

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K07511

研究課題名（和文）ハイギョとサメ、ヌタウナギの染色体からマイクロ染色体の起源を探る

研究課題名（英文）Investigation of the origins of microchromosomes from chromosomes of lungfish, shark, and hagfish

研究代表者

宇野 好宣 (Uno, Yoshinobu)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：60609717

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：爬虫類や鳥類で広く保存されているマイクロ染色体は、脊椎動物の祖先で獲得されたことが示唆されている。しかしながら、これらより共通祖先から系統的に早く分岐している軟骨魚類では、ゲノム情報や染色体情報がほとんど得られておらず、よくわかっていない。そこで、イヌザメを含む軟骨魚類種において、培養細胞の樹立、それを用いた詳細な染色体解析を行った。その結果、イヌザメはマイクロ染色体をもたず、ヒトと同様に矮小化したY染色体を持つことが明らかになった。これまでは多くの軟骨魚類種はマイクロ染色体をもつ核型を保持していると考えられていたが、軟骨魚類独自に染色体再配列や性染色体の進化が起きていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サメやエイなどの軟骨魚類は、真骨魚類や哺乳類などよりも早期に共通祖先より分岐しているため、脊椎動物の進化を理解する上で非常に重要である。しかし、軟骨魚類におけるゲノム情報や染色体情報はおろか、様々な生物学実験で必要である培養細胞株ですら軟骨魚類ではほとんど報告されていなかった。本研究では、複数の軟骨魚類のサメにおいて核型を明らかにしただけではなく、非常に安定に増殖する培養細胞株を世界で初めて樹立することに成功した。この成果で得られた培養細胞は、軟骨魚類における汚染物質への抵抗性検証解析などにも応用できることから、水産業への貢献も期待できる。

研究成果の概要（英文）：Microchromosomes, which are widely conserved in reptiles and birds, have been suggested to have been acquired in the common ancestors of vertebrates. However, in cartilaginous fishes, which diverged earlier than the common ancestors, little genomic or chromosomal information is available and the microchromosome evolution in cartilaginous fishes is not well uncovered. Therefore, we established cultured cells and performed detailed chromosome analysis using these cells in four cartilaginous fishes, including the brownbanded bamboo sharks. These results revealed that the bamboo sharks lack many microchromosomes and possess a reduced Y chromosomes like human. Although many cartilaginous fish species were previously thought to retain karyotypes with many microchromosomes, our results indicate that chromosome rearrangements and sex chromosome evolution have occurred independently in cartilaginous fishes.

研究分野：細胞遺伝学

キーワード：脊椎動物 染色体進化 核型 軟骨魚類 マイクロ染色体 性染色体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

爬虫類や鳥類は、マイクロ染色体と呼ばれる微小な染色体を多数もっているが、真骨魚類や両生類のほとんどの種はマイクロ染色体をもたない。一方、系統学的に四肢動物より先に分岐したシーラカンス類や、軟骨魚類は、爬虫類や鳥類と同様に多数のマイクロ染色体をもっている。したがって多数のマイクロ染色体を有する核型は、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。しかしながら、多数のマイクロ染色体はいつ、なぜ獲得されてきたのかは、今もその真偽はよくわかっていない。

これまでに多くのモデル動物のゲノム配列が解読された結果、これらのゲノム情報を用いた比較ゲノム・染色体解析が可能となり、マイクロ染色体の起源を含めた脊椎動物の染色体進化過程の一端が明らかになりつつある。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子連鎖群をもち、多数のマイクロ染色体を保持していた可能性が示唆されている。申請者は、両生類のネッタイツメガエルとアフリカツメガエルにおいて機能遺伝子の染色体地図を作製した。その結果、ニワトリのマイクロ染色体の連鎖群はマイクロ染色体をもたないツメガエルにおいて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イ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 PLOS ONE 他)。

現在では、交配によって次世代を得ることができる動物種であれば、全ゲノム配列情報がなくても、新型シーケンサーを用いた RAD シーケンス解析によって遺伝連鎖地図を作製することが可能である。しかしハイギョやシーラカンス、サメなどの軟骨魚類、無顎類のヌタウナギのように、実験室での飼育や繁殖が難しい動物種ではこの手法を用いることは困難である。そこで申請者らはこれに代わる方法として、FISH 法を用いて DNA クローンを染色体上にマッピングし、細胞遺伝学的な染色体地図を作製することで、他の動物種との染色体の相同性を比較する方法が有効であると考えた。この手法は、わずかな組織片から得た培養細胞から FISH マッピング用の染色体標本作製するため、家系を作出する必要がない。しかし、肺魚亜綱やシーラカンス亜綱、軟骨魚類、無顎類における網羅的な染色体マッピングの報告は皆無であり、効率よく FISH マッピングを行うための実験手技はいまだ確立されていない。しかし、申請者はこれまでに、真骨魚類や分岐鱗類魚類、両生類において、わずかな組織片から得た培養細胞を用いて良好な染色体標本作製し、FISH マッピングを行う実験系を構築してきた (Uno et al. 2012 PLOS ONE 他)。この手法を肺魚亜綱や軟骨魚類、無顎類に応用することによって、効率よく良好な染色体標本作製し、大量の DNA クローンをを用いた網羅的な FISH マッピングが可能となると考えられる。

