

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月6日現在

機関番号：32607  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23657159  
 研究課題名（和文）非コード型エクソンの生成・縮退から脊索動物の形態形成システム進化を捉える  
 研究課題名（英文）System evolution in chordate morphogenesis in view of gene evolution of noncoding exons  
 研究代表者  
 伊藤 道彦 (ITO MICHIIKO)  
 北里大学・理学部・准教授  
 研究者番号：90240994

研究成果の概要（和文）：本研究では、脊索動物の形態形成進化と非コード型エクソン1の生成・縮退との関連性を調べる事を目的として、精巣形成関与遺伝子 *Dmrt1* の解析を行った。その結果、*Dmrt1* の非コード型エクソン1は初期の脊椎動物進化過程で誕生し、魚類や両生類の精巣形成においては、その上流とイントロン1内の計2つの領域が *Dmrt1* のプロモーターとして機能分担することが示唆された。しかし、その後の進化過程で、このエクソンの縮退が起り、プロモーター機能が統合あるいは変化した可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：To understand how emergence and degeneration of noncoding exon 1 is involved in morphological evolution in chordates, a testis formation-related gene *Dmrt1* was analyzed using several chordate species. The results indicated that *Dmrt1*'s noncoding exon 1 might have emerged during vertebrate evolution, which could give the gene two types of promoters, contributing to divergence of expression patterns. However, it might have degenerated because of changes of DMRT1 functions in testis formation and maintenance during amniote evolution.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：遺伝子進化学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：脊椎動物、選択的プロモーター、エクソン、遺伝子進化、退化、精巣形成、生殖細胞

## 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物においては、1つの遺伝子が、その個体における様々な生命現象に関わるために、その遺伝子に2つ以上のプロモーターがある場合が知られている。この選択的プロモーターを可能にする分子機構に、非コード型エクソン1によるプロモーターの多様化がある。ところで、多細胞生物の進化過程においては、環境に適応するために組織の創成

あるいは複雑化が起ったと考えることができる。しかし、このボディープラン進化と遺伝子進化の共進化機構は、いまだ未解明点が極めて多い。遺伝子重複後の機能分化 (subfunctionalization) や新機能付加 (neofunctionalization) 型遺伝子が、このボディープラン進化に関与することは容易に想像できるが、プロモーター創出・変化との関連に関しては、報告がほとんどない。すなわち、形態形成遺伝子に関して、プロモータ

一創成による形成システム進化に関する知見は乏しい。

研究代表者らは、これまでに、精巣形成か、卵巣形成かを決定する性決定遺伝子を、両生類アフリカツメガエルから、同定し、解析を行ってきた。この性決定遺伝子 (*Dm-W* は命名) は、精巣の形成や維持に重要な機能を有すると考えられる *Dmrt1* という遺伝子の重複によって誕生した遺伝子で、真骨魚メダカの性決定遺伝子 *Dmy* も同様にそのパラログとして種分化過程で誕生した。さらに、研究代表者らは、これらの祖先遺伝子である *Dmrt1* のプロモーターの解析を行う過程で、ツメガエルでは、非コード型エクソン1が存在するのに対し、哺乳類では、データベース上、このエクソンが縮退した可能性を見出した。

本研究は、*Dmrt1* のプロモーターの増減に関わる非コード型エクソン1の生成・縮退が、脊椎動物の精巣形成システムと連関があるのではないかと、という着想からスタートしたものである。

## 2. 研究の目的

本研究は、脊椎動物の進化過程において、非コード型エクソン1の生成・縮退と形態形成進化の連関性を調べることで、すなわち、【非コード型エクソンの生成・縮退は、組織(形態)形成システムの進化・退化と共進化してきた】という進化仮説の検証を目的として、精巣形成に関与する遺伝子 *Dmrt1* の解析を行った。

