

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657163

研究課題名(和文)爬虫類ミトコンドリアにおける遺伝子発現様式の多様性と進化

研究課題名(英文) Diversity and evolution of gene expression in reptilian mitochondria

研究代表者

熊澤 慶伯 (Kumazawa, Yoshinori)

名古屋市立大学・大学院システム自然科学研究科・教授

研究者番号：60221941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、爬虫綱有鱗目の様々な系統を代表する種につき、次世代シーケンサーを利用したRNA-Seqデータを取得した。このデータを解析して、爬虫類ミトコンドリアDNAに由来するmRNAへのpolyA付加サイトの網羅的決定を行ったところ、種ごとに一部異なるパターンが発見された。またミトコンドリアDNAの遺伝子配置の変化がある種において、一部のタンパク質遺伝子のmRNA量が増加している結果を得た。このように爬虫類のミトコンドリア遺伝子発現系には多様性があり、進化していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We conducted RNA-Seq experiments using animal species representing Reptilia. We found some variations in the distribution of polyA-addition sites to mRNAs and some of them are consistent with variations of gene arrangements of mtDNAs. Accuracy of polyA addition was lowered to some extent for particular mRNAs in a species though reasons for this are currently unknown. Relative ratio of each mRNA abundance in a species is changed in a way that is consistent with an idea that polycistronic mRNAs are created from one control region to another. The gene expression system in mitochondria has variations and is evolving in Reptilia.

研究分野：分子進化学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：ミトコンドリア RNA-Seq 爬虫類 次世代シーケンス RNA編集 polyA付加

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物のミトコンドリア DNA (mtDNA) は約 16kbp の環状二本鎖 DNA であり、13 コのタンパク質遺伝子、2 コの rRNA 遺伝子、22 コの tRNA 遺伝子、及び制御領域 (mtDNA の複製・転写の制御に關与する約 1kbp の非コード領域) をコンパクトな遺伝子配置で含む。哺乳類を用いた 1980-1990 年代の先行研究によって、脊椎動物 mtDNA の遺伝子発現制御機構は概ね解明されたと思われていた。例えば、制御領域内から両方向に転写されたポリシストロニック転写物が tRNA 遺伝子の二次構造を目印に切断を受け個々の RNA 分子種が生成すること (tRNA punctuation model: Ojala et al. 1981, Nature 290:470-474)、その切断で生じた mRNA の 3' 末端に polyA が付加し、mtDNA 上にコードされない終止コドンがしばしば出現すること (例えば 3' 末端の U に polyA が付加して UAA 終止コドンが生じる) などである。

しかし近年様々な動物種の mtDNA 全塩基配列の解読が行われるにつれて、先行研究の成果だけで説明しきれない事例がいくつも出現してきた。例えば、動物 mtDNA がコードする tRNA 遺伝子の発現産物に広範に RNA 編集が行われることが分かった (Segovia et al. 2011, Mol. Biol. Evol. 28:2873-2881)。しかし、この RNA 編集の分子機構はほとんど未解明であり、そもそも tRNA 遺伝子以外の rRNA 遺伝子やタンパク質遺伝子の発現産物にも同様の RNA 編集があるのかについて誰も真剣な探索を行っていない。また、カメ類や鳥類の一部の種において、mtDNA コードの mRNA 中に例えば CUNA の 4 塩基でロイシンに対応するような翻訳フレームシフトも見出された (Russell and Beckenbach 2008, J. Mol. Evol. 67:682-695)。このケースでも同様に分子機構が不明であり、DNA レベルだけではなく RNA レベルでの研究が待たれている。

一方申請者らは、ヘビ類 mtDNA 上で制御領域が重複して 2 箇所が存在し、両者の塩基配列が遺伝子変換によって協調進化していることを発見した (Kumazawa et al. 1996, Mol. Biol. Evol. 13:1242-1254)。2 箇所の制御領域から転写反応が独立に開始しうるとすれば、ヘビ類ミトコンドリアで各遺伝子産物の発現レベルがどのように調節されるのかという疑問が生じる。このように様々な系統で mtDNA の遺伝子発現様式はダイナミックに進化しており、その実態を新しい角度から解明する研究が待たれている。

2. 研究の目的

本研究では、爬虫綱有鱗目の様々な系統を代表する種のミトコンドリア遺伝子発現系を題材に、RNA 編集サイトや翻訳フレームシフトサイトの探索、転写物への polyA 付加や RNA 切断における多様性の解明、mtDNA 遺伝子配置の変動や制御領域の重複が転写制御に与えた影響の解明を行う。次世代シーケ

