

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 23 日現在

機関番号：12702

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14582

研究課題名(和文)地衣化菌類の遺伝子進化速度の解析

研究課題名(英文)Analysis of evolutionary rate heterogeneity in lichenized fungi

研究代表者

颯田 葉子 (SATTA, Yoko)

総合研究大学院大学・先端科学研究科・教授

研究者番号：20222010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：突然変異率がゲノム全体で一様ではないことは、酵母を除いて、動物・植物・細菌でも知られるようになってきた。最近、私達の研究グループでは、地衣化菌類のサルオガセ属の4遺伝子間に蓄積する同義塩基置換数の有意な差を発見した。本研究では、この蓄積する塩基置換数の不均一性の地衣化菌類でのゲノムレベルの一般性とその原因を明らかにすることを目的としている。ハコネサルオガセとコフレサルオガセの101遺伝子座の塩基配列を用いて、この不均一性を確認するとともにその進化的な要因を明らかにすることを試みた。その結果、この不均一性は遺伝子座間の同義置換速度の不均一性に起因することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The heterogeneity of the mutation rate within a genome has been known for animals, plants, and bacteria, but the heterogeneity in fungal genomes has not been fully understood. Recently, our group found the presence of a large variation in the per-site synonymous divergences among four genes between two lichens, *Usnea hakanensis* and *U. bismolliuscula*. In this study we aim to analyze the generality of this heterogeneity in their genomes and to examine their causes. Synonymous divergences of nucleotide sequences from 101 loci from two species revealed a large range of divergences from 0.046 to 0.337. Several statistical tests concluded that this range was caused by the heterogeneity of synonymous substitution rates among loci. The extent of rate heterogeneity was estimated to be 0.176 ± 0.413 /site/unit time. In future, we will examine biological causes for this heterogeneity by investigating the relationship with codon usages, gene expression and methylation.

研究分野：ゲノム進化学

キーワード：同義置換速度の不均一性 負の2項分布 祖先集団サイズ オーソログとパラログ ガンマ分布

1. 研究開始当初の背景

突然変異率がゲノム全体で一様ではないことは、酵母を除いて、動物・植物・細菌でも知られるようになってきた。一方、酵母での突然変異率の一様性は、突然変異蓄積システムの解析からも明らかになってきた(Zhu et al. 2014)。この研究では塩基の並びが塩基置換率を決める重要な要因で TCG と CCG という塩基での第 2 番目の C が他の 62 種の並びよりも 2 倍程度の高い塩基置換率を持つことを示した(Zhu et al. 2014)。この塩基置換率の差の原因については、酵母でのわずかな(0.364%)メチル化が効果を及ぼしているのではないかと推測している(Tang et al. 2012)。一方で酵母以外の菌類での 6 遺伝子の比較で突然変異率が遺伝子ごとに $0.9 \sim 16.7 \times 10^{-9} / \text{site/generation}$ と大きく異なることを報告している研究がある(Kasuga et al. 2000)。しかし、この研究では、比較している同義置換座位数が少なく、また進化速度推定の基準点にも大きな誤差がある。

2. 研究の目的

最近、申請者の研究グループでは、地衣化菌類のサルオガセ属 2 種ハコネサルオガセ (*Usnea hakonensis*) とコフクレサルオガセ (*Usnea bismolliuscula*) の 4 遺伝子間で蓄積した同義塩基置換数の有意な差を発見した(表 1)。本研究では、この塩基置換数の差の地衣化菌ゲノムレベルでの一般性と不均一性の原因を明らかにすることを目的とする。

表 1 ハコネサルオガセとコフクレサルオガセの遺伝子比較

	遺伝子座			
	RPB	OPT	HSP	TF
d_s	12.4%	22.3%	22.5%	16%
d_n	2.3%	1.9%	0.5%	3%

RPB : RNA polymerase subunit, OPT: Oligopeptide transporter, HSP: Heat-shock protein, TF: Transcription factor

d_s : 座位あたり同義置換数

d_n : 座位あたり非同義置換数

3. 研究の方法

(1) サルオガセ属の 2 種、ハコネサルオガセとコフクレサルオガセの transcriptome データを用いて、これら 2 種のオーソログ間と同義置換塩基多様度 (d_s) と非同義置換多様度 (d_n) を比較し、 d_s 、 d_n の分布を明らかにする。しかし、用いるデータが transcriptome データなので、オーソログとパラログの区別をつけることが難しい。そこで、以下の二つの方法でこの問題の解決を図る。第 1 は外群を用いること(図 1)。第 2 は、ゲノムレベルで重複遺伝子の存在を調べることである。そして、オーソログであることが明らかになった配列については、*Usnea* 2 種の種内変異を調べる。外群としては、最近ゲノム配列が公開された、サルオガセ属と同目の *Cladonia* 属の 2 種を用いる。

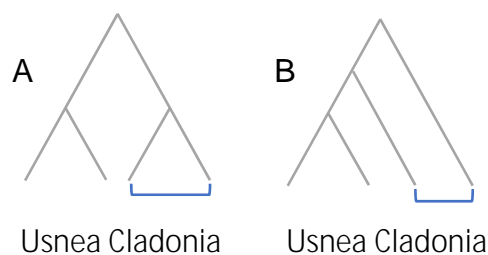


図 1: サルオガセ属の 2 種 *Cladonia* 属の 2 種の相同遺伝子塩基配列を比較した時、*Cladonia* 2 種との比較よりも、サルオガセ属 2 種が互いに近いという系統関係を示すことが、サルオガセ属 2 種の遺伝子がオーソログである条件の一つとなる。

A はサルオガセ属の遺伝子 *Cladonia* 属の遺伝子ともオーソログである場合、一方 B で

はサルオガセ属と *Cladonia* 属のオーソログ関係は確定できない。

(2) オーソログ間の比較で同義置換速度の多様性を示すことができた場合には、同じ速度の差がイントロン及び周辺領域にも観察されるかどうか、また、種内変異の程度を明らかにすることで、サルオガセ属の遺伝子の塩基置換速度の差に自然選択が関与しているかどうかの検証を行う。対象遺伝子について qPCR を用いての発現の定量化も行う。さらに、同義置換に CpG サイトが関与している割合と、バイサルファイトシーケンスにより、メチル化の程度を調べる。

(3) 同義置換速度の差の普遍性・特殊性を明らかにするため、他の地衣化菌・非地衣化菌での速度や CpG の出現頻度を比較する。

4. 研究成果

(1) ハコネサルオガセとコフクレサルオガセの transcriptome の解析。
相同遺伝子を 933 遺伝子同定した。これらの遺伝子のうち 106 遺伝子についてハコネサルオガセとコフクレサルオガセで同義置換の座位あたりの同義置換数を比較した (図 2)。置換数の分布は非常に広く 0.048 から 0.456 である。この時の 106 遺伝子座での同義置換数の平均値は 0.179, 分散は 0.005、中央値 0.175 となった。また、非同義置換と同義置換の比 (dn/ds ratio) は 0 から 0.612 まで分布していたが、平均値は 0.131, 中央値は 0.097 となり、タンパク質をコードする遺伝子としては、保存的な遺伝子が多いことがわかる。

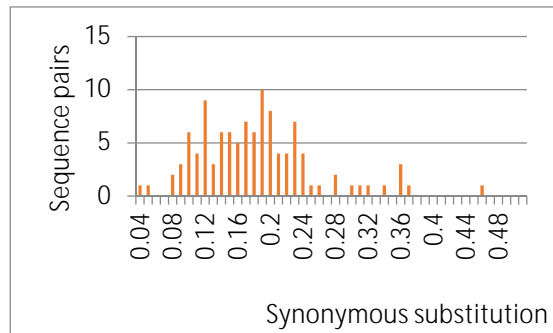


図 2: ハコネサルオガセとコフクレサルオガセの相同遺伝子間の座位あたりの同義置換 (x 軸) と 106 遺伝子座での頻度 (y 軸)

(2) 106 遺伝子の同義置換数の不均一性についての検定

次に、この遺伝子の同義置換数の不均一性を検定した。ハコネサルオガセとコフクレサルオガセの相同遺伝子間での同義置換数が遺伝子座ごとに異なることを説明には、以下の三つが主な要因として考えられる。

ハコネサルオガセとコフクレサルオガセの相同遺伝子の比較の中に、パラローグの比較を含んでいる場合、2 種の祖先集団が大きく、祖先集団中で分岐した各遺伝子座の対立遺伝子が共通祖先にまで遡る時間 (coalescence time) の違いが無視できない程度に大きい場合、あるいは、同義置換速度が遺伝子座間で不均一な場合の三つである。

この三つの仮説を区別するために以下の解析を行った。

オーソログとパラローグを区別するために、*Cladonia* 属の 2 種のゲノムでの相同遺伝子を探索した。しかし、相同遺伝子を確認できたのはわずかに、7 遺伝子座であり、他の遺伝子については、有効な相同性を示す遺伝子を得られなかった。そこで、オーソログとパラローグを区別するために同義置換数のハズレ値を持つ遺伝子を見つけることとした。各遺伝子座の同義置換数の平均

値からのズレをZ検定により確かめた。その結果平均値から有意水準2%でズレていると判断できる $d > 0.35$ となる5点のサンプルを同定した。この5サンプルを除いた残りの101遺伝子については現段階では全てオーソログであると仮定して解析を進めることとした(図3)。

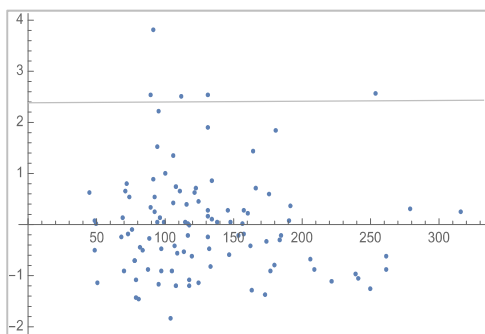


図3：各遺伝子座の同義置換数と平均値の差の検定

x軸は各遺伝子座での同義置換座位数
y軸は各遺伝子座の同義置換数と平均値の差をZ変換した値。図中の水平の線は有意水準2%を示している。

2種に由来するオーソログ遺伝子の比較から、祖先集団での多型と種分岐後の divergence を同時に推定する最尤法 (Takahata & Satta 1997) を用いた。その結果、祖先集団での多型と種分岐後の divergence はそれぞれ、5.5% と 11%と推定された。観察されている同義置換の不均一性を全て、祖先集団での多型に帰すると、祖先集団の多型が5.5%となり、非常に大きな祖先集団を仮定することになる。

ハコネサルオガセとコフレサルオガセの同義座位の数は101遺伝子間で44.6から477.4まで異なる。2種類の理論値(ポアソン分布と負の2項分布)

との比較には、同義座位の数を揃える必要があるため、平均の同義座位数(138)を用いた。すべての遺伝子のペアが同じ分岐時間(t_s)を持ち、一定の同義置換速度(μ_s)で置換が蓄積するとすれば、ペア間の置換数は平均の同義置換数、23 ($= 0.168 \times 138$) を平均と分散に持つポアソン分布となる。一方、すべての遺伝子のペアが同じ分岐 t_s であっても、 μ_s が遺伝子座間で振れる(ガンマ分布に従う)場合には、平均の同義置換数だけでなく、その分散(ハコネサルオガセとコフレサルオガセの場合は57)から求められる二つの変数、 m と p を持つ負の2項分布(ハコネサルオガセとコフレサルオガセの場合は $m=15.86$ と $p=0.406$) に従うことが予測される。実際に、これらの変数を持つポアソン分布と負の二項分布での同義置換数を求め、実際の観察値と比較した(図4)。

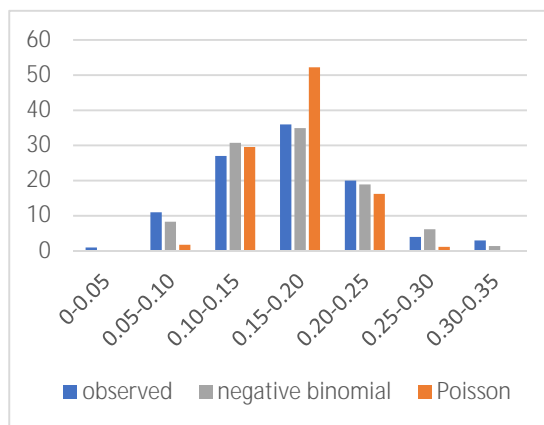


図4：ハコネサルオガセとコフレサルオガセの相同遺伝子間の座位あたりの同義置換数の分布とポアソン分布、負の2項分布との比較

x軸は同義置換数のレンジを y 軸は101遺伝子座中での頻度を表している。青色：観察値、灰色：負の2項分布、オレンジ色：ポアソン分布

図4からは、負の2項分布がポソン分布よりも実際の観察値の分布によくあっていることがわかる。このことは、101 遺伝子座間での同義置換速度が異なり、その速度はガンマ分布に従っていることを示している。このガンマ分布の平均と分散を負の二項分布の平均と分散は 23 と 34 となり、ペア間の同義座位あたり分岐時間単位の同義置換速度は、 0.176 ± 0.055 となる。

(4) 今後の展開

101 遺伝子座間での同義置換速度の不均一性を生み出している生物学的要因を絞り込むため、これらの 101 遺伝子座の産物の発現量とコドンの使用頻度の関連やメチル化との関連を明らかにしていく。

またハズレ値を示した 5 遺伝子座を含めて、101 遺伝子座のオーソロジーを確定するために、ハコネサルオガセのゲノム塩基配列を決定したので、ゲノム塩基配列との比較を行い、パラログが存在するかどうかを調べていく。

<引用文献>

Zhu YQ, Siegal MD, Hall DW, Petrov DA, Precise estimates of mutation rate and spectrum in yeast, Proc. Natl. Acad. Sci. vol. 111, 2014, E2310-E2318

Tang Y, Gao XD, Wang Y, Yuan BF, Feng YQ, Widespread existence of cytosine methylation in yeast DNA measured by gas chromatography/mass spectrometry. Anal Chem vol. 84, 2012, 7249-7255.

Kasuga T, White TJ, Taylor JW, Estimation of nucleotide substitution rates in Eurotiomycete Fungi, Mol. Biol. Evol. vol. 19, 2000, 2318-2324,

Takahata N, Satta Y, Evolution of the primate lineage leading to modern humans: Phylogenetic and demographic inferences from DNA sequences, Proc.

Natl. Acad. Sci. vol. 94, 1997, 4811-4815

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

颯田葉子: 地衣化菌類のゲノミクス・トランスクリプトミクス. 日本地衣学会 第15回大会(招待講演) 2016年 7月 岐阜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

颯田 葉子 (SATTA, Yoko)
総合研究大学院大学・先導科学研究科・教授

研究者番号: 20222010

(4) 研究協力者

河野 美恵子 (KONO, Mieko)