

平成30年 5月26日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26840118

研究課題名(和文) 古代魚の比較染色体マッピングによる脊椎動物のゲノム・染色体進化過程の解析

研究課題名(英文) Process of genomic and chromosomal evolution in vertebrates inferred from comparative gene mapping for archaic-looking fishes

研究代表者

宇野 好宣 (Uno, Yoshinobu)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：60609717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロ染色体の起源を含めた脊椎動物におけるゲノム・染色体進化過程を推定するため、条鰭類の中で最も初期に分岐した、マイクロ染色体をもたないポリプテルスにおいて、FISHマッピングを用いてニワトリマイクロ染色体連鎖遺伝子92個を含む210個の遺伝子からなる染色体地図を作製した。その結果、ニワトリのマイクロ染色体に相同な18個の遺伝連鎖群すべては、ポリプテルスの染色体上に高度に保存されていた。さらに、他の脊椎動物種との染色体シンテニーの比較を行った結果、四肢動物の祖先核型と条鰭類の祖先核型はニワトリのマイクロ染色体と相同な多数のマイクロ染色体を保持していたことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To deduce genomic and chromosomal evolution including the origins of microchromosomes in vertebrates, I constructed chromosome maps of 210 functional genes including 92 genes on microchromosomes in the chicken using FISH mapping for the extant fish in the most basal group of the ray-finned fish, the gray bichir (*Polypterus senegalus*), which has no microchromosomes. All of 18 genetic linkages of the chicken microchromosomes are highly conserved in *Polypterus* chromosomes. Moreover, the results of comparisons of chromosome synteny among the other vertebrates including *Polypterus* collectively suggest that the protokaryotypes of tetrapods and actinopterygians had contained many microchromosomes, each of whose linkages were conserved in the single microchromosomes of the chicken.

研究分野：進化学

キーワード：FISH 核型進化 マイクロ染色体 脊椎動物 染色体地図 条鰭類 四肢動物 *Polypterus*

1. 研究開始当初の背景

爬虫類や鳥類の核型は、哺乳類とは異なり、主に 10 対以下の大型のマクロ染色体と微小で形態学的に識別不可能な多数のマクロ染色体から構成されている。また、系統学的に羊膜類より先に分岐した肺魚類や両生類のほとんどの種、そして条鰭類の分岐鰭類や真骨魚類のすべての種がマクロ染色体をもたないのに対し、条鰭類の全骨類に属するほとんどの種や肺魚類のオーストラリアハイギョは多数のマクロ染色体をもつことが知られている。このことから、爬虫類や鳥類がもつマクロ染色体は、羊膜類や四肢動物、肉鰭類、さらに遡って脊椎動物の共通祖先ですでに獲得されていたという仮説が古くから提唱されているが (Ohno et al. 1969)、今もその真偽は不明である。

これまでにメダカやゼブラフィッシュ、ニワトリ、ヒト、マウスなどの多くのモデル動物で全ゲノム配列が解読され、得られたゲノム情報を用いた比較ゲノム・染色体解析により、脊椎動物のゲノム・染色体進化に関する多くの知見がもたらされつつある。爬虫類や鳥類のマクロ染色体の起源については、真骨魚類とニワトリ、ヒトの比較ゲノム解析から、羊膜類の共通祖先はニワトリと類似した遺伝連鎖群をもち、多数のマクロ染色体を保持していた仮説が提唱されており (Burt 2002, Nakatani et al. 2007)、現在でもこの仮説が広く支持されている。また申請者は、両生類のネットイツメガエルと爬虫類のスッポンとシャムワニにおいて機能遺伝子の染色体地図を作製した。その結果、ニワトリのマクロ染色体に相同な連鎖群は両生類や爬虫類でも高度に保存されていたことから、四肢動物の共通祖先も羊膜類と相同なマクロ染色体を保持していた可能性が示唆された (Uno et al. 2012, 若手研究 (B) X H24 ~ 25)。

