

4. ミトコンドリア DNA の SNP による塩基置換パターンの解析

立命館大学総合理工学院生命科学部

河合 洋介

国立遺伝学研究所集団遺伝研究部門

齋藤 成也

1. はじめに

哺乳類のミトコンドリア DNA (mtDNA) は種に関わらず約 1 万 7 千塩基対程度と一定しており、コードされる遺伝子の構成や配置も高度に保存されている。そのことからミトコンドリア遺伝子はマーカー開発が比較的容易であり、哺乳類の遺伝的多様性研究に多用されている。また動物の mtDNA は進化速度が速く生物種内の DNA 多型を測るだけでなく近縁生物種の系統関係を調べるための遺伝子座としても有用である。一方で mtDNA は遺伝子や生物種により進化速度が大きく異なり¹⁾、特に類縁関係が離れるほど系統解析を妨げる原因となる²⁾。

一般に DNA の塩基組成は一本鎖に着目した場合でも相補的な塩基対の頻度は等しいという性質 ($A=T, G=C$) をもつことが知られている。しかし動物の mtDNA は例外的に相補塩基間で非対称な塩基組成をもっている。例えばヒトの mtDNA は $A=33.4\%$, $T=27.2\%$, $C=25.9\%$, $G=13.5\%$ と明らかに相補塩基の頻度の対称性は認められない。さらに、生物種間の塩基組成は極めて多様で、特にアミノ酸変異を伴わないコドン第 3 座位である四重縮退サイトの塩基組成ではその傾向が強い (図 1)。分子系統解析で用いられる塩基置換モデ

ルは塩基組成の定常性を仮定しているものがほとんどであり、本質的に塩基組成の変動は系統関係や分岐時間推定に偏りを生じる原因になる。

我々はこれまでに哺乳類の中でも特に塩基組成に偏りの著しいヒトの mtDNA の SNP 解析を行ってきた。その結果、ヒトの mtDNA の塩基置換パターンは定常に達しておらず、少なくとも現生人類の共通祖先以降 T が減少し C が増加してきていることがわかった (未発表)。本研究では哺乳類の平均な塩基組成をもつウシ (*Bos taurus*) の mtDNA に着目し、塩基置換パターンの解析を行い塩基組成の定常性を調査した。さらに、ウシゲノムの核 DNA に偽遺伝子として残る太古の mtDNA 配列の解析を行い長期間の塩基組成動態についても報告する。

2. 材料と方法

(1) mtDNA 配列の収集

ウシの全長 mtDNA 配列を GenBank から取得した。MUSCLE²⁾を用いて多重整列後、リファレンス配列に従って遺伝子の位置を同定し 4 重縮退サイトに相当する塩基のみを抽出した。

(2) 祖先配列の復元と塩基置換パターンの推定

まず、収集した 4 重縮退サイトから構成されるアラインメントから分子系統樹を作成した。系統

The analysis of nucleotide substitutions inferred from SNPs of mitochondrial DNA

Yosuke Kawai^{*1}, Naruya Saitou^{*2}. ^{*1}College of Life Sciences, Institute of Science and Engineering, Ritsumeikan University, Kusatsu 525-8577, Shiga, Japan, ^{*2}Division of Population Genetics, National Institute of Genetics, Mishima 411-8540, Shizuoka, Japan.

