

Molecular cloning and characterization of novel highly repetitive DNA sequences in avian and reptilian species.

(鳥類および爬虫類における高頻度反復配列のクローニングとその解析)

学位論文内容の要旨

生物はそれぞれ種に固有の核型をもっている。その中でも鳥類の核型は、多くの種が76～82本程度の染色体からなり、染色体の大きさにより7～8対の大型染色体（マクロ染色体）と30～34対のマイクロ染色体に大別され、ZZ/ZW型の性染色体の分化が見られる。これと類似した核型をもつ生物として爬虫類が知られている。カメ類やヘビ・トカゲ類には、マイクロ染色体が存在し、ヘビ類では一般にZZ/ZW型の性染色体の分化が見られる。鳥類と爬虫類の間に見られる核型の類似性については古くから論じられてきたが、染色体の相同性が分子レベルで解析されたことはない。

染色体を構成するゲノムDNAは、遺伝子とそれに関連する塩基配列と、それら以外の塩基配列に大別される。遺伝子以外の塩基配列には、LINEやSINEに代表されるゲノム全体に分散する反復配列と、ほとんど同じ塩基配列が同方向に連なって存在する反復配列（縦列反復配列）が含まれる。反復配列の中でもコピー数の多いものは、高頻度反復配列と呼ばれ、これら反復配列のゲノムに占める割合は種によって異なるものの、ゲノムの大きな領域を占めている。

反復配列に関する研究は、ほ乳類や高等植物で広く行われているものの、鳥類や爬虫類ではほとんど行われていない。本研究では、鳥類と爬虫類から反復配列を単離し、その染色体上の分布、塩基配列、ゲノム中での存在様式について解析するとともに、進化過程におけるこれらの配列の変化を明らかにすることを試みた。さらに鳥類と爬虫類の間に見られる核型の類似性が、共通祖先種の核型に由来するものなのか、あるいは収斂によるものなのか考察を試みた。

キジ目ヒメウズラからは、ほぼ全てのマイクロ染色体の動原体部に存在する高頻度反復配列が得られた。この配列の染色体上の分布パターンはすでに報告されているニワトリ、ニホンウズラのものと同じであったが、塩基配列の長さが異なっていた。ニワトリのマイクロ染色体動原体部に存在する高頻度反復配列は、W染色体上に存在する*XhoI* family repeat と共通の塩基配列に由来すると考えられているが、ヒメウズラから得られた配列は構造や塩基配列が*XhoI* family repeat と類似していた。このことからこれらの反復配列は、共通の塩基配列に由来している可能性が示唆された。

ダチョウ目の2種のレア（コモンレア、ダーウィンレア）からそれぞれ、ほぼ全てのマイクロ染色体の動原体部に存在する高頻度反復配列、一部のマイクロ染色体の動原体部のみに存在する高頻度反復配列の2種類が得られた。2種のレアの塩基配列を比較したと

ころ、2つの配列ともに高い相同性が見られた。これらの配列は他のダチョウ目3種（ダチョウ科ダチョウ、ヒクイドリ科ヒクイドリ、エミュー）のゲノム中には見られなかったことから、レアの祖先種が他のダチョウ目と分岐した後に生じ、現在まで2種のレアの間で保存されてきたと考えられる。

フクロウ目シマフクロウからは、全ての染色体の動原体部に分布する高頻度反復配列が得られた。フクロウ目はこれまでに述べた種の核型とは異なり、マクロ染色体とマイクロ染色体の大きさの境界が不明瞭である。これらのことからマクロ-マイクロ染色体の大きさの境界が明瞭な種では、マイクロ染色体の動原体部に特異的な高頻度反復配列がみられ、大きさの境界が不明瞭な種では全ての染色体の動原体部に分布する高頻度反復配列が存在すると予想された。

フクロウ目同様マクロ染色体とマイクロ染色体の大きさの境界が不明瞭なワシ・タカ目のミサゴから反復配列を単離したところ、シマフクロウと同様に全ての染色体の動原体部に分布する高頻度反復配列が得られた。このことから核型と反復配列の分布の様式には相関があることが示唆された。

