

## Genetic Variations of Microsatellite and Allozyme in Vertebrate Species.

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-06-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 八島, 亮子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://mu.repo.nii.ac.jp/records/544">https://mu.repo.nii.ac.jp/records/544</a>

# 脊椎動物におけるアロザイムとマイクロサテライトの遺伝的多様性

## Genetic Variations of Microsatellite and Allozyme in Vertebrate Species.

八 島 亮 子<sup>1</sup>

Akiko Sato Yashima

### 1 はじめに

種内の遺伝的多様性がどの程度保たれているかを理解することは、生態学的、進化遺伝学的、保全生物学的に重要な知見である。その理由として、ひとつには、任意の地域集団間でのように遺伝的な集団構造が異なるかを調査することで、その生物の移住パターンがある程度推測できるからである。また、集団の遺伝的分化とその地域への局所適応は種分化の基礎となる。異なった局所適応をしている近縁種を交雑させることで適応度を下げないためにも、遺伝的多様性のパターンを定量することは、生物の保全計画を考慮する基礎的知見となる [1]。そのため様々な生物種で自然集団の遺伝的多様性のパターンがどのようなものであるかを定量化する試みが行われてきた。しかしながら、こうした遺伝的多様性はあくまで種内で論じられるのみに留まっており、種をまたいだ比較を行った解析（メタ解析）による研究は少ない。しかし、メタ解析を行うことによって、どういった特徴を持つ生物種が、どのような遺伝的多様性のパターンを示すか明らかにすることによって、進化生物学的にも保全生物学的にも重要な知見が得られる可能性がある。そこで本論文では、従来遺伝的多様性の定量化手法として広く用いられてきたアロザイムと、マイクロサテライトによって定量されてきた様々な生物種の遺伝的多様性について、簡単なメタ解析の結果を示し、両者のメタ解析時におけるマーカーとしての有用性を論じたい。

### 2 遺伝的多様性定量の歴史的経緯

自然界の生物集団の遺伝的多様性がどの程度のものなのか定量する試みは、1930年代にアメリカ大陸におけるショウジョウバエの染色体型の多様性が調べられてきたことに始まる [2]。この方法は顕微鏡でショウジョウバエの唾液腺染色体を直接観察する方法であるが、どの生物にも使えるテクニックではなく、多型のパターンも大雑把にしか観察できない。1960年代に入ると分子生物学的手法の開発により、アロザイム・マーカーによる多型が調べられてきた。

---

<sup>1</sup> 武蔵野大学数理工学センター員 / 武蔵野大学工学部数理工学科助教

表 1 野生生物の遺伝的多様性を評価する実験手法の比較

手法 解析対象	論文数	ゲノム全体の多様性を反映するか？
A. アロザイム (タンパク質)	多い	○ (ゲノムの様々な箇所の多様性を反映するが、自然選択のために多型が著しく低い)
B. マイクロサテライト (常染色体 DNA 上の繰り返し配列)	多い	○ (ゲノムの様々な箇所の多様性を反映するが、突然変異率が不安定)
C. ミトコンドリア DNA の配列	非常に多い	× (ごく一部の特殊な領域であるため、あまり反映しない)
D. 次世代シーケンサによる網羅的解析	少ない	◎ (最も理想的だが、実験コストが高い)

アロザイムとは酵素としての活性がほぼ同じでありながら、アミノ酸配列が微妙に異なるような酵素であり、ある酵素をコードする DNA 配列に突然変異が起きた結果として生じたアミノ酸の極性の変化などによって、電荷が異なってくるものを電気泳動法によって検出する。アロザイムによる遺伝子多型の検出方法は、非常に汎用性がある方法で、プライマー<sup>1</sup>の開発など実験条件の検討をほとんど必要としないため、様々な生物で広く用いられた。1980年代になるとミトコンドリア DNA 配列やマイクロサテライトといった DNA 配列の情報を解析する方法が開発された。特にミトコンドリア DNA は、半数体であるためにクローニングが不要で実験が簡便であり、また地域間の差異が検出されやすいことや系統関係が明確にわかりやすいため、野生生物の遺伝的多様性を調査するために非常によく用いられている。また、常染色体上の遺伝マーカーとしてマイクロサテライトもよく用いられる。マイクロサテライト (microsatellite) とはゲノム中に複数存在する、ATATATAT... のような単純な繰り返し配列領域のことである。一世代にある一つの塩基に突然変異が起きる確率は  $10^{-8}$  ほどであるが、マイクロサテライトのような繰り返し配列はすべりモデルと呼ばれる特殊な変異のメカニズムにより、 $10^{-4}$  ほどの突然変異率があると言われている。この高い変異率により、マイクロサテライトの違いは個体間で違いが生じやすいため、個体識別や親子関係の解析、分集団間の違いなどを調べやすい。さらに、近年では次世代シーケンサーの開発によって全ゲノムの DNA 配列を網羅的に解析し、断片化された DNA 配列の多様性を直接観察する手法も開発されている。分子生物学的な遺伝的多様性の評価手法についてのまとめを表 1 に示す。

<sup>1</sup> 膨大なゲノム配列の、ある特定域を PCR (Polymerase Chain Reaction) という化学反応によって増幅するために、その領域の両側に数十配列程度の短い DNA 断片が必要であり、これをプライマーと呼ぶ。プライマー配列を決定するために未知の DNA 配列を決定する必要がある他、PCR のために適切な反応温度を設定する必要がある。

### 3 遺伝的多様性のメタ解析について

どのような進化学的な力学が実際の自然集団の遺伝的多様性の維持に働いているか？ 遺伝的多様性は集団サイズに比例することが理論的に予測されているが、実際にどの程度反映しているのか？ 新たな環境の変化に対して、低い遺伝的多様性はどの程度適応を生み出す能力を制限するか？ など、様々な疑問についてはまだまだ未解明な点が多い [3]。こうした疑問を解決するには、様々な生物種で調査された遺伝的多様性の指標を横断的に再解釈することがひとつのアプローチとなる。例えば、様々な集団サイズを持つ生物種とその生物種の遺伝的多様性の相関関係をとることなどは、有用なアプローチのひとつである。

生物種をまたいだ解析で重要な点は、(1) ゲノム全体の遺伝的多様性を適切に反映する、(2) 論文数が多い、(3) 生物種に偏りが少ないことが重要となる。表 1 に示した 4 つの手法のうち、ゲノム全体の遺伝的多様性を適切に反映する点で最も理想的なのは、表 1D. の次世代シークエンサによる網羅的解析である。しかし、これはごく最近の手法であり、まだまだ解析された生物種は少なく、モデル生物に偏っている傾向がある [5]。逆に論文数の多さと、モデル生物で

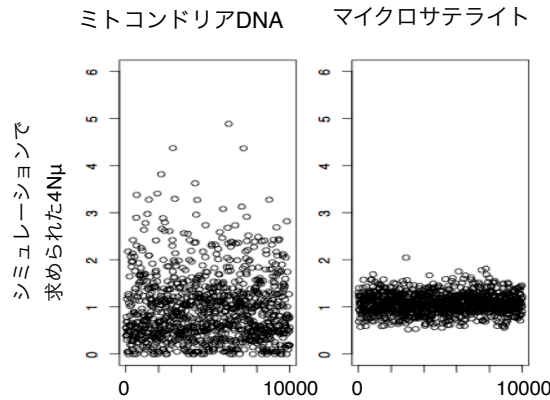


図 1 (1) 式に示す  $4N_e\mu$  が 1、サンプルする個体の数を 10 とした時の、10000 回分のシミュレーション結果。左図はミトコンドリア DNA の結果を示し、右図は 5 座位のマイクロサテライトを用いた結果を示す。縦軸はシミュレーションで得られた  $4N_e\mu$  であり、横軸は試行回数を示す。シミュレーション結果の正解は 1 に等しいことであるが、ミトコンドリア DNA では値のバラつきがより大きく、正解から大きく外れる傾向があることがわかる。シミュレーションの内容については脚注を参考のこと。

なくとも容易に実験ができるために生物種に偏りがないと考えられる点では表 1C. のミトコンドリア DNA 配列の情報も有用である。しかし、ミトコンドリア DNA はゲノムのごく一部の情報しか反映せず、また、母親からのみ伝わる性質のため、図 1 のシミュレーション結果<sup>2</sup>に

<sup>2</sup>  $2N$  の親遺伝子の集団が、毎世代任意交配を行い、各子供の遺伝子にそれぞれ  $1/2N$  の確率で同じ遺伝子を伝えるようなモデル (遺伝子が伝わる時にランダムで突然変異が起き、また、子供は同じ親の遺伝子を  $(1/2N)^2$  の確率で受け継ぐ。) でシミュレーションを行った。シミュレーションには、初期集団を最初に考えて、次世代に更新を重ねて一回一回突然変異を発生させる方法と、現在ある集団が一つの祖先に辿り着く系図を考えてからポアソン分布に従って全体の突然変異の発生を計算する方法がある。前者は未来に向かって計算を進め

示すように、ミトコンドリア DNA 配列による遺伝的多様性の定量結果は安定しない。

本論文では、生物種をまたいだメタ解析に用いるデータとしてどちらが適切であるのか、表 1A. のアロザイムと表 1B. のマイクロサテライトを、遺伝的多様性を評価した種に偏りがいかという点と、遺伝的多様性の指標がおおよそどの辺りの値をとるのかという点から比較する。また、最後に簡単なメタ解析の例を示す。一般に、体が大きい生物はより多くの食物資源を必要とすると考えられるため、哺乳類の種ごとの体サイズと、一定の面積下における集団サイズには負の相関関係が見られることが知られている [6]。加えて、集団サイズと遺伝的多様性は理論的には比例すると予測される [7] ことから、遺伝的多様性と体サイズの間には負の相関関係が観察されることが予測される。アロザイムとマイクロサテライトのデータを体サイズと比較することによって、両手法におけるメタ解析の有効性を論じる。

## 4 方法

脊椎動物の各生物種について、遺伝的多様性を示すヘテロ接合度の平均値と評価された種名を取得した。マイクロサテライトの情報のデータは、Yashima & Innan (2016) による VarVer データベース [5] から 2010 年までの情報を、アロザイムについては Nevo(1984) らのデータの中から脊椎動物に関係するものについて取得した [8]。また、IUCN Red List(<http://www.redlist.org>) から絶滅危惧種のリストを取得し、それぞれのマーカーで遺伝的多様性を評価した種に偏りがいかを比較した。

また、現在の遺伝的頻度から求められる遺伝的多様性の指標であるヘテロ接合度  $H_e$  と、過去の集団サイズの調和平均である有効集団サイズ  $N_e$  (effective population size) 及び世代あたりの突然変異率  $\mu$  の関係は、理論的に次のように予測される [7]。

$$H_e = \frac{4N_e\mu}{1 + 4N_e\mu} \quad (1)$$

アロザイムの変異は上記式に従うものとして  $H_e$  から求めた  $4N_e\mu$  ( $\theta$  で示す) を用いて体サイズとの比較を行う。マイクロサテライトは繰り返し配列のリピート数とユニットの配列数<sup>3</sup>に従い、突然変異率が上昇することが観測から予測される [9]。そのため、Yashima & Innan (2016) に従って以下の補正式を用いる。

$$\begin{cases} \Theta = \frac{2.428}{0.199j+0.439}\theta & (\text{dinucleotide}) \\ \Theta = \frac{3.429}{0.249j+0.939}\theta & (\text{tetranucleotide}) \end{cases} \quad (2)$$

---

る古典的な方法であり、「前向きシミュレーション (forward simulation)」と呼ばれ、後者は「後ろ向き (Backward simulation)」や「coalescent simulation」と呼ばれる。「coalescent」とは、「過去の祖先に遡ると、共通の同一祖先に行き着く」といった意味の言葉である。後者の方がアルゴリズムとしては少々複雑だが、計算時間を大幅に節約することができる。シミュレーションプログラムは“ms” [4] を用いた。

<sup>3</sup> 例えば、配列の例として ATATATATATAT だった場合、ユニット (AT) が 6 回繰り返しているため、ユニットの配列数は 2、繰り返し数は 6 である。ユニットの配列数が 2 の場合を dinucleotide、3 の場合を trinucleotide、4 の場合を tetranucleotide と呼ぶが、dinucleotide と tetranucleotide のマーカーが最もよく使われる。

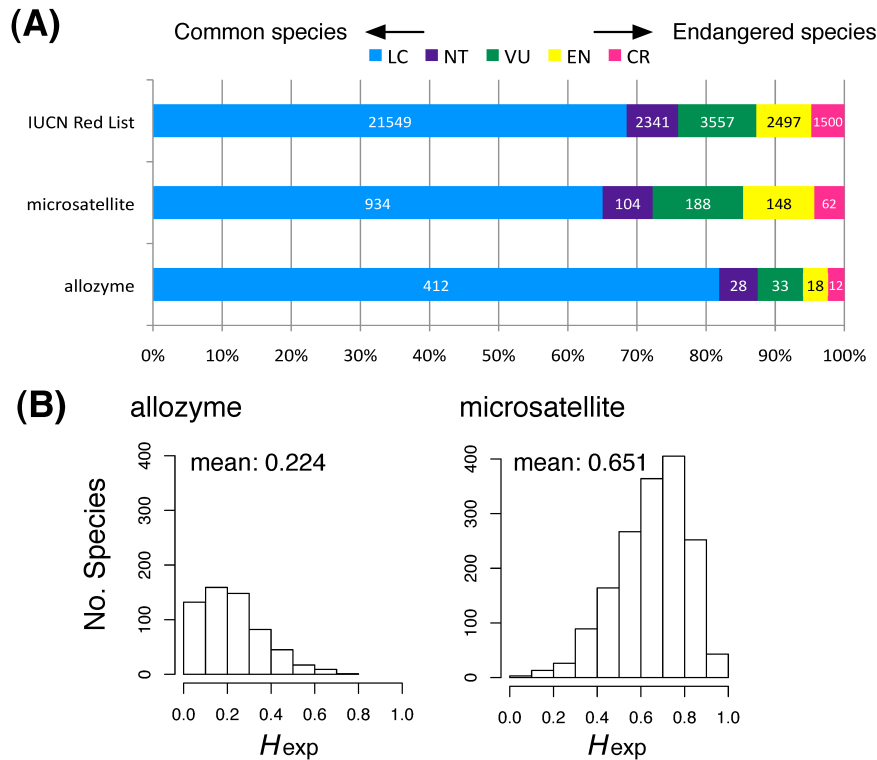


図 2 (A)IUCN による脊椎動物の絶滅危惧種の評価を示す. 評価は左から LC (軽度懸念), NT(準絶滅危惧), VU (危急), EN (絶滅危機), CR (絶滅寸前) を示し, 右に行くほど絶滅がより危惧される評価となる. 一番上のグラフは IUCN によって評価されている生物種全体のなかで各カテゴリーに属する種の割合を示す. 中央のグラフは, マイクロサテライトによって遺伝的多様性が評価された生物種がどのカテゴリーに属するかを示し, 一番下が同じくアロザイムによって遺伝的多様性が評価された生物種がどのカテゴリーに属するかを示す. (B) アロザイムとマイクロサテライトによって評価されたヘテロ接合度の平均値をヒストグラムに示す. 左のグラフがアロザイム, 右のグラフがマイクロサテライトを示す.

$j$  は集団からランダムにサンプルした遺伝マーカーの繰り返し数を示す.  $\theta$  と区別するため, 補正したものを  $\Theta$  で表す. dinucleotide と tetranucleotide はユニット配列の種類を示すが, 詳細については脚注 [1] を参考のこと. また, 哺乳類の体サイズの情報は PanTHERIA データベースの情報を参照した [10].

## 5 結果と考察

図 2A にマイクロサテライトとアロザイムで評価された種が, どの絶滅危惧のカテゴリーに属するかを示す. IUCN の Red List 全体と比べると, マイクロサテライトで評価された種はそれほど変わらないのに対し, アロザイムで評価された生物種は, もっとも絶滅から程遠い LC のカテゴリーに属する種が多いことがわかる. この理由として考えられるのは, 両手法において, 必要とされるサンプルが異なるからである. マイクロサテライトは DNA を用いるため, 毛髪や糞などからも分析試料を取ることができる一方で, アロザイムは活性のあるタンパ

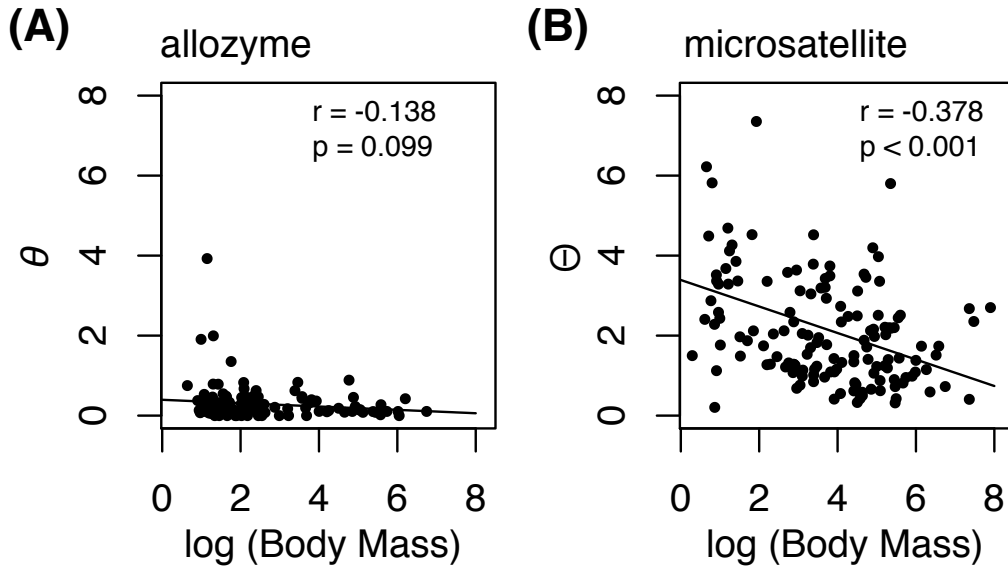


図3 (A) アロザイムによって求められた集団突然変異率  $\theta$  を縦軸に示し、各種の平均的な体サイズを横軸に示す。(B) 同じくマイクロサテライトによって求められた集団突然変異率(繰り返し数によって補正されているため、 $\Theta$  と表記)を縦軸に示し、各種の平均的な体サイズを横軸に示す。両グラフにおいて、体サイズは体重 (g) の常用対数を用いた。

ク質を実験に用いるために新鮮な組織片が必要とされる。一般に、絶滅の危機に瀕する生物は個体数の絶対数が少ない傾向があるために、サンプリングが難しかったり、むやみに傷つけないように保護されている可能性もある。よって、血液の採取など侵襲的なサンプリングが必要なアロザイムは絶滅の危機に瀕する生物からは試料が採取しにくいという難点があり、実際にそれが反映された結果だといえる。

また、ヘテロ接合度の種ごとの平均値をヒストグラムに示し、両者を比較した(図2B)。先に示した通り、アロザイムは比較的集団サイズの大きいと思われる生物種が多かったにも関わらず、アロザイムのヘテロ接合度はマイクロサテライトに比較して、全体的に低い。アロザイムは何かしらの酵素活性のあるタンパク質であるために、突然変異によって大幅なタンパク質の改変があった場合、生存に不利になりやすい(これを自然選択を受けている状態という)。そのためにゲノム領域全体の中でも、遺伝的多様性は比較的低いと考えられる[11]。一方で、マイクロサテライトはゲノム中のランダムな場所の多様性を反映する。哺乳類ではゲノムの大半の領域は自然選択を受けない中立の領域であると考えられるため、マイクロサテライトは中立的な領域からサンプリングされている可能性が高く、よって自然選択の影響は少ないと考えられる。このような理由から遺伝的多様性はアロザイムよりもマイクロサテライトの方が高いと考えられるが、ヘテロ接合度の分布を比較すると、そのような背景を支持する結果となっている<sup>4</sup>。

それでは、最後に哺乳類の遺伝的多様性が体サイズと負の相関関係があるという仮説が正し

<sup>4</sup> マイクロサテライトは化学構造的な性質により突然変異率が高く、それによって遺伝的多様性が高くなりやすいという面もある。

いと仮定した場合、マイクロサテライトとアロザイムで比較した結果はどのようになるだろうか？図3にアロザイムの $\theta$ とマイクロサテライトの $\Theta$ について体サイズとの線形プロットを示した。予測された通り、マイクロサテライトの遺伝的多様性と体サイズには負の相関関係がクリアに見られた。一方で、アロザイムの遺伝的多様性は全体的に非常に低く、変化に乏しいため、統計的に有意な相関関係は見られなかった。

## 6 最後に

遺伝的多様性について種をまたいだメタ解析を行う上で、データ数が十分にあり、かつゲノムワイドな遺伝的多様性を反映するマイクロサテライトとアロザイムのうち、どちらのデータによる解析が有用であるかを検討した。マイクロサテライトに比べてアロザイムは評価されている生物種に偏りがあり、絶滅危惧種にカテゴライズされた生物種はあまり評価されていない傾向があった(図2A)。また、実際メタ解析を行う際に、自然選択の影響を受けているアロザイムは突然変異率が低すぎるため、集団サイズの大きさと相関関係を十分に反映しにくいと考えられる(図3)。よって現時点では、脊椎動物の遺伝的多様性についてメタ解析を行う際にはマイクロサテライトのデータを使うことが非常に有効であると結論する。

## 参考文献

- [1] Frankham, R., Briscoe, D. A., and Ballou, J. D. Introduction to conservation genetics. *Cambridge University Press.*, 2002.
- [2] Dobzhansky, T., and Socolov, D. "Structure and variation of the chromosomes in *Drosophila azteca*." *Journal of Heredity*, 30 (1939) 3–19.
- [3] Leffler, E. M., Bullaughey, K., Matute, D. R., Meyer, W. K., Segurel, L., Venkat, A., ... and Przeworski, M. (2012). Revisiting an old riddle: what determines genetic diversity levels within species?. *PLoS Biol*, 10(9), e1001388.
- [4] Hudson, Richard R. "Generating samples under a Wright-Fisher neutral model of genetic variation." *Bioinformatics* 18.2 (2002) 337–338.
- [5] Yashima, Akiko Sato, and Hideki Innan. "VarVer: A database of microsatellite variation in vertebrates." *Molecular Ecology Resources* (2016).
- [6] Brown JH, Gillooly JF, Allen AP, Savage VM, West GB "Toward a metabolic theory of ecology." *Ecology*, 85 (2004) 1771–1789.
- [7] Kimura, M. and Crow, J.F., "The number of alleles that can be maintained in a finite population." *Genetics*, 49(4),()1964, 725–738.
- [8] Nevo, Eviatar, Avigdor Beiles, and Rachel Ben-Shlomo. "The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life history correlates." *Evolutionary dynamics of genetic diversity. Springer Berlin Heidelberg*, 1984. 13–213.



- [9] Sun, J.X., Helgason, A., Masson, G., Ebenesersdottir, S.S., Li, H., Mallick, S., Gnerre, S., Patterson, N., Kong, A., Reich, D. and Stefansson, K., 2012. "A direct characterization of human mutation based on microsatellites." *Nature genetics*, 44(10), (2012) 44(10), pp.1161-1165.
- [10] Jones, K.E., Bielby, J., Cardillo, M., Fritz, S.A., O'Dell, J., Orme, C.D.L., Safi, K., Sechrest, W., Boakes, E.H., Carbone, C. and Connolly, C., "PanTHERIA: a species - level database of life history, ecology, and geography of extant and recently extinct mammals." *Ecology* 90 (2009) 2648–2648.
- [11] Eanes, W.F., "Analysis of selection on enzyme polymorphisms.", *Annual Review of Ecology and Systematics*, (1999) 301–326.

(原稿提出: 2017 年 1 月 17 日; 修正稿提出: 2017 年 2 月 1 日)