

平成 2 8 年 5 月 2 8 日現在

機関番号：1 6 1 0 1

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014 ~ 2015

課題番号：2 6 8 7 0 4 1 0

研究課題名 (和文) オキナワトゲネズミのneo-X、neo-Yにおける哺乳類特有の分子進化機構の解明

研究課題名 (英文) Mammalian specific molecular evolution in neo-X and neo-Y of the Okinawa spiny rat, Tokudaia muenninki

研究代表者

村田 知慧 (MURATA, Chie)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：0 0 6 1 4 1 3 2

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,100,000 円

研究成果の概要 (和文) : 真獣類の性染色体の初期分化過程を解明するために、進化の初期段階にあるオキナワトゲネズミの性染色体に転座した常染色体 (ネオ性染色体) を用いてそのゲノム進化を明らかにした。その結果、ほとんど未分化なネオ性染色体において動原体側で組換えが抑制され、末端側で活性化されることが示された。このことから、性染色体の初期進化において組換え抑制領域の拡大とは独立に偽常染色体領域 (PAR) が形成されるという新たな説が提唱された。さらに、フィリマングースのネオ性染色体において減数分裂時の対合像を観察し、元のY染色体と隣接するネオ性染色体の動原体側で遺伝的分化が開始されることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : The neo-sex chromosomes generated by sex-autosome fusions of recent origin in Tokudaia muenninki provide a good model in which to elucidate the early phases of eutherian sex chromosome evolution. Here this study describes the genomic evolution in their neo-sex chromosome differentiation. The results suggest that recombination has been suppressed in the pericentromeric region of neo-sex chromosomes, whereas high levels of recombination activity is limited in the peritelomeric region of almost undifferentiated neo-sex chromosomes. Therefore, PAR might have been formed on the peritelomeric region of sex chromosomes as an independent event from spread of recombination suppression during the early stages of sex chromosome differentiation. Furthermore, the immunostaining of pachytene spermatocytes in Herpestes auropunctatus revealed that genetic differentiation was initiated with the neo-sex chromosomal region adjacent to ancestral Y chromosome.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：性染色体 Y染色体 進化 偽常染色体領域 組換え抑制 遺伝子量補償 トゲネズミ

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む多くの真獣類は XX/XY 型の性染色体構成をもつ。X と Y 染色体はもとも一对の常染色体であったが、Y 染色体は雄性に有利な遺伝子を獲得した一方で多くの遺伝子を失った。そのため現在、X と Y 染色体は末端部のごく小さな領域 (偽常染色体領域: PAR) のみで相同性が高い。真獣類の PAR は他のゲノム領域よりも組換え頻度や GC 含量が高く、常染色体とは異なる独自の進化を遂げている。

有袋類とヒトの染色体の比較から、真獣類の祖先の性染色体には一对の常染色体が転座し、その一部がヒトの PAR として残されていることが知られている。すなわち、性染色体に転座した常染色体ペア (neo-X^{anc}、neo-Y^{anc}) は一部が新しい PAR となり、他の大部分は遺伝的に分化し X もしくは Y 染色体だけがもつ領域に進化した。neo-X^{anc}、neo-Y^{anc} の遺伝的分化は PAR (相同領域) を縮小し、neo-Y^{anc} の矮小化を進行させる。また、矮小化による neo-Y^{anc} 遺伝子の機能低下や消失は雌雄間の遺伝子量を不均等にするため、neo-X^{anc} は遺伝子量補償機構に組み込まれる必要がある。しかしながら、真獣類の Y 染色体はすでに多くの情報を失い、PAR に残された遺伝子も少なく大規模な比較解析が行えない。そこで、この性染色体の多面的な進化を解明するために有用なモデルとなるのが、性染色体に最近新たに常染色体ペア (neo-X、neo-Y) が転座したオキナワトゲネズミ *Tokudaia muenninki* である。本種の neo-X、neo-Y と近縁種の常染色体上の相同領域との比較解析によってネオ性染色体に特異的な分子進化を明らかにすることで、neo-Y の矮小化、遺伝子量補償機構への適応、PAR 形成の過程の解明が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、オキナワトゲネズミの neo-X、neo-Y と近縁種 (マウス、ラット) の常染色体上の相同領域との比較解析によりネオ性染色体に特異的な分子進化を明らかにし、neo-Y の矮小化、遺伝子量補償機構への適応、偽常染色体領域 (PAR) の形成の過程を解明する。未だ多くの遺伝子を保持し、分化の初期段階にあるオキナワトゲネズミのネオ性染色体は性染色体の初期進化の有用なモデルであり、本研究によって真獣類の性染色体の多面的な進化機構が解明されると期待される。

3. 研究の方法

(1) 雌雄複数個体のゲノム DNA を用いた PCR およびシーケンス解析により、オス特異的な塩基置換を同定した。その配列情報をもとに neo-X、neo-Y 由来の各 BAC クローンを単離し、次世代シーケンス解析と *de novo* assembly により遺伝的に分化した領域 (neo-X_{diff}、neo-Y_{diff}) の塩基配列を決定した。

次に neo-Y_{diff} の矮小化の程度を明らかにするために、オキナワトゲネズミの neo-X_{diff}、neo-Y_{diff} 遺伝子配列と近縁種の常染色体上のホモログ配列との比較解析を行い、ネオ性染色体間の遺伝的分化の程度を明らかにした。さらに neo-Y_{diff} に特異的なゲノムの構造変化と遺伝子進化を同定した。

(2) 雌雄複数個体の腺維芽細胞を用いて RNA-seq 解析を行い、neo-X と neo-Y allele 間の遺伝子発現量の比を算出し、オスにおける neo-X_{diff} 連鎖遺伝子の発現量を推定した。次に neo-X の遺伝子量が補償されているかを明らかにするために、雌雄間で neo-X_{diff} 連鎖遺伝子群の発現量を比較した。

(3) BAC クローンの次世代シーケンス解析と *de novo* assembly により、ネオ性染色体の未分化領域 (末端部および中央部) の塩基配列を決定した。次にオキナワトゲネズミのネオ性染色体で特異的に GC 含量が増加しているかを明らかにするために、組換え活性と相関のある GC 含量および A/T→G/C 型の置換頻度を近縁種の相同領域と比較した。それぞれの系統における塩基置換パターンは最節約法に基づき推定した。(図 1)

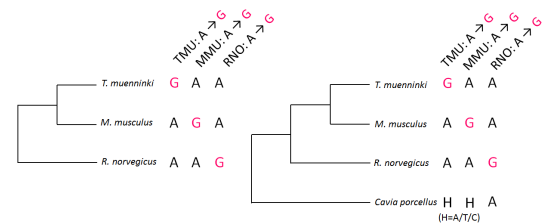


図 1. 最節約法に基づく 3 種の塩基置換パターンの推定

TMU: *T. muenninki*, MMU: *M. musculus*, RNO: *R. norvegicus*

(4) ネオ性染色体における遺伝的分化の開始機構を明らかにするために、精巢を用いて減数分裂 (パキテン) 期のネオ性染色体の対合像を観察し、不對合の領域とその頻度を確認した。オキナワトゲネズミは国の天然記念物かつ絶滅危惧種に指定されており、本研究期間中にサンプルが得られなかったため、Y 染色体が転座した常染色体 (neo-Y) をもつ別の真獣類 (フイリマンゲース *Herpestes auropunctatus*) を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) ネオ性染色体の動原体側に連鎖する 11 遺伝子において計 47 のオス特異的な塩基置換サイトを同定した。マウスのホモログ配列と比較した結果、*PRM1* および *CPPED1* においてオキナワトゲネズミの neo-Y 配列にフレームシフト変異が生じていることが明らかになった。また 18 遺伝子の BAC クローン配列を決定し、*TXNDC11* の neo-Y 配列においても 1 塩基挿入によるフレームシフトが生じてい

ることが明らかになった。*TXNDC11* の neo-X 配列や他の 17 遺伝子配列において、neo-X、neo-Y 配列にフレームシフト変異はみられなかった。次に、*TXNDC11* を除く 17 遺伝子において neo-X と neo-Y 配列間の進化速度を比較した結果、neo-Y で有意に進化速度が加速していることが明らかになった (図 2 a, b)。また、neo-X に比べて neo-Y 遺伝子群で 2.9 倍高い dN/dS 比が観察され (図 2 c) neo-Y 連鎖遺伝子にかかる純化淘汰圧が緩和している、もしくは正の選択圧がかかっていることが示唆された。