フクロウ目8種（シマフクロウ、ワシミミズク、アメリカワシミミズク、シロフクロウ、フクロウ、メガネフクロウ、ヨーロッパコノハズク、アオバズク）より高頻度反復配列を単離し、その塩基配列を用いて分子系統樹を作成した。その結果、核DNAおよびミトコンドリアDNAの配列から作成された分子系統樹とよく一致した。このことから高頻度反復配列は、鳥類の系統類縁関係を明らかにするひとつの指標となる可能性が示唆された。

キジ目のニホンウズラ、ホロホロチョウから、それぞれW染色体に特異的な反復配列が得られた。この2種から得られた塩基配列を比較したところ、高い相同性が見られた。またこれらの配列は、既知のW染色体特異的反復配列と異なる配列であった。この配列をプローブとしてニワトリ、ヒメウズラにFISH解析を行ったところ、W染色体上にシグナルが観察され、キジ目でこの配列が広く保存されていることが明らかになった。さらに他の目についても同様の解析を行ったところ、ガンカモ目、フクロウ目、ツル目、ワシ・タカ目、スズメ目には存在するが、ダチョウ目、シギダチョウ目では見られなかった。鳥類は古口顎（蓋）類（ダチョウ目、シギダチョウ目）と新口顎（蓋）類（その他のすべての鳥類）に大別され、この配列は新口顎類にのみ見られることから、鳥類の祖先種から古口顎類と新口顎類が分岐した後に、新口顎類で新たに生じた反復配列であると考えられる。

爬虫類のカメ目スッポンから反復配列を単離したところ、約半数のマイクロ染色体に存在するもの、4対のマイクロ染色体に存在するもの、2対のマイクロ染色体に存在するものが得られた。この反復配列の分布様式はレアのものと同様であることから、鳥類と爬虫類は核型が類似しているだけでなく、染色体の構造も類似している可能性が示唆された。

動原体部位特異的な高頻度反復配列とW染色体特異的な反復配列の種間での比較から、鳥類の反復配列はその系統類縁関係を明らかにするひとつの指標となる可能性が示唆された。また、マクロ-マイクロ染色体の大きさの境界が明瞭な種と不明瞭な種では、その反復配列の染色体上の分布様式が異なっていた。近年、ニワトリペインティングプローブを用いた解析から、ダチョウ目やキジ目に比べ、フクロウ目やワシ・タカ目では、マクロ染色体の構造変化が高頻度に見られることが明らかになってきており、マイクロ染色体にのみ分布する高頻度反復配列は、核型を安定に保つ働きをもっているものと推定される。以上のことから、マイクロ染色体をもつ多くの鳥類と爬虫類は、約2億5千万年前に分岐してから今日に至るまで、共通の祖先種がもつ染色体構造を保持してきたものと考えられた。

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 | 増田 | 隆一 |
| 副査 | 助教授 | 鈴木 | 仁 |

学位論文題名

Molecular cloning and characterization of novel highly repetitive DNA sequences in avian and reptilian species.

(鳥類および爬虫類における高頻度反復配列のクローニングとその解析)

脊椎動物のゲノムの10-20%を占める染色体部位特異的な高頻度反復配列は、染色体の主要な構成要素の一つであり、染色体の凝縮、分配、核内配置などに深く関わっている。また、核型進化の過程や種間の系統類縁関係を解析する上で、良い分子細胞遺伝学的マーカーとなる。哺乳類ではヒトを中心に数多くの種から部位特異的な高頻度反復配列が単離され、その構造や特性が解析されているのに対し、鳥類ではこの種の研究はまだほとんど行われていない。そこで、著者は、新たに5目15種の鳥類から6種類の部位特異的反復配列をクローニングし、また爬虫類のカメ目からも3種類の反復配列をクローニングし、それらの塩基配列、染色体分布、ゲノム中での構成、塩基配列の保存性について詳細な解析を行った。

