

次世代シーケンシングを用いた 河川昆虫カワゲラの日本列島の気候勾配に沿った発現変動遺伝子の探索

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

気候変動は、水温上昇や水質悪化等のハビタットの劣化に伴う適応進化過程を通じて、遺伝的多様性の損失を招く恐れがある。適応進化の過程は細胞内の DNA・RNA・タンパク質の3段階の変異で観察される。異なる環境下における同種内の生物の転写遺伝子には差異が生じる可能性があり、遺伝子発現解析により気候環境に適応的な遺伝子が特定されると考えられる。しかし、異なる気候環境下における遺伝子発現の違いに焦点を当てた研究は非常に少ない。

遺伝子発現解析の手法には、マイクロアレイや次世代シーケンシングを用いた RNA Sequencing (RNA-Seq) などがある。マイクロアレイは既知遺伝子の発現量測定に用いられている。一方、RNA-Seq は数十億の配列を同時並行に処理できるため、ゲノムワイドに及ぶ解析が可能であり、マイクロアレイに比べて測定できる発現量の範囲が大きい。また、未知遺伝子の発現量測定も可能である。

幼虫の間、水中に生息するカワゲラ類は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ことが知られている。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したり水質が変化したりすると、敏感であるカワゲラ類は他生物より明確な適応を示すと予測され、遺伝的多様性の劣化が懸念される。

そこで本研究では、次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq 解析により、水生昆虫カワゲラ群集の RNA 配列を一挙に解読し、日本の気候勾配に沿った4つの地域間、かつ8種の種間において発現量が変動している遺伝子を検出する。

2. 方法

気候環境の異なる4つの地域を選び、2014年2月から4月にかけて札幌の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地点からカワゲラを採取した(図1, 表1)。標本は実体顕微鏡と日本産水生昆虫図鑑を用いて同定した。RNeasy Mini Kit (QIAGEN) と TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて50個体からそれぞれトータル RNA を抽出した。TURBO DNA-free Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた酵素反応により混入した DNA を分解し、Dynabeads mRNA DIRECT Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた磁気ビーズ法によりトータル RNA から messenger RNA (mRNA) を単離・精製した。次に RNA Fragmentation Reagents (Thermo Fisher Scientific) を用いた加水分解反応により mRNA を200塩基以下に断片化した。その後、SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Thermo Fisher Scientific) を用いて RT-PCR により complementary DNA (cDNA) に逆転写した。精製後、NEBNext End Repair Module (New England Biolabs) を用いて cDNA 末端の平滑化、Klenow Fragment (Takara Bio) を用いて3'末端への dATP 付加を行い、T-A ライゲーションにより次世代シーケンシング解析に必要なアダプターを付加した。PCR 増幅後、PCR 増幅産物をアガロースゲルから切り出し、QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。最後に各個体の cDNA を等量ずつ混合・濃縮し、次世代シーケンサー HiSeq 2000 (Illumina) を用いてペアエンド法により cDNA 塩基配列の両端から49塩基ずつ解読した。解読した配列を Fastq ファイルとして取得し、ソフトウェア FastQC を用いて塩基のクオリティを確認した。ソフトウェア Cutadapt を用いてアダプター配列内に含まれる個体を識別するためのインデックスを除去し、ソフトウェア Trimmomatic を用いてアダプターを除去した。その後、ソフトウェア FASTX-Toolkit を用いて3'末端からクオリティ値が30未満の塩基を削除し、20塩基長未満になった配列を除

去した。

3. 結果と考察

シーケンス解析により、カワゲラ 50 個体から 1 配列 49bp のリードが 1,286,848 配列得られた。また、クオリティ値が 20 以上の塩基の割合を示す Q20 は 80~96%だった。アダプター、インデックス、クオリティの低い塩基を除いた結果、85,052 配列のリードが残った。このことから、カワゲラの cDNA 配列が少量しか含まれておらず、多くのアダプターが読み取られていたことが分かった。cDNA 配列が少量だった原因として、T-A ライゲーションより前の実験段階においてミスがあり、アダプターが cDNA に適切に付加されなかった可能性や mRNA 単離・精製、断片化、逆転写に問題があった可能性が考えられる。アダプター混入の原因として、T-A ライゲーションにおいてアダプター同士が結合したアダプターダイマーという配列が非常に多く作られていたことや 49 塩基長未満の cDNA 配列が多かったことが挙げられる。cDNA とアダプターの配合比率や反応時間といったライゲーション反応条件に問題があった可能性や試薬の混和が不十分であった可能性が考えられる。

4. 今後の展望

ソフトウェア Trinity を用いて 5,052 配列のリードから元の配列を復元する de novo アセンブリを行う。アセンブリから得られた配列へのリードマッピング、発現量正規化後、発現変動遺伝子を検出する。

5. 謝辞

本研究は、科学研究費補助金・基盤研究 B (25289172)、特別研究員奨励費 (13F03366)、挑戦的萌芽 (26630247) の資金的援助を受けました。ここに記して謝意を表します。

6. 参考文献

- 1) Schena, M., Heller, R. A., Theriault, T. P., Konrad, K., Lachenmeier, E., & Davis, R. W. (1998) Trends in Biotechnology, 16(7), 301-306
- 2) Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009) Nature Reviews Genetics, 10(1), 57-63

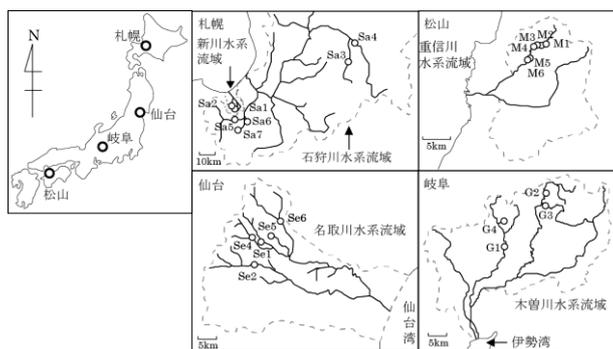


図 1 調査地点

注 1) 地点 Se3 は GPS ロガーの測定ミスにより不明である。

注 2) 松山の地点は上流から順に M1, M2, …, M6 である。

表 1 解析個体数

種名	和名	札幌	仙台	岐阜	松山
<i>Haploperla japonica</i>	ヤマトヒメミドリカワゲラ	2	2	2	2
<i>Nemoura sp.</i>	オナシカワゲラ的一种	2	2	2	2
<i>Stavsolus sp.</i>	ヒメカワゲラ的一种	2	2	2	2
<i>Rhabdiopteryx japonica</i>	オビシタカワゲラ	2	2	2	1
<i>Isoperla nipponica</i>	フタスジクサカワゲラ		2		
<i>Amphinemoura sp.</i>	フサオナシカワゲラ的一种	1	1	1	
<i>Perlodini incertae</i>	アミメカワゲラ	2	2	2	2
<i>Eucanopsis nivalis</i>	コバネクロカワゲラ	2	2	2	
合計		13	15	13	9