

学位論文題名

Studies on genomic and chromosomal evolution in amphibians

(両生類におけるゲノム・染色体進化に関する研究)

学位論文内容の要旨

魚類や鳥類、哺乳類などの多くの種でゲノム配列が解読され、脊椎動物における遺伝連鎖群の保存性が明らかになりつつある。最近、ネッタイツメガエル (*Xenopus (Silurana) tropicalis*) ($2n = 20$) の全ゲノム配列が両生類で初めて解読されたが、塩基配列情報と染色体との対応はほとんどついておらず、それ以外の両生類でも染色体地図の報告は皆無である。脊椎動物のゲノム進化を理解するうえで、系統的に魚類と羊膜類 (爬虫類、鳥類、哺乳類) の間に位置する両生類のゲノム情報は重要であるにもかかわらず、これまで我々は、両生類と他の脊椎動物間や両生類の複数の種間における染色体の相同性やゲノム・染色体進化を詳細に論じることはできなかった。

1章では、ネッタイツメガエルの比較染色体地図から推測された、羊膜類の祖先核型とゲノム・染色体進化過程に関する研究を報告する。FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) 法を用いてアフリカツメガエル由来の EST クローン をネッタイツメガエルの染色体上にマッピングし、140個の機能遺伝子からなる高精度染色体地図を作製した。得られたネッタイツメガエルの染色体地図と、メダカとニワトリ、ヒトのゲノム・染色体地図や、先行研究で得られた3種の爬虫類 (カメ目スッポン、ヘビ亜目シマヘビ、ワニ目シャムワニ) の染色体地図と比較することによって、羊膜類の祖先核型と羊膜類におけるゲノム・染色体進化過程の推測を試みた。その結果、羊膜類の祖先核型は、ニワトリのマクロ染色体と相同な11の遺伝連鎖群と、ニワトリマイクロ染色体と相同な多数のマイクロ染色体から構成されていたことが示唆された。したがって鳥類やカメ目では羊膜類の祖先核型がそのまま保持されているが、哺乳類やヘビ亜目、ワニ目においては、それぞれ独自にマイクロ染色体の消失や減少が起こった可能性が示唆された。

2章では、アフリカツメガエル (*X. laevis*) ($2n = 36$) のゲノム倍数化に伴う染色体再配列過程について報告する。動物のゲノム重複 (倍数化) では、脊椎動物の祖先で生じた2回のゲノム重複とその後硬骨魚類独自で起こったゲノム重複が有名であり、それにより脊椎動物特有の複雑な体制が獲得され、硬骨魚類では多様な種分化が生じたと考えられている。しかしながら、これらのゲノム重複は5億年前から3億5000年前の間に起きたと考えられており、すでに多くの重複した遺伝子の一方のコピーが失われているため、ゲノム重複にともなう染色体再配列の過程を推定するのは非常に困難である。アフリカツメガエルは、約4000万年前に起こったゲノム重複によって生じた四倍体ゲノムをも

つため、二倍体で近縁種のネツタイツメガエルと比較することにより、ゲノム重複に伴うゲノム・染色体進化の過程を解明することができると考えられている。しかしながら、この2種間の比較染色体地図はいまだ報告されていない。そこでネツタイツメガエルの染色体マッピングに用いた EST クローンのうち、ネツ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、FISH 法を用いてアフリカツメガエルの染色体にマッピングを行い、ネツタイツメガエルとの比較染色体地図を作製した。その結果、59 個のうち 49 個の EST クローンは 2 対の同祖染色体対にマップされ、ネツタイツメガエルの遺伝連鎖群はアフリカツメガエルでも高度に保存されており、さらに *Xenopus* 2 種のほとんどの染色体間において遺伝子オーダーの一致が見られた。以上の結果から、アフリカツメガエルでゲノム重複が生じた後、ゲノム重複によって生じた重複遺伝子の消失や異なる染色体間での相互転座や逆位はほとんど起こっていないことが示唆された。

ほとんどの脊椎動物では遺伝的に性が決定され、XX/XY 型、ZZ/ZW 型の性染色体をもつ。しかしヘビ亜目以外の爬虫類や両生類、魚類では、この2つの性染色体構成が混在しており、魚類では比較ゲノム学的解析により近縁種間であっても性決定遺伝子や性染色体の起源が異なる例が報告されている。両生類の性染色体に関しては、ZZ/ZW 型であることが知られているアフリカツメガエルとネツタイツメガエルの性染色体はいまだ同定されておらず、他の両生類では詳細な染色体地図の報告はなされていない。系統学的解析から祖先型の両生類の性染色体構成は ZW 染色体と推定されているが、それらの起源と進化過程はいまだ不明である。

3 章では、性染色体構成が異なるツチガエル集団における性染色体の起源と分化過程に関する研究を行った。日本に分布するツチガエル (*Rana rugosa*) は、脊椎動物の中でも極めて珍しい、性染色体構成の異なる集団をもつ動物種で、大きく 4 つの集団に分けられる。形態的に未分化な XX/XY 型性染色体をもつ、西日本に分布する西日本集団と関東地方に分布する関東集団の 2 集団、これらに加えて、東北・北陸地方に分布し形態的に分化した ZZ/ZW 型性染色体をもつ ZW 集団、東海地方に分布し形態的に分化した XX/XY 型性染色体をもつ XY 集団である。これまでに、性染色体の分染パターンと 2 つの性連鎖遺伝子の塩基配列の解析から、ZW 集団と XY 集団の性染色体の起源は同じであり、この 2 つの集団の Z 染色体と Y 染色体は、西日本集団の 7 番染色体を起源とし、W 染色体と X 染色体は関東集団の 7 番染色体が起源であると考えられているが、まだその証明はなされていない。そこで、すでに共同研究者によって単離された 10 個の機能遺伝子を用いて ZW 集団のツチガエルにおける染色体マッピングを行った。その結果、4 つの性連鎖遺伝子を同定し、4 つすべての遺伝子は XY 集団においても性染色体上にマップされ、これらの 4 つの遺伝子のオーダーと位置は、Y 染色体と Z 染色体、X 染色体と W 染色体でそれぞれ一致した。これらの結果から、ZW 集団と XY 集団の Z 染色体と Y 染色体は、W 染色体と X 染色体とは異なる集団の染色体対を起源としている可能性が示唆された。

4 章では、ZW 染色体をもつ 4 種の無尾目に属する両生類、アフリカツメガエル、ネツタイツメガエル、ツチガエル、カジカガエル (*Buergeria buergeri*)、に着目し、無尾両生類における性染色体の起源と進化に関する研究を報告した。アフリカツメガエルの性決定候補遺伝子である *DM-W* と、ネツタイツメガエルの性連鎖 AFLP マーカーと同じ連鎖群に位置する遺伝子の EST クローンを

用いた FISH マッピングを行い、アフリカツメガエルとネッタイツメガエルの性染色体の同定を行った。さらに、アフリカツメガエルとネッタイツメガエル、ツチガエルの性連鎖遺伝子をカジカガエルにマッピングし、4 種間の染色体上の位置を比較した。その結果、アフリカツメガエルとネッタイツメガエル、ツチガエルの 3 種の性染色体の起源はそれぞれ異なり、*DM-W* はアフリカツメガエル独自に獲得されたことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 瀧 谷 重 治
副 査 教 授 高 橋 孝 行
副 査 教 授 山 下 正 兼
副 査 教 授 松 田 洋 一 (名古屋大学大学院
生命農学研究科)

学 位 論 文 題 名

Studies on genomic and chromosomal evolution in amphibians

(両生類におけるゲノム・染色体進化に関する研究)

近年、魚類、鳥類、哺乳類でゲノム研究が盛んに行われ、これらの結果に基づいて脊椎動物のゲノム・染色体の進化過程が論じられている。しかし、両生類のゲノム解析はまだ不十分であり、羊膜類（爬虫類、鳥類、哺乳類）の共通祖先の核型や両生類から羊膜類に至るゲノム・染色体の進化過程に関する知見はほとんど得られていない。また、両生類は遺伝的性決定様式をもつにもかかわらず、ほとんどの種で性染色体が同定されていないため、両生類における性染色体の起源と分化過程も未解明のままである。さらに、脊椎動物では脊索動物から進化する過程で2回のゲノム重複が生じたが、ゲノム重複後のゲノム構造変化過程の詳細は知られていない。そこで、本論文は、4種の無尾両生類を対象として、分子細胞遺伝学的手法を用いた比較ゲノム解析によって、両生類と羊膜類の進化過程に生じたゲノム・染色体再配列と両生類における性染色体の進化過程を解明することを目的としたもので、以下のような研究成果が得られた。

