

学 位 論 文 題 名

Study on the evolution of the sex chromosomes and the *SRY* gene in the Okinawa spiny rat, *Tokudaia muenninki*

(オキナワトゲネズミにおける性染色体と *SRY* 遺伝子の進化に関する研究)

学位論文内容の要旨

私達ヒトを含め、哺乳類は XX/XY 型の性染色体をもち、*SRY* 遺伝子による性決定機構を約 1 億 8000 万年前から維持してきた。X 染色体と Y 染色体はもともと一对の常染色体であったが、性決定遺伝子を獲得した Y 染色体は、X 染色体との組換えを抑制され、有害な突然変異の蓄積と欠失を繰り返し、X 染色体とは大きく異なる姿となった。進化の過程で、Y 染色体に存在していた遺伝子の多くは失われたが、一方で残された遺伝子の多くは、オスにとって重要な機能を獲得した。Y 染色体は、このまま遺伝子を失い続けて消失するのか、それとも強い選択圧を受けて生き残るのか、Y 染色体の運命については議論の最中である。そこで、私は哺乳類の Y 染色体進化について新たな知見を得るために、トゲネズミ属 3 種に注目した。アマミトゲネズミとトクノシマトゲネズミの染色体数は、それぞれ 25 本と 45 本であり、両種は XO/XO 型の性染色体構成をもち、Y 染色体だけでなく *SRY* 遺伝子を消失した極めてめずらしい哺乳類である。一方、オキナワトゲネズミの染色体数は 44 本であり、本種は XX/XY 型の性染色体をもつ。本研究では、トゲネズミ属の Y 染色体の進化過程を解明するために、トゲネズミ属で唯一 Y 染色体を保持するオキナワトゲネズミの性染色体と *SRY* 遺伝子の特徴を明らかにすることを目的とした。オキナワトゲネズミはトゲネズミ 3 種の中で、特に深刻な絶滅の危機に瀕しており、サンプルの入手が非常に困難であったが、2008~2010 年に約 30 年ぶりに生息個体が捕獲され、分子系統学的、分子細胞遺伝学的解析が可能となった。

第 1 章では、3 種の系統関係の解明および、オキナワトゲネズミの X、Y 染色体の同定、*SRY* 遺伝子の検出を行った。まず、オキナワトゲネズミの系統学的位置を明らかにするためにトゲネズミ属 3 種を用いた分子系統解析を行った。その結果、ネズミ亜科において 3 種の単系統が高い信頼性で示され、さらに 3 種のうちオキナワトゲネズミが先に分岐したことが明らかになった。次にオキナワトゲネズミの X および Y 染色体を同定するために、G-および C-分染法を行った結果、最も大きく、メタセントリック型で、動原体付近に大きなヘテロクロマチンをもつものが X 染色体と同定された。また、4 番目に大きく、メタセントリック型で、長腕全体がヘテロクロマチンに覆われているものが Y 染色体であることがわかった。さらに、一般的な哺乳類に比べて、オキナワトゲネズミの X および Y 染色体は非常に大型であることが示

された。一方、*SRY* 遺伝子を検出するために PCR およびサザンブロット解析を行った結果、オキナワトゲネズミのオスが *SRY* 遺伝子を複数コピーもつことが明らかとなり、FISH 解析により染色体上の位置を決定したところ、*SRY* 配列は Y 染色体の長腕全体に分布することがわかった。さらに、シーケンス解析の結果、本種は少なくとも 24 種類の *SRY* 配列をもち、そのうち 3 配列のみが完全な ORF を保存していることが明らかになった。しかしながら、*SRY* の機能に重要な DNA 結合ドメインである HMG-box 内に、オキナワトゲネズミ特異的なアラニンからセリンへの置換が観察された。この置換は、本種の全配列に共通してみられ、重複前の *SRY* 配列に生じた置換であることが示唆された。以上の結果から、Y 染色体と *SRY* 遺伝子の消失は、XO/XO 型トゲネズミ 2 種の共通祖先に起きたことがわかり、一方のオキナワトゲネズミは一般的な XX/XY 型の性染色体構成をもつにもかかわらず、その Y 染色体と *SRY* 遺伝子は、独自の進化を遂げていることが示された。

第 2 章では、オキナワトゲネズミの性染色体の特徴をより詳細に明らかにした。まず、オキナワトゲネズミの性染色体が大型化した要因を明らかにするために Zoo-FISH 解析を行った。その結果、マウスの 11 番および 16 番染色体と相同である一対の常染色体が、オキナワトゲネズミの X および Y 染色体に転座したことが明らかとなった。また、マウスの 11 番染色体に連鎖する遺伝子と X 連鎖遺伝子の cDNA クローンを用いて FISH 解析を行った結果、オキナワトゲネズミの祖先 X 染色体領域と X 染色体に転座した常染色体領域はそれぞれ他のネズミ類と遺伝子オーダーが一致し、構造変化はみられなかった。しかしながら、性分化関連遺伝子のひとつである *CBX2* が、性染色体に転座した一対の常染色体上だけでなく、他の常染色体にも存在し、重複していることが明らかになった。XO/XO 型トゲネズミ 2 種においても *CBX2* は二対の常染色体に存在していることが知られており、3 種の共通祖先において重複したことが示唆された。また、CGH 解析により、オキナワトゲネズミにおいて性特異的な領域は検出されなかったが、本種の Y 連鎖遺伝子の cDNA クローンを用いた FISH 解析により、転座する以前の祖先 Y 染色体のユークロマチン領域が短腕の動原体付近に保持されていることが示唆された。

第 3 章では、オキナワトゲネズミの *SRY* 遺伝子の機能性の予測を試みた。マウスの *SRY* は NR5A1 と協同で、*Sox9* 遺伝子の精巢特異的エンハンサー領域 (TES) に結合し、その転写を活性化することが知られている。そこで、オキナワトゲネズミ特異的なアミノ酸置換による転写活性への影響を確認するために、マウスの *SRY*、*SRY*_{A24S} (1 アミノ酸置換を加えた *SRY*)、NR5A1、*Sox9* プロモーターおよび TESCO 配列を用いた co-transfection assay を行った。その結果、*SRY* と *SRY*_{A24S} どちらを用いた場合も、両者は同程度の高い転写活性を示し、アミノ酸置換による転写活性への影響は観察されなかった。次に、TES コア配列 (TESCO) 内の *SRY* 結合配列の保存性を確認した結果、マウスに存在する 3 つの *SRY* 結合配列のうち 2 配列がオキナワトゲネズミにおいて保存されていないことがわかった。オキナワトゲネズミにおいて *SRY* が TESCO の活性化を介して、*Sox9* の発現を調節しているかを明らかにするためには、さらなる解析が必要とされた。

本研究では、オキナワトゲネズミにおいて、性染色体と一対の常染色体の転座および、*SRY* 遺伝子の重複という独自の進化が起きたことを明らかにし

た。このことから、Y 染色体の進化に大きな影響を与えるイベントが、トゲネズミ 3 種の共通祖先において生じ、その後、二系統において、消失と存続という Y 染色体の運命が大きく二分されたことが示唆された。このように、本研究により、トゲネズミ属の Y 染色体進化に新たな仮説が立てられた。

学位論文審査の要旨

主 査	准教授	黒 岩 麻 里
副 査	教 授	高 橋 孝 行
副 査	教 授	山 下 正 兼
副 査	准教授	瀧 谷 重 治

学 位 論 文 題 名

Study on the evolution of the sex chromosomes and the *SRY* gene in the Okinawa spiny rat, *Tokudaia muenninki*

(オキナワトゲネズミにおける性染色体と *SRY* 遺伝子の進化に関する研究)

哺乳類は XX/XY 型の性染色体をもち、Y 染色体上の *SRY* 遺伝子による性決定機構を維持してきた。しかしながら、例外的にトゲネズミ属には、Y 染色体と *SRY* 遺伝子を消失した種が存在している。近年、トゲネズミ属の性染色体進化に関する研究が盛んに行われているが、そのほとんどは Y 染色体と *SRY* 遺伝子を消失させたトゲネズミ 2 種（アマミトゲネズミとトクノシマトゲネズミ）における性染色体進化の解明を目的としている。そのため、消失以前のトゲネズミ祖先の Y 染色体と *SRY* 遺伝子の特徴については、ほとんど明らかになっておらず、今後の発展が待たれている状況にある。

本論文は、このような現況にあるトゲネズミ属の性染色体の進化研究について、唯一 Y 染色体を保持するオキナワトゲネズミを用いて、本種の Y 染色体と *SRY* 遺伝子の特徴を分子細胞遺伝学的に研究し、消失前のトゲネズミ祖先の Y 染色体と *SRY* 遺伝子の構造を明らかにし、トゲネズミ属の Y 染色体進化過程をより詳細に解明することを目的としたものである。本論文では、未解明であったトゲネズミ属 3 種における分子系統解析を行った。その結果、ネズミ亜科内におけるトゲネズミ 3 種の単系統が高い信頼性で示され、さらに 3 種のうちオキナワトゲネズミが最初に分岐したことが明らかになった。次に、オキナワトゲネズミの X および Y 染色体を同定し、両者は祖先 X および Y 染色体領域を保持する一方で、一对の常染色体が転座したことにより、大型化していることを明らかにした。また、本論文により、通常は単一遺伝子である *SRY* 遺伝子が、オキナワトゲネズミにおいて、マルチコピー化しており、Y 染色体の長腕に広く分布していることが明らかになった。完全な ORF をもつ機能配列が確認されたものの、全コピーに共通して *SRY* 遺伝子の機能に重要な DNA 結合ドメインである HMG-box 内に、オキナワトゲネズミ特異的なアミノ酸置換が観察され、DNA 結合能や転写活性能への影響が示唆された。さらに、*SRY* 遺伝子の標的である *Sox9* 遺伝子上流の *SRY* 結合サイトを比較ゲノム学的に解析した結果、*SRY* 遺伝子の機能性に問題がある可能性が示唆された。

本研究によって、オキナワトゲネズミの Y 染色体と *SRY* 遺伝子が独自の進化を遂げたことが明らかになった。このことから、トゲネズミ 3 種の共通祖先において、Y 染色体と *SRY* 遺伝子の独自の進化を促す重大なイベントが起きたことが示された。トゲネズミ属は国の天然記念物であるため、研究材料として自由な入手は望めない。行なえる実験系に限りがある状況下で、着実に結果を積み重ね、哺乳類の Y 染色体進化研究に新たな知見をもたらした本論文は、大変高く評価できる。

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。