

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23870011

研究課題名（和文）ニホンノウサギの *Tshb* 遺伝子とその周辺遺伝子座における自然選択の影響の検証研究課題名（英文）Assessment of natural selection on *Tshb* of *Lepus brachyurus* using phylogeographic analyses and luciferase assay

研究代表者

布目 三夫（NUNOME MITSUO）

名古屋大学・生命農学研究科・研究員

研究者番号：40609715

研究成果の概要（和文）：

季節性繁殖の制御に関わるとされる遺伝子、*Tshb*のニホンノウサギ集団における自然選択の影響を検証するため、本遺伝子の地理的変異とプロモーター活性、および周辺領域におけるセレクトクスウィープの痕跡を調べた。

ニホンノウサギの *Tshb* の一部の領域で遺伝的多様性が低いことが明らかとなった。それはノウサギ全体において *Tshb* が高く保存されている結果であると考えられた。また南方の集団では比較的高い遺伝的多様性がみられ、その保存性が弱まっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To assess effects of natural selection on *Tshb*, which is known to be related to seasonal reproduction in mammalian species, I examined geographic variation, promoter activity by luciferase assay, and selective sweep of *Tshb* of the Japanese hare, *Lepus brachyurus*.

A low genetic diversity was exhibited in northern populations of the Japanese hare. A part of *Tshb* was highly conserved in several *Lepus* species. Meanwhile, a relatively higher genetic diversity was shown in southern populations. Besides, alleles of *Tshb* promoter region from southern populations showed lower promoter activities than alleles from northern populations. These results suggested that an important part of *Tshb* has been well conserved in the evolution of *Lepus* species, and *Tshb* of southern populations of the Japanese hare might be getting away from the conservation pressure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：遺伝・ゲノム動態

キーワード：哺乳類、ニホンノウサギ、系統地理学、遺伝的多様性、季節変化、適応進化、自然選択、種分化

1. 研究開始当初の背景

中・高緯度に生息する哺乳類は、冬季の過酷な環境に適応するために体内環境を季節

的に変化させている。例えば、生殖腺を収縮させて繁殖活動を抑えたり、保温効果の高い冬毛へ換毛したりして、冬季のエネルギー消

費量を抑えている。けれども、そのような体内環境の季節変化は、生息環境に依存する傾向がある。同じ種でも、環境の季節変化が厳しい高緯度地域にすむ個体は、その体内環境を季節的に大きく変える。一方で、環境の季節変化が小さい低緯度に生息する個体は体内環境をあまり変えない。

近年、このような体内環境の季節変化に関わる遺伝子がショウジョウバエやサケ、ウズラやマウスなど様々な動物種で発見されている。そして、中には緯度に沿った地理的変異を示す遺伝子も見つかっている。例えば、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の *timeless* と *period* という遺伝子にみられる対立遺伝子は北と南に偏った分布を見せる (Costa et al., 1992; Tauber et al., 2007)。それら二つの遺伝子は温度や光刺激に基づき 24 時間の体内時計を調律する役割を担うが、対立遺伝子によって刺激への感受性の強さが異なる。例えば、ある対立遺伝子は環境温度が変化しても、ほぼ 24 時間の体内時計を維持するが、別の対立遺伝子は温度の低い環境では体内時計を 24 時間よりも短くする。温度や日長の季節変化は、北方ほど大きく南方ほど小さいため、それぞれの地域の環境に適した対立遺伝子が南北に沿って分布していると考えられている。これらのことから、他の動物種においても季節的な体内環境の変化に関わる遺伝子は、南北に沿ってその遺伝的多様性や遺伝的変異が異なると予想される。

ニホンノウサギ *Lepus brachyurus* は季節性に南北差を見せる動物の一種である。日本列島の本州・四国・九州と周辺の島に生息する。北方に生息するニホンノウサギは春から秋にかけて繁殖を行い、冬には繁殖活動をみせない。また中には夏には茶色の毛をもち、冬になると毛の色を白くする個体もいる。一方で、南の暖かな地域に生息するノウサギはほぼ一年中繁殖ができ、また一年中茶色い毛を持つ。これまでの系統地理学的解析の結果、*Tshb* という遺伝子が北方の集団ほど遺伝的多様性が低いことが明らかとなった。*Tshb* は他の動物種で季節性繁殖の制御に関わることが知られている (Nakao et al., 2008; Ono et al., 2008; Huang et al., 2012)。よって、ニホンノウサギに見られた *Tshb* の遺伝的多様性の南北差が、自然選択の影響によって形成されている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、*Tshb* の遺伝的多様性の地域差が、自然選択の影響によるものかどうかを、

