

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：32641

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K19327

研究課題名(和文)後生動物で異質倍数化は如何にして起こるか? : その実証に向けて

研究課題名(英文)How might allotetraploidization occur in the metazoan? A challenge to make it happen.

研究代表者

平良 眞規(Taira, Masanori)

中央大学・理工学部・共同研究員

研究者番号：60150083

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,600,000円

研究成果の概要(和文): 進化の原動力の一つである異質倍数体化の過程を実験的に再現させることで、自然界で異質倍数体化が如何に起こったかを探るのが本研究の目的である。異質倍数体化の始まりは異種間交雑なので、雑種オスの精子形成過程について、ツメガエルの*X. borealis*と*Xenopus laevis*間の雑種(Xb-XI雑種)を用いて形態学的観察を行った。まずXb-XI雑種では成熟精子数の顕著な減少を認めた。しかし複糸期や円形精細胞期には顕著な異常が認められなかったがさらに詳細な解析が必要である。Xb-XI雑種の異質倍数体化を試みた結果、受精卵を低温処理する事で異質倍数体を得た。これらを基礎に今後の展開が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異質倍数体化が進化の原動力の一つと考えられているが、それがどのように起きたかは推測の域を出ない。2016年、私を含む大勢の研究者により異質四倍体のアフリカツメガエル*Xenopus laevis*のゲノムが解読され、異質倍数体のゲノム構造とその進化についての議論が可能になった。そこで異質倍数体化の過程を実験的に再現できれば、自然界で異質倍数体化が如何に起こり、それにより異質倍数体ゲノムがどのように進化したのかを探ることが可能となる。本研究ではその基礎を確立しようとしたものであり学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文): Allopolyploidization is postulated to be one of the driving forces of evolution.

The purpose of this study is to investigate how allopolyploidization occurred in nature by experimentally reproducing its process. Since allopolyploidization begins with interspecific hybridization, morphological examinations of the spermatogenesis in hybrid males were carried out using a hybrid between the clawed frogs *Xenopus borealis* and *X. laevis* (Xb-XI hybrid). First, a marked decrease in the number of mature spermatozoa was observed, but diplotene spermatocytes and round spermatids were not largely affected in the Xb-XI hybrid. Using cold-shock treatment of fertilized Xb-XI eggs, allopolyploid and aneuploid frogs were obtained. Based on these results, future progress is expected.

研究分野：進化発生生物学

キーワード：異質倍数体 アフリカツメガエル キタアフリカツメガエル 種間雑種 精子形成 減数分裂 非減数精子 異質倍数体化

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全ゲノム重複 (WGD) は遺伝子数を倍増させて遺伝子の多様性をもたらす基礎となるため進化の原動力の 1 つとされている。例えば、脊椎動物の祖先種では 2 回の WGD が起きたことで多様性が格段に増したと考えられる。WGD には同質倍数体化と異質倍数体化がある。同質倍数体化とは、同一種内でのゲノムの重複であるが、異質倍数体化は、2 つの近縁種、種 1 と種 2 の異なるゲノム AA と BB が交雑により AB の子孫をつくり、その後に重複して AABB となることである。従って異質倍数体は異なる祖先種に由来する 2 種類のゲノムをもつことになり、それらをサブゲノムと呼ぶ。通常、雑種 AB は種 1 と種 2 の染色体の違いなどで減数分裂が正常に進行せず不稔となるが、WGD により AABB となることで減数分裂ができるようになり稔性をもち子孫を残せる。つまり異質倍数体化によって同一ゲノムを持つ交配可能な集団、すなわち新たな種が形成されることになる。雑種形成後の WGD の機構として 3 つの可能性が想定される。〔可能性 1〕雑種成体において、減数分裂異常により減数分裂していない非減数卵 AB が生じ、それに精子 A が受精し異質三倍体となり (AAB) さらにその非減数卵 AAB に精子 B が受精する;〔可能性 2〕雑種成体からの非減数卵 AB と非減数精子 AB が受精する;〔可能性 3〕雑種受精卵 AB の 1 回目の卵割の時に DNA 複製のみが行われて AABB となり、その後正常発生する。これら 3 つの可能性のうち、可能性 1 は実験的に示されているが、これが起こり得る確率は、三倍体の形成確率と生存率および四倍体の形成確率と生存率の積になるため自然界でどの程度この現象が起こり得たかは検討の余地がある。一方、可能性 2 と可能性 3 は一段階で進行するため、自然界で起こる可能性は少なからずありそうであるが、これまでほとんど解析されてこなかった。可能性 2 に関しては非減数卵の存在は既に報告されているので (Kobel and Du Pasquier, 1975) 本研究では *Xenopus* 属のカエルを用い、未解析の非減数精子形成の実証を目指し、次いで非減数卵と非減数精子の受精を試みる。可能性 3 を検証するためには、交雑した受精卵に加圧/低温ショック法を応用して、異質倍数体化を試みる。これらの解析により、自然界における異質倍数体化のメカニズムを考える上での実験的根拠を与えるのが本研究課題の目的である。

