

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32659
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24570113
 研究課題名(和文) 尾索動物ミトコンドリアゲノムの遺伝子構成・配置多様性の進化と尾索動物の進化

研究課題名(英文) Evolution of Urochordata inferred from evolution of gene content and gene organization of urochordate mitochondrial genomes

研究代表者
 横堀 伸一 (Yokobori, Shin-ichi)
 東京薬科大学・生命科学部・講師

研究者番号：40291702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：尾索動物の進化に伴うミトコンドリア(mt)ゲノムの構造の多様化の解析と、尾索動物のmt遺伝子に基づく分子系統解析に基づき、尾索動物の進化を明らかにすることを目的とする。

オタマボヤ綱サイツチボヤ科の*Fritillaria haplostoma*は約4 kbpsと約6 kbpsの少なくとも2種類の環状mtゲノムを持つことが示唆された。Mt遺伝子に基づく分子系統解析によると、タリア綱が腸性目特に管鰓亜目の内群であること、管鰓亜目ディアゾナ科の*Rhopalaea* sp.が無管鰓亜目の群内群になること、からタリア綱並びに無管鰓亜目と管鰓亜目からなる腸性目の分類体系の再検討が必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Evolution of urochordates based on the diversification of mitochondrial (mt) genome structures and molecular phylogenetic study using mt genes was discussed.

Fritillaria haplostoma (Appendicularia, Fritillaridae) was suggested to have at least two circular mt genomes (ca. 4 kbps and ca. 6 kbps). From the molecular phylogenetic analyses using 12 mt protein genes, Thaliacea was suggested to be an ingroup of Phlebobranchia of Enterogona. In addition, *Rhopalaea* sp., which is the member of Diazonidae (or Diazoninae) of Phlebobranchia in classical taxonomy, was suggested to be a member of Applousobranchia of Enterogona. Thus, reconsideration of taxonomy in Thaliacea, Phlebobranchia, and Applousobranchia is desired.

研究分野：分子進化学

キーワード：ミトコンドリアゲノム 尾索動物 分子系統解析

1. 研究開始当初の背景

後生動物ミトコンドリア(mt)ゲノムは一般に15~18 kbpsの環状DNAであり37種の遺伝子をコードする。申請者等はその中でも尾索動物 mt ゲノムの全塩基配列を決定し、ゲノム構造、遺伝暗号、tRNA 遺伝子とその転写産物等の進化の解析を進めてきた。また、尾索動物 mt 遺伝子に基づく分子系統解析を進めてきた。

尾索動物 mt ゲノムの基本遺伝子セットは13蛋白質遺伝子、2 rRNA 遺伝子、24 tRNA 遺伝子である。しかし、既報の尾索動物 mt ゲノムのコードする遺伝子の数は、蛋白質遺伝子は9~13種、rRNA 遺伝子は0~2種、tRNA 遺伝子は0~27種と種間で大きく異なり、その配置も異なる。尾索動物 mt ゲノムを比較すると、次の様な特徴が挙げられる。

ワカレオタマボヤ *Oikopleura dioica* mt ゲノムでは、9種の蛋白質遺伝子しか発見されていない。これらの mt ゲノムでは4種の蛋白質遺伝子と、すべての tRNA、rRNA の遺伝子が見つかっていない。しかし、*Oikopleura* mt は尾索動物型 mt 遺伝暗号を使用していると考えられ、核・細胞質遺伝情報系を攪乱し得る tRNA^{Gly}_{U*CU}、tRNA^{Met}_{U*AU}、tRNA^{Trp}_{UCA} の遺伝子が核ゲノムにコードされ、mt に移入することは考えにくい。*O. dioica* mt 蛋白質遺伝子で示唆された RNA 編集や2番目の mt ゲノム染色体の存在を検討する必要がある。

次に、サルパ *Ritteriella* spp. mt ゲノムが *atp8* 遺伝子をコードしていない。

また、ナツメボヤ科ホヤの *Phallusia* spp. mt ゲノム上に tRNA^{Asp} 遺伝子が見いだされていない。

更に、*Ritteriella amboinensis* のように同一アンチコドンを持つ複数の tRNA 遺伝子が mt ゲノム上に存在する例が見いだされる。

以上のような理由により、尾索動物 mt ゲノムは、後生動物 mt ゲノムの多様性とその進化を研究する上でよい研究対象である。また、このように多岐にわたる mt ゲノム構造は、尾索動物を考える上での重要な形質として取り扱うことができると期待される。

尾索動物の分子系統解析は、これまで、主に18S rRNA 遺伝子に基づくものが主流であった。18S rRNA 遺伝子に基づく解析によると、尾索動物は大きく3つのグループ、オタマボヤ綱、ホヤ綱壁性目、並びにホヤ綱腸性目+タリヤ綱、に分けられることが示唆された。この3者の関係については、オタマボヤ綱が最初期に分岐したとする仮説とオタマボヤ綱がホヤ綱壁性目の姉妹群であるとする仮説の双方が、18S rRNA 遺伝子の解析から示唆されている。尾索動物 mt ゲノムに基づく分子系統解析も、18S rRNA 遺伝子に基づく解析ほど網羅的では無いが、進められてきた。オタマボヤ綱 (*Oikopleura dioica*) mt ゲノムは、極端に進化速度が速く、他の尾索動物 mt ゲノムと合わせて分子系統解析を行うことは、難しいと考え

られる。ホヤ綱とタリヤ綱(ウミタル *Doliolum nationalis*) mt ゲノムの解析では、ホヤ綱腸性目とタリヤ綱 (*D. nationalis*) がグループを作ることが示唆される点において、18S rRNA 遺伝子に基づく分子系統解析と矛盾しない。

また、蛋白質遺伝子数の減少しているオタマボヤ等での mt 蛋白質遺伝子の進化速度の上昇は、mt ゲノム構造の進化と mt 遺伝子の一次配列レベルの進化が、関連していることを示唆されている。尾索動物全体の分子系統解析を mt ゲノムの配列に基づいてより信頼性の高い解析するには、さらに解析対象とする尾索動物(特にオタマボヤ類やサルパ類)を増やすことが重要である。

2. 研究の目的

尾索動物 mt ゲノムの全塩基配列を新規に決定し、尾索動物の進化の過程で、どのように mt ゲノムの構造(遺伝子構成並びに遺伝子配置)の多様化が生じたのか、特に tRNA 遺伝子の出現と消失に注目し、その可塑性の由来と限界を明らかにすることを目的とする。尾索動物の mt 遺伝子に基づく分子系統解析を行うことで、尾索動物の進化、放散の枠組みをあわせて明らかにしていくことを目的とする。

第一に、オタマボヤ類の mt ゲノムの全塩基配列の新規決定。これを *O. dioica* や他の尾索動物 mt ゲノムと比較する。*O. dioica* mt ゲノムで見られる遺伝子数減少の道筋とその原因について、検討する。また、rRNA 遺伝子などの遺伝子が mt ゲノム上に見いだされない場合、2番目の mt ゲノムの存在や大規模な RNA 編集等の可能性を検討する。

第二に、新規に尾索動物 mt ゲノムの全塩基配列を決定し、それぞれの mt ゲノムの特徴を明らかにし、mt ゲノムのコードする遺伝子の一次配列に基づく分子系統解析を行う。その結果を18S rRNA 遺伝子に基づく分子系統解析の結果等と総合して、尾索動物の進化・放散経路を考察する。

3. 研究の方法

(1) オタマボヤ類(例: サイツチボヤ類)の mt ゲノムの配列決定と mt 遺伝子の全セットの同定: 以下のような方法で mt ゲノムの塩基配列の決定を進める。

まず、既知の尾索動物 mt ゲノムの塩基配列に基づいて設計した一次配列の保存性の高い遺伝子の部分配列増幅用縮重プライマーを用いて、*cox1* (チトクロム酸化酵素サブユニット I)、および *cob* (チトクロム b) 遺伝子の部分配列を PCR で増幅し、その配列を決定する。

次いで、上で得られた配列を元に種特異的プライマーを設計し、mt ゲノムの全領域を long PCR で増幅する。その後、shotgun

sequencing と primer walking を併用し、全塩基配列決定を行う。

そして、遺伝子の同定を行い、遺伝子組成・遺伝子配置などのゲノム構造を決定する。その他、各 mt ゲノムに見られる特徴を塩基配列の解析から検討する。

オタマボヤ類の mt ゲノムでは、*O. dioica* や *O. longicauda* の場合のように、rRNA 遺伝子や tRNA 遺伝子が mt ゲノム上に見いだされないことが予想される。その場合、rRNA 遺伝子の保存配列をプローブとする Southern hybridization、RNA に対する Northern hybridization などの解析や、mt-tRNA の RT-PCR (reverse transcription PCR) 等による mt-rRNA (遺伝子) の検出を試みる。Mt-rRNA (遺伝子) が検出されれば、その際に得られた情報に従って、その遺伝子配列を含む mt ゲノムのクローニング、配列決定を試みる。

(2) 尾索動物の mt ゲノムの比較ゲノム解析とゲノム構造の多様化の経路の解明: 尾索動物の進化について検討する上で鍵となるグループから種を選び、mt ゲノムの全塩基配列を決定する。注目するのは、次のグループである。

タリア綱 (サルパ目)

ホヤ綱腸性目無管亜目 (ヘンゲボヤ科、マンジュウボヤ科、ウスボヤ科)

ホヤ綱腸性目管罎亜目 (ナツメボヤ科、オオグチボヤ科等)

オタマボヤ綱 (サイツチボヤ科、オタマボヤ科)

mt ゲノムの解析は上記のように行う。更に、mt 遺伝子に基づく分子系統解析を行い、尾索動物の進化経路を推定する。

(3) 尾索動物 mt ゲノムに見られる過剰な tRNA 遺伝子の発現解析と、mt 遺伝暗号表の完全な解読に必要な tRNA (遺伝子) セットの探索: 既報の *Phallusia* spp. mt ゲノムは tRNA^{Asp} 遺伝子を欠くと報告されている。一方、マボヤ *Halocynthia roretzi* やサルパ *Ritteriella amboinensis* では、同一アンチコドンを持つ tRNA 遺伝子が複数存在する。それらの遺伝子の数の異同は尾索動物 mt ゲノムのゲノム構造の多様化の過程で生じたものである。これらの mt ゲノムと、新規に得られた尾索動物 mt ゲノム (後述) から解析対象を選び、下記の解析を行う。

まず、尾索動物 mt ゲノムを比較検討し、tRNA 遺伝子の再同定を行う。特に、データベース上の mt ゲノムの tRNA 遺伝子を見てみると、アクセプターステムの範囲の同定は、必ずしも正確では無い。そのため、まず、尾索動物 mt-tRNA 遺伝子の配列の整理を行う。

4. 研究成果

(1) オタマボヤ綱 mt ゲノム

オタマボヤ科の *Oikopleura longicauda* mt ゲノムでは、ワカレオタマボヤ *Oikopleura dioica* mt ゲノム同様、9種の蛋白質遺伝子しか発見されていない。すなわち、mt ゲノム上に tRNA、rRNA の遺伝子が全く見つからない。尾索動物 mt rRNA 遺伝子の保存配列を元に PCR プライマーを設計し、*O. dioica* total DNA を鋳型として PCR による検出、増幅を試みたが、増幅は見られなかった。PCR プライマー配列の再検討が必要である。また、*Oikopleura* spp. mt 遺伝暗号表は他の尾索動物 mt と同一であると考えられる。*O. longicauda* の複数の mt 遺伝子では、フレームシフトが見られた。これは、*O. dioica* mt 蛋白質 mRNA の解析で報告された RNA 編集が、*O. longicauda* でも存在することを示唆している。

オタマボヤ綱サイツチボヤ科の *Fritillaria haplostoma* mt ゲノムの解析では、まず、*cox1* 遺伝子と *cob* 遺伝子の部分配列の増幅を行い、塩基配列を決定した。*cox1* と *cob* 遺伝子の間を増幅する PCR では、PCR フラグメントの増幅は見られず、*cox1* 遺伝子の上流向きと下流向きの PCR プライマーによる PCR 増幅 (約 4 kbps) 並びに *cob* 遺伝子の上流向きと下流向きの PCR プライマーによる PCR 増幅 (約 6 kbps) が見られた。これは、*cox1* 遺伝子をコードする mt ゲノムと、*cob* 遺伝子をコードする mt ゲノムの少なくとも 2 種類の mt ゲノムを *F. haplostoma* が持つことを示唆する。さらに、*cox1* 遺伝子をコードする mt ゲノムの塩基配列の解析から、この mt ゲノムが *cox1/3* 融合遺伝子、*cox2* 遺伝子、*atp6* 遺伝子のみをコードすることが示唆された。Mt ゲノムにコードされる cytochrome oxidase subunit で、*cox1* と *cox3* の融合遺伝子が見いだされたのは初めてである [ミトコンドリア以外では、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* で *cox1/cox3* 融合蛋白質遺伝子が知られている] また、*F. haplostoma* mt 蛋白質遺伝子 (*cox1/cox3*、*cox2*、*atp6*) を用いて、他の尾索動物 mt 蛋白質遺伝子と共に分子系統解析を行うと、*F. haplostoma* mt 遺伝子の進化速度は *O. longicauda* よりも速いことが示唆された。

(2) 尾索動物 mt ゲノムに基づく分子系統解析: 4種の mt 蛋白質遺伝子に基づく尾索動物の分子系統解析より、蛋白質遺伝子数の減少したオタマボヤ類で進化速度が極度に速いことを明らかにした。また、*atp8* 遺伝子 mt ゲノムに欠く 2 種類のサルパ、*Ritteriella amboinensis* と *Ritteriella pecteti* も進化速度が他の尾索動物 (ウミタルとヒカリボヤを含む) よりも速いことが示唆された。

オタマボヤ綱の mt 遺伝子の進化速度が他の尾索動物よりも極端に速くなっていること、また mt ゲノム上にコードされている蛋白質遺

伝子の数が他の尾索動物よりも少ないことから、オタマボヤ綱を以降の分子系統解析から除外した。また、サルパ*R. amboinensis*と*R. pecteti* mtゲノムが*atp8*遺伝子をコードしていないため、残る12種のmt蛋白質遺伝子を用いて分子系統解析を行った。

分子系統解析は、主として最尤法並びにベイズ法を用いて進めた。尾索動物ミトコンドリア遺伝子の進化速度は、他の脊索動物に比べ極めて速いこと、加えて、尾索動物内の種間（配列間）での進化速度が極端に異なることから、配列間の進化速度の差の影響をどのようにして少なくするのか、その検討を行う必要がある。そこで、進化モデルとして、座位間での進化速度の差の影響が少ないことが報告されているmixed model、CAT modelや、系統間で進化モデルまたは進化速度が異なることが許容される系統樹作成法を用いて、尾索動物内の系統関係を再検討した。その結果、タリア綱が、腸性目特に管鰓亜目の内群であることが示唆された。また、管鰓亜目ディアゾナ科の*Rhopalaea* sp.は無管鰓亜目の群内群になること、タリア綱が管鰓亜目の群内群になることから、管鰓亜目は、多系統群であると考えられる。よって、無管鰓亜目と管鰓亜目からなる腸性目の分類体系の再検討が必要であると考えられる。また、壁性目（褶鰓亜目）のマボヤ（ピウラ）科が側系統群になる（これは18S rRNA遺伝子の解析結果と矛盾しない）ことから、壁性目の内部系統の分類体系についても、再検討が必要であると考えられる。

(3) 尾索動物mt-tRNA遺伝子の再同定：既報の尾索動物mtゲノムについて、tRNA遺伝子の再同定を行った。ナツメボヤ科ホヤのmtゲノムでは、tRNA^{Asp}遺伝子が見いだされないことを再確認した。また、他のtRNA遺伝子の5'末端並びに3'末端の位置の再同定を行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 13 件)

Yokobori, S., A. Yamagishi, & K. Watanabe. Evolution of urochordate mitochondrial genetic code. The 7th Tunicate International Meeting, Naples, Italy (2013/07)

Yokobori, S. & K. Watanabe. Early evolution of genetic code inferred from extant mitochondrial genetic decoding system. EANA 2014. Edinburgh, UK. (2014/10)

横堀伸一. 遺伝暗号の進化：ミトコンドリア遺伝情報システムから考える。生命の起原夏の学校2012。野田。(2012/7)

渡辺公綱、横堀伸一、鈴木勉. 動物ミトコンドリアの遺伝暗号の多様性。第14回日本進化学会年会。南大沢（八王子）。(2012/8)

横堀伸一、鈴木勉、渡辺公綱. tRNAの進化に基づく動物ミトコンドリア遺伝暗号の多様性。第85回日本生化学会大会。福岡。(2012/12)

渡辺公綱、横堀伸一、鈴木勉. ミトコンドリア翻訳系から遺伝暗号の起源を探る。第15回RNAミーティング。松山。(2013/07)

横堀伸一. 遺伝暗号の可塑性と生命の起源。生命の起源と進化・アストロバイオロジー夏の学校2013。お台場。(2013/08)

横堀伸一、渡辺公綱、山岸明彦. 後生動物ミトコンドリア遺伝暗号の進化（尾索動物を中心として）。第15回日本進化学会年会。つくば。(2013/08)

横堀伸一、別所義隆、渡辺公綱、山岸明彦. 尾索動物ミトコンドリア遺伝暗号の進化。第84回日本動物学会年会。岡山。(2013/09)

横堀伸一、山岸明彦、西野敦雄. ホソサイツチボヤ*Fritillaria haplostoma*（尾索動物門オタマボヤ綱）の分子系統解析（18S rRNAとミトコンドリア遺伝子を用いて）。第16回日本進化学会大会。高槻。(2014/08)

横堀伸一、山岸明彦、西野敦雄. ホソサイツチボヤ*Fritillaria haplostoma*の分子系統解析。第85回日本動物学会年会。仙台。(2014/09)

横堀伸一. 動物ミトコンドリア遺伝暗号からみた遺伝暗号の初期進化。第7回アストロバイオロジーワークショップ。東京。(2014/11)

横堀伸一、渡辺公綱、動物ミトコンドリア遺伝暗号からみた遺伝暗号の進化、生命の起原および進化学会の第40回学術講演会、2015/3、東京

[図書](計 1 件)

Watanabe, K. & S. Yokobori (2014) How the early genetic code was established? -Inference from the analysis of extant animal mitochondrial decoding systems-. *Chemical Biology of Nucleic Acids: Fundamentals and Clinical Applications*, pp. 25-40, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横堀 伸一 (YOKOBORI, Shin-ichi)
東京薬科大学・生命科学部・講師
研究者番号：40291702

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：