(1) *Tshb* の遺伝子配列全体における遺伝的多様性の地域差の調査、(2) 近傍遺伝子の遺伝的多様性とセレクトィブスウィープの検証、(3) ルシフェラーゼアッセイによる *Tshb* のプロモーター活性の解析、の 3 点

から推定する。

3. 研究の方法

秋田県から宮崎県までにかけて、ニホンノウサギの分布域を広くカバーするよう、サンプルを収集した。ゲノム DNA は、皮膚、肝臓、および糞から、フェノール・クロロフォルム法により抽出した。得られたゲノム DNA、90 サンプルに対し、解析を行った。

(1) *Tshb* の遺伝子配列全体における遺伝的多様性の地域差の調査

ニホンノウサギの近縁種であるカイウサギ (*Oryctolagus cuniculus*) の *Tshb* は三つのエクソンと二つのイントロンから成る、およそ 5000 bp の遺伝子である。先行研究ではエクソン 3 の一部 (668 bp) の遺伝的多様性を調査した。本研究では、イントロン 1 まで解析範囲を広げ、およそ 2500 bp の遺伝子配列における地理的変異を調べた。まず、カイウサギの *Tshb* 遺伝子配列をもとにプライマーを作成した。PCR 産物のサイズは 600 bp 程度を目安とし、イントロン 1 の途中からエクソン 3 にかけての領域を、互いに重なり合う複数の断片となるように、プライマーを設計した。得られたフラグメント配列について、3 つの地域集団での遺伝的多様性を比較した。地域集団は試験的な集団として、①秋田～栃木 (North 集団)、②茨城～滋賀 (East 集団)、③淡路～大分 (S-West 集団) と設定した (図 1)。

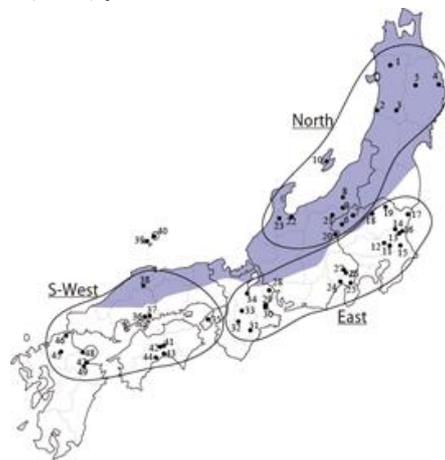


図 1. 調査用に設定した三つの試験集団

(2) 近傍遺伝子の遺伝的多様性とセレクトィブスウィープの検証

セレクトィブスウィープとは、ある遺伝子の遺伝的多様性が自然選択の影響を受けて低く抑えられていると、近傍の遺伝子座もその影響を受けて遺伝的多様性が低くなる現象である。野生哺乳類でよく知られている例としては、北アメリカ西部のハイロオオカミにおける毛色関連遺伝子座、K 遺伝子座に

おけるセレクトィブスウィープが挙げられる (Anderson et al., 2009)。ニホンノウサギ北方集団の *Tshb* における遺伝的多様性の低下が、自然選択によるものなのか否かを検証するため、*Tshb* 近傍の 4 遺伝子、*Atpa1*、*Casq2*、*Sycp1-like*、*Csde1* の遺伝的多様性を調べた。

