

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07451

研究課題名(和文)ミトコンドリアイントロンの解析によるスプライソソーマルイントロン進化の解明

研究課題名(英文)Study on spliceosomal intron evolution through inspecting mitochondrial introns

研究代表者

西村 祐貴(Nishimura, Yuki)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・特別研究員

研究者番号：20783012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物の核ゲノムに見られるスプライソソーマル(sp)イントロンは、ミトコンドリアゲノム(mtDNA)に存在するグループII(gII)イントロンから進化したと考えられている。そこで、本研究は真核生物mtDNAにおけるgIIイントロンの多様性を探ることでspイントロンへの進化を解明する手がかりを得ることを目的とし、カタブレファリス類と有中心粒太陽虫類に属する生物のmtDNAを解読した。決定したmtDNAに含まれていたgIIイントロンは少数であったが、別タイプのイントロンの水平伝播やC-to-U型RNAエディングの発見など、派生的ではあるが興味深い成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Spliceosomal (sp) introns in eukaryotic nuclear genome are thought to be derived from group II (gII) introns in mitochondrial genome (mtDNA). The goal of this study is to obtain the clues of the evolution from gII intron to sp intron by investigating the diversity of gII intron in mtDNAs. Two mtDNAs from the organisms belong to Kathablepharid and Centroheliozoa were completely sequenced. Although the mtDNAs of two species includes a few gII introns, I found the lateral gene transfer of another type of intron and C-to-U RNA-type editing from these mtDNA, which extending the our knowledge on mtDNA diversity.

研究分野：オルガネラゲノム、イントロン、原生生物学、分子進化学

キーワード：ミトコンドリアゲノム グループIIイントロン スプライソソーマルイントロン カタブレファリス類
有中心粒太陽虫類

1. 研究開始当初の背景

(1) 真核生物の核コード遺伝子の多くはスプライソソーム(sp)イントロンによって分断されているが、これらのイントロンは翻訳前にスプライシングによって mRNA から除去される。sp イントロンはミトコンドリアゲノム(mtDNA)中から発見されるイントロンの一種、グループ II(gII)イントロンと様々な点で類似していることから、sp イントロンは gII イントロンから進化したと考えられている。しかし 2 種のイントロンには相違点も多く、gII イントロンから sp イントロンへと至る進化については未解明の部分が多い。

(2) sp イントロンは数十種のタンパク質から構成される巨大複合分子であるスプライソソームによってスプライシングされる。一方、gII イントロンのスプライシングには自身が内部にコードしているタンパク質(IEP; Intron Encoded Protein)が働いている。近年、スプライソソームの構成因子の一つは IEP と相同であることが明らかとなった。しかしスプライソソームは核内のすべての sp イントロンを認識するのに対し、IEP は原則として自身をコードする gII イントロンにのみ機能するという相違もある。ところが mtDNA に存在する gII イントロンの多くは IEP を持たないため、そのような gII イントロンがスプライシングされる仕組みは謎に包まれている。一部の真核生物では IEP をもたない mtDNA 内の複数の gII イントロンに対して、mtDNA からの水平伝播に由来すると考えられる核ゲノムコードの IEP 様タンパク質が作用することが示されている。IEP 様タンパク質がスプライソソームのように不特定のイントロンをターゲットとしているという事実は、スプライソソームの進化過程を考える上で非常に興味深いと言える。

(3) *Roombia* sp. は近年に発見・単離された従属栄養性の単細胞真核微生物である。研究代表者らの先行研究によって *Roombia* sp. の mtDNA には大量のイントロンが含まれていることが判明している。これらのイントロンは既知のどのタイプのイントロンにも当てはまらないものもあるが、gII イントロンの特徴を様々な度合いで残しているイントロンも多数存在する。このことから、未知のイントロンは gII イントロンから分岐したものだと考えられる。また当該イントロンの多くは IEP を保有しないので、*Roombia* はスプライソソームのような多数のイントロンに働くシステムを「再開発」しているはずである。したがって、これら未知のイントロンのスプライシングシステムを明らかにすることで、sp イントロンへの進化を理解するための新たな発見が得られると期待できる。

2. 研究の目的

(1) *Roombia* の mtDNA におけるスプライ

シング機構を明らかにするために、まず本種 mtDNA の完全配列を決定する。その後 mtDNA 中の全てのイントロンについて、IEP の有無や gII イントロンで保存されている RNA モチーフに基づき整理する。さらに、トランスクリプトーム解析やミトコンドリアのプロテオーム解析を行い、スプライシングに働く因子を探索する。

(2) 現在までに解読された mtDNA のほとんどは動物・菌類・陸上植物で占められているため、真核生物全体における mtDNA 中の gII イントロンの多様性が十分に理解されているとは言い難いのが現状である。したがって、まだ mtDNA が解読されていない生物群から、sp イントロン進化解明のために重要な手がかりが見つかる可能性は十分にある。そこで *Roombia* が属するカタブレファリス類を中心に、mtDNA データの蓄積が乏しい生物群から mtDNA の解読、及びイントロンの比較解析を行う。

(1)(2)を通して mtDNA で gII イントロン、あるいは gII 様イントロンのスプライシング機構が進化した過程、ひいては真核生物の sp イントロンが成立した進化的背景について、これまでにない視点から手がかりを得ることを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Roombia* sp. の mtDNA の部分配列は本研究計画前に既に行われていたが、mtDNA 中の反復配列が完全配列の取得を阻んでいると考えられた。そこで *Roombia* の培養細胞から DNA を抽出し、ロングリードシーケンサーである PacBio または Nanopore に供することで mtDNA の全長を決定することを目指す。その後、決定した mtDNA 中のイントロンについて、挿入されている遺伝子とその位置、イントロンに保存されているモチーフ、IEP の種類・保有しているドメイン等を可能な限り詳細に調べる。

また密度勾配遠心により *Roombia* のミトコンドリアを単離し、SDS-PAGE で精製したタンパク質を質量分析に供することでプロテオームデータを取得する。さらに、*Roombia* の細胞培養から RNA を抽出して次世代シーケンサーに供し、トランスクリプトームデータを取得する。これらの結果からスプライシング因子を探索することで、*Roombia* の mtDNA におけるスプライシング機構を明らかにしていく。

(2) *Roombia* に近縁だと考えられるテロネマ類、カタブレファリス類、ゴニオモナス類は現在までにほとんど mtDNA が解読されていないので、国内外から培養株を入手し、次世代シーケンサー(NGS)を利用して mtDNA の配列決定を行う。解読した mtDNA にイントロンが含まれていた場合には、(1)と同

様にして詳細なアノテーションを行い、*Roombia* や他の真核生物と比較する。

4. 研究成果

(1) *Roombia* については大量培養が難航したため、ロングリードシーケンスに必要な高分子ゲノム DNA を抽出することができず、mtDNA の完全配列を決定することができなかった。同様の理由で、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析も行うことができなかった。

そこで同じくカタブレファリス類に属する *Leucocryptos marina* NIES-1335 の培養株を国立環境研究所から購入し、大量培養を行った。培養細胞から DNA を抽出して、NGS に供し、得られた配列データを既存のソフトウェアを用いてアセンブルすることで本種の mtDNA の完全解読に成功した。カタブレファリス類に属する生物の mtDNA の全長が決定されたのは、本研究計画が世界でも初めての成果である。*L. marina* の mtDNA は約 67 kb の環状ゲノムであり、その中にコードされている遺伝子のほとんどは *Roombia* の mtDNA と共通であった。一方、*L. marina* の mtDNA に含まれている gII イントロンはリボソーム遺伝子に挿入されている少数のみであり、これは多数の gII イントロン、あるいは gII 由来イントロンをもつ *Roombia* とは大きく異なっていた。このことは 2 種のカタブレファリス類の mtDNA は全く異なる進化を辿ったことが示唆している。

今後は完全配列が決定できた *L. marina* のイントロンを詳細に解析し、学会発表や論文投稿を行う予定である。

(2) 真核生物における gII イントロンの多様性を探るために、これまでに mtDNA が解読されたことがない有中心粒太陽虫類 2 種、*Polyplacosystis contractilis* と *Marophyrs* sp. の培養株を入手して、*L. marina* と同様に mtDNA の配列決定を行い、完全配列の決定に成功した。2 種の mtDNA は共に約 110 kb の環状ゲノムで、コードしている遺伝子セットや遺伝子の並び順(シンテニー)も非常に似通っていた。これらの mtDNA からは gII イントロンは発見されなかったが、グループ I(gI)イントロンを *P. contractilis* は 10 個、*Marophyrs* sp. は 20 個含んでいた。gI イントロンは種の壁を越えて水平伝播することが知られているイントロンである。解読した有中心粒太陽虫類の gI イントロンを解析した結果、その一部は興味深いことに緑藻類の葉緑体ゲノム中の gI イントロンと起源が同一であることが示された。有中心粒太陽虫類と緑藻類は系統的に離れた生物なので、この結果は 2 つの生物群の異なるオルガネラ間で gI イントロンの水平伝播が起きたことを示唆している。

さらに、*P. contractilis* の mtDNA 転写物においてのみ、一部のシトシン(C)がウラシル

(U)に置換される C-to-U 型 RNA エディティングが起きていることが確認された。*P. contractilis* におけるエディティング箇所は少なくとも数十カ所に及ぶが、これほど頻繁に mtDNA で C-to-U 型 RNA エディティングが起こる例は、陸上植物を除いては知られていない。一方、*P. contractilis* と同じく有中心粒太陽虫類に属する *Marophyrs* sp. では RNA エディティングが全く起きていないので、今後 2 種を比較していくことで、C-to-U RNA エディティングの意義やその進化が解明されることが期待される。

このように有中心粒太陽虫類の mtDNA からは sp イントロン進化についての洞察を得ることはできなかったが、副次的に gI イントロンの水平伝播や C-to-U RNA エディティングを発見することができた。これらの成果については現在投稿論文を準備している。

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 1 件)

Masahiro Yuki, Mitsuo Sakamoto, Yuki Nishimura, Moriya Ohkuma, *Lactococcus reticulitermitis* sp. nov., isolated from the gut of the subterranean termite *Reticulitermes speratus*., Int J Syst Evol Microbiol., 2018, 68(2):598-601, 査読有

[学会発表](計 9 件)

西村祐豊、白鳥峻志、石田健一郎、橋本哲男、稲垣祐司、有中心粒太陽虫類におけるミトコンドリアゲノムの解析、第 12 回日本ゲノム微生物学会年会、2018 年 3 月 5 日~7 日、京都大学、京都府

西村祐豊、小田切正人、雪真弘、井上潤一、守屋繁春、大熊盛也、シングルセルトランスクリプトームによりシロアリ腸内原生生物の一種がキチン分解を通して効率的な窒素の利用に資することが示された、第 50 回日本原生生物学会大会&第 1 回日本共生生物学会大会合同大会、2017 年 11 月 17 日~19 日、筑波大学、茨城県

西村祐豊、小田切正人、雪真弘、井上潤一、守屋繁春、大熊盛也、シングルセルトランスクリプトームに基づくイエシロアリ共生原生生物の機能解明、環境微生物系合同大会 2017、2017 年 8 月 29 日~31 日、東北大学、宮城県

高島昌子、Sira Sriwasdi、杉田隆、西村祐豊、遠藤力也、大熊盛也、岩崎渉、眞鍋理一郎、ハイブリッドゲノムも包含する真菌のゲノム分類：多様な表現型を有する Trichosporonales 目の特性解析、環境微生物系合同大会 2017、2017 年 8 月 29 日~31 日、

東北大学、宮城県

Yuki Nishimura, Masato Otagiri, Yuki Masahiro, Jun-ichi Inoue, Shigeharu Moriya, Moriya Ohkuma, Single cell transcriptomes of the symbiotic protists in the wood-feeding termites gut suggest that chitin degradation is assigned to a symbiotic species, 15 th International Congress of Protistology, 2017 年 7 月 30 日～8 月 4 日, Prague, Czech republic

Kristína Záhonová, Romana Petrželková, Euki Yazaki, Yuki Nishimura, Matúš Valach, Štěpánka Hrdá, Vladimír Klimeš, Yuji Inagaki, Gertraud Burger, Vladimír Hampl, Vyacheslav Yurchenko, Marek Eliáš, Molecular tinkering in the evolution of the membrane attachment mechanisms of the Rheg GTPase, 15 th International Congress of Protistology, 2017 年 7 月 30 日～8 月 4 日, Prague, Czech republic

高島昌子、Sira Sriswasdi、西村祐貴、眞鍋理一郎、杉田隆、遠藤力也、岩崎渉、大熊盛也、ゲノムデータに基づく Trichosporonales 目の系統解析、第 11 回日本ゲノム微生物学会年会、2017 年 3 月 2 日～4 日、慶応大学、神奈川県

西村祐貴、真核生物における光合成生物の多様性とオルガネラ進化、第 12 回新産業酵母研究会講演会、2016 年 11 月 4 日、産業技術研究所臨海副都心センター、東京都

西村祐貴、小田切正人、雪真弘、守屋繁春、大熊盛也、シングルセルトランスクリプトームに基づくイエシロアリ共生原生生物の機能解明、第 31 回日本微生物生態学会、2016 年 10 月 23 日～25 日、横須賀市民文化会館、神奈川県

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
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
西村 祐貴 (NISHIMURA, Yuki)
国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・特別研究員
研究者番号：20783012

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()