

【研究課題名】

de novo RNA-seq 解析によるモレレットワニ (*Crocodylus moreletii*) の遺伝子発現の定
量化

【代表研究者名 (所属を含む)】

飯田 緑 (九州工業大学)

【共同研究者名 (所属を含む)】

(分担) Asela Marisol Buenfil-Rojas (愛媛大学・沿岸環境科学研究センター)

(分担) 岩田久人 (愛媛大学・沿岸環境科学研究センター)

(協力) 道山 千潤 (九州工業大学)

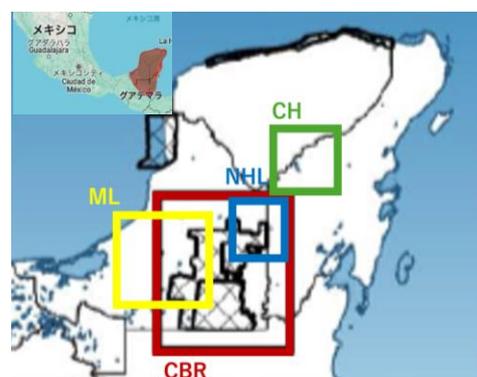
【研究目的】

モレレットワニはユカタン半島の淡水生態系における最上位捕食者の爬虫類である。本種は、個体数の減少からワシントン条約の絶滅のおそれのある種に指定されている。個体数減少の原因として、生息地域における環境汚染の可能性が考えられているが、化学物質曝露と生体影響の関係については明確な結論が出ていない。これらの関係を科学的に裏付けるためにはゲノムや遺伝子配列情報などの生体情報が必要であるが、本種のゲ

ノム配列のドラフトは存在せず、遺伝子配列情報は 35 遺伝子のみしか公開されていない。本研究はモレレットワニの鱗甲から得られた mRNA 試料から、モレレットワニの遺伝子配列を再構築し、発現量の定量化を行うことを目的とした。本研究を遂行することで、モレレットワニの遺伝子情報と遺伝子発現情報を明らかにできる。これらの情報は、モレレットワニにおける化学物質曝露と生体影響の関係の解明に貢献する。

【研究方法】

(Sample) 生体試料は、非侵襲的手法である鱗甲からの穿孔器による穴開けにより取得した。採取地点は、カラクムル生物保護区・バラムク州立保護区 (CBR)、チチャンカナブ湖 (CH)、モク湖 (ML)、



ノーハ湖 (NH) の 4 地点である (Fig.1)。それぞれ、CBR から 2 検体、CH から 7 検体、ML から 4 検体、NH から 3 検体の全 16 サンプルを用いた。

(Sequencing) 得られたサンプルから mRNA を抽出し、Illumina 社の次世代シーケンサーを用い

Fig. 1 サンプルの採取地点

て、150bp のペアエンドでリードを得た。

(Quality control of RNA-Seq data) 次世代シーケンシングから得られた配列は、FastQC (0.12.0) によりクオリティをチェックした。さらに、クオリティが悪いリード

アダプター配列は、Trimomatic(0.39)により除去した。

(de novo Assembly) トリミングを終えたリードを用いて、Trinity(3.0.0)により、遺伝子配列の再構築を試みた。

(Quantification of gene expression level) トリミングしたデータをアメリカワニのゲノム配列 (rAllMis1) にマッピングし、リードをカウントした。

(Phylogenetic tree analysis of animal CYPs) アメリカワニ、イリエワニ、インドガビアル、ヨウスコウアリゲーター、スッポン、ニワトリ、ヒト、線虫の CYP 配列を NCBI から取得し、系統樹解析を行った。解析には Jalview(2.11.3.2)を用いた。

【研究成果】

(Quality control of RNA-Seq data)

次世代シーケンシングから得られた配列数は 1400 万 (ML14) ~ 2214 万 (CH2) だった。これらの配列のクオリティをチェックした結果、Per base sequence quality が全てのサンプルで 28 以上を示したことから、リード配列のクオリティは非常に良いと判断した。一方で、アダプター配列など重複配列が見られたことから、これらの配列を Trimomatic(0.39)により除去した。この結果、全体の 1%~2%程度の配列が各サンプルから除去された。

(de novo Assembly)

トリミングを終えたリードを全てまとめ（総リード数：11.6 億本）、Trinity(3.0.0)により、遺伝子配列の再構築を試みた。この結果、再構築された転写産物の数は 2.94 億本、N50 値は 2006bp だった（Table 1）。再構築されたリードの品質を評価するため、得られた転写産物に元のリードを再度マッピングしたところ、マッピング率は 69%であった。これまでの研究から、爬虫類での de novo assembly による N50 値は 2500bp 程度あり（Hernández-Fernández et al., 2021）、再マッピング率は 80%以上が良好されている。このことから、本研究のアセンブリは不十分であると考えられた。

Table 1 Trinity による転写産物の再構築結果

統計量	再構築された転写産物の統計値
転写産物の総数	2 億 9400 万 (本)
転写産物の長さの中央値	359 (bp)
転写産物の長さの平均値	848.04(bp)
N30	4221 (bp)
N50	2006 (bp)

(Quantification of gene expression level)

そこで、ゲノム配列のドラフトが公開されているアメリカワニの配列を参照配列として、マッピングを行い、遺伝子の定量化を行った。本研究では、遺伝子の中でも薬物代

謝酵素 CYP に焦点を当てて解析を行った。アメリカワニのゲノム配列(rAllMis1)へのマッピング率は、75.5%だった。

アメリカワニのゲノム配列 (GCF_030867095.1) には 31,016 個の配列が遺伝子として登録されている。このうち、85 個の遺伝子配列が薬物代謝酵素 CYP として登録されていた。これらの配列はパラログを持つため、同じタンパク質をコードする遺伝子としては、45 種の CYP 遺伝子が確認された。これまでの研究から、ヒトは 57 種、ニワトリは 45 種、ゼブラフィッシュは 82 種の CYP 分子種を持つことが明らかとされている (Ren et al., 2019)。このことから、アメリカワニはニワトリと同程度の数の CYP 分子種を持つことが明らかとなった。この結果から、モレレットワニもアメリカワニやニワトリと同程度の数の CYP 分子種を持つと考えられる。

45 種の CYP 分子種のうち、12 種の CYP (CYP2B4, 2G1, 2K4, 2W1L, 3A24L, 4B1, 4V2, 4V2L, 7B1, 20A1, 26B1, 27C1) がモレレットワニの鱗甲から得られたサンプルで恒常的に発現していると考えられた (Fig.1)。このうち、細胞の分化に重要なレチノイド代謝に関与している 26B1 はいずれのサンプルでも発現量が多く、鱗甲では細胞分化が活発に行われていることが示唆された。

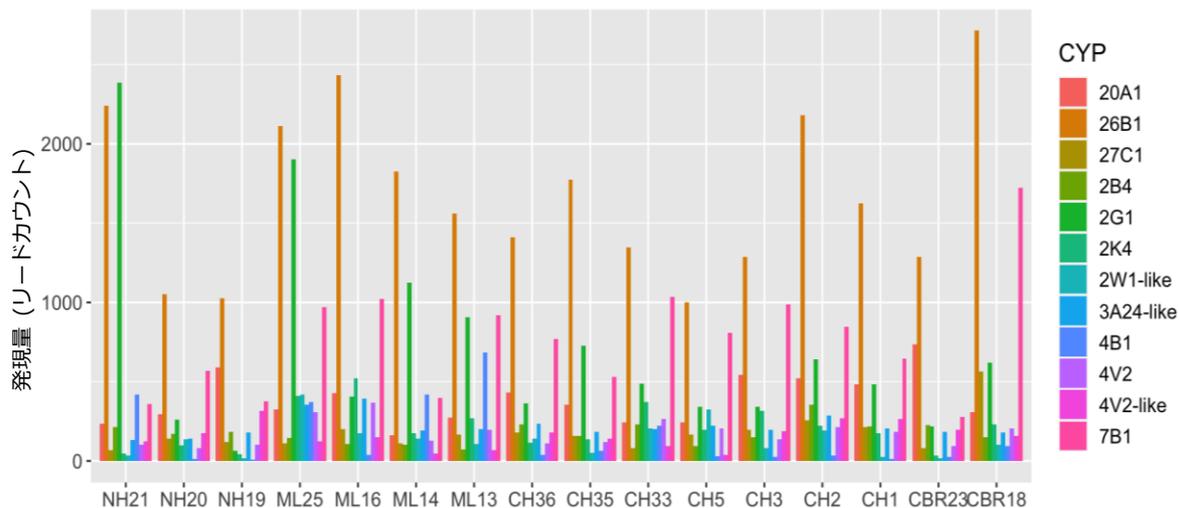


Fig.1 アメリカワニのゲノムを参照配列とした場合のモレットワニの CYP mRNA

発現量. 縦軸はリード数、横軸はサンプル名、色は各 CYP 分子種を示す。

(Phylogenetic tree analysis of animal CYPs)

CYPの進化的な関連性を調査するため、アメリカワニなど、8種の動物を対象に、合計70種のCYP分子種を用いた系統樹解析を行った。この結果、CYP分子種は大きく5つのクラスタに分かれることが明らかとなった (Fig.2)。

クラスタ II には 4B1、3A24、20A1、26B1 などの CYP がクラスタ化されていた。鱗甲サンプルで発現の多かったワニの 26B1 はニワトリ・ヒトの CYP26B1 と近縁であることが示唆された (Fig.2)。26B1 はヒトでは膵臓がんのバイオマーカーとして知られていることから (Yu Y et al., 2022)、疾患バイオマーカーとして利用できる可能性が考えられた。

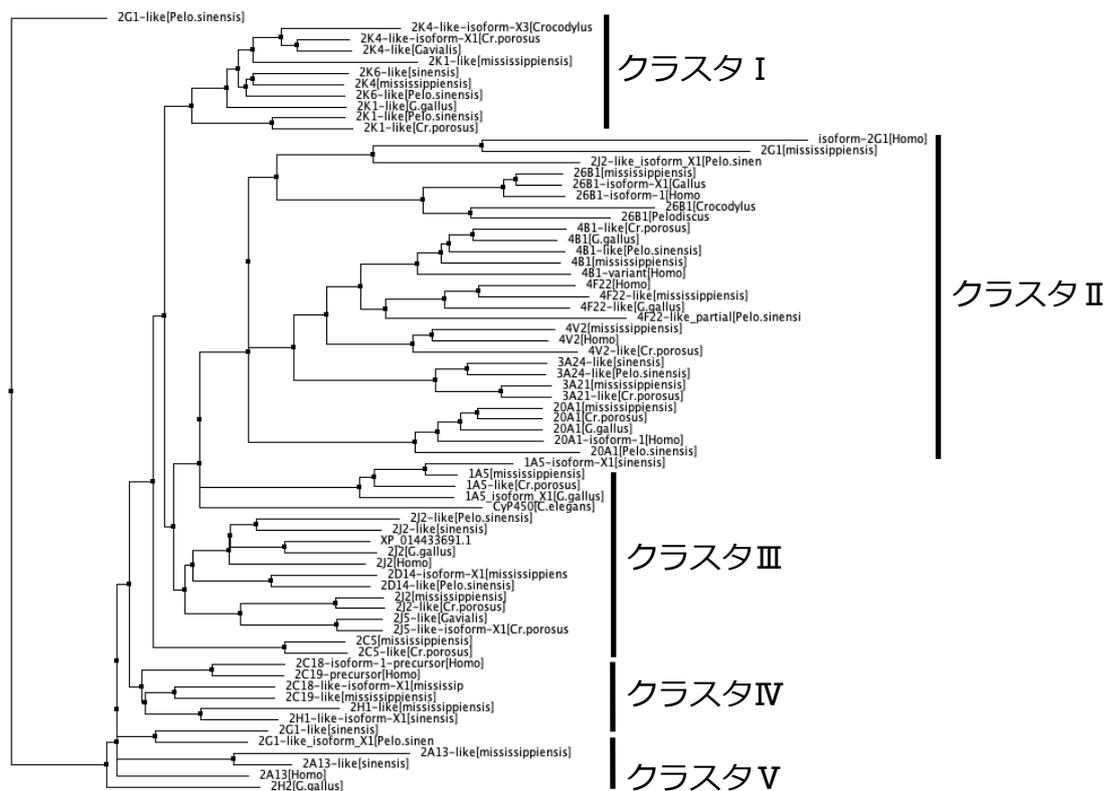


Fig.2 CYP の系統樹

【今後の課題】

本研究では、モレレットワニの遺伝子配列の再構築を試みた。Trinity を用いたアセンブリの結果、N50 は短く、再マッピング率が低かったことから、遺伝子配列の再構築は不十分であると結論づけた。今後、アセンブリを改良するために以下の4点を行う：① rRNA の除去、② 異なるアセンブラーによる遺伝子配列の再構築、③ 複数のアセンブラーを組み合わせた遺伝子配列の再構築、④ Trinity を用いた近縁種のゲノムガイドありの遺伝子配列の再構築。

また、本研究では、CYP の系統解析を行った。このとき、NCBI から遺伝子名で検索し取得した 70 種類の CYP 配列を用いたが、今後は pfam 検索により、CYP の特徴的な構造を持つタンパク質をコードする遺伝子を検索し解析に使用する予定である。