

自然集団変異を利用した嗅覚・味覚受容体遺伝子間の機能ネットワークの構築

Inference of Functional Connections of *Drosophila* Chemoreceptor Genes Based on Linkage Disequilibrium in Natural Populations

(日本遺伝学会推薦)

代表研究者 国立遺伝学研究所 高野敏行 National Institute of Genetics Toshiyuki TAKANO
協同研究者 九州大学 猪股伸幸 Kyushu University Nobuyuki Inomata

Multilocus selection such as truncation selection can effectively reduce mutation load. Many quantitative characters including complex genetic diseases are likely to be under this type of selection; however, direct measure of selection in natural populations remains difficult. Multilocus selection with epistasis can generate linkage disequilibrium, from which we can infer the pattern and degree of selection. Previous *Drosophila* studies revealed the existence of recombination load, which is the reduction of fitness by recombination. Decreased fitness through recombination can occur when there are epistatic fitness interactions; in other words, gene combinations present in adult organisms that have survived selection are superior to those generated by recombination. Thus, some natural variants are not randomly combined in an individual but are instead in linkage disequilibrium. We undertook an analysis of linkage disequilibria between polymorphisms at *Drosophila* chemoreceptor genes, finding many significant non-random associations and a significant excess of haplotypes composed of one frequent

and one less common allele in replacement polymorphisms. These results suggest that multilocus selection plays a significant role in shaping within-species variation, particularly to reduce the frequencies of replacement variants. We could, in turn, make candidate functional connections of genes based on the linkage disequilibria generated in natural populations.

研究目的

多重遺伝子解析の基盤となる網羅的な「遺伝子ネットワーク」の構築のため、自然集団中の多型的DNA変異間の「連鎖不平衡解析」という新たなアプローチの開発・応用が本研究の目的である。この方法は「相互作用の分子基盤についての仮定（直接の接触・結合など）を必要としない」点で2ハイブリッド法などの分子的方法と比べて決定的に優れている。ゲノムワイドの遺伝子ネットワークの構築法の開発はポストゲノム後の緊急課題である。タンパク質間の相互作用を検出する2ハイブリッド法、発現解析のマイクロアレイ等幾つかの方法が存在するが、どれ一つとして絶対的な方法ではなく、固有の欠点・限界を有している。機能破壊変異体の表現型解析を骨幹とする遺伝学的解析も最も重要な手法のひとつであるが、その最大の障害は代理機能の存在である。例えば、マウスやヒトでは約1000の嗅覚受容体遺伝子が見つかった。これらの受容体はそれぞれ複数の匂い分子と結合し、ひとつの匂い分子も複数の受容体と結合すると予想されている。したがって嗅覚情報はどの匂い受容体が活性化されたかではなく、どの組み合わせの受容体が活性化されたかによって決まっていると考えられていて、この遺伝子相関図を構築する方法の開発が急務とされている。この場合、当然、タンパク対タンパクの相互作用や発現解析は役立たない。2重、3重突然変異体の作出が必要となるが、この組み合わせの数だけで莫大な数になる。さらに、表現型のタイピングが「実験室の条件下」であることも解析に重大な限界を与えている。

一方、自然集団中には多量の遺伝的変異が存在し、そのあらゆる組み合わせが常に「自然淘汰のふるい」にかけられている。「連鎖不平衡」とは染色体上の「複数の」遺伝子座の変異の「偏った」組み合わせ頻度（独立性）を示す指標で、もし複数の変異が独立でないなら、それらの間に何らかの「機能的関係」がなければならない。連鎖不平衡解析は「自然淘汰に有利・不利」という条件のもとで、自然集団中の対立遺伝子の組み合わせを通して「遺伝子の機能上の相互作用」を探索することを意味している。このように「多型的DNA変異間の連鎖不平衡解析」は「研究者の目」や「既存の知識」に頼らず、「自然淘汰のふるい」によって「遺伝子間の機能相関」を網羅的に探索するもので、全くこれまでにない考え方・手法であり、新たな相互作用を検出できる可能性が極めて高い。この方法の

有効性をキイロショウジョウバエの感覚受容体遺伝子に応用することで検証した。

研究経過

キイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) で同定されている 121 の味覚・嗅覚受容体遺伝子のうち 104 遺伝子について変異を調査し、300 以上のアミノ酸変化を伴う非同義置換を含む約 1700 の SNP、挿入／欠失変異を同定した。この中には 10 の遺伝子で 12 の機能喪失型と予想されるノンセンス、フレームシフト変異も含まれていた。外挿すれば個体当たり 8 個あるいはそれ以上の機能喪失型変異を持っていると推測される。近縁種の塩基配列を決定することで、祖先配列を推定した。新たに生じた変異の頻度分布、同義、非同義置換の種内、種間変異の比較解析から、受容体遺伝子上に多くの正の淘汰を受けた（有利な）アミノ酸置換が種間で固定していること、種内変異については非同義置換の多くが弱有害であることを示唆する証拠を得た。

これらの変異のうち、98 遺伝子に 114 の ASO (allele specific oligo)、RFLP (restriction fragment length polymorphism) 等のタイピングマーカーを構築した。秋、春、異なる時期の 2 サンプル、約 400 個体、800 染色体についてタイピング、連鎖不平衡解析を行った。50 のマーカーペア (2%) が両 2 サンプルで 0.5% レベルで有意な連鎖不平衡を示し、15 のペア (0.5%) は多重テストの補正を行った 0.0017% レベルでも有意であった。これらの変異間には遺伝子間相互作用を通じた淘汰の働きが予想される。X 染色体についてはさらに 5 サンプル、総計約 1400 染色体について解析を行った。比較的隔離されている沖縄、西表のサンプルを用い、異なる時期に採集したサンプルの頻度変化から、約 2200 の集団の有効な大きさの推定値を得た。この推定値とマーカー間の組換え頻度から連鎖不平衡の期待値を推定、実際の集団には遺伝的浮動から期待される量の 1.2~1.6 倍の連鎖不平衡が存在することを明らかにした。

連鎖不平衡の方向は、全てのマーカーを用いた解析では、偏りは観察されなかったが、春のサンプルでは非同義置換についてのみ有意な方向性、すなわち稀な対立遺伝子の組み合わせハプロタイプの頻度が期待値より低い方向性を見出した。組合せ解析における非独立性の欠点を補うため、ブートストラップ解析、Permutation 解析を行い、100% ブートストラップ確率と、観察値以上の偏りを生じる Permutation 確率が 1.6% に過ぎないことを示した。したがって偏った方向性は非同義置換に対する淘汰の影響を反映したものと理解される。この仮説と一致して、同義置換間、あるいは非同義置換と同義置換の間には方向性の偏りは観察されない。また、秋のサンプルでも同様の方向性は観察されなかった。冬における集団サイズの減少は単純な瓶首効果ではなく、淘汰圧の上昇を伴うものであることが推論される。

考察

自然集団は味覚・嗅覚受容体遺伝子座に多量の変異、特に機能喪失型変異を含んでいること、機能喪失型変異の頻度も 1%~39% と高いことが明らかとなった。これらの遺伝子も実際に、感覚受容器官において発現が確認されており、

機能を完全に喪失しているわけではない。弱い淘汰が働いていると考えられる。

例え遠く離れた変異間でも有意な連鎖不平衡が多くの遺伝子変異の組合せで観察された。これまでの電気泳動で分離可能な可溶性タンパクのアロザイム変異や遺伝子内変異の解析結果からすれば、連鎖不平衡は距離とともに速やかに崩壊し、1～2 kb も離れるとほとんど連鎖不平衡は存在しないと考えられてきた。本研究の結果はこの常識を見直す必要があることを強く示唆する。本研究では、味覚・嗅覚受容体遺伝子群という機能的な関連があることが予想される遺伝子を対象としたことが、これまでの解析と一線を画し、本研究の目的である、連鎖不平衡によって機能相関する遺伝子を探索することが可能であることを支持する。有意な連鎖不平衡は嗅覚受容体遺伝子間、味覚受容体遺伝子間だけでなく、嗅覚受容体-味覚受容体遺伝子間でも検出された。嗅覚、味覚受容体の分類はアミノ酸配列のホモロジーに基づいたもので、必ずしも機能を反映しているわけではない。事実、幼虫においては嗅覚受容体遺伝子の多くは発現していない。本研究の結果は、これまでの嗅覚、味覚の分類を支持せず、化学受容体として統一し、分類の再考を促すものである。

多遺伝子の関与するいわゆる“複雑な疾患”などにおいては、閾値をもって表現型が現れると考えられている。しかし、こうした多因子淘汰が自然界において実際に遺伝子レベルで働いていることを示す証拠はほとんど得られていない。本研究が示した連鎖不平衡の偏った方向性は、ある閾値をもったせつ頭型淘汰が非同義置換間に働いていることを示すものである。これは連鎖不平衡解析が弱い淘汰の多因子効果を検出可能であることを示すもので、機能相関を探索する方法として有用であることを強く支持する。今後、ショウジョウバエを含む様々な生物種での幅広い遺伝子への応用が待たれる。

研究発表

口頭発表

1. 河邊昭、高野敏行；「キイロショウジョウバエの味覚・嗅覚レセプター遺伝子群のDNA変異」、日本遺伝学会（福岡、2002）
2. Toshiyuki Takano-Shimizu; “Genome-wide analysis on recombination load”, The 2nd Japan-Korea Symposium: Towards the Association of Drosophila Research Communities (Tokyo, 2003)
3. 高野敏行、河邊昭、猪股伸幸、難波紀子、近藤るみ、伊藤雅信、井上寛；「遺伝的組換え荷重のゲノムワイド解析」日本進化学会（福岡、2003）
4. 難波紀子、伊藤雅信、猪股伸幸、近藤るみ、河邊昭、井上寛、高野敏行；「ショウジョウバエのX連鎖味覚・嗅覚レセプター遺伝子の連鎖

不平衡解析」、日本遺伝学会（福岡、2003）

5. Toshiyuki Takano-Shimizu; "Genome-wide analysis on recombination load: Linkage disequilibrium revisited", International Symposium on Endo-Symbiosis and Molecular Evolution in Insects (Ibaragi, 2003)
6. Toshiyuki Takano-Shimizu, Akira Kawabe, Masanobu Itoh, Nobuyuki Inomata, Noriko Nanba, Rumi Kondo, and Yutaka Inoue; "Linkage disequilibrium revisited", The Mishima Workshop on "The post-genome studies of genetic diversity and evolution of organismic populations" (Shizuoka, 2003)
7. Toshiyuki Takano-Shimizu, Akira Kawabe, Nobuyuki Inomata, Noriko Nanba, Rumi Kondo, Yutaka Inoue, and Masanobu Itoh; "Linkage disequilibria between polymorphisms at *Drosophila* chemoreceptor genes", 45th Annual *Drosophila* Research Conference (Washington, DC, 2004)

誌上発表

1. Toshiyuki Takano-Shimizu, Akira Kawabe, Nobuyuki Inomata, Noriko Nanba, Rumi Kondo, Yutaka Inoue, and Masanobu Itoh; "Inter-locus nonrandom association of polymorphisms in *Drosophila* chemoreceptor genes" (submitted).