1章では、FISH法を用いて140遺伝子からなるネットイツメガエル(*Xenopus tropicalis*) ($2n = 20$)の高精度染色体地図を世界に先駆けて作製した。得られたネットイツメガエルの染色体地図を、メダカとニワトリ、ヒトのゲノム・染色体地図や3種の爬虫類（カメ目スッポン、ヘビ亜目シマヘビ、ワニ目シャムワニ）の染色体地図と比較することによって、羊膜類の祖先核型と羊膜類におけるゲノム・染色体再配列過程を推測した。その結果、羊膜類の祖先核型は、ニワトリのマクロ染色体と相同な11の遺伝連鎖群と、ニワトリマイクロ染色体と相同な多数のマイクロ染色体から構成されていたことが示唆された。したがって鳥類やカメ目では羊膜類の祖先核型がほぼそのまま保持されているが、哺乳類やヘビ亜目、ワニ目ではそれぞれ独自にマイクロ染色体の消失や減少が起こった可能性が示唆された。

2章では、アフリカツメガエル(*X. laevis*) ($2n = 36$)で約4000万年前に生じたゲノム倍数化に伴う染色体再配列過程を明らかにする目的で、59遺伝子からなる染色体地図を作製した。その結果、9つの同祖染色体組をすべて同定することに成功した。59遺伝子のうち49遺伝子は2対の同祖染色体対にマップされ、さらに二倍体の近縁種であるネットイツメガエルの染色体地図と比較した結果、ほとんどの染色体において2種間で遺伝子オーダーの一致が見られた。以上の結果から、アフリカツメガエルでは、ゲノム重複が生じた後、重複した遺伝子の消失や異なる染色体間での相互転座、染色体内での逆位がほとんど起こっていないことが

明らかとなった。

3章では、同一種でありながらXY型とZW型の性染色体をもつ集団が混在するツチガエル(*Rana rugosa*)の性染色体の起源とその分化過程を比較染色体マッピングによって明らかにした。日本に生息するツチガエルは、形態的に未分化なXY型性染色体をもつ西日本と関東の2集団、形態的に分化したZW型性染色体をもつ東北・北陸集団、形態的に分化したXY型性染色体をもつ東海集団に大別される。これらの集団について、性染色体連鎖遺伝子と反復配列DNAマーカーの比較染色体マッピングを行った結果、ZW集団とXY集団の性染色体の起源は同じであることを明らかにした。そして、これら2つの集団のZ染色体とY染色体は西日本集団の7番染色体を起源とし、W染色体とX染色体の起源は関東集団の7番染色体であることを証明した。

4章では、ZW型性染色体をもつアフリカツメガエル、ネッタイツメガエル、ツチガエル、カジカガエル(*Buergeria buergeri*)に着目し、無尾両生類における性染色体の起源と進化について調べた。アフリカツメガエルの卵巣決定候補遺伝子であるDM-Wと、ネッタイツメガエルで単離された雌特異的な性連鎖AFLPマーカーと同じ連鎖群に位置するアフリカツメガエル遺伝子のESTクローンをを用いて染色体マッピングを行い、形態的な性染色体の分化が見られないアフリカツメガエルとネッタイツメガエルのZW染色体を同定した。さらに、*Xenopus* 2種とツチガエルの性染色体連鎖遺伝子をカジカガエルの染色体上にマッピングし、4種間の染色体上の位置を比較した結果、アフリカツメガエルとネッタイツメガエル、ツチガエルの3種の性染色体の起源はそれぞれ異なり、DM-Wはアフリカツメガエル独自に獲得された性決定遺伝子であることを明らかにした。

これを要するに、著者は、両生類のゲノム・染色体進化に関して数多くの新知見を得たものであり、脊椎動物のゲノム・染色体進化研究の進展に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(生命科学)の学位を授与される資格あるものと認める。