

研究報告書

「エピジェネティクス制御の多様性と進化」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 北野 潤

1. 研究のねらい

本研究の目的は、野外動物集団を用いて、エピジェネティクス制御の集団間変異の進化的意義、及び、その進化遺伝機構を解明することである。具体的には、まず、野外に生息するトゲウオ科魚類のイトヨを中心に、表現型可塑性を示す集団と示さない集団について、エピジェネティクス制御の違いをまず明らかにし、次いで、QTL解析やトランスジェニック法などを駆使して、表現型可塑性とエピジェネティクス制御の進化の分子機構の解明を目指す。表現型可塑性とは、同一の遺伝型の個体が周囲の環境に合わせて表現型を変化させることであり、生物が新規環境や環境変動に応答する際に重要な戦略の1つである。この課題には、回遊するイトヨと河川残留イトヨを利用し、塩分濃度や日長変化に対する応答性の違いを解析する。

ついで、性染色体転座を起こしている地域集団を用いることによって、ネオ性染色体の進化がゲノムのメチル化、低分子 RNA 発現などのエピジェネティクス制御に与える影響を明らかにする。申請者は、本課題採択以前に、日本海と太平洋のイトヨが性染色体転座(Y染色体と常染色体の融合)によって性染色体の構造が異なっていることを発見していた。これら二種のイトヨを利用することで、この課題に迫る。また、種分化、特に近縁種間での雑種異常におけるエピジェネティクス分化の役割を明らかにする。既述の日本海と太平洋のイトヨは、人工的に交雑すると雑種オスが不妊になること(一方方向の交配のみで、また、雑種メスは正常)も明らかにし、さらに QTL マッピングを行って雑種不妊や交配行動の違いの原因遺伝子が性染色体上に存在していることも発見していた。そこで、この雑種不妊の現象にエピジェネティクス分化が関わっているか否かを検討する。

性染色体転座や表現型可塑性は、ヒトにおいても普遍的に見られる重要な現象であることから、これらの研究成果は、野外生物のみならずヒトをも含む生物のエピジェネティクス制御の進化機構の理解に対して大きく貢献すると期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

まず、本研究課題実施の際に必要な基盤情報を整えることを目的として、日本と北米の回遊型と河川型の複数のイトヨについて、全ゲノムを解読した。また、イトヨと同じトゲウオ科に属するトミヨを比較研究のモデルとして確立した上で、論文に報告した。

ついで、研究テーマ(A)に関連して、日長変化で発現変動を示す遺伝子として TSHB2 を、塩分刺激で変動を示す遺伝子としていくつかの神経ペプチドや下垂体ホルモンを同定した。これらのシス領域について DNA メチル化やヒストン修飾を現在解析している。これらの TSHB2 や神経ペプチドの機能を解析するために TALEN によるノックアウトの系や tol2 を用いたトランスジェニックの系を無事立ち上げることができた。

研究テーマ(B)に関しては、まず、性染色体融合が、どの程度普遍的な現象であるのかを明らかにするために、複数の分類群について X 染色体-常染色体融合が起こった種、Y 染色体-常染色体融合が起こった種の数のカウントし、その成果を論文二報に発表した。ついで、日本海イトヨと太平洋イトヨの雌雄 5 個体ずつについて HiSeq2000 を用いてゲノムを解読し、転座領域におけるゲノム上の特徴を明らかにし、論文に投稿した。また、低分子 RNA 発現と性染色体との関係も明らかにし論文に報告した。日本海と太平洋のイトヨの間で観察される雑種オスの不妊について、候補遺伝子を同定し、これらの機能的分化について生化学的に解析するとともに、トランスジェニックを作出した。

(2) 詳細

研究テーマ A「表現型可塑性の分子遺伝機構」

まず、本課題実施の際に必要な基盤情報を整えることを目的として、日本と北米の回遊型と河川型の複数のイトヨについて、全ゲノムを解読した。HiSeq2000 を用いて一集団当たり数十倍以上のカバレッジで解読し、貴重な基盤情報を得た。これらについて、ヘテロ SNP の頻度や自然選択がかかったらしき遺伝子について同定した(Yoshida et al. PLOS Genetics 印刷中)。

また、イトヨと同じゲウオ科に属するトミヨを比較研究のモデルとして確立し、論文報告した(Ishikawa et al. 2013 Journal of Evolutionary Biology)。北海道東部に生息する 3 種のトミヨ(汽水型トミヨ、淡水型トミヨ、エゾトミヨ)について、表現型分化や生殖隔離機構を明らかにした。エゾトミヨ、淡水トミヨ、汽水トミヨの隠蔽 3 種は生殖的に隔離されており、同所生息域でも淡水トミヨと汽水トミヨ間の雑種のみがごく稀に採集される程度であった。これら 3 種は河川の上流から下流にかけて生息域をうまく住み分けて共存しており、摂餌器官や浸透圧耐性能も大きく異なっていた。一方で、鱗板(体の側面の骨化組織)の変異は、単純な上流-下流勾配にそった変異はみられず、また、その遺伝基盤は近縁のイトヨ属とは異なる遺伝子で決定されていることが明らかになった。イトヨ属では、Eda 遺伝子が鱗板をコントロールしていることが既に知られているが、トミヨ属では Eda 遺伝型と鱗板表現型に相関は全く見られなかった。

これらの基盤情報を整えながら、まず、日長応答性の異なる回遊型と河川型のイトヨについて、日長を変化させた時に回遊型のみで変動を示す遺伝子として甲状腺刺激ホルモン(TSH)を同定した(Kitano et al. 2010 Current Biology; Ishikawa et al. 未発表)。TSH は糖タンパクであり、他の下垂体ホルモンと共通のアルファ鎖と TSH に特異的なベータ鎖(TSHB)からなる。魚類は全ゲノム重複の結果、二つの TSHB 遺伝子を持つが、このうち TSHB2 遺伝子がより顕著な日長変動を示す。また、カナダの回遊型と河川型のイトヨの F1 雑種のアリル特異的発現解析の結果、TSHB2 のシス領域の変化が集団間の反応の違いの原因であること、また、この領域に強い分岐自然選択圧がかかっていることを明らかにした。

ついで、塩分耐性の異なる回遊型と河川型のイトヨについて、塩分濃度を上昇させた時に回遊型でのみ有意に変動する遺伝子として神経ペプチドや下垂体ホルモンの遺伝子をいくつか同定した(Ishikawa et al. 未発表)。また、塩分耐性の違いに関わる原因遺伝子を同定するた

めに、カナダの回遊型と河川型のイトヨについて F2 雑種を作出し現在 QTL マッピングの最中である。

これらの TSHB2 や神経ペプチドの機能を解析するために TALEN によるノックアウトの系や tol2 を用いたトランスジェニックの系を無事立ち上げることができた。

最後に、これらの遺伝子の上流について DNA メチル化の集団間や環境間の違いをバイサルファイトシーケンス法で解析中である。

研究テーマ B「性染色体転座とエピジェネティクス」

まず、性染色体融合が、どの程度普遍的な現象であるのかを明らかにするために、複数の分類群について X 染色体-常染色体融合が起こった種、Y 染色体-常染色体融合が起こった種のカウントした。その結果、魚をはじめとする多くの分類群では Y 染色体-常染色体融合が X 染色体-常染色体融合に比して多く (Kitano & Peichel, *Environmental Biology of Fishes* 2012)、哺乳類のみが例外的に、両方の融合をほぼ同程度に起こすことを見いだした (Yoshida & Kitano, *Evolution* 2012)。さらに、哺乳類において X 染色体-常染色体融合を持つ種と Y 染色体-常染色体融合を持つ種を比較した結果、X 染色体と常染色体の融合は中部動原体染色体を多く持つ哺乳類で起こりやすく、Y 染色体と常染色体の融合は末端動原体染色体を多く持つ哺乳類で起こりやすいことを世界で初めて見いだした。また、X 染色体と常染色体の融合には、メスが卵子を形成する減数分裂の過程に、どのような形の染色体が卵子に伝達されやすいか (メス減数分裂ドライブ; female meiotic drive) が強く影響しているのではないかという仮説を提唱し、米国進化学会誌 *Evolution* に掲載された (Yoshida & Kitano, *Evolution* 2012)。

ついで、転座領域におけるゲノム上の特徴を明らかにするために、日本海イトヨと太平洋イトヨの雌雄 5 個体ずつについて HiSeq2000 を用いて解読された全ゲノム配列の解析を行った。その結果、転座をおこし、組み換えが X と Y で抑制されている領域において、neo-X 染色体と neo-Y 染色体の間で配列レベルでの分化が生じており、アミノ酸置換を起こす変異も多数蓄積していることなど、新しい知見を得ることができ、現在論文を投稿中である (Yoshida et al. 未発表)。さらに、雑種で見られるエピジェネティクス異常を解析するために、雑種を作出し、様々な発達段階の試料を採取し凍結保存した。

ネオ性染色体におけるエピジェネティクス制御を明らかにするために、性染色体の量的補償を解析した結果、一部の遺伝子には量的補償が見られたが、染色体全体が修飾されて補償されているという傾向は見られなかった。現在、この成果についても投稿中である。また、低分子 RNA を解析し、ネオ性染色体において特徴的な低分子 RNA の発現パターンの有無を解析したが、顕著な傾向は見られなかった (Kitano et al. 2013 *BMC Genomics*)。

近年、エピジェネティクス機構が近縁種間で分化することによって、近縁種間での生殖隔離 (つまり種分化) が進化する例がモデル動物で報告されている。これまでに同定された雑種異常の原因遺伝子の多くは DNA/クロマチン結合分子であり、雑種において、本来ではない染色体部位に結合することが異常の原因であると報告されている。また、これら原因遺伝子は近縁種間で急速進化が見られ、同義置換率に比して非同義置換率が高い ($Ka/Ks > 1$) ことが報告されている。

そこで、雑種不妊についてエピスタシスを組み込んだモデルを用いて QTL 解析を行った結果、X 染色体上の 2カ所に雑種不妊の原因遺伝子座があり、これらの相互作用でほぼ完全に雑種不妊が説明できることが明らかになった。さらに具体的な雑種不妊の原因遺伝子を絞り込むために、まずは日本海イトヨと太平洋イトヨ両種の雌雄 5 個体ずつについて HiSeq2000 を用いて全ゲノムを解読した。1 個体平均 80 倍以上のカバレッジで、89%以上の領域について配列を決定した。その結果、QTL 領域内に、同義置換率に比して非同義置換率が高く、精巢で発現が確認されており、DNA/クロマチン結合能が示唆される遺伝子として 4 個の有力な雑種不妊の候補遺伝子を同定した。これらの遺伝子について遺伝子クローニング(太平洋型と日本海型の両型について)を行い、tol2 のベクターに組み込み、現在トランスジェニックイトヨを作成の上、育成中である。これによって、太平洋型イトヨの精巢発達に異常をもたらすような日本海型イトヨの遺伝子を同定する。また、ヒストンを含めたタンパク相互作用の生化学的解析を行っており、候補遺伝子の一つの遺伝子については、日本海型と太平洋型でヒストンへの結合能が変化しているという生化学的な実験結果も得られた。

3. 今後の展開

雑種不妊や表現型可塑性の候補遺伝子を同定することに成功したので、これらのノックアウトやトランスジェニックを利用して遺伝子の機能を *in vivo* で解析する。その上で、表現型可塑性の遺伝子については、当該遺伝子領域の DNA メチル化やヒストン修飾、関連する転写因子との関わり等を明らかにすることで、当初の目的であるエピジェネティクス制御の近縁集団間での分化を解明する。雑種不妊に関しても、既に、候補遺伝子がヒストン結合において分化を示すことが明らかになりつつあるので、この分子機構をさらに追求することで、近縁集団間でのエピジェネティクス分化を種分化の関係を解明する。

4. 評価

(1) 自己評価

研究の当初の狙いに向かって着実に近づいており、数年以内にその目標を達成できるところまで来ていることから、十分に成功であったと評価する。具体的には、表現型可塑性の遺伝子については、候補遺伝子を同定することに成功し、現在は当該遺伝子領域の DNA メチル化やヒストン修飾、関連する転写因子との関わり等を明らかにする段階に入っている。また、雑種不妊に関しても、既に、候補遺伝子がヒストン結合能において分化を示すことが明らかになりつつあり、この分子機構をさらに追求することで、近縁集団間でのエピジェネティクス分化と種分化の関係を解明できると期待される。ネオ性染色体の研究に関しては、既に国際誌に論文を複数報告しており、現在、一報も改訂中である。

イトヨの複数集団のゲノム配列、ゲノム編集技術によるノックアウト、Tol2 を用いたトランスジェニック等は、今後の私の研究室の発展に欠かせない基盤情報と技術であり、3年でこれらの基盤を十分に整備できたことも大成功であった。また、エピジェネティクスとは違う異分野で研究していた私にとって、エピジェネティクスに関する多くの知識を習得できたこと、研究の進め方に関して専門のアドバイザーから適切なコメントを要所で頂けたことは今後の研究者とし

ての人生の大きな糧になることから、成功であったと評価する。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

表現型可塑性とエピジェネティクス制御の進化に関しては、表現型可塑性に関わる遺伝子が同定され、当該遺伝子のエピジェネティクスに関しては緒についたところである。種分化とエピジェネティクス制御に関しては、雑種不妊に関して候補遺伝子がヒストン結合能において分化を示すことが明らかになりつつある。

課題のスタートに当たりイトヨの全ゲノム解読初め、複数の課題に関わる原因遺伝子の解明のためにゲノム解析、QTL 解析など精力的に進めた。その結果、多くの候補遺伝子が同定されると共に種分化に関して DNA/クロマチン結合能に関わることが明らかになりつつあり、生物多様性の進化にエピジェネティクスが重要な役割を果たしている可能性を示唆した。イトヨにおける遺伝子操作法が確立したので、今後近縁種間でのエピジェネティック分化と種分化の関係、さらに表現型可塑性とエピジェネティクス制御の進化に関しても、当初の目的を達成することを期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yoshida, K. and **Kitano, J.** The contribution of female meiotic drive to the evolution of neo-sex chromosomes. *Evolution* (2012) 66: 3198–3208
2. **Kitano, J.**, S.C. Lema, J.A. Luckenbach, S. Mori, Y. Kawagishi, M. Kusakabe, P. Swanson, and C.L. Peichel. Adaptive divergence in the thyroid hormone signaling pathway in the stickleback radiation. *Current Biology* (2010) 20: 2124–2130.
3. Ishikawa, A., Takeuchi, N., Kusakabe, M., Kume, M., Mori, S., Takahashi, H., and **Kitano, J.** Speciation in ninespine sticklebacks: reproductive isolation and phenotypic divergence among cryptic species of Japanese ninespine stickleback. *Journal of Evolutionary Biology* (2013) 26: 1417–1430
4. **Kitano, J.**, Yoshida, K., and Suzuki, Y. RNA sequencing reveals small RNAs differentially expressed between incipient Japanese threespine sticklebacks. *BMC Genomics* (2013) 14:214
5. **Kitano, J.**, and Lema, S. C. Divergence in thyroid hormone levels between juveniles of marine and stream ecotypes of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Evolutionary Ecology Research* (2013) 15: 143–153

(2) 特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演(国際)

Okazaki Biology Conference at Okazaki (2012 March 21)

Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution at Kyoto (2011 Jul 27)

学会発表(国内)

2012年、2013年日本遺伝学会

2012年分子生物学会

2011年、2013年 日本動物学会

2012年日本進化学会

学会発表(海外)

2011年 Meetings for the American Fisheries Society

2012年 Stickleback Conference 2012

2013年 European Society for Evolutionary Biology

受賞

2011年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞

著作物

Ishikawa, A., and Kitano, J. (2012). Ecological genetics of thyroid hormone physiology in humans and animals. In: *Thyroid Hormones* (N. K. Agrawal Ed.) p.37-50, InTech

森 誠一・北野 潤 (2012) ドルフ・シュルーター 適応放散の生態学(日本語訳). 京都大学学術出版会

北野 潤・河田雅圭 (2012) 自然選択の直接観察. 第 13 章 エコゲノミクス —遺伝子からみた適応— (シリーズ 現代の生態学 7) 日本生態学会(編集) 共立出版

北野 潤 (2011) イトヨの行動遺伝学. 第 6 章 行動遺伝学入門—動物とヒトの“こころ”の科学— 小出剛・山元大輔(編集) 裳華房