## 3. 研究の方法

以下の方法により、解析を進めた。

- (1) 脊椎動物各種で *Dmrt1* オルソログの転写開始点の同定を行い、非コード型エクソン1の有無を検討する。
- (2) 両生類アフリカツメガエルの生殖巣形成過程において、*Dmrt1* の非コード型エクソン1を介した転写、および、非コード型エクソン1を介さない(イントロン1部をプロモーターとした)転写の発現解析を行う。
- (3) 脊椎動物各種で *Dmrt1* オルソログ・パラログの遺伝子進化機構を解析する。
- (4) 上記(1)~(3)の結果から、【*Dmrt1* 遺伝子の非コード型エクソンの生成・縮退は、組織(形態)形成システムの進化・退化と共進化してきた】という進化仮説の考察を行う。

## 4. 研究成果

- (1) 各種脊椎動物種の *Dmrt1* オルソログにおける非コード型エクソン1の分子進化  
哺乳類マウス、鳥類ニワトリ、両生類アフリカツメガエル、魚類メダカの各精巣から

RNA抽出し、5' cap を標的として5' RACE法でそれぞれ転写開始点を決定した。図1に、この結果と、現在までにわかっている *Dmrt1* ホモログのエクソン・イントロン情報をまとめて示す。

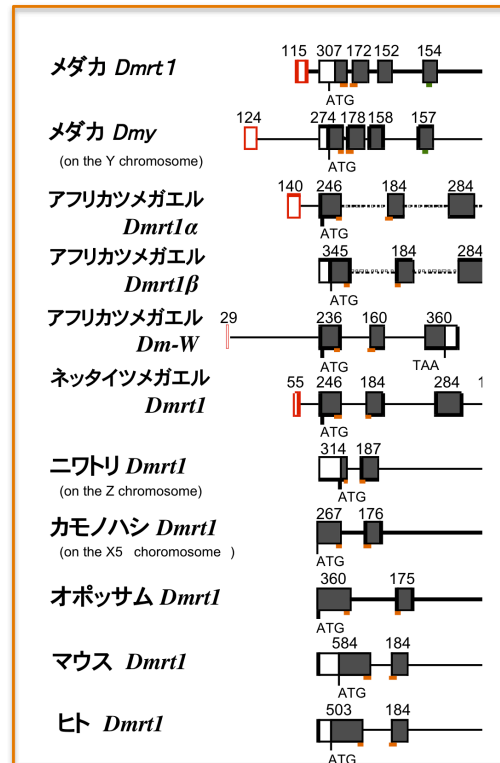


図1. 脊椎動物各種における *Dmrt1* オルソログおよびパラログの第一エクソン周辺の構造模式図

(白抜きbox: 非コードエクソン/黒塗りbox: コードエクソン/線: イントロン/ATG: 開始コドン用のATG)

非常に興味深いことに、両生類ネットイツメガエルと魚類メダカの *Dmrt1* オルソログ、および、そのパラログ(性決定遺伝子であるアフリカツメガエル *Dm-W*、メダカ *Dmy*) は、非コード型エクソン1を持つが、哺乳類マウスと鳥類ニワトリのオルソログは、このエクソンを持たないことが明らかになった。また、アフリカツメガエルに関しては、異質4倍体であるため、*Dmrt1* 遺伝子が  $\alpha$  と  $\beta$  の2つ存在するが、解析の結果、*Dmrt1*  $\alpha$  は非コード型エクソン1を持つのに対し、*Dmrt1*  $\beta$  は持たないこともわかった。

これらのことから、*Dmrt1* 遺伝子は、哺乳類、鳥類の祖先種、すなわち両生類以降の進化過程で、その非コード型エクソン1が縮退した可能性が考えられる。また、アフリカツメガエルでは、その種分化の過程で、*Dmrt1*  $\alpha$  が非コード型エクソン1依存の転写による機能を保持しているため、*Dmrt1*  $\beta$  の非コード型エクソン1は縮退したと想像できる。

