

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657168

研究課題名(和文)超微小逆位配列をマーカーとして用いる新しいゲノム進化学の構築

研究課題名(英文)Evolutionary genomics of ultramicro inversions.

研究代表者

今西 規 (IMANISHI, Tadashi)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：80270461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ゲノムに起こる超微小逆位が生物に普遍的な現象であるかを検証するとともに、超微小逆位の現象を実験的に検証し発生頻度を測定することを目的とする。まず、計算機を用いて真核生物、古細菌、真正細菌の10系統について近縁種間や株間で比較ゲノム解析を行ったところ、10系統全てにおいて超微小逆位が同定された。したがって、超微小逆位は生物に普遍的なゲノム構造変化であることが強く示された。次に、マウスの超微小逆位のホットスポット候補領域について多数のマウス精子のゲノム配列を決定することにより、超微小逆位の発生頻度の測定を試みた。この解析は現在進行中であり、成果は論文等で発表予定である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to demonstrate that ultramicro inversions is a universal phenomenon observed in the genomes of many organisms, and to measure experimentally the frequencies of ultramicro inversions. First, we examined genomic sequences of 10 different species of eukaryotes, prokaryotes, and archaea, and identified ultramicro inversions in all of the 10 species. This strongly indicates that ultramicro inversion is a universal phenomenon of genomic rearrangement. Secondly, in order to estimate the frequencies of ultramicro inversions, we predicted 360 possible hotspots of ultramicro inversions based on the comparison of 17 strains and a tumor mouse genomes in silico, and sequenced 150 hotspots out of 360 using quite a number of mouse sperms with modern high-throughput sequencers. This analysis is still in progress, and the results will be published in the future.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：比較ゲノム 超微小逆位 生物進化 突然変異 バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

比較ゲノム配列解析では、対象種間における相同領域のアラインメントを精査することによりゲノムに起こった進化現象を特定することができる。ヒトとチンパンジーのゲノムアラインメントには、アラインメントの一致度が99%近くになるにもかかわらず、ミスマッチやギャップの集中したホットスポットが見つかることがある。このホットスポット領域は、頻発した点突然変異や挿入欠失によって生じたと考えられてきた。ところが驚くべきことに、われわれは相補的に反転させた一方の配列が他方に完全一致するホットスポット領域を多く発見した。つまり、ミスマッチやギャップのホットスポットとされた領域は、実際にはアラインメント内に埋もれてしまうくらいの超微小な逆位によって生じたことが強く示唆された。アラインメントの中に隠れてしまうというその性質のため、超微小逆位に関する研究はこれまで全くなされておらず、その存在の有無すらも説明されていなかった。

そこでわれわれは、近縁種間のアラインメント内に埋もれている超微小逆位を同定する解析方法を開発し、ヒト-チンパンジー間の全ゲノムアラインメント内に2,377か所もの超微小逆位を同定して、世界に先駆けて論文発表した[Hara and Imanishi (2011) BMC Evol Biol 11:308]。これらの超微小逆位は、AT-rich 領域、Y染色体、Alu や L1 の近傍、DNA ステム-ループ構造など、ゲノム構造の不安定性が高い領域に高頻度に同定された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、5bp-125bp の長さの超微小逆位を普遍的な分子進化マーカーとして確立することである。そのために研究期間内に以下の2点を明らかにする。

(i)超微小逆位が生物に普遍的な進化現象であること: バクテリアからヒトまであらゆる生物群に超微小逆位が起こっていることを、大規模な配列データ解析を通じて明らかにする。

(ii)超微小逆位の分子機構を解明すること: 超微小逆位が全生物に共通な分子機構で起こることを示せば、進化マーカーとしての有用性が明らかになる。そこで、超微小逆位および近傍領域の配列的特徴から超微小逆位が生じる分子機構を推定し、さらにマウス精子ゲノムに対して超微小逆位のホットスポット候補領域をターゲットリシーケンスして *de novo* 超微小逆位を観察することにより、超微小逆位の生成機構を実験的に検証する。

3. 研究の方法

申請者は下記の4つのテーマに分けて研

究を実施する計画である。

(i) 計算機による高精度な超微小逆位検出法の開発: 逆位のサイズによらず感度・特異度が高い同定プログラムを開発する。(ii) 超微小逆位の普遍性の解明: さまざまな生物系統における近縁種間のゲノムアラインメントから微小な逆位を同定する。(iii) 超微小逆位が生じる生成機構の解明: 超微小逆位および近傍領域の配列およびゲノム構造を系統間で比較し、多くの生物に共通な構造および系統特異的な特徴を見いだす。共通構造に基づく超微小逆位のホットスポット候補領域に対して、マウス精子ゲノムを用いて *de novo* 超微小逆位を同定することにより、超微小逆位の生成機構を検証し発生頻度を計測する。(iv) 遺伝子機能に影響を及ぼした超微小逆位の同定: 表現型と関連する超微小逆位を同定し、ゲノムアノテーションとしてデータベースに公開する。

