

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「ゲノムスケールの DNA 設計・合成
による細胞制御技術の創出」
研究課題「生殖システム進化を駆動するゲノム変化
の原理解明と操作」

研究終了報告書

研究期間 2018年10月～2025年03月

研究代表者：杉本 亜砂子
(東北大学 大学院生命科学研究科
教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究では、*Caenorhabditis* 属、*Pristionchus* 属、*Strongyloides* 属線虫をモデル系として用い、1) 生殖システムの変化がどのようなゲノム要素の変化と連動して引き起こされているのかを解明すること、2) 得られた知見に基づき、ゲノム改変によって生殖システムを人為的に操作すること、を目的としている。研究開始からこれまでに得られた成果は以下の通りである。

1. 線虫の生殖システム進化を駆動するゲノムスケール変化の解明

1-1) *Caenorhabditis* 属線虫の比較ゲノム機能解析による生殖システム変化に関わるゲノム要素の抽出

- ① *C. elegans* とその姉妹種 *C. inopinata* の性決定遺伝子経路遺伝子の機能比較(杉本グループ)
- ② *Caenorhabditis* 属線虫の保存された非コード配列比較による雌雄異体特異的な制御配列の同定(杉本グループ)
- ③ *C. inopinata* におけるトランスポゾン活性化とそのグローバルな遺伝子発現への影響の解析(杉本グループ・菊地グループ)
- ④ *C. elegans* と *C. inopinata* の形質の相違に影響を及ぼす遺伝子群の同定(杉本グループ)
- ⑤ *C. elegans* と *P. pacificus* の生殖顆粒構成因子の比較解析(杉本グループ)
- ⑥ *C. auriculariae* における染色体削減の発見とその分子メカニズムの解析(菊地グループ・杉本グループ)
- ⑦ *C. elegans* と *C. inopinata* の small RNA の網羅的比較解析(菊地グループ)
- ⑧ *C. inopinata* の野外ポピュレーション解析(菊地グループ)
- ⑨ 多様な線虫種の比較ゲノムに基づく生殖システムとゲノム多様性の解明(菊地グループ)

1-2) *Strongyloides* 属線虫の比較ゲノム解析による生殖システム変化に関わるゲノム要素の抽出

- ① *Strongyloides* 属線虫の性染色体削減の分子メカニズムの解析(菊地グループ・杉本グループ)

1-3) *Pristionchus* 属線虫の異種間交雑による生殖システム変化に関わるゲノム要素の抽出

- ① 三つの染色体の間の頻繁な染色体融合・開裂による生殖の雑種異常の発見(吉田グループ)
- ② 種分化の原因となる生殖的隔離を生み出す染色体進化の複数のメカニズムの発見(吉田グループ)
- ③ *P. mayeri* と *P. entomophagus* における環境依存的性決定による雌雄同体化の発見(吉田グループ)

2. ゲノムスケール操作による線虫生殖システムの人為的改変

2-1) *Caenorhabditis* 属線虫および *Pristionchus* 属線虫のゲノムスケール操作技術の開発

- ① *Caenorhabditis* 属線虫のゲノムスケール操作技術の開発(杉本グループ)
- ② *Pristionchus* 属線虫のゲノムスケール操作技術の開発(杉本グループ)

2-2) *Caenorhabditis* 属線虫の生殖システム改変

- ① *C. elegans* のホロセントリック染色体のモノセントリック化(杉本グループ)

2-3) *Pristionchus* 属線虫の生殖システム改変

- ① *P. mayeri* の *tra-1* 遺伝子破壊による完全な性転換(吉田グループ)
- ② *P. mayeri* の雄比率を上昇させる変異体の単離と性決定遺伝子の機能的進化(吉田グループ)

2-4) TAQing システムによる線虫ゲノムの大規模改変(杉本グループ・太田チームとの連携研究)

(2) 顕著な成果

＜優れた基礎研究としての成果＞

1. 染色体融合の種分化に関する影響

概要: 染色体融合は基本的なゲノム変異の一つであり、種間、種内でそのバリエーションは頻繁に観察されるものの、それがもつ進化的な意味についてはよくわかつていなかった。吉田グループと菊地グループは *Pristionchus* 属線虫の最近縁種の 2 種のゲノム解析により、複数の染色体融合が生じていることを明らかにし、遺伝的な解析により、それが生殖的隔離の進化を引き起こすメカニズムを明らかにし、この重大な問題に答えを与えた (Yoshida, et al., *Nat Eco Evo*, 2023; Yoshida, et al., *Nature Comm*, 2024)。

2. *Caenorhabditis* 属線虫群による進化生物学的比較モデル系の構築

概要: 菊地グループ・杉本グループはモデル線虫 *Caenorhabditis elegans* の姉妹種である *C. inopinata* のゲノム・トランスクリプトーム比較解析、および、遺伝子機能阻害実験を統合的に用いることにより、*C. inopinata* におけるトランスポゾン転移活性化が 2 種の形質の顕著な違いの要因となっている可能性を見出した (Kawahara, et al., *Genome Biol Evo*, 2023; Hatanaka, et al., *Genetics*, 2024)。*C. inopinata* の野外ポピュレーションの比較解析や、*Caenorhabditis* 属の生殖システム進化に寄与した非コード配列 (Conserved Non-coding Elements, CNE) の解析を実施した (Tamagawa, et al., *Science Advances*, 2024)。また、*C. angaria* をはじめとする *Caenorhabditis* 属線虫群のゲノム比較解析を通じて、転写因子と内胚葉形成の遺伝子ネットワークの進化的変遷を明らかにし、GATA 因子の機能多様性を解明することで、進化生物学的比較モデル系の構築に貢献した (Tintori, et al., *Development*, 2022)。さらに、*C. auriculariae* のゲノム解読から、体細胞系列で染色体削減が起きていることを発見した。以上のように、*Caenorhabditis* 属線虫群を比較モデル系とする進化生物学的研究の基盤を構築した。

3. *Caenorhabditis* 属線虫における染色体削減の発見

概要: 染色体削減はこれまで、主に寄生性線虫でおこることが知られていたが、寄生性線虫の材料としての扱いづらさから、その分子メカニズムには迫れていた。菊地グループはモデル生物 *C. elegans* の近縁種 *C. auriculariae* において体細胞型の染色体削減が起きていることを発見し、詳細なゲノム解析により、削減領域に含まれる遺伝子群や削減領域付近に特異的な DNA モチーフを同定した。さらに、杉本グループにおける分子遺伝学的・細胞生物学的解析により、*C. auriculariae* における染色体削減は初期胚 8~16 細胞期に起きること、テロメア結合タンパク質が寄与していることを明らかにした。*C. auriculariae* は、染色体削減のさらに詳細な分子メカニズムの解明に最適なモデルとなる。(論文準備中。)

＜科学技術イノベーションに大きく寄与する成果＞

1. 様々な線虫ゲノムの染色体レベルの解読

概要:これまでのゲノム解読は断片的で、染色体進化や遺伝子発現制御メカニズムなどの高解像度な解析の障害となっていた。菊地グループはロングリードシーケンサーや Hi-C 解析を組合せて、高い連續性を持つリファレンスゲノムの構築技術を確立し、寄生性線虫や自由生活線虫等、様々な線虫 30 種以上の染色体レベルでのゲノム解読を達成した。特に、*C. elegans* グループ内において、新たに発見した祖先種や最小ゲノムを持つ種などのゲノムを、最新の技術を駆使して染色体レベルの連續性で解読した。この成果は、ゲノム比較進化研究を染色体レベルで高解像度に行うことのできるプラットフォームを提供するもので、真核生物グループとして希少なものである。

2. 安定的な染色体融合ペアの同定

概要:吉田グループの解析から、完全な染色体レベルのゲノムアッセンブリが完成した *Pristionchus* 属線虫 6 種の間では 5 回の独立な染色体融合が生じているが、全てが同じ 3 つの染色体のうちの 2 つの融合であり、とくに、そのうちの 2 つは常に同じ方向のテロメア領域であることを明らかにした。このことは、そのテロメア領域が染色体融合を安定化する因子を持っていることを示している。将来的に生物の染色体を自由に操作する際にその因子は重要な役割をもつ。

3. テロメア付加による染色体数増加

概要:杉本グループは、*C. elegans* における TAQing 処理の際にテロメアリピート配列を持つ合成オリゴヌクレオチドを同時に導入することで、染色体数が増加した系統が得られることを見出した。また、CRISPR/Cas9 で染色体の特定の部位を切断するとともに、テロメアリピート配列を相同的な組み換えにより付加することによって、染色体を分断し染色体数を増加させることにも成功した。この染色体数増加には、線虫の染色体がホロセントリック(染色体全体にセントロメアが分散して存在)であることも寄与していると推測される。この知見は、染色体の人為的な大規模改変や人工合成の際の染色体要素配置デザインに寄与する。

＜代表的な論文＞(下線:チームメンバー、*:責任著者)

1. Yoshida K*, Rödelsperger C, Röseler W, Riebesell M, Sun S, Kikuchi T, Sommer RJ*. Chromosome fusions repatterned recombination rate and facilitated reproductive isolation during *Pristionchus* nematode speciation. *Nature Ecology and Evolution*, 7(3):424-439, 2023.

概要:最も近縁な線虫二種 *Pristionchus pacificus* と *Pristionchus exspectatus* の比較ゲノム解析や細胞遺伝学的解析により、2 種で独立に染色体融合が起ったことを明らかにした。さらに、交雑を用いた遺伝学的解析により、染色体融合によって組み換え率の変化が生じたこと、染色体融合の起った領域に、複数のメカニズムにより、生殖的隔離の原因となるゲノム変異が蓄積したことを明らかにした。

2. Kawahara K, Inada T, ...Kikuchi T, Sugimoto A, and Kawata M*. Differentially expressed genes associated with body size changes and transposable element insertions between *Caenorhabditis elegans* and its sister species, *Caenorhabditis inopinata*. *Genome Biology and Evolution*, 15, evad063,

2023.

概要: モデル線虫 *C. elegans* ではトランスポゾン転移は抑制されているが、姉妹種 *C. inoopinata* では、トランスポゾンが活性化されコピー数が大幅に増加している。*C. inoopinata*においてトランスポゾン増幅が形質進化に影響しているかどうかに着目して解析を行った。その結果、*C. elegans* ではトランスポゾン挿入により遺伝子発現が抑制されるのに対して、*C. inoopinata* では逆に遺伝子発現が亢進する傾向が示された。このことは、トランスポゾン増幅・転移がグローバルな遺伝子発現に影響を及ぼし、個体サイズ増大などの形質進化に寄与している可能性を示唆する。

3. Shinya R, Sun S, Dayi M, Tsai IJ, Miyama A, Chen AF, Hasegawa K, Antoshechkin I, Kikuchi T*, Sternberg PW*. Possible stochastic sex determination in *Bursaphelenchus* nematodes. *Nature Communications*, 13(1):2574, 2022.

概要: 松枯れ病の原因となる *Bursaphelenchus xylophilus* (雄と雌) とその近縁種 *Bursaphelenchus okinawaensis* (雌雄同体と雄) の染色体レベルのゲノム配列決定から、これらの線虫では雌雄同体または雌と雄の染色体本数には検出可能な違いではなく、確率的に性決定が行われていることが示唆された。*C. elegans* で詳細に解析されている性決定遺伝子経路の下流遺伝子である *tra-1* 遺伝子のオルソログが *B. okinawaensis* においても性決定に重要であることが示された。このことから、線虫の性決定経路は、性決定レギュレーター *tra-1* から「ボトムアップ」で確立された可能性が示唆された。

4. Tamagawa K, Dayi M, Sun S, Hata R, Kikuchi T, Haruta N, Sugimoto A*, Makino T*. Evolutionary changes of noncoding elements associated with transition of sexual mode in *Caenorhabditis* nematodes. *Science Advances*, 10(37):eadn9913, 2024.

概要: 雌雄異体から雌雄同体への進化は様々な生物種で起こっているが、その進化メカニズムは分かっていません。本論文では、複数の種で雌雄同体が進化してきた *Caenorhabditis* 属線虫を対象として、雌雄同体の進化に伴い急速に進化したゲノム中の非コード保存領域 (Conserved non-coding element: CNE) を網羅的に特定した。さらに、雌雄同体の CNE を雌雄異体の種に入れ替えることで、精子の形成に関わる遺伝子の発現を変化させることに成功した。

5. Yoshida K*, Witte H, Hatashima R, Sun S, Kikuchi T, Roseler W, and Sommer RJ*. Rapid chromosome evolution and acquisition of thermosensitive stochastic sex determination in nematode androdioecious hermaphrodites. *Nature Communications*, 15:9649, 2024.

概要: 線虫を含む一部の動物では雌雄異体から雌雄同体への進化が度々起こっている。本論文では、雌雄同体を進化させた *Pristionchus* 属線虫の遺伝機構を解析し、一部の雌雄同体の種では *tra-1* という遺伝子の ON/OFF を介して、確率的にオスを発生させる確率的性決定を進化的に獲得することで、雌雄同体が進化してきたことを明らかにした。生殖システム、性染色体、性決定システムの進化が相互に関係する進化ダイナミズムを世界ではじめて示した。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

1) 杉本グループ

- ① 研究代表者: 杉本 亜砂子 (東北大学生命科学研究科 教授)
- ② 研究項目: 生殖システム進化を駆動するゲノム変化の原理解明と操作
 - 1. 線虫の生殖システム進化を駆動するゲノムスケール変化の解明
 - 1-1) *Caenorhabditis* 属線虫の比較ゲノム機能解析による生殖システム変化に関わるゲノム要素の抽出
 - 1-2) *Strongyloides* 属線虫の比較ゲノム解析による生殖システム変化に関わるゲノム要素の抽出
 - 2. ゲノムスケール操作による線虫生殖システムの人為的改変
 - 2-1) *Caenorhabditis* 属線虫および *Pristionchus* 属線虫のゲノムスケール操作技術の開発
 - 2-2) *Caenorhabditis* 属線虫の生殖システム改変
 - 2-3) *Pristionchus* 属線虫の生殖システム改変
 - 2-4) TAQing システムによる線虫ゲノムの大規模改変(太田研究チームのチーム間連携研究)

2) 菊地グループ

- ① 主たる共同研究者: 菊地 泰生 (宮崎大学医学部 准教授→東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授)
- ② 研究項目: 比較ゲノム解析に基づく生殖システム進化原理の解明
 - 1. 線虫の生殖システム進化を駆動するゲノムスケール変化の解明
 - 1-1) *Caenorhabditis* 属線虫の比較ゲノム機能解析による生殖システム変化に関わるゲノム要素の抽出
 - 1-2) *Strongyloides* 属線虫の比較ゲノム解析による生殖システム変化に関わるゲノム要素の抽出
 - 2. ゲノムスケール操作による線虫生殖システムの人為的改変
 - 2-2) *Caenorhabditis* 属線虫の生殖システム改変

3) 吉田グループ

- ① 主たる共同研究者: 吉田 恒太 (Max Planck Institute for Developmental Biology, Senior Scientist→国立遺伝学研究所 特任助教 → 新潟大学脳研究所 特任教授(2024.1~))
- ② 研究項目: 異種間ハイブリッドゲノムを用いた生殖システム進化原理の解明
 - 1. 線虫の生殖システム進化を駆動するゲノムスケール変化の解明
 - 1-3) *Pristionchus* 属線虫の異種間交雑による生殖システム変化に関わるゲノム要素の抽出
 - 2. ゲノムスケール操作による線虫生殖システムの人為的改変
 - 2-3) *Pristionchus* 属線虫の生殖システム改変

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- 菊地グループは、International Helminth Genomes Consortium（国際寄生虫ゲノムコンソーシアム）のメンバーとして寄生性線虫ゲノム解析の国際連携活動に参画している（Comparative genomics of the major parasitic worms, *Nature Genetics* 51, 163-174 (2019)）。
- 杉本グループおよび吉田グループの *Pristionchus* 属線虫のゲノム解析および遺伝子操作技術開発については、Ralf Sommer 研究室（Max Planck Institute for Developmental Biology）と連携している。
- 杉本グループの *C. elegans* と *C. inopinata* 胚発生過程の比較解析については、理化学研究所 生命機能科学研究センターの大浪修一研究室と共同研究を行っている。