

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22125009

研究課題名（和文）ゲノム配列解析に基づく突然変異発生特性と適応進化の解明

研究課題名（英文）Study of the occurrence of mutations and adaptive genome evolution via genomic analyses

研究代表者

渡邊 日出海（Watanabe, Hidemi）

北海道大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：30322754

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 61,000,000 円

研究成果の概要（和文）：ゲノム配列中に生じる多くの変化のうちのどれが適応的進化をもたらしているものであるのかを明らかにするための基本データを得ることを目的として、本研究では、人為的にゲノムに二重鎖切断を導入した出芽酵母のゲノム配列を決定することにより、ゲノムの突然変異発生特性を調べ、また、自然界から得られるウイルスやヒトのゲノム解析を行うことにより、実際の突然変異発生特性とゲノムの適応的進化の推定を行った。

研究成果の概要（英文）：In order to obtain the fundamental properties of occurrence of genomic mutations so as to identify genomic changes that have led to adaptive evolution, i.e., genome adaptation, via finding significant deviations from the expectations calculated with the properties of the occurrence of mutations, we artificially introduced random double-strand breaks (DSBs) to the budding yeast genome and detected occurred mutations during repair of the DSBs by sequencing the whole genomes. In addition, we have computationally traced back genomic changes of natural human adenoviruses (HAdV), and it was suggested that HAdVs have changed via homologous recombination events between distant relatives. The statistical properties of this type of changes in HAdV indicate that the recombinant forms have been selected for adaptation.

研究分野：比較ゲノム学

キーワード：突然変異 組換え 修復 ゲノム 進化 自然選択

1. 研究開始当初の背景

生物の適応進化を分子進化学的・遺伝学的に理解するためには、進化の原動力であるゲノム内突然変異に関する理解が不可欠である。ゲノム内突然変異には点変異、挿入、欠失、再編成などが含まれ、特に点変異については、古くから分子生物学・分子遺伝学研究によって多くのデータが蓄積しており、分子進化学において適応進化の検出のために多用されてきた。しかし、ゲノム内再編成および挿入・欠失 (INDEL) については、その発生機構と発生特性に関するデータの蓄積が極めて少なく、それらの適応進化との関連については手付かずの状態にあると言っても過言ではない。

2. 研究の目的

本研究課題では、ゲノム内適応進化関連領域の検出のために、ゲノム中に生じる突然変異 (点変異、再編成、INDEL) の発生特性を明らかにすることを目指す。その特性から外れた変異のパターンを見つけることで、適応的進化領域の候補を絞り込むことが可能となる。再編成の発生特性解析のために、ヒトアデノウイルス (HAdV) を用いた研究を進め、その特性と適応進化との関係を明らかにする。また、出芽酵母の半数体を用い、相同組換え (HR)、微小相同末端結合 (MMEJ)、非同源末端結合 (NHEJ)、単鎖アニーリング (SSA) などの DNA 二本鎖切断 (DSB) 修復機構による修復過程で生じる突然変異の発生特性を解析することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 半数性出芽酵母株を用いた突然変異発生特性解析

BY4741 株のゲノム配列決定と DNA 二重鎖切断の発生特性解析

本研究代表者が属している新学術領域研究班の班員である白髭教授より、同研究室において維持されている *Saccharomyces cerevisiae* の半数性株 BY4741 を譲り受け、1 コロニーから得られた細胞集団 (以下、BY4741 株) のみを以下の研究に用いることとした。この BY4741 株のゲノム配列を、本研究課題において導入した Life Technologies 社の Ion PGM と、同じ研究班員の伊藤教授の研究室にある Illumina 社の Miseq を借用して決定し、基準参照配列とした。リード配列の多様性から半数体 (a 細胞) であること、また、ゲノム配列から MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0 から BY4741 であること、また、トロント大学の株との違いを確認した。

α ファクタにより BY4741 株の細胞周期を G1 期に同調・停止した状態で Bleomycin 処理し、人為的二重鎖切断 (DSB) を導入した。細胞に物理的力が加かって DNA が分断しないよう、アガロースゲルに細胞を包埋し、DSB によって生じた末端に Ion PGM での配列決定過程で用いられるアダプター (A アダプタ)

