

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770001
 研究課題名 (和文) ヘビにおける性染色体の分化過程の追跡および爬虫類における性決定遺伝子の探索
 研究課題名 (英文) Investigation for the process of sex chromosome differentiation in snakes and sex-determining genes in reptiles
 研究代表者
 松原 和純 (MATSUBARA Kazumi)
 北海道大学・大学院理学研究院・博士研究員
 研究者番号：90399113

研究成果の概要：ヘビにおける性染色体の分化過程を解明することを目的として、3 種のヘビ（インドニシキヘビ、シマヘビ、ハブ）において性染色体の構造比較を行った結果、インドニシキヘビの ZW 染色体は分化の初期状態を保持してきたことや、シマヘビとハブの共通祖先において W 染色体の矮小化が進んでいたことが示唆された。また、ヘビにおいて性分化関連遺伝子群の染色体上の位置を同定した結果、哺乳類において卵巣形成に関わるとされる β カテニン遺伝子が性染色体に位置することが明らかとなった。さらに、いくつかの性決定関連遺伝子の胎児期の性腺における発現パターンの雌雄差を調べた結果、産卵後 10 日以前に性分化が開始することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：性染色体、ヘビ、爬虫類、性決定遺伝子、進化

1. 研究開始当初の背景

性染色体は常染色体対に由来し、片方の染色体の退化と矮小化によって異型性の性染色体が生じたと考えられている (Ohno, 1967)。様々な動物種において性染色体が同定されているが、性染色体の分化過程やその分子レベルでの機構、種間での性染色体分化の仕組みの共通性や相違点は明らかと

なっていない。図 1 に羊膜動物の性決定様式を示す。哺乳類の性染色体は雄ヘテロ型の XX/XY 型であるのに対し、鳥類は雌ヘテロ型の ZZ/ZW 型の性染色体構成をもつ。ニワトリとヒトの比較染色体地図から、哺乳類の XY 染色体と鳥類の ZW 染色体は共通祖先の異なる常染色体に由来することが明らかとなっている (Nanda *et al.*, 1999)。

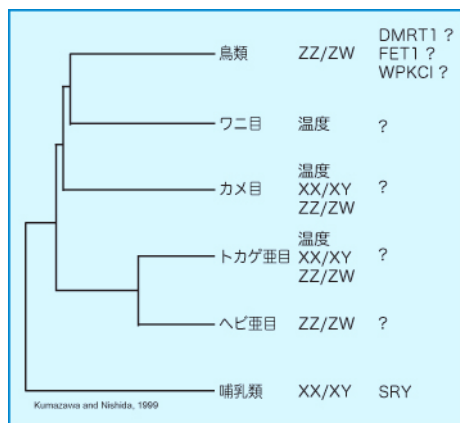


図1. 羊膜動物の系統関係と各分類群の性決定様式および性決定遺伝子

一方、爬虫類において、分類群を通じて性染色体と遺伝的な性決定様式の間には明確な関係がみられるのは、ZZ/ZW型の性染色体構成をもつヘビ亜目のみである。また、ヘビ種間でも性染色体の分化の程度に差が見られる(図2)。ボア科に属する種ではZW間で形態の違いがほとんど見られないのに対して、クサリヘビ科などの毒ヘビではWの矮小化とヘテロクロマチン化が進んでおり、ZW間で明瞭な形態の違いが見られる。ナミヘビ科に属する種では、それらの中間段階のZW間の分化が見られる。これらのことから、ヘビは常染色体から性染色体への分化過程やその機構について研究する上で非常に有用なモデル動物と言える。