(3) ルシフェラーゼアッセイによる *Tshb* のプロモーター活性の解析

ヒトやマウス *Tshb* における研究結果から (Kashiwabara et al., 2009; Masumoto et al., 2010)、*Tshb* の転写調節配列は転写開始点の上流およそ 600 bp までの範囲にあると考えられた。*Tshb* が季節性繁殖に深く関わるとすると、顕著な季節性繁殖を示す北部のニホンノウサギにおいて、*Tshb* のプロモーター領域 (-1~600 bp) はよく保存されていると考えられる。また転写量も、北部集団のプロモーター配列は南部集団のプロモーター配列に比べ、一定の転写量を示すと予想した。そこで、ニホンノウサギ *Tshb* のプロモーター領域における地理的変異と遺伝子発現量との関連を調べた。まず、ニホンノウサギ 90 サンプルの *Tshb* プロモーター配列を解析し、各配列 (アレル) の地理的分布を調べた。得られたアレルのうち、North、East、S-West の地域の代表的なものを選抜した。各アレルをレポーターベクター pGL 4.10 Luciferase Reporter Vector (promega) に導入後、HEK293 細胞を用いて培養した。内部標準ベクターとして pGL 4.74 ベクター (promega) を用い、ルミノメーター、ルーマト LB9507 (BERTHOLD Technologies) を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) *Tshb* の遺伝子全体における遺伝的多様性の地域差の調査

イントロン 1 (+2779 bp) ~ エキソン 3 (+5209 bp) の領域 (合計 約 2500 bp) の遺伝的多様性の地域差を解析した。その結果、エキソン 2~3 領域において、North 集団が他の地域よりも低い遺伝的多様性を示した。しかし、イントロン 1 領域では遺伝的多様性に地域差は見られなかった (図 2)。

さらに、イントロン 2~エキソン 3 の前半までの領域について、同属のノウサギであるユキウサギ *Lepus timidus*、カンコクノウサギ *Lepus coreanus*、およびデータベース上の他のノウサギの遺伝子配列を調べたところ、エキソン 3 の領域が非常に高く保存されていることが明らかとなった。このことは、北方集団の遺伝的多様性が低いというよりは、南方の集団で遺伝的多様性が高くなっている、という可能性を示唆している。

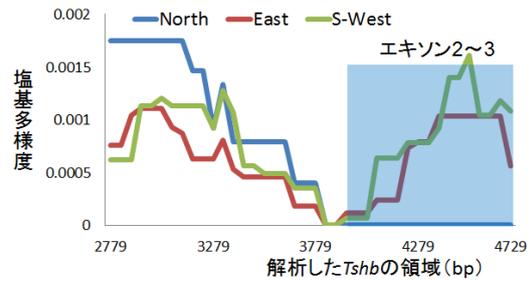


図 2. スライディングウィンドウ法による遺伝子内の遺伝的多様性の変化。横軸はカイウサギの *Tshb* を参考にして推定した *Tshb* 遺伝子配列における解析領域の位置を示す。

(2) 近傍遺伝子の遺伝的多様性とセレクトィブスウィープの検証

Tshb の近傍遺伝子においても、North 集団における遺伝的多様性の低下がみられるか否かを知らた。カイウサギのゲノム情報を基に、*Tshb* の前後 2 Mb 以内における上流および下流、それぞれ二つの遺伝子、*ATPA1*、*CASQ2*、および *SYCP1*、*CSDE1* を選び、イントロン領域およそ 700 bp における塩基多様度 (π) を算出した。遺伝子間の塩基多様度を比較しやすいよう、North、East、S-West 集団の塩基多様度を集団全体の塩基多様度で割った値を用いた (図 3)。そして、各地域集団の相対的な塩基多様度を遺伝子間で比較した。その結果、他の遺伝子においては North 集団の遺伝的多様性の低下はみられなかった。また、*Tshb* のエキソン 2~3 領域 (およそ 3700 bp 以降) にかけて比較的低い遺伝的多様性がみられた。

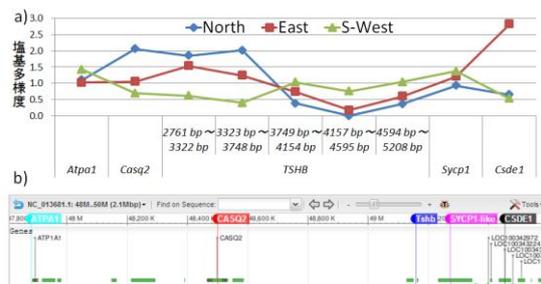


図 3. *Atpa1*、*Casq2*、*Tshb*、*Sycp1*、*Csde1* の三つの地域集団における塩基多様度 (a) とゲノム上の位置 (b)。塩基多様度は地域集団の塩基多様度を集団全体の塩基多様度で割った値、つまり集団全体の遺伝的多様性に対する地域集団の相対的な遺伝的多様性を示した。