### 2. 研究の目的

当初の計画の 2 項目 (1) と (2) に加え、新たな目的として (3) 雑種個体の遺伝子発現解析に向けての RNA-seq データの取得を行った。以下、雑種の表記法として、メス *X. laevis* とオス *X. borealis* を掛け合わせて得たものは XI-Xb 雑種、メスとオスを入れ替えたものは Xb-XI 雑種と表記し、オスメスを問わない時は XI/Xb 雑種と表記した。

1) XI/Xb 雑種における精子形成過程の形態学的解析: 既に作成していた Xb-XI 雑種成体の精巢の切片観察による精子形成過程の解析を行った。コントロールとして *X. laevis* とホルモン処理と無処理の *X. borealis* のオス個体を用いた。

2) Xb-XI および XI-Xb 雑種個体の作成と異質倍数体化: ゲノム情報が整っている *X. laevis* と、ゲノム解析が進行中の *X. borealis* を用いて XI/Xb 雑種個体を解析することで、雑種個体および雑種倍数化個体における遺伝子発現変化を網羅的に解析可能となる。しかし *X. laevis* と *X. borealis* の雑種個体からの異質倍数化の試みは未だ報告されていないので、その実験系の確立を目指した。

3) Xb/XI 雑種個体および異質倍数体における遺伝子発現変化の解析に向けて。Xb/XI 雑種との比較対象となる一方の親種の *X. laevis* の RNA-seq データは既にあるが (Session et al., 2016) 他方の親種 *X. borealis* は未だない。そこで *X. borealis* B 系統の成体を用いて RNA-seq データを得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

1) 精巢の切片作成とヘマトキシリン・エオシン染色。 *X. laevis* 成体、*X. borealis* 成体、Xb-XI 雑種成体から抽出した精巢をプアン液で固定し、パラフィン包埋して 6  $\mu$ m の連続切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行った。必要に応じて精細管の輪郭を識別するため、コラーゲン結合組織を染めるアニリン青染色も行った。切片観察は正立光学顕微鏡を用いデジタルカメラで画像を取得した。少なくとも各グループ 3 個体ずつを用い、各個体の精巢から得た連続切片の隣り合わない 3 切片の顕微鏡写真の画像を用いて、精子形成過程を観察した。減数分裂過程の各ステージの同定は、*X. laevis* に関する記載の Kalt (1987) を参考にした。

2) XI/Xb 雑種と異質倍数体化。 *X. laevis* 近交系の J 系統と *X. borealis* 近交系の B 系統を用いた。 *X. borealis* のオスとメスはホルモン刺激により卵子形成と精子形成を増強させた。交

配は人工授精により行った。異質倍数化は、雑種受精卵の低温処理により DNA 複製後の第一卵割を阻害する方法を用いた。倍数性の確認は尾芽胚後期で尾を切断して生じる再生芽での分裂像を観察した。

3) *X. borealis* の成体の各種組織の RNA-seq 解析と多型解析。 *X. borealis* B 系統より、各種器官より組織を摘出し、常法に従い全 RNA 抽出と RNA-seq データの取得を行った。読み取った塩基配列を *X. borealis* のドラフトゲノム配列 (UC Berkeley の Dan Rokhsar 博士より未発表データを取得) に当て、遺伝子モデルごとに TPM (transcripts per million) 値を得た。*X. borealis* の A 系統と B 系統よりゲノム DNA を抽出し、次世代ゲノムシーケンサーで部分塩基配列を決定し、ドラフトゲノム配列と間の多型を元に *X. borealis* の A 系統と B 系統のホモ接合度を解析した。

