

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：32508

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07516

研究課題名(和文) 昆虫ゲノムから探る遺伝子水平転移により獲得した遺伝情報の機能と特徴

研究課題名(英文) Functions and characteristics of genetic information obtained by horizontal gene transfer in insect genome

研究代表者

二河 成男 (Nikoh, Naruo)

放送大学・教養学部・教授

研究者番号：70364916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：アノテーションが不十分な昆虫類のゲノム配列から、水平転移により細菌から獲得した遺伝情報の検出を、過去に遺伝子水平転移が明らかになっているアブラムシやその近縁種を中心に行った。アブラムシでは7種のゲノムを調べ、いくつかの候補遺伝子について水平転移の可能性を調べている。また、エンドウヒゲナガアブラムシの既知の水平転移遺伝子、4種類について、他のアブラムシや近縁の昆虫類のゲノムにも同じ遺伝子があることを見つけ、分子系統解析を行った。その結果、この4種類の遺伝子がアブラムシの祖先で水平転移により獲得されたものと推定された。これらの結果から、水平転移遺伝子の特徴と進化について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アブラムシに見られる細菌由来の遺伝子は、アブラムシの共通祖先で獲得され、それが受け継がれてきたものであること、そしてこれらの4種類の遺伝子の機能が類似していることから、遺伝情報の細菌からアブラムシへの転移が、アブラムシとブフネラの共生に影響を与えたことが示唆される。一方で、ブフネラの祖先や現在のブフネラに由来する遺伝子がゲノム中に見られないことは、そのような水平転移がないか、少なくとも煩雑に生じないことを示している。これらのことは、生物の進化において、昆虫細菌間の遺伝子水平転移の新たな知見を示唆するものであり、学術的にも意義がある。

研究成果の概要(英文)：We tried to detect genetic information acquired from bacteria through horizontal transfer in the poorly annotated genome of insects. At present, we focus on aphids and their close relatives. In aphids, seven genomes were examined, and several candidate genes are investigated for potential acquisition by horizontal transfer. In addition, we found the orthologs of the four known horizontal transferred genes of the pea aphid in the genomes of other aphids, and the palalogs in the related insects genomes. Using these sequences, we estimated the molecular phylogenetic position of the transferred genes in bacterial genes. The molecular phylogenetic analyses suggested that these four genes were acquired by horizontal transfer at the common ancestor of the aphids. From these results, we examined the characteristics and evolution of the horizontal transferred genes.

研究分野：生物学

キーワード：遺伝子水平転移 共生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

原核生物のみならず、真核生物でも様々な生物種でゲノム解析が行われた結果、これまでの安定的な生物の遺伝情報の進化に対するイメージは、変更を余儀なくされた。塩基置換や遺伝子重複といった既存の遺伝子情報の変化に加えて、種の障壁を越えた水平転移による新規遺伝子の獲得によって、生物の遺伝情報は進化するということである。

生物の遺伝情報の進化は、突然変異とその集団への浸透、そして固定という過程を経る。遺伝子の水平転移による進化も、この道筋が当てはまる。遺伝子の水平転移では異なる種の遺伝情報が個体の生殖細胞の DNA に取り込まれ、それが遺伝的浮動や自然選択によって集団中に広まり、固定した結果を観察したものである。

将来の生殖細胞が発生初期に体細胞から分離され、体内に保持される動物では、非自己の DNA や RNA との接触頻度が低く、水平転移の頻度は低いと考えられていた。しかし、共生細菌が細胞内によく観察される昆虫類や線虫類では、生殖細胞でも細菌と接触する機会が多く、事実、水平転移により獲得した遺伝子をその核ゲノム内に保持する例が多数報告されている。このような水平転移による遺伝子の獲得が、昆虫の生存や繁殖にどのような役割があるのかは興味もたれる。

しかし、水平転移に由来する遺伝子の同定は困難な点がある。例えば、ヒトゲノムやクマムシゲノムでは実験操作上の混入 DNA が水平転移した遺伝情報として発表され、大きな誤解を招いた。これらの誤りを避けるには、ゲノム解析の手法、アセンブルのしくみ、混入細菌のゲノムの特徴、といった生物ゲノム自身とゲノム解析の知識が必須である。しかしながら、そのような解析が可能な研究グループは世界的に見てもわずかであり、ゲノム解析でも十分な検証がなされていない場合が多い。よって、水平転移による遺伝子情報の進化を知る以前にそのゲノム中での同定もままならない現状がある。

## 2. 研究の目的

公開されている昆虫類のゲノム配列データから、共生細菌を体内に保持するものを中心に、1) 細菌由来の水平転移により獲得した遺伝子を探索し同定する。2) 転移遺伝子の由来を分子系統解析から明らかにする。3) 分子進化解析より転移遺伝子の機能を推定する。4) 個別の結果を統合して、獲得した転移遺伝子の機能や分子進化から、昆虫ゲノム情報の進化における遺伝子水平転移の役割を解明する。5) 由来となる微生物や遺伝子に共通する特徴を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 相同性検索のためのデータベースの準備 極めて大量のデータについて相同性検索を行うため、既存のあらゆる配列情報が登録されているデータベースでは計算時間が膨大になる。よって、国際 DNA データベースから昆虫のタンパク質アミノ酸配列と主要な細菌のタンパク質アミノ酸配列をダウンロードし、それぞれについてデータベースを作成する。さらに、それらのデータベースに対して、Blast によって相同性検索可能なシステムを構築する。

(2) 昆虫核ゲノムの塩基配列情報の準備 次に、昆虫のゲノム配列情報を準備する。アセンブルされた scaffold か contig ゲノムデータ、それに加えて遺伝子予測が行われていれば遺伝子のデータも用いる。ここまでのシステムが構築できれば、基本的にルーチンで水平転移に由来する遺伝子の候補を予測できる。

(3) 断片化したゲノム配列を用い、全ゲノムの網羅的な相同性検索 (2) のアセンブルされたゲノム配列データは、塩基配列長が長い。目的としている水平転移に由来する転移遺伝子が部分的にしか含まれていない場合、何も処理をせずに相同性検索の問い合わせ配列として用いる

と、検出できない可能性が高い。したがって、2000 塩基以上の配列は、1000 塩基の重なりを許して、2000 塩基以下の断片に分割する。このようにして作成した昆虫の問い合わせ配列を用いて、(1) で作成したデータベースに対して Blast による相同性検索を行う。

(4) 細菌のタンパク質と類似した塩基配列の抽出 相同性検索で得られた相同性の評価スコアを比較して、他の昆虫よりも細菌のタンパク質とより高い相同性を示す塩基配列を抽出する。これらの候補を問い合わせ配列として、今度は国際 DNA データベースが作成している、既知のあらゆるタンパク質の情報を含む non-redundant データベースに対して、Blast による相同性検索を行う。これによって、既知のタンパク質の中で最も相同性が高いものを同定する。昆虫核ゲノムにコードされているにも関わらず、細菌と最も相同性が高い遺伝子を水平転移に由来する遺伝子の候補とする。

(5) 水平転移に由来する遺伝子の確認。 細菌の遺伝子と高い相同性を示したとしても、実験の過程で細菌の遺伝子の情報が入り込んでしまった可能性がある。そのような検出の誤りを排除するため、contig 上で昆虫類の祖先に由来する遺伝子に挟まれているか、リードが正しくマップできるか、真核生物の遺伝子配列と同様の特徴を有しているかといったことを確認する。

(6) アライメントや分子系統樹を用いた確認 (4) の過程で得られた他の相同性を示すタンパク質も加えて、アライメントを行い、統計的にも有意な相同性があるかどうかを確認する。また、アライメントより分子系統樹を推定し、その樹形が生物種の系統関係と統計的にも有意に矛盾するかどうかを確認する。このような検証によって、明らかに水平転移によって獲得された遺伝子を検出する。

(7) 分子系統進化学的な解析 水平転移由来の遺伝子と判断したものについては、その由来と本来の機能を推定する。方法は、(6) で作成した分子系統樹を元に、最も相同性の高いタンパク質を保持する種を同定する。このような転移遺伝子と相同性が高いタンパク質の機能を検索し、水平転移に由来する遺伝子が転移以前にもっていた機能や役割を調べる。そこから、転移後の機能を類推する。

(8) 遺伝子水平転移の全体像の解明 これまでに得られた個別の情報を集約して、遺伝子水平転移に由来する遺伝子の特徴や、それら転移遺伝子の進化の特徴を探求し、真核生物に特徴的な水平転移に由来する遺伝子の進化を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) 様々な昆虫類を用いた転移遺伝子の検出 転移遺伝子の検出の基盤となるシステムの構築を行った。相同性検索のために構築するデータベースは、既存のもので問題ないことを確認した。昆虫核ゲノムの塩基配列情報に関しては、ゲノムアセンブル後のデータから自動的に検出を行うことができるシステムの構築を試みた。遺伝子予測までできれば理想であるが、現在でもゲノム配列情報だけでは予測が難しいことがわかり、予測をせず全ゲノム DNA の塩基配列を利用することとした。断片化したゲノム配列を用い、全ゲノム の網羅的な相同性検索を自動的にを行い、必要な情報を収集することができるようになった。細菌のタンパク質と類似した塩基配列の抽出については、単純な相同性検索で得られたスコアを元にした抽出はできるようになった。現在は遺伝子のサイズレベルでの検出を行っている。得られた結果を検証したところ、細菌のタンパク質と高い相同性を示す領域は DNA 上で連なって存在するケースが多かった。contig レベルでも検出できるしくみがあると、その後の解析が進めやすいことがわかってきた。得られた転移遺伝子候補の検証を進めたが、ゲノム配列が断片的であるものや、近縁な種のゲノムデー

タがない場合は、転移遺伝子が配列決定時の混入かの判別が難しいことがわかったので、次にアブラムシの仲間を解析の中心に据えることにした。

(2) アブラムシ類を用いた転移遺伝子の検出 現在ゲノム配列が決定され公開されている8種の内、以前に 詳細な解析を行ったエンドウヒゲナガアブラムシを除く7種について、水平転移遺伝子の候補遺伝子をリストアップした。現時点では、共生細菌であるブフネラの混入や、部分的に細菌の遺伝子と比較的高い相同性を示しやすいミトコンドリア関連の遺伝子が多数含まれているので、それらを除く作業を行っている。現時点では、細菌により近いDNAの塩基配列が見つかっている領域は、*Diuraphis* 26、*Rhopalosiphum* 10、*Schizaphis* 62、*Sipha* 16、*Myzus* 11、*Melanaphis* 16、*Aphis* 73 である。20を超えるものは共生細菌ブフネラのゲノムがゲノム解析の際に誤って入り込んだものを含んでおり、それらを除くといずれも10前後と予想される。これらの最終的な検証は現在行っている段階である。

(3) アブラムシ類の水平転移遺伝子の系統解析 既に細菌由来の遺伝子であることが明らかになっているエンドウヒゲナガアブラムシの水平転移遺伝子について、これらの7種のゲノムDNA中に存在するかどうか、相同性検索を用いて調査した。エンドウヒゲナガアブラムシでは6種類12遺伝子が見つかり、そのうち2つはブフネラ由来である。よって今回は、残りの4種類について、相同性検索に基づいた探索を行った。各遺伝子について7種のゲノムの内、amiD (amidase)、ldcA (LD-carboxylase)、bLys (lysozyme)、rlpA (rare protein A)、それぞれについて4、5、7、6種から アミノ酸配列レベルで相同性を示す領域を含むDNAの断片が見つかった。エンドウヒゲナガアブラムシと同じ族である、*Diuraphis*と*Myzus*のゲノムからは、4遺伝子すべてが見つかった。別族だが同亜科の*Rhopalosiphum*、*Aphis*、*Schizaphis*のゲノムでは、それぞれ3、4、2の遺伝子が見つかった。

上記7種のデータに加えて、データベース検索から上記4つの水平転移遺伝子のデータを集めて系統解析を行った。これまでの知見と違いが見られた遺伝子として、bLysが挙げられる。bLysは、これまでエンドウヒゲナガアブラムシの遺伝子だけが動物からは知られていた。これは細胞内共生細菌ボルバキアの遺伝子と高い相同性を示した。本研究において調べ直したところ、多くのアブラムシゲノムにコードされていることがわかった(9種中9種)。さらに、カメムシとアリにもこの細菌由来タイプのbLysをゲノム中にコードすることがわかった。分子系統解析はこれらの昆虫由来のbLysが複数のクラスターに分かれ、独立に水平転移により獲得された可能性を示した。一方、ボルバキアの遺伝子と複数のアリに見られる遺伝子が系統樹上で混在しており、ゲノム決定の際に混入した可能性もあるので、これらアリのデータについては検討が必要である。また、一部のカメムシは共生細菌を腸内などに保持しており、細菌との共生に利用されている可能性がある。amiD、ldcA、rlpAについても相同性検索を行い、複数のアブラムシから新たな遺伝子を発見した。

分子系統解析の結果、これらはアブラムシ類の遺伝子が1つのクラスターを組むため、アブラムシの祖先で獲得後、種分岐とともに広がったと考えられる。ただし、その遺伝子をもたないアブラムシもあり、それらではゲノムから喪失した可能性が考えられる。また、機能がよくわかっていなかったrlpAもペプチドグリカンの分子の一部を切断する酵素であることがわかった。エンドウヒゲナガアブラムシで見つかった細菌由来の転移遺伝子がいずれもペプチドグリカンを構成する分子を切断する活性をもつタンパク質である点が興味深い。

#### (4) 転移遺伝子の機能、特徴について

このような結果から、水平転移遺伝子は共生の成立と密接に関わっていること、一方でそれらを失っている系統があること、さらに現在では転移が起こっていないか、頻度が少ないこと、が予想される。今後は上記の解析をより正確に行い、水平転移と共生の具体的なモデルを構築する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 二河成男	4. 巻 54巻5号
2. 論文標題 共生細菌との共生が昆虫ゲノムに及ぼす影響	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 44 - 47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 二河成男、土`田努、前田太郎、山口勝司、重信秀治、古賀隆一、深津武馬
2. 発表標題 宿主昆虫の体色変化を引き起こす細胞内共生細菌Rickettsiella viridisの比較ゲノム解析
3. 学会等名 日本進化学会第19回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考