

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 12 月 3 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010~2011

課題番号：22657025

研究課題名（和文）

原始真核生物を求めて：新奇真核微生物の形態・発現遺伝子・ミトコンドリアゲノム解析

研究課題名（英文）

Novel biflagellate TKB055 as a possible early-branch in the global eukaryotic phylogeny: studies on its morphology, transcriptome, and mitochondrial genome.

研究代表者

稲垣 祐司 (INAGAKI YUJI)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：50387958

研究成果の概要（和文）：

ディスコバ生物群は、単細胞真核生物からなる単系統群であり、4つのサブクレード、即ちヘテロロボサ類、ユーグレノゾア類、ヤコバ類、ツクバモナディダ類から構成される。ヤコバ類の一種である *Reclinomonas americana* のミトコンドリア (mt) ゲノムはもともと原始的な遺伝子構成を保持しているため、*R. americana* を含むディスコバ生物群は mt ゲノムの初期進化を考察する上で極めて重要な生物種であると考えられている。ツクバモナディダ類は *Tsukubamonas globosa* (TKB055 株) の発見と共に 2011 年に確立されたが、この時点ではディスコバ生物群内部で *T. globosa* の系統的 position は確定できなかった。本研究では、次世代シーケンス技術を用いた *T. globosa* のトランスクリプトーム解析を行い、そこから生成した配列データを基に 157 個のタンパク質 (アミノ酸) 配列をふくむ巨大アライメントを作製した。この 157 タンパク質アライメントによる系統解析では、姉妹群となるヘテロロボサ類とユーグレノゾア類の基部から *T. globosa* が分岐した。また、我々は *T. globosa* の mt ゲノムを完全解読することに成功した。*T. globosa* mt ゲノムは、全長 48,463 塩基対 (AT 含量 66.2%) の環状分子であり、52 個のタンパク質と 29 個の RNA をコードしていた今後 157 タンパク質系統解析により解明したディスコバ生物群内部の系統関係をもとに、*T. globosa* の mt ゲノムと他のディスコバ生物の mt ゲノムとを比較することにより、この生物群内部での mt ゲノムにおける遺伝子構成の進化を精度よく推測することが可能となる。

研究成果の概要（英文）：

Discoba (Excavata) is a unicellular eukaryotic assemblage that comprises four subgroups: Heterolobosea, Euglenozoa, Jakobida and Tsukubamonadida. This clade is especially important for understanding the early evolution of mitochondrial (mt) genomes, as the jakobid *Reclinomonas americana* retains the most ancestral (i.e. gene-rich) genome of any mt genomes determined to date. Amongst discobids, the Tsukubamonadida is the most recently established group and contains a single representative species (*Tsukubamonas globosa*; formerly known as the biflagellate strain TKB055) whose precise phylogenetic position within the Discoba has not yet been resolved. We conducted a pyrosequencing-based transcriptomic survey of *T. globosa* and, based on these data, we assembled a phylogenomic alignment of 157 proteins. Our phylogenomic analyses show that *T. globosa* branches at the base of the union of Euglenozoa and Heterolobosea. In addition, we completely sequenced the mt genome of *T. globosa* (48,463 bp in length and A+T content of 66.2%). The mt genome of *T. globosa* can be mapped as circular, and encodes 52 putative protein-coding and 29 RNA genes, indicating that *T. globosa* is second only to *R. americana* in terms of its coding capacity. The relationships amongst the major members of the Discoba clade inferred from the 157-protein phylogeny and their mt genome data enable us to elucidate the evolution of mt gene repertoires in this protist clade.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 生物多様性・分類

キーワード：ミトコンドリア、真核生物系統、原始真核生物、細胞内微細構造、EST 解析

1. 研究開始当初の背景

すべての真核生物の共通祖先がどのような細胞であったかを推定することは、真核生物の細胞やゲノム構造、生物活動と地球環境との関連等を考察する上で最も重要である。しかし、これまでの分子系統解析では真核生物の共通祖先、すなわち「根元」を決定するには至っていない。これまでの研究とは独立して、我々は細胞内小器官・ミトコンドリア(mt)が真核生物起源を推定するうえで重要であると考えている。mtは生命維持に必須な器官であるが、その起源は細胞内共生したバクテリアの一種であり、そのためバクテリア型のゲノムDNA(ミトコンドリアDNA: mtDNA)を保持する。mtは祖先真核生物で獲得されたと考えられるため、祖先真核生物に近縁な生物のmtDNAは祖先的な特徴を有している可能性が極めて高い。

真核微生物(原生生物)の1グループであるディスコバ生物群に含まれる*Reclinomonas*はゲノムサイズ・遺伝子数が最大である「祖先的」mtDNAを持ち、真核生物の根元に最も近い可能性が示唆されている(Langら *Nature* 1997 387:493-497)。従って、*Reclinomonas*以外にもディスコバ生物群は祖先真核生物を決定するための鍵となる生物を含むと考えられる。

我々が培養株として確立したTKB055株は、光学顕微鏡観察では所属不明真核微生物であった。TKB055株から5種の遺伝子を単離し系統解析を行った結果、TKB055株はディスコバ生物群の新奇系統であること、TKB055株がディスコバ生物群内で*Reclinomonas*よりも早く分岐したことが示唆された。

2. 研究の目的

本研究計画開始以前に行った5種の遺伝子配列に基づく系統解析では、TKB055株はディ

スコバ生物群の新奇メンバーであることを強く示唆した。そこでディスコバ生物群内部でのTKB055株の系統的な位置を確定し、さらにmtゲノムを完全解読し*Reclinomonas* mtゲノムと比較することで、原始真核生物細胞に関する知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)TKB055株の顕微鏡観察

TKB055株の光学顕微鏡観察、超薄切片の電子顕微鏡観察による細胞内微細構造の観察の詳細は、Yabukiら(2010 *Protist* 210(4):523-538.)に記述した通りである。

(2)網羅的発現遺伝子(EST)解析

精製したtotal RNAサンプルを基に作成したcDNAライブラリーを作成し、パイロシーケンシングを行った。最終的に約25万リード程度のデータを取得することに成功した。パイロシーケンシングデータの整理を行い、157遺伝子アライメントデータを作成した。最終的に系統解析に用いたPhylogenomicアライメントは60タクサ、41,372アミノ酸ポジションとなった。

(3)分子系統解析

157遺伝子アライメントはRAxMLをもちいた最尤法とPhyloBayesをもちいたベイズ法により解析した。最尤法にもちいた置換モデルはLGモデルを元にアライメント座位間での置換速度差をガンマ分布で補正し、アミノ酸頻度をデータから推定したLG+Γ+Fモデルを使用した。ベイズ法解析に用いた置換モデルは、アライメント座位間での置換速度差をガンマ分布で補正したCAT+Γモデルである。

最尤系統樹の樹形の信頼度は、ブートストラップ解析(100レプリケート)により評価した。またベイズ法による解析結果の信頼度は事後確率により評価した。

R. americana などの原始真核生物を含むと考えられこの生物群内で mt ゲノム遺伝子構成がどのように変遷してきたかを推測する手がかりを得ることができた。

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 1 件)

- ① Akinori Yabuki, Takeshi Nakayama, Naoji Yubuki, Tetsuo Hashimoto, Ken-ichiro Ishida, Yuji Inagaki.

Tsukubamonas globosa n. g., n. sp., a novel excavate flagellate possibly holding a key for the early evolution in "Discoba." 2011 *Journal of Eukaryotic Microbiology* 58(4):319-331. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ①第 31 回微生物系統分類研究会 (埼玉, 和光, 理化学研究所: 2011 年 11 月 25 日)

稲垣祐司、矢吹彬憲、神川龍馬。

新奇真核微生物からの大規模配列データで変貌し続ける、我々の真核生物大系統像 (国内・招待講演)

- ②International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (北海道, 札幌, 札幌コンベンションセンター: 2011 年 9 月 6-10 日)

Akinori Yabuki, Ryoma Kamikawa, Martin Kolisko, Sohta A. Ishikawa, Ken-ichiro Ishida, Alastair G. B. Simpson, Andrew J. Roger, Yuji Inagaki.

Tsukubamonas globosa is a deep-branching member in the Discoba clade: Morphology, phylogenomics, and mitochondrial genome. (国際・招待講演)

- ③ Meeting of Center for Comparative Genomics and Evolutionary Bioinformatics (Dalhousie 大学, ハリファックス, カナダ: 8 月 6 日)

Yuji Inagaki.

Recent progress in placing newly-discovered lineages of protists in the deep tree of eukaryotes. (国際・招待講演)

- ④18th meeting of International Society of Evolutionary Protistology (石川, 金沢, 金沢県立美術館: 2011 年 7 月 2-7 日)

Akinori Yabuki, Takeshi Nakayama, Naoji Yubuki, Tetsuo Hashimoto,

Ken-ichiro Ishida, Yuji Inagaki.

Tsukubamonas globosa gen. et sp. nov.; a novel excavate flagellate possibly hold a key for the early evolution in "Discoba". (国際・ポスター)

- ⑤第 5 回日本進化原生物研究会 (富山, 富山, 富山大: 2011 年 6 月 11-12 日)

神川龍馬、矢吹彬憲、Martin Kolisko、西村祐貴、石川奏太、石田健一郎、橋本哲男、Andrew J Roger、Alastair GB Simpson、稲垣祐司。

Tsukubamonas globosa の Phylogenomic 解析と部分的ミトコンドリアゲノム配列 (国内・ポスター)

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲垣 祐司 (INAGAKI YUJI)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号: 50387958