まず、キジ目ヒメウズラから、全てのマイクロ染色体の動原体領域に存在する反復配列を得た。この配列の染色体上の分布パターンは、ニワトリ、ニホンウズラのものと同じであったが、塩基配列の長さが異なっていた。ホモロジー検索の結果、この配列はニワトリW染色体上に存在する *XhoI* family repeat と同じ起源をもち、マイクロ染色体上でコピー数を増幅させたものと考えられた。

次に、ダチョウ目のレア2種（コモンレア、ダーウィンレア）からも、全てのマイクロ染色体と、一部のマイクロ染色体の動原体領域に存在する2種類の反復配列を得た。これらの配列は、ともに2種のレア間で高い相同性がみられたが、他のダチョウ目3種（ダチョウ科ダチョウ、ヒクイドリ科ヒクイドリ、エミュー）のゲノム中には存在しないことから、レアの祖先種が他のダチョウ目と分岐した後に生じ2種のレアで保存されてきたと考えられた。

一方、フクロウ目シマフクロウからは、上記の種とは異なり、全ての染色体の動原体領

域に分布する反復配列を得た。フクロウ目はキジ目やダチョウ目の核型とは異なり、マクロ染色体とマイクロ染色体の大きさの境界が不明瞭な変異型の核型をもつ。さらに、フクロウ目と同様に変異型の核型をもつワシ・タカ目のミサゴからも、全ての染色体に分布する反復配列が得られた。これらの結果は、核型と反復配列の染色体上の分布様式に相関があることを示唆している。つまり、マクロ-マイクロ染色体間の大きさの境界が明瞭な種では、マイクロ染色体に特異的な反復配列が存在し、大きさの境界が不明瞭な種では、全ての染色体に分布する反復配列が存在することが予想される。

さらに、フクロウ目8種（シマフクロウ、ワシミミズク、アメリカワシミミズク、シロフクロウ、フクロウ、メガネフクロウ、ヨーロッパコノハズク、アオバズク）から動物原領域に存在する反復配列を単離し、その塩基配列を用いて分子系統樹を作成した。その結果、核DNAおよびミトコンドリアDNAの塩基配列から作成された分子系統樹と一致し、これらの反復配列が、鳥類の系統類縁関係を示すひとつの指標となることを見いだした。

キジ目のニホンウズラとホロホロチョウから、新規のW染色体特異的反復配列を得た。2種間の塩基配列には高い相同性が見られ、これらをプローブとしてニワトリ、ヒメウズラ染色体にFISHを行った結果、W染色体上にシグナルが観察され、キジ目でこの配列が広く保存されていた。この配列は新口顎（蓋）類に属するガンカモ目、フクロウ目、ツル目、ワシ・タカ目、スズメ目に存在するが、古口顎（蓋）類のダチョウ目、シギダチョウ目には存在しなかった。以上の結果は、この配列が鳥類の祖先種から古口顎類と新口顎類が分岐した後、新口顎類で新たに生じた反復配列であることを示している。

さらに、爬虫類のカメ目スッポンからも、約半数のマイクロ染色体に存在する反復配列、4対のマイクロ染色体と2対のマイクロ染色体に存在する計3種類の反復配列を得た。この反復配列の分布様式はレアのものと同様であることから、鳥類と爬虫類は核型だけでなく染色体の構造も類似している可能性が示された。

以上の結果より、染色体部位特異的反復配列とW染色体特異的反復配列は、鳥類の系統類縁関係を示す指標となることが示唆された。また、マイクロ染色体のみに分布する高頻度反復配列は、核型の安定化とその維持に関与しているものと推定された。そして、マイクロ染色体をもつ多くの鳥類と爬虫類は、約2億5千万年前に分岐してから今日に至るまで、共通の祖先種がもっていた染色体構造を保持してきたものと考えられた。

本研究は、分子細胞遺伝学的手法を駆使し、高度な解析技術と適切な動物種を選択によって、鳥類および爬虫類において染色体を構築する高頻度反復配列と核型の関係およびその進化に関する重要かつ興味深い研究成果を示したものであり、すでに国際的にも高い評価を受けている。

よって、審査員一同はこれらの研究成果を高く評価し、著者は博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。