

古細菌ゲノムに散在する可動性イントロンの集団内伝播と進化のダイナミクス

●野村 紀通

京都大学大学院農学研究科

＜研究の目的と進め方＞

ゲノムにおけるイントロンの存在意義とイントロンの進化史については未だ数多くの謎が残されている。我々は古細菌のゲノム比較解析の結果、一部の古細菌イントロンがゲノム間を水平伝播する可動遺伝因子（可動性イントロン）であることを明らかにした。本研究の目的は、古細菌可動性イントロンの水平伝播を司る分子機構を実験的に提示することである。具体的には、(1) 可動性イントロンの水平伝播過程に関与する因子のゲノム規模での同定、ならびに (2) 自然環境の古細菌群集における可動性イントロンの分布パターンと出現頻度の解析、という二点からのアプローチを試みる。

＜研究開始時の研究計画＞

可動性イントロンの伝播過程は、自身の内部にコードされるDNAエンドヌクレアーゼ (homing endonuclease; HEase) によるゲノム上の二重鎖切断(DSB)を契機として開始される。これをふまえて下記の実験を計画した。

- (1) HEaseと協調して働く因子群のゲノム規模での同定
- (2) HEase-標的DNA複合体のX線結晶構造解析 (可動性イントロンはいかにして転移標的を選択するのか)
- (3) HEase遺伝子をコードする古細菌可動性イントロンの自然界での分布パターンの解析

＜研究期間の成果＞

1. 古細菌rRNA遺伝子イントロンは「動く」遺伝因子である
本研究を開始する時点で既に、*A. pernix* K1の16S-23S rRNA遺伝子領域に3つのイントロン I α , I β および I γ が存在することが知られていた。そこでこの知見を敷衍し、*A. pernix* 種内の近縁株 (11株) を含む約60株の古細菌におけるrRNA遺伝子イントロンの分布を体系的に解析した結果、古細菌界全体としてイントロン挿入パターンに次のような規則性があることを見出した (図)。

- (1) イントロンは、*Aeropyrum*属、*Desulfurococcus*属、*Thermoproteus*属、*Pyrobaculum*属などのCrenarchaeota門の古細菌株から検出される。一方、Euryarchaeota門に属する菌株からイントロンは見い出されない。またイントロンを有する菌株はいずれも海底熱水口や温泉に生息する超好熱菌である。

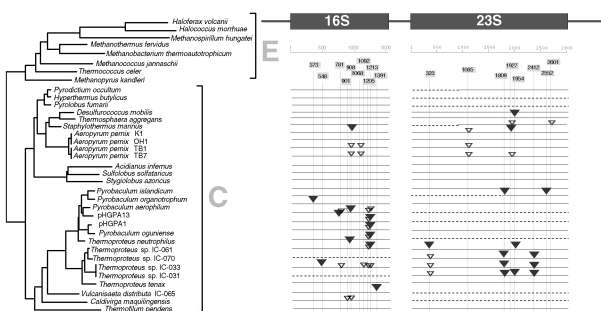


Fig. Distribution of the known rDNA introns within the domain Archaea. Triangles in the schematic diagrams on the right panel indicate the insertion positions of introns relative to the *E. coli* rRNA. Filled and open triangles denote ORF-possessing and ORF-less introns, respectively. Dotted lines indicate unanalysed portions of the rRNA genes. To the left of these diagrams is juxtaposed the neighbor-joining tree based on the 16S rRNA sequences.

Fig. Distribution of the known rDNA introns within the domain Archaea. Triangles in the schematic diagrams on the right panel indicate the insertion positions of introns relative to the *E. coli* rRNA. Filled and open triangles denote ORF-possessing and ORF-less introns, respectively. Dotted lines indicate unanalysed portions of the rRNA genes. To the left of these diagrams is juxtaposed the neighbor-joining tree based on the 16S rRNA sequences.

- (2) イントロン挿入部位はrRNA遺伝子領域内部の19か所の特定部位 (ホットスポット) に集中している。
- (3) イントロンの有無は生物種の系統関係とは合致せず、同一種近縁株間であっても複数の異なるイントロン挿入パターンが存在しうる。この著しく多様性に富むイントロン挿入パターンの形成機序は、単に『祖先型遺伝子にすべてのイントロンが存在し、進化の過程で一部のイントロンが逐次欠失した』という仮定のもとでは合理的に説明できない。
- (4) イントロン領域の塩基配列比較に基づいて、同一部位に挿入されているイントロンは進化的に同一起源を有することが示唆される。

以上から、これらの古細菌rRNA遺伝子イントロンがゲノム間を部位特異的に水平伝播する遺伝因子 (可動性イントロン) であると結論づけた。

2. 古細菌rRNA遺伝子イントロンはどのようにして転移するか? : 転移過程においてホーミングエンドヌクレアーゼが果たす役割

1. で述べたrRNA遺伝子イントロン (計57個) の約半数には、その内部にORF (open reading frame) 領域が存在した。これらのORF産物のアミノ酸配列における機能モチーフを情報学的に検索したところ、いずれもホーミングエンドヌクレアーゼ (homing endonuclease; HEase) に特徴的なLAGLIDADGモチーフを有していた。このうち *A. pernix* K1の二つのイントロンORF をモデルとして選び、それらより産生される蛋白質を*E. coli* 発現系を用いて調製機能解析を行った。その結果、16SrRNA遺伝子イントロンI α (*ApeK1.L908*)の内部ORF産物 I-ApeI は、5'-GCAAGGCTG⁺AAAC⁺↓TTAAAG-3' (↓は+鎖, ^は一鎖の切断末端) の19 bpからなる非回文配列DNAを特異的に認識し二重鎖切断を導入する活性をもつ単量体酵素であった。同様に、23S rRNA遺伝子イントロンI γ (*ApeK1.L1927*)の内部 ORF 産物 I-ApeII は、5'-CTGACTCTC⁺TTAA⁺↓GGTAGCCAA-3' (↓は+鎖, ^は一鎖の切断末端; 下線部は回文座位) の22bpの偽回文配列を認識・切断するホモ二量体のエンドヌクレアーゼであった。これらの二つのエンドヌクレアーゼの切断部位は、上記のイントロン挿入ホットスポットとほぼ一致した。

I-ApeI および I-ApeIIのエンドヌクレアーゼ活性は *A. pernix* K1株細胞からも検出された。さらに I-ApeI 蛋白質を、ゲノム上にイントロン I α を持たない *A. pernix* OH2株の生細胞内に電気穿孔法により強制導入するとゲノムDNA が I α 挿入部位で切断されることが観察され

た。以上の結果から、rRNA遺伝子イントロンの内部ORFは古細菌細胞内でも発現しており、ORF産物は細胞内の生理条件下でDNAエンドヌクレアーゼとして機能していることが示された。

これらを考慮すると、古細菌 rRNA遺伝子イントロンはHEaseによるゲノム二本鎖切断を契機としてホーミング機構により転移すること、天然の熱水環境中において古細菌可動性イントロンのゲノム間転移が頻繁に起こっていること、の二点が強く示唆される。HEaseはイントロン挿入部位を認識・切断するため、可動性イントロンの転移標的を規定する因子（転移標的セレクト）としての役割を果たすものと考えられる。

3. ホーミングエンドヌクレアーゼ I-ApeII の標的DNA分子認識機構

それでは、HEaseは膨大なゲノム塩基配列の中からどのようにして標的 DNA 配列を見つけ出すのだろうか。I-ApeI, I-ApeII の立体構造をホモロジーモデリング法による *in silico* 解析に供した結果、(i) ともに $\alpha\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha$ の二次構造要素で構成されるドメイン二つからなること、(ii) I-ApeI では構造の異なる二つのドメインが分子内会合して単量体酵素を形成しているのに対し、I-ApeII ではドメインがサブユニットに相当し、構造的に同一なドメインが二つ会合することによりホモ二量体を形成することが予測された。I-ApeI, I-ApeII がそれぞれ非回文配列、偽回文配列を認識するという特徴の差異が生ずる原因は、『認識配列の半分に対してHEaseのドメイン一つが相互作用する』と仮定することで矛盾なく説明できる。そこでHEaseの単一ドメインとDNAとの間の相互作用様式を生化学的に解析するためのモデルとしてホモ二量体酵素 I-ApeII を用い、認識配列内に種々の一塩基置換または多重塩基置換を導入した変異基質に対するI-ApeIIの切断効率を体系的に測定した結果、標的DNA分子認識に関して次のような知見を得た。

- (1) 認識配列内部のすべての座位について野生型塩基を他の三種の塩基に置換した各変異基質（66種）を用いた検討から、I-ApeII が認識配列内部の多くのSNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) に対して寛容であることがわかる。但し、野生型以外の塩基では I-ApeII により切断されなくなる座位 (L/R1, L/R2, L/R3, L/R4) も存在し、これらの座位は I-ApeII / 標的DNAの分子間相互作用において特に重要であることが示唆される。以上の結果から、I-ApeIIは認識配列内に位置する全ての塩基を等しい厳密さで認識するのではないと言える。
- (2) 野生型基質における非回文座位の塩基種の組み合わせにより、I-ApeIIと標的DNAとの相互作用の強さが顕著に変化する。とくにL/R4とL/R8、またはL/R4とL/R5の二つの座位に対して同時に二重塩基置換を導入した場合、一塩基置換に比べて切断効率が相乗的に低下または上昇する。
- (3) 野生型基質における回文座位に位置する一対の塩基について、回文構造は保ったままで他の塩基種に置換した変異基質は I-ApeIIによりほとんど切断されない。したがってこれらの回文座位では、単に回文構造が認識されているのではなく塩基の種類自体が認識されていると考えられる。
- (4) 認識配列の同定の過程で、I-ApeIIが細胞性粘菌 *Physarum polycephalum* 由来のHis-Cys box 型HEase, I-PpoIとイソシゾマー (isoschizomer; 認識配列と切断部位が同じエンドヌクレアーゼ) の関係にあることを偶然見出した。両者のアミノ酸配列の一致率は

11.6%であり、構造モデリングの結果からも互いに異なる立体構造をもつと考えられる。上述の一連の変異型基質を用いた検討の結果、I-PpoIの標的DNA認識様式はI-ApeIIのそれと異なることが判明した。これは、同一のDNA配列に対して異なる複数の分子認識様式が存在していることを見出した最初の例であり、今後構造生物学的な側面からHEase /DNA相互作用を探究する上で重要なモデルになると考えられる。

以上の結果から、I-ApeIIは認識配列内の部分的変異に対する寛容性を高めて、フレキシブルに標的DNA分子を認識していることが明らかになった。HEaseのこのような性質は切断可能な標的DNA配列のバリエーションを増やすことに繋がり、結果的に可動性イントロンが水平伝播できる生物種の範囲を広くするという戦略に寄与していると考えられる。

4. HEaseと協調して働く細胞内因子の同定

古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来のHEase, I-ApeIがスプライシング後のイントロン I α RNA鎖とその他約30個のタンパク質とともに45Sのリボ核タンパク質(RNP)複合体を形成することを明らかにした。

5. 新規HEaseの同定およびX線結晶構造解析

古細菌 *Thermoproteus* sp. IC-061株イントロン由来のHease, I-Tsp061Iの結晶について空間群R32, 格子定数 $a=b=95.4\text{ \AA}$, $c=192.2\text{ \AA}$, 到達分解能2.3 \AA のX線回折データを得た。多波長異常分散法によってI-Tsp061Iの精密立体構造を解析することに成功し、その原子座標をPDBに登録した (Accession No: 1VAW)。静電ポテンシャル解析からI-Tsp061I分子におけるDNA結合表面の構造を特定した。

<国内外での成果の位置づけ>

出芽酵母、単細胞緑藻、粘菌、ファージなどの微生物ゲノムにも可動性イントロンの水平伝播の痕跡がみられ、Belfort (ワズワース医療センター, NY), Dujon (パストゥール研究所), Lambowitz (テキサス大)らが研究を進めている。本研究の成果は可動性イントロンの起源と進化を考える上でも重要である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

HEase-基質DNA複合体の結晶生成条件は未だ確定できていない。基質DNA分子の長さ(サイズ)を変化させる等、今後より広い範囲の条件検索(約500条件)を試みる必要がある。

RNPのより効率的な精製のために今後、カラムクロマトや超遠心のみではなく免疫沈降を試す(そのための抗I-ApeI抗体は調製済)。

<今後の課題>

- (1) 本研究で見いだしたRNP複合体の構成因子の全同定を行い、*A. pernix*ゲノム配列データに基づいて遺伝子を同定する。因子群のそれぞれについて遺伝子破壊を行い表現型を解析することにより、RNP複合体の機能を解明する。
- (2) 可動性イントロンの伝播が接合を介して起こることを実験的に証明する。イントロン(+)細胞とイントロン(-)細胞の混合培養でイントロンが転移することをFISH解析により証明する。古細菌可動性イントロンが、「分子化石」ではなく、現在も水平伝播していることの証拠を得る。
- (3) 環境ゲノムDNAを試料として定量PCR法の手法を用いて、自然界における可動性イントロンの出現頻度を

解析する。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0403231441
Nakayama, H., Morinaga, Y., Nomura, N., Nunoura, T., Sako, Y., and Uchida, A., An archaeal homing endonuclease I-PogI cleaves at the insertion site of the neighboring intron, which has no nested open reading, *FEBS Lett.*, 544(1-3), 165-170 (2003).
2. 0403231453
Itoh, T., Nomura, N., and Sako, Y., Distribution of 16S rRNA introns among the family Thermoproteaceae and their evolutionary implications, *Extremophiles*, 7(3), 229-233 (2003).
3. 0403231507
Morinaga, Y., Nomura, N., and Sako, Y. Population dynamics of archaeal mobile introns in natural environments: a shrewd invasion strategy of the latent parasitic DNA. *Microbes and Environments*. 17(4), 153-163 (2002)
4. 0602100442
Imagawa, T., H. Nakayama, N. Katunuma, H. Sakuraba, T. Ohshima, T. Itoh, Y. Sako, N. Nomura and H. Tsuge. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of homing endonuclease I-Tsp061I. *Acta Crystallographica Section D*. 60(11), 2006-2008 (2004)
5. 0602100446
Nomura N, Morinaga Y, Shirai N, Sako Y. I-ApeKI: a novel intron-encoded LAGLIDADG homing endonuclease from the archaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *Nucleic Acids Research* 33(13), e116 (2005)
6. 0403231518
野村紀通, 左子芳彦超好熱古細菌からの遺伝子資源の開発利用月刊海洋No.35号外 (特集「海洋微生物 II-基礎, 応用研究とその利用」)