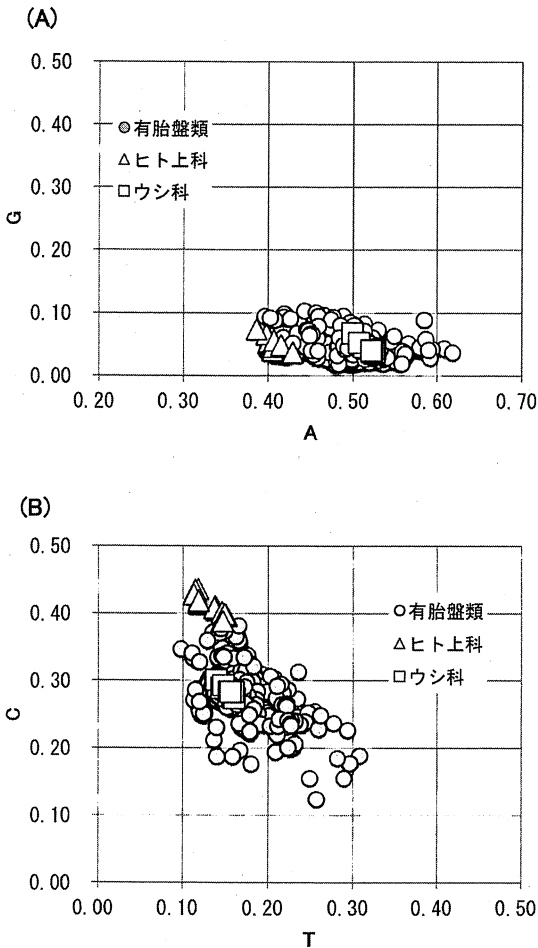


図1 有胎盤類の mtDNA の 4 重縮退サイトにおける塩基組成の多様性
有胎盤類 mtDNA の 4 重縮退サイトは幅広い塩基組成を持っている (○)。ヒト上科の分布の末端に位置する (△) のに対し、ウシ科は平均的な塩基組成を示している (□)。 (A) はアデニンの頻度に対してグアニン頻度をプロットしており、 (B) はチミンの頻度に対してシトシンの頻度をプロットしている。

樹は MEGA4.0³⁾ を使い近隣結合法⁴⁾ により作成した。次にサイト毎に系統樹上の各結節 (祖先配列) に対応する塩基を最大節約の原理に基づき復元し、隣接し合う結節間または結節と葉 (現存配列) の間で塩基が異なる場合はそれらを間で塩基置換が生じたとみなし塩基置換の方向とその総数 ($n_{x \rightarrow y}$) を数え上げた。推定した塩基置換パターンは 4×4 行列の形で表現した。それぞれの塩基

毎に塩基 N (N = A, T, C, G) を増加させた置換数 ($\sum_{X \neq N} n_{X \rightarrow N}$) と減少させた置換数 ($\sum_{X \neq N} n_{N \rightarrow X}$) の差 ΔN を塩基組成の定常性の指標とした。もし塩基置換による定常状態にあるとき $\Delta N = 0$ が期待される。

(2) 核 DNA にコードされた mtDNA 偽遺伝子 (numts) の探索

ウシ mtDNA の全長配列を問い合わせ配列にウシ核 DNA に対して相同性検索を行った。検索には WU-BLAST を使用し、E-value が 0.001 以上でヒットした配列を収集した。それらをウシ mtDNA の全長配列に対してグローバルアライメント (Needleman-Wunsch アルゴリズム⁵⁾) を行い 4 重縮退サイトに対応する部位のみを抽出した。その結果得られた塩基数が 400 残基未満の numts は解析から除外した。

3. 結果

GenBank に登録されているウシの mtDNA 配列を検索したところ 145 個体分の全長配列が得られた。アクセッション番号 NC_006853.1 の全長配列を遺伝子位置を同定するための参照配列とし、4 重縮退サイトに相当する塩基をアライメント中から抽出した。その結果 2086 残基の 4 重縮退サイトが得られ、そのうち 109 サイトが多型であった。145 個体分の全長アライメントに外群としてコブウシ (*Bos indicus*; GenBank アクセッション番号 NC_005971.1) の配列を加えたデータから系統樹を作成した。この系統樹に 109 の多型サイトの塩基を割り当て、最大節約の原理に基づき祖先塩基の推定を行い塩基置換数行列 (表 1) を得た。4 重縮退サイト全体で 116 回の塩基置換が観察された。定常性を測るために各塩基の増減の差を計算したところ、いずれの塩基も有意な頻度変化は認められなかった (表 2)。

次の今回解析したウシ集団の共通祖先以前の塩基組成動態を調べるために、核 DNA にコードされている mtDNA の偽遺伝子 (numts) から祖先配列の復元を試みた。ウシ参照 mtDNA 配列をクエリにウシ核ゲノムに対して相同性検索を行ったところ 170 個の numts がみつかった。現存種であるウシ参照 mtDNA 配列と numts 配列のグローバ

表1 ウシ mtDNA SNP から得られた塩基置換パターン

祖先型	派生型			
	A	T	C	G
A	-	1	1	21
T	2	-	36	1
C	3	26	-	0
G	23	2	0	-

表2 塩基置換による塩基組成の増減

塩基 N	A	T	C	G
+	28	29	37	22
-	23	39	29	25
ΔN	+5	-10	8	-3
p 値 ($\Delta N \neq 0$; 二項検定)	0.288	0.909	0.195	0.720

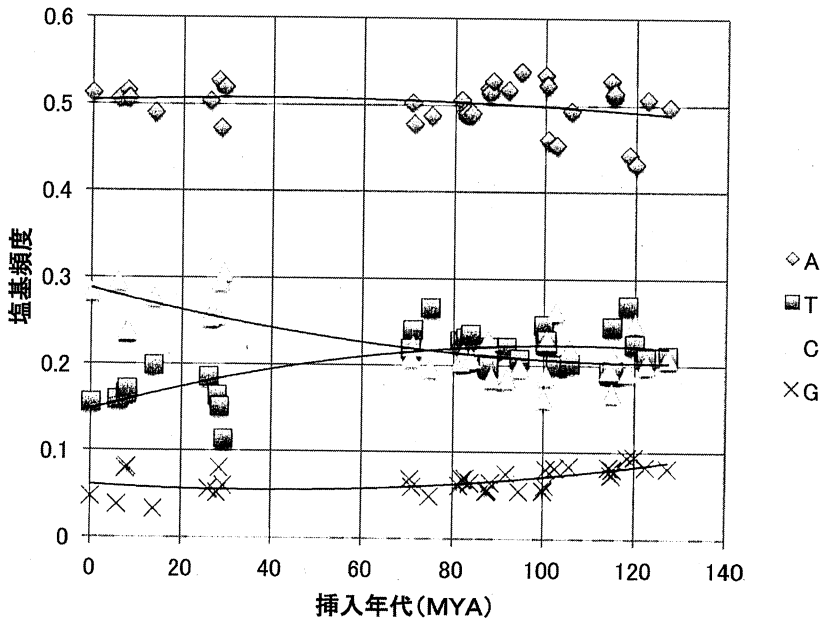


図2 ウシ numts の挿入年代と塩基組成の関係
 進化距離から推定したウシ numts の挿入年代を横軸にとり、各 numts の4重縮退サイトにおける塩基組成をプロットした。一番左の挿入年代が0に対応するプロットは現存のウシ mtDNA の塩基組成に対応している。

ルアラインメントを行い、4重縮退サイトに相当する塩基のみを抽出した。400座位未満しか抽出されなかった numts を除外した結果、32個の numts が残った。それぞれの numts が核 DNA に挿入された時期を見積もるために、ウシ参照 mtDNA 配列と numt 配列の間の進化距離（塩基置換数の期待値）の推定を行った。進化距離はヒト mtDNA の塩基置換行列から得られた経験的モデルを用いて、最尤推定を行った。最も近年挿入された numt と現存 mtDNA 配列の間の進化距離は 0.398 であった。これは突然変異率を年あたり

1 残基につき 7.0×10^{-8} と仮定すると、569 万年前に相当する。最も古くに挿入された numt の進化距離は 8.918 で 1 億 2739 万年前に相当する。挿入年代と numts の塩基組成の関係を図 2 に示す。

4. 考 察

4重縮退サイトで観察される塩基置換パターンはアミノ酸変化を伴わないので突然変異の影響を直接受けていると考えられる。本研究で4重縮退サイトの SNP から得られた塩基置換パターンは、ウシ集団では少なくとも有意な塩基組成の変動は

生じていないことを示している(表2)。本研究では過去に mtDNA が各 DNA に転移したことによって生じた mtDNA 偽遺伝子 (numts) を太古の mtDNA 配列を推定に利用した。哺乳類 mtDNA は核 DNA に比べて約 10 倍の速さで塩基置換することが知られており、一度核に取り込まれ numts となった配列は mtDNA に比べて約 10 分の 1 の速度で進化することになる。その結果 numts は真の mtDNA よりも核に取り込まれた時代の塩基配列の特徴を保った状態であることが期待される。実際、図 2 に示される numts の塩基組成変動は少なくとも約 3000 万年前以降はほとんどなく、SNP 解析から得られた定常的な塩基組成変動(表2)と一致している。これらの結果から現存のウシにつながる系統の mtDNA は少なくとも 3000 万年間はほとんど塩基組成を変化させることなく進化してきたことを示唆している。これは現在でも塩基組成の変動を伴うヒト mtDNA の分子進化パターンとは対照的である。

謝辞：この研究は 2010 年度国立遺伝研究所共同研究 (A) の支援を受けて実施した。

文 献

- 1) Gissi, C, A Reyes, G Pesole, C Saccone: Lineage-specific evolutionary rate in mammalian mtDNA, *Mol Biol Evol* 17: 1022-1031, 2000.
- 2) Edgar, RC: MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32: 1792-1797, 2004.
- 3) Tamura, K, J Dudley, M Nei, S Kumar: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0, *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599, 2007.
- 4) Saitou, N, M Nei: The Neighbor-Joining Method - a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees, *Mol Biol Evol* 4: 406-425, 1987.
- 5) Needleman, SB, CD Wunsch: A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins, *J Mol Biol* 48: 443-453, 1970.