

水生昆虫類 18SrRNA 配列可変領域の二次構造と系統推定

小堀峻吾¹、竹門康弘²、谷田一三¹、加藤幹男¹(¹大府大・理、²京都大・防災研)

【緒言】

rRNA はタンパク質生合成における翻訳反応に極めて重要な役割をもっており(1)、rRNA 全体の二次構造や、機能的に重要であると考えられる領域の塩基配列が生物種を越えて保存されている(2,3)。また、変異度が高い領域も存在しており、これらの塩基配列情報を利用して様々な生物種で、系統関係を知るために使われてきた。通常の系統樹は、一次構造の情報を元に塩基配列の整列を行い、樹形と枝長の推定を行うことで再構築される。しかし、rRNA のようにその二次構造が機能に関係するような分子では、二次構造形成領域上の相同部位の対応づけが困難であることや、二次構造上の相補部位の共置換の頻度の差異もあると思われ、単純な一次配列情報のみでの整列では情報が正確かつ効率的に使用されているとは言えない。近年、RNA に関してはその二次構造情報を整列に利用する方法が確立されている(4)。

そこで本研究では、水生昆虫類、主にカゲロウ目(Ephemeroptera)、トンボ目(Odonata)、カワゲラ目(Plecoptera)、トビケラ目(Trichoptera)に加えて、陸生のチョウ目(Lepidoptera)、バッタ目(Orthoptera)の 18S rRNA 配列を材料として、昆虫類の rRNA 配列中に特異的に存在する可変領域の特徴を把握し、進化的変化の過程を推察することを目的とした。そして、二次構造情報を利用したより高精度な配列の整列が得られるかどうかについて検討した。解析する配列は、国際データベースから取得するものに加えて、我々が採集した個体から抽出したゲノム DNA から新たに配列を決定したものを加えた。

【方法】

1. 解析サンプルとして各目の 18SrRNA 配列のデータ収集および塩基配列の決定を行った。
2. 解析対象領域の変異量を知るため、目内および目間の遺伝距離の計算を行った。18SrRNA 内の可変領域を除いた保存性の高い約 400ntd の領域を選び出した。また、目間の系統関係を把握するため、目内コンセンサス配列を作成した。こちらは可変領域を一部含む約 520ntd を使用した。
3. 可変領域の特性を明らかにするため、RNAfold による二次構造推定と GC 含量やステム長の計測を行った。また、二次構造情報と一次構造情報の両方を用いて MARNa で整列したものが、さらなる高分解能な系統樹を描けるか検討した。

【結果と考察】

1. 6 目の合計で 1248 サンプルを国際データベース(GeneBank/EMBL/DDBJ)から収集するとともに、日本産昆虫合計 19 試料について対象領域の塩基配列を読み取った。
2. 遺伝距離の平均値は目内より目間のほうが約2倍以上大きくなっていった。このことは目内において変異の量が飽和していないということを示唆し、目内、目間の系統関係の推定にこの領域の比較が有効であると考えられた。目間ではカゲロウ目-チョウ目間が最も離れており、カゲロウ目-トンボ目間が最も近い値となった。チョウ目-トビケラ目間の距離が大きいのは、それぞれの目内の共通の祖先において大きな進化速度を示したか、あるいは目内における置換サイトが目間で異なるためか、あるいはその両方の理由によるものと思われる。カゲロウ目とトビケラ目・チョウ目のそれぞれとの距離、およびトンボ目とトビケラ目・チョウ目のそれぞれとの距離が、カゲロウ目、トンボ目からバッタ目、カワゲラ目への距離よりも大きいことは、トビケラ、チョウの進化速度が大きいことを示唆する。

3. 可変領域はトビケラ目以外のものは、共通して、ステム1・ステム2・ステム3からなる構造をしており、主な挿入欠失などの変異はステム2に起こっていた。それぞれのステムはおおよそGC含量が多く、これはステム構造を安定化させるよう進化してきたのではないかと考えられる。この可変領域は機能的には未知であるが、全くランダムに変異しているのではなく、二次構造を安定化するよう進化しているのかもしれない。チョウ目、トンボ目以外のものでは、鎖長にかなりの差が見られ、カワゲラ目では最も顕著であった。

また、可変領域での二次構造情報と一次構造情報を用いての整列では、一次構造のみでは整列しにくい挿入断片でも、共通するステムとループ構造から整列が可能であった。可変領域は、近縁な分類群では鎖長がほぼ等しいために通常の一次構造(配列)による整列によって系統推定が可能であるが、より広い分類群を一度に比較しようとする、挿入・欠失変異のために真の相同部位を比較することが困難である。図1に、コカゲロウ科の一部について二つの整列手法による系統推定の比較を示す。16属とひとつの群外種(等しい鎖長をもつ)のみを考慮した場合には、一次構造情報による整列結果(1A)も二次構造情報を含めた整列結果(1B)も同じような結果、すなわち、6属と10属の二つの系統に分かれた。しかし、カゲロウ目内の配列データ93属を一度に整列すると、一次構造のみに基づく整列(1C)ではこの分類群では樹形が大きく変わった。一方、二次構造情報を含めた結果(1D)では、6属と10属の二系統が再現された。すなわち、二次構造形成を考慮することによって、配列データに刻まれた系統情報を有効に利用することができたと考えられる。ただし、これらの分類群の真の系統を知るためには、他の遺伝子領域による結果もあわせて今後の課題としたい。

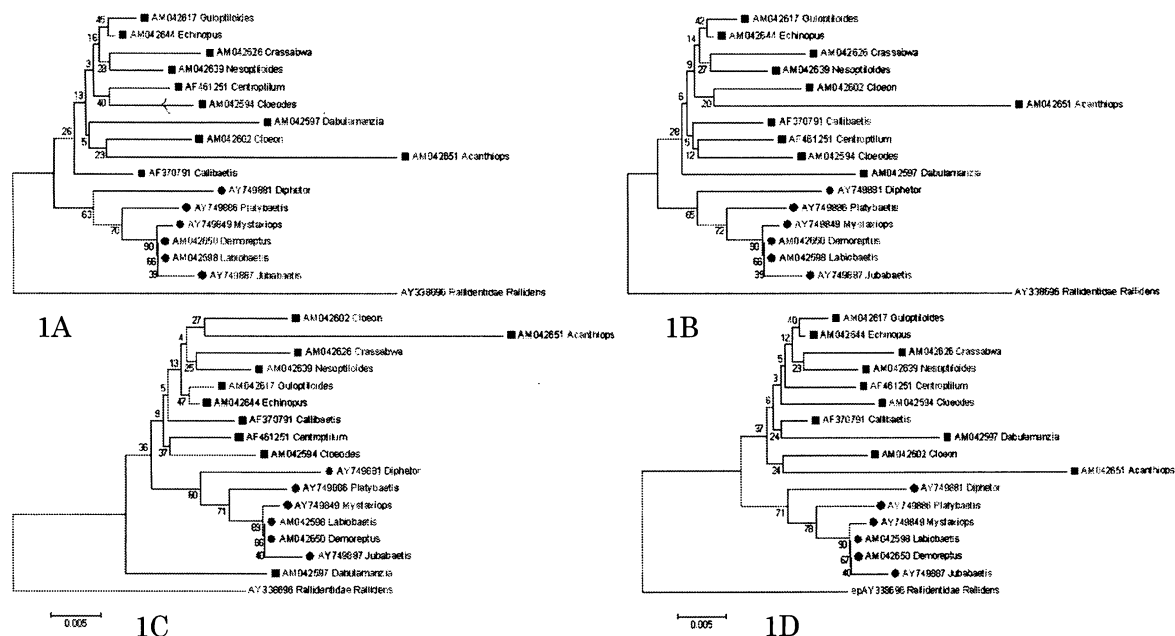


図1 コカゲロウ科における系統樹

【参考文献】

- (1) Spirin, A.S. (2004) The Ribosome as an RNA-Based Molecular Machine. *RNA Biology* 1: 3-9.
- (2) 志村令郎、渡辺公綱「RNA研究の最前線」シュプリンガー・フェアラーク東京、2000、P.132.
- (3) Raue HA, Klootwijk J, Muster W (1988) Evolutionary conservation of structure and function of high molecular weight rRNA. *Prog. Biophys. Mol.* 51: 77-129.
- (4) Siebert S, Backofen R, (2005) MARNA: multiple alignment and consensus structure prediction of RNAs based on sequence structure comparisons. *Bioinformatics* 21(16):3352-3359.