

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22687021

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いた人工・自然雑種の遺伝子発現ネットワーク解析

研究課題名(英文) Analysis of gene expression network of natural and artificial allotetraploids using next generation sequencers

研究代表者

長田 直樹 (Osada, Naoki)

国立遺伝学研究所・集団遺伝研究系・助教

研究者番号：70416270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,800,000円、(間接経費) 5,040,000円

研究成果の概要(和文)：異なった二種のゲノムが一つになった時には、様々な遺伝的な相互作用が起こると考えられている。本研究は特に、モデル生物であるシロイヌナズナの近縁種に注目して、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行った。これらの二種には自然に発生したと考えられる異質倍数体が存在することが知られている。これらの異質倍数体と親種の遺伝子発現様式をゲノムレベルで比較した。本研究で新たに解読された親種のゲノム配列をもとに各染色体由来の転写産物が偏りなく推定できるような方法を開発し、それをもとに転写産物の発現量を推定した。

研究成果の概要(英文)：Understanding the interaction between two different genomes is important issue in evolutionary biology research, especially when the two genomes were incorporated into the same organisms. I analyzed the genomic and expression properties of recently established natural allotetraploid plants, of which parental species are relative to the model species *Arabidopsis thaliana*. Using massively parallel sequencers, genome sequences of parental species and transcriptome data of allotetraploid species were studied.

研究分野：分子進化学・集団遺伝学

科研費の分科・細目：進化生物学

キーワード：ゲノム 異質倍数体 トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

二つの異なったゲノムが一つになった時に起こる異種ゲノム間相互作用はどのようにして起こるのだろうか。近年急速に発達した大量 DNA 配列解析技術により、異なったゲノム由来の転写産物発現量をゲノムワイドに解析することが可能になってきた。ゲノムレベルでの差異とトランスクリプトームレベルでの差異を比較することにより、表現型における両者の寄与の度合いを知ることができると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、異なったゲノムのセットを持つ異質倍数体のゲノム・トランスクリプトーム解析を通して、ゲノムレベルで二つのゲノムがどのように構成され、また遺伝子発現レベルで調節されているかを明らかにすることである。例えば、二つのゲノム間でどのようなゲノム構造変換があるのか、また、二つのゲノム間で組み換えはあるのか、などを検討する。また、二つの異なった集団遺伝学的特徴を持つゲノムが一つになった時にどのような挙動をするかについての理論的研究を行う。

3. 研究の方法

サンガー法による配列解析

予備段階の実験として、およそ 20 座位の DNA 配列について、サンガー法によるシーケンス解析を行った。PCR 法によりランダムに選ばれた座位の DNA 断片を増幅しクローニングした後、*Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ)を含む *A. lyrata*, *A. halleri* のゲノム DNA 配列を解読し、各種間の塩基配列の違いを定量化した。

次世代シーケンス解析

シロイヌナズナの近縁種、*A. halleri* および *A. kamchatica* のゲノム・トランスクリプトーム解析を行う *A. kamchatica* は *A. halleri* と *A. lyrata* からなる異質倍数体であることが知られている。両種のゲノム DNA および栄養期における葉由来 RNA よりライブラリーを作成し、イルミナ社 HiSeq2000 を用いて大量のシーケンスデータを得た。解析には、日本産 *A. halleri* ssp *gemmifera*, *A. kamchatica*, *A. kawasakiana*, および台湾産 *A. kamchatica* を用いた。

得られた *A. halleri* 由来ゲノム DNA 断片をアセンブルし、断片的なドラフト配列を得た。このドラフト配列を、公開されている *A. lyrata* ゲノム配列と整列させ、仮の親種ゲノムを得た。更に、その仮の親種ゲノムに

kamchatica のゲノム配列をマッピングすることにより、*A. kamchatica* のドラフトゲノム配列を得ることができた。更にそれに対してトランスクリプトーム配列をマッピングすることにより、異質倍数体における転写産物量の比較を行った。

4. 研究成果

ゲノム間相互作用の分子進化研究

二つの異なったゲノム間の相互作用の特殊な例として、霊長類におけるミトコンドリアゲノムと核ゲノムとの相互作用について研究を行った。ミトコンドリアゲノムは組換えがなく有効集団サイズが小さい。また、哺乳類では突然変異率が非常に高いことが知られている。霊長類の系統ではミトコンドリアで働く核遺伝子の進化速度が速くなっていることが知られているが、その説明として、脳でのエネルギー消費能力の向上のためであるという仮説が存在する。ところが、実際の分子進化パターンとミトコンドリアで働く複合タンパク質の立体構造を比較することにより、ミトコンドリアに固定した弱有害変異が、核にコードされている遺伝子による変異により補完されるというモデルがよくあてはまるということが示された。

種間遺伝距離の推定と進化速度の推定

Arabidopsis 近縁種間の遺伝子配列を比較することにより、分子時計の推定、特に核、ミトコンドリア、葉緑体ゲノムの違いに注目して比較を行った。これまで他の生物で確認されてきたように、同義置換率は、ミトコンドリアゲノムで最も低く、続いて葉緑体、核の順番になった。これらの違いはそれぞれのゲノムにおける突然変異率の違いと考えることができ、上記のゲノム間相互作用が起こりうることを示している。また、*A. halleri* と *A. lyrata* 間で一般的な分子時計が成り立つことを確認した。相同遺伝子を用いた比較では、樹木である *Populus* 属の遺伝子は *Arabidopsis* 属の遺伝子よりも 3 倍から 8 倍程度年あたりの進化速度が遅くなっていた。これは二属の世代時間の違いによるものであると考えられる。

次世代シーケンサーによる異質倍数体の解析

異質倍数体の解析を行うには、親種のゲノム構成が明らかになっていなければいけない。そのために、親種の一つであると考えられる *A. halleri* ssp *gemmifera* の DNA 解析を行った。次世代シーケンサーによる短い DNA 配列のアセンブルを行い、ドラフト配列を得ることができた。

得られた *A. halleri* ゲノム配列を *A. lyrata* ゲノム配列と整列させ、これを仮の異質倍数体親ゲノム配列とした。それに対し、台湾産 *A. kamchatica* のゲノム DNA 配列断片をマッピングし、*A. kamchatica* ゲノム配列を推定した。およそ 9 割の DNA 配列が平均 80 倍の重複率でマッピングされた。このことはそれぞれのホメオログ配列が親種と比較的近いことを示している。ところが、両親のゲノムは比較的 (~4,5%) 似ているために、反対の親ゲノムに間違っ てマッピングされる配列も存在する。したがって、通常用いられている次世代シーケンス解析の手法ではなく、それらの間違っ たマッピング結果を補正して解析を行った。

詳細な解析により、*A. kamchatica* のゲノム配列には親種と別れてから多くの挿入・欠失があることが分かった。これらの挿入・欠失は 100bp 以上の比較的大きなスケールではなく、数~数 10bp の小さなスケールで起こっているものがほとんどであることが分かった。また、親種ゲノム間で組換えが起こっているかどうかについて検証を行った。マッピングされた配列のパターンより、大きなレベルでの組換えの痕跡は発見できなかった。したがって親種ゲノムの間での遺伝子の交換は大規模には起こっていなかったと考えられる。更に、発現遺伝子がどちらの親ゲノムから由来しているかについての解析を行い、およそ 7,000 程度の遺伝子について比較を行うことができた。現在の段階では親種ゲノム間の整列の程度があまり良くないために、多くの遺伝子が解析から漏れているが、今後改良を加えて更に多くの遺伝子を比較することを考えている。また、異質倍数体のゲノムレベルでの遺伝子多型情報をもとに、詳細な過去の歴史推定を行う予定である。

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 8 件)

1. Naoki Osada*. Extracting population genetics information from a diploid genome sequence (**review**). *Front. Ecol. Evol.*, **2**: 7 (2014). doi: 10.3389/fevo.2014.0000, 査読有
2. Hiroshi Akashi*, Naoki Osada, Tomoko Ohta. Weak selection and protein evolution (**review**). *Genetics*, **192**: 15-31 (2012). Doi: 10.1534/genetics.112.140178, 査読有
3. Chi-Chun Huan, Kuo-Hsiang Hung, Wei-Kuang Wang, Chao-Li Huang, Tsai-Wen Hsu, Naoki Osada*, Chi-Chuan Hwang*, Tzen-Yuh Chiang*. Evolutionary rates of commonly used nuclear and organelle markers of *Arabidopsis* relatives (*Brassicaceae*). *Gene*, **499**: 194-201 (2012). doi: 10.1016/j.gene.2012.02.037, 査読有
4. Chao-Li Huang, Cheng-Yu Hung, Yu-Chung Chiang, Chi-Chuan Hwang, Tsai-Wen Hsu, Chi-Chun Huang, Kuo-Hsiang Hung, Kun-Chan Tsai, Kuo-Hsiung Wang, Naoki Osada*, Barbara Anna Schaal*, Tzen-Yuh Chiang*, Footprints of natural and artificial selection for photoperiod pathway genes in *Oryza*. *Plant J.*, **70**: 769-782 (2012). doi: 10.1111/j.1365-3113X.2012.04915.x, 査読有
5. Naoki Osada*, Hiroshi Akashi. Mitochondrial-nuclear interactions and accelerated compensatory evolution: Evidence from the primate cytochrome c oxidase complex. *Mol. Biol. Evol.* **29**: 337-346 (2012). doi: 10.1093/molbev/msr211, 査読有
6. Renchao Zhou, Shaoping Ling, Wenming Zhao, Naoki Osada, Sufang Chen, Meng Zhang, Hua Bao, Cairong Zhong, Bing Zhang, Xuemei Lu, David Turissini, Norman C. Duke, Jian Lu*, Suhua Shi*, Chung-I Wu*. Population genetics in non-model organisms: II. Natural selection in marginal habitats revealed by deep sequencing on dual platforms. *Mol Biol Evol.* **28**: 2833-2842 (2011). doi: 10.1093/molbev/msr102, 査読有
7. Naoki Osada*. Phylogenetic inconsistency caused by ancient sex-biased migration. *PLoS ONE* **6**: e25549 (2011). doi: 10.1371/journal.pone.0025549, 査読有
8. Wei-Kuang Wang, Chuan-Wen Ho, Kuo-Hsiang Hung, Kuo-Hsiung Wang,

Chi-Chun Huang, Hitoshi Araki, Chi-Chuan Hwang, Naoki Osada*, Tzen-Yuh Chiang*. Multi-locus analysis of genetic divergence between outcrossing Arabidopsis species: evidence of genome-wide admixture. *New Phytol.* **188**: 488-500 (2010). doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03383.x, 査読有

〔学会発表〕(計9件)

1. Dissecting regulatory mechanisms of transcriptome variation in *Drosophila melanogaster*. Naoki Osada, ISEGB2013, Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, 2013年11月8日
2. キロショウジョウバエにおける集団内での *cis* および *trans* 遺伝子発現変異の定量 長田直樹, 宮城竜太郎, 高橋文, 日本遺伝学会 慶応大学日吉キャンパス 2013年9月20日
3. Finding the factors of reduced genetic diversity on X chromosomes of *Macaca fascicularis*. Naoki Osada, Shigeki Nakagome, Shuhei Mano, Yosuke Kameoka, Ichiro Takahashi, Keiji Terao, SMBE2013, Chicago, USA, 2013年7月9~11日
4. Inferring natural selection by stratifying a single genome sequence. Naoki Osada, SMBE2012, Dublin, Ireland, 2012年6月23~28日
5. Inference of population history using a single genome data, Naoki Osada, 第34回日本分子生物学会 パシフィコ横浜 2011年12月13~16日
6. 機能喪失と CpG サイトの崩壊による旧世界ザル *CYP1A2* 遺伝子の高い遺伝的多様性 長田直樹, 宇野泰広 第83回日本遺伝学会 京都大学 2011年9月22日
7. Compensatory evolution between mitochondrial and nuclear genomes: evidence from primate respiratory chain complex genes. Naoki Osada, Hiroshi

Akashi. SMBE2011, Kyoto, Japan, 2011年7月28日

8. ミトコンドリア・核遺伝子間の弱有害補完モデル: 霊長類 COX 遺伝子群の進化を例に 長田直樹, 明石裕 第90回日本遺伝学会 北海道大学 2010年9月22日
9. Population Genetics of Non-human Primates: How Are We Diverse? Naoki Osada. International Primatological Society Congress, Kyoto, Japan, 2010年9月13日

〔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〕

6. 研究組織
(1)研究代表者
長田直樹 (Osada, Naoki)
国立遺伝学研究所・集団遺伝研究系・助教
研究者番号: 70416270