

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650130

研究課題名(和文)全ゲノム重複後に消失する遺伝子パターンの実験的検証

研究課題名(英文) Experimental verification of gene loss patterns in yeast genome after whole genome duplication

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では世代時間が短く扱いやすい4倍体酵母を用いた進化実験系を確立し、全ゲノムが倍加後も機能的遺伝子クラスターが保持されつつ、大規模遺伝子消失が起きるかを検証した。4倍体酵母を紫外線照射しながら200日間培養した結果、ゲノム中に多くの突然変異が検出された。これら突然変異のうち有害変異が機能的遺伝子クラスター上にどのように分布しているかを調査した結果、同一染色体上の遺伝子クラスターで同時に有害変異が生じていることが明らかとなった。このことは、倍数化後に遺伝子がランダムに消失していくのではなく、機能遺伝子クラスターが保持されるよう選択が働いている事を示している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to establish an artificial evolutionary experiment approach for tetraploid yeast, and examine the pattern of gene function losses. We cultured tetraploid yeast for 200 days under exposure to intense ultraviolet irradiation. As a result, we observed many mutations in the genome of tetraploid yeast. In particular, deleterious mutations were enriched in genes on the same chromosome of functional gene clusters.

研究分野：比較ゲノム学

キーワード：全ゲノム重複

1. 研究開始当初の背景

様々な生物のゲノム解読が進み、酵母、脊椎動物、植物においてゲノム全体が重複する WGD が起きたことが明らかとなってきた。WGD は進化過程で希に生じるイベントであるが、種子植物や脊椎動物の誕生に関わだけでなく、6500 万年前の大量絶滅の際には、植物の複数系統で絶滅回避に寄与したことが報告されている。

WGD 直後は全ての遺伝子が冗長であるため大規模な遺伝子消失が起きる。一方で、遺伝子量が厳密に決められている量的均衡遺伝子(Dosage-Balanced Gene, DBG)では WGD 後も消失することなく保持されるとの予測がなされた。個別の遺伝子重複が有害となる DBG であるが、WGD による遺伝子の重複ではゲノム全体に対する相対的な遺伝子量に変化がないため、有害な影響を受けることなく DBG は遺伝子コピーを作ることができる。WGD により重複した DBG は、相対的な遺伝子量を保持するため倍加した遺伝子量を減らすことなくゲノム上に留まる。我々は分子遺伝学的解析と比較ゲノム解析により、DBG は WGD 後に重複や消失を経験することなくゲノム上に保持されやすい事を明らかにした。遺伝子量的バランスによる DBG の保持機構については知見が集まってきたが、DBG でない遺伝子の消失過程については全く分かっていなかった。我々は、機能的に関連のある遺伝子が同一染色体上に隣接して遺伝子クラスターを形成することを報告したが、最近になって WGD 後に起きる大規模遺伝子消失を経たあとでも機能的遺伝子クラスターが保持されている傾向をヒト、酵母、シロイヌナズナにおいて発見した (図 1)。このことは、WGD 後に生じる冗長な重複遺伝子の消失はランダムではなく、自然選択の結果であることを示唆している。

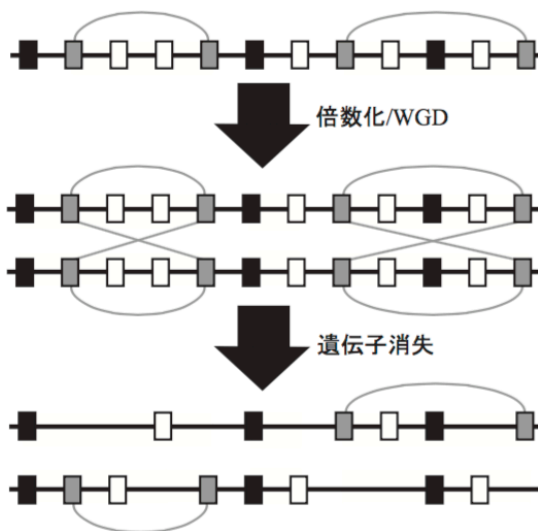


図 1. 倍數化後の機能的遺伝子クラスターの消失パターン 倍數化により全ての遺伝子(四角)が重複。遺伝子クラスターは遺伝子消失を経験した場合でも残存ペアが同一染色体上に保持される。

