

真核生物におけるファミリーA タイプ DNA ポリメラーゼの多様性と分布：新たなタイプの ミトコンドリア DNA ポリメラーゼ同定を目指して

原田 亮 (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)

Introduction

ミトコンドリアおよび色素体は細胞内共生によって獲得された細胞内小器官であり、核とは別の独自の DNA をもつ。そのため、ミトコンドリア DNA をもつ真核生物はミトコンドリア DNA 複製のための DNA ポリメラーゼをもつ。

DNA ポリメラーゼは配列の類似性に基づき、数個のファミリーに分類される。その中のファミリーA にはバクテリアの DNA ポリメラーゼ I や真核生物の DNA ポリメラーゼ θ (シータ) などが含まれている。また、このファミリーA の中には DNA ポリメラーゼ γ (PolG), POP (Plant and Protist Organellar DNA Polymerase), PREX (Plastid replication and repair enzyme complex) などのミトコンドリアや色素体で DNA 複製を行うポリメラーゼが含まれている。

これまでに研究が進んでいる菌類・後生動物では PolG が、光合成真核生物・一部の原生生物では POP がミトコンドリア DNA を複製していることが判っている。しかし、これまで研究されてきたのは真核生物の一部の系統のみであるため、真核生物中に 2 種類のミトコンドリア DNA ポリメラーゼ (mtDNApol) がどのように分布しているのか、それぞれがいつ出現したのか等は理解できていない。

本研究ではファミリーA タイプ DNA ポリメラーゼを系統的に広範な真核生物、特に非光合成原生生物に対する探索と系統解析を行うことで、mtDNApol の多様性と分布を解明することを目的とした。

Methods

1. ファミリーA タイプ DNA ポリメラーゼのホモログ配列収集
大腸菌 (*E. coli*) の DNA ポリメラーゼ I の DNA polymerase ドメイン配列を問合せ配列とし、NCBI nr (non-redundant protein sequences) データベースに対して生物種を指定した相同性検索を行った。

さらに NCBI nr データベースに登録されているタンパク質では不十分な生物については NCBI SRA (Short Read Archive) から大規模シーケンスデータを取得した。これらのトランスクリプトームデータは sra-toolkit v2.8.2 および fastp v0.19.5 による処理の後、Trinity v2.8.4 によって *de novo* アセンブリを行い、mRNA コンティグ配列を作成した。このコンティグ配列に対しても大腸菌の DNA ポリメラーゼ I の DNA polymerase ドメイン配列を問合せ配列とし、相同性検索を行った。

その結果得られた配列を、POP に関する先行研究 (Moriyama T, *et al.* 2008) で使用されたファミリーA タイプ DNA ポリメラーゼのデータセットに加えた。

2. 系統解析

1 で得られたデータセットを MAFFT v7.407 を用いてアライメントし、trimAI v1.4 を用いて保存されている領域だけを切り出した。IQ-TREE v1.6.1 によって LG+G4 モデルを用いて ML 系統樹を作成した。さらに 100 回のリサンプリングによるブートストラップ解析も行った。

Results and Discussions

相同性検索による探索の結果、PolG は菌類・動物以外のオピストコンタからも見つかったが、オピストコンタの近縁種からは見つからなかった。このことから PolG はオピストコンタの共通祖先で獲得されたと考えられる。また、POP は非光合成生物でもある程度保存されていることが分かった。

系統解析の結果、PolG, POP, PREX など既知の mtDNApol は単系統を形成し、ブートストラップ解析においても高い支持を得た。バクテリアの DNA ポリメラーゼ I は完全な単系統にはまともならず、いくつかの真核生物由来の配列もバクテリアの配列と共にクレードを形成した。この真核生物由来の配列についてまずはバクテリア由来の配列の混入を疑い、NCBI nr データベースに対する相同性検索を行い、混入配列と考えられるものは削除した。しかし、NCBI nr データベースに登録されているバクテリアとは明らかな相同性をもたない配列が *Discoba*, *Malawimonadida*, *Ancyromonadida* に含まれる生物種から見つかり、その単系統性は高いブートストラップ値で支持された。*Discoba* は *Excavata* の一群だが、*Malawimonadida*, *Ancyromonadida* は *Orphans* と呼ばれる系統的な位置が分かっていない生物群である。これらの原生生物から POP など既知の mtDNApol は見つからなかった。完全長だと考えられる配列の N 末端にはミトコンドリア輸送シグナルが予想されたことから、これらの DNA ポリメラーゼはミトコンドリアに輸送される可能性が高い。以上のことよりこれらの上記 3 系統はこれまで認識されていなかった新しいタイプの mtDNApol を使用していることが示唆された。

本研究で新たなミトコンドリア DNA ポリメラーゼ候補の存在が示唆された。またこの新規 mtDNApol が *Discoba*, *Malawimonadida*, *Ancyromonadida* の共有派生形質だとすると、上記 3 系統はこれまで認識されていなかった大系統を形成することになる。今後新規 mtDNApol が (1)他の原生生物系統に保持されていないか、(2)実際にミトコンドリアにタンパク質が局在するのを実験的に確かめる必要がある。

参考文献

Moriyama T, *et al.* (2008) FEBS Journal, 275: 2899-2918.