

水生昆虫カワゲラ群集のゲノムワイド発現解析に基づく 日本の気候勾配に適応的な遺伝子の検索

愛媛大学大学院 学生会員 ○後藤友亮 愛媛大学大学院 非会員 Maribet Gamboa
愛媛大学大学院 正会員 渡辺幸三

1. はじめに

気候変動による河川環境の変化は、水生生物の種内の遺伝的多様性を劣化させ、集団や種の絶滅につながる恐れがある。したがって、気候勾配に沿った環境適応に対する生物の遺伝的応答の評価は将来の気候変動後の遺伝的多様性を予測するための重要な課題である。

環境適応に対する応答（適応進化）は DNA・RNA・タンパク質の3段階の変化から確認出来る。遺伝子発現過程において、DNA の塩基配列に暗号化されている遺伝情報は RNA へ転写され、その遺伝情報を基に RNA からタンパク質が作られる。RNA へ転写される遺伝情報は DNA のもつ遺伝情報すべてではなく、環境状態を基に生存に必要な遺伝子が選択的に転写される。そのため、同じゲノムをもつ個体間でも環境状態が異なれば RNA の塩基配列は異なる。したがって、RNA からどのような環境状態でどのような遺伝子が発現しているか知ることが出来る（図 1）。

遺伝情報をもつメッセンジャーRNA（mRNA）から遺伝子発現量を測定する方法を遺伝子発現解析という。その方法の1つである次世代シーケンサーを用いた RNA Sequencing（RNA-Seq）は、従来のマイクロアレイでは不可能な未知の DNA 配列のサンプルを用いることが可能であり、測定出来る遺伝子発現量の範囲がマイクロアレイより広い。また、サンプルを同時並行に解析することで大規模なデータを迅速に得られる。したがって、RNA-Seq は遺伝子発現解析に適した方法である。

カワゲラ目に属す水生昆虫カワゲラは幼虫の間水中に生息する。水中の溶存酸素を特に消費し、水質に敏感できれいな水を好む。溶存酸素濃度と水温には相関があり、水温が低いほど溶存酸素濃度が高い。気候変動により水温が上昇すると溶存酸素濃度が下がり、敏感なカワゲラは他生物より明確な適応を示すと予測でき、遺伝的多様性の劣化が心配される。

本研究は、RNA-Seq を用いて日本の気候勾配に沿ったカワゲラ群集の遺伝子発現パターンの地域変異を明らかにすることを目的とする。

2. 方法

カワゲラは 2014 年 2 月中旬から 4 月上旬にかけて札幌の 2 水系 7 地点、仙台の 1 水系 6 地点、岐阜の 1 水系 4 地点、松山の 1 水系 6 地点から採取した。（図 2）50 サンプルからそれぞれ RNA を抽出し、磁気ビーズ法により DNA の遺伝情報が写されている messenger RNA（mRNA）を単離・精製した。この mRNA と相補的な塩基配列の complementary DNA（cDNA）を合成し、50 サンプルをまとめて PCR で増幅した。この PCR 産物を次世代シーケンサーの Illumina HiSeq 2000 を用いてペアエンド法により cDNA 塩基配列の両端から 50 塩基ずつを解読した。

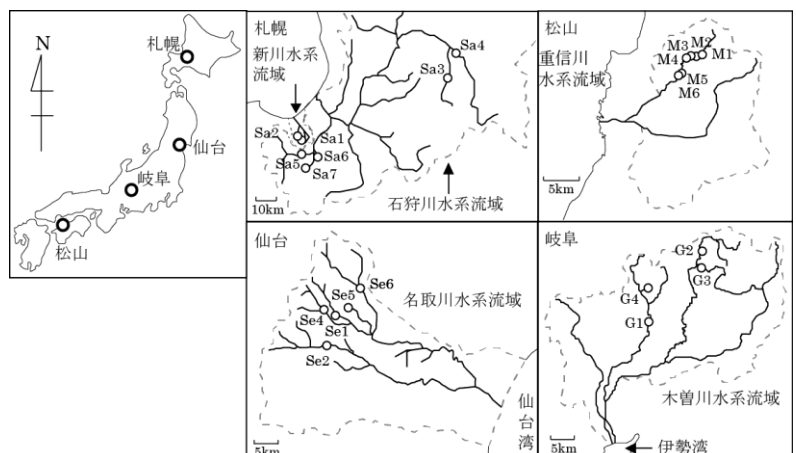


図 2 調査地点 仙台的地点 Se3 は GPS ロガーの測定ミスにより不明。松山の地点は上流から順に M1, M2, …, M5, M6 である。

シーケンス解析から解読された塩基配列のクオリティをチェックした後、アプリケーション Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて国際 DNA データベース GenBank の cDNA 配列とシーケンス解析結果の配列を照合し、最も類似する遺伝子を検索した。

3. 結果と考察

次世代シーケンス解析から合計 1,286,848 配列が検出された。各サンプルの配列数の最大は 138,042 配列、最小は 334 配列だった。各調査地域で得られた配列数は、札幌では 353,352 配列、仙台では 309,316 配列、岐阜では 26,200 配列、松山では 362,180 配列であり、各配列長は 49 塩基長だった。読み取られた配列数にサンプル間で大きな差が見られた。室内実験でサンプル間の濃度を調整し忘れたことが最も大きな原因であると考えられる。また、Illumina の次世代シーケンサーが読み取る配列をランダムに選択することもこの差に関係した可能性がある。読み取られた配列数の多いサンプルほど、実際に発現していた遺伝子領域全てを含んでいる可能性が高くなり、正確なデータといえる。シーケンス解析結果の予想塩基長は 100bp であったが、実際の結果は約半分の長さだった。この原因は、室内実験の RNA 断片化時に、試薬の過剰添加や保温時間超過により過度に断片化されたことであると考えられる。

Local Blast v2.2.30 で検索した結果、次世代シーケンサーで検出された 353,352 配列のうち 1,732 配列がデータベース上の配列と一致した。また、411 の遺伝子領域が特定された。そのうち、各地域の群集を比較すると、札幌では 131、仙台では 88、岐阜では 92、松山では 79 の遺伝子領域が各地域で特異だった。それに対して、4 地域において共通の遺伝子領域は Ribosomal Protein S26 というタンパク質を発現する遺伝子領域の 1 つのみだった。特定された遺伝子領域は札幌で特に多かった。サンプリングは冬に行ったため、札幌は他地域より特に寒冷な環境状態だった。このことから、極端な環境状態に適応するためにカワゲラはより多くの遺伝子を発現する必要があると推測出来る。

4. おわりに

本研究で、RNA-Seq を用いて日本の気候勾配に沿ったカワゲラ群集の遺伝子発現パターンの地域変異を迅速に明らかにすることが出来た。今後の課題は、遺伝子の機能の特定、遺伝子多型の発見、発現変動遺伝子の特定である。

5. 参考文献

・ Zhao, Y., Zeng, Y., Chen, L., Dong, Y., Wang, W. (2013) Insect Science, 21, 687-698

表 1 BLAST 検索結果			
	一致した 配列数	特定された 遺伝子領域	地域特有の 遺伝子領域
札幌	728	143	131
仙台	407	99	88
岐阜	167	103	92
松山	430	92	79
合計	1732	437	390

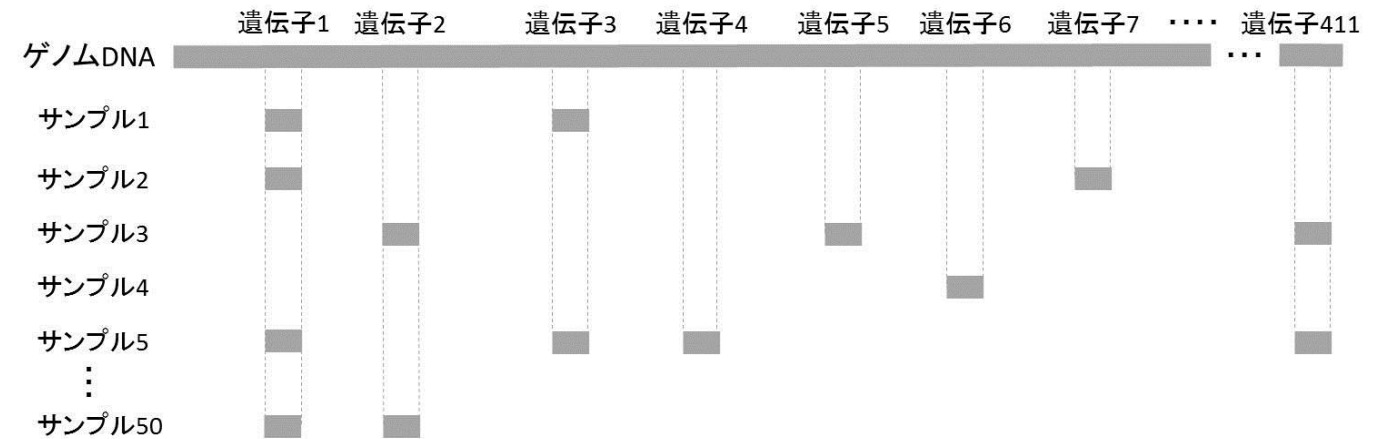


図 1 遺伝子発現の例