

令和元年6月13日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14792

研究課題名(和文)ネオ性染色体の実験的進化

研究課題名(英文)Experimental evolution of neo-sex chromosomes

研究代表者

北野 潤 (Kitano, Jun)

国立遺伝学研究所・ゲノム・進化研究系・教授

研究者番号：80346105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：2つの独立した系統にて、32度の高温処理にてオスへの性転換が高頻度で確認できた。4世代間の性転換率の変動を見たところ、世代変化のパターンは2系統間で異なっていた。1系統では、世代によらず26度での性転換率は一定であったのに対して、32度での性転換率は変動を示した一方、別の系統では、32度の性転換率はある程度一定であったのに対して、26度での性転換率は大きな変動を示した。このように、実験的進化で出現したネオ性染色体を解析するための材料を準備することができたとともに、性決定機構のゆらぎの世代変動について明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

性決定機構や性染色体がどの程度ゆらぐのか、また、潜在的に性を決める遺伝子座がどの程度ゲノム内に隠れているのかを明らかにするのが本研究の目的である。我々は、青森の野外メダカの性決定が温度によって大きく揺らぐこと、世代を経て変動することを明らかにした。本結果で得られたY染色体の除去系統の個体のDNAを解析することによって、性を決める潜在的遺伝子座を同定することができる。

研究成果の概要(英文)：In two independent lines, sex conversion to males occurred frequently at high temperature treatment (32 °C). Analysis of changes in the sex conversion rates among 4 generations showed that the pattern of generational change was quite different between the two lines. In one line, the sex conversion rate at 26 °C was constant regardless of generation, while the sex conversion rate at 32 °C showed fluctuation. In the other line, the sex conversion rate was relatively constant at 32 °C, while the sex conversion rate at 26 °C showed a large fluctuation. Thus, we obtained materials for analyzing neo-sex chromosomes and clarified generational changes in the sex conversion rates.

研究分野：進化生物学

キーワード：性染色体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の遺伝・ゲノム研究により、性染色体が近縁種間で急速に転換するターンオーバー現象が明らかになりつつある (Kitano & Peichel 2012 *Environ Biol Fish*; Bachtrog et al. 2014 *PLoS Biol*)。例えば、魚類の場合、近縁種間で異なる染色体上に性決定遺伝子が座乗している例が豊富に存在する (Takehana et al. 2008 *Chromosome Res*; Ross et al. 2009 *PLoS Genet* など)。また、性染色体の転換は、種分化や表現型多様化を促進することも示唆されている (Kitano et al. 2009 *Nature*; Yoshida et al. 2015 *PLoS Genet*)。

その一方で、性染色体のターンオーバーにも関わらず、特定の染色体が繰り返し性染色体として利用される傾向も知られている。例えばハエ目では dot chromosome (Vicoso & Bachtrog 2015 *PLoS Biol*)、トゲウオ科では第 12 番染色体 (Ross et al. 2009 *PLoS Genet*)、メダカ科では第 10 番染色体 (Myosho 2015 *G3*) が複数回独立して性染色体に進化している。このことは性染色体になりやすい染色体が存在する可能性を示唆するが、実際に、特定の染色体が性染色体になりやすい傾向があるのかどうか、また、そういった傾向の原因について実験的に解明された例はない。

そこで、第 1 番染色体が性染色体であるメダカを利用して実験的に Y 性染色体を除去し、複数の系統で繰り返し同じネオ性染色体が出現するか、また、これまで近縁種で性染色体として同定されている染色体にネオ性染色体が出現するかを検証することによって、性染色体になりやすい染色体の有無について検証することが可能でないかと着想した。

また、表現型可塑性は、生物が新規環境や環境変動に応答する際に重要な戦略の 1 つであり、急激な環境変化への迅速応答に重要である (Hendry et al. 2008, *Mol Ecol*)。しかし一方で、可塑性を保持していることはむしろコストがかかるので (DeWitt et al. 1998 *Trends Ecol Evol*)、形質の発現に対して一定方向の選択圧が常にかかるような場合には、固定された表現型を示すように可塑性を失っていくと考えられる (遺伝的同化)。しかし、性染色体の進化に遺伝的同化が関与するかについて検証されたことはない。

