

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14788

研究課題名(和文) 一次細胞内共生系を成立させるエピトランスクリプトームの解明

研究課題名(英文) Possible roles of the epitranstomic plasticity in establishing the host-symbiont relationship in the primary endosymbiosis

研究代表者

松尾 充啓 (Matsuo, Mitsuhiro)

京都府立大学・生命環境科学研究科・特任助教

研究者番号：70415298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、進化史上、比較的最近にシアノバクテリアを取り込んで真核光合成生物になった有殻アメーバに着目して、その若い光合成オルガネラ(シアネレ)とシアネレに近縁なシアノバクテリアについて、トランスクリプトーム解析と、包括的なRNAシュードウリジン化修飾部位の同定・比較解析を試みた。前者の解析から、一次細胞内共生進化の初期段階にあるシアネレのトランスクリプトームの全容が世界で初めて明らかになり、後者においても、有殻アメーバのシアネレのRNAシュードウリジン化修飾部位が同定されて、共生進化初期におけるオルガネラのRNA修飾(エピトランスクリプトーム)の様相が初めて明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Epitranscriptome means all the biochemical modifications of the RNA within a cell. Increasing evidence suggests that epitranscriptomic diversity makes a new layer of controlling the genomic functions in addition to the classical gene regulatory steps and epigenomic diversity. Our preliminary genome analysis of a photosynthetic amoeba, *Paulinella micropora*, suggests that the enzymes involved in RNA modification should be preferentially acquired by horizontally- and endosymbiotically-gene transfer at the early stage of the primary endosymbiotic evolution. To gain insight for the relationship between RNA modification and endosymbiotic evolution, we performed the comprehensive analysis of RNA pseudouridylation, one of major RNA modifications, in *P. micropora*. Our analysis detected the novel RNA pseudouridylations in the photosynthetic organelle of this organism, suggesting that the organelle epitranscriptome might be altered in the primary endosymbiotic evolution.

研究分野：進化

キーワード：一次細胞内共生進化 エピトランスクリプトーム RNAシュードウリジン化 有殻アメーバ シアネレ

1. 研究開始当初の背景

(1) 有殻アメーバのゲノム解析

有殻アメーバ *Paulinella chromatophora* の仲間は、約一億年前に誕生した光合成生物群であり、葉緑体と同様にシアノバクテリアに由来する光合成オルガネラ（シアネレ）をもっている。植物/藻類の葉緑体がシアノバクテリアの一次共生から 15 億年以上を経ているのとは比べると、このオルガネラはわずか 1 億年しか経ておらず、非常に若い。それ故、有殻アメーバは一次細胞内共生進化の初期過程を調べる上で格好の研究材料である。我々の研究グループは最近、世界に先駆けて有殻アメーバの一種 *Paulinella micropora* のゲノム（約 1GB）の解読に成功し、次の三つの興味深い知見を得た（投稿準備中）。

一次共生進化の初期過程では、宿主と共生者のゲノムの機能統合と再編成（=共生者から核への遺伝子移動と共生者ゲノムの縮退）が、従来の予想よりも遙かに短い時間で、一気に進行して終息する。

一次共生が生じる前に、宿主核には既に多数の原核生物遺伝子が水平転移しており、それら転移遺伝子の機能が、一次共生進化を推進した可能性が高い。

一般に、宿主核には、原核生物由来の「共生体ゲノムの制御に関わる遺伝子」が多数コードされているが、共生進化初期の核では、転写や翻訳などの制御因子に比べ、RNA 修飾酵素の割合が高いこと示された。つまり、宿主核が共生者ゲノムを統御する上で、RNA 修飾機構の収奪は極めて高い優先度をもっていったことが示唆される。

(2) エピトランスクリプトーム

RNA 修飾については、この数年、次世代シーケンサーを用いた包括的解析手法が新たに開発され、その結果、mRNA にも修飾塩基が含まれていること、さらに、ほ乳類では概日リズムやストレス応答、細胞運命決定等の細胞生理現象にも関わっていることが示され、「ゲノム塩基配列、エピゲノム情報、につづく第 3 の遺伝子制御コードである可能性」が示唆されている。ゲノムに対するエピゲノムと同様に、トランスクリプトームに対するエピトランスクリプトームという概念が新たに提唱されている。

2. 研究の目的

ミトコンドリアや葉緑体を生み出した一次共生進化の初期過程で、宿主ゲノムと共生者

ゲノムの機能的統合はどのように進むのだろうか。我々は、先に述べた有殻アメーバのゲノム解析の知見から、「宿主核による共生体のエピトランスクリプトームの改変が、共生体の表現系を変化させ、細胞内共生の成立を促した」のではないかと考えるようになった（図 1）。本研究では、RNA 修飾の一つである RNA シュドウリジン化に着目して、光合成有殻アメーバをモデルに、一次細胞内共生進化における「核-共生者ゲノムの機能的統合」に「エピトランスクリプトームの可塑性」がどのような役割を果たしているのかを、最新のゲノム学的手法によって検証することを目的にしている。

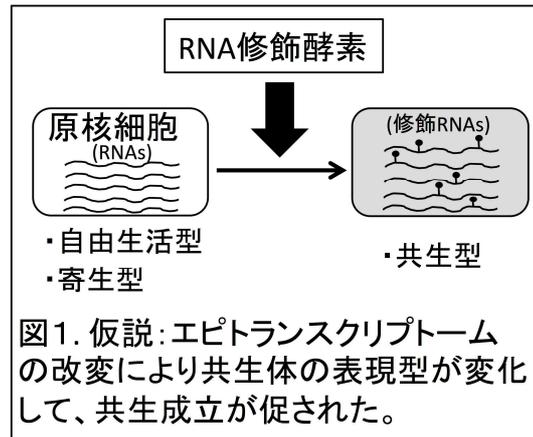


図1. 仮説: エピトランスクリプトームの改変により共生体の表現型が変化して、共生成立が促された。

3. 研究の方法

シアノバクテリアが本来持っている RNA シュドウリジン化修飾パターンが細胞内共生進化を経てどのように変化したのかを明らかにするため、光合成有殻アメーバ *P. micropora* MYN1 (旧名 *P. chromatophora* MYN1) の光合成オルガネラであるシアネレと、シアノバクテリアのパターンを比較解析する。その上で必要な以下の項目を遂行した。

(1) RNA 修飾を調べる上で基盤となる有殻アメーバのシアネレと近縁シアノバクテリアのトランスクリプトーム情報を RNAseq 解析により取得した。

(2) 有殻アメーバのシアネレ RNA のシュドウリジン化修飾を包括的に調べるには、解析上、RNA サンプルに大量に含まれる真核型 rRNA を除く必要がある。しかしながら市販の rRNA 除去試薬・キットを用いて、目的サンプルを調製することが有殻アメーバにおいては困難であった。そこで有殻アメーバの RNA サンプルから rRNA を効率的に除去する実験手法を開発した。

(3) RNA シュドウリジン化修飾を包括的に解析する Pseudo-seq 法 (Carlisle 等, 2014: DOI:10.1038/nature13802) は出発材料として大量の RNA を必要とし、有殻アメーバの微量 RNA サンプルに対して、そのまま適用する

ことは困難であった。そこで微量サンプルに適合する Pseudo-seq ライブラリの作成手法を新たに開発した。

(4) Pseudo-seq ライブラリをショートリードの次世代シーケンサーでシーケンシングを行った。

4. 研究成果

(1) 一次細胞内共生進化の初期段階にある光合成オルガネラのトランスクリプトームの全容解明

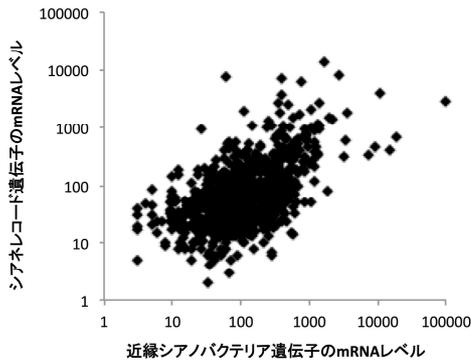


図2. 有殻アメーバシアネレと近縁シアノバクテリアのトランスクリプトームパターン比較
 散布図の各点は個々のオルソログ遺伝子の発現量を示す。シアネレとシアノバクテリア間で、遺伝子の発現量について正の相関があることが見て取れる。

有殻アメーバと近縁のシアノバクテリア4種について、神戸大学・内海域環境教育研究センターの村上博士と共同で、RNAseq 解析を実施して、一次細胞内共生進化の初期段階にある有殻アメーバの光合成オルガネラのトランスクリプトームの全容を世界で初めて明らかにした。その解析から、1)シアネレと近縁シアノバクテリアはよく似た遺伝子発現パターンを持つこと(図2)、2)シアネレ遺伝子とシアノバクテリア遺伝子が類似したプロモーター配列を持つこと(図3)、が判明して、有殻アメーバのシアネレがその祖先であるシアノバクテリアの特徴を遺伝子発現レベルにおいても色濃く残していることが明らかになった。これらの知見は、「シアノバクテリアからどのように葉緑体へと変化していったのか?」という細胞内共生進化の謎を解く上で重要であり、より詳細な解析を

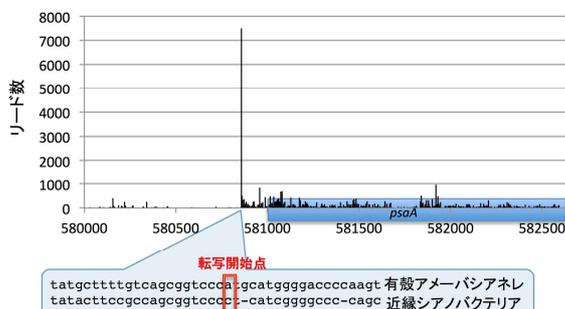


図3. 有殻アメーバシアネレ遺伝子(*psaA*)の転写開始点解析
 シアネレと近縁のシアノバクテリアは類似したプロモーター配列を持つ。

現在進めている。

(2) 非モデル生物における rRNA 除去法の開発

非モデル生物の RNA サンプルから rRNA を特異的に除去する方法については、Li 等(2013)が RNA ハイブリダイゼーションの原理を用いた方法を報告している。

(<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074286>)

しかしながら彼らの方法は、2価のカチオンを含む状態で RNA サンプルを高温にさらす等、RNA 分解を促進する処理工程を含むため、RNA を分解させずに rRNA の除去を行うことが難しい。そこで本研究では、反応組成、条件を変えた改良系を開発して、市販試薬の適用が難しい非モデル生物においても、RNA 分解を抑えながら RNA サンプルから rRNA を除去できるようにした(図3)。この改良系を用いれば、rRNA 除去・RNA 非分解が前提とした様々な実験手法が、非モデル生物で適用可能となる。

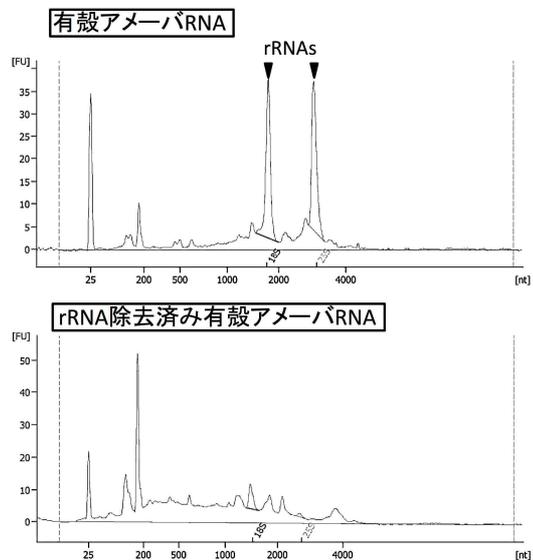


図4. 有殻アメーバ rRNA のバイオアナライザ電気泳動解析図

(3) 微量型 Pseudo-Seq ライブラリ作成法の開発

有殻アメーバの微量 RNA サンプルから Pseudo-seq ライブラリを作成するにあたり、ライブラリ調製時にサンプルロスが生じ得る、「アルコール沈殿」、「ポリアクリルアミドゲル電気泳動による RNA サイズ分画」の工程を、磁気ビーズによる手法に置き換えた微量型 Pseudo-Seq ライブラリ作成系を開発した。これにより、従来法よりも桁少ない RNA 量からでも Pseudo-Seq 解析が可能になり(図5)、ライブラリ作成にかかる時間を大幅に短縮できるようになった。

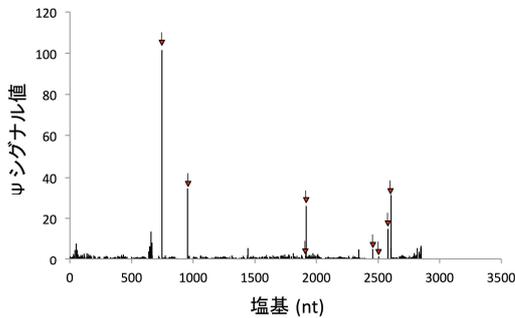


図5: 微量型Pseudo-seq法により検出された大腸菌23S rRNAのRNAシュードウリジン(Ψ)修飾化パターン
矢印: 大腸菌で報告されているシュードウリジン化修飾部位
Ψシグナル値: Pseudo-seqリード数より算出されたシュードウリジン修飾化の程度を示す値

(4) 有殻アメーバのRNAシュードウリジン化修飾部位の検出

有殻アメーバの Pseudo-seq 解析により、世界で初めて、一次細胞内共生進化の初期段階にある光合成オルガネラの RNA シュードウリジン化修飾部位の検出に成功した。その解析から近縁シアノバクテリア種にない有殻アメーバに特異的な RNA シュードウリジン化修飾部位も検出された (図6、赤矢印)。興味深いことに、16S rRNA に有殻アメーバ特異的な RNA 修飾がみつき、翻訳やリボソーム合成といった細胞にとって根幹をなす重要な生合成プロセスが、有殻アメーバのシアネレで改変されている可能性が示唆された。この結果は、「細胞内共生の過程でエピトランスクリプトームの改変が生じて、共生体の表現系を変化が生じる」という本研究の作業仮説にうまく合致する。

今回の解析では、RNA シュードウリジン化修飾修飾部位の同定は、rRNA を始めとする発現量の高い遺伝子に関してのみで可能であった。発現量の低い遺伝子については、Pseudo-seq で得られた配列のリード数が十分でなかったため、RNA 修飾パターンを解明できなかった。有殻アメーバのシアネレの RNA シュードウリジン化修飾パターンの全容を解明して、本研究の仮説を詳細に検証していくことは、今後の研究課題として残された。

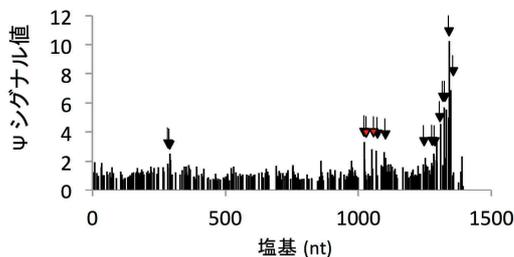


図6: 有殻アメーバ・シアネレの16S rRNAのシュードウリジン化修飾パターン
矢印: 検出されたシュードウリジン(Ψ)化修飾部位
赤矢印: 有殻アメーバに特異的なΨ化修飾部位

(5) 研究を進める過程で得た想定外の知見

有殻アメーバの RNA シュードウリジン化酵素遺伝子について解析を進めるにあたり、有殻アメーバゲノムのアノテーションを整備する必要があった。そのゲノム情報の基盤整備から、以下の二つの知見が得られた。

有殻アメーバゲノムに見られるウイルス感染の痕跡

Spliced leader 型 trans-splicing に関わる供与遺伝子(SL RNA) の特性

前者については、現在も解析を進めており、後者の発見については、Public online journal の一つ PLOS ONE に論文として投稿された (投稿中)。

(6) 国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

細胞内共生進化説においては、植物/藻類の葉緑体は 15 億年以上前にシアノバクテリアが始原植物細胞に取りこまれて誕生したと考えられているが、そのプロセスが、具体的にどのように進化したのかは、いまだによくわかっていない。その理由は、太古に生じた現象を知る上で必要な痕跡情報が、現存の植物、藻類においては長い進化の過程で失われており、その解析を行うことが困難だからである。一方、共生成立から僅か 1 億年しか経ていない有殻アメーバはそれらの情報をふんだんに保持している。本研究は、世界に先駆け、この有殻アメーバのオルガネラのトランスクリプトームの全容や核ゲノムの特性を明らかにして、これまで誰も知ることはできなかった一次細胞内共生進化の初期プロセスの一端を明らかにした。これらの発見は真核生物の進化の根幹を理解する上で重要な知見として国内外にインパクトを与えるだろうと推察する。

また RNA シュードウリジン化修飾に着目した解析は、有殻アメーバのゲノム解析を行ってきた我々のグループ独自のアイデアであり、世界を見渡しても類似するものがない極めてオリジナリティの高い研究である。本研究の Pseudoseq 解析で得られた結果は、これまで検証されてこなかった細胞内共生進化とエピトランスクリプトームの関係を示唆するもので、細胞内共生進化に関連する学術分野において、新しい研究の方向性を示すものと考えている。

最後に pseudoseq 解析を実施する上で、開発した 2 つの実験系「rRNA 除去法」「微量型 Pseudo-seq ライブラリ作成法」は、どちらも非モデル生物で、トランスクリプトーム解析や Pseudo-seq 解析を実施する上で重要な手法であると言える。特に Pseudo-seq 解析に関しては、モデル生物においても、大量の RNA を必要とする点や煩雑な実験手順が、研究を

進める上でのハードルとなっている。本研究で開発した新手法は、それらのハードルを低くすることから、哺乳類等のモデル生物の研究においても役立つと考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

松尾充啓、渦端篤、立川誠、水口洋平、野口 英樹、豊田敦、藤山秋佐夫、鈴木穰、中山卓郎、神川龍馬、野村真未、稲垣祐司、石田健一郎、小保方 潤一
有殻アメーバのゲノム解読による一次細胞内共生進化の初期プロセスの解析
日本植物学会第 81 回大会
2017 9 月 野田

松尾充啓、渦端篤、水口洋平、野口英樹、豊田敦、藤山秋佐夫、鈴木穰、佐藤壮一郎、中山卓郎、神川龍馬、野村真未、稲垣祐司、石田健一郎、小保方潤一

「真核光合成生物はどのように生まれたか?—光合成有殻アメーバのゲノム解析から見えてきた一次細胞内共生進化の初期プロセス」

第 19 回オルガネラワークショップ

2017 年 3 月 鹿児島

Mitsuhiro Matsuo, Atsushi Katahata, Soichirou Satoh, Motomichi Matsuzaki, Mami Nomura, Ken-ichiro Ishida, Yuji Inagaki and Junichi Obokata

Evolutionary roles of

SL-trans-splicing in the primary endosymbiosis.

The 13th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis.

2016 年 9 月京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 充啓 (Matsuo Mitsuhiro)
京都府立大学・生命環境科学研究科・特任助教

研究者番号：70415298

(2) 研究分担者

小保方 潤一 (Obokata Junichi)
京都府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：50185667

(3) 連携研究者

村上 明男 (Murakami Akio)
神戸大学・内海環境教育研究センター・准教授

研究者番号：50304134