

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 12 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440188

研究課題名(和文) 菌類のエキソン、イントロン構造の進化機構の解明

研究課題名(英文) Studies on evolution of exons and introns in fungi

研究代表者

西田 洋巳 (Nishida, Hiromi)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：60301115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物のゲノムDNAはヒストン8量体に巻きつき、ヌクレオソームを形成する。本研究では、菌類のエキソン、イントロンにおけるゲノムDNAとヒストンの関連を調べた。まず、菌類のヒストンの等電点とゲノムの塩基組成には関連性は見られなかった。次に、エキソンおよびイントロンを比較したところ、エキソンではグアニン・シトシンに富み、ヌクレオソーム形成頻度が高く、イントロンではアデニン・チミンに富み、ヌクレオソーム形成頻度が低いことを明らかにした。また、菌類の種によって、ヌクレオソーム形成における塩基配列のパターンが異なることを示し、系統進化上近縁な菌類よりも、塩基組成に近い菌類に似ていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Eukaryotic chromosomal DNA binds to core histones (2 copies of H2A, H2B, H3, and H4 each), resulting in the formation of nucleosomes. The isoelectric point values of fungal histones were not clearly correlated with the chromosomal GC contents. Next, we showed that the frequency of the dinucleotide sequences AA (TT), AT, and TA in introns was more than that in exons. On the other hand, the frequency of CC (GG), CG, and GC in exons was more than that in introns. Among the other dinucleotides, some sequences had species-specific pattern. Enriched and depleted dinucleotides distribution of the archiascomycetous yeast *Saitoella complicata* around the midpoints of highly positioned nucleosome dyads was not similar to that of the phylogenetically close yeast but similar to the basidiomycete *Mixia osmundae*, which has similar genomic GC content to that of *S. complicata*.

研究分野：微生物インフォマティクス

キーワード：菌類 進化 エキソン イントロン 塩基組成 塩基配列 ヌクレオソーム 連続2塩基配列出現頻度

1. 研究開始当初の背景

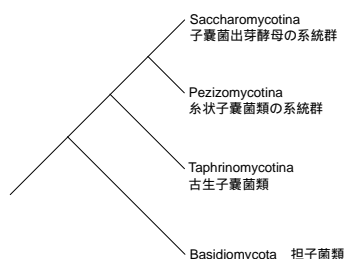
動物や植物の遺伝子におけるイントロンのサイズはエキソンよりも長い場合が多く、ゲノムサイズに占めるエキソン領域の割合は低い。これに対し、菌類においては100塩基程度の短いイントロンが大半を占めている。最近のゲノム塩基配列比較解析およびヌクレオソーム(ヒストン8量体とそれに巻きつくDNAの複合体)位置解析より、動物や植物においてはエキソン領域のグアニンおよびシトシン(GC)含量がイントロン領域よりも高く、ヌクレオソーム形成の頻度が高くなる傾向にあることが明らかにされた。

2. 研究の目的

本研究では、菌類のエキソン、イントロン構造における共通性および多様性について解析し、エキソン、イントロンの構造とヌクレオソーム形成およびDNA塩基配列パターンとの関連を解明し、菌類の系統進化に与えた影響を明らかにする。

菌類のゲノム情報は動物や植物に比べ充実しており、菌類の系統群間における比較を可能としている。本研究では、生活環において安定な2核相を持つ菌類を研究対象とした。これらの菌類は外生の有性胞子を形成する担子菌類(Basidiomycota)と内生の有性胞子を形成する子嚢菌類(Ascomycota)に系統進化上、分けられる。さらに、子嚢菌類は、糸状菌類を中心とした系統群Pezizomycotina、出芽酵母を中心とした系統群Saccharomycotina、それら2つの系統群が進化上分岐する以前に共通祖先より分岐してきた系統群Taphrinomycotinaの3系統群に分けられる。Pezizomycotinaのイントロンの平均サイズは70塩基程度と短く、他の系統群に比べて数は多いこと、Saccharomycotinaのイントロンの平均サイズは200塩基程度であり、数は極めて少ないことなどの特徴がある。しかし、Taphrinomycotinaに関するゲノム情報は分裂酵母*Schizosaccharomyces*属菌種に限られており、この系統群全体のゲノムの特徴は不明である。よって、本研究では、Taphrinomycotinaに属する*Saitoella complicata*に関するゲノム情報を得て、*Schizosaccharomyces*と比較することを目的の一つとした。

生活環に安定な2核相の時代を有する菌類の進化系統関係



3. 研究の方法

(1) 糸状子嚢菌類(Pezizomycotina) *Aspergillus* におけるエキソンおよびイントロンにおける連続2塩基配列出現頻度、ヌクレオソーム形成率が高い領域および低い領域における連続2塩基配列出現頻度を異なる3種(*A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. oryzae*)で比較した。連続2塩基配列解析は統計解析ソフトウェアRを用いて行った。

(2) ヒストンはアルギニンやリジンの塩基性アミノ酸に富み、等電点が高くなっている。ヌクレオソーム形成はDNAとヒストンの電気的相互作用が大きく関与していることより、菌類のヒストン(H2A, H2B, H3, H4)の等電点とゲノムDNA塩基組成(GC含量)に関連があるかどうかを確かめた。等電点は理論値を、Swiss Institute of BioinformaticsのExPASy ProtParamを用いて各ヒストンのアミノ酸配列に基づいて算出し比較した。

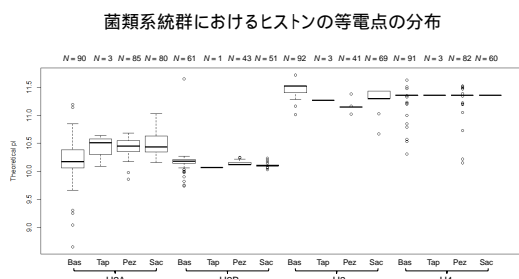
(3) 菌類の進化において重要な位置にある古生子嚢菌類(Taphrinomycotina) *Saitoella complicata* を研究対象とし、ゲノム支援のもと、そのゲノム塩基配列を決定した。その後、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチンA(TSA)を異なる濃度(1, 2, 3 μg/mL)で処理した際のRNAマッピングを行った。また、TSAの有無(0, 3 μg/mL)によるヌクレオソーム形成の違いを探るため、TSA有無の状態におけるヌクレオソームDNA断片を取得し、それらの塩基配列を決定し、ヌクレオソーム形成位置を明らかにした。これらのデータと同じ古生子嚢菌類である分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*のヌクレオソーム位置形成と塩基配列の関係を比較した。

4. 研究成果

(1) 3種の*Aspergillus*において共通なこととして、連続2塩基配列AA(TT), AT, TAはイントロンの方がエキソンよりも出現頻度が高く、CC(GG), CG, GCはエキソンの方がイントロンよりも出現頻度が高かった。また、その他の連続2塩基配列については種間で違いがあったものがあつた。また、ヌクレオソーム密度が高い領域とエキソン、低い領域とイントロンの出現頻度パターンが類似していた。これらのことより、エキソン領域はイントロン領域に比較して、GC含量が高く、ヌクレオソーム密度が高くなっていることが明らかとなった。

(2) 菌類の系統群によってゲノムDNAのGC含量の分布が異なっており、担子菌類およびPezizomycotinaのGC含量が高く、SaccharomycotinaおよびTaphrinomycotina(*Schizosaccharomyces*)は低いことを明らかにした。また、ヒストンH3およびH4の等電点はH2AおよびH2Bに比べより高くな

っていた。ゲノム GC 含量の系統群における偏りと同じような偏りが見られるヒストンの等電点の分布はなく、菌類のヒストンの等電点とゲノム DNA の塩基組成に直接的な関連はないことを明らかにした。



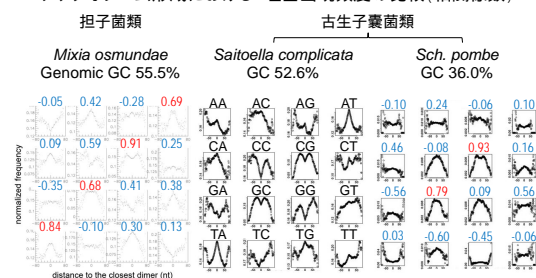
(3) *S. complicata* のゲノム DNA シークエンスにより、104 コンティグ (N50, 239 Kbp) 全長 14.1 Mbp を決定、公開した (BACD03000001-BACD03000104)。これは古生子菌類 (Taphrinomycotina) において、*Schizosaccharomyces* 属菌種以外で初めてのゲノム情報となる。また、RNA マップ情報を考慮し、6933 のタンパク質コード領域、7119 の転写ユニットを明らかにし、公開した (GAO45749.1-GAO52867.1)。ゲノム塩基配列および遺伝子注釈付けによって、エキソン領域 ($n = 20524$) の平均 GC 含量が 52.4%、イントロン領域 ($n = 13591$) の平均 GC 含量が 48.0% であることがわかった。

ヌクレオソームを形成している DNA 断片における連続 2 塩基配列出現頻度プロファイル (ゲノムシグネチャ) を比較したところ、*S. complicata* は *Sch. pombe* と大きく違っていることを明らかにした。*S. complicata* のそれは、担子菌類である *Mixia osmundae* の連続 2 塩基配列の出現頻度プロファイルの方に類似していた。この結果は、ヌクレオソーム形成は各真核生物種で高度に維持されており、進化系統上近縁な生物種間であってもその制御が異なっていることを示している。*S. complicata* のゲノム GC 含量が 52.6% であり、*Sch. pombe* の 36.0% と大きく違っており、*M. osmundae* の 55.5% に近いことと関連があると考えられ、生物系統よりもゲノム塩基組成の方にヌクレオソーム形成が強く関連していることを示唆している。

TSA 濃度が 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の場合には、明らかな出芽異常が顕微鏡により観察されたにもかかわらず、TSA 濃度依存的に遺伝子発現が 25% 以上増加した遺伝子数は 154、減少した遺伝子数は 131 と極めて少なかった。これら遺伝子発現に変化が生じた遺伝子におけるヌクレオソーム位置の変化もほとんど見ることができなかった。翻訳開始上流 300 塩基領域における TSA なしの条件と 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の条件でのヌクレオソーム位置プロファイルが相関係数 0.4 以下であった遺伝子が増加遺伝子中 20 (13%)、減少遺伝子中 22 (16.8%) であった。他方、相関係数 0.8 以上の類似パ

ターンであったものは、増加遺伝子の 38.3%、減少遺伝子の 44.3% と、いずれも位置プロファイルが変化したものよりも多い結果であった。また、TSA 濃度が 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のときのヌクレオソーム形成領域の連続 2 塩基配列プロファイルとコントロールを比較しても顕著な違いは見られなかった。これらのことは、ヒストンアセチル化の亢進によるヌクレオソーム形成変化は極めて限られており、*S. complicata* におけるヌクレオソーム形成パターンは高度に保存、維持されていることを示している。

ヌクレオソーム形成における 2 塩基出現頻度の比較 (相関係数)



5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件、すべて査読あり)
Yamauchi K, Kondo S, Hamamoto M, Suzuki Y, Nishida H (2016) Genome-wide maps of nucleosomes of the trichostatin A treated and untreated archiascomycetous yeast *Saitoella complicata*. AIMS Microbiology 2, 69-91.

Yamauchi K, Kondo S, Hamamoto M, Takahashi Y, Ogura Y, Hayashi T, Nishida H (2015) Draft genome sequence of the archiascomycetous yeast *Saitoella complicata*. Genome Announcements 3, e00220-15.

Nishida H (2015) Relationship between chromosomal GC content and isoelectric points of histones in fungi. Journal of General and Applied Microbiology 61, 24-26.

Nishida H (2014) Conserved and varied dinucleotide sequences in the genomes of three *Aspergillus* species. Recent Advances in DNA & Gene Sequences 8, 10-14.

[学会発表] (計 4 件)
山内健太, 居島冨香, 近藤伸二, 西田洋巳; 菌類ヌクレオソーム形成と DNA 塩基配列; 第 10 回日本ゲノム微生物学会; 東京; 2016 年 3 月 5 日

山内健太, 近藤伸二, 浜本牧子, 鈴木穰, 西田洋巳; 古生子菌類 *Saitoella complicata* の RNA マップ解析およびヌクレオソームマッ

プ解析; 2015 年度日本農芸化学会中部・関西
支部合同大会; 射水; 2015 年 9 月 20 日

西田洋巳; 菌類におけるエキソン、イントロ
ン、塩基組成とヌクレオソーム形成; 日本農
芸化学会 2014 年度大会 シンポジウム「微生
物ゲノム設計の時代に塩基組成の機能と進
化を再考する」; 川崎; 2014 年 3 月 30 日

西田洋巳; 菌類のヌクレオソームマップ解析
から見えること; 第 6 回北陸合同バイオシ
ンポジウム; 七尾; 2013 年 11 月 9 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/microbioinformatics/home/fungal-nucleosome-database>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西田 洋巳 (NISHIDA, Hiromi)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号 : 60301115