2. 研究の目的

性染色体の人為的な転換、つまりネオ性染色体の実験進化に挑戦し、特定の染色体がネオ性染色体になりやすいような遺伝的制約の有無を検証する。メダカは XY 性決定機構を持つものの、胚発生初期の高温刺激によって一定頻度の XX オスを誘導できる (Sato et al. 2005 *Zoolog Sci*; Hattori et al. 2007 *Sex Dev*)。そこで、高温刺激によって性転換した XX オスのみを用いて交配を繰り返し、オスへの性転換を起こしやすい遺伝基盤を持った個体を人為選抜し、ネオ性染色体が出現するか検証する。また、高温刺激で性転換した個体を選抜することで、低温でも性転換が生じやすい個体が選抜されるのか、という遺伝的同化を検証する。

3. 研究の方法

性転換しやすいことが知られている青森のメダカを 2016 年 6 月に採集し、オス 20 尾とメス 20 尾のクローズドコロニーを準備した。メスの産卵が確認されると採卵し、一腹卵をランダムに半分に分け、26°C 群と 32°C 群に分けた (図 1)。温度刺激は Hattori et al. (2007 *Sex Dev*) にならった。受精卵は 8~16 細胞期 (受精後 2~3 時間以内) に採卵して、それぞれの温度処理群へ配分し、卵に対する温度処理は孵化まで続けた。この作業は、それぞれの群が 100 卵以上に到達するまで続けた。孵化した個体は、26°C の共通環境へ移して成魚まで飼育した。なお、死亡した卵と魚は順次、除去した。同様のことを 2 回実施し、A 系統と B 系統の 2 家系を作出した。

2016 年の 11 月に全ての生存した成魚から麻酔下で尾鰭の末端を切り取りカネカ簡易 DNA 抽出キットで DNA を精製後、性判別マーカーの DMY 遺伝子座の PCR にて遺伝的性 (XX 染色体型か XY 染色体型か) を決定した。具体的には、プライマー PG17-5 (5'-CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG-3') と PG17-6 (5'-GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA-3') を利用し、KAPA2G Fast Multiplex PCR Kits にて、95 度 3 分のアニーリング反応を 1 サイクル後、95 度 15 秒、60 度 30 秒、72 度 90 秒の反応を 35 サイクル実施し、72 度で 10 分間の最終の伸長反応を行なった。2% アガロース電気泳動にて 1 本の PCR 産物のみのものを XX、2 本の PCR 産物が確認できた個体を XY とした。表現型の性別は尻鰭の外部形態でまず決定し (Kawajiri et al. 2014 *Mol Ecol*)、その後、約半数の個体の生殖腺の解剖を

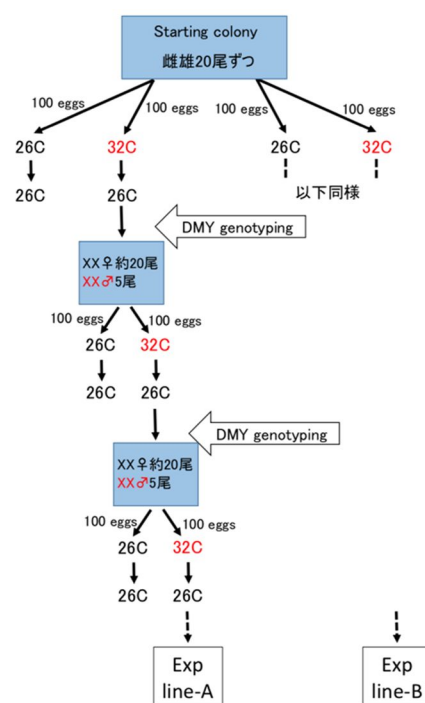


図 1 実験デザイン

行って、外部形態による性別判定が正しいことを確認した。

次世代を作成する交配には、26度で飼育したXXメス全てと32度で性転換したXXオス5尾からなるクローズドコロニーを用いた。この第二世代が成長後、上記と同様にして尾鰭からDNAを採取しPCRを実施してこれら個体がXX型であることを確認した。全てがXX型であったため、以降の世代ではXX型であるかどうかは確認していない。表現型の性別は尻鰭の外部形態で判断した。さらに次世代を同様に作出することを2回繰り返して、第4世代まで作出し、表現型の性を決定後エタノールに保存しEcoRIとBglIIを用いたRestriction-site Associated DNA (RAD)解析へ供した。

4. 研究成果

A系統とB系統の双方の系統において、32度の高温処理にてオスへの性転換が高頻度で確認できた(図2)。26度群においても20%以上の性転換個体が観察されたことから、本青森集団の性決定はDMYのみで決まっているのではなく、他の要因(他の遺伝子座や環境要因)の寄与もそれなりに大きいと考えられた。

A系統では、世代によらず26度での性転換率は約20%と一定であったのに対して、32度での性転換率はいったん上昇ののち低下の傾向を示した。一方、B系統では、32度の性転換率は70-80%の間である程度一定であったのに対して、26度での性転換率は大きな変動を示した。これらの結果から、4世代の間の交配実験では性転換率の変化は一定の傾向を示さなかった。

遺伝的同化の仮説によると(Waddington 1942 *Nature*)、32度で誘導した性転換個体の選抜によって、潜在的に性転換しやすい発生機構をもつ個体が選抜され、26度での性転換率も上昇していく傾向が期待される。しかし、本実験では、そのような進化応答は観察されなかった。その原因の一つとして、26度でもそもそも性転換の高い集団を利用したために強い選択がかからなかったことが考えられる。

本実験で得た系統のDNAは全て保管しており、現在、最終世代のRAD解析を進行中である。GWASにて性と連鎖する領域を見出すことで潜在的に存在している性決定領域を見出せる。本結果が次次第論文化を計画している。

このように、実験的進化で出現したネオ性染色体を解析するための材料を準備することができたとともに、性決定機構のゆらぎの世代変動について明らかにすることができた。

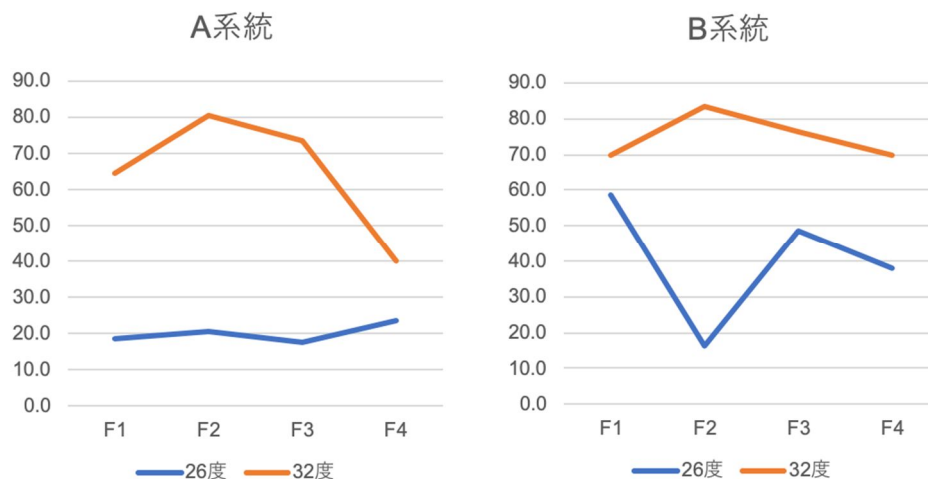


図2 XX個体のうちオスに性転換した個体の%

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山平 寿智

ローマ字氏名：(YAMAHIRA, kazunori)

所属研究機関名：琉球大学

部局名：熱帯生物圏研究センター

職名：教授

研究者番号(8桁): 20322589

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。