4. 研究成果

本研究は、ゲノムに起こる超微小逆位が生物に普遍的な現象であるかを検証するとともに、超微小逆位の現象を実験的に検証し発生頻度を測定することを目的とする。まず、本研究では、我々が以前に開発した超微小逆位の同定プログラムを改良し、より小さい超微小逆位も感度良く検出できるようにした(図1)。しかも、誤検出率も改良前のプログラムと同程度に抑えている。これにより、ヒト-チンパンジーのゲノムアラインメント中に同定された超微小逆位は3,330箇所に増大した。さらに、ゲノム配列データから超微小逆位を検出するための計算機プログラムを改良し、より高い精度とともに、次世代シーケンサーを用いた解析に適する処理速度を得ることに成功した。

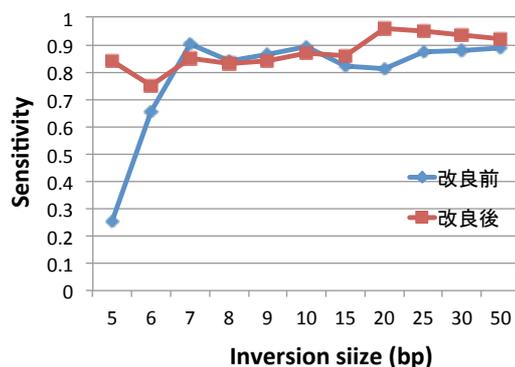


図1. シミュレーションに基づく超微小逆位のサイズごとの感度。Hara and Imanishi (2011)に発表された改良前の方法に比べ、改良後の方法では小さい逆位の感度が大幅に上昇している。また、20塩基以上の比較的長い逆位の感度も上昇している。

次に、このプログラムを用いて、真核生物(ヒ

ト・チンパンジー、ハエ、出芽酵母、イネ)、古細菌(ピロバキュラム、スルフォロブス)、真正細菌(大腸菌、ピロリ菌、ナイセリア、レンサ球菌)から 10 系統のゲノム配列データを公共データベースより取得し、近縁種間や株間の全ゲノムアラインメントを作成して超微小逆位を探索したところ、10 系統全てにおいて超微小逆位が同定された(図 2)。この結果から、超微小逆位は生物に普遍的なゲノム構造変化であることが強く示された。

	Species (strains) pair	Alignment size	Sequence size difference	# UMIs	# UMIs/10 ⁴ mutations
Eubacteria	<i>Neisseria meningitidis</i> MCS8-22491	1.85 Mb	3.03%	27	4.79
	<i>Escherichia coli</i> K12-O157	3.88 Mb	2.16%	13	2.38
	<i>Helicobacter pylori</i> J99-26695	1.48 Mb	6.18%	26	2.83
	<i>Streptococcus pyogenes</i> SIS-MGAS232	1.64 Mb	1.71%	17	6.06
Archaea	<i>Pyrococcus arsenaticum</i> P. ogunise	1.89 Mb	5.00%	23	2.43
	<i>Sulfolobus islandicus</i> M.16.4-Y.N.15.51	2.28 Mb	1.62%	12	3.24
Eukaryota	<i>Oryza sativa</i> O. glaberrima	69.3 Mb	1.00%	62	0.897
	<i>Saccharomyces paradoxus</i> NRRL17217-A12	11.0 Mb	3.91%	40	0.926
	<i>Drosophila melanogaster</i> D. simulans	100 Mb	4.32%	1285	2.56
	<i>Homo sapiens</i> Pan troglodytes	2.42 Gb	1.2%	3330	1.27

図 2. 各系統におけるアラインメントサイズ、アラインメント相違度、超微小逆位の数、10,000 突然変異に対する超微小逆位の頻度。

特に、ヒト-チンパンジーのゲノムアラインメント中に同定された超微小逆位を精査したところ、全体の約 3 分の 1 にあたる 1,041 箇所超微小逆位が DNA ステムループ内に存在することが判明した(図 3)。また、90 箇所超微小逆位が遺伝子領域に存在し、そのうち 28 箇所がコードされる領域に存在することがわかった。

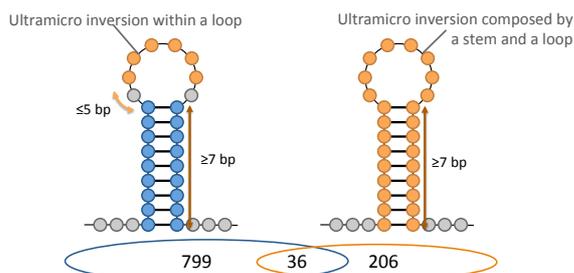


図 3. ヒト-チンパンジーのアラインメントにおける、DNA ステムループ構造に同定された超微小逆位。

さらに、公開されている 17 系統のマウスの全ゲノムならびにマウスのがん組織のゲノムの全配列データを比較解析すると、超微小逆位が複数の系統において独立に起きていると考えられる領域があることがわかった。我々は、このような領域を超微小逆位ホットスポットと呼び、ホットスポットをマウスゲノム中に 360 カ所同定した。これらのホット

スポット領域に実際に起きた超微小逆位を検出するため、多数のマウス精子ゲノムのホットスポット領域を次世代シーケンサーで超深度に解読する実験を試みた。超微小逆位が DNA ステムループ構造に多く見られることから、生殖系列での減数分裂に伴う相同組換えが超微小逆位を起こすメカニズムの有力な候補に挙げられている。従って減数分裂における相同組換えの頻度が上昇している、あるいは組換え修復に異常を持つ変異マウスにはより多くの超微小逆位が期待される。そこでこれらの表現型をもつ変異体マウスを用いて、150 カ所のホットスポット領域のゲノム配列について Illumina HiSeq 1500 Sequencer を用いてアンプリコンシーケンスを行った。対照として野生型マウスを用いて同様のシーケンシングを行った。現在は以上の結果を論文発表すべく、実験結果の計算機による解析を進めている。以上の超微小逆位に関する研究成果は、学会にて口頭およびポスター発表を行っている。特に、2013 年 10 月の Cold Spring Harbor Laboratory の Genome Informatics 会議では口頭発表に採択され、2014 年 3 月の生殖系列の新規変異に関する国際シンポジウムでは原がオーガナイザーを務め、講演を行った。

本研究によって、ゲノムアラインメント内のミスマッチとギャップの由来を、単純な点突然変異/挿入欠失あるいは逆位として詳細に捉えることができるようになった。すなわち、本研究はより精度の高いゲノムアラインメントの作成にも有効である。われわれは、逆位の同定に基づき精査されたヒト・類人猿のゲノムアラインメントを用いて、ヒトと類人猿の進化史を全ゲノムレベルで再構築した。その結果、これまでに提唱されていた「祖先におけるヒト-チンパンジー間の異種間交雑」仮説が明確に否定された。また、ヒトとチンパンジーの種が分岐した年代は 600~760 万年前と推定され、ヒト祖先の化石とよく合致することがわかった。この結果は 2012 年に雑誌論文に掲載された[Hara, Imanishi, and Satta (2012) *Genome Evol Biol* 4:1133-1145]。

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 1 件)

① Hara Y, Imanishi T, and Satta Y. Reconstructing the Demographic History of the Human Lineage Using Whole-Genome Sequences from Human and Three Great Apes. *Genome Biology and Evolution*, 4:1133-1145, 2012.

(この論文は *Genome Biology and Evolution*, Volume 4 Issue 11 のハイライト論文として掲載された。

Highlight: Family Ties—New Evidence Simplifies Human Evolutionary Tree. *Genome Biology and Evolution*, 4:1146-1147, 2012.)

〔学会発表〕(計 5 件)

①2014年3月21日-22日

Hara Y

Search for germline mutations from next-generation sequencing analysis. International Symposium on "Germline Mutagenesis and Biodiversification" Kyushu University
Oral Presentation

②2013年10月30日-11月2日

Hara Y and Imanishi T

Identification and characterization of ultramicro inversions within local alignments between closely related species. Cold Spring Harbor Meetings, GENOME INFORMATICS
Cold Spring Harbor Laboratory, USA
Oral Presentation

③2012年12月11日-14日

原 雄一郎, 今西 規

近縁種間の全ゲノム比較による超微小逆位の同定とその生成機構
日本分子生物学会年会(福岡)
ワークショップでの口頭発表およびポスター発表

④2012年8月21日-23日

原 雄一郎, 今西 規

近縁種ゲノム比較によって明らかにされる超微小逆位
日本進化学会第14回大会(東京)
ワークショップでの口頭発表

⑤2012年6月23日-26日

Hara Y and Imanishi T

Abundance of ultramicro inversions within local alignments between closely related species. SMBE2012 (Dublin, Ireland)
ポスター発表

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

[ミーティングレポート]

内村 有邦、原 雄一郎

日本遺伝学会 国際シンポジウム報告
GSJ コミュニケーションズ 88-6:13

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今西 規 (IMANISHI, Tadashi)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 80270461

(2) 研究分担者

原 雄一郎 (HARA, Yuichiro)

独立行政法人理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター・研究員

研究者番号: 70709708

(平成 25 年度より研究分担者)