- (2) アフリカツメガエル *Dmrt1*  $\alpha$  の選択的ブ

ロモーター

転写開始点の解析から、アフリカツメガエルの精巣で転写される *Dmrt1α* mRNA には、非コード型エクソン1領域が存在するものとは別に、イントロン1の一部が存在するものがあつた。すなわち、*Dmrt1α* は、非コード型エクソンの上流と、イントロン1内の2つのプロモーター (Promoter I, Promoter II と呼ぶ) を持つことが明らかになつた (図2参照)。

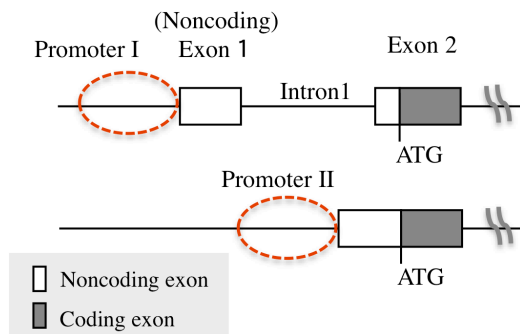


図2. アフリカツメガエル *Dmrt1α* 遺伝子の2つのプロモーター

2種プロモーター部が、どのように *Dmrt1* 遺伝子の転写制御に関わっているか (発現様式の分担に寄与しているか) を調べるために、それぞれの転写産物で互いに特異的な塩基配列を用いて、*in situ* hybridization を行つたが、プローブの長さが短く、それぞれ特異的な転写産物を検出することができなかつた。しかし、性決定後のいくつかの発生段階の雌雄生殖巣を用いたそれぞれの転写産物の RT-qPCR 解析、および、共通のコード領域を用いた *in situ* hybridization の解析等から、非コード型エクソン1を介した転写産物は生殖細胞に、このエクソン1を介さない転写産物は体細胞に発現している可能性が考えられた。すなわち、図2に示す Promoter I と Promoter II はそれぞれ、生殖細胞と体細胞での転写のためのプロモーターとして機能する可能性が示唆された。

また、魚類メダカの *Dmrt1* においても、同様の2種類の転写産物が精巣で検出しており、この細胞型特異的な選択的プロモーターによる転写制御は、魚類・両生類で共通の可能性も考えられた。

(3) 脊索動物における *Dmrt1* の起源およびその非コード型エクソン1の分子進化

脊索動物進化過程における *Dmrt1* 遺伝子の起源を調べるために、脊椎動物の祖先の脊索動物頭索類ナメクジウオのゲノムでオルソログの存在の有無を検討した。その結果、データベース上ではオルソログを見つけることができなかった。次に、原始的脊椎動物種

の無顎類ヤツメウナギ (スナヤツメ) の *Dmrt1* オルソログの存在を検討した。その結果、精巣で発現する *Dmrt1* 様の cDNA の単離に成功した。更に、対応するゲノム領域をクローニングし、配列の比較解析を行つたところ、この *Dmrt1* 様遺伝子は、非コード型エクソン1が存在することがわかつた。なお、近縁種のウミヤツメのゲノム情報においては、この遺伝子の周辺領域情報が断片化していること、および、スナヤツメではゲノム解析がなされていないことから、シンテニー解析ができない。よつて、現時点では、この遺伝子が *Dmrt1* のオルソログであるか、確定できない状況である。

(4) 【非コード型エクソンの生成・縮退と、脊索動物の形態形成システム進化】に関する考察

当初の本研究の計画は、*Dmrt1* 遺伝子の解析を主とし、更にそれだけでなく、脊索動物進化過程で非コード型エクソン1の生成・縮退が見られる他の遺伝子の解析もする予定であつた。しかし、成果がでた解析は上述の(1)~(3)のように、*Dmrt1* に関する結果であつたので、これについての考察を以下に記す。

つい最近 (2013年2月)、無顎類ヤツメウナギは、脊索動物進化過程で2回のゲノム重複後に種分化してきたらしいことが、ゲノム解析から報告された。この事と、本研究で明らかになつた事、更に、これまでの他の研究者による知見を併せ、考察として、図4に示すような脊索動物進化における *Dmrt1* 遺伝子非コード型エクソン1の分子進化と精巣形成の共進化モデルを提案する (投稿準備中)。

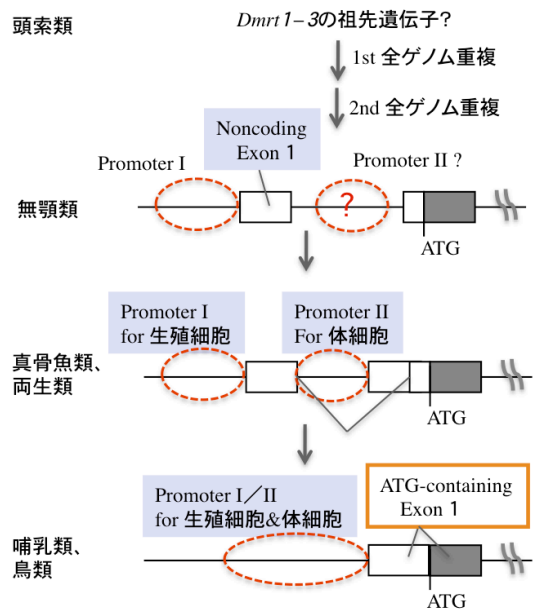


図4. 脊索動物進化における *Dmrt1* 遺伝子の非コード型エクソン1の分子進化モデル

すなわち、原始的脊索動物(頭索動物と尾索動物の祖先種)から脊椎動物に進化する全ゲノム重複過程を介して、新たに *Dmrt1* 遺伝子が重複進化した。cDNA の単離解析から、無顎類では *Dmrt1* は非コード型エクソン1を介したプロモーターを主に使用していたと考えられるが、魚類進化過程で、精巢形成機構の複雑化に伴い、*Dmrt1* 遺伝子の第1イントロンの1部分がプロモーターとして確立した。更に、爬虫類と哺乳類の共通祖先種において、何らかの精巢形成機構の変化に伴い、非コードエクソン1が縮退し、2つのプロモーターがタンデムに並ぶタイプのプロモーターに分子進化したと考えられる。

#### 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5件)

- ① 伊藤 道彦 両生類・爬虫類・鳥類の性決定システムおよびその分子機構. 細胞工学 32巻, 181-187, 2013. (査読なし)  
<http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901399.html>
- ② Ito, M., Tamura, K., Mawaribuchi, S., and Takamatsu, N. Apoptotic and survival signaling mediated through death receptor members during metamorphosis in the African clawed frog *Xenopus laevis*. Gen. Comp. Endocrinol. 176, 461-464, 2012. (査読あり)  
Doi:10.1016/j.ygcen.2011.12.037
- ③ Mawaribuchi, S., Yoshimoto, S., Ohashi, S., Takamatsu, N., and Ito, M. Molecular evolution of vertebrate sex-determining genes. Chromosome Res. 20, 139-151, 2012. (査読あり)  
Doi:10.1007/s10577-011-9265-9

[学会発表] (計8件)

- ① Ito, M. Male sex-determining systems during vertebrate evolution? Workshop 'Turnovers in sex-determination mechanisms' (Conférence Universitaire de Suisse Occidentale) 2012. 6 (La Sage, Switzerland)
- ② Ito, M., et al. (全7人) Molecular evolution of vertebrate *Dmrt1* orthologues. Sixth International Symposium on Vertebrate Sex Determination, 2012. 4 (Kona, USA)
- ③ Ito, M. et al. (全7人) Opposite roles of *DMRT1* and its W-linked paralogue, *DM-W*, in

the ZZ/ZW-type sex-determination in *Xenopus laevis*. NASCE (北米比較内分泌学会). 2011, 7 (Ann Arbor, USA)

[その他]

ホームページ

<http://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/eibutsu/joho/index.htm>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 道彦 (ITO MICHIIKO)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号: 90240994

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者: なし