

クリプチスタ生物群におけるシトクロム *c* 成熟系の複雑な進化 : *Hemiarma marina* ミトコンドリア ゲノムに基づく一考察

曾根原 奎斗 (筑波大学 生物学類)

指導教員 : 稲垣 祐司 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

シトクロム *c* 成熟系とは、シトクロム *c* に錨体であるヘムを付加する仕組みである。生物界には起源の異なる複数のシトクロム *c* 成熟系が存在する。細菌で詳細な研究が進んでいる「システム I」と呼ばれるシトクロム *c* 成熟系は複数の Ccm タンパクから構成される。ヘムは CcmABCDE 複合体と結合し、その後 CcmFHI 複合体に受け渡され、CcmF によりヘムがアポシトクロム *c* へ付加されホロシトクロム *c* が生成される (参考文献 1)。一方「システム III」は、真核生物特異的シトクロム *c* 成熟系であり、主に酵母で研究が進んでいる。システム III では CCHL と呼ばれる単一のタンパク質がヘムとアポシトクロム *c* を結合するとされるが、詳細な仕組みについてはまだ解明されていない (参考文献 2)。

真核生物ではシステム I と III が相補的に分布しており、両システムをもつ真核生物は今のところ 1 種しか知られていない (参考文献 3)。システム I をもちいる生物種では CcmA-D および F (あるいはそのサブセット) はミトコンドリア (mt) ゲノムにコードされているが、CCHL タンパクは核ゲノムコードである。ミトコンドリアの起源となった α プロテオバクテリアはシステム I をもつため、真核生物のシステム I はミトコンドリアの起源となった細菌共生体から伝播したと考えられる。一方、システム III は原核生物には見つからないため、システム III は真核生物の進化中に確立したと考えるのが妥当である。

真核生物の主要系統の 1 つであるクリプチスタ生物群は、クリプト藻類、ゴニオモナス類、カタブレファリス類、*Palpitomonas bilix*、*Hemiarma marina* から構成される。*P. bilix* 以外のクリプチスタ系統ではシステム III を使用するが、*ccmABCDF* 遺伝子をふくむ mt ゲノムをもつ *P. bilix* はシステム I をもつ (参考文献 4)。*P. bilix* はクリプチスタ生物群の最原始系統であるため、*P. bilix* のもつシステム I は原始的の形質で、他の系統がシステム I から III に切り替えたことと提唱された (参考文献 4)。しかし、祖先的クリプチスタ生物ではシステム I と III が共存し、各系統が分岐した後どちらかのシステムが消失した可能性も否定できない (参考文献 4)。

本研究では、クリプチスタ生物群を構成する *H. marina* の mt ゲノムを完全解読した。興味深いことに、この mt ゲノム中に *ccmA*, *B*, *C* および *F* 遺伝子が同定されたため、クリプチスタ生物群におけるシステム I の進化を再検証した。

方法

1. *Hemiarma marina* SRT149 のミトコンドリア DNA の決定

本研究室で Illumina 社 Mi-seq をもちいて取得した Genome-seq データ (合計約 12.6 G 塩基) を metaSPAdes によりアセンブルし、41,539 コンティグを得た。このコンティグデータから各種 BLAST を用いた相同性検索により、mt ゲノムにコードされる典型的な遺伝子を含む約 17 kb と 48 kb の 2 コンティグを同定した。これらのコンティグの両末端に PCR プライマーを設計し、増幅産

物が得られた。従って、上記 2 コンティグが 1 つの環状 DNA 分子を形成することを確認した。決定した *H. marina* mt ゲノムの塩基配列は MFannot によりアノテーションした。

2. Ccm タンパク質の分子系統解析

クリプチスタ生物群におけるシステム I の進化を推測するため、CcmA, CcmB, CcmC および CcmF 配列について分子系統解析を個なした。原核生物の Ccm 配列データは、主要系統群毎にランダムに 2 種ずつ KEGG データベースから抽出した。真核生物 (mt ゲノムにコードされる) Ccm タンパク質は、ヤコバ類の 1 種である *Andalucia godoyi* 配列をクエリとした GenBank nr データベースに対する BLASTP により取得した。

4 種類の Ccm タンパク質配列 (本研究で取得した *H. marina* ホモログを含む; 結果と考察参照) を MAFFT によりアライメントした。trimAI で系統解析にふさわしくない座位を除去した後、4 つのアライメントデータそれぞれから IQ-TREE をもちいて最尤系統樹を推測した。最尤系統樹中の各分岐に対する信頼度は、IQ-TREE をもちいた Ultrafast Bootstrap 法により評価した。

結果と考察

H. marina mt ゲノムは 65,262 bp の環状 DNA であることが判明した。詳細は省くが、*H. marina* mt ゲノムの遺伝子レパートリーは、他のクリプチスタ生物の mt ゲノムの遺伝子レパートリーに類似していたが、*ccmA*, *ccmC* および *ccmF* 遺伝子を含んでいた。一方、*H. marina* のトランスクリプトームデータ中に CCHL 遺伝子の転写物は検出できなかった。以上の結果を総合すると、*H. marina* はシトクロム *c* 成熟系にはシステム I を使用していると考えられる。

クリプチスタ生物群のうちシステム I をもつのは *P. bilix* と *H. marina* であるが、*H. marina* は *P. bilix* よりもシステム III をもちいるクリプト藻類やゴニオモナス類と近縁である。そこで *P. bilix* と *H. marina* でもつシステム I が同一起源かどうかを検証するため、4 つの Ccm タンパク質の分子系統解析を行った。いずれの解析でも、*P. bilix* 配列と *H. marina* 配列間に明確な近縁性は復元できなかった。この結果からはクリプチスタ生物群におけるシステム I の進化がどのように起こったのか結論を出すことはできないが、本生物群におけるシトクロム *c* 成熟系の進化は我々の予想以上に複雑である可能性が高い。

参考文献

- C. Sanders *et al.* (2010), Trends Microbiol, 18(6), pp.266-274
 J.W.A.Allen (2011), The FEBS Journal, Volume 278, Issue 22, pp.4198-4216
 J. Janouskovec *et al.* (2017), Current Biology, Volume 27, Issue 23, pp.3717-3724
 Y. Nishimura *et al.* (2016) Genome Biology and Evolution, Volume 8, Issue 10, pp.3090-3098