

分化した集団間の比較ゲノム機能解析によるショウジョウバエ種多様化メカニズムの解明

●高橋 文

国立遺伝学研究所 集団遺伝研究系

<研究の目的と進め方>

現在様々な生物種のゲノム解読が進んでいるが、現存する多様な種が分化していくメカニズムについては未知な部分が多い。これを解明するためには、種多様化のソースとなる種内表現型変異に焦点をあて、種間ゲノムの比較と種内ゲノムの比較を有機的に結び付けていく必要がある。本研究では、分化の進んだ集団間でゲノムがどのように変化しているかを探ることで、種が多様化していくメカニズムを解明することが大きな目的である。

本研究に先立ち、申請者は種分化の前段階にあると考えられる分化の進んだキロショウジョウバエの集団を見つけた。西アフリカ産の系統 (MEL6) と台湾産の系統 (TW1) を比較してみると交尾相手の選好性、コンタクトフェロモンとされるクチクラ炭化水素成分組成、摂食行動、クチクラの pigmentation のパターンなどが異なることが明らかとなった。また、これらのゲノム間で不妊 (synthetic sterile) となるような遺伝子の組み合わせがある可能性も示唆されている。交尾相手の選好性や妊性に関わる形質の変異は将来、物理的隔離や自然選択をきっかけに集団間の生殖的隔離をもたらすポテンシャルを秘めている。このようなことから、この二つの系統の遺伝的変異は、種が分岐していく時にゲノム上のどのような遺伝子の変化が起きるか理解するためのモデルケースであると考えられる。

本研究では、これら分化の進んだ二つの系統の特徴的な表現型の違いを体系的にゲノム上の違いとしてマッピングしていくためのシステムを構築する。具体的には、複数形質のマッピングに用いることができる多数の組み換え体パネルを準備する。また、代表的な形質についてゲノムレベルでの遺伝子マッピングを行い、可能なものについては原因遺伝子を特定することをめざす。

<2007 年度の研究の当初計画>

2006 年度に計画していたゲノムワイドな組み換え体の作成は完了し、更にこれらの組み換え体を用いて、特徴的な形質である、1) 胸部クチクラの pigmentation のパターンの 3 つの表現型変異、2) 雄の交尾相手選好性についてゲノムレベルでの遺伝子マッピングを進めていく計画であった。

特に 1) については、2006 年度中に組み換え体によるマッピングが成功し、原因遺伝子は色素合成系に関与する酵素である *ebony* 遺伝子であることが明らかとなった (成果公表リファレンス 0707192344)。この遺伝子の発現量の違いが上記のような胸部三叉の pigmentation のパターンに変異の原因であることから、この遺伝子上流のゲノム領域について、比較ゲノム、進化的解析を進める計画であった。

2) に関しては、2006 年度中に明らかとなった行動の詳細な違いについて、更にゲノムワイドなマッピングを進めていくことを計画していた。

<2007 年度の成果>

上記、1)、2) の形質について得られた成果を下記に記す。

1) 胸部クチクラの pigmentation のパターンについて

上述のように、胸部三叉の pigmentation パターン変異の原因は、*ebony* 遺伝子の発現量の違いであることが、昨年度明らかとなったため、その上流配列の解析を行った。その際、① TW1 の採集地である台湾から約 200 km の近距離にある西表島の集団を用いた association 解析、②今年度公開となったショウジョウバエ 12 種ゲノムを用いた上流配列の解析、③遺伝子組み換えを利用した、実験的解析の 3 つの切り口で行った。

① 西表島の集団を用いた association 解析

西表の集団中には集団内多型が観察される。この集団からサンプリングした近交系統 13 系統について、この遺伝子領域約 13 kb の塩基配列を決定し、表現型との association を比較した結果、遺伝子上流領域の一部 (約 150 bp) と、この表現型変異の間に強い相関が見られた。

② ショウジョウバエ 12 種ゲノムを用いた比較解析

塩基配列が公開されたショウジョウバエ 12 種のゲノムのうち、アラインメントが可能であり、*ebony* 遺伝子のその 5' 側の隣にある遺伝子 (CG5892) の間の約 5kb の配列がそろっている 5 種のデータを用いて保存性の高い、よって機能があると予想される探索を行った。

VISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>) による解析の結果、キロショウジョウバエ近縁の 3 種でよく保存された領域 (約 150 bp) が上記①によって明らかとなった領域の近傍に存在することがわかった。このように、本年度はショウジョウバエ 12 種のゲノムの情報が公開され、それを利用することにより 2006 年度にはあまり進まなかった近縁種ゲノムの配列データとの比較解析による成果を得ることができた (図 1)。

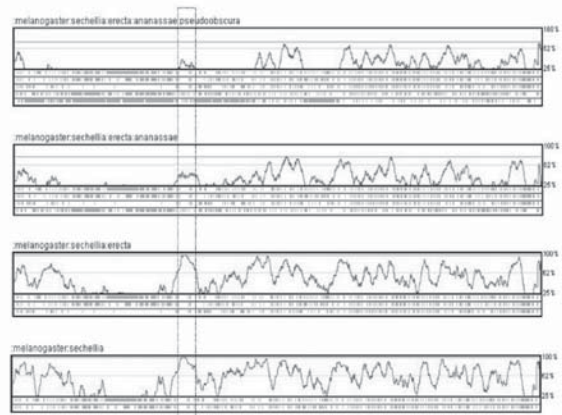


図 1. Phylo-VISTA による解析例

③ 遺伝子組み換えを利用した解析

上記①、②による結果を考慮してこれら2つの領域を含む約900 bpをMEL6系統よりPCRクローニングし、ミニマムプロモータ及びGAL4配列を含む遺伝子組み換え用ベクター(pPTGAL)に組み込んだ。これをハエにトランスフォームし、この領域にエンハンサー活性があるかどうかを調べた。この遺伝子組み換え体を、生命システム情報領域の上田龍班員から分譲していただいた *ebony* 遺伝子のUASによる誘導型RNAi系統とかけ合わせた結果、胸部三叉のpigmentationパターンが濃くなり、この領域にエンハンサー活性が存在することが明らかとなった。TW1由来の配列では活性がどう変わるかなどの実験を進めている。

2) 雄の交尾相手選好性について

実体顕微鏡付属のビデオカメラによる行動解析により、交尾前0.5秒以内の雌雄の距離がTW1系統の方がMEL6系統よりも小さいことが昨年度明らかとなった。このような交尾行動のゲノムワイドな遺伝基盤について調べるため、組み換え体を用いた行動解析を行った結果、第3染色体上にその原因因子が存在することが明らかとなった。更に、第3染色体の組み換え系統を用いた解析により右腕のdistal側領域に、この形質に対し効果の大きい因子が存在することが明らかとなった(図2)。

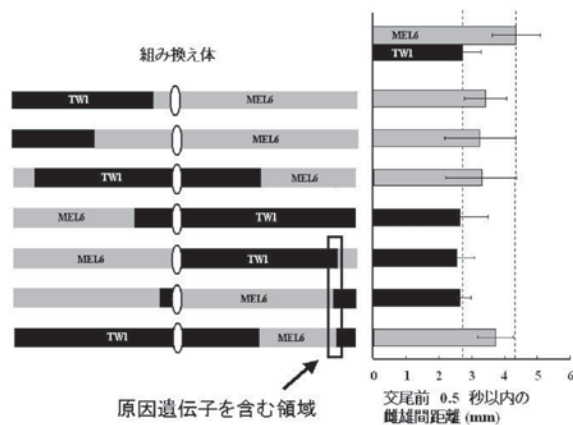


図2. 第3染色体組み換え体によるマッピング

<国内外での成果の位置づけ>

上記 1) 胸部三叉のpigmentationのパターンの変異について、ゲノムワイドなマッピングのための組み換え体を用いて行ったシステムティックなマッピングにより、自然集団に存在するこのような形質変異の原因遺伝子を明らかにしたことは意義が大きい。この原因遺伝子 *ebony* は、色素沈着に関与するだけでなく神経系での発現も見られるため、国内外で最も古くから存在が知られている遺伝子である。本研究による成果もその点意義を認められ、論文として出版することができた(リファレンス 0707192344)。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

上記 1) 胸部クチクラのpigmentationのパターンについて、この表現型と交尾相手の選好性の間に関係があることが示唆されたことから発展して、集団内のゲノムレベルでの遺伝子型の変異を解析するという考えを考えた。具体的には、理想集団中の進化的に中立な遺伝子が、Hardy-Weinberg平衡に達しているのに関して同類交配や集団の分化、自然選択の影響などによりこの平衡

から予測される遺伝子型頻度から有意にずれることが予想される。このことを利用し、*ebony* 遺伝子領域について自然集団から採集した500個体について遺伝子型を同定しようとしたが、遺伝子型のタイピングで以下のような手法的困難にぶつかり、進展しなかった。それは、ショウジョウバエには配列の挿入欠損による変異が多いため、PCR用プライマーがそのような箇所につかるとヘテロの頻度が過小評価されてしまうということである。複数のプライマーを作成したが、全てのalleleを評価できているかの判断が難しかった。

<今後の課題>

また、胸部クチクラのpigmentationの違うもの間で同類交配の傾向がみられることが昨年度示唆された。もしもこのような同類交配がみられるならば、種分化のポテンシャルとなり得る遺伝的変異ということになるため大変興味深い。これを示すために、上記組み換え体を用いた直接的な実験も今後進めていきたい。

また今後の課題として、上記のようなゲノムワイドな組み換え体ツールに加え、マイクロアレイデータの解析により得られたゲノム中の全遺伝子の発現プロファイルをもとに2つの系統間で発現量が大きく異なる遺伝子については、その遺伝子の機能情報から類推される形質に与える影響についての知見を得るという方向も検討したい。

<成果公表リスト>

論文/プロシーディング

0707192344

Takahashi, A., Takahashi, K., Ueda, R., and Takano-Shimizu, T. Natural variation of *ebony* gene controlling thoracic pigmentation in *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, 177, 1223-1237 (2007).