最近、多数のマクロ染色体をもつ条鰭類の全骨類に属するスポットテッドガーにおいて、ゲノム情報の一部である遺伝連鎖地図情報が公開された (Amores et al. 2011)。これは真骨魚類以外の条鰭類では唯一の報告例であるが、すべての遺伝連鎖群と染色体との対応関係は不明であった。したがって、現在までに比較ゲノム・染色体解析に用いることが可能な脊椎動物種は、真骨魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類のモデル動物のみであり、真骨魚類以外の条鰭類や肺魚類に属し一般的に古代魚と言われている動物種を含めた、脊椎動物の広範囲にわたる比較染色体解析はいまだ報告されていない。特に真骨魚類ではゲノム重複後に大規模な染色体再配列が起きたと考えられているため、真骨魚類を条鰭類の代表として扱うこれまでの比較ゲノム解析では、詳細な進化過程を推測するのは困難であった。したがって、羊膜類のマクロ染色体の起源を含む、脊椎動物の共通祖先から羊膜類に至る脊椎動物全体の詳細なゲノム・染色体進化過程を明らかにするには、

真骨魚類以外の条鰭類のゲノム・染色体情報が不可欠である。

2. 研究の目的

「マクロ染色体を有する爬虫類と鳥類のゲノム・染色体構造は、四肢動物で独自に獲得されたものなのか、それともそれ以前から保持されてきたのか」を明らかにし、比較ゲノム学の視点から脊椎動物の進化過程を検証する。

3. 研究の方法

(1) 古代魚のゲノム・染色体構造の解明
条鰭類のポリプテルス・セネガルス (*Polypterus senegalus*) とスポットテッドガー (*Lepisosteus oculatus*)、肺魚類のアフリカハイギョ (*Neoceratodus forsteri*) の高精度機能遺伝子染色体地図を作製し、これら 3 種の古代魚のゲノム・染色体構造を明らかにする。

(2) マクロ染色体の進化過程を含む、脊椎動物におけるゲノム・染色体再配列過程の推定

(1) で得られた染色体地図を、すでにゲノム情報が公開されている他の脊椎動物種 (メダカやニワトリ、ヒトなど) の染色体地図、ならびに申請者もしくは申請者が当時所属していた研究グループで作製された両生類 (ネットイツメガエル、アフリカツメガエル) や爬虫類 (スッポン、シャムワニ、シマヘビ) の染色体地図と比較することによって、真骨魚類以外の条鰭類や肺魚類と他の脊椎動物種間の相同染色体領域を同定する。スポットテッドガーは、爬虫類や鳥類と同様に多数のマクロ染色体をもつが、ポリプテルスとアフリカハイギョはマクロ染色体をもたない。そこで、条鰭類や肉鰭類、四肢動物の祖先核型が、スポットテッドガーのようなマクロ染色体を含む核型か、あるいはポリプテルスのようなマクロ染色体をもたない核型かを明らかにし、それぞれの系統におけるマクロ染色体の獲得もしくは消失過程を中心に、脊椎動物の共通祖先から肉鰭類、四肢動物、羊膜類に至る、ゲノム・染色体再配列過程を推定する。

4. 研究成果

(1-1) ポリプテルスの染色体地図の作製

ポリプテルス・セネガルスの成体のヒレや腎臓、心臓から得られた線維芽細胞の培養を行い、複製 R-分染染色体標本作製した。その結果、ポリプテルスの核型は先行研究の報告と同様に 36 本の染色体から構成されており、さらに複製 R-分染バンドにより 18 対のすべての染色体を識別することが可能になった。ポリプテルスの FISH マッピングには、すでに公開されているニワトリのゲノム情報や、申請者の先行研究であるネットイツメガエルの染色体地図情報 (Uno et al. 2012)、そして当時申請者が FISH マッピングを行い作製した染色体地図をもとに構築中であった

アフリカツメガエルのゲノム情報(全ゲノム解読は申請者が筆頭共同著者となり 2016 年に Nature 誌にて報告 (Session, Uno et al. 2016)) に基づいて、ニワトリやツメガエルの染色体全域をカバーできる 210 個の遺伝子を選抜した。そして FISH マッピングによりそれらの遺伝子のポリプテルスにおける染色体上の位置を決定した。その結果、ポリプテルスすべての染色体腕を網羅する染色体地図を作製することに成功した(図 1)。

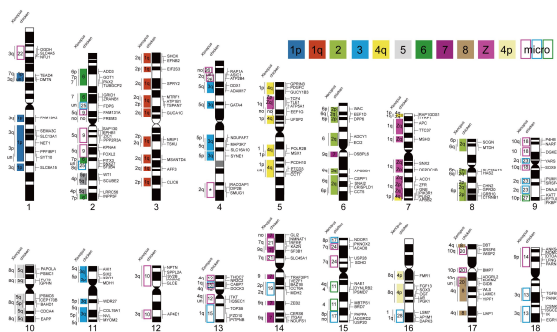


図 1 ポリプテルスにおけるニワトリとネッタイツメガエルとの比較染色体地図

(1-2, 3) ガーおよびアフリカハイギョにおける染色体地図の作製

ガーの成体個体をペットショップより購入し、ポリプテルスと同様な方法で、腎臓や心臓から得られた培養細胞を用いて FISH マッピング用複製 R-分染染色体標本作製した。その結果、先行研究の報告と同様に、多数のマクロ染色体を保持することが明らかになった。これらの微小で識別不可能なマクロ染色体を識別するためのマクロ染色体特異的 DNA プローブの作製を行い、ポリプテルスと同様にガーでも FISH マッピングをすすめていた。しかし、2016 年 3 月にアメリカのグループを中心とした国際チームによって、スポットテッドガーの全ゲノム解読が Nature Genetics 誌にて報告された (Braasch et al. 2016)。この報告では、すでにこの種で報告されている遺伝連鎖地図 (Amores et al. 2011) を元に全ゲノム配列をアセンブリし、この種における染色体レベルの全ゲノム配列を構築している。この情報は、本研究によって得られたガーの染色体地図情報と一致し、かつより高精度なデータであることから、以降の比較解析には本研究で得られた FISH マッピングデータではなく、染色体レベルにアセンブリされた全ゲノム配列の情報を用いることにした。

ガーと同様に、ペットショップより購入したアフリカハイギョの成体から採取した腎臓や心臓、血液を用いて軟骨魚類における細胞培養法の条件検討を行った。その結果、増殖の盛んな培養細胞を得ることが可能になった。しかしながら、良好な染色体中期像を得ることができず、染色体地図の作製のための機能遺伝子の FISH マッピングを行うに至

らなかった。アフリカハイギョは 1 匹あたりの値段も高く、大量の個体を用いるのは不可能であることから、今後はハイギョと同様にゲノムサイズが巨大でかつ安価なアカハライモリを用いて染色体標本作製法の条件検討を行う必要があると考えられる。

(2) マイクロ染色体の進化過程を含む、脊椎動物におけるゲノム・染色体再配列過程の推定

得られたポリプテルスの染色体地図とガーやメダカ、メキシコサラマンダー、ニワトリ、ヒトなど他の脊椎動物種のゲノム情報、ならびに申請者もしくは申請者が所属していた研究グループで作製された 2 種の両生類(ネッタイツメガエル、アフリカツメガエル)と 3 種の爬虫類(スポン、シャムワニ、シマヘビ)の染色体地図と比較することで、これらの動物種間の染色体相同領域の特定を行った。その結果、ポリプテルスは、ガーや両生類、爬虫類、ニワトリと非常に保存された遺伝連鎖群をもつことが明らかになった。羊膜類の祖先核型をそのまま保持していると考えられているニワトリの遺伝連鎖群ごとの詳細な比較を行った結果、ニワトリマクロ染色体に相同な遺伝連鎖群 10 個のうち 5 個はポリプテルスの染色体上に高度に保存されていた。残りの 5 個の連鎖群はそれぞれ、分断され 2 対のポリプテルス染色体上に保存されていた。このうち、ニワトリ 4 番染色体長腕と Z 染色体に相同な連鎖群は、両生類では 1 本の染色体に保持されており、ニワトリやポリプテルス、ガーではそれぞれ異なる breakpoint で 2 本の染色体上に保持されていたことから、四肢動物の共通祖先や条鰭類の共通祖先ではこの 2 つの連鎖群が融合した 1 対の大きなマクロ染色体 (4q/Z) を保持していた可能性が強く示唆された。同様な比較解析の結果、四肢動物の共通祖先では、ニワトリ 2 番染色体と 3 番染色体の遺伝連鎖群に相同な 2 対のマクロ染色体 (2, 3) を保持していたが、条鰭類の祖先ではこの 2 つの連鎖群がそれぞれ 2 対の染色体 (2a, 2b, 3a, 3b) として保存されていたことが新たに示唆された。

また 18 対のニワトリマイクロ染色体 (16、25 番を除く 9 番から 28 番染色体) に相同な連鎖群すべては、他のニワトリ染色体と相同な連鎖群と融合する形で、マイクロ染色体をもたないポリプテルスでも高度に保存されていた。しかしながら、それぞれのマイクロ染色体連鎖群と融合している連鎖群は、ポリプテルスと両生類間だけでなくポリプテルスとガー間でも大きく異なっていた。このことから、四肢動物の共通祖先と条鰭類の共通祖先は、ニワトリのマイクロ染色体に相同なマイクロ染色体を多数保持していた可能性が強く示唆され、さらにこれらの共通祖先はそれぞれ 11 本と 9 本のマクロ染色体を保持していたことが示唆された(図 2)。したがって、マイクロ染色体をもたないポリプテルス

や両生類では、すべてのマイクロ染色体に染色体融合が生じマイクロ染色体が消失し、ガーでは一部のマイクロ染色体で染色体融合が生じマイクロ染色体が減少したことが示唆された。

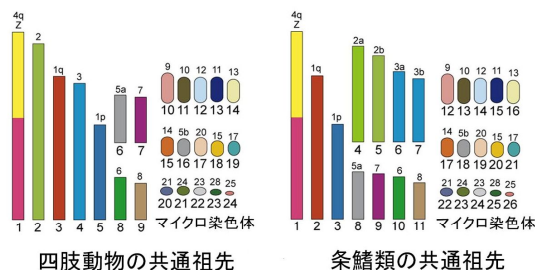


図2 推定された四肢動物の共通祖先核型(左)と条鰭類の共通祖先核型(右)

それぞれの染色体の色は
相同なニワトリ染色体連鎖群を示す

これらの研究成果は、2015年4月にタイ・バンコクにて開催された The 5th Asian Chromosome Colloquium における招待講演発表を含めた、国内外の5つの異なる学会にて発表を行い、現在学術論文として投稿中である。

今後より詳細に脊椎動物のゲノム・染色体進化過程を理解するには、四肢動物と条鰭類の共通祖先である硬骨魚類の共通祖先の核型を明らかにする必要があり、それを行うには軟骨魚類や無顎類のゲノム・染色体情報が不可欠である。したがって、申請者は平成29年度から基盤研究(C)に採択され、軟骨魚類を中心とした動物種における染色体情報を構築するため解析をすすめている。

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0件)

[学会発表](計5件)

Uno Y, Nishida C, Toyoda A, Fujiyama A, Okabe M, Matsuda Y. The origin and evolutionary process of microchromosomes in ray-finned fishes and tetrapods inferred from comparative gene mapping for *Polypterus*. The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan, 沖縄科学技術大学院大学(沖縄) 2016年11月14日 - 11月19日

宇野好宣、西田千鶴子、豊田敦、藤山秋佐夫、岡部正隆、松田洋一 ポリプテルスの比較染色体解析により明らかになった脊椎動物におけるマイクロ染色体の進化過程 染色体学会第66回年会、東京大学(東京) 2016年11月2日 - 11月4日

宇野好宣、西田千鶴子、豊田敦、藤山秋佐夫、岡部正隆、松田洋一 古代魚の比較染色体マッピングによる脊椎動物のマイ

クロ染色体の進化過程の解析 日本遺伝学会第87回大会、東北大学(仙台) 2015年9月24日 - 26日

宇野好宣、西田千鶴子、豊田敦、藤山秋佐夫、岡部正隆、松田洋一 古代魚ポリプテルスの比較染色体解析により明らかになった脊椎動物におけるマイクロ染色体の進化過程 日本進化学会第17回大会、中央大学(東京) 2015年8月20日 - 23日

Uno Y. Evolution of microchromosomes in vertebrates. The 5th Asian Chromosome Colloquium, Kasetsart University (タイ・バンコク) 2015年4月29日 - 5月1日 (招待講演)

6. 研究組織

(1)研究代表者

宇野 好宣 (UNO, Yoshinobu)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員
研究者番号：60609717

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