我々は先行研究において、哺乳類—鳥類—ヘビ亜目の間における性染色体の起源を比較することを目的として、シマヘビ(*Elaphe quadrivirgata*)のESTクローンをを用い、FISH法によってシマヘビ染色体地図を作製した。109の遺伝子がマッピングされ、そのうち11がZ染色体にマップされた。これらの遺伝子の位置をシマヘビ—ヒト—ニワトリ間で比較した結果、シマヘビのZ染色体はヒトやニワトリの常染色体と相同性をもつことが判明し、ヘビ亜目の性染色体は、哺乳類や鳥類の性染色体とは共通祖先がもつ異なる常染色体に由来することが示唆された。また、ヘビにおける性染色体の分化過程を明らかにすることを目的として、シマヘビ(ナミヘビ科)のZ染色体にマッピングされた11のZ連鎖遺伝子について、インドニシキヘビ(*Python molurus*, ボア科)とハブ(*Trimeresurus flavoviridis*, クサリヘビ科)においても染色体マッピングを行った。Z連鎖遺伝子はインドニシキヘビにおいてはZ染色体だけでなくW染色体にもマッピングされた。シマヘビでは3つの遺伝子がZ染色体とW染色体にマッピングされ、それ以外の遺伝子はZ染色体のみにマッピングされた。一方、ハブでは全ての

の遺伝子がZ染色体のみにマッピングされた。これらのことから、インドニシキヘビのZW染色体は分化の初期状態を保持してきたと考えられた。そして、シマヘビとハブの系統に

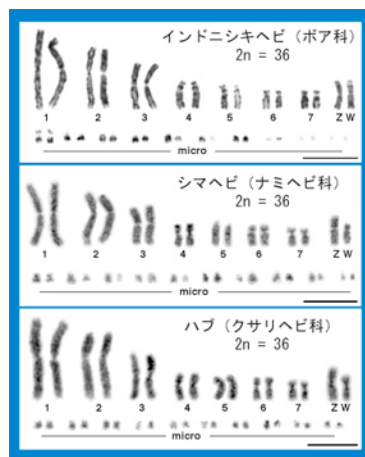


図2. ヘビ3種のG分染核型

においてW染色体の矮小化とヘテロクロマチン化が進んできたことが推定された(Matsubara *et al.*, 2006)。しかし、インドニシキヘビにおいてZW染色体の間で分化している領域はまだ同定できていない。また、シマヘビやハブのW染色体にはどのような領域(遺伝子)が残ってきたのか、ヘテロクロマチンはどのような配列で構成されているのかは不明である。

性決定遺伝子に着目すると(図1)、哺乳類においてY染色体上のSRYが雄性決定遺伝子として同定されている。鳥類ではZ染色体上のDMRT1、W染色体上のWPKCI、FET1が性決定の候補遺伝子として考えられているが、まだ確証は得られていない。爬虫類では多様な性決定様式がみられる。カメ目やトカゲ亜目の一部では性染色体の分化が観察されており、ワニ目では形態的に異なる性染色体は確認されていない。ワニ目、多くのカメ目、トカゲ亜目の一部は温度依存性の性決定様式をもつ。しかし、爬虫類において性決定遺伝子が特定された例は未だにない。性分化に関わる遺伝子群は哺乳類、鳥類、爬虫類の間で保存されているが、その発現パターンは大きく異なる(Crew, 2003)。このような多様な性決定様式や性腺分化の機構が羊膜動物の系統分化の過程でどのように進化してきたかは解明されていない。羊膜動物が共通祖先である原始爬虫類から系統分化してきたことも考慮して、モデル動物となる代表的な爬虫類動物種において性決定遺伝子の特定や性腺分化の分子機構の解明が望まれる。

[引用文献]

- Crew (2003) *Evo Dev*, 5: 50-55.
Matsubara *et al.* (2006) *PNAS*, 103: 18190-18195.
Ohno (1967) *Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes*.

