

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23247038

研究課題名(和文) 新型分割イントロンの切り出し因子同定に基づく真核生物mRNA成熟機構進化の解明

研究課題名(英文) Splicing mechanisms of a novel split intron and evolution of the mRNA maturation process in eukaryotes

研究代表者

橋本 哲男 (HASHIMOTO, Tetsuo)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：50208451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,600,000円

研究成果の概要(和文)：腸管寄生虫 *Giardia intestinalis* において我々が発見した新型分割イントロンに注目し、*Giardia*ゲノムの中での分割・通常イントロンの分布を明らかにするとともに、分割イントロンのスプライシングメカニズムの解明とスプライセオソーム構成因子の解明を目的として研究を進めた。研究開始当初に明らかであったイントロンに加え、3つの通常イントロンと1つの分割イントロンをゲノム上に発見し、それらの存在を実験的に示した。一方、*Giardia*スプライセオソームを精製するために、スプライセオソームを構成する複数のタンパク質にタグをつけて*Giardia*で発現させる形質転換系の確立に取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：We previously found novel split introns in the divergent protozoan parasite, *Giardia intestinalis*. In this project, we explored distribution of the split and ordinary introns in the *Giardia* genome. In addition to the four ordinary and four split introns that were already identified, we newly found two ordinary and one split introns. The ordinary introns were present in the separate two genes whose functions were unknown, while a split intron found in the RNA-dependent helicase p68 gene, the coding region of which was split, and N- and C-terminal portions of the gene were located distantly in the *Giardia* genome. To further investigate the splicing machinery of the split intron, and to compare the *Giardia* spliceosome which can splice both ordinary and split introns with other spliceosomes from diverse eukaryotes, we started biochemical analyses to purify intact spliceosomes from *Giardia*.

研究分野：分子進化学

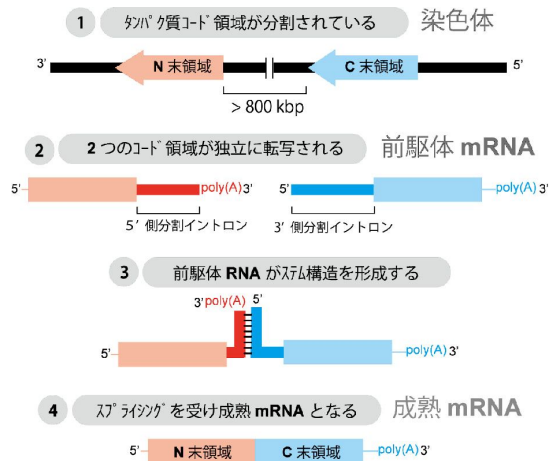
キーワード：イントロン トランススプライシング スプライセオソーム *Giardia* 分子進化

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物ゲノムでは、遺伝子からイントロンを含む pre-mRNA が合成されるが、イントロンはスプライセオソームと呼ばれる RNA-タンパク質複合体により取り除かれ成熟 mRNA となる。真核生物ゲノムには多数のイントロンが存在するため、DNA-RNA タンパク質という遺伝情報のスムーズな伝達には、効率的なイントロンの除去とコード領域の結合（スプライシング）は極めて重要である。また、イントロンの出現は真核生物の初期進化に深く関わるとする説もあり、イントロンおよびスプライセオソームの進化は、真核生物とそのゲノムの初期進化と、その後の生物多様性を生み出した要因である可能性が高い。しかし、これまで精力的に研究されてきたスプライシング機構はヒトなど哺乳類や酵母のものであり、多様な真核生物系統群のごく一部からのデータにすぎない。一方、他の真核生物のスプライシング機構の研究は、解析対象生物のゲノムデータに対し、ヒト・酵母配列を「問合せ配列」として用いた相同性解析が行われたにすぎず、真核生物全体のスプライシング機構の全体像とその進化は謎に包まれている。現在までの知見では、イントロンとスプライシング機構の本質的理解に不可欠な、「真核生物全体における普遍的・本質的事象」、「生物群特異的な事象」を区別・同定することは困難である。この現状を打破するためには、進化的に幅広い生物種間でのスプライシング機構の比較解析や、2種類の pre-mRNA から1種類の成熟 mRNA を作り出す trans スプライシングなどの特殊なスプライシング機構の研究が必要不可欠であると考えられた。

こうした中、研究代表者らのグループは、嫌気環境に適応し典型的なミトコンドリアを失う特異な進化を遂げた腸管寄生虫である *Giardia intestinalis* のイントロンに着目した研究を開始した。進化生物学において、*Giardia* 属は原始的真核生物の候補として注目を集めてきた。研究開始当初、*Giardia* ゲノム解析では、通常のスプライセオソーム型イントロンは4つしか発見されていなかった。その一方で、研究代表者らのグループは、*Giardia* の3種類のタンパク質遺伝子の mRNA 成熟には、特殊な「分割」イントロンの新型 trans スプライシングが必須であることを報告した (Kamikawa et al. *Curr. Biol.*) (図)。このような特異なスプライシングを行うために *Giardia* のスプライセオソームは通常型のスプライシング機能の他に特殊な機能を保持していると考えられたが、*Giardia* のスプライセオソーム構成因子の全容は未解明であった。また、*Giardia* のゲノムに通常イントロンと分割イントロンがどれくらいあり、どのように分布しているかという点にも興味もたれた。このような背景から、*Giardia* のイントロンを検索しスプラ

イセオソーム構成因子の全容を明らかにして、それを他の多様な真核生物のイントロンやスプライセオソームと比較することにより、真核生物全体のスプライシング機構とその進化の解明に繋がるカギが得られるのではないかと考え、本研究課題に取り組んだ。



## 2. 研究の目的

研究開始当初までに、研究代表者らは *Giardia* の 90kDa 熱ショックタンパク質 (HSP90) 及びダイニン (OAD) 遺伝子発現に新型 trans スプライシング機構が必須であることを明らかにした。その結果、*Giardia* におけるイントロンとスプライシング機構に関する以下の疑問点が明確となった。

- (1) これまでの *Giardia* ゲノム探索では通常イントロンは4つ、分割イントロンが4つ確認されたが、*Giardia* ゲノム中に通常・分割を合わせてイントロンが何個あるのか？
- (2) 分割イントロンのスプライシングに必要な配列要素は何か？また *Giardia* のスプライセオソームはどんな RNA・タンパク質因子から構成されるのか？
- (3) 通常イントロンと共に分割イントロンのスプライシングも行う *Giardia* スプライセオソームと、イントロンのほとんどが通常型であるヒトや酵母のスプライセオソームと本質的相違点があるのか、あるのならそれは何か？

そこで本研究では、上記3つの疑問点の解明を目指し、以下の3つの目標を設定して解析を行うこととした。

- 《目標1》*Giardia* ゲノム中の正確なイントロン分布の推測
- 《目標2》*Giardia* スプライセオソームの全容解明と機能解析
- 《目標3》真核生物スプライセオソーム進化の解明

## 3. 研究の方法

上記の3つの目標を達成するために、以下に示す5つの実験を計画して研究に取り組ん

だ。

- 実験 1 配列相同性検索と 5' RACE (rapid amplification of cDNA ends) 解析の結果を合わせることで、ゲノムデータ中の分割イントロンを探索する。
- 実験 2 網羅的転写産物 (EST) 解析を行い、EST データをゲノムデータへマップすることにより、通常・分割イントロンを探索する。
- 実験 3 組換え体 *Giardia* を用いて、pre-mRNA が形成するステム構造など、trans スプライシングに必要な配列要素を *in vivo* 実験で検証する。
- 実験 4 *Giardia* スプライセオソームを単離し、その構成因子を網羅的に同定する。単離したスプライセオソームからタンパク構成因子を個別に分離し、それらの部分的アミノ酸配列を決定・ゲノムデータへの参照を行うことで、スプライセオソーム構成因子の全容を解明する。
- 実験 5 trans スプライシングの有無、trans スプライシングのタイプが異なる *Giardia*、*Trypanosoma*、ヒト・酵母の間でスプライセオソームの構成因子を比較する。この比較解析から、真核生物スプライセオソーム構成因子の共通性と特異性を解明する。

#### 4. 研究成果

*Giardia* ゲノムデータに対して mRNA 配列をマッピングすることで分割および通常イントロンを網羅的に検出する作業を進めた。その結果、2 つの hypothetical protein 遺伝子上の通常イントロンを発見した。それらについて詳細な実験的解析を行うとともに、*Giardia* の関連データベースでの検索を行った結果、片方のイントロンに関しては、近縁の *Giardia* 株の 1 つで最近失われたことが明らかになった。一方、分割イントロンについては、RNA-dependent helicase p68 遺伝子上に存在する可能性が示唆され、実験的解析によりその存在を確認した。p68 遺伝子の分割イントロンを既知の 4 つの分割イントロンと比較解析した結果、基本的にそれらと同じメカニズムでスプライシングされる可能性が高いことが明らかとなった。

*Giardia* スプライセオソームの精製を目指す実験に関しては、スプライセオソーム構成因子である 3 種類のタンパク質 SMD1, SMD3, LSM1 に FLAG タグを付して大量発現させるためのプラスミドコンストラクトを作製し、*Giardia* を形質転換するための実験を進めてきた。現在、GFP タンパク質を *Giardia* 細胞内で発現させることに成功しているため、今後、FLAG タグ付タンパク質の大量発現と精製のステップに取り組む予定である。

一方、さまざまな真核生物のスプライセオソーム構成タンパク質のデータを整理する作業を進め、*Giardia* を含めて全真核生物に

普遍的に存在すると考えられるタンパク質に関するアライメント解析と分子系統解析を行った。生物種・あるいは生物グループに特異的に存在するタンパク質に関しても同様の解析を進めている。これらの解析から、スプライソソームは真核生物全体で保存されているタンパク質に加え、系統特異的なさまざまなタンパク質から構成されており、超分子システムとして非常に多様な構造となっているとの可能性が示唆された。

#### 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 7 件)

Arisue N, Hashimoto T, 2015.