この結果から、(1) 同様に、*Tshb* のエキソン領域が高く保存されていることが明らかとなった。North 集団における低い遺伝的多

様性は自然選択の影響ではなく、*Tshb* のエキソン 2~3 領域において保存性が高く保たれている結果であると考えられた。

(3) ルシフェラーゼアッセイによる *Tshb* のプロモーター活性の解析

ニホンノウサギ 90 サンプルの *Tshb* プロモーターから、20 個のアリルが見つかった。North 集団および East 集団からはそのうちの 8 つのアリルが、S-West からは 18 個のアリルがそれぞれ見つかった。そのうち、① North 集団で高頻度で見つかったアリル (Prom01-03)、② S-West 集団で高頻度で見つかったアリル (Prom04-06)、③ 各地から低頻度で見つかったアリル (Prom07-09) の 9 つのプロモーター配列について、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を解析した (図 4)。

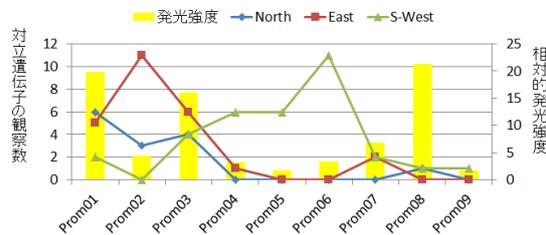


図 4. *Tshb* プロモーター領域の 9 つのアリルの地域別観察数とルシフェラーゼ活性。

S-West 集団で高頻度で見つかったアリルは低いプロモーター活性を示した。また、North 集団から見つかったアリル (Prom1, 3, 8) は比較的高いプロモーター活性を示した。しかし North 集団において高頻度で見つかったアリル (Prom2) は比較的低いプロモーター活性を示し、当初予想していた、North 集団も持つプロモーター配列の転写活性の一貫性は支持されなかった。一方で、プロモーター活性が低いアリル (Prom4-7) では活性が高いアリルに比べ、プロモーター領域の下流の転写開始点に近い領域に塩基置換が起きていた。ヒトやマウスにおける *Tshb* のプロモーター解析の結果において、転写開始点に近い部位に転写調節因子結合サイトが多く存在することが報告されている。よって S-West 集団のプロモーター配列 (Prom4-7) における低い転写活性は、その領域の塩基置換と関連する可能性が考えられる。

(4) まとめ

以上の結果から、ニホンノウサギ *Tshb* における北方集団での低い遺伝的多様性は、地域集団特異的な自然選択の影響というよりは、ノウサギ属全体として古くから自然選択の

影響を受けているためであると考えられる。そして、南方の集団において比較的高い遺伝的多様性がみられたことは、ニホンノウサギ南方集団の *Tshb* において自然選択の影響が弱くなっている可能性を示唆している。今後は、他のノウサギ種も含め、より多くのサンプルについてプロモーター領域における変異と観察頻度、およびプロモーター活性について調査し、本領域における自然選択の影響を調査する必要がある。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

1. 布目三夫: ニホンノウサギ体毛の形態的特徴における季節変化と地域差に関する研究、日本哺乳類学会 2012 年度大会、麻布大学、9 月・2012 年
2. Mitsuo Nunome and Gohta Kinoshita: Phylogeography of two hare species in Japanese archipelago., 15th Evolutionary Biology Meeting at Marseilles, マルセイユ (フランス), 9 月・2011 年

[図書] (計 1 件)

1. 布目三夫、友澤森彦、佐藤淳、鈴木仁: 日本列島でみられる哺乳類の毛色多型と系統地理学からみえるその遺伝的背景、種生物学シリーズ、2013 年 6 月出版予定

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

布目 三夫 (NUNOME MITSUO)

名古屋大学・生命農学研究科・研究員

研究者番号: 40609715

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし