

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 24 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657060

研究課題名（和文）多数の核ゲノムコード遺伝子座を標的にした分子系統解析の試み

研究課題名（英文）Molecular phylogeny using multiple nuclear gene sequences

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

研究成果の概要（和文）：4種の有鱗類の肝臓からトランスクリプトーム解析を行い、各種から100以上のほぼ完全長のcDNA塩基配列を効率的に決定した。Blast解析で遺伝子の同定を行い、種間での高発現遺伝子の共通性の評価及びパラログを持つ可能性の高い遺伝子の排除を行った。その結果得られた11遺伝子のcDNA塩基配列を用いて系統解析を行ったところ、ヘビ類がイグアナ下目及びアンギストカゲ下目に近縁であるとの結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：We conducted high-throughput analyses using 4 squamate species and determined cDNA sequences of many highly expressed genes in the liver. Using the Blast analyses, we assessed the similarity of the cDNA representation between species, as well as the occurrence of paralogy for the highly expressed genes. Tree analyses suggested the phylogenetic position of snakes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	390,000	3,390,000

研究分野：分子系統学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：分子系統・次世代シーケンサー・爬虫類・ヘビ類・核ゲノム・cDNA

1. 研究開始当初の背景

ゲノム情報の解読が加速的に進んでいる今日において、核DNAにコードされる遺伝子の進化過程を分子系統解析によって

解明する作業は、生体システムの機能を歴史的観点から明らかにする上で、また生物種の系統関係を明らかにする上で極めて重要になっている。しかしDNAデータベース

に登録される塩基配列情報は特定の種に偏りがちであり、様々な種における様々な遺伝子に関する情報を、自ら迅速に取得できる実験手法の開発が望まれている。

核コードのタンパク質遺伝子には、塩基配列の置換速度が非常に高いイントロン領域が混在しているため、そのままの形で遠縁生物間の系統解析に利用することが難しい。そこで cDNA の塩基配列を解読する必要があるが、既存の方法でこの作業を行うには多くの労力と時間を費やすため、多数のタクソンと遺伝子座を対象とする研究には発展しにくいという問題点があった。また、イントロンレス遺伝子やイントロン領域の少ない遺伝子(例えば C-mos、Rag1 など)を特異的に選んで PCR 増幅を行う戦略もあるが、この方法にも系統解析に用いる遺伝子が限定されるという問題がある。このような点が系統解析に用いる核遺伝子のレパートリーに制約を与え、効率的な大量データ取得を阻害する要因となってきた。

近年、サンガー法(ジデオキシヌクレオチドを用いた伸長鎖停止法)を用いずに大量の塩基配列を並列的に解読する新技術が開発され、巨大ゲノムのショットガンシーケンシングや数万から数十万コクの EST 塩基配列の大量取得に利用され始めている。この技術は複数種由来の比較的短い(メガ塩基対以下)塩基配列を同時取得するには向いていないと考えられていたが、最近になってそれを可能にする方法(parallel tagged sequencing 法: PTS 法)が開発された。申請者は、これらの方法を組み合わせることで、核ゲノムコードの多数の cDNA 塩基配列を複数種から迅速に解読し系統解析を行うことが出来るとの見通しを持った。

有鱗目は、トカゲ亜目、ヘビ亜目、ミミズトカゲ亜目の3亜目からなる。このうち種数が最大のトカゲ亜目は、主にヤモリ下目、スキネク下目、アンギストカゲ下目、イグアナ下目の4下目から構成される。形態的研究によって、ヘビ類はトカゲ類とは別系統と考えられたり、ヘビ類がアンギストカゲ下目のオオトカゲ科に近縁と考えられたり、様々な学説が提唱されている。ミトコンドリアゲノムや核ゲノムの複数の遺伝子の塩基配列を用いた分子系統学的研究も行われているが、ヘビ類の系統的位

置の問題はまだ決着を見ていない。そこで、本研究では、トランスクリプトームを用いた新しい系統解析法の開発のための題材として、この系統的問題を取り上げることにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、多数の核 DNA コードの cDNA 塩基配列を複数の動物種から迅速に並列解読する新しい実験手法について、その有用性を検証することである。本研究ではその具体例として、数種の爬虫類から高発現遺伝子の cDNA 塩基配列を決定して分子系統解析を行い、有鱗目内におけるヘビ類の系統的位

3. 研究の方法

目的の種の肝臓から total RNA を抽出し、mRNA 以外の rRNA などを除去した。残った mRNA から Roche cDNA Rapid Library Preparation Method を用いて cDNA 断片を合成し、Roche GS FLX Titanium 型ゲノムシーケンサーを用いて約 400bp の Read を大量に取得した(図1)。

各種において得られた cDNA 断片をアセンブルし、ほぼ完全長の cDNA 塩基配列(Isotig)を復元した。ncbi データベース及び Ensembl データベースに対する Blast 解析により、各 Isotig に対応する遺伝子を同定した。同定した遺伝子に関して、他種の Isotig との共通性を調べる Blast test を行った。また Ensembl データベースから取得したモデル生物間の系統関係に立脚し、パラログを持つ可能性の高い遺伝子を除外する Tree test を行った。この2つのテストにおいて一定の条件を満たす遺伝子を候補遺伝子として選抜した。ドラフトゲノム塩基配列が公開されているグリーンアノール(イグアナ下目)に関しては、データベースからオーソログ遺伝子の塩基配列を取得した。

候補遺伝子を塩基配列レベルで整列し、ベイズ系統解析を行った。系統解析は、複数の候補遺伝子を個別に解析した場合、それらをコンカテネートした場合の両方でを行い、信頼できる系統的結論を追求した。

4. 研究成果

ヘビ類のシマヘビ及びトカゲ類3種

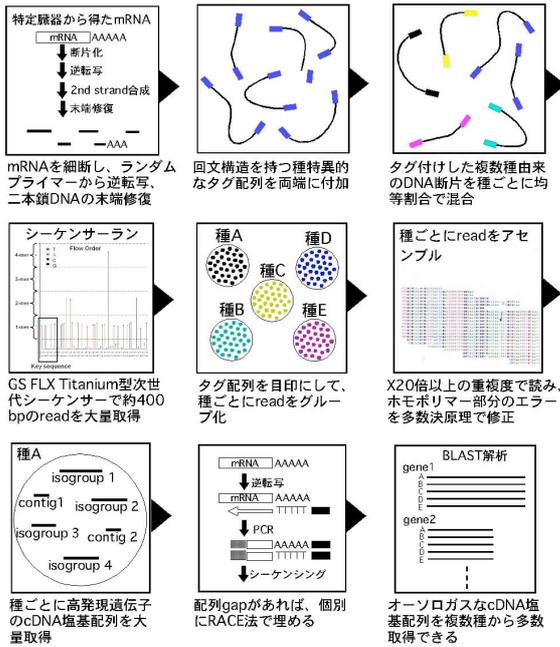


図1 トランスクリプトームを用いて高発現遺伝子のcDNA塩基配列を複数種から並列解読する手法の概要

表1 トランスクリプトーム解析の概要

動物種	平均鎖長	Read数	総塩基数	Isotig数
シマヘビ (ナミヘビ科)	296	212,930	63Mb	4,320
サバンナオオトカゲ (オオトカゲ科)	411	67,533	28Mb	1,907
ヒョウモントカゲモドキ (トカゲモドキ科)	405	65,629	27Mb	1,889
サンドフィッシュ (スキンク科)	398	58,971	23Mb	1,438

(サバンナオオトカゲ、ヒョウモントカゲモドキ、サンドフィッシュ)からトランスクリプトーム解析を行った。トカゲ亜目は4下目から構成されており、ドラフトゲノム配列が報告されているグリーンアノールと併せて、上記の3種でトカゲ類の4下目を網羅する。シマヘビ以外の3種のトランスクリプトームデータは、図1に示す方法により並列的に取得した。

トランスクリプトーム解析により各種から6万~21万のcDNA断片塩基配列(平均断片長400bpのRead)を取得した(表1)。それらをアセンブルした結果、それぞれの種でほぼ完全長のcDNA塩基配列を100以上決定できた。シマヘビにおいてRead数の多い上位100遺伝子に関して、種間の高発現遺伝子の保存性の確認(Blast Test)やパラログの存在が疑われる遺伝子を除去する

テスト(Tree Test)を行い、系統解析に適する11コの候補遺伝子を選別した。

これらをコンカテネートし、Vidal and Hedges(2005)などの先行研究と比べてはるかに多い約3万bpの配列情報を用いてベイズ系統解析を行った。その結果、ヘビ類がイグアナ下目+アンギストカゲ下目と姉妹群を形成するという仮説が、高い事後確率を伴って支持された(図2)。

11遺伝子
(29,043bp)

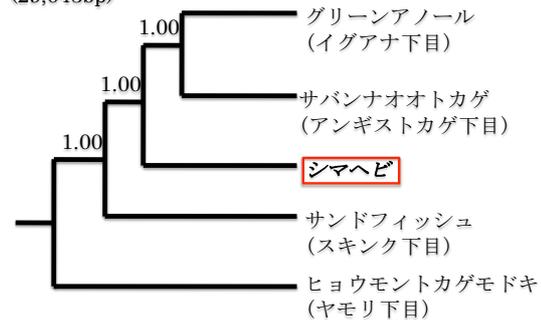


図2 11遺伝子を結合したベイズ系統樹

今後は系統解析に用いる種や遺伝子の数を増やして、ヘビ類の系統的位置づけをさらに精査するとともに、他の系統的問題に対して本研究手法を適用して、脊椎動物の系統解析一般に有効な手法であることを確認していこうと考えている。

本研究の実験手法は、複数種からcDNA塩基配列を網羅的に取得し、その中から系統解析に適する遺伝子を選別する点で、特定の遺伝子の部分配列を狙って増幅・配列決定する従来法と比べて大きな発想の転換がある。本研究の手法を用いれば、イントロンの有無に関係なく、一定の発現量を持つ任意の核遺伝子を系統解析に用いることが可能となるはずである。従って、系統解析に用いる核遺伝子のレパートリーを大幅に広げることにより、系統学的研究を大きく前進させ、当該分野に大きな影響を与えることが期待できる。

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5件)

① Dehara Y, Hashiguchi Y, Matsubara K,

Yanai T, Kubo M and Kumazawa Y (2012) Characterization of squamate olfactory receptor genes and their transcripts by the high-throughput sequencing approach. *Genome Biology and Evolution* 4(4): 602-616、査読有

DOI: [10.1093/gbe/evs041](https://doi.org/10.1093/gbe/evs041)

② Okajima Y and Kumazawa Y (2010) Mitochondrial genomes of acrodont lizards: timing of gene rearrangements and phylogenetic and biogeographic implications. *BMC Evolutionary Biology* 10: 141、査読有
DOI: [10.1186/1471-2148-10-141](https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-141)

〔学会発表〕(計14件)

① 栗崎政希、松原和純、鳥羽通久、熊澤慶伯。有鱗目におけるトランスクリプトームプロファイル：核遺伝子を用いた系統解析を目指して。日本進化学会第13回大会、2011年8月30日、京都大学（京都市）

② 熊澤慶伯。次世代シーケンシングによる新規ミトコンドリアゲノム配列決定の効率性と正確性。日本進化学会第13回大会、2011年8月30日、京都大学（京都市）

③ 熊澤慶伯。中-新生代の大陸移動と爬虫類の進化。日本進化学会第12回大会「大陸移動と動物の進化2億年」シンポジウム、2010年8月5日、東京工業大学（東京都）

④ Kumazawa Y and Okajima Y. Molecular phylogeny and biogeography of lizards. The International Symposium on Biodiversity Sciences 2010 "Genome, Evolution and Environment", 2010年8月1日、ルブラ王山ホテル（名古屋市）

〔図書〕(計2件)

① 熊澤慶伯、第2版 古生物学事典、日本古生物学会編、朝倉書店、2010、pp. 211, 338, 444-445, 476-477 (総ページ数584)

② 熊澤慶伯、第1版 生物の事典、石原勝敏・末光隆志編、朝倉書店、2010、pp. 43-45, 47-49 (総ページ数560)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~kuma/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

栗崎 政希 (KURISAKI MASAKI)

名古屋市立大学・大学院システム自然科学研究科・博士前期課程