#### 4. 研究成果

##### 1) Xb-XI 雑種における精子形成過程の形態学的解析

既に作成されている Xb-XI 雑種成体から精巣を摘出して重さを測定したのち、切片観察で精子形成過程を解析した。Xb-XI 雑種の精巣の大きさは、*X. laevis* の精巣と比べて小さく、また精子の数も非常に少ないことが示された。*X. borealis* は *X. laevis* と異なり、受精に用いるときはオスにも性腺刺激ホルモンを注入するので、Xb-XI 雑種の精巣が *X. borealis* と同様であることを考性腺刺激ホルモン処理を行ったところ精巣の大きさは大きくなり、精細管の直径も顕著に拡大した。しかし精細管の中央は空洞で精子数は非常に少ないままであり、ホルモン処理した *X. borealis* よりも顕著に少なかった (図 1)。このことは Xb-XI 雑種の精巣では減数分裂異常がどこかの段階で起きることで精子形成が抑制されていると考えられた。

そこで親種の *X. laevis* と、性腺刺激ホルモンを注入した *X. borealis* の精巣における精子形成過程について、一次精母細胞から成熟精子の形成までの細胞の形態変化を観察した。1 つの精原細胞は細胞分裂を繰り返して一次精母細胞の合胞体を形成する。一次精母細胞は DNA 複製を行ってから第一減数分裂期に入るがその過程は、細糸期 (L) 接合期 (Z) 太糸期 (P) 複糸期 (D) 移動期 (Dk) 分裂期中期 (MI) 分裂期後期 (AI) 分裂期終期 (TI) に分けられる。第一減数分裂が終了すると二次精母細胞となり、第二減数分裂の前期 (PII) 分裂期中期 (MII) 分裂期後期 (AII) 分裂期終期 (TII) を経て、円形精細胞 (RS) となる。RS は精子成熟過程へと進み成熟精子となる。精巣のパラフィン切片をヘマトキシリン・エオシンで染色し、対物レンズ 2x~100x を用いて写真撮影を行い精子形成の各ステージを観察した。

減数分裂のチェックポイントとして知られているのは、どの生物でも共通な太糸期チェックポイント (pachytene checkpoint) である (Li et al., 2009)。太糸期 (P) の時期は非常に長く一次精母細胞の多くを占めるので、また接合糸期 (Z) との形態学的境界が明瞭でないため、その数を計測し比較するのは容易でないと予想された。そこで、もし太糸期チェックポイントで異常となりアポトーシスで除去されれば複糸期 (D) の細胞数は顕著に減少するはずである。また複糸期 (D) の期間は相対的に短いため、細胞の比率が小さくため数え易く、形態学的にも 18 個の二価染色体 (*X. laevis* と *X. borealis* は  $2n=36$ ) が特徴的な粒状の形状となるため容易に同定できる。一方で、複糸期の期間が短い故に、複糸期 (D) の細胞を含む合胞体には、太糸期 (P) も一緒に含むものと、第一減数分裂期の細胞も含むものとに分かれるため、両者ともに複糸期 (D) の細胞を含む合胞体としてまとめて計測した。計測の結果、Xb-XI 雑種の複糸期 (D) の細胞を含む合胞体の数および合胞体内での精母細胞数には、*X. laevis* と *X. borealis* と比べて顕著な減少は認められなかった。Xb-XI 雑種の第二減数分裂像も両親種と同程度に観察されて、円形精細胞の合胞体の数と、その中の細胞数も同程度に観察されたので、精子数の劇的な減少は精子の成熟過程での異常によるものと考えている。

以上の結果は、Xb-XI 雑種でも相同染色体間の対合は正常に行われている可能性を示している。「1. 研究開始当初の背景」で述べた可能性 の非減数精子 AB が作られるためには、Xb と XI の両ゲノムを全て持つ  $2n$  精子が作られる必要がある。そのためには、第一減数分裂が起きずに次の第二次減数分裂が起きなければならないが、現時点ではそれを示唆する分裂像は見つかっていない。この可能性については別の解析方法が必要になると考えられる。

##### 2) XI/Xb 雑種個体の作成と異質倍数体化

*X. laevis* 卵と *X. borealis* 精子を受精させ、低温処理により DNA 複製後の第一卵割を阻害し全ゲノム倍数化を試みた。正常発生率にばらつきがあり実験を多数繰り返した。オタマジャクシまで発生した個体について尾を切断しその再生芽の細胞分裂像を観察した結果、多くは二倍体が異数体、あるいはキメラ体であったが、これまでに 1 匹に倍数化した染色体像が認められた。例数がまだ 1 であるが倍数化の可能性を示せた点で重要な一歩である。今後は *X. borealis* 卵と *X. laevis* 精子による受精や、低温処理による条件を種々検討して効率良く倍数化できる条件を探し出す必要がある。

##### 3) Xb/XI 雑種個体および異質倍数体における遺伝子発現変化の解析に向けて

*X. borealis* B系統の卵巣、肝臓、脾臓、腎臓、脳、脂肪組織より RNA を抽出し、RNA-seq データを得た。今後さらに他の臓器や組織のデータを取得し、*X. laevis* と同程度のデータセットを構築し、安定的に異質倍数体が得て遺伝子発現解析に用いることが可能になった時に備える必要がある

*X. borealis* には国内で 2 つの近交系 A と B が存在するが、RNA-seq に用いた B 系統は皮膚移植の短期拒絶をしなくなった系統でホモ接合度がより高いと予想された。これを確認するため、それぞれの系統から DNA を抽出しシーケンシングして、そのデータを Dan Rokhsar 博士から提供された別系統の *X. borealis* の全ゲノム配列に当て SNP を検出し、ホモ接合度を算出した。結果、A は 69.6%、B は 83.5% と予想通りであった。また、2 つの系統に違いがあることから、今後、系統間で交配して *borealis* の連鎖地図の作成も期待できる。

#### < 考察 >

本研究で、Xb-XI 雑種個体の精巣の切片観察により、成熟精子が極端に少なくなっていることが判明した。文献的には *X. laevis* と *X. muelleri* との雑種個体で大幅な精子数の減少が報告されている (Malone et al., 2007)。しかし *X. laevis*-*X. muelleri* 雑種についての精子形成過程の形態学的解析は行われていないのでどの段階での異常かは不明であるが、雑種オスの精子形成異常という点では *X. laevis* と *X. borealis* の雑種固有ということではなさそうである。しかし、少ない成熟精子の中には非減数精子が存在している可能性はまだ残されているので、精子形成異常のメカニズムを解析するとともに、この点についてもさらに明らかにしたいと考えている。これまで両生類の精子形成過程の切片観察の文献は非常に少なく、知る限りにおいて、*Xenopus* 属では、Kalt (1976) による *X. laevis* のみであった。この点でも今回の形態学的解析は価値あるものと考えている。