Phylogeny and evolution of apicoplasts and apicomplexan parasites. *Parasitology International* 64:254-259.

doi:10.1016/j.parint.2014.10.005. 査読有.

Kamikawa R, Inagaki Y, Hashimoto T, 2014. Secondary loss of a cis-spliced intron during the divergence of *Giardia intestinalis* assemblages. *BMC Research Notes* 7:413.

doi: 10.1186/1756-0500-7-413. 査読有.

Kamikawa R, Brown MW, Nishimura Y, Sako Y, Heiss AA, Yubuki N, Gawryluk R, Simpson AGB, Roger AJ, Hahimoto T, Inagaki Y, 2014.

Parallel re-modeling of EF-1 $\alpha$  function in eukaryotic evolution: Divergent, low-expressed EF-1 $\alpha$  genes co-occur with EFL genes in diverse distantly related eukaryotes. *BMC Evol Biol* 13:131.

doi:10.1186/1471-2148-13-131. 査読有.

Kamikawa R, Kolisko M, Nishimura Y, Yabuki A, Brown MW, Ishikawa SA, Ishida K, Roger AJ, Hashimoto T, Inagaki Y. 2014 Gene-content evolution in discobid mitochondria deduced from the phylogenetic position and complete mitochondrial genome of *Tsukubamonas globosa*. *Genome Biology and Evolution* 6:306-315. doi: 10.1093/gbe/evu015. 査読有.

Ishikawa SA, Inagaki Y, Hashimoto T. 2012. RY-coding and non-homogeneous models can ameliorate the maximum-likelihood inferences from nucleotide sequence data with parallel compositional heterogeneity. *Evolutionary Bioinformatics* 8:357-371. doi: 10.4137/EBO.S9017. 査読有.

Kamikawa R, Inagaki Y, Hashimoto T. 2011. A novel spliceosome-mediated trans-splicing can change our view on the genome complexity of the divergent eukaryote *Giardia intestinalis*. *Biophysical Reviews* 3 (4) :193-197. doi:10.1007/s12551-011-0058-3. 査読有.

Kamikawa R, Inagaki Y, Roger AJ, Hashimoto T. 2011. Splintrons in *Giardia intestinalis*: Spliceosomal introns in a split form. *Communicative and Integrative Biology* 4(4):454-456. doi:10.4161/cib.4.4.15466. 査読無.

[学会発表](計6件)

矢崎裕規, 石川奏太, 久米慶太郎, 谷藤吾朗, 釜石隆, 橋本哲男, 稲垣祐司. 43 遺伝子系統解析により解明されたキネトプラスチダ類における寄生性形質

獲得プロセス, 第84回日本寄生虫学会大会, 杏林大学(東京), 2015.3.21.

高林舜, 谷藤吾朗, 久米慶太郎, 稲垣祐司, 橋本哲男. フォルニカタ生物 *Kipferlia bialata* の二者培養系の確立とゲノム・トランスクリプトーム解析, 第84回日本寄生虫学会大会, 杏林大学(東京), 2015.3.21.

Nishimura Y, Kamikawa R, Inagaki Y, Hashimoto T. A new strategy of organellar genome sequencing incorporating rolling circle amplification: protist mitochondria genomes. *Protist* 2012, Norway, Oslo, 2012.7.29.

Kamikawa R, Inagaki Y, Andrew J. Roger, Hashimoto T. Trans-splicing of split introns is required for the expressions of indispensable genes in *Giardia intestinalis*. IUMS2011 (International Union of Microbiological Societies 2011 Congress), Sapporo Convention Center (Sapporo), 2011.9.6.

Kamikawa R, Inagaki Y, Andrew J. Roger, Hashimoto T. Spliceosomal introns in a split form: Another aspect of intron evolution in eukaryotes. *SMBE2011*, Univ of Kyoto (Kyoto), 2011.7.26.

神川龍馬, 稲垣祐司, Andrew J Roger, 橋本哲男. 寄生性真核微生物 *Giardia* の縮退ゲノムにおける複雑な遺伝子発現, 第5回日本進化原生生物学研究会, 富山大学(富山), 2011.6.10.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 哲男 (HASHIMOTO, Tetsuo)  
筑波大学・生命環境系・教授  
研究者番号: 50208451

### (2) 研究分担者

稲垣 祐司 (INAGAKI, Yuji)  
筑波大学・生命環境系・准教授  
研究者番号: 50387958

奈良 武司 (NARA, Takeshi)  
順天堂大学・医学研究科・准教授  
研究者番号: 40276473

飯田 慶 (IIDA, Kei)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 00387961