

令和元年6月6日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07169

研究課題名(和文) カメ類のミトコンドリア遺伝子と核遺伝子の大量比較に基づく分子進化特性の解明

研究課題名(英文) Comparison of molecular evolutionary properties between mitochondrial and nuclear genes in turtles

研究代表者

熊澤 慶伯 (Kumazawa, Yoshinori)

名古屋市立大学・大学院システム自然科学研究科・教授

研究者番号：60221941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、カメ類の代表種からミトコンドリアゲノム全塩基配列と核遺伝子に関するオースロガスcDNA塩基配列データセットを取得し、以下の諸点を明らかにした。1)カメ類の様々な系統で、ミトコンドリアタンパク質遺伝子の読み枠に新しい翻訳フレームシフトを発見し、フレームシフト部位におけるmRNA構造上の特徴を示した。2)カメ類の分子進化速度はカメ類全体で一様に低下しておらず、カメ類の系統ごとに異なる。3)系統的有用度の極大値を示す年代域に関して、多くの核遺伝子はミトコンドリア遺伝子よりも大幅に古い。4)カメ類の高次系統解析に適した単一コピー核遺伝子の候補を50個以上見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、様々なカメ類からミトコンドリアゲノムと核ゲノムにコードされる遺伝情報を迅速に決定して系統解析に利用する方法を探求した。分岐年代が7千万年前を超えるような高次の系統解析には、ミトコンドリア遺伝子よりも核遺伝子の方が概して有用性が高いことを示し、今後の研究で利用可能な核遺伝子の候補をいくつか提案した。核遺伝子の情報を網羅的に取得するには特定臓器を用いたRNAシーケンシングの手法が優れていることも示した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we determined complete mitochondrial DNA sequences and obtained datasets of orthologous cDNA sequences from representative turtle species. We found some new translational frameshifts in the turtle mitochondrial protein-coding genes and showed mRNA structural features at and around the frameshift site. We showed that molecular evolutionary rates are not homogeneous among turtle lineages. Most nuclear genes had much older optima in the phylogenetic informativeness profile than mitochondrial genes. We proposed more than 50 candidate single-copy nuclear genes that may be suitable for deep-branch phylogenetic analyses in turtles.

研究分野：分子系統進化学

キーワード：カメ ミトコンドリア遺伝子 核遺伝子 系統的有用度 翻訳フレームシフト RNAシーケンシング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の遺伝情報は核ゲノムとミトコンドリアゲノムによって担われているが、両ゲノムはそのサイズ・形状・細胞内のコピー数・遺伝様式・コードする遺伝子の機能などで大きく異なっている。様々な核遺伝子やミトコンドリア遺伝子が配列決定され分子系統解析に用いられてきたが、各々の遺伝子の分子進化特性はまだ十分理解されていない。

第一に、各遺伝子がどの程度の時間スケールにおいて、優れた系統学的特性を發揮するのかがよく分かっていない。塩基置換速度が高いミトコンドリア遺伝子の場合、平行置換による非相同同形がノイズとして蓄積し、系統推定の確度や精度が低下する危険が指摘されている。また遠縁タクソン間の分子距離を過小評価することで、内群の分岐年代が過大推定されるという危険も指摘されている。では、どの時間スケールであればミトコンドリア遺伝子は優れた系統学的特性を發揮しうるのだろうか？こうした問題にはまだ十分な検討が行われていない。一方、核遺伝子はタンパク質をコードするものだけでもゲノム中に2-3万個も存在し、それらの多くは多重遺伝子族の一員である。パラログをゲノム上に持つ核遺伝子も多く、実際にどのような核遺伝子が系統解析に有効であるのかはまだよく分かっていない。

第二に、鳥類やカメ類のような一部の動物群のミトコンドリアゲノムにコードされるタンパク質遺伝子には、翻訳コドンフレームのずれが生じていることが知られている。これまでにカメ類ではND3 遺伝子やND4L 遺伝子などで翻訳フレームシフトが見つかったが、この現象の分子メカニズム(翻訳レベルのコドンフレームシフトを生じさせる mRNA 等の構造上の特徴)や分子進化様式(特定の系統で生じた稀な現象が複数系統で独立して生じたのか)などは依然として不明である。

カメ目(爬虫綱)は、甲という極めて特異な形態を進化させた脊椎動物の1群で、340種余り(14科、94属)の現生種を含む。Aviséら(1992, MBE 67:682-695)は、カメ類の分子進化速度が哺乳類などよりも数倍遅いことを示し、カメ類の代謝率の低さや世代時間の長さが分子進化速度の低下と関係しているとの仮説を提唱した。しかし、カメ類は陸棲から海棲・半水棲まで様々な生活様式を持つ種を含み、世代時間も10-50年と幅広い。カメ類全体について分子進化速度が減少しているのかどうかはさらに検証を加える必要がある。

以上のことから、我々はカメ類を題材として取り上げ、ミトコンドリア遺伝子と核遺伝子の塩基配列を次世代シーケンシングの手法を用いて新たに決定するとともに、それらの分子進化特性を調べることにした。

2. 研究の目的

本研究では、次世代シーケンス技術を用いたハイスループットな方法(図1)により、カメ類の代表種からミトコンドリアゲノム全塩基配列と核遺伝子に関するオーソログ cDNA 塩基配列データセットを取得する。これらに基づいてカメ類の系統関係を構築し、それに立脚してミトコンドリア遺伝子と核遺伝子の分子進化特性の比較を行う。その際、以下の諸点に特に注目する。1)各遺伝子がどの時間スケールにおいて最も優れた系統推定能力を有するのか。2)カメ類の高次系統解析に適した核遺伝子はどれか。3)カメ類のミトコンドリア遺伝子に存在する翻訳フレームシフトの分子機構と分子進化様式。4)カメ類の分子進化速度はカメ類全体で一様に低下しているのか。

3. 研究の方法

カメ目の主要なグループの代表種でミトコンドリアゲノム全塩基配列を決定した。図1に示すように、まずミトコンドリアゲノムのほぼ全周を増幅するロングPCRを行い、この増幅産物を細断したのち、マルチプレックス化した次世代シーケンシングにより100-200bpのショートリードを多数読み取った。これらを種ごとにアセンブルしてミトコンドリアゲノム全塩基配列を復元した。一方、核遺伝子由来のcDNA塩基配列データも図1に示す方法で取得した。カメ類の新鮮な肝臓からmRNA画分を調製し、これを重金属と熱により細断後、逆転写の過程を含む手順によりRNAシーケンシングのライブラリーを構築した。このライブラリーの両方向から100-150bpの塩基配列をランダムに読み取ったのち、Trinityを用いたアセンブルを行い、多数のコンティグおよび同一遺伝子座由来のコンティグを統合したアイソグループを取得した。ゲノムデータベースに存在する他種のデータも含めて、Transdecoderを用いたアミノ酸配列への翻訳、Orthofinderを用いたorthogroupの同定を行なった。

決定されたミトコンドリアゲノム塩基配列に存在する37遺伝子を同定し、アノテーションを行なった。タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列とその予想翻訳産物を他種の相同配列と比較し、翻訳フレームシフトが存在するかどうかを調べた。翻訳フレームシフトが認められた場合は、フレームシフト部位およびその周辺の塩基配列に共通の特徴が見られるかを調べた。カメ類の各系統における分子進化速度の比較は、ミトコンドリアタンパク質遺伝子の塩基配列を用い、multidistributeを用いたrelaxed-clockベイズ解析により行なった。ミトコンドリア遺伝子と核遺伝子での系統推定能力の比較は、両者で同一のタクソンサンプリングに基づき行なった。PhyDesignを用いてPhylogenetic Informativeness(系統的有用度)(Townsend 2007, Syst Biol 56:222-231)を求め、それぞれの遺伝子が系統解析に最も適した時間スケールを推定した。

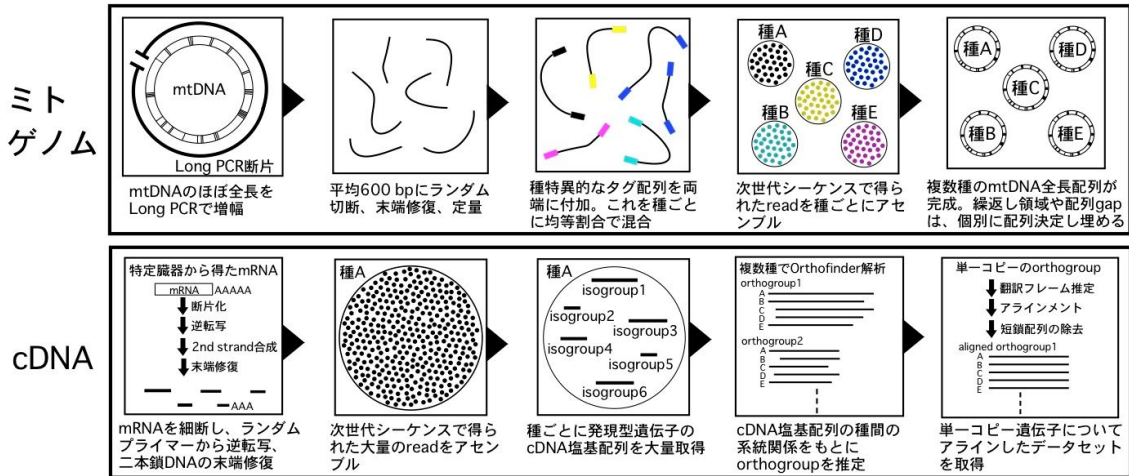


図1 ミトゲノム全塩基配列（上段）とcDNAオースログ塩基配列（下段）の取得手順の概要

4. 研究成果

(1) ミトコンドリアゲノムのシーケンシングと翻訳フレームシフト解析

本研究では 20 種のカメ類からミトコンドリアゲノムのシーケンシングを行い、それらのゲノムにコードされる遺伝子のアノテーションを行なった。コードされる遺伝子の配置は、ヒトなどで見られるいわゆる典型的な脊椎動物型の配置と同一であった。これらのカメ類には既知のものや未知のものを含め様々な翻訳フレームシフトが見つかった。このうち Cytb-493 はナンベイヨコクビガメ科のオオアタマヨコクビガメのみに見られる新規フレームシフトであった。また N4L-234 はヌマガメ科の一部に、N3-135 と N4L-99 と N4L-262 はアフリカヨコクビガメ科の一部にのみ見られた。鳥類にも見られる N3-174 は、ヌマガメ科、オサガメ科、ヘビクビガメ科などに属する一部の種だけで存在していた。カメ類の系統関係をもとにこれらの翻訳フレームシフトの出現時期を最節約的に推定したところ、N3-174 は複数のカメ類系統で何度も繰り返し出現した一方で、残りの翻訳フレームシフトは特定の系統で 1 回だけ出現したことが示唆された。フレームシフト部位周辺の塩基配列には高い共通性が認められた。Cytb-493 を除く全てのフレームシフトは、ロイシンをコードする CTN コドンに続く A の位置で起きており、これに続く塩基は G であった。ただし Cytb-493 だけはグリシンをコードする GGG コドンに続く A の位置でフレームにずれが生じていることが分かった。従ってこれらの翻訳フレームシフトの分子機構は非常に共通性の高いものと思われるが、必ずしも単一の機構によるものとは断定できない結果が得られた。

(2) 分子進化速度の多様性

ミトコンドリアゲノムにコードされるタンパク質遺伝子の塩基配列を用いて、カメ類の種間の系統関係を構築し、これに基づきそれぞれの枝での分子進化速度を推定したところ、ヨコクビガメ類の 2 科やドロガメ科において有意な進化速度の上昇が見られたのに対し、ウミガメ科等では進化速度の低下が認められた。この結果は、カメ類において一様に分子進化速度が低下していることを示唆した Avise ら (1992, MBE 67:682-695) の結論とは異なり、カメ類のなかでも分子進化速度に多様性があることを示唆している。ただし、分子進化速度と体重、代謝率、寿命などの要因との間に単純な相関は見出されておらず、今後さらに詳しい解析が必要である。

(3) 系統的有用度を用いた遺伝子間の分子進化特性の比較

ニホンイシガメおよびニホンスッポンから肝臓由来の RNA シーケンシングを行い、それぞれ約 4 千万 read の塩基配列を取得した。ここからそれぞれ約 8 万個と 11 万個のアイソグループ塩基配列を取得し、これらの中に存在するコード領域のアミノ酸配列を同定して取得した。カミツキガメ、カロリナハコガメ、キスイガメ、ミシシッピニオイガメ、クリイロハコヨコクビガメのデータとあわせて Orthofinder を用いた orthogroup の同定を行なったところ、パラログが存在しない単一コピー遺伝子に相当すると考えられるオースログ系列を 114 個同定できた。このなかでアライン後のアミノ酸配列が 200 アミノ酸残基長を超えるもの 55 個につき、系統的有用度を推定した。一方、同一のタクソンサンプリングにおけるミトコンドリアタンパク質遺伝子のアミノ酸配列 (アミノ酸残基長が比較的長い 10 遺伝子の翻訳産物) についても同様に系統的有用度を推定した。

図 2 に得られた結果の一部を示す (核遺伝子については 55 遺伝子からランダムに選んだ 10 遺伝子の結果のみ示す)。ほとんどの核遺伝子が 8 千万年前以前 (平均 1 億 2 千 7 百万年前) に系統的有用度の極大値を持つのにに対し、ミトコンドリア遺伝子は 2 千万年前から 7 千万年前 (平均 5 千万年前) に極大値を持っていた。従ってミトコンドリア遺伝子は、アミノ酸配列を用いて系統解析を行なったとしても、7 千万年前を超えるような深い分岐を対象とする系統

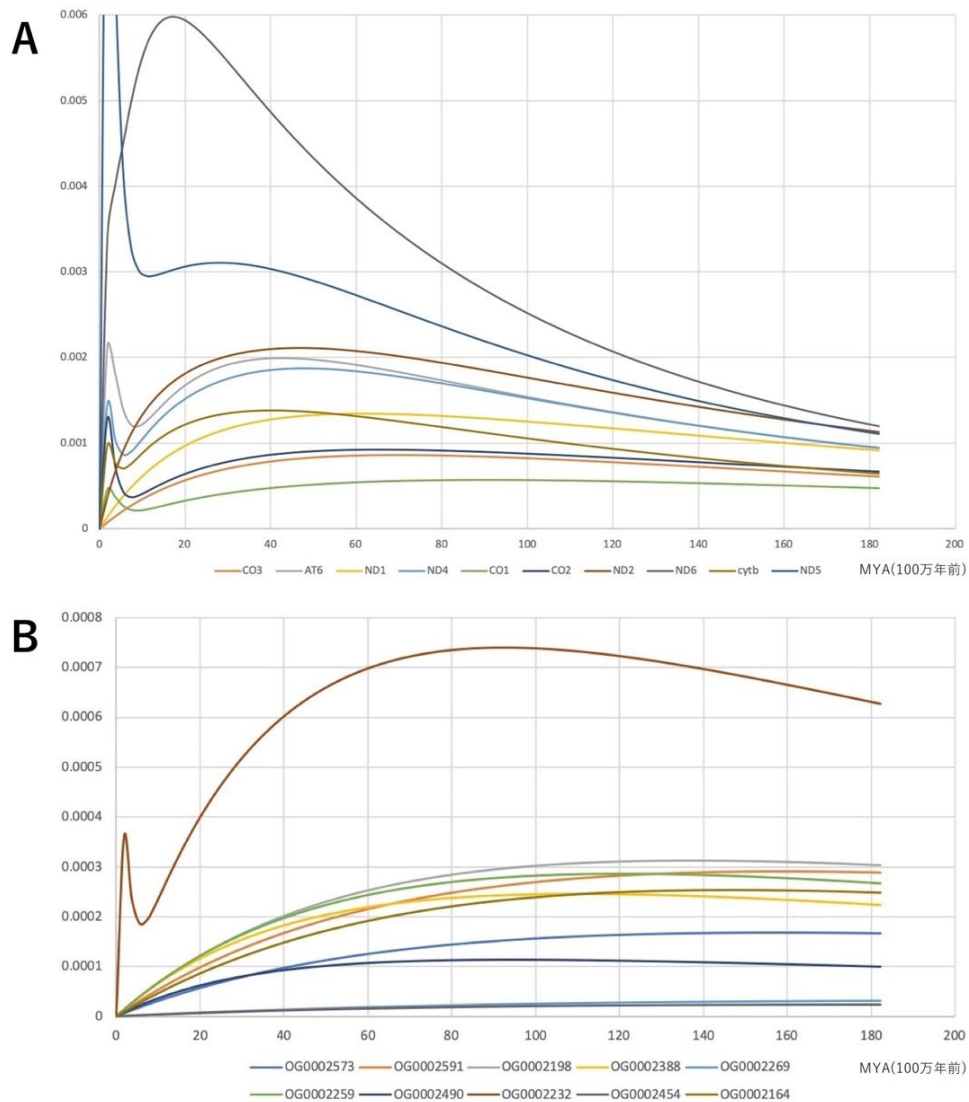


図2. カメ類のミトコンドリア遺伝子 (A) と核遺伝子 (B) のアミノ酸配列におけるPhylogenetic informativenessの比較
10MYA以下に出現する鋭いピークは非特異的な解析ノイズを反映したもの

関係や分岐年代の推定には適さないことが示唆された。一方、RNA シーケンシングで得られた上記 55 個の核遺伝子のアミノ酸配列は、カメ類の高次系統推定に適した遺伝子の候補であると考えられる。通常の PCR を含んだ実験手法では、それらの遺伝子のイントロン領域まで増幅されてしまうため、効率的にコード領域の塩基配列決定を行うことが難しい。本研究で行なったような特定臓器（肝臓）由来の RNA シーケンシングを用いればそれが容易であり、我々は RNA シーケンシングによる系統推定法の有効性を示す研究を行えたものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Matsubara K., [Kumazawa Y.](#), Ota H., Nishida C. and Matsuda Y. (2019) Karyotype analysis of four blind snake species (Reptilia: Squamata: Scolecophidia) and karyotypic changes in Serpentes. *Cytogenetic and Genome Research* 157(1-2): 91-99. 査読有
DOI:10.1159/000496554

Atminarso D., Wibowo A., Kusuma W.E., Prianto E., Ahnelt H., Vasemägi A. and [Kumazawa Y.](#) (2018) The complete mitochondrial DNA sequence of *Pectenocypris* sp. (Actinopterygii: Cyprinidae) from Serkap River, Sumatra, Indonesia. *Mitochondrial DNA Part B* 3(1): 122-124. 査読有
DOI:10.1080/23802359.2018.1424585

Sun Y., Kurisaki M., Hashiguchi Y. and [Kumazawa Y.](#) (2017) Variation and evolution of polyadenylation profiles in sauropsid mitochondrial mRNAs as deduced from the high-throughput RNA sequencing. *BMC Genomics* 18: 665. 査読有
DOI:10.1186/s12864-017-4080-0

Kusuma W.E., Samuel P.D., Wiadnya D.G.R., Hariati A.M. and [Kumazawa Y.](#) (2017) Complete mitogenome sequence of *Rasbora argyrotaenia* (Actinopterygii: Cyprinidae).

Mitochondrial DNA Part B 2(2): 373-374. 査読有

DOI:10.1080/23802359.2017.1347835

Kusuma W.E., Ratmuangkhwang S. and Kumazawa Y. (2016) Molecular phylogeny and historical biogeography of the Indonesian freshwater fish *Rasbora lateristriata* species complex (Actinopterygii: Cyprinidae): cryptic species and west-to-east divergences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 105: 212-223. 査読有

DOI:10.1016/j.ympev.2016.08.01

Kusuma W.E. and Kumazawa Y. (2016) Complete mitochondrial genome sequences of two Indonesian rasboras (*Rasbora aprotaenia* and *Rasbora lateristriata*). *Mitochondrial DNA Part A* 27(6): 4222-4223. 査読有

DOI:10.3109/19401736.2015.1022749

Matsubara K., Nishida C., Matsuda Y. and Kumazawa Y. (2016) Sex chromosome evolution in snakes inferred from divergence patterns of two gametologous genes and chromosome distribution of sex chromosome-linked repetitive sequences. *Zoological Letters* 2: 19. 査読有

DOI:10.1186/s40851-016-0056-1

〔学会発表〕(計 5件)

Yao Sun, Masaki Kurisaki, Yasuyuki Hashiguchi, Yoshinori Kumazawa : Evolution of structural and abundance profiles in vertebrate mitochondrial mRNAs. SMBE 2018 Yokohama Japan, Pacifico Yokohama (Yokohama)、2018年7月9日

孫 垚、栗崎正希、橋口康之、熊澤慶伯 : 脊椎動物ミトコンドリア mRNA におけるポリアデニル化サイトの網羅的探索と分子進化。日本進化学会第19回大会、京都大学(京都市)、2017年8月24日

孫 垚、栗崎正希、橋口康之、熊澤慶伯 : RNA-Seq を用いた竜弓類ミトコンドリア mRNA の polyA 付加サイトの網羅的解析。第5回 NGS 現場の会、仙台国際センター展示棟(仙台市)、2017年5月22日

Yoshinori Kumazawa, Molecular phylogeny and historical biogeography of some Asian vertebrates. NCU 65th Anniversary Event Symposium "Biodiversity and Environmental Medicine in South East and East Asia Based on Molecular Biology 2015", Nagoya City University, Nagoya, July 16-17, 2015 (招待講演及び座長)

孫 垚、栗崎正希、熊澤慶伯 : 次世代シーケンサーを用いた爬虫類 mtDNA 遺伝子発現様式の解析。第4回 NGS 現場の会、つくば国際会議場(つくば市)、2015年7月2日

〔その他〕

ホームページ等

http://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~kuma/lab_homepage/HOME.html

6. 研究組織

(1) 連携研究者

連携研究者氏名：柴田 弘紀

ローマ字氏名：(SHIBATA, hiroki)

連携研究者氏名：矢部 隆

ローマ字氏名：(YABE, takashi)

連携研究者氏名：井上 潤

ローマ字氏名：(INOUE jun)

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：孫 垚

ローマ字氏名：(SUN, yao)

研究協力者氏名：山田 知江美

ローマ字氏名：(YAMADA, chiemi)

研究協力者氏名：クスマ ワーユ エンドラ

ローマ字氏名：(KUSUMA, wahyu endra)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。