 3 割近くが発現上昇、もしくは発現低下の異常を起こしていることが分かった。X 染色体には、精子形成の初期に発現する遺伝子が集中していることが知られているが、こうした X 染色体連鎖遺伝子の広範の発現異常は、精子形成の初期ステージにおいて大きな影響を及ぼすことが推測される。また、B6-ChrX^{MSM} 系統の表現型は、B6-Chr1^{MSM} 系統との F1 個体で回復することから、X 染色体と第 1 番染色体を含んだ相互作用が、これら亜種間の遺伝的不和合に関連していることが示された。

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)

〔学会発表〕（計 2 件）

1. 木曾彩子（岡彩子）、城石俊彦
マウス亜種間の生殖隔離の遺伝的メカニズム、日本遺伝学会第 83 回大会、2011 年 9 月 22 日、京都
2. 木曾彩子（岡彩子）、城石俊彦
マウス亜種間における生殖隔離の遺伝的メカニズム、日本進化学会第 13 回大会、2011 年 7 月 30 日、京都

〔図書〕（計 1 件）

Ayako Oka, Toshihiko Shiroishi
The role of the X chromosome in house mouse speciation, In: Macholán M, Baird SJE, Munclinger P, Piálek J, editors. Evolution of the House Mouse, Cambridge university press, pp. 431-454, 2012

〔その他〕

2013 年 4 月 6 日、研究者代表が研究を行っている国立遺伝学研究所にて一般公開が行われ、マウスの亜種分化の説明を実際のマウスシステムの展示とともに行った。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木曾 彩子（岡 彩子）(AYAKO KISO)
大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構 新領域融合研究センター・融合プロジェクト特任研究員
研究者番号：80425834