ンサーを用いた新しいアプローチを開拓して、これまでほとんど誰も研究してこなかった爬虫類ミトコンドリアにおける遺伝子発現様式の解明に取り組む。

3. 研究の方法

RNA-Seq

目的とする動物の肝臓から RNA を抽出し、oligo dT ビーズを用いて polyA RNA の濃縮を行った。次に NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB 社) を用いて RNA-Seq ライブラリーの調製を行った。その概略を述べると、まず重金属と熱により RNA を断片化したのち、ランダムプライマーからの逆転写、2nd strand 合成、末端修復、アダプターライゲーションを手順通り行った。短鎖産物を除いたのち、12 サイクル程度の PCR 増幅を行い、この増幅産物の鎖長分布及び濃度を、Agilent Bioanalyzer 及び定量 PCR により調べた。このライブラリーの適量を用いて、Illumina Miseq 次世代シーケンサーによるランを実施し、151bp の read を pair-end で大量取得した。

mtDNA 全塩基配列の決定

上記の RNA-Seq 実験に用いたのと同個体から少量のゲノム DNA を抽出した。これを鋳型にして、mtDNA のほぼ全長にあたる約 15-16kbp の DNA 断片を Long PCR により増幅した。この増幅産物を超音波により平均約 600bp の断片に切断し、末端修復したのち、Meyer et al. 2007, Nucleic Acids Res. 35:e97 の手法に従い、20bp のタグ配列のライゲーション、SrfI 制限酵素による切断を行った。この切断産物を定量して、種ごとに均等割合で混合し、Roche FLX 次世代シーケンサーによって約 300bp の read を大量取得した。これら read が由来した種を、末端のタグ配列によって識別し、種ごとに *de novo* アセンブルを行った。contig 間のギャップは、別途 PCR 増幅・配列決定を行うことで埋め、約 17kbp の mtDNA 全塩基配列を決定した。

データ解析

RNA-Seq で得られた大量の read に対して、当該種の mtDNA 全塩基配列を query とした BLAST 解析を行い、mtDNA からの転写物に由来する read だけを選別した。これらの read を *de novo* アセンブルすることで、mtDNA 由来の mRNA から得られる cDNA の全長配列を復元した。その cDNA 塩基配列と mtDNA 塩基配列を比較することで、RNA 編集サイトの探索を行った。次に、mtDNA 由来 read のうち、polyA を 3' 末端に含むものを選別し、それらを mtDNA 全塩基配列の上にマッピングした。これによって polyA 付加サイトの網羅的同定を行い、その結果を爬虫類の種間で、あるいは先行研究における哺乳類との間で比較した。さらに各 mRNA の 3' 末端に polyA が付加する際の正確性について、RNA-Seq の read データ

に基づいて評価し、正確性の低下が疑われるケースがあれば、3' RACE 解析による検証を行った。最後に、mtDNA にコードされる 13 個のタンパク質遺伝子について、それぞれに由来する RNA-Seq の read を特定し、各遺伝子の発現量(mRNA 分子の相対量)を RPKM (Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads)の値で算出した。このデータをもとに、各ミトコンドリア遺伝子の相対的発現レベルと mtDNA 上のコード位置との間に何らかの関係が見られるかどうか調べた。

4. 研究成果

RNA-Seq データの取得

本研究の期間中に表 1 に示した 5 種の有鱗類から RNA-Seq データを取得した。個々の実験におけるライブラリーの調製条件や MiSeq ランの条件などは、試行錯誤を加えて少しずつ変えているが、概ね 1500-3500 万 read 程度の塩基配列がそれぞれの種から取得され、そのうちの 4-13%が mtDNA からの転写物に由来する read であった。これらの mtDNA 由来 read のうち、3' 末端に polyA が付加した read は 0.005-0.08%あることが示された。我々は本研究の期間直前に、Roche GS FLX Titanium 型次世代シーケンサーを用いて、シマヘビ(略称 Equa4)、サバンナオオトカゲ(Vexa3)、ヒョウモントカゲモドキ(Emac3)、サンドフィッシュ(Ssci6)の 4 種の RNA-Seq を、Illumina HiSeq 型次世代シーケンサーを用いてニホンカナヘビ(Ttac6)の RNA-Seq を実施している。本研究では、これらのデータも加えて上述のデータ解析を行った。

