

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14783

研究課題名(和文)ミトコンドリアにおけるC-to-U型RNAエディティングの進化と分布の解明

研究課題名(英文)The distribution and evolution of C-to-U RNA editing in mitochondria

研究代表者

西村 祐貴(Nishimura, Yuki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任助教

研究者番号：20783012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：C-to-U RNAエディティングは陸上植物をはじめとして様々な系統のオルガネラで起きている転写後修飾であるが、本研究は公共データベースを網羅的に探索することで、新たにネコブカビ類と有中心粒太陽虫類でも本現象が起きている可能性を見出した。ネコブカビ類については公開されているミトコンドリアゲノムからもC-to-U RNAエディティングが起きている可能性が高いと裏付けられた。さらに有中心粒太陽虫類については実際にC-to-U RNAエディティングが起きていることを確認し、またエディティングを担うタンパク質を解析することで当系統群におけるエディティングシステムの進化を考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は未だ理解が不十分だと考えられるミトコンドリアゲノムの多様性について、転写後修飾という面から新たな知見をもたらしたという意義がある。様々な系統群でC-to-U RNAエディティングが行われていることが改めて示されたことは、本現象が多様な真核生物におけるミトコンドリアの進化と深く関連していることを示唆している。その一方で、有中心粒太陽虫類では遺伝子の縮退によってエディティングシステムが二次的に失われた可能性が示されたのは進化的に興味深いと言える。さらに本現象はターゲットとする塩基のみを高い特異性で置換するので、生物工学的分野に応用されるポテンシャルがある成果である。

研究成果の概要(英文)：C-to-U RNA editing is posttranslational processing observed in the organelle of various eukaryotes including land plants. In this study, I newly indicated that phytomyxea and centrohelida harbor the C-to-U editing systems in their mitochondria by searching in the public database. The mitochondrial genome sequence of phytomyxea also supported the existence of C-to-U RNA editing. Further, I actually confirmed the C-to-U RNA editing in centrohelida mitochondria and discussed its evolution in centrohelida by analyzing the gene playing a central role in the editing.

研究分野：微生物学

キーワード：ミトコンドリアゲノム 転写後修飾 C-to-U RNAエディティング DYW型PPRタンパク質 有中心粒太陽虫類 ネコブカビ類

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは真核生物の共通祖先と  $\alpha$ -プロテオバクテリアが細胞内共生したことによって誕生した細胞小器官であり、その内部にはバクテリアに由来する独自のミトコンドリアゲノム(mtDNA)が存在する。mtDNA にコードされている遺伝子はゲノム配列がそのまま転写・翻訳されるだけでなく、スプライシングや RNA エディティングなどの転写後修飾を受けた後に発現する事例が様々な生物で知られている。例えば陸上植物の mtDNA にコードされている遺伝子は RNA へと転写された後、正常に機能するためには一部のシトシンがウラシルへと置換される C-to-U RNA エディティングを受ける必要がある。このような置換を受けるシトシンが、種によっては mtDNA 中に数百ヶ所も存在する。C-to-U RNA エディティングには、特定の RNA 配列を認識・結合する pentatricopeptide repeat モチーフと、C から U への置換能を担う DYW ドメインの両方をもったタンパク質(以下、DYW 型 PPR タンパク質と記す)が中心的な役割を果たしていると考えられている。不必要な塩基で RNA エディティングが起きるのは有害であるため、DYW 型 PPR タンパク質は必要な部位のみを認識して C-to-U 置換を起こさなければならない。しかしエディティング箇所と DYW 型 PPR タンパク質の適切な関係性がどのように進化し、C-to-U RNA エディティングが成立したのかは未解明である。

C-to-U RNA エディティングは植物に限らず、植物とは系統的に離れているヘテロロボサ類やアメーバ類の mtDNA 転写物でも報告されている。これらの生物のゲノム・トランスクリプトームからも DYW 型 PPR タンパク質をコードする遺伝子が発見されていることから、本遺伝子が水平伝播することによって真核生物の様々な系統のミトコンドリアで C-to-U RNA エディティングが進化したのではないかと考えられている。しかしこれまでの研究では限られた生物の配列データしか調べられておらず、DYW 型 PPR タンパク質による C-to-U RNA エディティングが真核生物全体でどのように分布しているかは分かっていなかった。実際に、予備的な調査で有中心粒太陽虫類 *Polyplacocystis contractilis* のトランスクリプトームから DYW 型 PPR タンパク質遺伝子が検出され、また mtDNA 転写物で C-to-U RNA エディティングが発見されていたことから、C-to-U RNA エディティングは従来の知見よりも幅広い系統の真核生物で分布していると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究の第一の目的は公共配列データベースを網羅的に探索することで、真核生物における DYW 型 PPR タンパク質及び C-to-U RNA エディティングの分布の分布を明らかにすることである。もう一つの目的は、C-to-U RNA エディティングを行う種と行わない種が混在している有中心粒太陽虫類をモデルとして、ミトコンドリアにおける転写後修飾の進化過程を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 公共データベースにおける DYW 型 PPR タンパク質の探索

NCBI の non-redundant(nr)データベースを対象に、Blast プログラムによって DYW 型 PPR タンパク質を探索した。また、Marine Microbial Eukaryotic Transcriptome Sequencing Project (MMETSP)によって公開された系統的に幅広い真核微生物のトランスクリプトームデータについても同様にして探索を行った。さらに NCBI の nr データベースや MMETSP には含まれておらず、Short Read Archive(SRA)でのみデータが公開されている生物については fastq ファイルをダウンロードし、アセンブリとタンパク質遺伝子の予測を行ってから探索した。

#### (2) C-to-U 型 RNA エディティング部位の予測

新たに DYW 型 PPR タンパク質が発見された発見された生物のうち、ネコブカビ類 *Plasmodiophora brassicae* は mtDNA 配列が公共データベースから利用可能だった。*P. brassicae* の mtDNA にコードされているタンパク質遺伝子の配列を様々な真核生物の相同配列と比較することで、本種 mtDNA の転写産物で C-to-U RNA エディティングが起きている可能性を検討した。

#### (3) *Polyplacocystis contractilis* の mtDNA 転写産物におけるエディティング箇所の決定

逆転写 PCR による予備的な実験により、有中心粒太陽虫類 *Polyplacocystis contractilis* の mtDNA 転写物では C-to-U RNA エディティングが多数のシトシン塩基で起きている可能性が示唆されていた。網羅的にエディティング箇所を決定するには次世代シーケンサー (NGS) によるトランスクリプトーム解析が有望であると考えられたが、従来の方法ではミトコンドリアを精製する他に、mtDNA 転写物のみを選択的に逆転写して NGS ライブラリーを作成する方法はなかった。そこで *P. contractilis* の mtDNA にコードされている全 41 タンパク質遺伝子上流に作成した逆転写用のプライマーを混合し、抽出 RNA に供して逆転写反応を行うことで、簡便に mtDNA 由来の転写産物が多く含まれた cDNA を作成することができるのではないかと考えた。得られた cDNA は RNA を消化してから DNA ポリメラーゼによって二本鎖化した後、

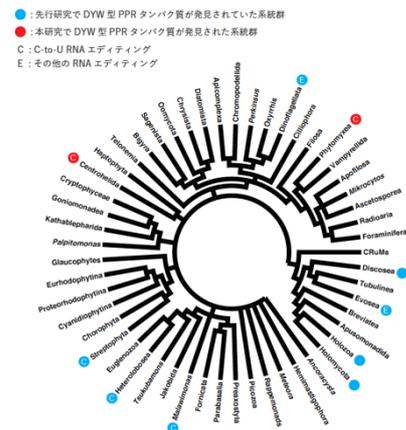
Illumina 社 NGS 用のライブラリーを作成した。シーケンスから得られたリードを *P. contractilis* の mtDNA にマッピングすることで、C-to-U RNA エディティングが起きている場所を網羅的に同定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 真核生物における DYW 型 PPR タンパク質の網羅的探索

これまでの研究で様々な系統で DYW 型 PPR タンパク質が報告されており、そのうち陸上植物とヘテロロボサ類では C-to-U 型 RNA エディティングが実際に確認されている。また、アメーバ類と渦鞭毛藻類については C から U への変換を含む様々なタイプの塩基置換や RNA プロセッシングが起きていることが知られているが、それらの転写後修飾と DYW 型 PPR タンパク質の関係は不明瞭である。本研究では新たにネコブカビ類 *Plasmodiophora brassicae* から DYW 型 PPR タンパク質を発見した。また、有中心粒太陽虫類においても予備的な研究で DYW 型 PPR タンパク質をもつことが分かっていた *P. contractilis* の他に、4 種から DYW 型 PPR タンパク質を発見した。(図 1)。

図 1：真核生物における DYW 型 PPR タンパク質と RNA エディティングの分布



##### (2) *Plasmodiophora brassicae* における C-to-U 型 RNA エディティング部位の予測

ネコブカビ類 *P. brassicae* の mtDNA にコードされているタンパク質遺伝子のアミノ酸配列を、近縁種の *Spongospora subterranea* を含む様々な生物の相同配列と比較した。その結果、真核生物で非常に保存的な部位のアミノ酸が *P. brassicae* では異なるアミノ酸をコードしており、かつ C-to-U 型 RNA エディティングを仮定すれば保存的なアミノ酸を指定するコドンに変化する部位が少なくとも 2 箇所発見された(図 2)。これは(1)の研究成果とあわせて、*P. brassicae* のミトコンドリアで DYW 型 PPR タンパク質による C-to-U RNA エディティングが起きていることを強く示唆している。

	CGG (R) > UGG (W)	CCA (P) > UUG (L)
<i>Plasmodiophora brassicae</i>	S I V Y R L W G G F S V	T D L L N P N T I
<i>Spongospora subterranea</i>	S I V Y W L W G G F S V	T D L L F L E K I
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	P I V E W L W G G F T V	G D L V L L N K S
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	S I V D W L W G G F T V	A D L S S L S K S
<i>Monosiga brevicollis</i>	D I V E W W W G G F S V	S D L S A L S R K
<i>Phytophthora infestans</i>	D I V D W L W G G F A V	T D L S N I H T I
<i>Pythium ultimum</i>	D I V D W L W G G F A V	T D L S N I F T I
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	S I V T W L W G G Y S V	S E P T I L S K T
<i>Agelasma schmidti</i>	E I V R W L W G G F S V	V E F L S G L S R E
<i>Pyropia yezoensis</i>	S I V A W L W G G F S V	T D I V S L V K L
<i>Chondrus crispus</i>	S I V T W L W G G F S V	Q D L I S L S R F
<i>Rhodomonas salina</i>	P I V V W L W G G F S V	S N I K G L A K T
<i>Chattonella marina</i>	S I V E W L W G G F S V	S D F S S I F Y L

図 2: *Plasmodiophora brassicae* における C-to-U RNA エディティング *P. brassicae* で C-to-U RNA エディティングが起こると考えられる場所とその周囲のアライメントを示した。エディティングが起こる座位を赤い四角で囲み、上部にエディティング前後のコドンとそれが指定するアミノ酸を示した。

##### (3) 有中心粒太陽虫類における C-to-U RNA エディティングの進化

*P. contractilis* の mtDNA にコードされている全てのタンパク質に対して作成した逆転写プライマーと抽出 RNA から作成した NGS ライブラリーは、想定通り mtDNA 由来のリードが多く含まれており、本種 mtDNA において 700 箇所以上 C-to-U RNA エディティングが起きていることが判明した。

有中心粒太陽虫類の中でも *P. contractilis* に近縁な *Marophrys* sp. SRT127 は mtDNA が解読されており、本研究により DYW 型 PPR タンパク質を有することが判明したが、C-to-U RNA エディティングは確認されていない。*P. contractilis* のエディティング後のアミノ酸配列は、*Marophrys* sp. SRT127 の mtDNA の遺伝子領域を翻訳したものとほぼ一致していた。このことから *Marophrys* sp. では C-to-U RNA エディティングが起きていないか、起きていたとしても僅かだと考えられる。近縁な生物間でこのような違いが生じている原因を探るため、有中心粒太陽虫類 5 種で検出された DYW 型 PPR タンパク質を用いて系統解析を行った。推定された系統樹の樹形から、有中心粒太陽虫類の DYW 型 PPR タンパク質遺伝子は配列が保存的なグループと進化速度の速いグループに分かれることが判明し、*P. contractilis* の遺伝子は前者に、*Marophrys* sp. のそれは後者に属していた。この結果から *Marophrys* sp. の mtDNA で C-to-U RNA エディティングが見られないのは、DYW 型 PPR タンパク質が縮退して C-to-U 置換活性が失われているからではないかと考えられる。この仮説が正しいとすれば mtDNA が解読されていない他の有中心粒太陽虫類についても、DYW 型 PPR タンパク質遺伝子が系統樹上でどちらのグループに属しているかを確認することによって、ミトコンドリアで C-to-U RNA エディティングが起きているか予想できることになる。この予想に基づくと、有中心粒太陽虫類の共通祖先においては DYW 型 PPR タンパク質による C-to-U RNA エディティングが成立したが、その後 DYW 型 PPR タンパク質の縮退によってエディティングシステムが二次的に失われるという現象が複数の系統で独立に生じたのではないかと考えられる(図 3)。

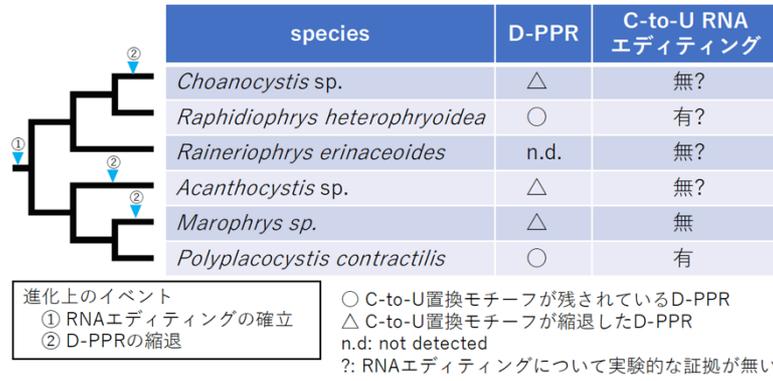


図 3: 想定される有中心粒太陽虫類での C-to-U RNA エディティングの進化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuki Nishimura, Keitaro Kume, Keito Sonehara, Goro Tanifuji, Takashi Shiratori, Ken-ichiro Ishida, Tetsuo Hashimoto, Yuji Inagaki, Moriya Ohkuma	4. 巻 8
2. 論文標題 Mitochondrial Genomes of <i>Hemiarma marina</i> and <i>Leucocryptos marina</i> Revised the Evolution of Cytochrome c Maturation in Cryptista	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Nishimura, Takashi Shiratori, Ken-ichiro Ishida, Tetsuo Hashimoto, Moriya Ohkuma, Yuji Inagaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Horizontally-acquired genetic elements in the mitochondrial genome of a centrohelid <i>Marophrys</i> sp. SRT127.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Nishimura, Masato Otagiri, Masahiro Yuki, Michiru Shimizu, Jun-ichi Inoue, Shigeharu Moriya, Moriya Ohkuma	4. 巻 14
2. 論文標題 Division of functional roles for termite gut protists revealed by single-cell transcriptomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The ISME Journal	6. 最初と最後の頁 2449 ~ 2460
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41396-020-0698-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 西村祐貴, 佐藤渚, 白鳥峻志, 石田健一郎, 橋本哲男, 稲垣祐司, 大熊盛也
2. 発表標題 有中心粒太陽虫類におけるミトコンドリアゲノムの比較解析
3. 学会等名 日本微生物資源学会第26回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村祐貴、佐藤渚、石谷佳之、白鳥峻志、石田健一郎、橋本哲男、稲垣祐司、大熊盛也
2. 発表標題 日本進化学会第21回大会
3. 学会等名 Distribution of plant-type mitochondrial C-to-U RNA editing in diverse eukaryotes
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Nishimura, Nagisa Sato, Yoshiyuki Ishitani, Takashi Shiratori, Ken-ichiro Ishida, Tetsuo Hashimoto, Yuji Inagaki, Moriya Ohkuma
2. 発表標題 Re-exploration of the protein performing plant-type C-to-U RNA editing in diverse
3. 学会等名 The 14th International Colloquim in Endocytobiology and Symbiosis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村祐貴、佐藤渚、大熊盛也
2. 発表標題 ヤマトシロアリ腸内に共生する原生生物の多様性と機能の解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 雪真弘、坂本光央、西村祐貴、大熊盛也
2. 発表標題 シロアリ腸内から分離された新規乳酸菌、Lactococcus reticulitermitis
3. 学会等名 日本微生物資源学会第25回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村祐貴
2. 発表標題 シングルセルゲノム・トランスクリプトームによるシロアリ共生微生物の機能解析
3. 学会等名 つくば藻類・プロティストフォーラム(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Shiratori, Akinori Yabuki, Euki Yazaki, Yuki Nishimura, Moriya Ohkuma, Katsunori Fujikura, Tetsuo Hashimoto, Yuji Inagaki, Ken-ichiro Ishida
2. 発表標題 Orphan protistology, accelerating in JAPAN
3. 学会等名 Joint Meeting of the Japan Society of Protistology and the Korean Society of Protozoologists (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Nishimura, Masato Otagiri, Masahiro Yuki, Michiru Shimizu, Nagisa Sato, Shigeharu Moriya, Moriya Ohkuma
2. 発表標題 Single cell transcriptome analyses of the symbiotic protists in termite gut
3. 学会等名 日本微生物生態学会第32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Nishimura, Masato Otagiri, Masahiro Yuki, Michiru Shimizu, Nagisa Sato, Shigeharu Moriya, Moriya Ohkuma
2. 発表標題 Single cell transcriptome analyses of the symbiotic protists in wood-feeding termites
3. 学会等名 17th International Symposium on Microbial Ecology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村祐貴、小田切正人、雪真弘、守屋繁春、大熊盛也
2. 発表標題 難培養性原生生物におけるシングルセルトランスクリプトーム:シロアリ共生原生生物をモデルとして
3. 学会等名 第13回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関