2. 研究の目的

本申請課題はヘビにおける性染色体のより詳細な分化過程の追跡と、シマヘビとスッポン (*Pelodiscus sinensis*) における性決定遺伝子の探索を目的とする。スッポンは遺伝的に性が決定され、ZZ/ZW 型の性染色体をもつ (Kawai *et al.*, 2007)。

ヘビの性染色体分化に関しては、以下の研究を行う。3種のヘビ (インドニシキヘビ、シマヘビハブ) において cDNA クローンのマッピングによる性染色体の比較地図の作製や、comparative genomic hybridization (CGH) 法を行い、性染色体の分化過程を推定する。また、シマヘビとハブにおいて W 染色体のヘテロクロマチンを構成する反復配列をクローニングし、染色体上の分布パターンを調べることで、ヘビにおける W 染色体のヘテロクロマチン化の過程を推定する。

シマヘビ、スッポンにおける性決定遺伝子の探索に関しては、以下の研究を行う。degenerate PCR 法を用いて性分化関連遺伝子群のホモログをクローニングし、FISH 法により染色体マッピングする [性決定遺伝子の進化過程として、性腺分化のカスケードではたらく遺伝子が重複し、片方のコピーが新規の機能を獲得することで新たな性決定遺伝子に進化するという説が Scharl (2001) によって提唱されている]。シマヘビの卵を経日的に解剖し、性腺の組織切片を作製し、雌雄の分化時期を同定する。その時期に発現する遺伝子を雌雄間で比較することによって性決定の候補遺伝子を同定する。

[引用文献]

Scharl (2004) *Curr Opin Genet Dev*, 14: 634-641.

3. 研究の方法

(1) 細胞培養と染色体標本の作製

シマヘビとハブの生体組織から得られた線維芽細胞とインドニシキヘビの末梢血から得られたリンパ球細胞を培養し、染色体標本作製した。

(2) EST クローンの選抜

シマヘビの EST クローンの塩基配列情報に対して、NCBI データベースを用いて相同性検索を行い、ヒトやニワトリの機能遺伝子に高い相同性を示すクローンをそれらの遺伝子のヘビホモログとして選抜した。

(3) FISH 法を用いた機能遺伝子の染色体マッピング

選抜された EST クローンを FISH 法によってシマヘビの染色体標本にマッピングした。シマヘビの性染色体にマップされたクローンについてハブとインドニシキヘビの染色体標本にもマッピングを行った。

(4)ヘビ3種における comparative genomic

hybridization (CGH) 法による雌雄間での染色体上の分化領域の検出

雄ゲノム DNA を Alexa Fluor 488-5-dUTP で、雌ゲノム DNA を Texas Red-5-dUTP でラベリングし、それらを同時に雌の染色体にハイブリダイズさせた。ライカ社の DMRA 顕微鏡を用いて蛍光観察を行い、蛍光色素の強度差を測定することで、雌雄間で分化した染色体領域の検出を試みた。

(5)シマヘビとハブにおける W 染色体のヘテロクロマチンを構成する反復配列のクローニング

シマヘビ、ハブのゲノム DNA を様々な制限酵素により消化し、電気泳動を行った。エチプロで濃染されたバンドを切り出し、DNA を抽出・クローニングした。得られた反復配列 DNA クローンに対して、塩基配列の解読と染色体マッピングを行った。

(6)シマヘビの性分化時期の同定

シマヘビの受精卵を経日的に摘出・解剖し、胚をブアン液またはホルマリンで固定した。外部生殖器の観察や、性腺の組織切片を顕微鏡観察することによって、性分化の時期の同定を試みた。

(7)性染色体連鎖遺伝子のクローニングと染色体マッピング

シマヘビ、スッポンにおいて培養細胞や生体組織から RNA を抽出し、RT-PCR により cDNA を合成した。得られた cDNA から degenerate PCR 法を用いて性決定関連遺伝子群のホモログをクローニングし、FISH 法を用いてマッピングした。

(8)性腺の摘出および性腺分化時期に発現する遺伝子の雌雄差の検出

シマヘビにおいて性腺分化期にある雌雄のそれぞれの胚から性腺を摘出し、RNA を抽出し、RT-PCR により cDNA を合成した。性決定関連遺伝子群の発現パターンを雌雄間で比較した。

