

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291096

研究課題名(和文) 外来種の侵略性に関する遺伝的基盤の解明

研究課題名(英文) Genetic basis for invasiveness of alien species

研究代表者

牧野 能士 (Makino, Takashi)

東北大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：20443442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：生物が持つ適応力は種によって異なる。本研究は、重複遺伝子保持率から生物が持つ環境適応力を予測する手法の確立を目指し、動物ゲノムの重複遺伝子保持率と生態的特徴の関係を調査した。本研究で侵略的外来種アメリカザリガニの全ゲノム配列決定し、本種を加えたゲノム配列既知の動物を対象にした比較ゲノム解析により、侵略的外来種の重複遺伝子保持率が高いことを明らかにした。重複遺伝子保持率と環境適応力との関連を強く支持するものであり、ゲノム配列情報からの環境適応力評価への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Species vary their adaptability to novel environments. We investigated a relationship between the proportion of duplicated genes in animal genomes and their ecological features to predict adaptability of species based on genomic sequences. We sequenced a genome of invasive species *Procambarus clarkii* with high adaptability, and found that *P. clarkii* had the highest proportion of duplicated genes compared to other fully sequenced invertebrates.

研究分野：比較ゲノム学

キーワード：遺伝子重複

1. 研究開始当初の背景

人間活動により持ち込まれた外来生物が、在来生物の生息域を奪うなど生態系に悪影響を及ぼすことが問題となっており、植物から動物まで幅広い外来種が世界各国で報告されている。世界各地で外来種が生態系を破壊する問題が深刻化しているが、他の地域から持ち込まれた生物種の全てが新規環境に定着しているわけではない。特定の種が世界各地で独立に何度も侵略的外来種となっている背景には、これらの種に共通する遺伝的な基盤があると考えられるが、その詳細は全く分かっていない。

日本国内における代表的な侵略的外来種として北米原産のアメリカザリガニ (*Procambarus clarkii*) が挙げられるが、本種はアメリカ大陸のみならず、アジア、ヨーロッパ、アフリカにおいても爆発的に生息範囲を広げており、際立って高い環境適応能力を持っている。一般に、高い環境適応能力を生み出す遺伝的基盤は不明な点が多いが、ショウジョウバエを用いた研究において適応度に関する形質の遺伝的多様性や (Kellermann V et al., 2009)、遺伝的多様性を生み出す源となる重複遺伝子の保持が寄与していることが分かってきた。

これまでに我々はゲノム情報が既知である 11 種のショウジョウバエを用いた比較ゲノム解析により、ゲノム中に重複遺伝子を多く維持している種が高い生息環境多様性を持つことを示した (Makino T. and Kawata M. 2012)。多くの重複遺伝子を保持することで、重複遺伝子間の分化により高い遺伝的多様性が維持できると推察される。そこで、侵略的外来種はゲノム上に多くの重複遺伝子を保持している (高い環境適応能力に寄与) と仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、国内外で問題となっている侵略的外来種アメリカザリガニ (*Procambarus clarkii*) の全ゲノム配列決定を実施し、環境適応能力の高さを生み出す遺伝的基盤の調査を目的とする。遺伝的構成から生物の侵略性を推察できるようになれば侵略種の拡散防止や在来生物保全の観点からも重要な研究となる。

3. 研究の方法

(1) アメリカザリガニゲノム配列決定

ゲノム配列未知のアメリカザリガニの全ゲノム配列決定 (ゲノムサイズ 2.6Gb) を実施した。累代飼育を行ってきたメス 1 個体よりゲノム DNA を抽出し、Paired-end ライブラリ、および、長さの異なる Mate pair ライブラリを作成し、次世代シーケンサー (illumina HiSeq 2000) により約 100x のカバレッジで塩基配列決定を行った。ゲノムアセンブラー platanus を用いて、得られた配列の *de novo* アセンブリを行った。

アセンブリした scaffold 間の位置関係を調査して連鎖地図を作成するため、2 系統のアメリカザリガニを掛け合わせて F2 個体を取得し、これら F2 世代を用いた ddRADseq を実施した。

