

学 位 論 文 題 名

Molecular cytogenetic studies on the origin and evolutionary process of the sex chromosomes in reptiles

(爬虫類における性染色体の起源と進化に関する分子細胞遺伝学的研究)

学位論文内容の要旨

有羊膜類の性決定様式には、性染色体上の性決定遺伝子によって性が決定する遺伝的性決定(Genotypic sex determination : GSD)と、胚発生時の孵卵温度によって性が決まる温度依存的性決定(Temperature-dependent sex determination : TSD)の二つが存在する。雄ヘテロ型(XX/XY 型)の GSD を示すのは哺乳類、一部のトカゲ類であり、雌ヘテロ型(ZZ/ZW 型)を示すのは、鳥類、ヘビ類、一部のトカゲ類である。TSD は、多くのトカゲ類とカメ類および、全てのワニ類でみられることが知られている。先行研究において、ニワトリ Z 染色体に連鎖する遺伝子はヘビ類では 2 番染色体短腕に連鎖し、ZZ/ZW 型のスッポン(*Pelodiscus sinensis*)では 6 番染色体に連鎖しており、ヘビ類の Z 染色体の遺伝子はニワトリの 2 番染色体と 27 番マイクロ染色体に連鎖していることが明らかにされている。これらの結果は、哺乳類、鳥類、ヘビ類、スッポンの性染色体は、それぞれ共通祖先の異なる常染色体に由来する(性染色体の起源が異なる)ことを示している。一方、ZZ/ZW 型であるミナミヤモリ(*Gekko hokouensis*)の Z 染色体は鳥類の Z 染色体と相同、つまりミナミヤモリの性染色体の起源は鳥類のものと同一であることが明らかにされている。このように、有羊膜類の性染色体の起源は非常に多様であり、性決定機構の分子メカニズムもそれぞれの分類群において独自に形成されてきたと考えられている。カメ類では GSD と TSD を示す種が混在しており、これまでに形態的に分化した性染色体を持つ種は 8 種しか報告されていない。さらに、カメ類が持つ性染色体の起源については、これまで、ニワトリの Z 染色体がスッポンの 6 番染色体に相同であるという報告しかなく、スッポンを含めた 8 種のカメ(XY 型 6 種、ZW 型 2 種)の性染色体の起源および分化過程は不明であった。そこで本論文では、ZW 型のスッポンと、XY 型であるホオジロクロガメ(*Siebenrockiella crassicollis*)、共にオオニオイガメ属に属し XY 型を示すスジオオニオイガメ(*Staurotypus triporcatus*)とサルヴィンオオニオイガメ(*Staurotypus salvinii*)の計 4 種を対象として、FISH 法を用いた染色体ペインティングと性染色体連鎖遺伝子の染色体マッピングを行い、カメ類の性染色体の遺伝連鎖群を同定することによって、その起源と分化過程の推定を試みた。本論文の第一章では、スッポンの性染色体と相同なニワトリの染色体を同定し、その起源と分化過程を明らかにすることを目的として、スッポン ZW 染色体上の遺伝連鎖群の同定を試みた。その結果、5 個の Z 染色体連鎖遺伝子を同定し、この内 2 個の遺伝子が W 染色体の両末端にも連鎖していた。そし

