

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04406

研究課題名(和文) 新型分割イントロンのスプライシング機構と進化多様性の解明

研究課題名(英文) Splicing mechanism of novel introns in a split form and their evolutionary diversity

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) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：原始的な真核生物の一候補である *Giardia intestinalis* のゲノム中に存在する、trans スプライシングにより切り出される新型分割イントロンに関する分子進化学的な解析を行い、スプライシング機構の多様性と進化に関する知見を得た。まず、*Giardia* および近縁種における通常および分割イントロンの分布を調査し、近縁種である *Kipferlia* において複数の分割イントロンを発見した。また、*Giardia* のスプライセオソーム構成因子を他の真核生物のデータと比較して分割イントロンの trans スプライシングに関与する因子を探るために、スプライセオソームの単離と精製を目指す実験を行った。

研究成果の概要(英文)：A protozoan parasite, *Giardia intestinalis*, previously considered as a primitive eukaryote, possesses novel introns with a split form (split introns) which are spliced by trans-splicing. We evolutionarily analyzed the genome and transcriptome of *Giardia* and found a new split intron of this type and suggested the presence of other candidates. We also sequenced and surveyed the genome and transcriptome of *Kipferlia*, a close relative of *Giardia*, and found several candidates of split introns. On the other hand, in order to search for spliceosomal factors participating in the trans-splicing of split introns, we try to isolate and purify spliceosomes from *Giardia* and to compare the spliceosomal components with those of other eukaryotic model organisms.

研究分野：分子進化学

キーワード：機能進化 スプライシング 分割イントロン ゲノム *Giardia* *Kipferlia*

1. 研究開始当初の背景

真核生物では、ゲノム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、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。しかし、これまでの研究は、1 つの pre-mRNA から成熟 mRNA を形成する cis スプライシングに関して、哺乳類や酵母を用いて行われたものがほとんどであり、多様な真核生物系統群のごく一部を対象としたものにすぎなかった。したがって、真核生物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た。

研究開始当初の知見では、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」と「生物群特異的な事象」を区別・同定することは困難であった。この状況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これまで特殊と考えられてきた機構の研究が必要不可欠であると考えられた。

進化生物学において、フォルニカータ生物群の *Giardia* 属は原始的な真核生物の候補として注目を集めてきた。*Giardia* において cis スプライシングを行う通常イントロンは研究開始当初までに 6 つしか発見されていなかった。その一方で、*Giardia* の 4 種類のタンパク質遺伝子の mRNA 成熟には、特殊な新型「分割」イントロンの trans スプライシング (右図) が必須であることが明らかとなっていた。しかし、*Giardia* および近縁生物種において、通常および分割イントロンのゲノム上での分布の実態は不明であり、その全容解明が待たれていた。また、*Giardia* のスプライセオソームの全容も不明であった。*Giardia* のスプライセオソームを精製してその構成因子を明らかにすることは、分割イントロンの trans スプライシング機構に参与する因子を探るために重要であるばかりでなく、真核生物全体を通してスプライシング機構の進化的な比較解析を行うための基礎データを提供するという意味でも重要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が原始的な真核生物の一候補である *Giardia intestinalis* のゲノム中に発見した、trans スプライシングにより切り出される新型『分割イントロン』(右図) (Kamikawa et al. 2011 *Curr Biol*) に関する分子進化学的な解析を通して、スプライシング機構の多様性と進化に関する新知見を得ることを目標とした。まず *Giardia* および近縁生物種における通常および分割イント

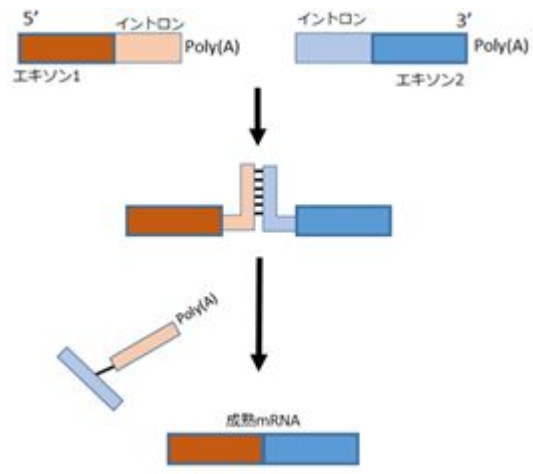


図 分割イントロンの trans スプライシング

ロンの分布を把握し、組換え体を用いる実験により、trans スプライシングに必要なイントロン側の配列要素を解明することとした。さらに、*Giardia* のスプライソソーム構成因子レパートリーを明らかにし、それを他の真核生物の既知データと比較することにより、trans スプライシングに参与する因子を推定することとした。

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) 研究開始時点までに *Giardia* ゲノムの探索の結果から、通常イントロンが 6 つ、分割イントロンが 4 つ確認されていたが、*Giardia* ゲノム中に通常・分割を合わせてイントロンは何個あるのか？

(2) *Giardia* の分岐以前に分岐した近縁種においてイントロンはどのくらいの数存在するのか？また、分割イントロンは存在するのか？

(3) 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 4 つの疑問点の解明を目指し、以下の 4 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* の分岐以前に分岐した近縁種におけるイントロンの探索

《目標 3》*Giardia* スプライセオソームの全

容解明と機能解析

《目標 4》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4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 トランスクリプトーム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プログラムを開発する。それを用いて *Giardia* ゲノム中に存在する通常・分割イントロンの総数を明らかにする。
- 実験2 *Giardia* の分岐以前に分岐した近縁種である *Kipferlia bialata* および *Dysnectes brevis* のゲノム・トランスクリプトーム解析を行い、得られたデータに対して実験1で開発したプログラムを適用して通常・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

次世代シーケンサーによって得られた大量のゲノム・トランスクリプトームのデータをもとに、分割イントロンの候補を探索するためのプログラムを開発し、既存の *Giardia* のデータに適用してその有効性を検証した。*Giardia* において既知の4つの分割イントロンを高いスコアで検出できることが分かったが、その他にも同程度のスコア値にて10個ほどの遺伝子を検出できた。その一部が200コピーほどある表面抗原タンパク質 Variant-specific surface proteins (VSP) であったため、それらが真の分割イントロンであるかどうかを検証するために、ゲノムレベルでの詳細な解析を進めている。

Giardia に近縁な自由生活性フォルニカタ鞭毛虫である *Kipferlia* と *Dysnectes* についても分割イントロンの有無を調べ進化的な比較をするために、次世代シーケンサー

(NGS)を用いてそれぞれのゲノム・トランスクリプトームのデータを得た。*Kipferlia* について、トランスクリプトームデータをゲノムデータにマッピングし、分割イントロン探査プログラムを用いて精査したところ、*Giardia* よりも多くの遺伝子に分割イントロンの候補を特定することができた。それらの一部について、分割イントロンをまたいだ位置に作成したプライマーを用い、ゲノムDNAとcDNAそれぞれを鋳型とするPCRを行ったところ、cDNAを鋳型とする場合に予想長のバンドが得られたことから、実際に分割イントロンが存在することが示唆された。一方、*Kipferlia* ゲノムには、約120,000の通常型シスイントロンが存在し、*Giardia* や *Spironucleus* (フォルニカタ寄生虫)のイントロンの数よりもはるかに多いことが明らかとなった。*Kipferlia* は *Giardia* や *Spironucleus* の分岐よりも早く分岐した生物であるため、自由生活性の祖先段階において存在した膨大な数のイントロンが寄生虫への進化の過程で失われたものと考えられた(論文)。現在、*Kipferlia* の分岐の後に分岐し、*Giardia* や *Spironucleus* により近縁な *Dysnectes* のゲノム・トランスクリプトームデータを用いた同様の解析を進めている。

組換え体 *Giardia* を用いる解析を進め、スプライセオソーム構成因子であるタンパク質 SmD1, SmD3, Lsm1 のN末側にFLAGタグを付したコンストラクトを *Giardia* に発現させることに成功した。それらの *Giardia* 株を維持しながら SmD1 に関する基本的な解析を進め、タグ付き SmD1 に対するタグアフィニティークラム精製により SmD1 と相互作用するタンパク質の網羅的同定を試みた。タグ付き SmD1 の回収率を向上させることができたため、質量分析を行ったが、他生物で良く保存されているスプライセオソーム構成タンパク質の同定には至らなかった。現在、SmD3, Lsm1 に関する同様な解析を進めるとともに、FLAGタグをC末側に移したコンストラクトの作成を検討している。

Giardia のスプライセオソーム構成タンパク質のレパートリーが哺乳類や酵母のものと異なっているかどうかを探るために、哺乳類・酵母で共通に存在する50個程度のタンパク質それぞれに対して、*Giardia* や他の真核生物でのホモログを探索した。それに際し、*Giardia*, *Kipferlia*, *Dysnectes* を含むフォルニカタ生物群のさまざまな生物のトランスクリプトームのデータ(論文)を精査して構成タンパク質のホモログの同定に努めた。収集したデータをもとにアライメント解析と分子系統解析を行った。その結果、哺乳類・酵母のホモログが *Giardia* にも存在すると考えられる30個程度のタンパク質のリストが明らかになった。これにより、スプライセオソームのコアとなるタンパク質は *Giardia* でも保存されているものと考えられた。以上の解析結果から、スプライセオソーム

が、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いう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 2 件)

Tanifuji G, Takabayashi S, Kume K, Takagi M, Nakayama T, Kamikawa R, Inagaki Y, Hashimoto T. 2018. The draft genome of *Kipferlia bialata* reveals reductive genome evolution in fornicate parasites.

PLoS One 13: e0194487. 査読有.

doi: 10.1371/journal.pone.0194487.

Leger MM, Kolisko M, Kamikawa R, Stairs CW, Kume K, Cepicka I, Silberman JD, Andersson JO, Xu F, Yabuki A, Eme L, Zhang Q, Takishita K, Inagaki Y, Simpson AGB, Hashimoto T, Roger AJ. 2017.

Organelles that illuminate the origins of *Trichomonas* hydrogenosomes and *Giardia* mitochondria. *Nature Ecology & Evolution* 1:0092. 査読有.

Tanifuji G, Archibald JM, Hashimoto T. 2016. Comparative genomics of mitochondria in chlorarachniophyte algae: endosymbiotic gene transfer and organellar genome dynamics. *Scientific Reports* 6:21016. 査読有. doi: 10.1038/srep21016

[学会発表](計 件)

杉崎 真, 神川 龍馬, 稲垣 祐司, 橋本 哲男, 谷藤 吾朗. ランプル鞭毛虫近縁種における分割イントロン(splintron)の探索: splintron の普遍性と成立過程の解明に向けて. 第 86 回日本寄生虫学会大会, 2017.
井上 貴史, 谷藤 吾朗, 神川 龍馬, 久

米 慶太郎, 稲垣 祐司, 橋本 哲男. *Giardia* に近縁な自由生活性鞭毛虫 *Dysnectes brevis* の MRO 機能の推測. 第 86 回日本寄生虫学会大会, 2017.

Tanifuji G, Archibald JM, Hashimoto T. Comparative analysis of chlorarachniophyte mitochondrial genomes; evolutionary insights from genome architecture and endosymbiotic gene transfer. VII ECOP-ISOP Joint Meeting, 2015.

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
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

橋本 哲男 (HASHIMOTO, Tetsuo)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号: 5 0 2 0 8 4 5 1

(2)研究分担者

奈良 武司 (NARA, Takeshi)
いわき明星大学・薬学部・教授
研究者番号: 4 0 2 7 6 4 7 3

稲垣 祐司 (INAGAKI, Yuji)
筑波大学・計算科学研究センター・教授
研究者番号: 5 0 3 8 7 9 5 8

谷藤 吾朗 (TANIFUJI, Goro)
国立科学博物館・動物研究部・研究員
研究者番号: 7 0 4 3 8 4 8 0

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()