

精子の大きさと突然変異率の雌雄差との関連性についての分子進化学的解析
Evolutionary analysis of the relationship between sperm length and male-female
mutation bias

(日本遺伝学会推薦)

代表研究者 東京大学 星山大介 The University of Tokyo Daisuke HOSHIYAMA

Under the assumption that errors in DNA replication are the major source of mutations that contribute to molecular evolution, male serves as a major generator of mutations, because the number of cell division in spermatogenesis generally exceeds greatly that in oogenesis. This provides the theoretical basis for the male-driven evolution theory. There are some difficulties in the direct comparison of the numbers of cell division or mutation rates during gametogenesis in males and females, but in 1987, Miyata et al. proposed a simple model which allows an estimation of male-to-female mutation bias (α_m) from mutation ratio between autosomes and sex chromosomes.

Great variation in sperm length is identified among *Drosophila* species, some of which have giant sperms longer than their body lengths. I examined the association between sperm length and α_m , which was estimated from the ratio of synonymous substitution rates in genes on autosome, X chromosome, and Y chromosome. The estimated values of α_m in short and long sperm species were all close to 1.0: almost no male-to-female mutation bias was observed in the genus *Drosophila*. This result suggests that the number of sperms prepared in *Drosophila* species with giant sperm is comparable with that in other *Drosophila* species.

研究目的

一般に、精子は卵に較べて圧倒的に多くの数が作られる。そのために、精子形成時の細胞分裂の回数は卵形成時に較べて多くなり、それに伴って DNA 複製の回数も多くなる。例えばヒトの場合、精子形成時の分裂回数は卵形成時の 6 倍以上にもなる。したがって、DNA 配列上に起こる突然変異が主として DNA の複製エラーによるならば、大部分の突然変異はオス（精子を作る性）で起き、オスが配列進化に寄与していることになる。この予測はオス駆動進化説(male-driven evolution theory) [1] と呼ばれ、脊椎動物を中心にその検証が行われてきた。性染色体・常染色体の間の突然

変異率を比較することによって、オスとメスの間の突然変異率の差を推定した結果、オスの突然変異率はメスの2〜5倍程度あることがわかり[総説として2]、オス駆動進化説が広く成り立つことが示されている。

しかし、精子の大きさ・形は多様であることが知られており、昆虫やダニ、有肺類の特定の種で非常に巨大な精子を持つものが知られている。例えば、ショウジョウバエ属の1種 *Drosophila bifurca* では体長よりもはるかに長い 58 mm もの長さの精子を作る[3]。このような種では精子形成に対して大きなコストがかかるため、作られる精子の数が少なくなることが予想される。実際、*Drosophila* 属内の種間比較から、大きな精子を作る種では単位時間当たりで作られる精子の数が少ないこと[4]や、1回の交尾でメスに渡す精子の数が少ないこと[5]が知られている。したがって、巨大な精子を作る種では卵形成と精子形成の間で細胞分裂の回数がほとんど変わらないか、あるいは、卵形成時の方が多「メス駆動の進化」が見られる可能性がある。

そこで本研究では、特に精子の多様性が大きい *Drosophila* 属に着目し、精子の大きさと突然変異率の雌雄差との関連性を分子進化学的に解析し、オス駆動進化説の理論的な拡張を目指した。

研究経過

1. 突然変異率の雌雄差 α_m の推定方法

オス・メスの生殖細胞での突然変異率を直接測定することは非常に困難である。本研究では、常染色体と2種類の性染色体の間でオス・メスを経由する割合が異なることを利用して、分子進化学的解析から突然変異率の雌雄差を推定する[1]。

具体的な方法を哺乳類などで見られる XY 性染色体システムで説明する。なお、本研究で用いる *Drosophila* 属は、常染色体と X 染色体の数の比で性決定が行われるが、XY 性染色体システムをとっている。X 染色体を1つ持ち、Y 染色体を持たない XO の個体はオスの表現型を示すものの不妊となる。

XY 性染色体システムではオスが X 染色体、Y 染色体を1つずつ、メスが X 染色体を2つ持つ。常染色体は両性とも2つずつ持つので、ある染色体を見たときにメスを経由してきた確率とオスを経由してきた確率はともに $1/2$ である。ここで、メスの突然変異率を1とし、オスの突然変異率をその α_m 倍とすると、常染色体の突然変異率は $1 \times (1/2) + \alpha_m \times (1/2) = (1 + \alpha_m)/2$ と表すことができる。次に X 染色体について考えると、メスは X 染色体を2つ、オスは1つ持つことから、メス・オスの經由確率はそれぞれ $2/3$ 、 $1/3$ となる。したがって、X 染色体の突然変異率を α_m を使って表すと、 $1 \times 2/3 + \alpha_m \times 1/3 = (2 + \alpha_m)/3$ となる。最後に、Y 染色体の突然変異率は、 $1 \times 0 + \alpha_m \times 1 = \alpha_m$ となる。以上をまとめると、染色体間の突然変異率の比は、

$$\text{常染色体} : \text{X 染色体} : \text{Y 染色体} = (1 + \alpha_m)/2 : (2 + \alpha_m)/3 : \alpha_m$$

と表すことができる。よって、染色体間の突然変異率の比がわかれば、そこから逆に α_m の値を求めることができる。

分子進化の中立説によれば、機能的制約の働いていない配列は突然変異率のみに依存して変化する

る。そこで本研究では、近縁な2生物間で同義置換率（コードするアミノ酸を変化させないような塩基配列の置換の割合）を測定し、各染色体の突然変異率を求め、その比から α_m の値を推定した。

2. 既知のゲノム配列を利用した突然変異率の雌雄差 α_m の推定

Drosophila 属の精子の長さは 0.3 mm から 58 mm 程度と約 200 倍の違いがある [3]。*Drosophila* 属の中では比較的短い精子を持つ、*D. pseudoobscura*（精子の長さは約 0.36mm、精子の長さについては以降も文献 3 を参考にした）と *D. persimilis* (0.32mm)、*D. melanogaster* (1.91mm) と *D. simulans* (1.14mm) の2組については、データベース上に登録されたゲノム配列を用いて、常染色体、X 染色体上の多数の遺伝子について同義置換率を測定することができる。また、*D. melanogaster* と *D. simulans* の組については、Y 染色体上の7 遺伝子について同義置換率を求めることができる。各染色体上の遺伝子の同義置換率の平均値と、常染色体と X 染色体の同義置換率の比から推定した α_m の値を Table 1 にまとめた。また、*D. melanogaster* と *D. simulans* の組で測定した同義置換率の分布を各染色体ごとに示した (Fig.1)。

Table 1. Synonymous substitution rates and male-to-female mutation ratio α_m in *Drosophila* species with relatively short sperms.

Species	Sperm length, mm	Synonymous substitution rate (\pm S.D.) [No. of Genes]		α_m
		Autosome	X chromosome	
<i>D. pseudoobscura</i>	0.36	0.0323 (\pm 0.0215) [5269]	0.0329 (\pm 0.0228) [2837]	0.89
<i>D. persimilis</i>	0.32	[5269]		
<i>D. melanogaster</i>	1.91	0.132 (\pm 0.046) [8729]	0.136 (\pm 0.057) [1287]	0.83
<i>D. simulans</i>	1.14			

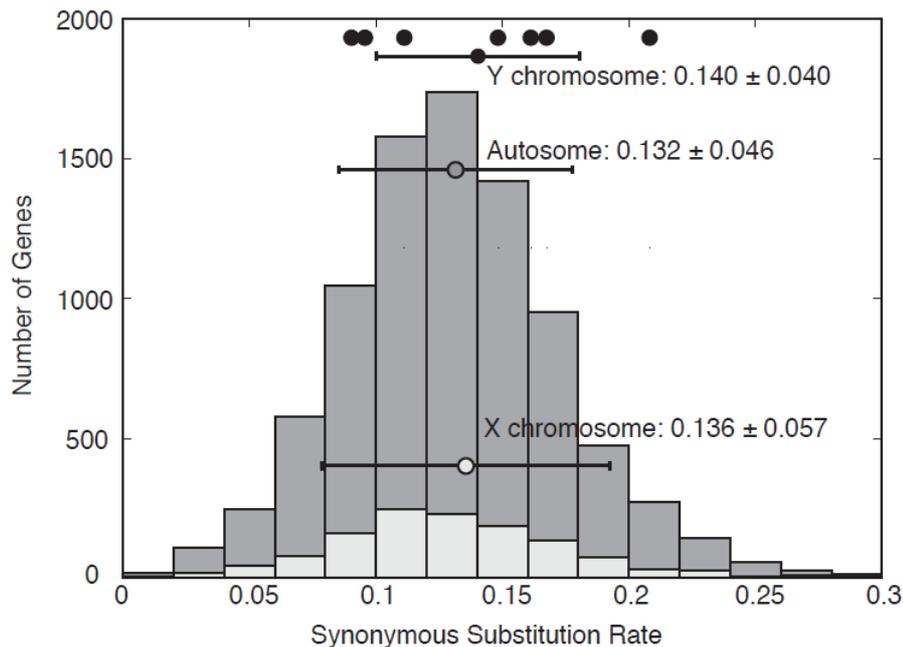


Fig.1

Fig.1 Distribution of synonymous substitution rates between *D. melanogaster* and *D. simulans* in genes on autosomes, X chromosome, and Y chromosome. Bars show the number of genes on autosomes (dark gray bars) and X chromosome (light gray bars) within each bin. Synonymous substitution rates in seven genes on Y chromosome are indicated at the top of the graph by closed circles. The values shown are means \pm SD.

推定された α_m の値は *D. pseudoobscura* - *D. persimilis*、*D. melanogaster* - *D. simulans* の両方の組において1よりもわずかに小さい値で、突然変異率の雌雄差はほとんどないことがわかる。これは、*D. melanogaster* - *D. simulans* 間で、常染色体とX染色体上の遺伝子を使ったこれまでの α_m の推定結果[6,7,8,9]と一致する。また、*D. melanogaster* - *D. simulans* の組み合わせについて、X染色体とY染色体の間で α_m を推定すると、 $\alpha_m = 1.04$ となる。これも、1に非常に近い値である。したがって、*Drosophila* 属の中で比較的短い精子を持つ種では、突然変異率の雌雄差はほとんどないといえる。

3. 巨大精子を持つ *Drosophila* の遺伝子配列決定と突然変異率の雌雄差 α_m の推定

Drosophila 属では12種のゲノム配列がすでに決定されている[10]が、非常に長い精子を作る種はこの中には含まれておらず、その遺伝子配列はほとんどわかっていない。巨大精子を持つ種でも突然変異率の雌雄差 α_m の推定を行うために、各染色体上の遺伝子の配列決定を行った。

未知塩基配列を複数種で迅速に決定するために、縮退プライマー (degenerate primer) を設計して目的配列をPCR (Polymerase Chain Reaction) 法により増幅し、塩基配列を決定する方法を用いた。この用法により、X染色体上、Y染色体上のそれぞれ3遺伝子、常染色体上の1遺伝子につ

いて配列決定を行った。

配列決定に用いる種は *D. nanoptera* (精子の長さは約 15.7mm)、*D. pachea* (16.5mm)、*D. bifurca* (58.3mm)、*D. hydei* (23.3mm) の 4 種で、これらの生体試料は UC San Diego Drosophila Species Stock Center より購入した。実体顕微鏡下で雌雄の判別を行い、1 個体ずつ genomic DNA 抽出あるいは、total RNA 抽出を行った(雌雄判別と DNA 抽出については放送大学の二河成男博士にご指導いただいた)。Total RNA は逆転写反応を行い、cDNA を合成した。これを縮退プライマーによる PCR 法の鋳型として用い、目的遺伝子の配列を増幅した。増幅産物は電気泳動により目的の長さの DNA が増幅していることを確認したのち、DNA シークエンサーによる塩基配列決定を行った(塩基配列の決定では、JT 生命誌研究館の宮田隆博士、蘇智慧博士、尾川武史博士、京都大学の岩部直之博士、佐々木剛博士にご協力いただいた)。

一連の実験によって、*D. nanoptera* で 4 遺伝子、*D. pachea* で 6 遺伝子、*D. hydei* で 7 遺伝子の配列を決定することができた。*D. nanoptera*–*D. pachea* の間において、X 染色体上遺伝子と Y 染色体上遺伝子の同義置換率の比から α_m を推定したところ、 $\alpha_m = 1.05$ という推定値が得られた。これは、短い精子を作る *D. melanogaster*–*D. simulans* の間で求めた $\alpha_m = 1.04$ という値と同じく、1 に近い値であることから、10mm を超える長い精子を形成する種でも突然変異率の雌雄差はほとんどないことが示唆された。

考察

精子の長さに最大 200 倍ほどの違いがある *Drosophila* 属の間で突然変異の雌雄差 α_m (オスの突然変異率/メスの突然変異率) を推定し、精子の大小と α_m との関連性を調べた。その結果、比較的小さな精子を持つ *D. melanogaster*–*D. simulans* 間、*D. pseudoobscura*–*D. persimilis* 間で推定した α_m と、大きな精子を持つ *D. nanoptera*–*D. pachea* 間で推定した α_m は両方とも 1 に近い値だった。これは、*Drosophila* 属一般に、精子の大小に関わりなく突然変異率はオスとメスの間でほとんど違いがないことを示唆している。これは、脊椎動物で広くオス駆動進化 ($\alpha_m > 1$) が見られるのと対照的である。

Drosophila 属でオス駆動の進化が起こっていない理由の 1 つとして、*Drosophila* 属の精子は概して脊椎動物のものよりも大きいことが考えられる。ヒトの精子は 0.06 mm (60 μ m) であり、これと較べると *Drosophila* 属の精子 (0.3 mm–58 mm) はどれもかなり大きい。

より興味深いのは、巨大な精子を作る種においても α_m の値は 1 に近く、 α_m が極端に低い値をとるようなメス駆動の進化が見られなかったことである。これは、巨大精子を作る *Drosophila* でも、小さな精子を作る種と同程度の数を作っていることを示唆している。巨大精子を作る種では、単位時間当たりに作られる精子の数が少なく[4]、1 回の交尾でメスに渡す精子の数が少ない[5]といった、精子を作るコストの増大に伴う「精子の希少性」を思わせる性質が見られる。*D. melanogaster* のような小さめの精子を作る種ではメスの再交尾頻度は非常に低く、メスは一度交尾をすると 24 時間以内にもう一度交尾をする割合は 2%ほどしかない。しかし、大きな精子を作る *D. hydei* や *D.*

nannoptera では 24 時間以内の再交尾頻度は 100%近い[11]。大きな精子は貴重であるため、これらの種ではオスの交尾の成功率が高い[4]。このように、巨大な精子を作るコストが雌雄の配偶行動にまで影響を与えている。

しかし、今回の解析からは、巨大精子を作る種でも、他の *Drosophila* と同程度の数の精子が作られていることがうかがえる。これには、体サイズに比して精巣が大きいこと[4,5]やオスが性成熟するまでの期間が非常に長い[3]といった、かなりの負担があるように思われる。このようなコストの増大に抗してなぜ巨大精子が進化したのかという疑問が生じるが、これについてはいまのところはっきりとした結論は出されていない。

今回使用した *Drosophila* は、動物界の中でも非常に大きな精子を作る種を含む。今後、既知の精子で最大のものを作る *D. bifurca* の配列解析を進める、解析に用いる遺伝子の数を増やすなどデータの拡充を行うことが必要であるが、現時点において、非常に大きな精子を作る種であっても、オスの基本戦略、すなわち、配偶子 1 つ当たりの資源を小さくして配偶機会を増やすという戦略を覆すほどではない、ということが示唆された。

研究発表

以上の結果を、学術誌へ投稿・発表すべく準備を進めている。

参考文献

1. Miyata, T, Hayashida, H, Kuma, K, Mitsuyasu, K, Yasunaga, T. Male-driven molecular evolution: a model and nucleotide sequence analysis. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1987;52(0):863-7.
2. Li, WH, Yi, S, Makova, K. Male-driven evolution. Curr Opin Genet Dev 2002;12(6):650-6.
3. Pitnick, S, Markow, TA, Spicer, GS. Delayed male maturity is a cost of producing large sperm in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92(23):10614-8.
4. Bjork, A, Pitnick, S. Intensity of sexual selection along the anisogamy-isogamy continuum. Nature 2006;441(7094):742-5.
5. Pitnick, S. Investment in testes and the cost of making long sperm in *Drosophila*. Am. Nat. 1996;148(1):57-80.
6. Bauer, VL, Aquadro, CF. Rates of DNA sequence evolution are not sex-biased in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. Mol Biol Evol 1997;14(12):1252-7.
7. Betancourt, AJ, Presgraves, DC, Swanson, WJ. A test for faster X evolution in *Drosophila*. Mol Biol Evol 2002;19(10):1816-9.
8. Bartolomé, C, Maside, X, Yi, S, Grant, AL, Charlesworth, B. Patterns of selection on synonymous and nonsynonymous variants in *Drosophila miranda*. Genetics 2005;169(3):1495-507.

9. Thornton, K, Bachtrog, D, Andolfatto, P. X chromosomes and autosomes evolve at similar rates in *Drosophila*: no evidence for faster-X protein evolution. *Genome Res* 2006;16(4):498-504.
10. Drosophila 12 Genomes Consortium. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 2007;450(7167):203-18.
11. Markow, TA, O'Grady, P. *Drosophila*: a guide to species identification and use. Academic Press 2005