て、これら 5 個の遺伝子は全てニワトリ 15 番染色体に連鎖していた。これらの結果は、スッポンの性染色体はニワトリ 15 番マイクロ染色体と相同であり、遺伝連鎖群が互いに高度に保存されていることを示している。また、少なくとも、W 染色体の両末端に Z 染色体との相同領域が残されていることを明らかにした(Kawagoshi et al. 2009)。第二章では、スッポンと同様に、*S. crassicolis* の XY 染色体上の遺伝連鎖群の同定を試みた。スッポン染色体特異的 DNA プローブを用いた染色体ペインティングの結果、*S. crassicolis* の XY 染色体はスッポン 5 番染色体と相同であることが明らかになった。この結果に基づき、スッポン 5 番染色体と相同なニワトリ 5 番染色体に連鎖する遺伝子の *S. crassicolis* ホモログを 14 個クローニングし、FISH マッピングを行った。その結果、全ての遺伝子が XY 染色体にマッピングされ、X-Y 染色体間の遺伝子オーダーにも差は見られなかったが、14 遺伝子のうち 2 つの遺伝子が X 染色体では長腕の動原体付近にマップされたのに対し、Y 染色体では短腕の動原体付近に存在していた。このように、Y 染色体に遺伝子の欠失が見られないこと、2 つの遺伝子が Y 染色体の短腕の動原体近傍にマッピングされたこと、さらに、XY 染色体上に存在する反復配列の分布パターンの比較から、*S. crassicolis* の XY 染色体は性染色体分化の初期段階にあり、Y 染色体で動原体の再配置(repositioning)が生じたことが示唆された(Kawagoshi et al. 2012)。第三章では、*S. triporcatus* を対象として、これまでと同様に XY 染色体上の遺伝連鎖群の同定を試みた。スッポン染色体特異的 DNA プローブを用いた染色体ペインティングの結果、*S. triporcatus* の XY 染色体はスッポン 6 番染色体と相同であった。スッポンの 6 番染色体はニワトリ Z 染色体と相同であることから、ニワトリ Z 染色体連鎖遺伝子の *S. triporcatus* ホモログを 17 個クローニングし、マッピングした。その結果、17 個全てが X 染色体と Y 染色体に同じオーダーでマッピングされ、そのオーダーは現生鳥類の中でニワトリよりも原始的なグループに属するダチョウの Z 染色体と相同であった。また、クローニングした 17 個のホモログを *S. salvinii* の染色にマッピングした結果、17 個全てが、*S. salvinii* の XY 染色体においても *S. triporcatus* のものと同じオーダーでマッピングされた。これらの結果は、*S. triporcatus* と *S. salvinii* の性染色体は *S. crassicolis* の性染色体と同様に性染色体分化の初期段階にあり、その起源はニワトリ(鳥類)の Z 染色体と相同であることを示している。また、ダチョウと *S. triporcatus* および、*S. salvinii* の性染色体は、共通祖先が保有していた同一の常染色体に由来し、構造変化を生じることなく原始的な遺伝子オーダーを保持したままで、それぞれの系統で独立に ZW 染色体と XY 染色体に分化したことが推定された(Kawagoshi et al. in preparation)。以上、本研究の結果から、スッポン、ホオジロクロガメ、スジオオニオイガメの性染色体はそれぞれ異なるニワトリの染色体に相同であり、サルヴィンオオニオイガメの性染色体は、スジオオニオイガメと同様に鳥類の性染色体と同じ起源をもつことが明らかになった。これらの結果は、カメ目内で性染色体の起源に多様性が存在し、性決定機構(性決定遺伝子)もそれぞれの種で異なることを示唆している。本研究は、ZW 型と XY 型のカメの性染色体の起源を世界で初めて明らかにしたものであり、爬虫類における性染色体の起源の多様性を支持するとともに、脊椎動物における性決定様式の進化過程とその多様性に関する重要な基礎情報を提供するものである。

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

Molecular cytogenetic studies on the origin and evolutionary process of the sex chromosomes in reptiles

(爬虫類における性染色体の起源と進化に関する分子細胞遺伝学的研究)

博士学位論文審査等の結果について(報告)

羊膜類の性決定様式には、性染色体上の性決定遺伝子によって性が決まる遺伝的性決定(Genotypic sex determination : GSD)と、胚発生時の孵卵温度によって性が決まる温度依存的性決定(Temperature-dependent sex determination : TSD)が存在する。雄ヘテロ型(XX/XY 型)の GSD を持つものには哺乳類とトカゲ類があり、雌ヘテロ型(ZZ/ZW 型)は鳥類、ヘビ類、トカゲ類に見られる。一方、TSD は一部のトカゲ類と多くのカメ類、そして全てのワニ類で見られる。ニワトリ Z 染色体に連鎖する遺伝子はヘビ類では 2 番染色体短腕に、逆に、ヘビ類の Z 染色体の遺伝連鎖群はニワトリの 2 番染色体と 27 番マイクロ染色体に対応することが知られている。これらの結果は、哺乳類、鳥類、ヘビ類の性染色体は、それぞれ共通祖先の異なる常染色体に由来することを示している。一方、ZZ/ZW 型性染色体を持つミナミヤモリ(*Gekko hokouensis*)の Z 染色体は鳥類の Z 染色体と相同であり、ミナミヤモリの性染色体の起源は鳥類と同じである。このように、羊膜類の性染色体の起源は多様であり、したがって性決定機構の分子メカニズムもそれぞれの分類群で独自に獲得されてきたと考えられている。カメ類では GSD と TSD の種が混在し、これまでに形態的に分化した性染色体を持つ種は 8 種(XY 型 6 種、ZW 型 2 種)しか報告されていない。さらに、カメ類が持つ性染色体の起源については、これまでに、ニワトリ Z 染色体がスッポン 6 番染色体に相同であるという報告しかなく、スッポンを含めた 8 種のカメの性染色体の起源とそれらの分化過程は不明であった。そこで本論文では、ZW 型の性染色体を持つスッポン(*Pelodiscus sinensis*)と、XY 型の性染色体を持つホオジロクロガメ(*Siebenrockiella crassicolis*)、オオニオイガメ属のスジオオニオイガメ(*Staurotypus triporcatus*)とサルヴィンオオニオイガメ(*Staurotypus salvinii*)の計 4 種を対象として、FISH 法を用いた染色体ペインティングと機能遺伝子の染色体マッピングによってカメ類の性染色体の遺伝連鎖群を同定し、その起源と分化過程を解明することを目的に研究を行なった。

第一章では、スッポンの性染色体と相同なニワトリの染色体を同定し、その起源と分化過程を明らかにすることを目的として、スッポン ZW 染色体の遺伝連鎖群の同定を試みた。まず、スッポンの機能遺伝子染色体地図の作成過程で *TOP3B* 遺伝子がスッポン Z 染色体にマップされた。この遺伝子がニワトリ 15 番染色体に存在することに着目し、4 つのニワトリ 15 番染色体連鎖遺伝子のスッポンホモログ(*GIT2*, *NF2*, *SBNO1*, *SF3A1*)をクローニングし染色体マッピングを行なった。その結果、すべての遺伝子が Z 染色体にマップされ、この内 2 個の遺伝子(*SBNO1*, *SF3A1*)がそれぞれ W 染色体の末端にも存在することがわかった。これらの結果は、スッポンの性染色体はニワトリ 15 番マイクロ染色体と相同であり、そしてカメと鳥類を含む主竜形類が約 2 億 5 千万年前に分岐して以来、遺伝連鎖群が互いに高度に保存されてきたことを示している。また、W 染色体の両末端に Z 染色体と相同な領域が残されていることを明らかにした。これらの研究成果は、スイスの染色体研究専門誌である *Cytogenetic and Genome Research* 誌に掲載された(Kawagoshi et al. 2009)。

第二章では、XY 型の性染色体構成を持つホオジロクロガメ(*S. crassicolis*)を対象として、比較染色体マッピングによって性染色体に連鎖する機能遺伝子群を同定し、カメ類における性染色体の起源とその分化過程について考察した。スッポン染色体特異的 DNA プローブを用いた染色体ペインティングによって、*S. crassicolis* の XY 染色体はスッポン 5 番染色体と相同であることを明らかにした。この結果に基づき、スッポン 5 番染色体に相同なニワトリ 5 番染色体の連鎖遺伝子の *S. crassicolis* ホモログを 14 個クローニングし、FISH マッピングを行なった。その結果、全ての遺伝子が XY 染色体にマップされ、X-Y 染色体間の遺伝子オーダーにも差は見られなかった。この結果は、*S. crassicolis* の X 染色体がニワトリ 5 番染色体と相同であり、性染色体の起源が哺乳類、鳥類、ヘビ類だけでなくスッポンとも異なることを示している。マップされた 14 遺伝子のうち 2 つの遺伝子(*DDB*, *DEAF1*)が X 染色体では長腕の動原体付近に存在するのに対し、Y 染色体では短腕の動原体付近にマップされ、Y 染色体に遺伝子の欠失が見られないことから、*S. crassicolis* の XY 染色体は性染色体分化の初期段階にあることが示唆された。次に、XY 染色体を構成する二つの部位特異的反復配列(*SCR-AluI-01*, *SCR-AluI-09*)をクローニングし、それらの染色体上の位置と 2 遺伝子および動原体の位置を X-Y 染色体間で比較した結果、Y 染色体で動原体の再配置(repositioning)が起こり X-Y 染色体間で形態の違いが生じたことを明らかにした。これらの結果は、性染色体分化の初期過程を分子細胞遺伝学的に解明した研究成果として国内外で高い評価を受け、英国の染色体研究専門誌である *Chromosome Research* 誌の特集号「Sex and Sex Chromosome – New Clues from Non-model Species」に招待論文として掲載された(Kawagoshi et al. 2012)。

第三章では、スジオオニオイガメ(*S. triporcatus*)を対象として、同様に XY 染色体の遺伝連鎖群の同定を試みた。スッポン染色体特異的 DNA プローブを用いた染色体ペインティングの結果、*S. triporcatus* の XY 染色体はスッポンの 6 番染色体と相同であった。スッポン 6 番染色体がニワトリ Z 染色体と相同であることから、ニワトリ Z 染色体連鎖遺伝子の *S. triporcatus* ホモログを 17 個クローニングし、染色体マッピングを行なった。その結果、17 個全てが X 染色体と Y 染色体に同じオーダーでマップされ、そのオーダーは、現生鳥類の中でニワトリよりも原始的なグループに属するダチョウの Z 染色体のものと同じであった。また、クローニングした 17 個のホモログをサルヴィンオオニオイガメ(*S. salvinii*)の染色体にマッピングした結果、17 個全てが、*S. salvinii* の XY 染色体においても *S. triporcatus* と同じオーダーでマップされた。これらの結果は、*S. triporcatus* と *S. salvinii* の性染色体の起源がニワトリ(鳥類)の Z 染色体のものと相同であり、性染色体分化のごく初期段階にあることを示している。また、ダチョウと *S. triporcatus* および *S. salvinii* の性染色体は、共通祖先が保有していた同一の常染色体に由来し、構造変化を生じることなく原始的な遺伝子オーダーを保持したままで、それぞれの系統で独立に ZW 染色体と XY 染色体に分化したことが推定された。これらの研究成果は、現在投稿準備中である。

以上のように、本研究において、スッポン、ホオジロクロガメ、スジオオニオイガメの性染色体がそれぞれ共通祖先の異なる常染色体に由来することが明らかとなった。そして、これらの結果は、カメ類と他の爬虫類との間だけでなく、カメ目内においても性染色体の起源が多様であり、性決定機構(性決定遺伝子)もそれぞれの種で独自に獲得されてきたことを示唆している。本研究は、ZW 型と XY 型のカメの性染色体の起源を世界で初めて明らかにしたものであり、爬虫類における性染色体の起源の多様性を支持するとともに、脊椎動物における性決定様式の進化過程とその多様性に関する重要な基礎情報を提供するものである。

これを要するに、著者は、爬虫類のゲノム・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。