

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 11 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14585

研究課題名(和文) ショウジョウバエNeo性染色体を用いたY染色体の退化過程の解明

研究課題名(英文) Elucidation of degeneration process of the Y chromosome by using the neo-sex chromosome systems in Drosophila species

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：常染色体が性染色体になると安定した性決定を行える一方、生物はY染色体の退化という潜在的不利益を被る。しかし、生物は進化において何度も独立に性染色体を獲得してきた。この謎を解く有効な手段の1つはY染色体の退化過程を明らかにすることである。そこで本研究では、性染色体を最近独立に獲得したショウジョウバエ3種およびその近縁種のゲノム配列を決定し、Y染色体の退化過程を明らかにすることを目的とした。その結果、Y染色体の退化の程度は、必ずしも性染色体になってからの時間に比例しないことが分かった。このことは、Y染色体化直後はクロマチン修飾などにより多くの遺伝子が可逆的にサイレンシングしている可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Sex chromosomes derived from a pair of autosomes provide a stable sex-determination to organisms, but result in a massive loss of functional genes on the Y chromosome, which is potentially deleterious. Despite this complicated outcomes, organisms have repeatedly and independently acquired sex chromosomes during evolution. A promising approach to solve this “paradox” is to uncover the degeneration process of the Y. In this study, I determined the genome sequences of three Drosophila species that recently acquired sex chromosomes and those of their closely-related species, and clarified the degeneration process of these Y chromosomes. The analyses revealed that the extent of Y degeneration does not necessarily proportional to the Y age. This finding implies that the initial Y dynamics after its emergence is largely governed by chromatin modification, resulting in rapid reversible gene silencing. This study poses a new concept with respect to the initial stage of Y “degeneration”.

研究分野：分子進化学、ゲノム進化学

キーワード：性染色体 ショウジョウバエ 次世代シーケンサー Y染色体 サイレンシング

1. 研究開始当初の背景

一对の常染色体から X および Y 染色体(または Z と W)が生じると、通常 X 染色体と Y 染色体間の組換えは抑制される。その結果、Y 染色体には自然選択が作用しにくくなり、有害突然変異の蓄積によって次第に遺伝子が失われる。このような Y 染色体の異型化(退化)に関する研究は、主に哺乳類を用いて進められてきたが、哺乳類の性染色体は起源が約 2 億年前と非常に古いため、Y 染色体からの遺伝子消失の過程を追跡することができない。その結果、Y 染色体の運命や将来についてもモデルによるばらつきが大きく、いまだ議論の最中である。また、哺乳類の Y 染色体はサイズが比較的大きく、多くの領域が反復配列であるため、アセンブル自体が非常に困難である。Y 染色体の「退化」を理解することは性染色体、ひいては性の進化を理解する上で非常に重要であるため、これらの問題点を克服するアプローチが必要である。このような背景から、起源が新しく、サイズが比較的小さい Y 染色体を調べるといふ本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

そこで本研究では、最近生じた性染色体(Neo 性染色体)を持ち、その獲得時期が異なるショウジョウバエ 3 種(*Drosophila miranda* 以後 Mir、*D. albomicans* 以後 Alb、*D. americana* 以後 Ame)を用いて、Y 染色体の退化過程を解明することを目的とする。また、この目的を達成するために、ロングリードのシーケンサーを用いた Y 染色体アセンブルの手法開発を目指す。2 年の研究期間で以下の事を行う。

(1) Alb、Ame の Neo-Y 染色体配列の決定

すでに研究代表者の先行研究において Mir の高精度ゲノム配列が決定されており、Neo-Y 染色体のアセンブリも得られている。また、Mir と近縁で Neo 性染色体を持たない *D. pseudoobscura* (以後 Pse) と *D. obscura* (以後 Obs) のゲノム配列、さらに Alb と近縁で Neo 性染色体を持たない *D. nasuta* (以後 Nas) のゲノム配列も研究代表者の先行研究で決定されている。そこで本研究では、Mir と同じく Neo 性染色体を持つ Alb と Ame のゲノム配列を決定し、Neo-Y 染色体のアセンブリを得る。さらに、Alb の近縁種で Neo 性染色体を持たない *D. kohkoa* (以後 Koh) と、Ame の近縁種で Neo 性染色体を持たない *D. texana* (Tex) と *D. novamexicana* (以後 Nov) のゲノム配列の決定も行う。

(2) Mir、Alb、Ame における Neo-Y 染色体の退化程度の推定

それぞれ近縁種との比較から Mir、Alb、Ame の 3 種の Neo-Y 染色体の退化の程度(具体的には偽遺伝子の割合)を推定する。

(3) 3 種の Neo-Y 染色体の比較に基づく Y 染色体退化過程の解明

3 種の Neo-Y 染色体の比較から Neo-Y 染色体の退化速度や退化パターンを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ゲノム配列の決定

PacBio シーケンス

Nas の PacBio シーケンスはすでに研究代表者らの先行研究により決定済みである(近藤、豊田、野澤 未発表)。そこで本研究では Alb、Ame、Tex、Koh、Nov の合計 5 種のメスゲノムを PacBio シーケンサーを用いて決定した。いずれもゲノムサイズの約 100 倍量の配列を決定した。得られた配列データは HGAP3 または HGAP4 を用いてアセンブルした。なお、PacBio シーケンスとアセンブルは、新学術領域研究「ゲノム支援」および「先進ゲノム支援」の支援を受けて行った。

HiSeq によるショートリードシーケンス

Alb、Ame の Neo-Y 染色体のアセンブリを得るために、上記の手順でまず Neo-X 染色体のアセンブリを得た。次にオスとメスの DNA をそれぞれ HiSeq2500 シーケンサーを用いてシーケンス(ゲノムサイズの 100×程度)し、それを Neo-X 染色体のアセンブリにマッピングした。オス特異的な SNP や Indel を Neo-Y 染色体由来のものであると仮定し、Neo-X 染色体の配列をこれら SNP および Indel で置き換えて Neo-Y 染色体のアセンブルを行った。

(2) トランスクリプトーム配列の決定

研究代表者の先行研究で Mir、Pse、Obs のトランスクリプトームは決定済みである。そこで Alb、Nas、Koh、Ame、Tex、Nov の 6 種のトランスクリプトーム配列を決定した。まずこれら 6 種の 3 齢幼虫、蛹、成虫のオスメスそれぞれから RNA を抽出し、イルミナ用ライブラリを作成した。これらのライブラリを HiSeq2000 シーケンサーまたは HiSeq4000 シーケンサーを用いて両端から 100bp ずつシーケンスした(各サンプルにつき 2000 万断片以上をシーケンスした)。この実験を各条件につき独立に 2 回行った。得られたデータを TopHat2 と CuffLinks を用いてそれぞれの種のゲノム配列にマップし、トランスクリプトームを決定した。

(3) 遺伝子のアノテーション

得られたトランスクリプトームの各転写産物の中にタンパク質コード領域が含まれるかどうかを、TransDecoder を用いて推定した。また、ゲノム配列から Augustus を用いて *Ab initio* な遺伝子予測も行った。

(4) 遺伝子発現量の推定

(2)で得られた RNA-seq リードを同じく(2)、

(3)で得られたトランスクリプトーム配列にBLASTNを用いてマップし、各遺伝子の発現量を推定した。

(5) Neo-Y 染色体の退化程度の推定

Neo 性染色体を持つ種の Neo 性染色体上の遺伝子と、近縁種で Neo 性染色体を持たない種の相同遺伝子を、BLASTP を用いて同定し、種間比較から Neo 性染色体上の遺伝子の偽遺伝子化の割合を計算した。

4. 研究成果

(1) ゲノム配列の概要

Neo 性染色体を持つ Alb と Ame については既にアセンブルが完了した。その概要を表 1 に示す。

表 1: *D. albomicans* (Alb) と *D. americana* (Ame) のゲノムアセンブリの概要

	<i>D. albomicans</i>	<i>D. americana</i>
ゲノムサイズ (Mbp)	182.7	210.3
コンティグ数	835	1,302
コンティグ N50 (Mbp)	22.0	1.5

Ame のコンティグ N50 がやや短いものの、両種とも Neo-Y 染色体上の遺伝子の偽遺伝子化の解析を十分行える高精度アセンブリが得られた。Tex、Koh、Nov の 3 種については現在アセンブルが進行中である。Alb、Ame とは独立に Neo 性染色体を獲得した Mir とその近縁種で Neo 性染色体を持たない Pse と Obs のゲノムアセンブルは、先に述べた通り、すでに研究代表者の先行研究にて決定済みである。

(2) トランスクリプトーム配列の概要

ゲノムアセンブルが完了している Alb、Nas、Ame の 3 種について、トランスクリプトーム配列を決定した。その概要を表 2 に示す。残りの 3 種 (Koh、Tex、Nov) についてはゲノムアセンブルが終了次第トランスクリプトーム配列を決定する予定である。

表 2: *D. albomicans* (Alb)、*D. nasuta* (Nas)、*D. americana* (Ame) のアノテーションの概要

	Alb	Nas	Ame
タンパク質コード遺伝子数	12,158	10,873	10,508
mRNA 数	22,787	22,535	21,459

(3) Neo-Y 染色体の退化の度合い

研究代表者の先行研究で決定した Mir の Neo-Y 染色体に存在する遺伝子の偽遺伝子の割合と、本研究で明らかにした Alb の Neo-Y 染色体遺伝子の偽遺伝子率を比較した。その結果、Alb は約 10 万年前に Neo 性染色体を獲得しており、Mir の Neo 性染色体 (約 100 万年前に誕生) よりも起源が新しいにもかかわらず

らず、Alb の Neo-Y 染色体は Mir の Neo-Y 染色体よりも偽遺伝子の割合が大きかった (図 1)。偽遺伝子のうち、Alb では特に遺伝子のサイレンシングによる偽遺伝子化が多かった。これらの結果は、時間とともに Y 染色体の退化が進むという従来の考え方と一致しない。

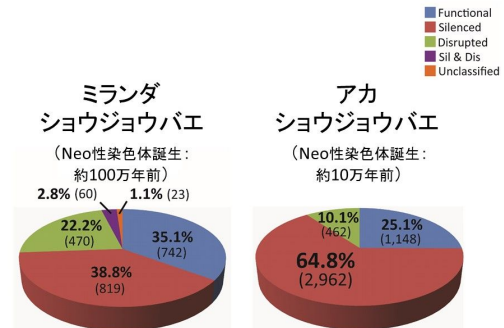


図 1: ミランダショウジョウバエ (Mir) とアカショウジョウバエ (Alb) の Neo-Y 染色体上の遺伝子の分類。円グラフのカッコ内はそれぞれに分類された遺伝子の数を示す。

そこで、Mir と Alb において Neo 性染色体が生じた時期を再評価するため、Mir と Alb のオスのリードを Neo-X 染色体アセンブリにマップし、SNP と Indel の割合を推定した。この値は Neo-X と Neo-Y の配列の違いにほぼ一致するはずなので、常染色体が Neo 性染色体になり、Neo-X と Neo-Y の分化が生じてからの時間に応じてこの値は大きくなると考えられる。その結果、Mir の方が Alb に比べて Neo-X と Neo-Y の配列の違いが大きいが分かった (図 2)。つまり、Alb の Neo 性染色体は Mir に比べて確かに分化の程度が小さく、その起源がより新しい (最近である) ことが再確認された。

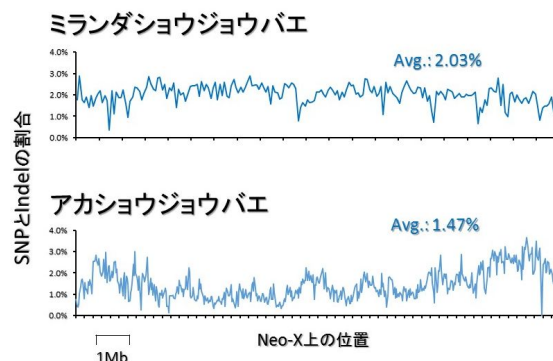


図 2: ミランダショウジョウバエ (Mir) とアカショウジョウバエ (Alb) のオスリードに含まれる SNP と Indel の割合。この値は Neo-X と Neo-Y の配列の違いに相当する。解析の Window size は 100 kb である。

(4) 考察

これらの結果は、Alb の Neo 性染色体の起源は確かに Mir の Neo 性染色体の起源よりも新しいにもかかわらず、Mir に比べてより多

くの遺伝子が Neo-Y 染色体上で「偽遺伝子化」していることを示唆する。このことは、突然変異が Neo-Y 染色体の初期退化過程の主要因であるとする従来の考えと一致しない。研究代表者は、(まだ予備的な考えではあるが) Neo-Y 染色体の初期動態が、主にエピジェネティックな修飾によって生じているのではないかという仮説を持っている。つまり、Neo-Y 誕生後は、突然変異による遺伝子退化も生じるが、それ以外に「クロマチン修飾による可逆的な遺伝子サイレンシング」も多数生じているのではないかということである。実際、Mir と Alb の Neo-Y 染色体を比較したとき、ORF の破損による偽遺伝子化は Alb に比べて Neo-Y の起源が古い Mir でより多く生じており(図1) これは突然変異が時間とともに蓄積し、徐々に Neo-Y 遺伝子が退化していくという従来の説と矛盾しない。これに対し、発現が停止している遺伝子の割合は Alb の方が Mir に比べてかなり大きい(図1)。したがって、もし研究代表者の仮説が正しければ、エピジェネティック変異による可逆的な遺伝子サイレンシングが Alb において Mir よりも頻繁に生じているということになる。

今後、この2種のヒストンマークの程度を ChIP-seq などでも明らかにできれば、本仮説を検証できるものと考えている。また、いまだ解析中である Ame の Neo-Y 染色体の傾向を見ることで、ショウジョウバエ Neo-Y 染色体の進化パターンに関する共通性と独自性を見いだせると考えている。

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1件)

Nozawa M, Onizuka K, Fujimi M, Ikeo K, and Gojobori T. (2016) Accelerated pseudogenization on the neo-X chromosome in *Drosophila miranda*. *Nature Communications* 7:13659. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

野澤昌文「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, 名古屋大学, 2017年1月24~25日(招待講演)

野澤昌文「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, 日本大学三島キャンパス, 2016年9月7~9日(招待講演)

野澤昌文「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, 東京工業大学大岡山キャンパス, 2016年8月25~28日(一般口演)

野澤昌文「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, 国立遺伝学研究所, 2016年8月20~21日(招待講演)

野澤昌文「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, 首都大学東京, 2015年11月11日(招待講演)

野澤昌文「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, 国立遺伝学研究所, 2015年6月27~28日(招待講演)

〔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