(2) アメリカザリガニ遺伝子予測

RepeatMasker を用いて得られたアメリカゲノム配列の反復配列のマスクを行った。その後、augustus (<http://augustus.gobics.de/>) によりタンパク質コード遺伝子の予測を行った。

(3) 重複遺伝子の同定

ゲノム配列が既知である約 50 種の動物のタンパク質配列を Ensembl データベース (<http://metazoa.ensembl.org/index.html>) よりダウンロードした。得られたタンパク質配列を用いて All-to-all Blast サーチを行い、重複遺伝子の同定を行った ($E\text{-value} < 10^{-5}$ 、alignable region > 30%)。今回ゲノム配列を決定したアメリカザリガニについても同様の方法で重複遺伝子の同定を行った。

(4) 生態的特徴による動物の分類

ゲノム配列既知種のうち、侵略的外来種データベースや世界の侵略的外来種ワースト 100 など基準として、侵略性の高い種を 9 種抽出した (アメリカザリガニ、カキ、ミジンコ、エンドウヒゲナガアブラムシ、ネバダオオシロアリ、マツノキクイムシ、ネツタイシマカ、オオマルハナバチ、ヒアリ)。また、ホストに依存し均質な環境に生息していることから重複遺伝子の保持率が低いと予想される寄生性生物を s10 種を抽出した (マンソン住血吸虫、シカダニ、ヒゼンダニ、サケジラミ、ヒトシラミ、*Strongyloides ratti*、*Trichinella spiralis*、*Brugia malayi*、*Onchocerca volvulus*、*loa loa*)。

4. 研究成果

(1) アメリカザリガニゲノム配列決定

アメリカザリガニのゲノム配列決定を行い、N50 が 410kb のドラフトゲノム配列を得た (全長 2.4Gb)。推定されているアメリカザリガニのゲノムサイズは 2.6Gb と非常に大きく、ゲノムのアセンブリは容易ではなく、アセンブリの際には能力の高い計算機を必要とした。これは、アメリカザリガニゲノム配列に極めて多くの反復配列を含むためだと考えられる。

(2) アメリカザリガニ遺伝子予測

得られたゲノム配列を用いて Augustus で遺伝子予測を行った結果、約 40000 のタンパク質コード遺伝子を得た。遺伝子の予測制度を BUSCO (<http://busco.ezlab.org/>) を用いて検証した結果、BUSCO 遺伝子の 90% 以上が、決定したゲノム配列に含まれていることがわかり、精度の高いゲノムアセンブリができたことが明らかとなった (図 1)。

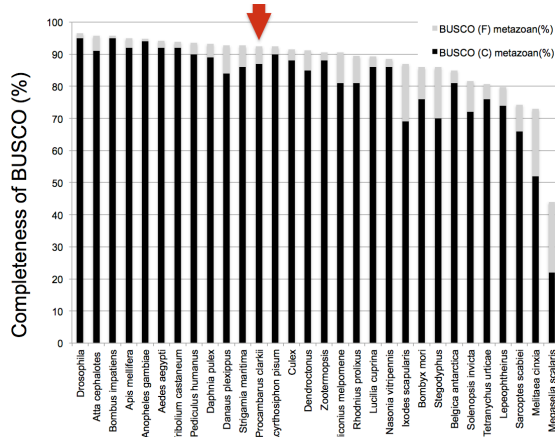


図 1. ゲノム配列既知種の BUSCO 保有率
矢印がアメリカザリガニを示す。

(3) 重複遺伝子保持率と生態的特徴の関係
アメリカザリガニを加えたゲノム配列既知の動物 50 種を対象にした比較ゲノム解析により、侵略的外来種の重複遺伝子保持率が高いことが明らかとなった (図 2)。特に、極めて高い環境適応力を持つアメリカザリガニは、これまでにゲノム配列が分かっている全ての無脊椎動物の中で重複遺伝子保持率が最も高いことが示された。一方、ノミヤシラミなどの外部寄生虫や寄生性センチュウは、重複遺伝子保持率が低いことも分かった。これは、宿主に依存した寄生性生物の生育環境が均質であり、進化過程において重複遺伝子が消失したためだと考えられる。以上の結果は、重複遺伝子保持率と環境適応力との関連を強く支持するものであり、ゲノム配列情報からの環境適応力評価への応用が期待される。

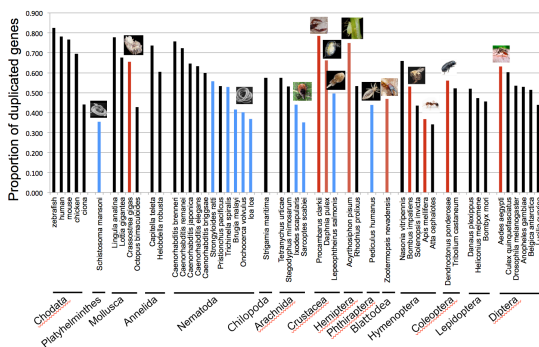


図 2. ゲノム配列既知種の重複遺伝子保持率
赤色のバーが侵略的外来種、青色のバーが寄生性生物を示す。

(4) アメリカザリガニゲノム配列を用いた遺伝的多様性解析
アメリカザリガニのゲノム配列が得られたことで、国内外個体のリシーケンスが可能となった。国内野外個体(仙台)と米国在来個体のゲノムリシーケンスを行い、得られた read を参照配列にマッピングして SNP を得た。遺伝的多様性を調べるため、コールさ

れた SNP を用いて Watterson theta を推定した。その結果、在来個体は国内導入個体よりも遺伝的に多様であることが分かった。また、ゲノムシーケンスに用いた個体の Watterson theta の推定も行ったところ、他個体と比較して theta が低く、累代飼育により遺伝的多様性が低下していることが示された。

国内に導入されたアメリカザリガニの集団構造を調査するため、国内 4 地点 (札幌、青森、鎌倉、沖縄) からサンプリングした野外集団 (8 個体をプール) のゲノムリシーケンスを実施した。また、ゲノム配列の種間比較を行うため近縁の *Procamburus* 属 4 種 (*Procamburus alleni*, *Procamburus fallax*, *Procamburus acutus*, *Procamburus zonangulus*) を用いたゲノムリシーケンスを行った。その結果、アメリカザリガニは、近縁な *Procamburus* 属の種よりも遺伝的多様性が低いことが分かった。

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 1 件)

① Satoshi C. Tamate, Masakado Kawata and Takashi Makino. (2014) Contribution of non-ohnologous duplicated genes to high habitat variability in mammals. *Molecular Biology and Evolution*. 31(7):1779-1786. 査読有
doi: 10.1093/molbev/msu128

[学会発表] (計 5 件)

① Takashi Makino 「High dosage sensitivity of genes maintained after whole genome duplication」 第 38 回日本分子生物学会シンポジウム (2015.12.1、神戸ポートアイランド [兵庫県神戸市])

② 牧野能士 「全ゲノム重複後に維持された重複遺伝子の進化と疾患との関係」 日本遺伝学会 ワークショップ (2015.9.25、東北大学 [仙台市青葉区])

③ 牧野能士 「Ohnologs in the human genome are dosage balanced and frequently associated with disease」 第 17 回日本進化学会シンポジウム (2015.8.26、中央大学 [東京都文京区])

④ 牧野能士 「人類による空前の進化実験~動植物の家畜化・栽培化がゲノムにもたらした負の遺産~」 日本遺伝学会 (2014.9.18、長浜バイオ大学 [滋賀県長浜市])

⑤ Takashi Makino. Genome-wide deserts for copy number variation in vertebrates. *International Plant & Animal Genome XXII*, San Diego, USA, 2014.1.14

[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〕

ホームページ等

<http://meme.biology.tohoku.ac.jp/klabo-wiki/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

牧野 能士 (Makino Takashi)

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号：20443442

(2)連携研究者

河田 雅圭 (Kawata Masakado)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：90204734