表 1 RNA-Seqデータの概要

動物名	略称	全read数	mtDNA由来read		polyA含有read	
			read数	割合(%)	read数	割合(%)
フトアゴヒゲトカゲ	Pvit10	22,304,660	2,940,040	13.2%	150	0.005%
ヤシヤモリ	Gvit3	16,113,622	1,040,088	6.5%	826	0.079%
シナワニトカゲ	Sero6	18,874,946	1,369,362	7.3%	905	0.066%
イボヨルトカゲ	Lfla3	35,300,086	1,462,000	4.1%	160	0.011%
ロージーボア	Ltril1	35,146,170	4,177,956	11.9%	1,680	0.040%

フトアゴヒゲトカゲの実験は、strand-specific RNA-Seqを実施し、条件が大きく異なる

RNA 編集の探索

現在までに RNA-Seq と同一個体についての mtDNA 全塩基配列の決定を、シマヘビ、サバンナオオトカゲ、ヒョウモントカゲモドキ、サンドフィッシュ、ニホンカナヘビの 5 種から行っている。これらの塩基配列を RNA-Seq から得られた cDNA 塩基配列と照合したところ、13 個のタンパク質遺伝子及び 2 個の rRNA には RNA 編集サイトが見いだされなかった。その他の種に関しては現在解析中である。

polyA 付加位置の網羅的決定

polyA 付加地点の網羅的決定を行ったところ、ヒトなどの哺乳類で得られた先行研究の結果(Ojala et al. 1981, Nature

290:470-474; Mercer et al. 2011, Cell 146:645-658)と概ね一致する位置に polyA が付加していることが分かった(図 1)。ただし一部において、爬虫類の種特異的に、異なる地点に polyA 付加したと考えられる事例が見つかった。例えば、ヒト及び殆どの有鱗類の種では、ND5 コード領域の直下に polyA が付加しないが、ニホンカナヘビにおいては ND6 コード領域(逆鎖)に 100bp 強入った地点に新たな polyA 付加サイトが見つかった。また、遺伝子配置変動によって ND5 遺伝子の直下に cytb 遺伝子が並ぶサバンナオオトカゲでも、ND5 コード領域の直後に polyA 付加サイトが見つかった。さらに、別の遺伝子配置変動によって ND1 遺伝子の直後の IQM tRNA 遺伝子クラスター(アルファベットは各 tRNA 遺伝子が結合するアミノ酸を示す。下線は L 鎖にコードされることを示す)の順序が QIM へと変化したフトアゴヒゲトカゲでは、ND1 コード領域の直後ではなく Q 領域の直後に polyA が付加するように変化していた。以上述べたような polyA 付加サイトの特徴は多数の read で共通に見られたため、それぞれの種のミトコンドリア内で主要な polyA 付加サイトとして用いられていると考えられる。一方、本研究では各コード領域の途中で polyA が付加したマイナーな polyA 含有 read も相当数見られた。ただし、これらは同一地点に付加したのではなく、ミトコンドリア内で RNA が分解する過程で誤って polyA 付加された副産物であろうと推定された。

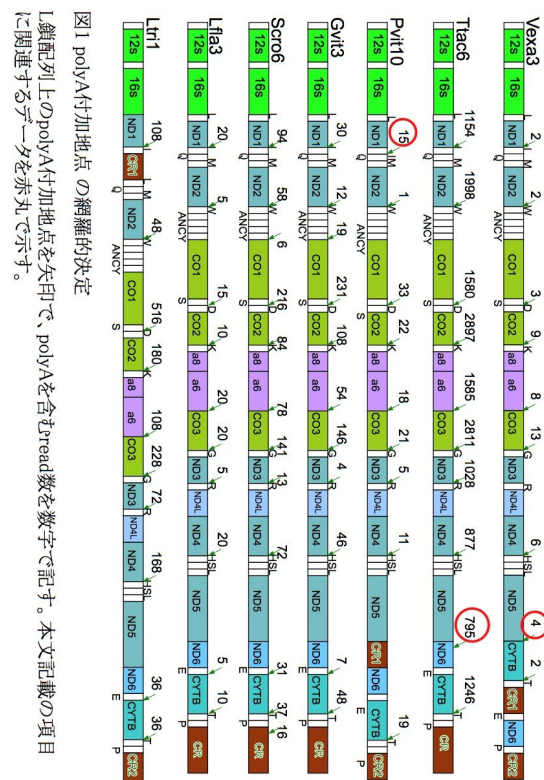


図 1 polyA付加地点の網羅的決定
L鎖配列上のpolyA付加地点を矢印で、polyAを含むread数を数字で記す。本文記載の項目に関連するデータを赤丸で示す。

