

論文の内容の要旨

論文題目 メダカ近交系統の交雑による対立遺伝子特異的な発現変動解析

氏 名 村田 泰彦

異なる生息環境に適応した同種集団は各生息環境において蓄積された自然変異によって異なる遺伝子発現量を示す。集団間に生じた遺伝子発現量の違いが、表現型の多様化、各生息環境下における種々のストレスへの適応を可能にしていると考えられる。このような遺伝的背景の異なる同種集団が再び接触する hybrid zone では各集団由来の対立遺伝子(アレル)を受け継いだ交雑個体が存在しており、野生生物集団間で数多く確認されている。交雑個体における 2 種のアレルの共存は、各アレルに特異的な発現量を変動させ、新たな表現型、場合によっては親と異なる環境適応能の獲得に結びつくと考えられる。交雑およびストレス曝露による両親由来の各アレルに特異的な発現量の変動解析は、親とは異なる環境適応能の獲得を分子生物学的な観点から理解することにつながると考えられる。しかし、アレル特異的な発現を定量的に評価するための方法論や適したモデル生物が不在であったため、遺伝的背景の異なる同種集団の交雑によってアレル特異的な発現がどのように変動するか解析が進んでいない。メダカは日本各地に特有の集団を形成しており、実験動物として多数の近交系統が樹立されている。近年の全ゲノム解析によって、南日本および北日本集団に由来するメダカ近交系統、Hd-rR および HNI 間には、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) が全ゲノムにおいて 3.4%、遺伝子コーディング領域において 1.8%存在することが明らかにされている。驚くべきことに、Hd-rR および HNI はこれだけの遺伝的背景の差異を有するにもかかわらず交雑によって、健康で生殖能を有する F1 交雑個体を作成可能である。本研究はこれらメダカ近交系統および F1 交雑個体に着目し、アレル特異的な発現量を個別および網羅的に定量する方法論を構築し、交雑による各アレル特異的な発現の変動、および環境ストレスとしての放射線ストレスが負荷された際の各アレル特異的な発現の変動を明らかにすることを目的とした。

まず、F1 交雑個体におけるアレル特異的な発現量を親系統と比較定量に適した方法が不在

なため手法の開発を行った。孵化後 3 ヶ月以上経過し、性成熟したメダカ近交系統 Hd-rR、HNI、相反 F1 交雑個体 NdF1 (HNI 雌および Hd-rR 雄の交雑個体) および dNF1 (Hd-rR 雌および HNI 雄の交雑個体) の雄 6 個体から腸をそれぞれ採取後、抽出した total RNA を用いて cDNA を合成した。個々の遺伝子についてアレル特異的な発現を定量的に評価するため、アレル特異的プライマーを用いた quantitative analysis of allele-specific expression (qASE) 法を開発した。アレル特異的プライマーの一方の 3'末端に SNP が位置するようにプライマーを設計し、さらに 3'末端から 2 塩基目を意図的にミスマッチ塩基として特異性を高めた。次に、Hd-rR および HNI アレル間で SNP を有する 11 遺伝子に対して、アレル間に共通な配列を用いて設計した共通プライマーおよび各アレルに特異的なプライマーを用い、各親系統および相反 F1 交雑個体における各遺伝子の総発現量およびアレル特異的な発現量を定量した。11 遺伝子のうち、総発現量が親系統間において有意に異なっていた 6 遺伝子 (PSMB8, MT, FMO, HPRT1, GAPDH, CYPR2J2) では、各 F1 交雑個体におけるそれらの総発現量は、親系統間で高い総発現量を示した親系統と同程度であった。6 遺伝子のうち、4 遺伝子 (PSMB8, MT, HPRT1, GAPDH) では、F1 交雑個体におけるアレル間の発現量の差が、親系統間の総発現量の差に比べ小さくなっていたが、2 遺伝子 (FMO, CYP2J2) ではそれらのアレル間の発現量の差は、親系統間の総発現量の差と同程度であった。残る 5 遺伝子においては、親系統間において総発現量に差はみられず、F1 交雑個体におけるアレル間の発現量にも差はみられなかった。また、相反 F1 交雑個体である NdF1 および dNF1 間において親系統の掛け合わせによるアレル特異的な発現量に差はみられなかった。アレル特異的な発現量が転写制御領域のみで調節されていると仮定した場合、親系統間で総発現量が異なる遺伝子では、F1 交雑個体において各親系統の総発現量の平均を示すことが期待されるが、そのような挙動を示す遺伝子は見出されず、交雑によるアレル特異的な発現量の変動に転写調節因子が関与することが示唆された。

次に、交雑によるアレル特異的な発現変動を網羅的に解析するため、各親系統 6 個体および F1 交雑個体 (NdF1) 6 個体の腸由来 total RNA をそれぞれ等量混合したプール RNA を作成し、次世代シーケンサー (Illumina) による RNA-Seq 解析に供した。得られたリードを参照配列 (Hd-rR ゲノム) にアライメント後、Ensembl に登録された遺伝子コーディング領域に応じ、各 SNP ポジションに対してアノテーションを行った。次に、RNA-Seq 解析によって検出された約 7,700 遺伝子に対して、サンプル間で共通する SNP の抽出、近交系統内に多型の恐れのある SNP の除去、遺伝子コーディング領域内に含まれる各アレル由来のリード数の総和の補正処理を施し、3447 遺伝子をアレル特異的な発現変動の解析対象とした。これら遺伝子の一部につき、親系統間の総発現量比および F1 交雑個体におけるアレル間の発現量比を qASE 法による定量結果と比較したところ、高い相関が見られたことから、本法により親系統の総発現量、アレル特異的な発現量を網羅的・定量的に評価可能であることが示された。親系統間において総発現量に 1.5 倍以上の差がみられた 1358 遺伝子のうち、836 遺伝子が Hd-rR 側に偏っており、522 遺伝子が HNI 側

に偏っていた。両遺伝子群ともに F1 交雑個体においては、アレル間の発現量比を調べたところ、親系統間の総発現量差より小さくなる傾向が認められた。この傾向は親系統間の総発現量が 2 倍、3 倍以上異なる遺伝子群においても同様であった。そこで、この 1358 遺伝子を対象に F1 交雑個体におけるアレル特異的な発現量の親系統に対する 1.5 倍以上の増減で分類したところ、両アレルに発現量の増減が見られなかった 495 遺伝子 (36%) を除く 822 遺伝子 (61%) においてアレルの片方の発現量が増加または減少していた。これら 822 遺伝子は F1 交雑個体において高い総発現量を示した親系統由来アレルの発現量が減少、または低い総発現量を示した親系統由来アレルの発現量が増加することで親系統間の総発現量差が小さくなる傾向が見られた。また、822 遺伝子に対して上述で分類された各遺伝子群に対して gene ontology (GO) 解析を行ったところ、Hd-rR アレルのみの発現量が 1.5 倍以上増加した遺伝子群に細胞周期停止関連遺伝子、1.5 倍以上減少した遺伝子群に微小管関連遺伝子、HNI アレルのみの発現量が 1.5 倍以上増加した遺伝子群に補酵素結合、ヘム結合および細胞内代謝経路関連遺伝子、1.5 倍以上減少した遺伝子群にシグナル伝達関連遺伝子が多く見られた。また、各遺伝子コーディング領域上の検出された SNP 数に含まれる非同義置換率と親系統間の総発現量比と相関が見られるか検討したが、相関は見られなかった。系統間のタンパク質のアミノ酸構成の変化と発現量差には、関係がないと考えられる。

F1 交雑個体 (NdF1) に γ 線 5Gy 照射後、4 時間経過した 6 個体の腸由来プール RNA を GA 解析に供し、非照射 F1 交雑個体と比較してアレル特異的な発現変動を検討した。解析対象となった 3447 遺伝子のうち、813 遺伝子において放射線照射後にアレル特異的な発現量が増加しており、813 遺伝子のうち 509 遺伝子においてアレルの片方または両方の発現量が 1.5 倍以上増加しており、304 遺伝子において 1.5 倍以上減少していた。GO 解析の結果、両アレルの発現量が 1.5 倍以上増加した遺伝子群に微小管関連遺伝子、減少した遺伝子群にミトコンドリアの ATP 合成関連遺伝子が多く見られた。Hd-rR アレルの発現量が 1.5 倍以上増加した遺伝子群には熱ショックタンパク関連遺伝子が多く見られた。HNI アレルの発現量が 1.5 倍以上増加した遺伝子群には脂質合成関連遺伝子、減少した遺伝子群には転写調節関連遺伝子が多く見られた。HNI アレルの発現量が 1.5 倍以上減少した遺伝子群に多く見られた転写調節関連遺伝子には放射線ストレス応答だけでなく、DNA 損傷応答およびアポトーシスに関わる遺伝子が含まれていた。

本研究によって、交雑によるアレル特異的な発現量の変動を個別および網羅的に解析する手法が樹立された。親系統間の総発現量が異なる遺伝子は、交雑後に、その差が小さくなる傾向が示された。親系統間の環境適応能に関連すると考えられる遺伝子群も交雑後に親系統間の発現量差が小さくなることが明らかとなった。また、放射線ストレス曝露によってアレル特異的な発現量が増加または減少した各遺伝子群内に特定の機能に関連する遺伝子が発見された。親系統間でアレル特異的な遺伝子発現量の制御に対するストレス感受性の違いが存在する可能性が示された。