

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：38001

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15071

研究課題名（和文）細胞内共生細菌における突然変異率の進化動態とその駆動要因の解明

研究課題名（英文）Evolutionary Dynamics of Mutation Rates and their Driving Factors in Intracellular Symbiotic Bacteria

研究代表者

金城 幸宏（Kinjo, Yukihiro）

沖縄国際大学・経済学部・研究員

研究者番号：40865515

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：突然変異率は、多くの進化過程に密接に関わる重要かつ基本的なパラメータである。しかしながら、突然変異率それ自体の進化がどのような要因に駆動されるのかは不明な点が多い。突然変異率の進化に関する既存の理論では、ゲノムサイズとの関連するとされているが、実際にはそのような理論予測に合わない系統が多数報告されている。本研究では、突然変異率の新たな進化的理論の足がかりとして、ゲノムサイズの劇的変動が報告されているアブラムシの細胞内共生細菌を対象に全ゲノム解析ならびに変異率の解析を実施した。その結果、当該共生細菌2種について、ゲノム縮小進化の各段階におけるゲノムおよび変異率に関する情報の取得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

突然変異率は、進化生物学における各種理論の最も基本的なパラメータの一つであり、様々な進化過程に密接に関わるだけでなく、遺伝医学や育種学、さらには病原体の病毒性の進化など、様々な応用分野においても極めて重要である。近年の次世代シーケンス技術の発展により、今後はさらに多くの環境・生態系においてゲノム情報を用いた研究の進展が予想される。本研究により得られる知見は、そのようなゲノム情報を利用した進化生態学の研究領域において、その進化過程の解釈や予測に対し有益な洞察を与えることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The mutation rate is an important and fundamental parameter closely related to many evolutionary processes. However, the driving factors behind the evolution of mutation rates remain largely unknown. Current theories on the evolution of mutation rates assume an evolutionary steady state within the organisms of interest, which hinders the prediction of the dynamic evolutionary processes of mutation rates in response to ecological changes. In this study, we investigated the driving factors and evolutionary dynamics of mutation rates in endosymbiotic bacteria of aphids to provide a promising framework for a new evolutionary theory of mutation rates.

研究分野：ゲノム進化

キーワード：ゲノム進化 細胞内共生細菌 突然変異率

1. 研究開始当初の背景

突然変異率は、進化生物学における各種理論の最も基本的なパラメータの一つであり、様々な進化過程に密接に関わるだけでなく、遺伝医学や育種学、さらには病原体の病毒性の進化など、様々な応用分野においても極めて重要である。例えば細菌では、環境ストレスに対する細胞応答により、短期的に突然変異率が1万倍近くまで上昇する (Cirz *et al.*, 2005)。また、共生や特殊環境への適応といった生態的变化の際には、突然変異率の上昇が数倍～数百倍の範囲で長期的に維持されることが知られている (Marais *et al.*, 2008)。申請者らによる最近の研究で、そのような突然変異率の長期的な上昇が、古細菌を含む多くの原核生物の分類群におけるゲノムの縮小進化と密接に関連していることが明らかになった (Bourguignon, Kinjo, *et al.*, 2020)。このように、突然変異率の長期変動は、新規環境への適応進化に密接に関わるだけでなく、その後のゲノム進化にも重大な影響を及ぼし得る。

しかしながら、突然変異率の進化がどのような進化要因によって駆動されるのかについては未だに不明な点が多い。現状では、生物における世代当たりの突然変異率の進化は、ゲノム中のコード領域の合計長ならびに有効な集団サイズにそれぞれ反比例して変異率が低下すると予想されている (ドリフトバリア仮説; Lynch 2010)。この仮説は突然変異率の定常 (進化的に安定な) 状態に対する説明を与える一方で、定常状態から外れていくような動的な進化過程においては、実際の観測データと整合性がないことがいくつかの研究により報告されている。これは、多様な生態系の中で動的な進化過程にある多くの生物を対象にできないことを意味しており、ゲノム情報を用いた進化生態学を展開する上で大きな障壁になる。

2. 研究の目的

突然変異率の進化に関する現在の理論では、対象生物における進化的な定常状態を仮定しているため、生態的变化に伴う動的な進化過程にある生物の変異率進化を予測できない。本研究の目的は、定常状態を仮定しないより一般的な理論へと拡張する足掛かりとして、既存の理論予測とは異なる変異率の進化動態を持つことが示唆されている細胞内共生細菌を対象に、突然変異率の進化動態とその駆動要因について明らかにすることである。

本研究では、アブラムシに共生する細胞内共生細菌 2 種 (*Buchnera aphidicola* ならびに *Serratia symbiotica*) を対象に、突然変異率の進化動態について調査する。この 2 種の共生細菌はそれぞれ宿主の生存に必須な栄養供給機能を担っているため、母子間の垂直伝播により宿主と共進化している。一般に、このような内部共生が長期間進化すると、ゲノム中から多くの遺伝子が失われていく (ゲノム縮小) 進化が生じることが知られている。アブラムシの場合、*Buchnera aphidicola* においては宿主との共進化の歴史が数億年前のアブラムシ上科の共通祖先までさかのぼるほど古く、長大な年月におよぶ共進化の過程で著しくゲノム縮小進化が進行している (全長約 60 万 ~ 40 万塩基対)。それに対し、*Serratia symbiotica* においては、複数のアブラムシ系統で独立に獲得されているため、ゲノム縮小進化の程度が大きく異なる系統 (全長約 350 万 ~ 65 万塩基対) が存在する。このことから、この 2 種の共生細菌のゲノムにおける進化時間当たりの塩基置換率を調査することで、共生に伴うゲノム縮小進化の初期 ~ 後期に至る各過程における突然変異率の進化動態を明らかにすることが可能である。

3. 研究の方法

まず、国内各地にて当該共生細菌 2 種を保有する宿主アブラムシを採集し、次世代シーケンス技術を用いて当該共生細菌の全ゲノム配列を解読する。得られた全ゲノム配列について、を遺伝的に近縁なグループ内で比較することにより、塩基置換が生じた座位を特定する。得られた塩基置換情報のうち、自然選択の影響を受けにくい領域 (遺伝子間領域あるいはタンパク質コード領域内の四重縮退座位) における塩基置換を突然変異の近似として扱い、2 種の共生細菌の変異率の相対値を得ることで、ゲノム縮小の過程で時間当たりの突然変異率がどのような進化動態を持つのかを明らかにする。

(1) サンプリング

国内各地 (北海道、栃木、茨城、千葉、東京、長野、京都、奈良、山口、福岡、沖縄) において、宿主アブラムシの採集を実施した。

(2) アブラムシ共生細菌のゲノム解読

採集したアブラムシ宿主の虫体全体を破碎し、DNA 抽出を行った。抽出した全 DNA を用いて次世代シーケンスライブラリを作製し、Illumina 社の NovaSeq による超並列 DNA 配列解読 (ショットガンシーケンス) を実施した。得られた断片配列のデータの中から共生細菌由来の配列を識別し、Kinjo *et al.* (2015) の方法によりゲノム配列の再構築 (ゲノムアセンブル) を行った。再構築された共生細菌由来の配列について、Kinjo *et al.* (2021) の方法で遺伝子機能の予測 (アノテーション) を実施した。これらの配列の識別からアノテーションまでの行程を、2 種の共生

細菌についてそれぞれ実施した。

(3) 分子系統解析と近縁ゲノムクラスターの抽出

2種の共生細菌それぞれについて、アノテーションの結果を基に、ゲノム中で保存性の高い遺伝子(系統マーカー遺伝子)の領域を抽出し、最尤法に基づいた分子系統樹の推定を行った。系統解析の結果から、遺伝的距離の近い系統群のゲノムデータを近縁ゲノムクラスターとして抽出した。この行程を2種の共生細菌それぞれについて実施し、クラスター内における分岐パターンが一致していることを確認した。

(4) 突然変異の解析

分子系統解析の結果を基に抽出された近縁ゲノムクラスターにおいて、基準となる参照配列(レファレンスゲノム)に対しそれぞれの宿主系統由来の次世代配列の出力データをマッピングすることで、突然変異座位を検出した。なお、各クラスターにおけるレファレンス配列には、公共データベース上で既に公開されているゲノム、あるいは公開ゲノムがない場合にはもっとも品質(ゲノム配列の平均解読深度)の高いゲノムを選択した。

4. 研究成果

国内各地における野外調査の結果、合計で71系統のアブラムシを採集した。採集されたアブラムシのうち64系統についてDNA抽出、DNAライブラリ作製、ならびに次世代シーケンス解析を実施した。得られた配列データを解析した結果、合計で46系統の*Buchnera aphidicola*、および39系統の*Serratia symbiotica*のドラフトゲノム配列を得た(図1)。2種の共生細菌の共進化を解析する目的のため、共通する37系統を後続の解析に使用した。なお、一部のアブラムシ系統においては*Serratia symbiotica*ではなく別の共生細菌を保持していたため、後続の解析から除外した。また、この解析の過程で合計52系統のアブラムシにおいて、ミトコンドリアゲノムのほぼ全長配列を得ることに成功した。

Location	Host Plant	Host Aphid	<i>Serratia symbiotica</i>						<i>Buchnera aphidicola</i>						
			Depth	SumLen	GC	#Sca	N50	L50	Depth	SumLen	GC	#Sca	maxLen	N50	L50
福岡	ヤナギ	<i>Tuberolachnus</i> sp.	167,446	650,526	0.21	1	650,526	1	655,419	432444	0.22	9	283213	283213	1
北海道	ヤナギ	<i>Tuberolachnus</i> sp.	210,085	646,031	0.21	39	28592	9	333,941	414308	0.22	1	414308	414308	1
東京	ヤナギ	<i>Tuberolachnus</i> sp.	203,672	650,647	0.21	3	352,209	1	323,002	430848	0.22	3	421673	421673	1
京都	ヤナギ	<i>Tuberolachnus</i> sp.	52,8643	673,828	0.22	41	31,227	8	246,661	431587	0.22	6	356384	356384	1
北海道	クロマツ	<i>Cinara</i> sp.	629,288	1,126,241	0.28	2	943134	1	661,493	443179	0.24	1	443179	443179	1
山口	マツ	<i>Cinara</i> sp.	159,833	1,045,673	0.29	2	866053	1	504,465	440333	0.23	8	138986	65688	3
沖縄	マツ	<i>Cinara</i> sp.	77,1403	1,046,068	0.29	6	25,43	2	201,355	449973	0.23	2	443711	443711	1
福岡	マツ	<i>Cinara</i> sp.	88,3685	1,054,892	0.3	6	591,876	1	283,388	450364	0.23	6	165341	138238	2
茨城	マツ	<i>Cinara</i> sp.	66,5741	1,053,339	0.3	7	229,361	2	28,7551	439446	0.23	37	69498	19666	7
京都	マツ	<i>Cinara</i> sp.	118,48	951,662	0.3	7	278,927	2	170,455	452282	0.23	4	212652	185546	2
沖縄	マツ	<i>Cinara</i> sp.	162,571	1,121,869	0.3	4	27,14	2	185,093	452378	0.24	5	374735	374735	1
北海道	ヒメ・トドマツ	<i>Cinara</i> sp.	1339,99	927,856	0.32	12	146085	3	527,979	429700	0.22	3	230201	230201	1
栃木	マツ	<i>Cinara</i> sp.	136,328	535,098	0.32	60	12,399	14	100,662	415472	0.23	76	26583	6002	20
北海道	マツ	<i>Cinara</i> sp.	98,9502	1,278,864	0.33	4	709355	1	100,09	442049	0.26	1	442049	442049	1
北海道	ヒメ・トドマツ	<i>Cinara</i> sp.	77,945	1,277,849	0.33	2	1082910	1	121,311	442418	0.26	1	442418	442418	1
北海道	エゾマツ	<i>Cinara</i> sp.	78,9274	1,278,632	0.33	4	816849	1	102,186	448292	0.26	2	442002	442002	1
北海道	エゾマツ	<i>Cinara</i> sp.	63,4162	1,304,545	0.34	11	182941	3	72,3931	448310	0.26	2	442019	442019	1
福岡	トウカエデ	<i>Pezomyzus</i> sp.	256,887	1,116,236	0.35	3	1,239,705	1	50,7955	436014	0.18	34	34078	20767	9
沖縄	マツ	<i>Cinara</i> sp.	52,0557	1,516,211	0.35	19	119310	5	65,2708	381465	0.23	12	87178	54474	3
東京	トウカエデ	<i>Pezomyzus</i> sp.	334,458	1,332,902	0.36	2	1,388,325	1	84,214	444386	0.18	20	42475	33382	6
北海道	ヒメ・トドマツ	<i>Cinara</i> sp.	493,002	1,036,691	0.39	10	162414	3	178,381	438693	0.25	5	180049	146055	2
北海道	ヒメ・トドマツ	<i>Cinara</i> sp.	641,826	1,037,071	0.39	4	731728	1	85,5831	438840	0.25	3	220073	220073	1
福岡	モミジ	<i>Pezomyzus</i> sp.	21,7731	2,036,306	0.44	85	34,869	18	136,463	453374	0.19	1	453374	453374	1
長野	クスギ	<i>Stomaphis</i> sp.	283,196	1,757,948	0.46	59	66,422	9	287,431	434698	0.22	2	427904	427904	1
東京	クスギ	<i>Stomaphis</i> sp.	197,247	1,743,928	0.46	55	54,123	9	403,765	284048	0.22	4	233874	233874	1
沖縄	マツ	<i>Cinara</i> sp.	155,047	4,419,914	0.47	138	63812	24	424,612	447021	0.24	17	83300	47279	4
沖縄	マツ	<i>Cinara</i> sp.	184,902	4,075,226	0.49	222	48297	25	154,088	452424	0.24	7	175946	128004	2
長野	ケヤキ	<i>Stomaphis</i> sp.	151,151	3,174,736	0.51	585	8,368	105	360,583	426398	0.22	1	426398	426398	1
福岡	クリ	<i>Lachnus</i> sp.	104,877	2,693,017	0.52	159	36,921	26	63,6608	331356	0.22	30	49015	15106	6
茨城	コノデガシワ	<i>Cinara</i> sp.	49,5352	2,306,998	0.52	230	19,731	40	192,675	453818	0.23	2	445693	445693	1
沖縄	コノデガシワ	<i>Cinara</i> sp.	70,4498	1,748,491	0.52	101	21200	29	118,246	445271	0.23	4	176990	142544	2
栃木	コナラ	<i>Lachnus</i> sp.	268,665	2,686,068	0.52	144	36,921	25	88,0194	386428	0.22	21	63751	30047	5
東京	モミジ?	???	33,8057	3,014,020	0.52	101	69,562	15	201,307	543819	0.24	1	543819	543819	1
東京	カシ	<i>Lachnus</i> sp.	474,203	2,625,585	0.52	136	39,769	25	63,7306	404876	0.22	16	76055	37488	4
北海道	コノデガシワ	<i>Cinara</i> sp.	99,4936	2,110,838	0.52	148	20898	36	123,999	422855	0.24	84	26542	6734	19
北海道	モミジ	<i>Pezomyzus</i> sp.	253,954	2,199,415	0.53	206	17,983	39	430,701	471589	0.2	3	388623	388623	1
東京	エノキ	<i>Stomaphis</i> sp.	236,383	1,360,133	0.58	352	4,757	87	271,354	429790	0.21	5	209374	133539	2

図1. 共生細菌2種(*Serratia symbiotica*および*Buchnera aphidicola*)の全ゲノム配列解読の結果

得られたゲノム配列を既に公開されたデータベース上のゲノム配列と統合し、それらの配列情報を基に分子系統解析を行った。その結果、2種の共生細菌のそれぞれについて9つの近縁ゲノムクラスターを得ることに成功した(図2)。

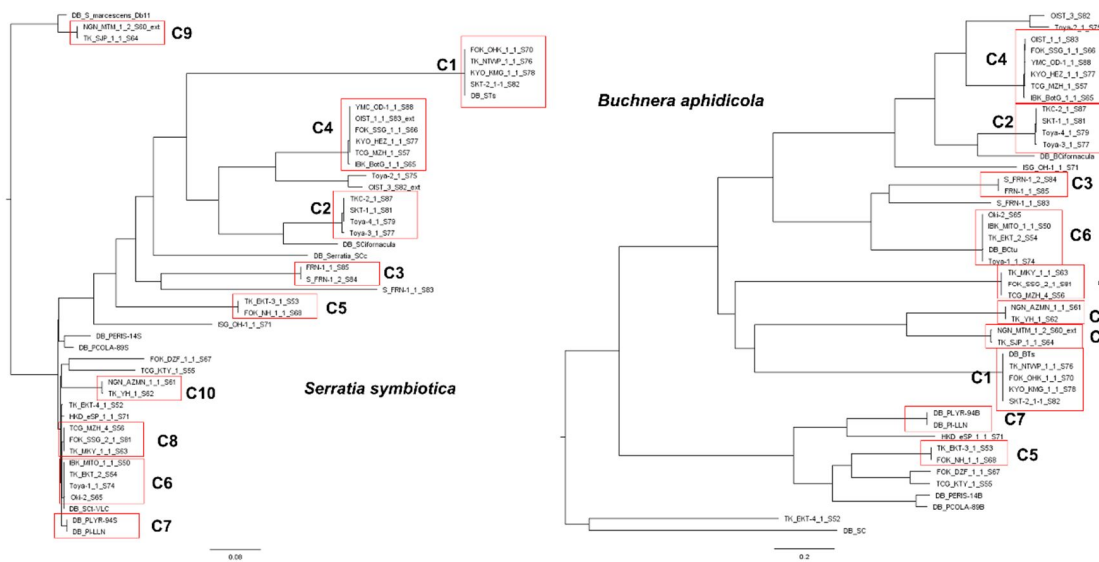


図2. ゲノムデータから推定された共生細菌2種の分子系統樹

各ゲノムクラスターにおけるゲノムサイズならびにGC含量については、*Buchnera aphidicola* についてはゲノムサイズならびにGC含量が比較的安定であるのに対し、*Serratia symbiotica* についてはそれぞれの値が大きく変動しており、ゲノム縮小進化の程度の異なる段階における情報の取得に成功した(図3)。

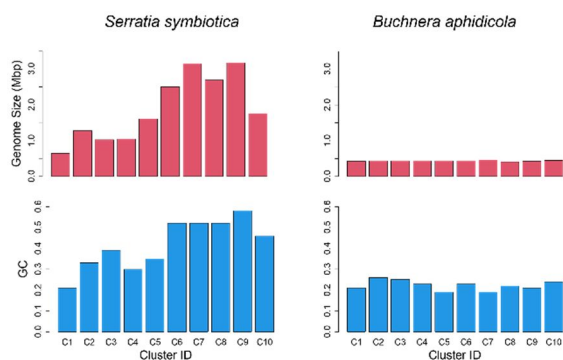


図3. 各近縁ゲノムクラスターにおけるゲノムサイズとGC含量

以上のように、アブラムシの細胞内共生細菌2種のゲノム情報について、ゲノム進化の各段階における突然変異率に関する情報を取得することに成功し、当初の目的をおおむね達成できた。今後は得られたデータを詳細に解析し、さらに公共データベース上で公開されている他の生物群のゲノム情報を含んだ解析系に拡張することで、ゲノム進化の過程で生じる突然変異率の進化動態に関するより深い理解が得られることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kinjo Yukihiro, Lo Nathan, Martin Paula Villa, Tokuda Gaku, Pigolotti Simone, Bourguignon Thomas	4. 巻 38
2. 論文標題 Enhanced Mutation Rate, Relaxed Selection, and the “Domino Effect” are associated with Gene Loss in Blattabacterium, A Cockroach Endosymbiont	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 3820 ~ 3831
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/molbev/msab159	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kinjo Yukihiro, Bourguignon Thomas, Hongoh Yuichi, Lo Nathan, Tokuda Gaku, Ohkuma Moriya	4. 巻 10
2. 論文標題 Coevolution of Metabolic Pathways in Blattodea and Their Blattabacterium Endosymbionts, and Comparisons with Other Insect-Bacteria Symbioses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.02779-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Arora Jigyasa, Kinjo Yukihiro, Sobotnik Jan, Bucek Ales, Clitheroe Crystal, Stiblik Petr, Roisin Yves, Zifcakova Lucia, Park Yung Chul, Kim Ki Yoon, Sillam-Dusses David, Herve Vincent, Lo Nathan, Tokuda Gaku, Brune Andreas, Bourguignon Thomas	4. 巻 10
2. 論文標題 The functional evolution of termite gut microbiota	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiome	6. 最初と最後の頁 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40168-022-01258-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Beasley Hall Perry G., Rose Harley A., Walker James, Kinjo Yukihiro, Bourguignon Thomas, Lo Nathan	4. 巻 46
2. 論文標題 Digging deep: a revised phylogeny of Australian burrowing cockroaches (Blaberidae: Panesthiinae, Geoscapheinae) confirms extensive nonmonophyly and provides insights into biogeography and evolution of burrowing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Systematic Entomology	6. 最初と最後の頁 767 ~ 783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/syen.12487	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Che Yanli, Deng Wenbo, Li Weijun, Zhang Jiawei, Kinjo Yukihiro, Tokuda Gaku, Bourguignon Thomas, Lo Nathan, Wang Zongqing	4. 巻 166
2. 論文標題 Vicariance and dispersal events inferred from mitochondrial genomes and nuclear genes (18S, 28S) shaped global <i>Cryptocercus</i> distributions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Phylogenetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 107318 ~ 107318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ympev.2021.107318	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 金城幸宏
2. 発表標題 ゴキブリの細胞内共生細菌Blattabacteriumの紹介とそのゲノム進化について
3. 学会等名 日本昆虫学会第81回大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金城幸宏・Thomas Bourguignon
2. 発表標題 Three mechanisms driving reductive genome evolution of Blattabacterium, the endosymbiont of cockroaches
3. 学会等名 第16回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金城幸宏
2. 発表標題 共生細菌におけるゲノム縮小の進化動態と分子進化パラメータの推定バイアス
3. 学会等名 第35回日本微生物生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金城幸宏
2. 発表標題 ゲノム縮小進化過程における遺伝的浮動の影響に関する網羅的調査
3. 学会等名 第17回日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2023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
研究協力者	ブーギニョン トーマ (Bourguignon Thomas)	沖縄科学技術大学院大学 (38005)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------