4. 研究成果

(1)ヘビの性染色体分化

シマヘビにおいて先行研究と合わせて188の遺伝子が FISH 法によってマッピングされ、そのうち Z 染色体へは 24 の遺伝子がマッピングされた。24 のうち 3 遺伝子が Z だけでなく W 染色体にもマッピングされた。Z 連鎖遺伝子についてインドニシキヘビとハブの染色体にもマッピングを行った結果、イ

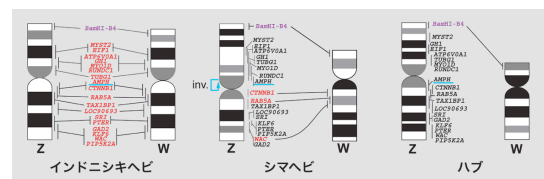


図3.ヘビ3種における性染色体の比較染色体地図

インドニシキヘビでは全ての遺伝子が Z だけでなく W 染色体にもマップされた。ハブでは全ての遺伝子が Z 染色体のみにマップされた (図 3)。

ヘビ 3 種において CGH 法を用いて雌雄間で分化している染色体領域の検出を試みた結果、インドニシキヘビにおいてはどちらかの性に特異的な染色体領域は観察されなかった。それに対して、シマヘビやハブの W 染色体上には雌特異的な配列の蓄積がみられた (図 4)。

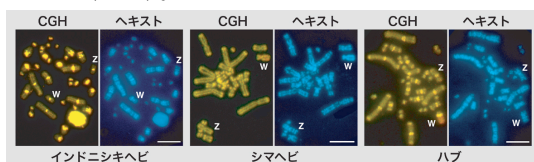


図 4. ヘビ 3 種における CGH パターンの比較

シマヘビにおいて W 染色体を構成する反復配列の 1 種が得られた。この DNA 配列に対して BLAST 検索を行った結果、レトロトランスポゾンに相同性を示した。この反復配列 DNA を FISH 法によってハブとパファダ (クサリヘビ科) の染色体にハイブリダイズさせたところ、これら 2 種の W 染色体にもシグナルが観察された (図 5)。これらの結果から、シマヘビとハブの共通祖先において既に W 染色体の矮小化や W 染色体上にレトロトランスポゾン様配列の蓄積が進んでいたと推定された。

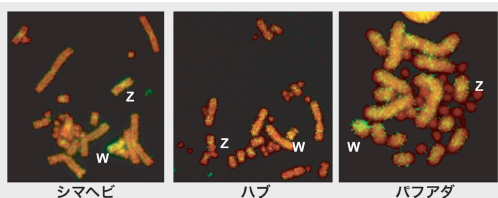


図 5. シマヘビから得られた W 染色体上の反復配列 DNA のヘビ 3 種における FISH マッピング

シマヘビにおいて先行研究と比較すると、新たに 14 の遺伝子が Z 染色体にマッピングされたが、それらは W 染色体へはマッピングされなかった。Z と W 染色体に共通してマッピングされている 3 つの遺伝子 (*CTNNB1*, *RAB5A*, *WAC*) のうち *CTNNB1* と *WAC* において W ホモログに特異的なイントロン配列が同定された。このことから、それらの遺伝子が位置する領域では既に Z と W 染色体間の組み換えが抑制されていることが示唆された。ハブと同様にシマヘビにおいても Z と W 染色体間の分化はほぼ全域に広がっていると予想された。

先述のように CGH 解析ではインドニシキヘビにおいてはどちらかの性に特異的な染色体領域は観察されなかった。インドニシ

キヘビの Z と W 染色体間での分化領域は、CGH の検出限界である 2 Mb 以下であると考えられる。また、先行研究と比較すると、性染色体にマッピングされた遺伝子の数は増えたが、インドニシキヘビの Z と W 染色体間で分化している領域は検出できなかった。今後は比較マッピングだけでなく対立遺伝子間の塩基配列を比較する必要がある。

(2) シマヘビ、スッポンにおける性決定遺伝子の探索

シマヘビやハブにおいて性分化関連遺伝子のクローニングを行った。これまでにクローニング、マッピングされた遺伝子を表 1 に示す。*CTNNB1* は EST クローンの網羅的マッピングの際にマッピングされた。*CTNNB1* 以外の遺伝子は全て常染色体にマッピングされたことから、これらの遺伝子はヘビにおける性決定の最上流遺伝子ではないことが示唆された。近年、哺乳類において *CTNNB1* は卵巣形成に働くことが報告されたことから (Maatouk *et al.*, 2008)、雌ヘテロ型の性染色体をもつヘビにおける性決定への関わりに興味もたれる。今後は、ZW の対立遺伝子間で構造の違いや性分化時期の発現パターンの違いなどを解析していく。

遺伝子名	クローンサイズ(kb)	ヘビ	染色体上の位置	
			ヒト	ニワトリ
<i>DMRT1</i>	1.2	2p	9p24.3	Z
<i>SOX9</i>	1.4	2q	17q24.3-q25.1	18
<i>WT1</i>	2.8	1q	11p13	5
<i>CBX2 (M33)</i>	1.4	2q	17q25.3	18
<i>WNT4</i>	0.8	micro	1p36.23-p35.1	21
<i>CTNNB1 (β-catenin)</i>	2.6	Z, W	3p21	2
<i>FOXL2</i>	0.3	N.D.	3q23	9
<i>CYP19A1 (aromatase)</i>	1.2	micro	15q21.1	10
<i>NRSF1 (SF-1/Ad4BP)</i>	0.5	micro	9q33	17
<i>ESR1</i>	1.9	1p	6q25.1	3
<i>AR</i>	1.2	micro	Xq11.2-q12	4

表 1. ヘビにおける性分化関連遺伝子の染色体上の位置

2007 年度にシマヘビ雌 4 個体から計 48 の受精卵を得て、経日的に解剖し、胚発生を監察した結果、25°C 保温時において発生の進む速さに個体差はあまり観られなかった。また、性腺の組織切片を監察した結果、雌雄間での性腺の形態的な分化は遅くとも産卵後 17 日までに開始することが明らかと

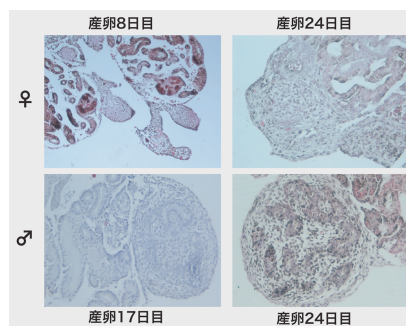


図 6. シマヘビ胎児の性腺の組織切片

なった (図 6)。2008 年度にシマヘビ雌 2 個体からそれぞれ 9 個の受精卵を得た。2 個体から得られた受精卵を産卵後 10 日目と 15 日目に解剖し、外部生殖器や性腺の形態を監察した結果、10 日目の胚では雌雄差が見られなかったのに対して、15 日目では雌雄差が見られた (図 7)。

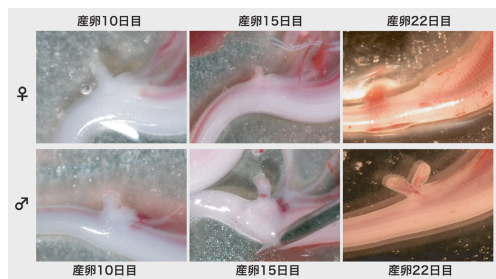


図 7. シマヘビ胎児の外部生殖器 (半陰茎)

