

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770226

研究課題名(和文)比較染色体マッピングによる脊椎動物のゲノム・染色体進化の解析

研究課題名(英文) Genomic and chromosomal evolution of vertebrates inferred from comparative gene mapping

研究代表者

宇野 好宣 (Uno, Yoshinobu)

名古屋大学・生命農学研究科・研究員

研究者番号：60609717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物のゲノム・染色体進化過程を明らかにする目的で、ネッタイツメガエルにおいてFISH法を用いた高精度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連鎖群は、マイクロ染色体をもたないネッタイツメガエルでも高度に保存されていることから、マイクロ染色体を有するゲノム・染色体構造は、四肢動物の共通祖先ですでに保持されていたことが示唆された。また、異質四倍体であるアフリカツメガエルでもFISHマッピングを行い、ツメガエル2種における比較染色体地図を作製した。その結果、アフリカツメガエルのゲノム倍数化では、異なる染色体間の再配列や重複遺伝子の消失はほとんど起こらなかったことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To deduce the process of genomic and chromosomal evolution in vertebrates, I constructed a chromosome map of *Xenopus (Silurana) tropicalis* using FISH mapping. The homologous segments corresponding to chicken microchromosomes have been highly conserved in *X. tropicalis* without microchromosomes, suggesting that the ancestral tetrapods probably had genetic linkage groups each of which corresponded to chicken microchromosomes. Next, I performed FISH mapping for an allotetraploid species, *X. laevis*, and constructed a comparative chromosome map between these two *Xenopus* species. This result indicated that the loss of duplicated genes and interchromosomal rearrangements occurred much less frequently in *X. laevis* allotetraploidization.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：FISH 核型進化 マイクロ染色体 脊椎動物 染色体地図 両生類 *Xenopus* 異質四倍体

1. 研究開始当初の背景

これまでにメダカやニワトリ、グリーンアノール、ヒト、マウスなど多くのモデル動物のゲノム配列が解読され、得られたゲノム情報を用いた比較ゲノム解析によって、脊椎動物のゲノム・染色体進化について多くの知見がもたらされつつある。しかしこれらの解析に用いられている脊椎動物種は、真骨魚類、爬虫類、鳥類、哺乳類のモデル動物のみである。両生類では、ネッタイツメガエル (*Xenopus (Silurana) tropicalis*) と異質四倍体であるアフリカツメガエル (*X. laevis*) でゲノムプロジェクトが進行している。近年ネッタイツメガエルにおいてゲノム配列が解読されたが (Hellsten *et al.* 2010)、いまだほとんどの塩基配列の scaffold における染色体上の位置が特定されていない。また、軟骨魚類やシーラカンス亜綱では、それぞれゾウギンサメ (*Callorhinchus milii*)、シーラカンス (*Latimeria chalumnae*) のゲノムプロジェクトが進行中である。しかしながら、これらの種の遺伝子連鎖群やゲノム・染色体構造の情報はまだ得られておらず、これらの動物種と他の脊椎動物との染色体相同性は不明である。したがって、両生類や軟骨魚類、シーラカンス亜綱を含めた、脊椎動物のゲノムワイドな比較解析はいまだ報告されていない。

爬虫類や鳥類の核型は、哺乳類とは異なり、主に 10 対以下の大型のマクロ染色体と微小で識別不可能な多数のマクロ染色体から構成されている。そして、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、多数のマクロ染色体を保持していた可能性が示唆されている (Burt 2002, Kohn *et al.* 2006, Nakatani *et al.* 2007)。また、系統学的に羊膜類より先に分岐した両生類や真骨魚類のほとんどの種がマクロ染色体をもたないのに対し、軟骨魚類の多くの種やシーラカンス亜綱は多数のマクロ染色体をもつことが知られている。このことから、羊膜類がもつマクロ染色体は、四肢動物もしくは肉鱗類、硬骨魚類の共通祖先ですでに獲得されていた可能性が考えられている。しかしながら、より詳細なマクロ染色体の起源やゲノム・染色体進化のシナリオをさらに詳細に描く上で、両生類、シーラカンス亜綱、軟骨魚類のより多くのゲノム・染色体情報が必要である。

2. 研究の目的

「マクロ染色体を有する爬虫類、鳥類のゲノム・染色体構造は、羊膜類で独自に獲得されたものなのか、それとも四肢動物もしくは肉鱗類、硬骨魚類から保持されてきたのか」を明らかにし、比較ゲノム学の視点から脊椎動物の進化過程を検証する。また、アフリカツメガエルに生じたゲノム倍数化に伴う染色体再配列の過程について考察を行う。

3. 研究の方法

(1) 両生類と軟骨魚類、シーラカンス亜綱のゲノム・染色体構造の解明

両生類のネッタイツメガエル、軟骨魚類のトラザメ (*Scyliorhinus torazame*)、シーラカンス亜綱のシーラカンスの 3 種における FISH 法を用いた高精度機能遺伝子染色体地図を作製し、両生類や軟骨魚類、シーラカンス亜綱がもつゲノム・染色体構造を明らかにする。次に、すでにゲノム情報が公開されているメダカやグリーンアノール、ニワトリ、ヒトの染色体地図と比較することによって、両生類と軟骨魚類、シーラカンス亜綱と他の脊椎動物種との間の相同染色体領域を同定する。