をライゲートした後に、配列決定手順を進めて配列決定し、上記参照配列上にマップすることで、細胞内で生じた DSB 末端の正確な位置を検出できるようにした。実験手順内で排除しきれないノイズを除くために、Bleomycin 処理をしなかった細胞でも全く同じ手順で DSB 末端の検出を行った。また、型制限酵素により切断した末端の検出も同条件で行いポジティブコントロールとした。

DSB 修復による突然変異の検出

導入された DSB が修復される過程で生じる突然変異の発生特性を解明するために、細胞周期を止めた状態で長期間異なる Bleomycin 濃度条件下に置いた細胞を用意した。それらを、細胞周期を回さずにそのままにしたものと、一端 YPD 30 下 17 時間培養したものとに分け、それぞれを TruSeq PCR free ライブラリ調製キットを用いて Miseq により DNA 配列決定し、得られたリードを参照配列にマップすることで変異を検出した。TruSeq PCR free キットを用いることにより、PCR による変異の導入を排除した。また、Ion PGM による配列決定は原理上、エラー率が高く、また、それを確認済みであるため、突然変異解析では使用しないこととした。

(2) ヒトアデノウイルス (HAdV) ゲノムを用いた実 DNA 変異解析

ヒトアデノウイルス (HAdV) ゲノム配列決定

日本において定点観測されてきた 87HAdV 検体、および、各国の共同研究者から分与された検体 (ドイツ 1、ハンガリー 1、サウジアラビア 1、シンガポール 1、スウェーデン 13、米国 20) の計 124 検体のゲノム配列決定を AB3130xl および Ion PGM を用いて行った。

HAdV ゲノムの変異解析

国際 DNA データバンクに登録されている HAdV ゲノム配列データを含めて、多重配列アラインメント化し、塩基置換等の変異を見つけるとともに、RDP プログラムを用いてゲノム間の組換えの検出を行った。

4. 研究成果

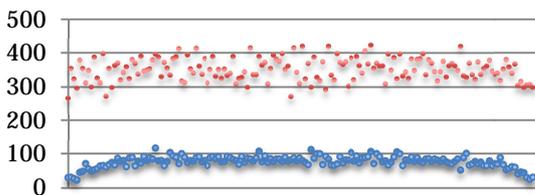
(1) 半数性出芽酵母株を用いた突然変異発生特性解析

BY4741 株のゲノム配列決定と DNA 二重鎖切断の発生特性解析

Bleomycin 無し YPD で培養した細胞を処理して検出された DSB 頻度 (青) と Bleomycin 5μg/ml 下 1 時間処理した細胞の DSB 頻度 (赤) の分布例 (2 番染色体) を以下に示す (それぞれ、細胞数 2.34×10^7 個を用いた結果)。他のどの染色体もよく似た分布となっている。この解析結果より、Bleomycin 非存在下で検出される DSB (ノイズ) よりも有意に高い頻度で Bleomycin 依存性 DSB が検出されていることを確認できた。また、ノイズは、

全ての染色体で同様に、テロメア近傍で抑えられ、テロメアではほとんど DSB は検出されていない。これは、ノイズがシーケンサーなどの特性によるものではなく、細胞内での染色体の状態あるいはテロメア近傍に特異的に会合しているタンパク質等が、Bleomycin 非依存的に生じる DSB の頻度に影響を与えているということを強く示唆している。このテロメア近傍領域からの関数としてのノイズ頻度の一様性（低分散）に比べると、Bleomycin 依存 DSB の頻度は、領域間で分散が大きく、ある程度、領域に依存していることも示唆された。ただし、絶対頻度に対する分散の割合は小さく、染色体の種類による分布の違いも見られないことから、巨視的には DSB 発生頻度の一様性を仮定することが可能であり、DSB 発生頻度の領域特異性を考慮せずに、突然変異検出頻度分布をそのまま突然変異発生頻度と解釈することも可能と判断した。なお、Bleomycin 依存 DSB もテロメア近傍での抑制が弱いながらも観察されたが、ノイズ成分を除くと、ほぼ消滅した。

暫定値ではあるが、上記条件下では約 325 個/cell 程度の DSB が発生した、という計算結果になった。この値は高すぎると考えられるため、以下の実験では、より低い Bleomycin 濃度を用い、暴露時間の調整で総導入 DSB 数を調整することとした。



DSB 修復による突然変異の検出

細胞周期が回らない同一条件下で異なる Bleomycin 濃度での処理を行い、そのままゲノム配列決定を行う場合と、8 回ほど細胞周期を回した後に配列決定する場合の細胞を用いて、突然変異の入り方を調べた。その結果、Bleomycin 濃度依存性は細胞周期を回した場合に現れたが、細胞周期を回さなかった細胞では有意な相関を検出することができなかった。突然変異の種類に分けて調べてみると、塩基置換が Bleomycin 濃度に相関する傾向が見られたが、INDEL に関しては、細胞周期を回したかどうかとは無関係に相関が見られなかった。これは、NHEJ などの非同源組換えの仕組みによる DSB の修復過程で INDEL が導入される、という従来の説に反する結果である。今後、これらの結果の再現性を確認するとともに、DSB 導入条件の影響等を調べ、各種の突然変異の条件依存性を明らかにしていく。

(2) ヒトアデノウイルス(HAdV)ゲノムを用いた実 DNA 変異解析

実際に自然界で起きている、未知の適応的

ゲノム進化の検出を目的とし、二本鎖 DNA をゲノムに持つヒトアデノウイルス(HAdV)の網羅的ゲノム配列比較解析による HAdV の多様性発生過程についての解析を進めてきた。その結果、RNA ウイルスに比べて遙かに塩基置換速度が遅くゲノム配列が安定していると考えられていた DNA ウイルスである HAdV が、遠縁の HAdV との組換えにより、ハプロタイプとしての多様性を増しているということを本研究において発見した。それがきっかけとなり、世界中のアデノウイルス研究者により、多くの HAdV の組換え体が発見されるようになった。この加速度的研究の進展は、次世代シーケンサーが広く利用されるようになり、これまでに蓄積されてきた多くの HAdV 株のゲノム配列決定を低コストで実施できるようになったという技術的側面に負うところが大きい。本研究においても、Life Technologies 社の Ion PGM を導入することにより、本研究代表者が属する研究グループが長年にわたり収集してきた HAdV 検体や海外の多くの共同研究者から分与された検体を多数ゲノム配列決定することが可能になった。それらのデータに他のグループにより決められたものを加え、HAdV ゲノム配列を多重アラインメント化し、比較解析を行うことにより、全 7 種のうちの D 種という、ヒトのみに感染し他の種とは比較にならないほど多くの型を有するという特徴をもつ HAdV 種において、特に高頻度で組換えが起きており、それが、この種の多様性の原因となっていることを明らかにした。

そのゲノム構造の多様性は、単にゲノムの様々な領域においてランダムに組換えが起きた結果なのか、あるいは、特定の状態が選択された結果であるのかは明らかにされていなかった。そこで、まず、HAdV の全 D 種ゲノムで組換え領域の同定とその分布に関する統計解析を行い、特定の領域における組換えが有意に高頻度で起きているということを明らかにした。しかも、塩基配列の一致度が低い遠縁の HAdV 間でも組換えが起きているということも明らかになった。しかし、その組換え頻度の領域依存性が、特定領域での組換え発生頻度の高さによるものなのか、あるいは、組換え発生頻度は領域間で一様であっても特定の領域で起きた組換えが高頻度で自然選択された結果であるのかは不明であった。さらに、遠縁ゲノムの間でどのようにして組換えが起きるのかも不明であった。

HAdV 間の組換えは、直系関係にあるゲノム領域間でしか観察されないため、宿主が持つ相同組換え機構によって引き起こされているものと考えられる。しかし、相同組換えの場合、一般に、その開始頻度は、組み合わせられる DNA 間の塩基配列の一致度に大きく依存するということがわかっており、塩基一致度の低い遠縁ゲノム間でも高頻度で組換えが起きているという我々の観察と矛盾

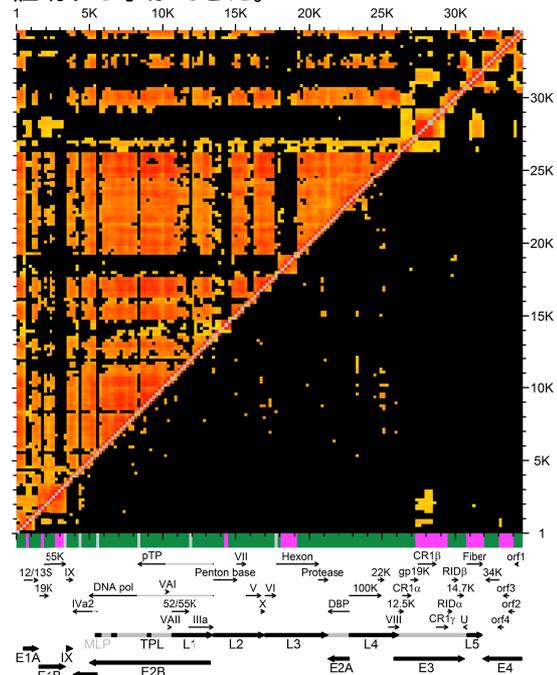
すると考えられた。そこで、この問題を解決するために、高頻度組換え領域の境界を調べたところ、ゲノム全体の一致度が低い遠縁ゲノム間も含めて有意($p < 10^{-100}$)に高い保存度を示す領域 (Universally conserved segments, UCS と命名)が D 種ゲノム全てに共通して存在するという発見をした。この UCS が存在することで、相同組換えがほとんど起きえないような遠縁 HAdV ゲノム間でも相同組換えが可能になっていると考えられた。

この UCS の同定において我々は、タンパク質のコード領域内に関しては d_s の値を指標としたので、UCS は、アミノ酸配列に対する選択圧とは異なる原因によって保存されていると考えられる。その有力な原因候補の一つは、UCS を起点として組換えが起こることへの選択圧である。実際、UCS を末端とする形で高頻度に組換えられていることが観察される領域には、3 つの主要キャプシドタンパク質領域があり、それらは、エピトープおよび宿主細胞への接着にかかわる部分を含むものであり、かつ、それらは HAdV ゲノム中で最も多様性の高い領域として知られている。これらの領域が遠縁のゲノムとの間で組換わることにより新たなハプロタイプができると、既に成立している宿主の対 HAdV 免疫を逃れ、新たな宿主細胞 (組織) への感染を成立させる可能性が高まる。これは、宿主への適応過程と見なされる。UCS という高度に保存した構造を維持することにより、高度に多様化した隣接領域を遠縁ゲノム間で入れ替えることを可能にしており、多様化領域が自然選択されることを通して、隣接領域において保存と多様化が並行して進んでいると考えられる。

相同組換えは、通常、DNA の二本鎖切断 (DSB) に始まり、切断末端からの 5' 3' プロセッシングによる 3' 末端の一本鎖化、さらに、一本鎖化された領域の、組換え対象 DNA への組み込みによる三本鎖の形成、3' 末端からの DNA 合成、ホリデー構造の解消または合成一本鎖の元相補鎖 DNA との再ハイブリダイゼーションを経て完了する。この過程では、通常、一本鎖となる DNA 鎖は DSB の両側で反対のものとなり、選択性は無い。したがって、相同組換え起点が決まっているとしても、その両側方向で等確率に組換えが起こると考えられる。しかし、実際に観察される組換え領域は、明らかに UCS 領域の片側のみに偏在している。したがって、この観察自体が、UCS を境として、選択圧のかかり方が大きく異なっているということを強く示唆している。

そこで、実際に、見かけの組換え頻度が低くなっている領域において、過去に、未知のゲノムとの間も含めて組換えを起こしていないのかどうかを高感度で確認する方法を新たに考案した。もし、ある程度遺伝的に離れたゲノム間で部分領域の交換またはコピーが行われれば、その領域と他の領域の間で

の進化的相関が低下する。そこで、HAdV ゲノム多重配列アラインメントを用いて、領域間の進化的相関を調べた。その結果、下図に示すように、上で触れた高頻度組換え領域は、他の領域との間で進化的相関が見られず、その他の領域は、高頻度組換え領域によって分断されているながらも互いに高度に相関している、ということが明確に示された (図左上三角の着色部分。詳細は 2015 年の Journal of Virology の論文中図 1 を参照)。この結果により、高頻度組換え領域は、その連続領域がモジュールとして他の領域とは独立して組換わっており、その他の低頻度組換え領域 (図中緑のバーで示した領域) では実際に過去において未知のゲノムとの間も含めてほぼ組換えを起こしていないということを初めて証明する事ができた。



低頻度組換え領域に存在する遺伝子を調べた結果、HAdV のゲノム複製複合体、主要キャプシドタンパク質間接着タンパク質群等の、互いに物理的に相互作用することで機能するタンパク質群の遺伝子で構成されていることが明らかになった。興味深いことに、それらの遺伝子の一部を、組換えが起きた場合と同様に他の HAdV に由来するものと入れ替えた場合に、活性が失われるということが既に示されている。したがって、低頻度組換え領域では、少なくとも遠縁ゲノムとの組換えが有害に働き、そのために、組換え体が排除され、結果として、組換えが抑制されている、と考えられる。また、この進化的相関解析法は、物理的・機能的関連の検出に応用可能であるということも示された。実際、本方法は、これまでに提案されているどの遺伝子機能予測法にも該当しない新しい方法である。上図の右下三角部分には、低頻度組換え領域との相関成分を除いた進化的相関を示しているが、高度組換え頻度領域内の自己相関以外にも、いくつかの、興味深い相関が見

られており、それらには、物理的・機能的連関が証明されていないものが含まれていることから、今後の HAdV タンパク質間の機能解析の重要な道標を与えていると考えられる。

以上の、本研究課題における HAdV 解析により、HAdV の多様化には、塩基置換などの蓄積とともに、異なる系統間での組換えが重要な役割を担っているということを見出すとともに、その特性を HAdV に与えている可能性の高いゲノム上の特徴的保存構造 (UCS) および特定の組換え体のみが選択されており、特定の高頻度組換え領域における組換えが宿主への適応に関わっているということが示唆された。

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7件)

Gabriel Gonzalez, Kanako Ono Koyanagi, Koki Aoki, Hidemi Watanabe. Interregional coevolution analysis revealing functional/structural interrelatedness between different genomic regions in Human mastadenovirus D. *Journal of Virology*, **89** (12) 6209-6217, 2015. 査読有. doi: 10.1128/JVI.00515-15

Gabriel Gonzalez, Kanako O. Koyanagi, Koki Aoki, Nobuyoshi Kitaichi, Shigeaki Ohno, Hisatoshi Kaneko, Susumu Ishida, Hidemi Watanabe. Intertypic modular exchanges of genomic segments by homologous recombination at universally conserved segments in human adenovirus species D. *Gene*, **547** (1), 10-17, 2014. 査読有. doi: 10.1128/JVI.00515-15

Tsuguto Fujimoto, Shotaro Yamane, Tomoko Ogawa, Nozomu Hanaoka, Atsushi Ogura, Chiemi Hotta, Takeshi Niwa, Yakou Chiba, Gabriel Gonzalez, Koki Aoki, Kanako Ono Koyanagi, Hidemi Watanabe. A novel complex recombinant form of human adenovirus species D, the first type 48-associated isolate in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **67** (4), 282-287, 2014. 査読有. doi:10.7883/yoken.67.282

青木功喜, 金子久俊, 北市伸義, 渡邊日出海, 石田晋, 大野重昭. 院内感染を起こす新型ヒトアデノウイルスのバイオインフォマティクス. *日本眼科学会雑誌*, **117** (9), 721-726, 2013. 査読有

Yamane S, Lee AW, Hanaoka N, Gonzalez G, Kaneko H, Ishida S, Kitaichi N, Ohno S, Koyanagi KO, Aoki K, Fujimoto T, Yawata N, Watanabe H. Identification of contamination in

the American type culture collection stock of human adenovirus type 8 by whole-genome sequencing. *Journal of Virology*, **87** (2), 1285-1286, 2013. 査読有. doi: 10.1128/JVI.02875-12

Kaneko H, Aoki K, Ishida S, Ohno S, Kitaichi N, Ishiko H, Fujimoto T, Ikeda Y, Nakamura M, Gonzalez G, Koyanagi KO, Watanabe H, Suzutani T. Recombination analysis of intermediate human adenovirus type 53 in Japan by complete genome sequence. *The Journal of General Virology*, **92** (6), 1251-1259, 2011. 査読有. doi: 10.1099/vir.0.030361-0

Kaneko H, Aoki K, Ohno S, Ishiko H, Fujimoto T, Kikuchi M, Harada S, Gonzalez G, Koyanagi KO, Watanabe H, Suzutani T. Complete genome analysis of a novel intertypic recombinant human adenovirus causing epidemic keratoconjunctivitis in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**, 484-490, 2011. 査読有. doi: 10.1099/vir.0.030361-0

[学会発表(抜粋)](計6件)

G Gonzalez, KO Koyanagi, K Aoki, N Kitaichi, S Ohno, H Kaneko, S Ishida, H Watanabe. "Recombination hotspots enabling intertypic modular exchanges in human adenovirus species D," The 11th International Adenovirus Meeting. San Diego, USA. 2014年7月18日

H. T. Masuda, K. O. Koyanagi, H. Watanabe. Detection of indels generated by mechanisms of double-strand DNA break repair mechanisms. The EMBO Meeting 2013, Amsterdam, Netherland. 2013年9月21日-24日

G Gonzalez, KO Koyanagi, K Aoki, N Kitaichi, S Ohno, H Kaneko, S Ishida, H Watanabe. "Identification of Recombination Hotspots on Human Adenovirus Species D Genomes," Conference: 10th International Adenovirus meeting. Umea, Sweden. 2012年6月14日

Gabriel Gonzalez, Koki Aoki, Kanako O. Koyanagi, Nobuyoshi Kitaichi, Shigeaki Ohno, Hisatoshi Kaneko, Hiroaki Ishiko, Susumu Ishida, Hidemi Watanabe. Evolutionary Origin of Human Adenovirus 54. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2011. The Greater Fort Lauderdale/Broward County Convention Center (Fort Lauderdale, Florida, US). 2011年5月3日

Gabriel Gonzalez, Koki Aoki, Kanako O Koyanagi, Nobuyoshi Kitaichi, Shigeaki Ohno, Hisatoshi Kaneko, Hiroaki Ishiko, Susumu Ishida,

Hidemi Watanabe. Evolutionary process behind the origin of adenovirus type 19a causing Epidemic Kerato-Conjunctivitis (EKC). International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 札幌コンベンションセンター 204 室 (札幌市). 2011 年 9 月 15 日

Gabriel Gonzalez, Kanako Koyanagi, Koki Aoki, Hisatoshi Kaneko, Hidemi Watanabe. Bioinformatics analysis over recently sequenced adenoviruses strains 53, 54 and intermediate 15-29-9 causing Epidemic Kerato-Conjunctivitis outbreaks in Japan. Cold Spring Harbor Meeting, "Infectious Disease Genomics & Global Health." Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK. September 12th, 2010

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 日出海 (WATANABE, Hidemi)
北海道大学・大学院情報科学研究科・教授
研究者番号：30322754

(2)研究分担者

小柳 香奈子 (KOYANAGI, Kanako)
北海道大学・大学院情報科学研究科・准教授
研究者番号：20362840