

菌類に分布するグループ I イントロンの多様性に関する研究

Studies on diversification of group I introns within the fungi

研究代表者 東京大学 分子細胞生物学研究所 助手 西田 洋巳
Instructor, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo
Hiromi NISHIDA

A *Youngia japonica* (Onitabirako) strain had a group I intron that was suggested to have been transferred from *Protomyces inouyei*, a pathogenic fungus of *Y. japonica*. It was located in the miraculin homologue coding gene by reverse complementation. The deduced amino acid sequence of this miraculin homologue of *Y. japonica* was similar to the amino acid sequences of tobacco and tomato pathogenesis-related proteins. I infected the intron-free *Y. japonica* with *P. inouyei*. Then we found a gall produced. However, the intron was not transferred from *P. inouyei* to the miraculin homologue gene of *Y. japonica*. I need further study to measure the frequency of the horizontal intron transfer and find whether it happens at the DNA or RNA level. On the other hand, the endonuclease activity was not detected in the ORF product encoded in *P. pachydermus* group I intron.

1. 研究目的

生物の種の多様化は遺伝情報の多様化により生じる。遺伝情報の多様化は遺伝子に生じる突然変異だけによるのではなく、動く遺伝因子やウイルスにより大きく変化してきた。遺伝子の水平移動は遺伝情報に大きな変化を与える。グループ I イントロンはまさに系統的に離れた生物間において水平移動する遺伝因子であり、生物やウイルスに広く分布している。すでに植物寄生菌類の1つである *Protomyces* におけるグループ I イントロンの存在、さらにその宿主植物の一部においてもその存在を示した。本研究では *Protomyces inouyei* およびその宿主オニタビラコ *Youngia japonica*、*Protomyces pachydermus* を材料にして、その多様化機構を解明することを目的とした。

2. 研究経過

初夏に大学周辺および町田市よりオニタビラコを採取した。さらに、八甲田山より採取されたものを譲ってもらった。スクリーニングの結果これらのオニタビラコにはグループ I イントロンは含まれなかった。

理化学研究所において研究していた際に見つけたグループ I イントロンを有するオニタビラコにおける本イントロンのフランキング領域の塩基配列はミラクリン様のタンパク質をコードしている領域に逆向きに挿入されていることを明らかにし、その DNA 配列から推定されるアミノ酸配列はタバコやトマトにおいて感染特異的に発現しているタンパク質と構造が類似していることを示した。

そこで、実験室において種子より育てたオニ

タバコに *Protomyces inouyei* を感染させ、発病を確認した。さらに浮腫病部分から DNA を抽出し、PCR によりオニタバコ・ミラクリン様タンパク質をコードしている領域をしらべたが、イントロンの挿入を確認できなかった。

イントロンを有しないことがわかっているオニタバコのミラクリン様タンパク質コード領域を PCR により増幅し、その塩基配列を決定したところ、その配列はイントロンのフランキング領域の配列と類似しているが明らかに異なっていた。そこで、ほかのキク科植物であるタンポポやナス科植物のナスよりミラクリン様タンパク質コード領域を増幅し、その塩基配列を決定し、それらを含めて系統樹を作成したところ、イントロンのフランキング領域の配列はオニタバコよりもタンポポに近縁であることがわかった (Figure 1)。よって、オニタバコは株レベルにおいてかなりの多様性を持つと考えられる。

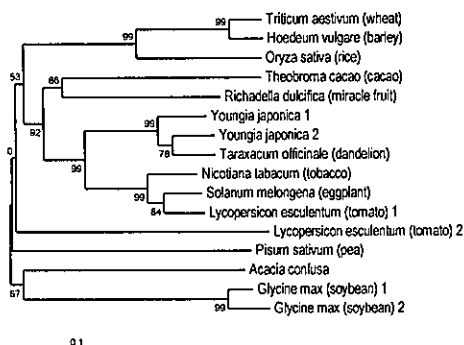


Figure 1. Phylogenetic relationships among proteins belonging to the soybean trypsin-inhibitor family.

タンポポ浮腫病菌 *Protomyces pachydermus* のグループ I イントロン内には 228 アミノ酸残基をコードしている ORF を有するためその産物がエンドヌクレアーゼの機能を有すると予測し、*in vitro* および *in vivo* 実験によりしらべた。大腸

菌での発現産物による *in vitro* 実験および酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 内で発現させ、その酵母の表現型をしらべる *in vivo* 実験いずれによっても配列特異的に働くエンドヌクレアーゼ活性は検出されなかった。

3. 研究成果

寄生菌類と同じ配列のイントロンを有する株だけではなく、複数の植物試料をしらべた結果、オニタバコに存在していたイントロン配列はオニタバコの進化において保存されたものではなく、短期的な過去においてたまたま挿入されたことを明らかにした。

さらにその挿入位置がミラクリン様タンパク質をコードしている遺伝子内に存在することを示し、植物の外敵に対する防御システムと寄生菌類が有する移動性の遺伝因子のかかわりを示したことは 1 つの成果である。

実験室において栽培したオニタバコに寄生菌類を感染させることに成功したことも 1 つの成果である。

4. 今後の課題と発展

オニタバコに多様性があり、それらを同一に取り扱うことができないことが判明した。今後はどれほどの多様性が存在しているかを集団遺伝学的・生態学的に解析しなければならない。それにより、寄生菌に対する抵抗力にどれほどの差異があり、そこに感染特異的タンパク質がどれほど関係しているのかしらべなければならない。その際、イントロンの有無をしらべ、イントロンの水平移動との関連を明確にする必要がある。

Protomyces pachydermus イントロン内 ORF の機能に関してはなぞのままである。しかし、それを酵母内で発現させたところ、酵母は死

滅することはなかった。また、この配列は他の *Protomyces* には存在していないことより、生育に必須のものではないことがわかる。さらに、その塩基配列・アミノ酸配列いずれにおいてもデータベースに相同性を有するものが存在しない。グループ I イントロン内に ORF が報告されている原生生物においてはその産物のエンドヌクレアーゼ活性が示された例が存在し、それらに共通の保存された配列があるが、本タンパク質には存在していない。現在のところ、この新規な配列を有するタンパク質の機能を知る術を持たない。

5. 発表論文

Group I intron located in PR protein homologue gene in *Youngia japonica*. Nishida H., Ogura A., Yokota A., Yamaguchi I., Sugiyama J. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2000**, *64*, 606-609