

論文の内容の要旨

論文題目 バクテリア16S rRNA遺伝子の進化

氏名 佐藤 允治

研究の背景

リボソームは全ての生物に存在し、DNA から mRNA に写し取られた遺伝情報をポリペプチドへと翻訳するタンパク質合成装置としての役割を担っている。バクテリアにおいては、リボソームは 30S サブユニットと 50S サブユニットの2つから成り立っており、30S サブユニットは 16S rRNA と 21 のリボソーマルタンパクから構成され、50S サブユニットは 5S rRNA と 23S rRNA、36 のリボソーマルタンパクから構成される巨大な RNA-タンパク質複合体である。リボソームは、機能的な重要性もさることながら、その構造の複雑さや生合成過程の複雑さから、進化的に保守的であると考えられてきており、各成分が協調進化してきたと考えられている。このため、リボソームを構成する rRNA は、水平伝播を受け入れない分子であると考えられてきた。このような「種固有性」という遺伝学的・生化学的な特徴に加えて、16S rRNA は情報量が豊富で進化速度が遅い領域が存在するため遠い種同士の比較にも適しているといった情報学的な特徴を有することなどから、系統解析の指標となる分子・遺伝子として扱われてきた。

しかし、自然界における 16S rRNA 遺伝子の水平伝播の報告も存在する。一つの生物種の 16S rRNA 遺伝子が、あたかも系統的に異なる複数の生物種の組み合わせ、いわゆるキメラ状態であるという報告である。また、16S rRNA 遺伝子のみならず、16S rRNA 遺伝子がコードされているリボソーマルオペロンが丸ごと水平伝播している報告も存在する。さらに我々の研究室では、人工的な 16S rRNA 遺伝子の水平伝播実験により、大腸菌との相同性が 80%ほどの、綱レベルで異なる分類群の 16S rRNA 遺伝子でも大腸菌の生育を相補できることを見出した (Kitahara et al., 2012)。このように、16S rRNA 遺伝子は部分、あるいは全体として、少なくとも水平伝播を受け入れる余地がある。

研究の目的

上述のように、16S rRNA 遺伝子の部分的な水平伝播の状況証拠は蓄積されつつある。しかし、これらの解析は、系統樹解析によって議論されており、単一の進化史しかあらわすことしかできない系統樹では、遺伝的組換えを含むデータセットの進化解析は不可能である。そこで本研究は、遺伝的組換えや水平伝播といった現象を含む進化史を記述可能な「系統ネットワーク法」を使用・応用して、(1)大腸菌・赤痢集団の 16S rRNA 遺伝子の詳細な系統ネットワーク解析、(2)腸内細菌目を対象とした 16S rRNA 遺伝子の詳細な系統ネットワーク解析、(3)バクテリアの各門を対象とした網羅的な水平伝播の検出、の3つの課題を通じて、16S rRNA 遺伝子の水平伝播を網羅的に解析した。

材料と方法

データの取得と整理

全ての 16S rRNA 遺伝子は、NCBI に登録されているバクテリアの全ゲノムから NCBI のアノテーションに従って抽出した。データの取得は、大腸菌・赤痢集団は、2013 年 10 月 2 日、腸内細菌目は 2013 年 10 月 4 日、バクテリア全体のデータは 2014 年 11 月 1 日に取得したものをを用いた。節約的な系統ネットワークは、Bandelt (1994) の手法を用い手で作成し、距離行列を用いて作成する系統ネットワークは Neighbor-Net 法 (Bryant and Moulton, 2004) を用いた。Neighbor-Net 法の計算・作成には SplitsTree4 (Huson and Bryant, 2006) を用いた。多重整列は、MAFFT (version7) (Katoh and Standley, 2013) を用いて行い、ギャップが 5% 以上含まれるサイトは解析から取り除いた。網羅的に節約的な系統ネットワークを作成するプログラムは、Perl Script を用いて作成した。

系統ネットワーク法による遺伝的組換えの検出方法

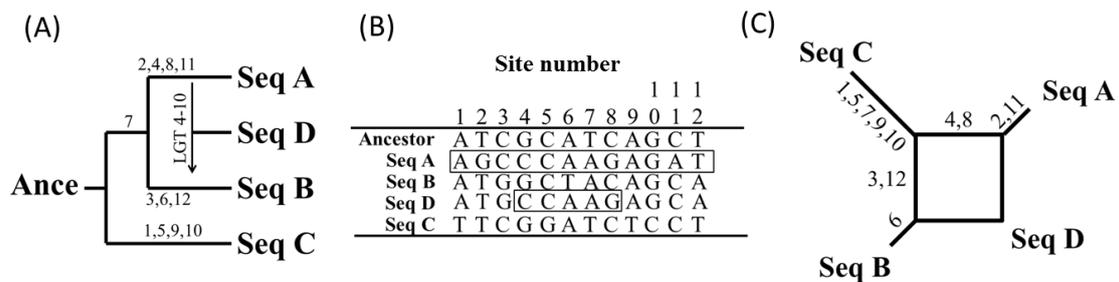


図 1. 系統ネットワーク法による組換えの検出方法の説明

図 1 に節約的な系統ネットワーク法による組換えの検出方法を記す。図 1A は仮想的な進化史である。Ancestor からサイト 1,5,9,10 へと点突然変異が蓄積することにより Seq C が生まれた。一方で、Ancestor からサイト 7 へと点突然変異が蓄積することにより生じた配列へと、さらに 2,4,8,11 へと点突然変異が蓄積することにより Seq A が生じ、3,6,12 へと点突然変異が蓄積することにより Seq B がそれぞれ生じたとする。Seq D は、Seq A のサイト 4-8 までの領域が Seq B へと水平伝播することにより生じた Seq A と Seq B の間の組換え体である。これらの配列が得られたとしたら、図 1B のようなアライメントを得ることができる。図 1B のアライメントから作成された系統ネットワークを図 1C に記す。図 1C の網目構造は正方形を成しており、平行する辺は同じサイトをあらわしている。すなわち、サイト 4 と 8 は Seq A, Seq D / Seq B, Seq C の系統関係を表し、サイト 3 と 12 は、Seq A, Seq C / Seq B, Seq D の系統関係を表す。このような網目構造が生じている理由は、Seq D の Seq A 由来の領域は Seq A と同様の系統関係を示し、Seq B 由来の領域は Seq B と同様の系統関係を示すからである。このように、組換え体を含むデータセットで系統ネットワークを作成した場合、網目構造を形成することが特徴であり、かつ網目を構成する辺のどちらか一方は組換え領域由来である。組換え以外に、平行置換によって矛盾する系統関係が生じた場合でも、系統ネットワークは網目を形成する。しかし、平行置換は連続した塩

であると示唆された。また、大腸菌・赤痢集団では、ゲノム内に複数の系統の 16S rRNA 遺伝子を持っていることは普遍的なことであり、組換え体 16S rRNA 遺伝子と親配列の系統すべてをゲノム内に保有する株も見られたことから、大腸菌・赤痢集団の祖先の段階で生じたゲノム内組換えが今日の大腸菌・赤痢集団の 16S rRNA 遺伝子の多様度を創生した可能性が示された。

腸内細菌目を対象とした詳細な系統ネットワーク解析を通じて、腸内細菌目において 16S rRNA 遺伝子の水平伝播は普遍的に見られるということが分かった。また、系統ネットワークのループ構造に対して、配列固有の塩基置換が少なかったことから、16S rRNA 遺伝子は点突然変異よりも水平伝播によって進化しやすいことが示唆された。加えて、*Citrobacter* 属などにおいて、ゲノム内の全ての 16S rRNA 遺伝子コピーが組換え体であることが見出され、組換え体 16S rRNA 遺伝子も機能的であり、種の基準として用いることができないことが示された。

細菌全体での網羅的な遺伝的組換えの検出においては、細菌全体に渡って 16S rRNA 遺伝子の水平伝播は生じていることが分かった。Proteobacteria 門の解析においては、少なくとも 16S rRNA 遺伝子の部分的な水平伝播は、綱レベルまでは超えて生ずることが分かり、遠い種同士だからと言って水平伝播しないわけではないことが分かった。また、16S rRNA 遺伝子の部分的な水平伝播は領域を問わず生じており、16S rRNA 遺伝子を用いた系統解析、特に、16S rRNA 遺伝子の一部の配列を読んで系統を決定する場合は誤った種同定を行う危険性がより高まってしまう可能性が示唆された。加えて、細菌の各門で、領域的な 16S rRNA 遺伝子の水平伝播の生じやすさが異なっていることが示唆された。このことから、16S rRNA 遺伝子の部分配列を用いて種同定を行うような場合は、分類群ごとに適切な領域を選択すべきであることが示された。

Bandelt, H. J. (1994). Phylogenetic networks. Verh. Natwiss. Ver. Hambg. 34:51-71.

Bryant, D., and Moulton, V. (2004). Neighbor-Net: An agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. Mol. Biol. Evol. 21(2): 255-265.

Huson, D. H., and Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. Mol. Biol. Evol. 23(2):254-267.

Katoh, K., and Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol. Biol. Evol. 30(4):772-780.

Kitahara, K., Yasutake, Y., and Miyazaki, K. (2012). Mutational robustness of 16S ribosomal RNA, shown by experimental horizontal gene transfer in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109(47):19220-19225.

Takahata, N. (1993). Comments on the detection of reciprocal recombination or gene conversion. Immunogenetics. 39(2):146-149.