

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：27103

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570274

研究課題名(和文) 遺伝子発現調節の進化メカニズム

研究課題名(英文) Evolutionary mechanisms of regulation of gene expression

研究代表者

猪股 伸幸 (Inomata, Nobuyuki)

福岡女子大学・文理学部・准教授

研究者番号：20301335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：キイロショウジョウバエのアミラーゼ遺伝子発現システムをモデルとして「発現調節の度合い」に関する責任候補遺伝子をRNAseqによって網羅的に探索し、デンプンや単糖の代謝に関連した遺伝子を含む353の責任候補遺伝子を同定した。また、責任候補遺伝子のうち、実際のゲノム中では重複遺伝子であったものについて遺伝子コピーの発現量を個別に調べたところ、アミノ酸配列予測からはタンパク質機能は同等と考えられる重複遺伝子であっても、重複遺伝子コピー間では「発現調節の度合い」は著しく異なるという興味深い知見を得た。

研究成果の概要(英文)：As amylase gene expression system of *Drosophila melanogaster* is a model system, I identified 353 candidate genes, which includes genes relating to starch and sugar metabolism, for differential gene expression using RNAseq. Some of the 353 genes were duplicated genes in genome. Interestingly, amino acid sequences of the duplicated copies were predicted to be similar, but the degree of differential gene expression was highly different between the copies.

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：遺伝子進化

1. 研究開始当初の背景

ヒトとチンパンジーの生物学的差異を説明するには遺伝的差異はあまりに小さい。事実、所有しているタンパク質にはほとんど差異がない。よって、King and Willson (1975) は、ヒトとチンパンジーの生物学的差異は遺伝子発現の差異に起因するにちがいないと考えた。現在では、分子生物学の技術進歩により遺伝子の発現調節機構の研究は生物学の一大本流であり、進化生物学においてもその進化メカニズム研究は中心課題の一つとなっている。遺伝子発現調節の進化にはシス調節配列、トランス調節因子のどちらの変化が重要であろうか。一つの仮説は、トランス調節因子は多機能（多面発現）であるがゆえの機能的制約の為に変化が生じにくい、シス調節配列は機能的制約が緩やかな為に変化が生じやすく、迅速に進化可能であるというものである。たとえば、キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエおよび2種の種間雑種を用いた形態変化に関する29遺伝子における発現パターン解析の結果はこの仮説を支持するものであった (Wittkopp et al. 2004)。先行研究で想定されているトランス調節因子は、シス配列に直接結合するものである。発現調節の進化メカニズムを理解するには、目的のシス配列に直接結合しないトランス調節因子も調査する必要があり、一つの遺伝子システムについて網羅的に調査する戦略が有効だと考えられる。そこで、本研究ではショウジョウバエ・アミラーゼ遺伝子システムをモデルとして研究を遂行する。キイロショウジョウバエのアミラーゼ酵素活性を指標とした研究では、異なる餌環境に対する遺伝子発現の差異（以降「発現調節の度合い」と呼ぶ）が適応度に寄与している事が示唆されている (Yamazaki and Matsuo 1984)。実験室集団を用いた人為選択実験（異なる餌培地でキイロショウジョウバエを飼育し、アミラーゼ対立遺伝子頻度を300世代モニターした研究）では、シス・トランスの相互作用による共進化が比較的短期間で生じることが示された (Araki et al.

2005)。これは従来の仮説とは異なる結果であった。塩基配列比較による集団遺伝学的解析から、シス発現調節領域に自然淘汰が働いた可能性が示された (Inomata and Yamazaki 2002)。また、ショウジョウバエ・アミラーゼ遺伝子のシス発現調節領域には異なる調節機能配列が存在することが明らかになっている (Inomata and Nakashima 2008)。

2. 研究の目的

遺伝子発現調節の変化は進化的に比較的短い時間での適応の遺伝的素材であると考えられている。ショウジョウバエのアミラーゼ酵素活性は餌環境に応じて変化する。変化の度合いの分子レベルの実体は遺伝子の発現調節であり、それは適応度と関係があるために「環境適応候補遺伝子」として研究されている。本研究では、アミラーゼ遺伝子発現システムをモデルとして発現調節の分子基盤について全体像を明らかにし、それらの自然集団における動態を集団遺伝学的に解析することにより発現調節による適応の進化メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 責任候補遺伝子の網羅的探索

「発現調節の度合い」は異なる環境 X と環境 Y での遺伝子発現量の比 (Y/X) として定量化できる。グルコース培地を X、スターチ培地を Y とすると、ショウジョウバエではアミラーゼ遺伝子の発現量は (グルコース培地) < (スターチ培地) なので、アミラーゼ遺伝子の「発現調節の度合い」は 1 より大きい。したがって、「発現調節の度合い」に関する責任候補遺伝子はアミラーゼ遺伝子の「発現調節の度合い」を指標として相対的に定量可能である。図1に責任候補遺伝子の網羅的探索の概略を示す。

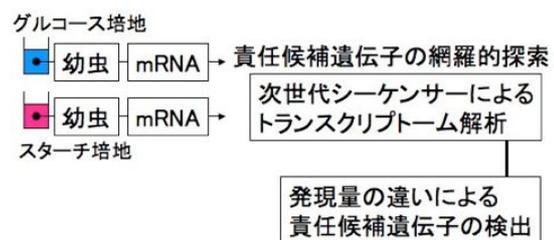


図1 責任候補遺伝子の網羅的探索の概略

ショウジョウバエでは一般に、成虫より幼虫の方が「発現調節の度合い」が大きい (Inomata et al. 1995a) ので幼虫を使って実験を行った。キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の代表的な実験室標準系統の1つである Canton-S 系統の幼虫を用いて「発現調節の度合い」の責任候補遺伝子の網羅的探索を行った。

サンプル調整による偏りを減らす為に以下のようにして幼虫サンプルを準備した。グルコース培地とスターチ培地の各々を複数バイアル準備して幼虫を飼育した。各バイアルから 20~30 匹の幼虫を回収した。同一培地から回収した幼虫はプールし、グルコース・サンプルとスターチ・サンプルとした。

各サンプルから RNA を抽出して EST ライブラリーを作成し、次世代シーケンサー (Illumina HiSeq2000) により転写産物 (cDNA) の配列決定をおこなった。取得した配列データをキイロショウジョウバエの公開データベースのゲノムにマッピングし、アノテーションをおこなった。マッピング、アノテーション、発現量の標準化をいくつかの方法で行ったところ、解析方法によって、定量結果がかなり異なることが明らかになった。解析方法を比較検討した結果、本研究において適当な解析方法を見いだした。

(2) 野外集団系統の確立

自然集団における発現調節の分子基盤の動態を明らかにするために、2012年12月に西表島でショウジョウバエを採集して自然集団由来キイロショウジョウバエ系統 (IR12 系統) を確立した。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサー (Illumina HiSeq2000) を用いて「発現調節の度合い」

に關与する責任候補遺伝子の網羅的探索を行った。各サンプルあたりおよそ1億リード (10Gb) の配列を取得した。次世代シーケンサーによって得られた配列データに基づく転写産物の定量解析では、解析方法によって定量結果が異なることが明らかになった。よって、適当な解析方法を検討した結果、リード数が発現量を表すので、2つのサンプル間でリード数 (発現量) が異なるものを発現調節に關与する責任候補遺伝子とすると、353 遺伝子の責任候補遺伝子を同定した。これらのうち、およそ70 遺伝子についてリアルタイム PCR により遺伝子発現量を定量した。リアルタイム PCR による発現量の定量結果と配列データ (次世代シーケンサーによる網羅的探索) に基づく定量解析の結果について、アミラーゼ遺伝子の「発現調節の度合い」を基準にして、比較検討したところ、本研究での配列データ解析は、一部偽陽性を含んではいるが、おおむね妥当であることが明らかになった。KEGG データベースを用いた pathway 解析で、353 遺伝子の責任候補遺伝子はスターチや単糖の代謝に関連した遺伝子をいくつか含むことが明らかになった。また、アミノ酸配列予測からはタンパク質機能は同等と考えられる重複遺伝子であっても、重複遺伝子間では「発現調節の度合い」は著しく異なるという興味深い知見を得た。

(2) アミラーゼはスターチをマルトースとグルコースに分解する酵素である。マルターゼは、アミラーゼと同じくスターチを分解する経路で使われる酵素であり、主としてマルトースをグルコースに分解する。キイロショウジョウバエのマルターゼ遺伝子は重複遺伝子である。そこで、スターチ分解経路に着目し、2種類の餌環境下において、キイロショウジョウバエ自然集団のアミラーゼ遺伝子およびマルターゼ遺伝子の発現量を調査して、遺伝子発現ネットワークがどのような挙動を示すのかを明らかにすることを試みた。

西表島由来の 36 単一雌系統をグルコースとスターチのえさに分けて飼育し、回収した三齢幼虫を用いて、リアルタイム PCR によって各遺伝子の発現量を定量した。先行研究同様、アミラーゼ遺伝子 (Amy-d) 発現量は、グルコースえさに比べてスターチえさの方が有意に高かった。今回の実験で調査した 11 のマルターゼ遺伝子は、Amy-d のようにスターチえさで育てた三齢幼虫の遺伝子発現量の方が高いという傾向は観察することはできなかった。調査した 15 遺伝子のうち、Amy-d、Mal-A1、Mal-A5b、Mal-A6、Mal-A8、Mal-B2、CG7685 (Amy-d 以外はマルターゼ遺伝子) の 7 遺伝子に遺伝的変異が存在した。これら 7 遺伝子について発現パターンの関係性がある遺伝子ペアを探すために相関係数を算出した。図 2 は相関係数を 0.1 刻みで色分けして示している。相関係数が高い程赤く、低い程青くなる。同じ遺伝子同士の相関係数は 1 なので最も赤い色で示してある。グルコース (図 2A) とスターチ (図 2B) では、スターチの方が全体的に相関係数は高く、赤みが強くなった。この結果から、餌環境が異なるとマルターゼ遺伝子の使われ方が異なることが示唆された。

以上の結果から、環境適応の遺伝基盤は重複遺伝子コピー間の機能分化に起因する遺伝子発現ネットワークの挙動の変化ではないかと考えられる。

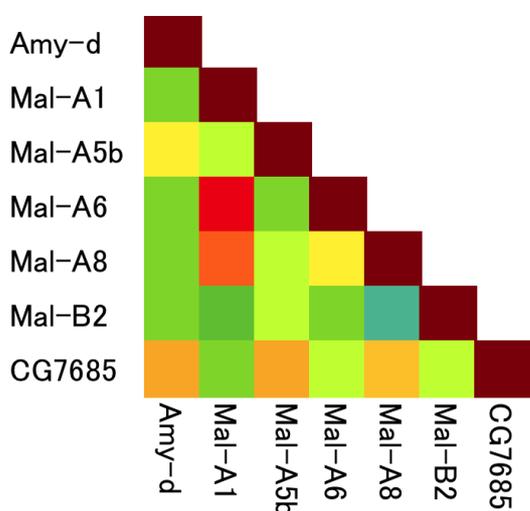


図 2A グルコースにおける遺伝子発現の相関

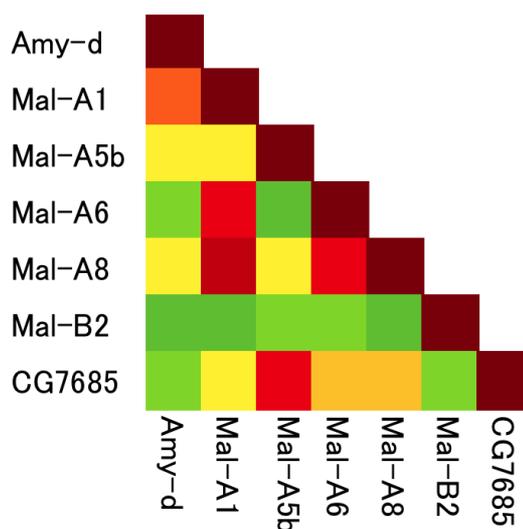


図 2B スターチにおける遺伝子発現の相関

