

【研究課題名】

de novo RNA-seq データを用いたモレレットワニ (*Crocodylus moreletii*) 遺伝子発現の生息地間比較

【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) 道山 千潤 (九州工業大学)

(拠点構成員) 岩田久人 (愛媛大学・沿岸環境科学研究センター)

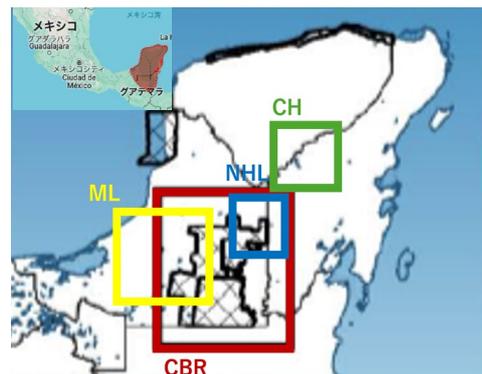
【研究目的】

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。これらの関係の科学的裏付けをするにはどのような地域の個体でどの

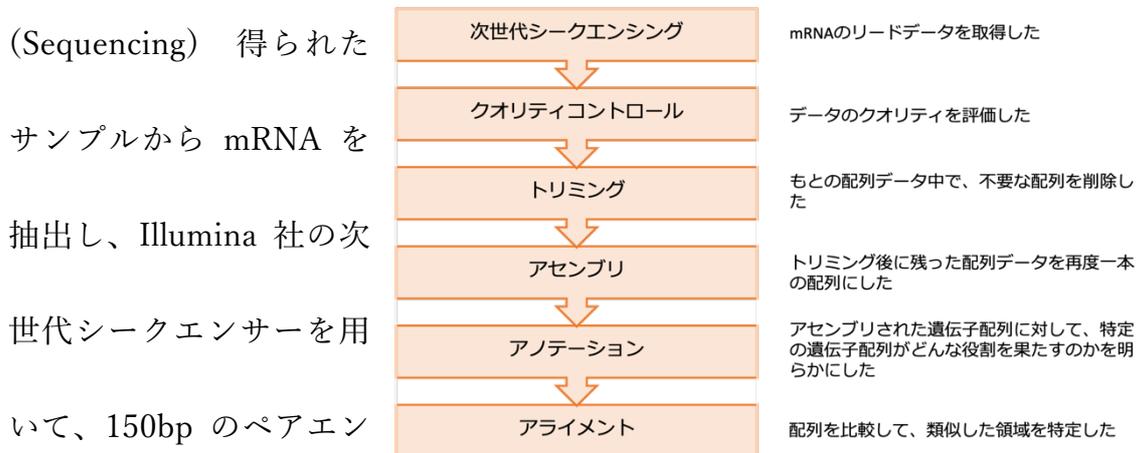
ような遺伝子が発現しているのかという遺伝子発現情報と、どのような化学物質がどのような地域の個体に蓄積されているのかという化学物質汚染情報の両方が必要である。本年度は、遺伝子発現の地域差を明らかにすることを目的とする。このために異なる生息域から非侵襲的に得られたモレットワニの鱗甲軟組織の遺伝子発現解析を行う。本研究を遂行することで、モレットワニの非侵襲的な化学物質汚染のバイオマーカー候補を明らかにできる。これらの情報は、モレットワニにおける化学物質曝露と生体影響の関係の解明に貢献する。

【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。



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。

(Trimming)

図 2 解析の流れ

クオリティが悪いリードやアダプター配列は、Trimomatic(0.39)により除去した。さらに、rRNA 配列を除去した。

(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。

(Annotation) 再構築された遺伝子配列の機能を Omibox blast2GO により同定した。

(Alignment) 再構築された遺伝子配列にリード配列を Mapping した。

(Quality check) 再構築された遺伝子配列をゲノムアセンブリや遺伝子セットの完全性を評価するためのソフトウェアである BUSCO で解析した。

【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、アダプター配列やコラーゲンの配列などに過度な重複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 130 万本、N50 値は 1972 bp だった (Table 1)。

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	1,304,637 (本)
転写産物の長さの平均値	843(bp)
N30	4180 (bp)
N50	1972 (bp)

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、マッピング率は約 60%であった。さらに、de novo RNA-seq の品質評価に使用される、BUSCO を用いて品質を評価したところ、生物群に共通する単一コピーの遺伝子セット (オーソログ) の再構築率が 5.66% と低値だった。

これまでの研究から、爬虫類での de novo assembly による N50 値は 2500bp 程であり (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 de novo アセンブリは不十分で、地域間の発現量比較までは行えないと判断した。

【今後の課題】

前回の課題と展望として、以下の 4 つが挙げられていた。

- 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

そこで、本研究では、① rRNA の除去を行ったサンプルを用いて同じ手順で de novo Assembly を行った。しかし、品質の改善には至らなかった。そこで、次年度は④Trinity 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を行う。これにより、品質の良いモレレットワニの遺伝子配列の再構築を試みる。