2. 研究の目的

我々は進化的解析を中心にして WGD 後の遺伝子の保持や消失に偏りがあることを示してきたが、実験的な検証は未だできていない(図 1)。WGD 後の遺伝子の保持・消失機構を理解するためには進化実験を通じた検証が必要である。そこで、本研究では世代時間が短く扱いやすい 4 倍体酵母を用いた進化実験系を確立し、全ゲノムが倍加後も機能的遺伝子クラスターが保持されつつ、大規模遺伝子消失が起きるかを検証した。

3. 研究の方法

(1) 異質倍数体酵母の全ゲノム配列決定

倍数体酵母を長期連続培養して生じた突然変異のパターンを調査し、我々が提案する遺伝子クラスターの保持を検証するため、異質倍数体酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC 42981 株を用いた。*Z. rouxii* ATCC 42981 株はゲノム配列が未知であったため、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、illumina Hiseq2000 によりゲノム配列の決定を行った。決定したゲノム配列を用いて Augustus により遺伝子の予測を実施した。

(2) 異質倍数体酵母の長期連続培養

異質倍数体 *Z. rouxii* ATCC 42981 株 独立 8 系統を YPD 培地・30°C 条件下で 200 日間培養を行った。培養液は毎日、新しい培地へ植え継いだ。培地を植え継ぐ際には、突然変異を導入するため 2 分間の紫外線照射を行った。

(3) 異質倍数体酵母のゲノムリシーケンスと有害変異の取得

Z. rouxii ATCC 42981 8 株を 200 日間培養後、Hiseq2000 でリシーケンスを行った。Hiseq2000 由来の short read 配列を BWA でゲノム配列決定した参照ゲノム配列にマッピングして、突然変異の生じた座位を網羅的に取得した。突然変異のうち、タンパク質コード領域中に存在するものを抽出し、アミノ酸配列を置換しない同義置換とアミノ酸配列を置換する非同義置換に分類した。非同義置換は PROVEAN(provean.jcvi.org)を用いての有害度を推定し、PROVEAN score が-2.5 以下のものを有害突然変異と定義した。

(4) 遺伝子クラスター情報の取得

機能的遺伝子クラスター情報を抽出するため、MIPS データベースよりタンパク質複合体とそのサブユニットのデータをダウンロードした。同一染色体上にあり、かつ、同一タンパク質複合体のサブユニットをコードする遺伝子の関係を機能的遺伝子クラスターと定義した。

4. 研究成果

(1) 異質倍数体酵母の全ゲノム配列決定

ゲノム配列が未知であった異質倍数体酵母 *Z. rouxii* ATCC 42981 株のゲノムシーケンス、および、*platanus* による *de novo* ゲノムアセンブリを実施した(N50: 750kb, scaffold 数: 188)。異質 4 倍体酵母 *Z. rouxii* ATCC 42981 株のゲノム構成のうち、ゲノム配列が未知であった *Z. pseudorouxii* 部分のゲノム配列が明らかとなった。augustus により遺伝子予測を行い、約 9000 の遺伝子を得た。ゲノム配列が既知である 2 倍体 *Zygosaccharomyces rouxii* CBS732 株の全 ORF 配列を用いて相同性検索を行い、identity の分布を調査した。その結果、54%の遺伝子が CBS732 株の遺伝子と 95%以上の相同性を持ち、残りの 46%の遺伝子は identity が 95%以下であり(88%あたりにピーク)、異質倍数体の特徴をよく反映していた(図 2)。

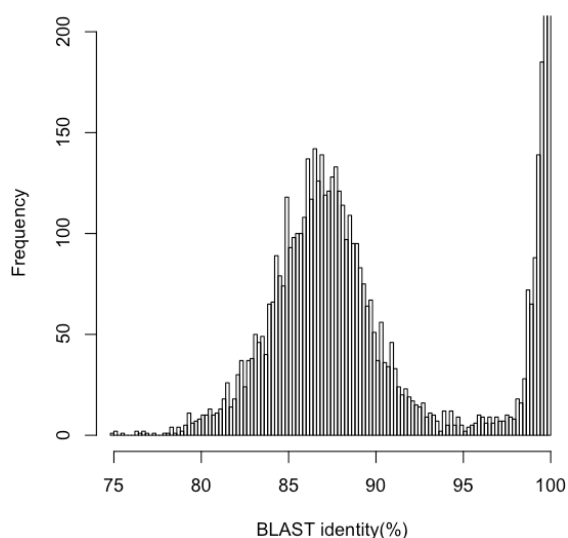


図 2. 異質倍数体 *Z. rouxii* ATCC 42981 株と 2 倍体 *Z. rouxii* CBS732 株の遺伝子の相同性 (identity) の分布

(2) 長期連続培養とゲノムリシーケンス
紫外線照射で変異を導入させながら *Z. rouxii* ATCC 42981 8 株を 200 日間培養し、HiSeq2000 でリシーケンスを行った。HiSeq2000 由来の short read 配列を参照ゲノム配列にマッピングして、突然変異の生じた座位を網羅的に取得した。

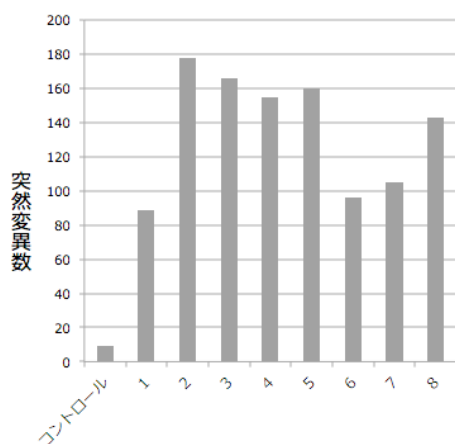


図 3. 200 日間の培養で *Z. rouxii* ATCC 42981 株ゲノムに導入された突然変異数

紫外線を照射せずに 200 日間培養したコントロール株では生じた突然変異が 9 のみであったのに対して、紫外線を照射した株では効果的に突然変異が導入されており、平均で 137 の突然変異がゲノム中に生じていた(図 3)。

(3) 機能的遺伝子クラスターの保持パターン
得られた突然変異のうち、アミノ酸配列を変える非同義置換、かつ、有害度の高い変異を PROVEAN で検出したところ 8 株平均で 57 の有害変異を取得した。有害変異が機能的遺伝子クラスター上にどのように分布しているかを MISP データベースのタンパク質複合体データを用いて調査した結果、25 の機能クラスター中に有害変異が生じていた。このうち、20 クラスターは同一種(*rouxii* もしくは *pseudorouxii*)の同一染色体上に突然変異が生じていた。有害変異が生じる際には、同一染色体上の機能クラスター中の遺伝子に同時に生じることが示された。このことは、倍数化後に遺伝子がランダムに消失していくのではなく、機能遺伝子クラスターが保持されるよう選択が働いている事を支持する結果である。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① 牧野 能士 「全ゲノム重複後の遺伝子進化」 酵母マルチオミクス研究会 (2016 年 1 月 28 日 サントリーワールドリサーチセンター[京都府相楽郡精華町])

② Takashi Makino. Experimental verification for gene loss pattern after whole genome duplication. 酵母マルチオミクス研究会 (2015 年 6 月 13 日 日本歯科大学[東京都千代田区])

[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)研究分担者

守屋 央朗 (Moriya Hisao)

岡山大学・異分野融合先端研究コア・准教授

研究者番号：60500808

(3)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