### 2. 研究の目的

真骨魚類や四肢動物のモデル動物における全ゲノム配列の解読および比較ゲノム解析によって、脊椎動物におけるゲノム・染色体構造の進化過程が明らかになりつつある。しかしより正確な進化のシナリオを描くためには、系統的に魚類と四肢動物の間に位置する肺魚亜綱、そして真骨魚類や四肢動物より先に分岐した軟骨魚類と無顎類のゲノム・染色体情報が必要である。そこで本研究では、肺魚亜綱のアフリカハイギョ (*Protopterus annectens*) と、軟骨魚類のイヌザメ (*Chiloscyllium punctatum*)、無顎類のヌタウナギ (*Eptatretus burgeri*) を対象として染色体地図を作製し、他の脊椎動物種のゲノム情報や染色体地図と比較することで、四肢動物がもつ多数のマイクロ染色体の起源を含めた、脊椎動物 5 億年における染色体・ゲノム進化の過程を検証する。

### 3. 研究の方法

#### 1. 染色体地図の作製

研究代表者が確立した魚類や両生類における培養細胞を用いた染色体標本作製法 (Uno et al. 2013 Cytogenetic Genome Res) にしたがって、アフリカハイギョやイヌザメ、ヌタウナギの全胚もしくは成体のヒレや腎臓、心臓から細胞培養を行い、複製 R-分染染色体標本作製する。そして FISH マッピングにより、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. イヌザメのマイクロ染色体特異的 DNA プローブの作製

イヌザメは、爬虫類や鳥類、他のすでに報告されているサメと同様に、微小で識別不可能なマイクロ染色体を多数もつことが予想される。そこで、マイクロディセクション法を用いてそれぞれのマイクロ染色体を採取し、得られたゲノム DNA をテンプレートとして DOP-PCR で増幅し、マイクロ染色体特異的な DNA ペインティングプローブを作製する。そして染色体特異的 DNA ペインティングプローブを用いたマルチカラー FISH 解析によって、マイクロ染色体の識別を行う。

#### (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

(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、ならびに研究代表者が報告した両生類（ネツタイツメガエル、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。イヌザメは、爬虫類や鳥類と同様に多数のマイクロ染色体をもつと予想されるが、ハイギョやヌタウナギはマイクロ染色体をもたない。それを加味しながら、それぞれの系統におけるマイ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

これまで研究代表者が確立した魚類や両生類における培養細胞を用いた染色体標本作製法を応用することで、軟骨魚類のイヌザメの全胚から線維芽細胞を、もしくは成体から採取した血液からリンパ球細胞を培養して得られた染色体標本作製し、ギムザ染色やC-分染、複製 R-分染などの核型解析を行った。その結果、軟骨魚類における細胞培養法や染色体標本の作製法の最適化に成功し、この種における核型を明らかにした。研究計画当初は、これまで核型報告されている軟骨魚類と同様に、イヌザメでも多数のマイクロ染色体を含む 60-70 本の染色体を保持していると想定していた。しかし、この種の核型はマイクロ染色体を含まない非常に多くの染色体 ( $2n=106$ ) から構成されていることが明らかになった。これは、これまで核型が報告されている軟骨魚類の中で最も染色体数の多い報告である。

イヌザメにおけるマイクロ染色体消失過程を明らかにするため、イヌザメと同じテンジクザメ目に属する複数種のサメ（テンジクザメ、ジンベエザメ、トラフザメ）についても、同様の手法を用いて染色体解析に用いるためにこれらの種において培養細胞を樹立した（図 1）。そもそも軟骨魚類種の培養細胞樹立の報告例はほとんどなく、本研究結果は軟骨魚類の *in vitro* 実験系の立ち上げを可能にしたと言っても過言ではない。特に、ジンベエザメの培養細胞樹立は世界初である。そしてこれらの種における核型解析の結果、これらの種もイヌザメと同様に 100 本を超える染色体を保持してしていた。しかし一部の種はマイクロ染色体をもたないイヌザメと異なり、多くの軟骨魚類種と同様に多数のマイクロ染色体をもつことが明らかになった。これらの結果から、軟骨魚類の共通祖先は、多くの軟骨魚類種と同様に多数のマイクロ染色体を含む 80 本程度の染色体から構成された核型を保持していたが、テンジクザメ目の共通祖先で独自に起きた染色体の分離により染色体数が増えた結果 100 本程度となり、さらにイヌザメなどの一部の種のみでは染色体融合や分離を伴う大規模な染色体再配列が生じた結果マイクロ染色体が消失したことが示唆された。また、これらのサメの染色体標本を用いた FISH マッピングの実験系を立ち上げることに成功した（図 2 右）。

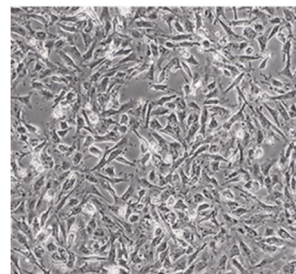


図 1 イヌザメから樹立した線維芽細胞

また、これら 4 種のうち、テンジクザメとイヌザメ 2 種の雄個体のみで最も小さい 1 本のマイクロ染色体が観察され、この染色体が Y 染色体である可能性が示唆された（図 2 左）。これを立証するため、雄雌 3 個体以上での核型解析を行った。その結果、この小型マイクロ染色体は 2 種ともに雌個体では観察されない一方、すべての雄個体では観察された。さらに、マイクロディセクションによりイヌザメの小型マイクロ染色体特異的 DNA を単離し、FISH による染色体マッピングを行った。その結果、作製したほとんどの DNA プローブでは小型マイクロ染色体のみに FISH シグナルが検出され、一部の DNA プローブではそれぞれ 1 本の小型マイクロ染色体と中型の染色体短腕にシグナルが観察された。後者の DNA プローブでは雌個体でも 2 本の中型染色体にシグナルが観察されたことから、この小型マイクロ染色体はテンジクザメやイヌザメでは Y 染色体であり、この 2 種は哺乳類と同様に XX/XY 性染色体を持つことが明らかになった。哺乳類のほとんどの種やメダカなど真骨魚類の多くの種も XX/XY 性染色体をもつが、後者の Y 染色体は矮小化しておらず X 染色体と DNA 配列も非常に類似している。しかし今回のサメ 2 種では哺乳類と同様に、X 染色体と比較して Y 染色体の大きさが非常に小さいことから、哺乳類の X 染色体と同様に遺伝子量補償機構がこのサメ 2 種でも働いている可能性が示唆された。

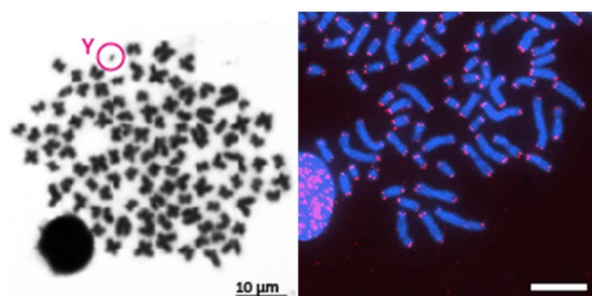


図 2 イヌザメの核型(左)とテンジクザメのテロメア FISH(右)  
左図:マゼンタは Y 染色体を示す, 右図:テロメア配列(TTAGGG)<sub>n</sub> の FISH シグナルを赤で示す, 両方ともスケールバーは 10µm.

脊椎動物において、真骨魚類や哺乳類などの多くの種で性染色体研究の知見が得られているが、それらより系統的に外側に位置する軟骨魚類を明らかにすることで、脊椎動物の性染色体進化を包括的に明らかにできる。しかしながら、改め軟骨魚類種において性染色体が同定された種は 10 種程度しかなく、他の脊椎動物群と比較して非常に少ないことが明ら

かになった。そんな中、本研究によりテンジクザメとイヌザメの性染色体 2 種の同定に成功した。今後はこの 2 種の性染色体の塩基配列や連鎖遺伝子の発現解析などを行うことで、脊椎動物の染色体進化をより深く理解することができるようになると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshinobu Uno, Ryo Nozu, Itsuki Kiyatake, Nobuyuki Higashiguchi, Shuji Sodeyama, Kiyomi Murakumo, Keiichi Sato, Shigehiro Kuraku	4. 巻 3
2. 論文標題 Cell culture-based karyotyping of orectolobiform sharks for chromosome-scale genome analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01373-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshinobu Uno	4. 巻 24
2. 論文標題 Inference of evolution of vertebrate genomes and chromosomes from genomic and cytogenetic analyses using amphibians	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chromosome Science	6. 最初と最後の頁 3-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11352/scr.24.3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宇野 好宣
2. 発表標題 全ゲノム解読における染色体解析の位置づけ:両生類や軟骨魚類から脊椎動物のゲノム・染色体進化をさぐる
3. 学会等名 日本遺伝子学会第92回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇野 好宣、山口 和晃、中村 將、工樂 樹洋
2. 発表標題 軟骨魚類における性決定機構解明の試み
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------