RT-PCR 法によって産卵後 10 日目と 15 日目の胚の生殖腺における *DMRT1*、*SOX9*、*FOXL2*、*CYP19A1* の発現量の雌雄差を調べた結果、両日において *DMRT1* は雄で、*CYP19A1* は雌で強い発現が見られた。*SOX9* と *FOXL2* については雌雄差が見られなかった (図 8)。これらの結果から、形態的な雌雄差が現れるのは産卵後 10 日目以降であるのに対して、遺伝子発現の雌雄差は産卵後 10 日目において既に顕著であった。

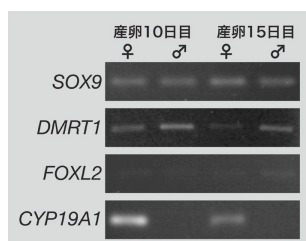


図 8. シマヘビ胎児の性腺における性分化関連遺伝子の RT-PCR

遺伝子発現レベルでの性分化は産卵後 10 日目以前から起きていることが示唆されたことから、今後は、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いて、産卵後 10 日目より前の性腺において遺伝子発現の雌雄差を網羅的に比較することによって性決定の上流に位置する遺伝子を探索していく。

スッポンにおいてクローニングされた性分化関連遺伝子は *CYP19A*、*WT1* であり、まだマッピングされていない。また、比較マッピングの結果から、スッポンの性染色体はニワトリのマイクロ染色体 (15 番)、シマヘビの一对のマイクロ染色体に相同であることが明らかとなったことから、ニワトリ、シマヘビ、スッポンの間で性染色体の起源は異なり、性決定遺伝子も異なることが予想された。

[引用文献]

Maatouk *et al.* (2008) *Hum Mol Genet*, 17: 2949-2955.

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 3 件)

① Kornsorn Srikulnath, Kazumi Matsubara, Yoshinobu Uno, Amara Thongpan, Saowanee Suputtitada, Somsak Apisitwanich, Yoichi Matsuda, Chizuko Nishida. Karyological characterization of the butterfly lizard (*Leiolepis reevesii rubritaeniata*, Agamidae, Squamata) by molecular cytogenetic approach. *Cytogenetics and Genome Research*, in press, 2009, 査読有り

② Taiki Kawagoshi, Chizuko Nishida, Yoshinobu Uno, Kazumi Matsubara, Yoichi Matsuda. The ZW micro-sex chromosomes of the Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*, Trionychidae, Testudines) have the same origin as chicken chromosome 15. *Cytogenetics and Genome Research*, in press, 2009, 査読有り

③ 松原和純、ヘビにおける性染色体の分化過程、*生物の科学 遺伝*、26-31、63、2009、査読無し

[学会発表] (計 6 件)

① 松原和純、cDNA マッピングと GC3 含量にもとづくヘビゲノムにおけるモザイク構造の推定、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会・合同年会、2008 年 12 月 9 日、神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル

② Kazumi Matsubara. Karyotypic evolution in snakes. The 3rd Asian Chromosome Colloquium 2008, 2008 年 12 月 2 日、大阪大学コンベンションセンター

③ Kazumi Matsubara. Delineation of the sex chromosome differentiation in snakes. International Symposium for Gonad and Brain Sex Differentiation, 2008 年 9 月 14 日、福岡・JAL リゾートシーホークホテル

④ 松原和純、ヘビ類-鳥類-哺乳類間における性染色体の起源の比較とヘビ類における性染色体の分化過程の追跡、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会・合同年会、2007 年 12 月 11 日、パシフィコ横浜

⑤ 松原和純、ヘビにおける性染色体の起源と分化過程の追跡、*日本爬虫両棲類学会*

第 46 回大会、2007 年 11 月 18 日、琉球
大学

⑥ Kazumi Matsubara. Comparison of the
origin of sex chromosomes in snakes,
birds and mammals, and delineation of
the process of sex chromosome
differentiation in snakes. 16th
International Chromosome Conference,
2007 年 8 月 26 日～28 日、オランダ・ア
ムステルダム

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 和純 (MATSUBARA Kazumi)

北海道大学・大学院理学研究院・博士研
究員

研究者番号：90399113

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし