

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440182

研究課題名(和文) サンゴに共生する褐虫藻類オルガネラゲノムの環境変化に伴う機能調節機構の解明

研究課題名(英文) Revealing regulation mechanisms of organeller genomes to environmental change in the coral symbionts, Symbiodinium spp.

研究代表者

將口 栄一 (SHOGUCHI, Eiichi)

沖縄科学技術大学院大学・その他の研究科・研究員

研究者番号：90378563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：共生性渦鞭毛藻の褐虫藻 *Symbiodinium minutum* (クレードB1)のプラスチドゲノムとミトコンドリアゲノムの全配列を決定し、その解析結果を論文として報告した (Mungpakdee et al., 2014; Shoguchi et al., 2015)。プラスチドゲノムは、14個のミニサークルDNA(1.8-3.3 kbp)からなり、各々のミニサークルに一つの遺伝子がコードされ、それらの全てがRNA編集を受けることを明らかにした。ミトコンドリアゲノム解析では、褐虫藻とアピコンプレクサ類マラリア原虫との間で多くのノンコーディングRNAsが保存されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The plastid and mitochondrial genomes were decoded and analyzed in the symbiotic dinoflagellate, *Symbiodinium minutum*. The papers showing these results were published (Mungpakdee et al., 2014; Shoguchi et al., 2015). The structures of plastid genome were fourteen minicircle DNA (1.8-3.3 kbp). Each circle encodes one gene, which was edited in RNA processing. The mitochondrial genome analysis reveals the conservation of non-coding RNAs between *Symbiodinium* and the apicomplexan, *Plasmodium falciparum*.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：オルガネラゲノム 渦鞭毛藻 *Symbiodinium* RNA編集 ノンコーディングRNA 共生 サンゴ 進化

1. 研究開始当初の背景

代表研究者らは、重要な環境問題であるサンゴの白化現象のメカニズムを明らかにする上での研究基盤を得るために、サンゴ (Shinzato et al., 2011) 及び共生性渦鞭毛藻の褐虫藻 *Symbiodinium minutum* (クレード B) のゲノム解読に取り組んできた。その結果、培養している褐虫藻の核ゲノム (1,500 Mb) には約 42,000 の遺伝子がコードされていることを明らかにした。また次世代シーケンサーから得た褐虫藻のゲノム配列には、ミトコンドリアのゲノム配列とプラスチドのゲノム配列が含まれていた。その配列とトランスクリプトーム配列の比較解析により、これらオルガネラゲノムから発現する mRNA は非常に多くの RNA 編集を受けることが分かりつつあった。しかしながら、渦鞭毛藻のオルガネラにみられる RNA 編集の意義については、これまでよく分かっていなかった。ところが温度ストレスの予備的実験により、mRNA の特定の領域で RNA 編集の程度が減少する可能性を示す結果が得られてきた。この結果は、タコの生息域に対する温度適応とカリウムチャンネル遺伝子の RNA 編集の関係に関する報告に類似しているように思われた (Garrett and Rosenthal, 2012)。このような背景から褐虫藻における RNA 編集の意義や褐虫藻の環境に対する応答を遺伝子レベルで明らかにする研究への道が開けてきたと考えられた。

2. 研究の目的

(1) サンゴに共生する褐虫藻類を含む渦鞭毛藻類は海洋環境系を考える上で非常に重要な生物である。褐虫藻類は分子系統学的解析から 9 つのクレード A から I に分類されているが、そのオルガネラの多様性についてよく分かっていない。またサンゴの白化につながる強い紫外線や高温ストレスに対し、褐虫藻類がどのように反応するのかは興味深い問題であるが、分子生物学的研究は進んでいない。代表研究者らはこれまでの研究で褐虫藻の核ゲノム概要配列を明らかにしてきた。本研究ではストレス環境下における褐虫藻類のトランスクリプトームの比較解析と野外からサンプリングした褐虫藻オルガネラゲノムの多型解析から、そのユニークな構造のオルガネラゲノムがストレスや環境の変化に対し、どのように反応しているのかを明らかにすることを第一の目的とした。

(2) また褐虫藻のオルガネラゲノムがユニークであり、わずかな遺伝子だけがコードされている理由に関するいくつかの仮説が報告されてきていた (Wisecaver and Hackett, 2011)。環境に応じて個々のオルガネラ遺伝子の発現調節をすばやく行うためという仮説や、ゲノムのコピー数を環境に応じてすばやく調節できること、変異を受けやすいオルガネラ遺伝子の多様化の上で議論することが可能であった。本研究により、これらの仮説を検証するゲノム配列基盤を整えるこ

とが第二の目的であった。

3. 研究の方法

(1) オルガネラゲノムの配列は繰り返し配列が多い等の問題により、断片配列だけが得られていた。プラスチドのミニサークル配列は、PCR 法を用いてギャップ領域の配列を含め、全配列を決定する。またミトコンドリアのゲノムが高コピー存在することを利用し、これまでにイルミナシーケンサーにより得られていたリード配列を再度アセンブルすることにより、非コード領域を含む全配列を決定する。

(2) 得られたゲノム配列にトランスクリプトーム配列をマッピングすることにより、RNA 編集を受けている領域を決定する。情報的手法により、オルガネラゲノムにコードされたタンパク質の 3 次元構造の予測や配列の比較解析を行い、オルガネラゲノム配列の特徴づけを行う。

(3) ストレス環境下 (温度、紫外線) における褐虫藻の遺伝子発現量と RNA 編集のパターンの変化を次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析から調べる。連携研究者の協力により、野外のサンゴ *Acropora digitifera* (100 個体以上) に共生している褐虫藻のオルガネラゲノムの多型のパターンを調べる。環境により変化する RNA 編集のパターンと褐虫藻のオルガネラゲノムの多型のパターンをバイオインフォマティクス的手法を用いて詳細に比較解析する。

4. 研究成果

(1) *S. minutum* の 109 個のプラスチド関連遺伝子の中の 95 個が核ゲノムにコードされ、その多くが重複していることを明らかにした (図 1)。1.8 kbp から 3.3 kbp のミニサークル DNA (図 2) からなるプラスチドゲノムにコードされた 14 個の遺伝子は、多くの RNA 編集を受けていた (表 1)。これら RNA 編集が光合成タンパクの機能に重要であることをタンパクの 3 次元構造の予測解析から明らかにした (図 3)。

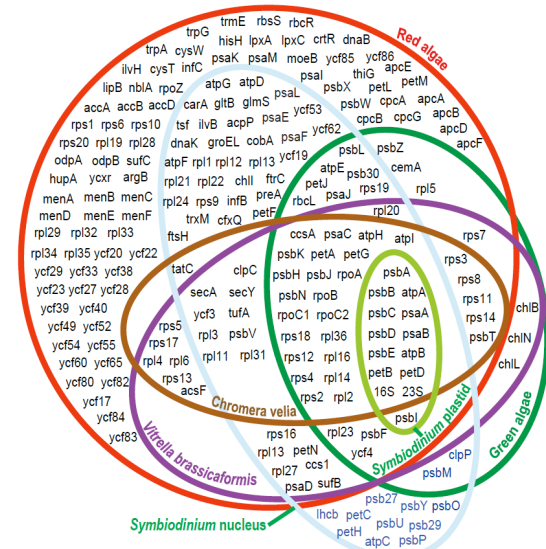


図 1. プラスチドゲノムにコードされているプラスチド関連遺伝子群のベン図. *Symbiodinium minutum* のプラスチドゲノムにコードされた 14 個の遺伝子 (黄緑色内) と核ゲノムにコードされた 95 個 (青色内) のプラスチド関連遺伝子を示す. アピコンプレクサ類の *Chromera velia* (茶色) と *Vitrella brassicaformis* (紫色), 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (緑色), 紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (赤色) のプラスチドゲノムにコードされた遺伝子をそれぞれのサークル内に示す.

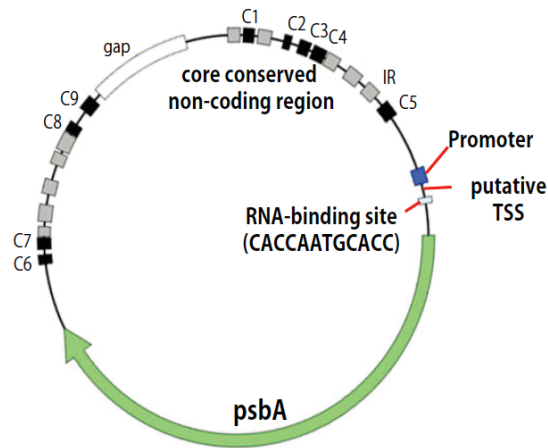


図 2. *S. minutum* のミニサークルの例. *psbA* 遺伝子をコードする約 2.4 kbp のミニサークルは、他の 13 個のミニサークルとの間で保存された非コード領域 (C1-C9, RNA-binding site) をもつ.

表 1. *S. minutum* の 14 個のプラスチド遺伝子にみられる RNA 編集.

Gene	estimated size of minicircle (kb)	No. of edits (%) ^a	Editing type										No. of amino acid substitutions (%) ^{**}
			A/G	G/A	C/U	U/C	G/C	C/G	U/A	A/U	A/G	A/U	
<i>psbA</i>	2.4	4/1029 (0.4)	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	3/343 (0.9)
<i>psbB</i>	2.5	30/1500 (2.0)	18	3	4	5	0	0	0	0	0	28/500 (5.6)	
<i>psbC</i>	2.5	25/1359 (2.4)	15	0	4	2	3	0	0	1	0	22/453 (4.9)	
<i>psbD</i>	2.25	8/1074 (0.7)	3	0	0	3	1	0	1	0	0	7/358 (2.0)	
<i>psbE</i>	1.8	9/234 (3.8)	4	0	1	0	2	1	0	1	0	8/78 (10.3)	
<i>psbI</i>	2.13	3/108 (2.8)	0	0	1	1	0	1	0	0	0	3/36 (8.3)	
<i>petB</i> ^{***}	2.3	23/657 (3.5)	5	1	2	6	9	0	0	0	0	22/219 (10.0)	
<i>petD</i> ^{***}	2.2	33/477 (6.9)	12	4	2	6	8	0	0	1	0	28/159 (17.6)	
<i>psaA</i>	3.3	100/2022 (4.9)	52	8	20	13	2	0	0	5	0	84/674 (12.5)	
<i>psaB</i>	3.2	85/2103 (4.0)	53	5	15	6	4	0	0	1	1	78/701 (11.1)	
<i>atpA</i>	2.4	43/1434 (3.0)	28	3	5	6	1	0	0	0	0	37/478 (7.7)	
<i>atpB</i>	3	50/1971 (2.5)	29	3	5	10	2	0	0	1	0	44/657 (6.7)	
<i>16S rRNA</i>	2.35	22/794 (2.8)	17	0	15	0	0	0	0	0	0	0	
<i>23S rRNA</i>	2.5	36/1138 (3.2)	26	0	7	0	1	2	0	0	0	0	

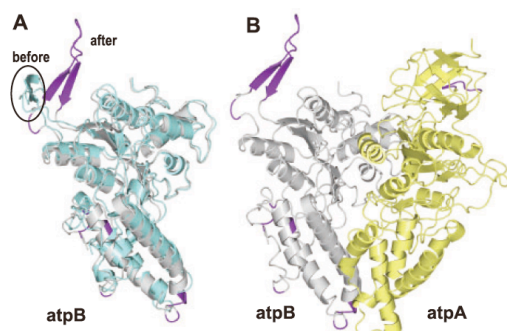


図 3. RNA 編集を受けることによるタンパク質の 3 次元構造の保存性の回復.

(A) 予測された *atpB* タンパク質の 3 次元構造. RNA 編集前 (青色) と RNA 編集後 (灰色) との比較により、構造が大きく変わると予測される領域が紫色で示される. (B) *atpB* と *atpA* (黄色) の予測されるインターアクション領域の近傍にも、構造が大きく変化するサイト (紫色) が含まれる.

表 2. *S. minutum* の 3 個のミトコンドリアゲノムにコードされた遺伝子の RNA 編集の型.

Gene	No. of edits (%) ^a	Editing type							No. of amino acid substitutions (%)
		A/G	G/A	C/U	U/C	G/C	U/G	A/C	
<i>cox1</i>	29/1455 (2.0)	18	0	3	4	2	1	1	24/485 (4.9)
<i>cox3</i>	24/774 (3.1)	18	1	1	4	0	0	0	23/258 (8.9) ^b
<i>cob</i>	19/1062 (1.8)	8	0	4	4	2	1	0	19/354 (5.4) ^b

表 3. *S. minutum* のミトコンドリアゲノム上に予測された遺伝子とマラリア原虫の遺伝子との類似性.

gene ^a	subunit order ^a	predicted location	orientation to scaffold	similarity to <i>P. falciparum</i> gene ^b
<i>cox1</i>		5809 - 7248	+	916 / 1441 (63%)
<i>cox3</i>		186587 - 187332	+	405 / 771 (52%)
<i>cob</i>		197602 - 198718	+	688 / 1131 (60%)
<i>SSUA</i>	S4	177279 - 177354	+	57 / 80 (71%)
<i>SSUB</i>	S6	236311 - 236394	+	48 / 86 (55%)
<i>SSUD</i>	S10	176902 - 176959	-	37 / 63 (58%)
<i>SSUE</i>	S11	221699 - 221724	+	19 / 26 (73%)
<i>SSUF</i>	S12	170409 - 170456	+	31 / 48 (64%)
<i>LSUA</i>	L1	105339 - 105493	-	89 / 158 (56%)
<i>LSUB</i>	L3	38813 - 38831	-	17 / 19 (89%)
<i>LSUC</i>	L4	73563 - 73580	-	17 / 18 (94%)
<i>LSUD</i>	L8	222761 - 222836	+	55 / 76 (72%)
<i>LSUE</i>	L9	193381 - 193573	+	149 / 195 (76%)
<i>LSUF</i>	L11	279828 - 279907	+	55 / 80 (68%)
<i>LSUG</i>	L12	278801 - 278900	-	74 / 100 (74%)
<i>RNA1</i>	L6	317063 - 317147	+	54 / 88 (61%)
<i>RNA2</i>	L2	60688 - 60729	+	26 / 42 (61%)
<i>RNA3</i>	L7	34514 - 34593	+	45 / 81 (55%)
<i>RNA4</i>		220439 - 220506	-	39 / 68 (57%)
<i>RNA5</i>	S9	138204 - 138280	+	48 / 80 (60%)
<i>RNA6</i>	L15	14596 - 14626	-	27 / 33 (81%)
<i>RNA7</i>		56199 - 56266	+	53 / 69 (76%)
<i>RNA8</i>	S5	106227 - 106279	-	30 / 53 (56%)
<i>RNA9</i>	S8	281819 - 281866	+	34 / 50 (68%)
<i>RNA10</i>	L13	217165 - 217255	+	59 / 92 (64%)
<i>RNA11</i>	L5	73434 - 73479	-	29 / 46 (63%)
<i>RNA12</i>	S2	191852 - 191892	+	30 / 41 (73%)
<i>RNA13</i>	L10	256591 - 256614	-	17 / 24 (70%)
<i>RNA14</i>	S1	31151 - 31177	+	21 / 27 (77%)
<i>RNA15</i>		253421 - 253447	-	19 / 27 (70%)
<i>RNA16</i>		51961 - 51991	-	21 / 31 (67%)
<i>RNA17</i>	S3	76949 - 76985	+	24 / 37 (64%)
<i>RNA18</i>	L14	300291 - 300312	+	17 / 22 (77%)
<i>RNA19</i>	S7	308063 - 308089	-	21 / 27 (77%)
<i>RNA20</i>		242197 - 242225	+	20 / 29 (68%)
<i>RNA21</i>		122845 - 122864	-	16 / 20 (80%)
<i>RNA22</i>		57665 - 57699	+	24 / 35 (68%)
<i>RNA23t</i>		186459 - 186487	-	20 / 29 (68%)
<i>RNA24t</i>		23626 - 23665	-	27 / 40 (67%)
<i>RNA25t</i>		302697 - 302717	+	16 / 21 (76%)
<i>RNA26t</i>		186374 - 186415	-	29 / 43 (67%)
<i>RNA27t</i>		278662 - 278712	-	36 / 52 (69%)

2) 渦鞭毛藻のミトコンドリアゲノム配列は、これまで断片的なものしか報告されてきておらず、非コード領域の配列についてはよく分かっていなかった。一方で、渦鞭毛藻類の姉妹群であるアピコンプレクサ類マラリア原虫のミトコンドリアゲノム配列はよく調べられており、約6 kbpの繰り返し配列からなることが分かっている。本研究において、渦鞭毛藻類では初となる *S. minutum* のミトコンドリアの全ゲノム配列(約326 kb)を決定した。タンパクをコードする3つの遺伝子は、RNA編集を受けていることを明らかにした(表2)。その中にマラリア原虫のミトコンドリアゲノムの非コード領域に類似性の高い領域が存在することを明らかにした(表3)。

本研究により得られた高精度のオルガネラゲノム配列は、サンゴに共生する多様な褐虫藻の環境応答を解析していく上での基盤となる。

(3) 野外のサンゴ *Acropora digitifera* (Shinzato et al., 2016)に共生していた褐虫藻のオルガネラゲノムの多型のパターンを解析中である。

<引用文献>

- ① Shinzato, C., Shoguchi, E., Kawashima, T., Hamada, M., Hisata, K., Tanaka, M., Fujie, M., Fujiwara, M., Koyanagi, R., Ikuta, T., Fujiyama, A., Miller, D. J. & Satoh, N. 2011. Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change. *Nature* 476, 320-323.
- ② Garrett S, Rosenthal JJ. 2012. RNA editing underlies temperature adaptation in K⁺ channels from polar octopuses. *Science* 335, 848-851.
- ③ Wisecaver JH, Hackett JD. 2011. Dinoflagellate genome evolution. *Annu Rev Microbiol.* 65, 369-387.
- ④ Shinzato, C., Mungpakdee, S., Arakaki, N., Satoh, N. 2015. Genome-wide SNP analysis explains coral diversity and recovery in the Ryukyu Archipelago. *Sci Rep.* 5, 18211.

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 4件)

- ① Beedessee, G., Hisata, K., Roy, M. C., Satoh, N. & Shoguchi, E. 2015. Multifunctional polyketide synthase genes identified by genomic survey of the symbiotic dinoflagellate, *Symbiodinium minutum*. *BMC Genomics.* 16, 941. 査読有.
doi: 10.1186/s12864-015-2195-8.

- ② Shoguchi, E., Shinzato, C., Hisata, K., Satoh, N. & Mungpakdee, S. 2015. The large mitochondrial genome of *Symbiodinium minutum* reveals conserved non-coding sequences between dinoflagellates and apicomplexans. *Genome Biol. Evol.* 7, 2237-2244. 査読有.
doi: 10.1093/gbe/evv137.

- ③ Mungpakdee, S., Shinzato, C., Takeuchi, T., Kawashima, T., Koyanagi, R., Hisata, K., Tanaka, M., Goto, H., Fujie, M., Lin, S., Satoh, N. & Shoguchi, E. 2014. Massive gene transfer and extensive RNA editing of a symbiotic dinoflagellate plastid genome. *Genome Biol. Evol.* 6, 1408-1422. 査読有.
doi: 10.1093/gbe/evu109.

- ④ Shinzato, C., Mungpakdee, S., Satoh, N. & Shoguchi, E. 2014. A genomic approach to coral-dinoflagellate symbiosis: studies of *Acropora digitifera* and *Symbiodinium minutum*. *Front Microbiol.* 5, 336. 査読有.
doi: 10.3389/fmicb.2014.00336.

[学会発表] (計 5件)

- ① 將口栄一、新里宙也、久田香奈子、佐藤矩行、褐虫藻3種のゲノムとその多様性、日本藻類学会、2016年3月19日-2016年3月20日
- ② Shoguchi, E. Comparative genomics of marine symbiotic dinoflagellates. 2015 international symposium on marine genomics, The palace hotel soul, Korea (2015.06.23)
- ③ Shoguchi, E., Shinzato, C., Hisata K., Satoh, N. Comparative genomics of symbiotic marine dinoflagellates. Academia Sinica-OIST Joint Meeting "Evolution of Complex Systems", Academia Sinica, Taiwan (2015.12.16)
- ④ 將口栄一、新里宙也、久田香奈子、佐藤矩行、褐虫藻 *Symbiodinium minutum* のミトコンドリアゲノムの解読、日本藻類学会、2015年3月20日-2015年3月22日
- ⑤ 將口栄一、新里宙也、川島武士、佐藤矩行、褐虫藻類のゲノムの解読、日本サンゴ礁学会、沖縄科学技術大学院大学、2013年12月12日-2013年12月15日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

將口 栄一 (SHOGUCHI, Eiichi)

沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミクスユニット・研究員

研究者番号：90378563

(2)連携研究者

ムンパッデイー・スタダ (MUNGPAKDEE,
Sutada)

沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミック
スユニット・研究員

研究者番号：10623647