

カタブレファリス類 *Roombia* sp. のミトコンドリアゲノムの解読

平澤 輝仁 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 橋本 哲男 (筑波大学 生命環境系)

目的と背景

真核生物は、細胞内共生した α プロテオバクテリアを起源とするミトコンドリア (mt)、もしくは mt 関連オルガネラを持つ。mt ゲノムのサイズは、 α プロテオバクテリアのゲノムサイズに比べはるかに小さいため、オルガネラ化の過程で強い縮小圧が働いたと考えられる。また真核生物系統間で、mt ゲノムにコードされる遺伝子の構成やその構造に大きな多様性があることが分かっている。mt ゲノム進化中では縮小圧が定常的に働いてきたと考えられるが、mt ゲノムでは配列内にタンパク質 (IEP) をコードした転移性イントロンの獲得と喪失が繰り返されていることが明らかとなりつつある。従って、mt ゲノムの進化はこれまで考えられてきたような縮退のみのシンプルなものではないと考えるべきである。本研究室では、これまでにカタブレファリス類 *Leucocryptos marina* における mt ゲノム断片配列を決定し、その cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) 遺伝子に菌類由来グループ I (gI) イントロンが挿入されていることを明らかとした。しかし、本イントロンがカタブレファリス類の共通祖先で獲得されたものであるのか、*Leucocryptos* において近縁種から分岐後に獲得されたのかは不明であった。そこで本研究では、同じくカタブレファリス類の一種 *Roombia* sp. の *cox1* 遺伝子構造を明らかとし、カタブレファリス類の *cox1* イントロン進化の理解を深めることを目的として実験を行った。

方法と材料

本研究室で確立された *Roombia* sp. のトランスクリプトームデータのコンティグ配列に対してカタブレファリス類に近縁であるクリプト藻類 *Rhodomonas salina* および *Hemiselimis andersenii* の mt 遺伝子配列をクエリとして相同性検索を行い、*cox1* 遺伝子転写産物配列を決定した。本トランスクリプトームデータ中のコンティグ配列が正しいことを確認するため、以下の手順で実験を行った。

URO+UY 培地、20 °C で培養した *Roombia* sp. 細胞から、CTAB 法によりゲノム DNA (gDNA) を抽出した。RNA の抽出には TRIzol Reagent を用いた。RNA の逆転写反応には SuperScript II 及びランダムヘキサマーを用いた。gDNA 及び cDNA を鋳型として、上述のコンティグ配列から作成した exact match primer を用い遺伝子配列の増幅を行い、増幅産物はクローニング後塩基配列を決定した。gDNA 及び cDNA から増幅された塩基配列を比較することでエキソン領域およびイントロン領域を同定した。

結果と考察

本研究により *Roombia* sp. の *cox1* 遺伝子配列約 26 Kbp を解読した。本配列断片は合計約 1.3 Kbp のエキソン領域と、合計約 25 Kbp のイントロン領域で構成されていた。本遺伝子には 13 個のイントロンが含まれており、cDNA 配列との比較結果から、すべてのイントロンについてスプライシングが正常に機能していることが確認された。同定された 13 個のイントロンはすべて、グループ II (gII) イントロンに特徴的な末端コンセンサス配列と、gII イントロンのスプライシングに重要なステム/ループ構造を取りうる領域を持つため、gII イントロンであると考えられる。*Roombia* sp. *cox1* 遺伝子には gI イントロンは挿入されておらず、近縁種である *Leucocryptos* が有する *cox1* gI イントロンは、*Leucocryptos* が *Roombia* から分岐した後に獲得されたと考えるのが妥当である。13 個のイントロンのうち、10 個はそれぞれ一つずつイントロンコードタンパク質 (IEP) を有しているが、5'側から 2 番目と 13 番目のイントロンは IEP を持たず、4 番目のイントロンは IEP を 2 つ持つことが分かった。mt ゲノム解析が進んでいる菌類以外では、mt ゲノム上の 1 つの遺伝子中に 13 個ものイントロンを持つ例は珍しく、これらのイントロンの大部分、もしくは全てが水平転移によって獲得したと考えられる。現在、挿入部位の比較解析や IEP を用いた系統解析を行っており、それらの起源を決定することを試みている。