(2) マクロ染色体の獲得過程を含む、脊椎動物におけるゲノム・染色体再配列過程の検証

トラザメやシーラカンスは、爬虫類や鳥類と同様に多数のマクロ染色体をもつ。(1) で得られた 3 種の染色体地図情報より、特にニワトリのマクロ染色体連鎖遺伝子との相同性に注目して比較解析を行う。その結果に基づき、羊膜類のマクロ染色体の起源とその形成過程を中心に、硬骨魚類から、肉鱗類、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。

(3) アフリカツメガエルのゲノム倍数化にともなう染色体再配列過程の解明

異質四倍体であるアフリカツメガエルにおいても染色体マッピングを行い、ネッタイツメガエルとアフリカツメガエルにおける比較染色体地図を作製することで、2 種間の遺伝子連鎖群の保存性を明らかにし、アフリカツメガエルに生じたゲノム倍数化に伴う染色体再配列の過程の推定を行う。

4. 研究成果

(1) ネッタイツメガエルの比較染色体地図から推測された、四肢動物・羊膜類の祖先核型とゲノム・染色体進化過程

ネッタイツメガエルの成体から心臓と腎臓を採取して細胞培養を行い、複製 R-分染色体標本作製した。FISH マッピングに用いるクローンは、基礎生物学研究所の上野直人教授が保有する大量のアフリカツメガエルの cDNA クローンのうち、ニワトリゲノムデータベースを用いてニワトリの各染色体に連鎖する遺伝子を選抜し、相同性検索を行うことで得られたアフリカツメガエルホモログの cDNA クローン 140 個を用いた。これらを用いて、ネッタイツメガエルにおける FISH マッピングを行うことで、染色体上の位置を決定したのち、得られたネッタイツメガエルの染色体地図と他の脊椎動物種のゲノム・染色体地図との比較解析を行った。その結果、ネッタイツメガエルにおいて 18 対のニワトリマクロ染色体 (16、25 番を除く 9 番から 28 番染色体) に相同な連鎖群を特定し、それ

ぞれのニワトリマイクロ染色体連鎖群は、マイクロ染色体をもたないネッタイツメガエルでも高度に保存されていることが明らかとなった(図1)。また、ネッタイツメガエルと他の脊椎動物種(硬骨魚類の共通祖先、メキシコサラマンダー、グリーンアノール、シマヘビ)の染色体上に存在するニワトリマイクロ染色体連鎖群の相同領域を比較した結果、これら5種間で多くのニワトリマイクロ染色体連鎖群の組合せにおいて違いがみられた。以上の結果より、四肢動物の共通祖先は、ニワトリのマクロ染色体を構築する11の大きな遺伝子連鎖群と、ニワトリのマイクロ染色体に対応する少なくとも8対以上のマイクロ染色体を保持していた可能性が強く示唆された(図2)。また両生類では、四肢動物の共通祖先が保持していたマイクロ染色体で染色体融合が生じた結果、すべてのマイクロ染色体が消失したと考えられた。この研究成果は PLoS ONE に投稿し、平成24年12月に受理された。

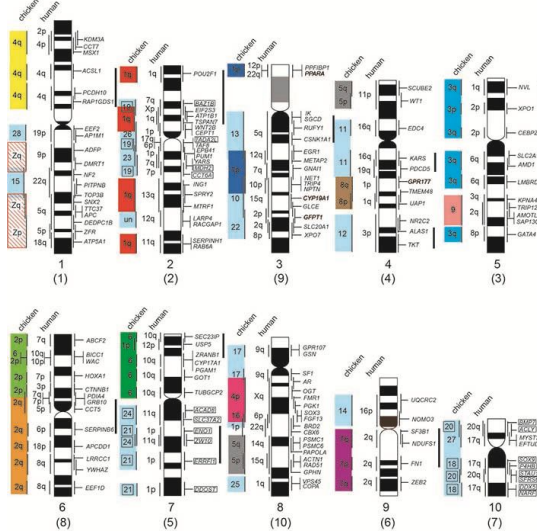


図1 ネッタイツメガエルにおけるヒト・ニワトリとの比較染色体地図

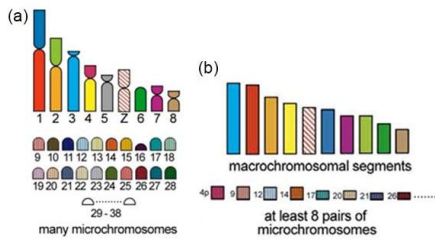


図2 ニワトリの核型(a)と推定された四肢動物の祖先核型(b)の染色体相同性

(2) 軟骨魚類およびシーラカンスにおける軟骨魚類の染色体地図の作製

軟骨魚類のトラザメの成体から採取した腎臓や心臓、血液を用いて軟骨魚類における細胞培養法の条件検討を行った。その結果、増殖の盛んな培養細胞を得ることが可能になり、得られた染色体標本を用いたギムザ染色を行うことで、この軟骨魚類が先行研究の報告と同様に、多数のマイクロ染色体をもつことを確認した。しかしながら、染色体地図