polyA 付加の正確性の検討

ミトコンドリアタンパク質遺伝子の中

には、3'末端に終止コドンが存在せず、mRNAの3'末端にpolyAが付加して初めて終止コドンが出現するものもある。その場合、polyAが正確に付加しないとreadthrough産物などが生じることになる。RNA-Seqデータのうちで最もpolyA付加read数が多かったニホンカナヘビを例にして、polyA付加の正確性を検討した。ND1, ND2, CO2, ATP6, CO3, ND3, ND4, cytbの各mRNAの3'末端にpolyAを含むreadのうち、0.1-2.0%のものは正しい位置にpolyAが付加しないか、あるいは付加地点周辺の塩基配列にindelが生じていた。特にCO2とcytbには、このような異常polyA付加readの割合が高く、3'末端のU(遺伝子上ではT)が削られてpolyAが付加するタイプの異常産物が2%近く見られた。これが次世代シーケンスのエラーによるものかどうか調べるために、ニホンカナヘビのCO2 mRNAの3'末端の構造を3'RACE解析によって調べた。344個拾ったクローンのうち、11個において同様のUの欠失が見られた(3.2%)。従って、理由は不明であるが、いくつかのミトコンドリアmRNAのpolyA付加において、2%程度のエラーが生じていることが示唆された。このようなエラー産物は異常タンパク質の生成に繋がるため、生体内ではそれを除去する何らかの機構が存在するものと考えられる。

遺伝子配置変動と遺伝子発現の関係

表1に、5種の有鱗類における13タンパク質遺伝子の発現量の相対比をRPKM%として求めた結果を示す。このなかで極端に鎖長が短いATP8, ND3, ND4L, ND6遺伝子などは、そのmRNAの相対比が正確に求められないと考えられる。しかしその他のmRNAの定常状態におけるおおよその相対比をRPKM%で評価することは可能と思われる。全ての種を通じて、シトクロームオキシダーゼのサブユニッ

表2 5種の有鱗類のmRNAレベルの比較

遺伝子	動物種				
	Pvit10	Gvit3	Scro6	Lfla3	Ltri1
ATP6	10.3	10.7	14.7	17.6	8.0
ATP8	9.6	9.5	10.7	13.0	3.8
CO1	15.7	22.2	10.9	13.1	12.4
CO2	11.4	10.2	10.4	6.8	10.2
CO3	13.0	11.6	13.0	14.5	10.1
CYTB	10.8	6.5	4.5	4.6	8.9
ND1	6.1	4.8	13.4	11.4	11.6
ND2	3.4	3.4	6.4	4.1	2.6
ND3	2.9	4.0	2.1	1.5	6.9
ND4L	5.8	5.3	3.6	3.4	5.5
ND4	6.2	4.4	5.9	4.1	7.3
ND5	2.4	2.9	1.0	2.0	5.3
ND6	2.3	4.3	3.4	3.9	7.4
合計	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

13個のタンパク質遺伝子由来のread数に基づきRPKM値を算出したのち、13タンパク質のRPKMの合計を100%とするようにRPKM%を計算した

ト(特にCO1)の相対比が高く、NADH脱水素酵素のサブユニットの相対比が低いという傾向が示された。ただしNADH脱水素酵素のサブユニットの中でもND1だけはいくつかの種において比較的高い値を示した。ND1遺伝子は、タンパク質のサブユニット遺伝子よりも高い発現レベルが必要とされるrRNA遺伝子の直下にあり、特にヘビ類(本研究ではLtri1)では、2つの制御領域(図1のCR)に挟まれた地点にrRNA遺伝子とともに存在している。従って2つの制御領域に挟まれた領域(12S rRNA, 16S rRNA, ND1)をまとめて転写する転写制御機構が存在すると考えられ、Ltri1においてND1 mRNAレベルの亢進が見られた結果と整合的である。このような制御領域の重複は、Pvit10においても見られるが、2つの制御領域に挟まれたcytb mRNAの相対比は10.8%とやはり高くなっていた。本種においても、制御領域に挟まれた領域を転写単位とする転写調節機構が存在することが暗示された。

今後の課題

本研究では、RNA-Seqの手法上の制約からmtDNAにコードされるrRNAとmRNAに関してのみRNA編集の探索を行った。今後は実験手法を工夫して短鎖のtRNAにも探索範囲を拡大できるようにしたい。脊椎動物にはミトコンドリアtRNAにおけるRNA編集の実例があり、この探索により新たなRNA編集が発見される可能性も高いと思われる。本研究では種によって異なる位置にpolyAが付加する事例がいくつか発見された。今後は、これらの変化がどのような理由により生じているのかについて実験や考察を進めたい。また本研究では、次世代シーケンスを駆使したRNA-Seqによって、非モデル生物のミトコンドリア遺伝子発現レベルを俯瞰的に調査できることを示した。今後は、特定の環境変化(例えば温度ストレス、栄養状態の変化など)に応じて、それぞれの遺伝子の発現調節が具体的にどのように行われるのか、この系を使って調べることが可能となるだろう。

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 5件)

Ratmuangkhwang, S., Musikasinthorn, P., and Kumazawa, Y. (2014) Molecular phylogeny and biogeography of air sac catfishes of the *Heteropneustes fossilis* species complex (Siluriformes: Heteropneustidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, in press, 査読有

DOI: 10.1016/j.ympev.2014.05.009

橋口康之、熊澤慶伯 (2013) 脊椎動物嗅覚受容体遺伝子ファミリーの進化研究における次世代シーケンサーの活用. 生物科学

64:131-140、査読有

http://www.ruralnet.or.jp/seibutsu/064_03.htm

Dehara, Y., Hashiguchi, Y., Matsubara, K., Yanai, T., Kubo, M., and Kumazawa, Y. (2012) Characterization of squamate olfactory receptor genes and their transcript by the high-throughput sequencing approach. *Genome Biology and Evolution* 4:602-616、査読有
DOI: 10.1093/gbe/evs041

Jonniaux, P., Hashiguchi, Y., and Kumazawa, Y. (2012) Mitochondrial genomes of two African geckos of genus *Hemithetheconyx* (Squamata: Eublepharidae). *Mitochondrial DNA* 23:278-279、査読有

DOI: 10.3109/19401736.2012.668898

Matsubara, K., Kuraku, S., Tarui, H., Nishimura, O., Nishida, C., Agata, K., Kumazawa, Y., and Matsuda, Y. (2012) Intra-genomic GC heterogeneity in sauropsids: evolutionary insights from cDNA mapping and GC3 profiling in snake. *BMC Genomics* 13:604、査読有
DOI: 10.1186/1471-2164-13-604

[学会発表](計 9件)

孫ぎょう、栗崎政希、熊澤慶伯、爬虫類ミトコンドリアRNAの構造多様性の網羅的探索、日本進化学会第15回大会、2013年8月29日、筑波大学

栗崎政希、Pierre Jonniaux、松原和純、熊澤慶伯、RNA-Seqデータから脊椎動物の分子系統解析に繋げるためのパイプラインの構築、日本進化学会第15回大会、2013年8月30日、筑波大学

孫ぎょう、栗崎政希、熊澤慶伯、爬虫類ミトコンドリアにおける転写物の網羅的解析、日本進化学会第14回大会、2012年8月22日、首都大学東京

Kumazawa, Y., Kurisaki, M., and Sun, Y., Characteristics of mitogenomic data for vertebrate phylogenetics、The Plenary International Symposium "Phylogenetics", Society of Evolutionary Studies, Japan(招待講演)、2012年8月22日、首都大学東京

栗崎政希、松原和純、熊澤慶伯、トランスクリプトームを用いたヘビ類の系統的位置付けの解析、日本進化学会第14回大会、2012年8月21日、首都大学東京
山田知江美、柴田弘紀、熊澤慶伯、カメ類ミトコンドリアゲノムにおける翻訳フレームシフトの分子進化、日本進化学会第14回大会、2012年8月23日、首都大学東京

橋口康之、出原由季、松原和純、柳井徳磨、久保正仁、熊澤慶伯、並列DNAシーケンサーを用いた有鱗類嗅覚受容体遺伝子

群の網羅的解析、日本進化学会第14回大会、2012年8月21日、首都大学東京
藤谷武史、能登原盛弘、熊澤慶伯、尾張地区におけるカスミサンショウウオの遺伝的解析、日本爬虫両棲類学会第51回大会、2012年11月10日、愛知学泉大学
熊澤慶伯、三浦沙綾、孫ぎょう、ピエールジョニオ、山田知江美、橋口康之、ヤモリ類のミトコンドリアゲノミクス:遺伝子配置変動と系統関係、日本分子生物学会第35回大会、2012年12月12日、福岡国際会議場&マリンメッセ博多

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊澤 慶伯 (KUMAZAWA, Yoshinori)
名古屋市立大学・大学院システム自然科学
研究科・教授
研究者番号: 60221941

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: