

学位論文題名

Studies on karyotypic evolution in small mammals
by comparative FISH analyses

(FISH 法による小型哺乳類における核型進化の研究)

学位論文内容の要旨

哺乳類は種特有の核型を有し、染色体の数と形態は動物種により様々である。このような種特有の染色体構成は進化過程で染色体に生じた構造変化の蓄積からなるものであり、現存する動物種の核型を比較することにより哺乳類の核型進化の歴史を読み取ることができ。近年の FISH 法、特に Zoo-FISH 法の発達により異種間で容易に染色体相同領域を検出することが可能となり、染色体構造変化の解析に大きな進展がもたらされた。これまでの哺乳類における核型進化研究から、ヒトとネコは哺乳類の祖先型に類似した核型を保持しており、一方、マウスやラットなどの齧歯目動物では染色体構造変化が高頻度に生じてきたという知見が得られている。本研究は、FISH 法を用いて齧歯目及び食虫目動物における核型進化の解析を行った。齧歯目動物における解析では、染色体構造変化が高頻度に生じてきたことから、核型進化の興味深い事例が見つかる可能性がある。食虫目動物は形態的に原始的な特徴を保持している動物種であり、食虫目動物における解析では、ヒトなどの祖先型に類似した核型を持つ種との比較に興味を持たれる。

第1章として、マウスとヒラゲハツカネズミ間に生じた染色体構造変化の解析を行った。Mus 属に属する多くの種の染色体数が $2n = 40$ であるのに対し、ヒラゲハツカネズミ (*Mus platythrix*) の染色体数は $2n = 26$ と少なく、全てアクロセントリック型である。また、X 染色体上の遺伝子オーダーは同じ Mus 属のマウス (*M. musculus*) よりもラット (*Rattus norvegicus*) に類似している (Kuroiwa et al., 2001)。これらのことから、ヒラゲハツカネズミは Mus 属内において独自の染色体構造変化を経てきたことが予想される。本研究では、ヒラゲハツカネズミとマウス間の進化過程において生じた染色体構造変化を解明することを目的として、Zoo-FISH 法によりマウスとヒラゲハツカネズミ間の染色体相同性を調べた。マウスの染色体特異的プローブをヒラゲハツカネズミの染色体にハイブダイズした結果、マウスとヒラゲハツカネズミ間で 27 の染色体相同領域が同定され、2 種間の進化過程で融合、開裂、転座、挿入などの染色体構造変化が生じたことが明らかとなった。

第2章として、*Apodemus* 属の核型進化の解析を行った。*Apodemus* 属はユーラシア大陸の温帯域の森林に生息する小型齧歯目動物であり、これまでに 21 種が確認されている。多くの *Apodemus* 属種の染色体数は $2n = 46$ または 48 であり、総腕数には 48 から 56 の変異が見られる。本研究は、*A. agrarius*、*A. argenteus*、*A. gurkha*、*A. peninsulae*、*A. semotus*、*A. speciosus*、*A. sylvaticus* の 7 種を対象として、それらの核型進化の過

程を解明することを目的として、マウス染色体特異的プローブを用いて各 *Apodemus* 属種に Zoo-FISH を行い、ハイブリダイゼーションパターンを比較することによって種間での染色体構造の違いを同定した。また、18S-28S rRNA 遺伝子の染色体上の位置を同定し、その染色体上の分布パターンを7種間で比較した。7種間でハイブリダイゼーションパターンを比較した結果、2、10、16、17、19、20、21、22、23 番染色体に染色体構造の違いが検出された。18S-28S rRNA 遺伝子は、共通祖先においては7、8、12 番染色体上に位置していたと予想され、東アジアに分布する5種では比較的、その染色体上の位置は保存されていた。一方、*A. gurkha*、*A. sylvaticus* では多数の染色体上に位置していた。染色体構造の違いと18S-28S rRNA 遺伝子の染色体上の分布パターンから、7種の核型進化の過程と共通祖先の核型を推定した。その核型進化過程は、Serizawa *et al.* (2000)による分子系統樹とほぼ一致した。また、共通祖先の核型は22対のアクロセントリック型染色体と1対のメタセントリック型染色体、アクロセントリック型の性染色体より構成され、現存種の中では *A. semotus* が祖先型に最も類似した核型を保持してきたと推定された。

第3章として、スunksとヒト間における比較染色体地図の作製を行った。スunks (2n = 40) は食虫目トガリネズミ科に属する実験動物である。本研究では、FISH法を用いたヒト機能遺伝子 cDNA クローンのマッピングによって、ヒトとスunks間における染色体相同領域の検出を試みた。51個の機能遺伝子をマッピングした結果、2種間で33の相同領域が同定された。また、51個の遺伝子のうち39個はマウスにおいても染色体上の位置が報告されており、その遺伝子の染色体上の位置をヒト、スunks、マウス間で比較した結果、スunksとヒト間においてマウスとヒト間と同数の染色体相同領域が同定された。従って、スunksの核型はマウス同様に多くの染色体構造変化を蓄積してきたと予想された。Zoo-FISH法によりヒトとヨーロッパトガリネズミ間において32の染色体相同領域が同定され、2種間での核型の高い保存性が示唆された (Dixkens *et al.*, 1998)。その報告と本研究の比較から、スunksはヨーロッパトガリネズミよりも進化過程において多くの染色体構造変化を蓄積してきたと予想され、トガリネズミ科内において染色体構造変化の生じた頻度は種間で大きく異なることが示唆された。

第1章、第2章及び Helou *et al.* (2001)の結果から、マウス、ヒラゲハツカネズミ、*A. semotus*、ラットは全てネズミ科に属するが4種間において核型は大きく異なることが明らかとなり、このことは齧歯目ネズミ科では染色体構造変化が高頻度に生じてきたことを支持した。また第3章で、食虫目トガリネズミ科内において染色体構造変化の生じた頻度は種間で大きく異なることが予想された。これらのことから、進化過程に生じる高頻度の染色体構造変化は、ネズミ科やトガリネズミ科などの小型哺乳類に共通する特徴であることが示唆された。齧歯目や食虫目などの小型哺乳類で染色体構造変化が高頻度に生じてきた要因として、以下の4つが考えられた。1) 齧歯目や食虫目動物は哺乳類の中では比較的、小型で移動能力が低いために、隔離集団ができやすく、染色体変異の固定頻度が高い。2) 世代交代が早いために染色体変異が蓄積されやすい。3) 染色体構造変化に対する淘汰圧が低い。4) 齧歯目や食虫目動物の染色体は変化を起こしやすい構造上の特徴を持つ。

ネズミ科とトガリネズミ科は哺乳類の中で、非常に多くの種数を含む分類群である。また、その核型は多様性に富んでおり、種間で染色体数や総腕数に幅広い差がある。前述のネズミ科やトガリネズミ科では染色体構造変化が高頻度に生じてきたことと、科内における種数の多さと核型の多様性に相関がみられたことから、ネズミ科やトガリネズミ科動物

では染色体構造変化が生殖隔離を助長し、種分化を促進することによって種数が増加してきた可能性が考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 洋 一
副 査 教 授 木 村 正 人
副 査 助 教 授 鈴 木 仁
副 査 助 教 授 増 田 隆 一

学 位 論 文 題 名

Studies on karyotypic evolution in small mammals by comparative FISH analyses

(FISH 法による小型哺乳類における核型進化の研究)

従来の動物の核型進化を研究では、種間に見られる核型の違いは主として G-分染法による形態的な染色体比較によって論じられてきた。しかし fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法の開発によって、DNA という物質的基盤のもとに異種間における染色体相同領域を容易にかつ正確に検出することが可能となり、核型進化の研究に大きな進展がもたらされた。これまでの哺乳類の核型進化の研究から、ヒトとネコの核型が哺乳類の祖先型に最も近い核型を保持しているのに対し、マウスやラットなどの齧歯目動物では高頻度に染色体の構造変化が生じていることが明らかになってきた。また、食虫目動物は形態的に原始的な特徴を保持していることから、ヒトの核型との類似性の有無について興味もたれている。そこで申請者は、*Mus* 属において特異的な核型を有するヒラゲハツカネズミ (*Mus platythris*) とユーラシア大陸に広く分布し数多くの種を有する *Apodemus* 属、唯一の食虫目実験動物でありトガリネズミ科に属するスンクス (*Suncus murinus*) に着目し、FISH 法を用いて核型の比較研究を行うことによって、これらの動物種における核型の特徴と核型進化のプロセスを明らかにすることを試みた。