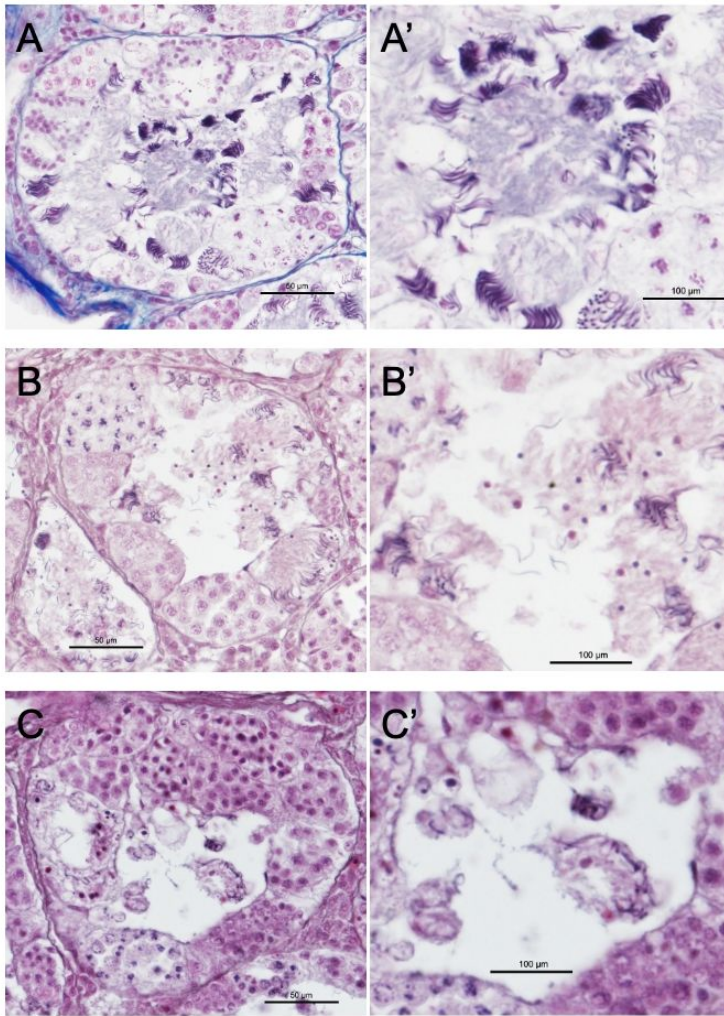
#### < 引用文献 >

- Kalt, M.R., 1976. Morphology and kinetics of spermatogenesis in *Xenopus laevis*. J. Exp. Zool. 195, 393-407.
- Kobel, H.R., Du Pasquier, L., 1975. Production of large clones of histocompatible, fully identical clawed toads (*Xenopus*). Immunogenetics 2, 87-91.
- Li, X.C., Barringer, B.C., Barbash, D.A., 2009. The pachytene checkpoint and its relationship to evolutionary patterns of polyploidization and hybrid sterility. Heredity 102, 24-30.
- Malone, J.H., Chrzanowski, T.H., Michalak, P., 2007. Sterility and gene expression in hybrid males of *Xenopus laevis* and *X. muelleri*. PLoS One 2, e781.

#### < 図の説明 >

図1 *Xenopus laevis*, *X. borealis*, Xb-XI 雑種の精巣の切片観察による形態学的比較。  
(A) *X. laevis*, (B) *X. borealis*, (C) Xb-XI 雑種。それぞれの画像の中央の拡大図を (A'), (B'), (C') に載せた。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  (A, B, C), 100  $\mu\text{m}$  (A', B', C')。 *X. laevis* では精細管の中央あるいは周辺の一部に成熟精子の鞭毛が十数本から数十本の束になって多数存在し、精細管の中央に空洞はあまり見られない。 *X. borealis* も同様に精細管の中央と周辺の一部 (写真の上部) に鞭毛が十数本の束になって存在するが、中央に空洞が見られ *X. laevis* より少なめである。なお *X. borealis* の核や鞭毛のヘマトキシリンの染色性が *X. laevis* に比べて弱いため、 *X. laevis* と比べて実際より少なめの印象を与えている。 Xb-XI 雑種では、精細管の太さや、精細管の周辺に精母細胞が密に多数存在している点では *X. laevis* と *X. borealis* とあまり違いが見られないが、中央に空洞があり、そこに成熟精子の鞭毛の束が僅か存在する程度である。

图 1



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mii, Y., Nakazato, K., Pack, C. G., Sako, Y., Mochizuki, A., Taira, M. and Takada, S	4. 巻 10
2. 論文標題 Quantitative analyses reveal extracellular dynamics of Wnt ligands in Xenopus embryos.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e55108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.55108	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0件

〔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
研究分担者	近藤 真理子 (Kondo Mariko) (70372414)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任研究員  (12601)	RNA-seq解析、ゲノム解析
研究分担者	原本 悦和 (Haramoto Yoshikazu) (30540869)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員  (82626)	Xb-XI雑種等のサンプル提供
研究分担者	荻野 肇 (Ogino Hajime) (10273856)	広島大学・両生類研究センター・教授  (15401)	異質倍数体化の実験の遂行
研究分担者	浅川 修一 (Asakawa Shuichi) (30231872)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授  (12601)	RNA-seq解析、ゲノム解析

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
---------	---------