以上のことから、ネオ性染色体の動原体側で組換えが抑制され、neo-Y の矮小化が進行している可能性が示された。

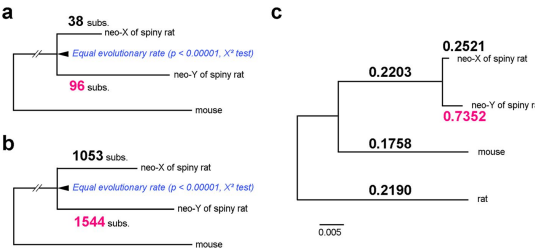


図 2 . オキナワトゲネズミのネオ性染色体における塩基配列進化

17 遺伝子のコード領域(a)および非コード領域(b)において進化速度の不均一性が示された。(c)17 遺伝子の ORF 配列を用いた最尤系統樹。樹上の数字は dN/dS 比を示す。dS: synonymous substitution rate; dN: non-synonymous substitution rate; spiny rat: *T. muenninki*; mouse: *Mus musculus*; rat: *Rattus norvegicus*

(2)オス 4 個体、メス 3 個体の RNA-seq データを用いてネオ性染色体におけるオス特異的な塩基置換サイトを網羅的に同定した。その結果、動原体側のおよそ 18Mb のゲノム領域にそのサイトが集中していることが明らかになった (図 3)。次に各遺伝子においてオス 4 個体の neo-X、neo-Y 由来のリード数を合計し、neo-Y / neo-X 発現比が 1 より有意に小さいことを明らかにした (平均値: 0.910128、中央値: 0.874225、有意性: Wilcoxon paired test $p=0.001256$)。さらに、Cufflinks を用いてネオ性染色体に連鎖する遺伝子群の雌雄の発現量 (RPKM) を算出し、neo-X/neo-Y 発現比に基づきオスの neo-X allele のみの発現量を推定した。メスの neo-X 連鎖遺伝子の発現量と比較した結果、neo-Xmale/2neo-Xfemale の発現比は 0.5 に近い値を示した (図 4、平均値: 0.5256752、中央値: 0.5211497)。このことから、neo-X は X 不活性化による哺乳類特有の遺伝子量補償機構には組み込まれていないことが示唆された。

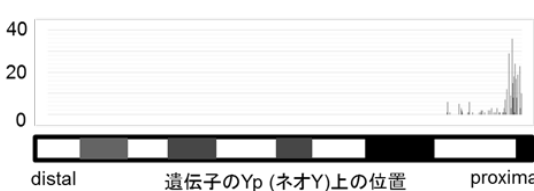


図 3 . ネオ Y 染色体におけるオス特異的な塩基置換をもつ遺伝子の分布

横軸: オスでヘテロ接合、メスでホモ接合の塩基置換サイトをもつ遺伝子の位置、縦軸: 1 遺伝子あたりのオス特異的な塩基置換数

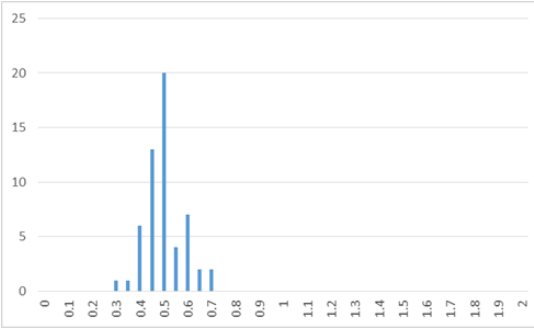


図 4 . 雌雄間の neo-X 連鎖遺伝子の発現量比

(3) 遺伝的分化のみられないネオ性染色体の末端部、中央部に連鎖するそれぞれ 51、29 遺伝子の塩基配列を決定し、マウスやラットの常染色体上の相同領域と比較した。その結果、オキナワトゲネズミのネオ性染色体の末端部で GC 含量が高いことが明らかになった (表 1)。また末端部において GC 含量が増加する A/T → G/C 型の置換が高頻度に見られた一方、中央部と他種の相同領域では GC 含量の増加にかかわる置換頻度に大きな偏りはみられなかった (表 1)。このことから、オキナワトゲネズミのネオ性染色体の末端側において特異的に組換えが活性化されていることが示唆された。本研究成果により、真獣類の性染色体の初期進化過程において、組換え抑制の拡大とは独立に組換え活性領域 (PAR) が末端に形成されるという新しい説が提唱された (図 5)。

表 1 . 3 種における GC 含量および塩基置換パターン頻度の比較

種	ゲノム領域	ゲノムカテゴリー	観察サイト数	GC 含量	A/T → G/C	G/C → A/T	A/T → C/G	C/G → A/T	A/T → T/A	G/C → C/G
トゲネズミ	末端側	ORF	22,288	69.5	51.9	25.1	9.8	2.8	3.6	6.9
マウス	chr. 11E1-E2			66.8	34.0	42.9	7.6	5.5	2.8	7.1
ラット	chr. 10q32.3			66.0	31.6	46.8	4.5	6.5	3.1	7.4
トゲネズミ	中央部	ORF	15,596	64.7	35.9	42.3	6.7	5.2	4.4	5.5
マウス	chr. 11B5			65.3	36.9	37.3	11.0	4.7	4.2	5.9
ラット	chr. 10q24			64.2	32.0	45.4	7.1	6.3	3.3	6.0
トゲネズミ	動原体側	ORF	16,788	58.5	27.4	52.2	5.2	6.7	3.5	5.1
マウス	chr. 16A1-B3			59.6	37.1	40.6	7.5	5.1	3.9	5.7
ラット	chr. 17A3.3			59.4	36.3	41.1	7.0	5.7	4.9	5.0
トゲネズミ	末端側	UTR + intron	342,340	52.4	40.3	24.9	13.4	6.3	7.3	7.8
マウス	chr. 11E1-E2			50.9	32.0	35.1	10.9	7.6	6.9	7.6
ラット	chr. 10q32.3			50.6	31.8	36.5	8.9	8.1	6.8	7.8
トゲネズミ	中央部	UTR + intron	346,940	48.2	32.0	36.0	10.3	7.1	7.9	6.7
マウス	chr. 11B5			48.4	32.7	34.4	11.5	6.9	7.6	6.8
ラット	chr. 10q24			48.3	32.6	35.3	9.9	7.2	7.7	7.3
トゲネズミ	動原体側	UTR + intron	576,147	45.5	28.7	40.9	8.6	8.1	7.8	6.1
マウス	chr. 16A1-B3			46.2	32.2	34.8	11.3	7.2	8.0	6.4
ラット	chr. 10q11-12			46.4	34.4	33.1	10.5	7.2	7.9	6.9

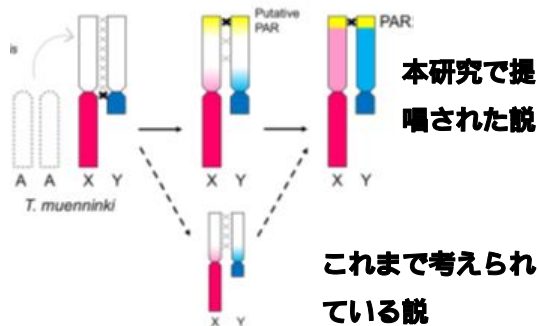


図5．推定されたネオ性染色体の進化過程

赤：X 染色体、青：Y 染色体、白：ネオ性染色体の未分化領域、ピンク：neo-X_{diff}、水色：neo-Y_{diff}、黄色：組換え活性領域（PAR）

(4) 蛍光免疫染色法を用いたパキテン期の観察により、Y 染色体が転座した常染色体（neo-Y）に X 染色体と neo-X 染色体がそれぞれ対合した 3 価染色体を確認した（図 6）。neo-X と neo-Y はほとんどの核板において全領域で対合がみられたが、2.5%の核板で元の Y 染色体と隣接する neo-Y の動原体側において neo-X との不对合が観察された（図 7）。今後さらなる解析によって性染色体の遺伝的分化が開始される要因が明らかになると期待される。

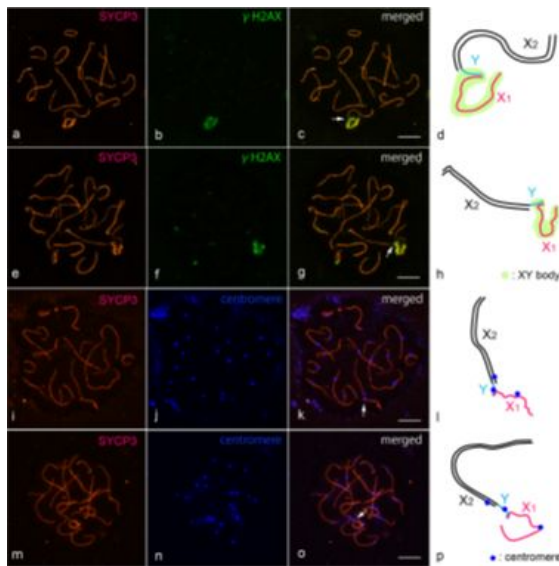


図6．フィリマンゲースにおけるパキテン期の染色体対合像

赤：SYCP3（減数分裂染色体の軸マーカー）
 緑：γH2AX（XY body のマーカー）
 青：centromere（動原体のマーカー）
 X1：祖先的な X 染色体、X2：ネオ X 染色体、
 Y：祖先的な Y 染色体（水色）およびネオ Y 染色体（黒色） スケールバー：10 μm
 矢印は祖先的な X と Y 染色体の対合を示す

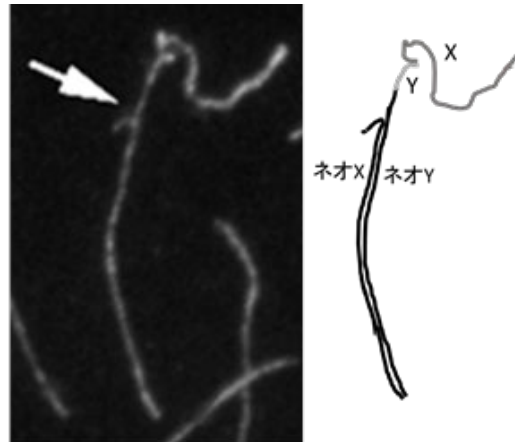


図7．フィリマンゲースのネオ性染色体における不对合像

矢印はネオ性染色体の不对合領域を示す

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）

Murata C, Sawaya H, Nakata K, Yamada F, Imoto I, Kuroiwa A

The cryptic Y-autosome translocation in the small Indian mongoose, *Herpestes auropunctatus*, revealed by molecular cytogenetic approaches.

Chromosoma, 査読有, 2016, 印刷中

Murata C, Kuroki Y, Imoto I, Tsukahara M, Ikejiri N, Kuroiwa A

Initiation of recombination suppression and PAR formation during the early stages of neo-sex chromosome differentiation in the Okinawa spiny rat, *Tokudaia muenninki*.

BMC Evol Biol, 査読有, 2015, 15:234

DOI: 10.1186/s12862-015-0514-y

〔学会発表〕（計 5 件）

村田 知慧、Y 染色体に常染色体が融合したオキナワトゲネズミにおける Y 連鎖遺伝子の重複と機能保持、第 38 回 日本分子生物学会年会 第 88 回 日本生化学会大会 合同大会、2015.12.1～12.4、神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）

Chie Murata, Genomic evolution in the proto-Y and neo-Y chromosomes of the Okinawa spiny rat, *Tokudaia muenninki*, The 5th Asian Chromosome Colloquium, 2015.4.29～5.1, Bangkok (Thailand)

村田知慧、オキナワトゲネズミのネオ性染色体の初期分化過程にみられる遺伝子進化、第 37 回 日本分子生物学会年会、2014.11.25～27、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

村田知慧、性染色体研究におけるトゲネズミの重要性、第 32 回九州実験動物研究会総会 九実研・実技協九州支部合同シンポジウム『南九州の野生齧歯類』、2014.10.25～26、宮崎観光ホテル（宮崎県宮崎市）

村田知慧、真獣類の性染色体の初期分化過程 —組換え抑制領域と組換え活性領域の形成—、日本遺伝学会 第 86 回大会、2014.9.17～19、長浜バイオ大学（滋賀県長浜市）

6．研究組織

(1)研究代表者

村田 知慧 （MURATA, Chie）
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号： 00614132