マウスの染色体特異的 DNA プローブを用いて比較染色体ペインティング (Zoo-FISH) 法によってマウス ($2n=40$) とヒラゲハツカネズミ ($2n=26$) 間に生じた染色体構造変化を調べた結果、2 種間で 27 の染色体相同領域が同定された。主な構造変化は染色体の末端融合であったが、それ以外にも開裂、転座、挿入など多岐にわたる染色体構造変化が、これらの種が分化した後生じたことを明らかにした。

ユーラシア大陸の温帯域の森林に広く分布する *Apodemus* 属ではこれまで 21 の種が知られている。本研究では、*A. agrarius*、*A. argenteus*、*A. gurkha*、*A. peninsulae*、*A. semotus*、*A. speciosus*、*A. sylvaticus* の 7 種を対象として、マウスの染色体特異的プロローブを用いた Zoo-FISH 解析と、18S-28S リボソーム RNA 遺伝子の比較染色

体マッピングを行った。その結果、7 種間で、2、10、16、17、19、20、21、22、23 番染色体で構造変化を検出した。東アジア産 5 種では 18S-28S リボソーム RNA 遺伝子の染色体上の分布が保存的であったのに対し、中央アジア、ヨーロッパ産 2 種では多数の染色体上に分布が確認された。これらの結果から、*Apodemus* 属における核型の祖先型と核型進化のプロセスを推定したところ、共通祖先の核型は、22 対のアクロセントリック型染色体と 1 対のメタセントリック型染色体、アクロセントリック型の性染色体より構成され、現存種の中では *A. semotus* が祖先型に最も類似した核型を保持してきた可能性を見いだした。

次に、スunksとヒトにおける機能遺伝子の比較染色体地図を作製し、染色体の構造比較を行った。51 個の機能遺伝子をマッピングした結果、2 種間で 33 の染色体相同領域が同定された。また、マウスとの間でもヒト間と同数の相同領域が存在した。従って、スunksの核型はマウスと同様に多くの染色体構造変化を蓄積してきたと予想された。この結果は、他の研究グループによって報告された、ヒトとヨーロッパトガリネズミ間では高い染色体相同性が存在することという結果と異なり、トガリネズミ科内において染色体構造変化の生じた頻度は種間で大きく異なる可能性を示唆するものである。

以上の結果は、マウス、ヒラゲハツカネズミ、*Apodemus* 属は全てネズミ科に属するにも関わらず核型は大きく異なり、齧歯目ネズミ科では染色体構造変化が高頻度に生じているという従来の仮説を支持するものとなった。また、食虫目トガリネズミ科内においても高頻度の染色体構造の変化が存在することが本研究によって明らかにされた。これらのことから、申請者は、進化過程に生じる高頻度の染色体構造変化は、ネズミ科やトガリネズミ科などの小型哺乳類に共通する特徴であることを明確に示した。そして、齧歯目や食虫目動物で高頻度に染色体構造変化が生じる要因として、1) 小型哺乳類では隔離集団ができやすく、染色体変異が固定されやすい、2) 染色体構造変化に対する淘汰圧が低い、3) 変異を起こしやすい染色体構造の特徴や遺伝的要因の存在、などを推定した。また、科内における種数の多さと核型の多様性に相関が見られたことから、ネズミ科やトガリネズミ科動物では染色体構造変化が生殖隔離を助長し、種分化を促進することによって種数が増加した可能性を強く示唆した。

本研究は、分子細胞遺伝学的な手法を駆使し、高度な解析技術と適切な動物種の選択によって、小型哺乳類における核型の特徴と核型進化に関する重要かつ興味深い研究成果を示した。また、今後の脊椎動物における核型進化研究の手本ともなるべき緻密かつ精度の高いものであり、本研究成果はすでに国際的にも高い評価を受けている。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。