の作製のための機能遺伝子の FISH マッピングはまだわずかしか行っておらず、軟骨魚類と他の脊椎動物種との染色体の相同性は不明である。

シーラカンスについては、東京工業大学生命理工学研究科の岡田典弘教授の研究室で保存されている、凍結個体から鱭や臓器のサンプリングを行い、染色体標本作製のための細胞培養を試みた。しかしながら、増殖が見られる細胞は観察されず、染色体標本の作製には至らなかった。

(3) アフリカツメガエルのゲノム倍数化にもなう染色体再配列過程の研究

アフリカツメガエルについても(1)のネッタイツメガエルと同様に、成体から心臓と腎臓を採取して細胞培養を行い、複製 R-分染色体標本作製した。次に、ネッタイツメガエルの染色体マッピングに用いた cDNA クローンのうち、ネッタイツメガエルの染色体領域全体をカバーできる 59 のクローンを選択し、アフリカツメガエルの染色体にマッピングすることで、アフリカツメガエルとネッタイツメガエルの比較染色体地図を作製した(図3)。その結果、異質ゲノムに由来する2対の同祖染色体のグループ(カルテット)をすべて同定することができ、ネッタイツメガエルの遺伝子連鎖群はアフリカツメガエルでも高度に保存されていることを明らかにした。また、マッピングに用いた 49 個(83%)の遺伝子において、2対の同祖染色体上にシグナルが観察された。これらの結果から、アフリカツメガエルに生じたゲノム倍数化の過程では、異なる染色体間の構造変化や重複遺伝子の消失はほとんど起こらなかったことが示唆された。この研究成果は Heredity に投稿し、平成25年5月に受理された。本研究で得られたデータは、現在日本とアメリカの共同で進行中のアフリカツメガエルのゲノムプロジェクトにおいて、遺伝子連鎖群と染色体を正確に対応づけるための非常に重要な先行データとなっている。

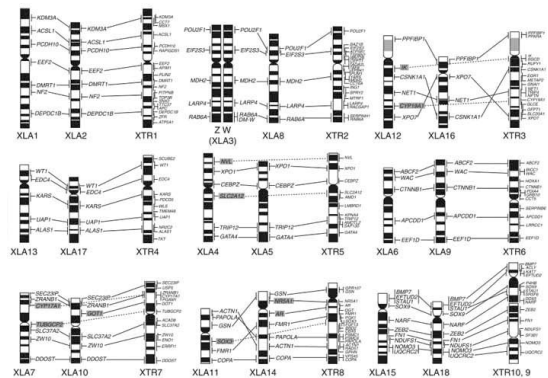


図3 アフリカツメガエルとネッタイツメガエルの比較染色体地図

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2件)

Uno Y, Nishida C, Takagi C, Ueno N and Matsuda Y. Homoeologous chromosomes of *Xenopus laevis* are highly conserved after whole genome duplication. *Heredity* 111: 430–436, 2013. 査読有
DOI: 10.1038/hdy.2013.65.

Uno Y, Nishida C, Tarui H, et al. (15人中1番目). Inference of the protokaryotypes of amniotes and tetrapods and the evolutionary processes of microchromosomes from comparative gene mapping. *PLoS ONE* 7:e53027, 2012. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0053027.

〔学会発表〕(計3件)

Uno Y, Nishida C, Takagi C, Igawa T, Ueno N, Sumida M and Matsuda Y. Molecular cytogenetic studies on the process of genomic and chromosomal evolution in *X. laevis* after WGD and the origin and evolution of sex chromosomes in anuran species. International symposium *Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing*, 27th-28th March 2014, Hiroshima University (東広島市)

宇野好宣、西田千鶴子、高木知世、井川武、上野直人、住田正幸、松田洋一：アフリカツメガエルのゲノム倍数化過程に生じた染色体再配列と無尾両生類における性染色体の起源とその進化に関する分子細胞遺伝学的研究、日本遺伝学会第85回大会2013年9月19日～21日、慶應義塾大学(横浜市)

Uno Y, Nishida C, Takagi C, Igawa T, Ueno N, Sumida M and Matsuda Y. Molecular cytogenetic studies on the process of genomic and chromosomal evolution in *X. laevis* after WGD and the origin and evolution of sex chromosomes in anuran species. The 19th International Chromosome Conference, 2nd-6th September 2013, University of Bologna (イタリア・ボローニャ)

6. 研究組織

(1)研究代表者

宇野 好宣 (UNO, Yoshinobu)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・研究員
研究者番号：60609717

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし