

リボソーマルタンパク質遺伝子 *RPS13* のイントロン位置を指標にした真核生物の系統分類

江部 聡 (大学院創成科学研究科ライフサイエンス系専攻)

國重 春菜 (大学院創成科学研究科化学系専攻)

茶島 健吾 (大学院創成科学研究科化学系専攻)

中村 仁美 (大学院創成科学研究科化学系専攻)

中村 勇喜 (大学院創成科学研究科化学系専攻)

林 知世 (大学院創成科学研究科化学系専攻)

平川 遥 (大学院創成科学研究科化学系専攻)

山地 啓介 (大学院創成科学研究科化学系専攻)

星田 尚司 (大学院創成科学研究科化学系専攻)

赤田 倫治 (大学院創成科学研究科化学系専攻)

Taxonomic grouping of eukaryotic organisms using intron positions of *RPS13* ribosomal protein gene as a guide

Satoshi EBE (Division of Life Science, Graduate School of Sciences and Technology for Innovation)

Haruna KUNISHIGE (Division of Applied Chemistry, Graduate School of Sciences and Technology for Innovation)

Kengo CHAJIMA (Division of Applied Chemistry, Graduate School of Sciences and Technology for Innovation)

Hitomi NAKAMURA (Division of Applied Chemistry, Graduate School of Sciences and Technology for Innovation)

Yuki NAKAMURA (Division of Applied Chemistry, Graduate School of Sciences and Technology for Innovation)

Chise HAYASHI (Division of Applied Chemistry, Graduate School of Sciences and Technology for Innovation)

Haruka HIRAKAWA (Division of Applied Chemistry, Graduate School of Sciences and Technology for Innovation)

Keisuke YAMAJI (Division of Applied Chemistry, Graduate School of Sciences and Technology for Innovation)

Hisashi HOSHIDA (Division of Applied Chemistry, Graduate School of Sciences and Technology for Innovation)

Rinji AKADA (Division of Applied Chemistry, Graduate School of Sciences and Technology for Innovation)

Abstract: Taxonomic classification of whole eukaryotes using conserved proteins or nucleotide sequences that are used as criteria looks convenient and easy. However, these methods may not be reliable to long evolutionary history if their function is developed or degenerated in their life history. The sequence-based classification methods depending on the functional conservation may cause unknown bias. In this study, we propose novel classification using intron positions in a gene, which are not related to function. Intron positions of highly conserved ribosomal protein *RPS13* gene were selected as novel criteria for the classification of whole eukaryotes from lower unicellular amoeba, algae, and flagellates to plants and animals. *RPS13* gene encodes 151 amino acids and possesses 453 bp exon sequence in many eukaryotic organisms. The intron positions are determined based on their coding exon sequences, in which all the introns are designated by the positions from the first nucleotide of the start codon and the position numbers are attached with 'i' for intron indication. For example, human *RPS13* gene contains introns at the positions of 24i, 73i, 152i, 322i, and 423i sites on the coding sequence. Interestingly, all the Deuterostomia animals including starfish, leech, and octopus showed the same intron positions to human. Similarly, all the land plants showed 24i, 97i, 236i, and 423i positions. In lower unicellular eukaryotes, which showed non-intron or variety of positions, only amoeba *Lenisia limosa* has the intron position of 152i site and Chlorophyta *Pedinophyceae* sp. has single 97i position, suggesting that they may be the ancestral organisms of animals and plants, respectively. As a conclusion, intron positions of *RPS13* gene can be used as a guide for the taxonomic classification of eukaryotic organisms.

Key Words: Ribosomal protein gene, *RPS13*, intron position, classification, parasite, amoeba, algae, flagellates, fungi, animals, plants

1. はじめに

地球上に存在する生物を整理し、関係性を示す分類系統学は、生物を理解するうえでの基礎となっている。現状の生物群は、リンネの提唱した階層的分類に基づいて整理されている。まず、生物界は4つのsuperkingdomに分かれており、ウイルス (virus)、古細菌 (archaea)、細菌 (bacteria)、真核生物 (eukaryota) に分類される。細胞構造をもたないウイルスを除くと古細菌と細菌は原核生物に分類され、真核生物とは大きく異なっている。原核生物は、膜でおおわれた核を持たず、複数の遺伝子が一つのプロモータで発現されるオペロン構造をもち、イントロンは持たないなどの特徴を有し、下等であるとされる。一方、真核生物は、核をもち、遺伝子それぞれにプロモータを有し、原則オペロン構造はなく、イントロンを持ち、ゲノムも大きく、ヒトを含む複雑な動物や植物などの高等な生物群が含まれる。どの生物も同一のDNAを遺伝物質とするので、下等な原核生物から真核生物が進化したと考えることができるが、真核生物の起源となる生物や、動物や植物や真菌の起源となる生物はほとんどわかっていない。さらに、真核生物界は、アメーバ、藻類、鞭毛虫、原生動物などから真菌類、多細胞の動物、植物など、進化の方向が多岐にわたり、その分類と系統解析は非常に難しい。

これまでに、数多くの生物群のデータベースをまとめ、全生物を系統的に整理しているものにNational Center for Biotechnology Information (NCBI) のTaxonomy browserがある²⁾。このデータベースでは、生物分類群の専門サイトからの情報を集め、種名の統一やそれぞれのデータのアップデートを行っているため、現状では、全生物を網羅した最も信頼できるデータベースであると言える。但し、系統分類法は常時改訂変化しており、確立されたものはない。例えば、真核生物においては、高次分類体系の改訂が数年おきになされている^{3,4)}。さらに、近年では、環境から取得されたDNA配列データのように、生物の形態的、または、発生学的な指標を使うことができない場合に、いかに、多様な生物を統一的に分類するのかが課題となっている。

その中でも、多くの分類系統は、リボソーマルRNA (rRNA) 配列を指標とした方法で展開されてきた^{3,4,5)}。この方法は、DNAデータで分類するので、環境サンプルでも可能であるが、近縁の生物ではほぼ同じ配列となる場合が多く、それらは同じ種に分類されることになる。また、鞭毛虫類においては、同系統であることが確実な近縁種間でもrRNA配列が大きく異なっており、他のタンパク質配列を利用して分類せざるを得ない状況にある⁶⁾。そのような場合は、熱ショックタンパク質遺伝子や解糖経路のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子

が使用されているが、これらの遺伝子での分類は、他の生物群では一般的ではなく、指標となる遺伝子として何が適切かについての基準もない。したがって、rRNA配列や、特定のタンパク質遺伝子では、真核生物全体の系統を示すことが困難であり、新たな方法が求められている。

その方法の一つとして、近年、ゲノムシーケンズデータを利用した分類系統学が展開されている。例えば、酵母菌類では、332種のゲノムを利用した分類⁷⁾や、哺乳動物類をゲノムで分類する試みが進んでいる^{8,9)}。ゲノム全体を使うことで正確な比較ができるかもしれないが、培養できない微生物種において全ゲノムを正確に解読することは容易ではなく、現在のところ、特定の生物種に対してだけ適用できる方法である。

このような状況で、新たな分類基準として、我々はリボソーマルタンパク質に注目した。リボソーマルタンパク質は、リボソームを構成する数多くのタンパク質サブユニットの集合体であり、単独で機能するものではないので、環境や進化の過程で生物種間の変化があまり多くないと考えられる。また、rRNAが基本的な分類配列として利用されてきたように、リボソームの保存性が系統分類に有用であることも示されている。したがって、リボソーマルタンパク質の中で、最適なタンパク質を選択することで、有用な分類情報が得られるのではないかと考えた。

このリボソーマルタンパク質遺伝子を調べていたところ、興味深いことに、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*において、約6000の全遺伝子のうちイントロンを持つ遺伝子282個の内、リボソーマルタンパク質関連遺伝子が103個であった¹⁰⁾。つまり、酵母のイントロン遺伝子の37%を占めていた。さらに、近縁の酵母種を調べても多くのリボソーマルタンパク質遺伝子はイントロンを持つことがわかった。したがって、リボソーマルタンパク質遺伝子には、イントロンを存在させる進化的な保存性があると考えられた。加えて、より近縁の酵母種においてイントロンの挿入位置は共通していたが、遠縁になるほどイントロン挿入位置が異なることもわかった。一旦イントロンが挿入するとその位置が変化するのではなく、同じ系統の生物群では同じイントロン位置が保存される可能性があると予想し、本研究では、イントロン位置と真核生物の系統関係を調べることにした。

酵母のような下等な生物では、イントロンを持つ遺伝子頻度も少ないが、1遺伝子のイントロン数も少ない。一方、ヒト*Homo sapiens*のゲノムにおいては、約97%の遺伝子がイントロンを持ち、1遺伝子内のイントロン数も非常に多い¹¹⁾。このように、高等生物ではイントロンが多く、下等な生物ではイントロンが少ないという事実から、イントロンが進化に伴ってゲノムに挿入されてきた歴史があることは明らか

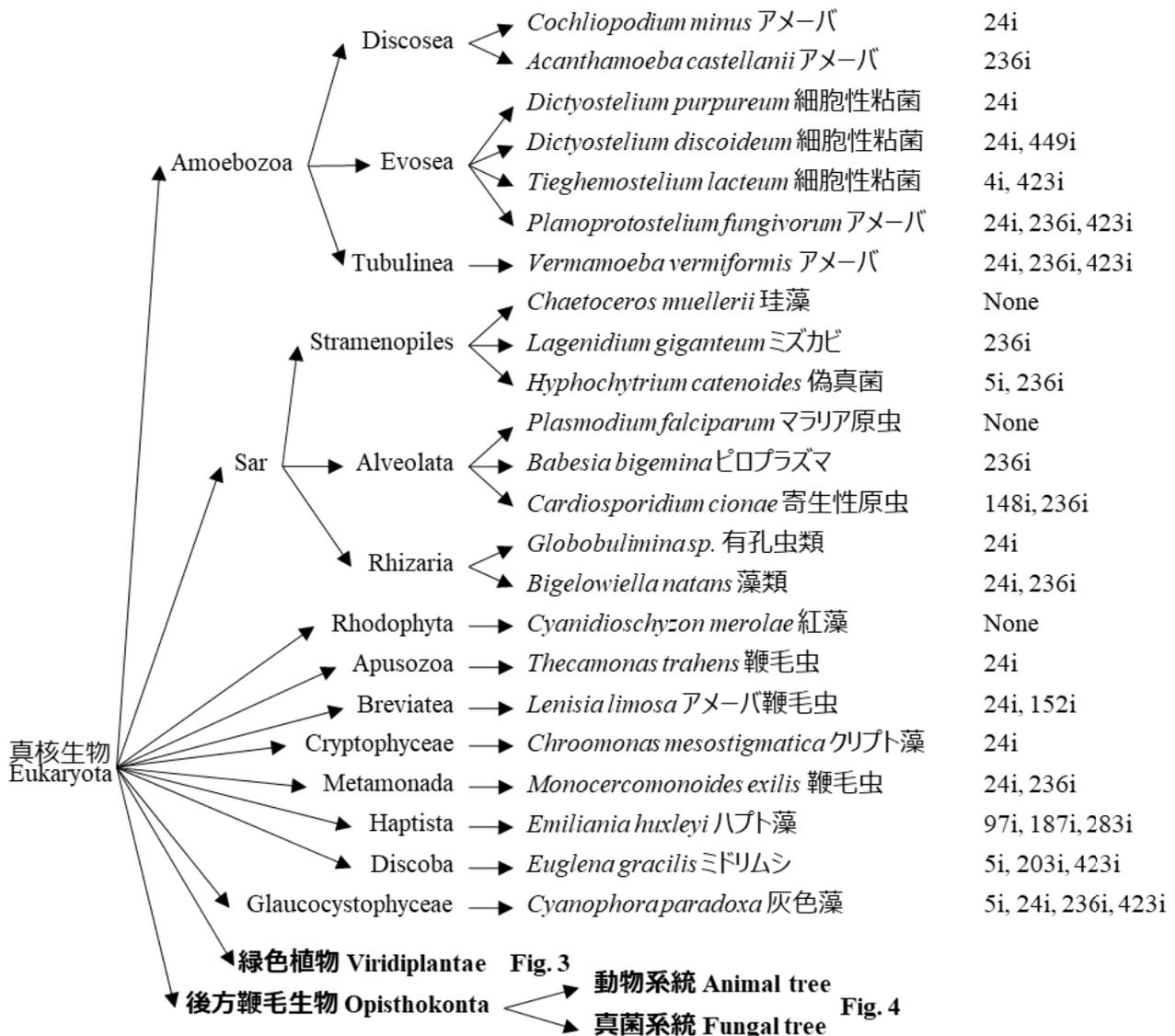


Fig. 1. RPS13 intron positions in lower eukaryotes

The phylogenetic tree is based on taxonomy browser of NCBI. The representative organisms of each clade were selected and searched the intron positions. The right-side number means the intron position for each species. "None" indicate species with no intron in RPS13.

かである。挿入されたイントロンの位置が同一の生物群は、共通の祖先をもつと考えることができるのではないだろうか。

これらのことから、イントロンが遺伝子上に挿入されることを進化的時間と関連付け、DNA上のイントロンの存在する位置を調べることで、全く新しい系統追跡法となると考えた。

そこで、本研究では、イントロン位置を一定に表現するために、真核生物のリボソームタンパク質配列の中でも、そのアミノ酸配列の長さの保存性の高いRPS13遺伝子を用い、その遺伝子上のイントロンの位置を全真核生物で同一の長さの位置として表現した。この表記法で、NCBIに上げられている真核生物の系統範囲をカバーする系統分類を試みた。さらに、環境から採取されたDNA配列の中に見出したRPS13遺伝子のイントロン位置から、その生物の系

統的位置を推定することも試みた。

2. 方法

使用した真核生物データベース

NCBIのTaxonomy browser²⁾には、2022年12月13日時点で、32359種の真核生物 (Eukaryota) のゲノムが登録されており、それらの生物種が持つゲノム配列が検索できる。

比較する真核生物の分類系統としては、門の上位分類である Amoebozoa, Sar, Rhodophyta, Apusozoa, Breviatea, Cryptophyceae, Metamonada, Haptista, Discoba, Glaucozystophyceaeなどに属する下等真核生物と、植物系統としてViridiplantae, および、動物と真菌類は共通の系統Opisthokontaに属する生物に対して調査を行った (Fig. 1)。

RPS13 のDNA配列の取得と得られたデータの選定

*S. cerevisiae*のRps13のアミノ酸配列を基準として、選んだすべての門の上位の各分類からランダムに選択した生物のアミノ酸配列、または、DNA配列に対するBLAST検索 (blastpとtblastn) を行った¹²⁾。この検索結果では、RPS13のDNA配列と同時にRPS13と類似したDNA配列も得られた。これらのうち、DNA配列から翻訳されたアミノ酸配列が*S. cerevisiae*と同じ151アミノ酸になる塩基配列を選び、118種の生物のRPS13のDNA配列を選定した。

RPS13 のイントロン位置情報の検索

RPS13遺伝子のイントロン位置は、各遺伝子からイントロンを除き、453塩基からなるコーディング配列に対し、開始コドンの最初のAを+1と設定して塩基配列に番号を付けた。イントロンの存在場所の5'末端側のエキソンの塩基に+1を加えて示した。総コーディング配列が同じものを検索しているため、同じイントロン位置とは、コーディング配列上の全く同じ位置にイントロンが存在することを示す。

RPS13 にイントロンを持たない生物の分類

Discobaに属するRPS13にイントロンを持たない12種の生物の遺伝子数とイントロンの有無を調べるため、500,000 bp以上のゲノムシーケンス (WGS) のデータがNCBI¹²⁾に保存されている生物を選び、各生物においてWGSの塩基データが最も長いコンティグの配列を取得した。それらのコンティグで、アノテーションされている遺伝子数を遺伝子数とし、また、このうちイントロンを持つ遺伝子数の割合からイントロン存在率を算出した。

また、RPS13にイントロンを持たない生物のRPS13のヌクレオチド配列からGenetyxのNJ法を用いて系統樹を作成した¹³⁾。

3. 結果と考察

比較するリボソーマルタンパク質遺伝子の選定

リボソーマルタンパク質配列のほとんどは真核生物間で高度に保存されているが、その中でもどの遺伝子を使用して分類するのがよいかを調べた。酵母*S. cerevisiae*のリボソーマルタンパク質をコードする遺伝子を調べると、136遺伝子であった¹⁴⁾。酵母では、遺伝子重複¹⁵⁾が起これ、同じリボソーマルタンパク質をコードする複数の遺伝子を持つ場合が多いことからイントロンの挿入位置の決定や、遺伝子配列検索に問題を起これす。そこで、*S. cerevisiae*で遺伝子重複が起これていない遺伝子で、さらに、保存性が高いことが予想される必須遺伝子を検索したところ、5遺伝子 (RPL25, RPL28, RPL30, RPL32, RPS13) であった。

次に、これらの酵母遺伝子のアミノ酸配列をヒト

Table 1. Comparison of ribosomal protein genes between human and yeast

Gene name		Amino acid identity (%)	Cover ratio (%)
<i>H. sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>		
RPS13	RPS13	78	99.3
RPL27A	RPL28	62	100.0
RPL23A	RPL25	62	89.7
RPL32	RPL32	61	96.9
RPL30	RPL30	60	87.8

*H. sapiens*の相同タンパク質と比較した (Table 1)。

Rps13が最も高い相同性を持っていたので、RPS13をイントロン位置検索に用いることとした。

RPS13 のイントロン位置情報の統一的な表記法

酵母*S. cerevisiae*とヒト*H. sapiens*のRPS13は同一アミノ酸数で構成されており、その保存性が高い (Fig. 2A)。したがって、RPS13はコーディング配列上の塩基配列の位置を基準にすることでDNA中のイントロンの挿入位置を統一的に示すことができる遺伝子だと考えた。*S. cerevisiae*のイントロンを含む遺伝子構造をFig. 2Bに示した。コーディング配列の開始コドンの最初のAを+1とすると、Exon 1が+1から+21塩基まであり、+22から+560がイントロン配列である。全長は992 bpであるが、イントロンを除いたコーディング配列を元に、イントロン位置を示すとFig. 2Cのように、22番目にイントロンが入っていると記述ができる。これを22iと表現する。このようにコーディング配列を基準にするとヒトの

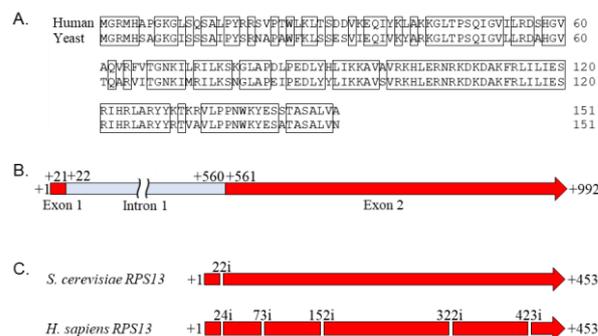


Fig. 2. Yeast and human ribosomal protein RPS13 gene structures and the nomenclature of intron positions on the coding sequences.

A. Amino acid sequence comparison of Rps13 proteins between yeast *Saccharomyces cerevisiae* and human *Homo sapiens*. The same amino acids are enclosed. The identity percentages of the amino acid and coding nucleotide sequences are 78% and 66%, respectively. B. A schematic diagram of *S. cerevisiae* RPS13 gene structure. The intron was inserted at the +22 position (22i) from the start codon in which the first A of ATG was determined as +1 position. C. RPS13 coding sequences without introns were used as a guide for the nomenclature. Human RPS13 genomic sequence contains five introns and the positions were expressed under the 453 bp coding sequence positions, such as 24i, 73i, 152i, 322i, and 423i, where introns were inserted.



Fig. 3. *RPS13* intron position in green plants and algae

The green plant kingdom is divided into green algae and streptophyta, which contain the current land plants.

ンが存在することから、共通の祖先をもつと考えることもできるのではないだろうか。

植物系統の*RPS13* のイントロン位置

緑色植物界は、緑藻植物門とストレプト植物に別れる¹⁶⁾。ストレプト植物から派生している3つの系統のうち、クロロキブス藻とメソスティグマ藻の2系統、および、調べたすべての陸上植物でいずれも24i, 97i, 236i, 423iにイントロンを持っていた (Table 3, Fig. 3)。このことから、陸上植物は、様々な植物種がいるようにみえるが、*RPS13*のイントロン位置で分類してみると差がないため、かなり近縁のグループであることが示唆される。形態的な多様性に比べ、その進化的な時間の長さは短いことが予想される。

一方で、藻類の属する、クレブソルミディウム藻では陸上植物が持つ97iがなく、328iを持つので、他のストレプト植物の系統とは少し異なる。

緑藻植物門では、クロロピコン藻、ミクロモナスではイントロンがなく、クラミドモナスでは、いずれも全く他の真核生物ではみられない29i, 72i, 287i, 352iという位置に持つので、クラミドモナスは緑色植物や Fig. 1 の下等真核生物とも全く異なる系統に属するのではないかと考えられる。同様に、391iを持つクロロデンドロン藻も同じ位置にイントロンを持つ生物がないので、特殊な系統に存在することが示唆された。

陸上植物が持つイントロン位置のうち、97iは動物や真核微生物には存在せず、単一で97iを持つ生物は、ペディノ藻のみである。多様性に富んだ陸上植物の起源を考える上で、97iのイントロン位置が統一的な系統関係を表す可能性を指摘したい。

動物と真菌系統の*RPS13* のイントロン位置

NCBIの動物系統と真菌系統は、後方鞭毛生物を起点に後生生物と真菌類に分かれ、後生生物から動物

群が進化する。後方鞭毛生物から、下等なAphelida, Filasterea, とRotosphaeridaが派生しているが、これらは、いずれも24iのイントロンを持つ (Table 3, Fig. 4)。24iを単独で持つ生物は、Fig. 1の下等真核生物群のアメーバ類や緑色植物のパルモフィルム藻にも見られるので、*RPS13*のイントロン位置から考察すると、これらのアメーバ類の現状の系統関係に疑問が残る。

一方、ヒトやウミヤツメが含まれる後口動物ではいずれも24i, 73i, 152i, 322i, 423iの位置にイントロンを持っており、この位置は軟体動物マダコで同一、イソギンチャクでも同じ位置に持つ (Fig. 4)。脊椎動物は多様に見えるが、*RPS13*イントロン位置で分類すると、全く同じ系統に入るので、陸上植物と同様に、進化的に短時間で形態的な多様性を獲得したことが理解できる。

後生生物では、センモウヒラムシを例外として、152iのイントロンを持つことが他の生物にはない特徴である。152iが動物へ至る一つの指標となるのではないだろうか。甲殻類や昆虫では、下等とされるイソギンチャクや海綿に比べ、フジツボでは24i, 152i, 318i, ミジンコやハエでは24i, 152iの位置など少ないイントロン数となっており、イントロンが削除されたのか、それとも、下等とされていた動物群とは、異なる進化系統を持っていることも考えられ、議論のあるところであろう。

一方、同じ後方鞭毛生物から進化したとされる真菌類の*RPS13*イントロン位置は多様である。動物群で存在していた24iは下等真核生物や、植物にも存在するが、調べた真菌類には存在していない。この24iの位置にイントロンが存在しない真菌類と後生生物を同一の後方鞭毛生物から派生したと考えるならば、かなり早い時代に真菌類は分岐したと考えられる。

また、調べた真菌類の中に、*fungus* sp. No. 11243の未同定菌でイントロン位置が調べられた。この菌は203i, 236i, 283iを持つので、同一のイントロン位置を

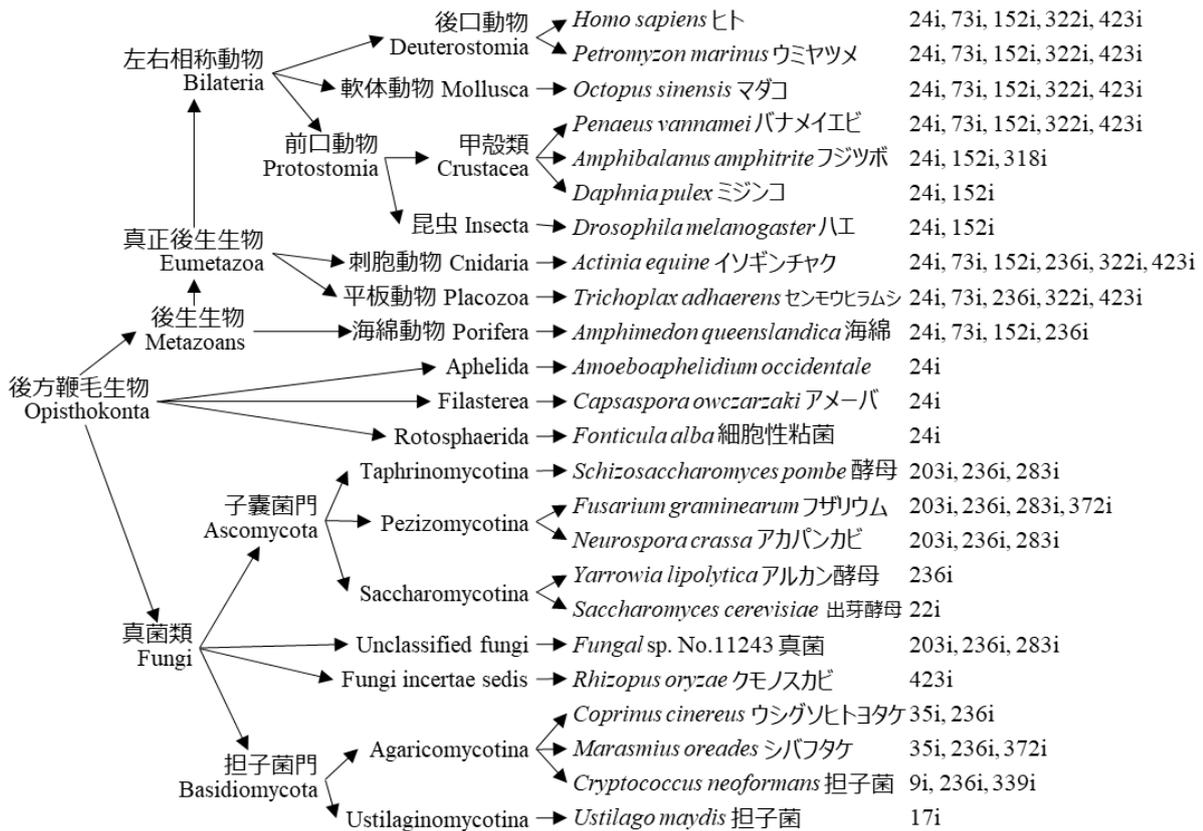


Fig. 4. RPS13 intron position in animals and fungi

Starting from opisthokonta, metazoans and fungi are divided, and animal groups evolve from metazoans

持つアカパンカビなどの仲間であると予想できる。

RPS13イントロン位置による真核生物界の分類

これまでの結果から、RPS13のイントロン位置は、陸上植物全体あるいは脊椎動物全体を含む後口動物で一致することから、大きな分類体系に対しての同一性が示された。一方で下等真核生物においては、これまでもその分類系統に様々な議論があるように、RPS13イントロン位置も多様性を示した。しかし、その中でも、24i, 236iや423iのように、共通のイントロン位置を持つものも多い。したがって、RPS13イントロン位置を指標とした分類も系統関係を示すことができるのではないかと考えられる。そこで、RPS13イントロン位置のみを利用した分類を行った (Fig. 5)。

RPS13 にイントロンを持たない種：イントロンが進化の過程で削除されることがあるのかどうかはわからないが、高等動物には、RPS13遺伝子にイントロンを持たない生物が見当たらないことから、イントロンが頻繁に削除されるとは考えにくい。RPS13にイントロンが存在しない種 (Non-intron group) はいずれも下等で、鞭毛虫類か寄生虫であった。これらが真核生物の起源である可能性も考えられる。

RPS13イントロン位置がユニークである種：藻類の中には、クロロデンドロン藻 *Tetraselmis striata* やクラ

ミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* のように調べた他の真核生物には存在しない位置にイントロンを持つ生物が存在していた。これらの進化系統 (Rare position group) は、他の生物とは独立していると考えられる。

RPS13イントロンが1カ所である下等真核生物：1カ所のみイントロンが挿入されている下等真核生物 (鞭毛虫、アメーバ、藻類) を集めた (Group 24i)。Group 24iは、NCBIに示されている分類では多様な系統に存在しているが、同じ位置1カ所のイントロンを持つということは、同一の系統を構成しているとも考えられる。

RPS13イントロン236i/423iを持つ下等真核生物：高等動物と似たイントロン位置を持つもので、複数のイントロンを持つ下等真核生物種を236iまたは423iにイントロンを持つグループとして集めた (Group 236i/423i)。236iも423iも動物、真菌類、植物等の高等生物に存在するので、高等生物への進化過程に共通の祖先をもちながら分枝したと考えられる。

真菌類のRPS13イントロンの特徴：真菌類の分類は、RPS13のイントロン位置が多岐にわたるので、多様な進化の過程があったと想像できる。その中でも、203iと283iを持つ真菌が一部に存在している (Fungi group 203i/283i)。この203iと283iを下等真核生物で探

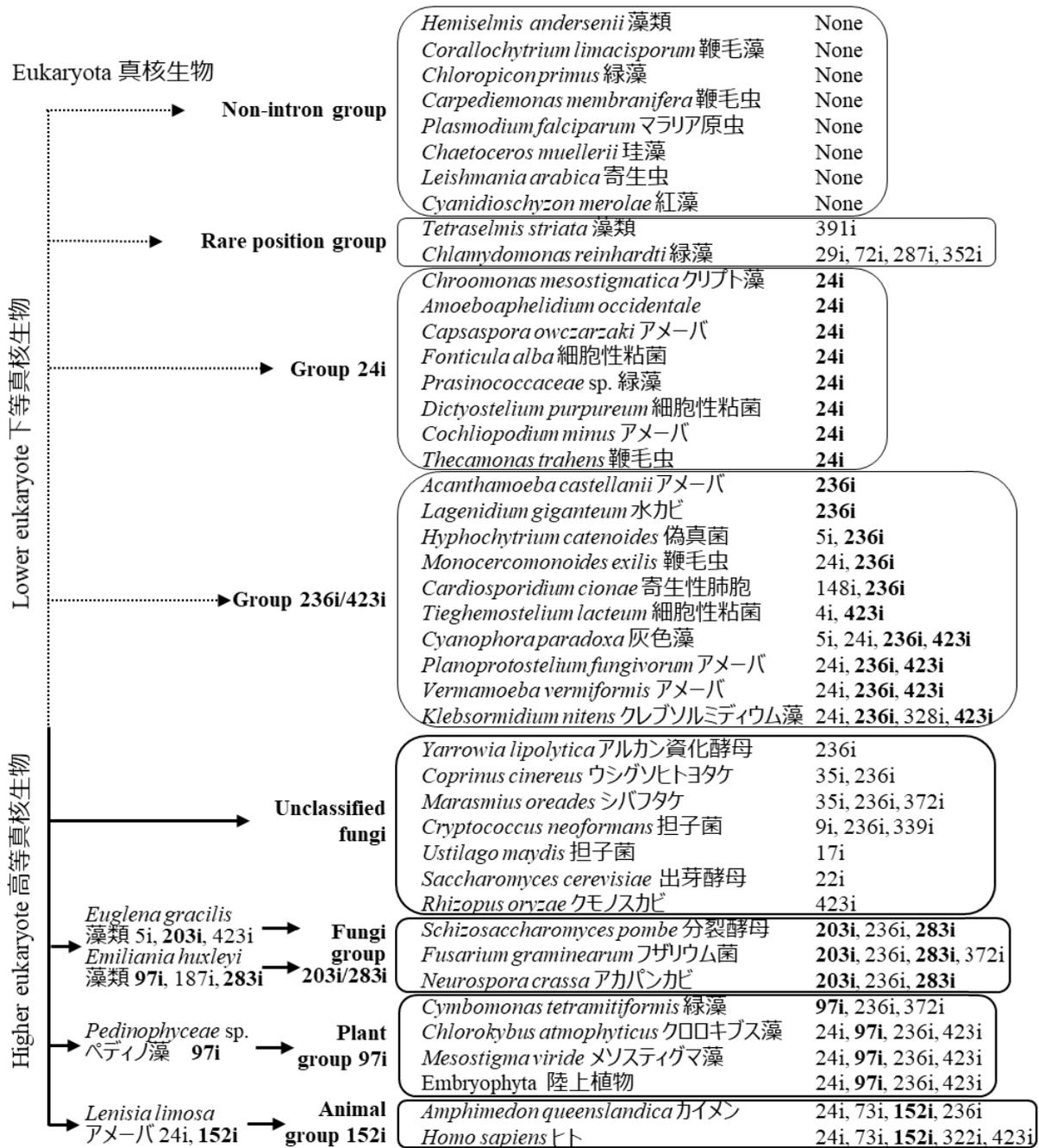


Fig. 5. Grouping of eukaryotic kingdoms by RPS13 intron positions

Eukaryotic organisms are grouped by the RPS13 intron positions. The solid line indicates the higher eukaryote groups. The dashed line indicates the lower eukaryote groups. These arrow point show the group separated by same intron position in RPS13. The species in each group are representative in Table 2 and 3. Bold indicates the intron position used for each grouping.

すと藻類のミドリムシ *Euglena gracilis* が203iを持ち、*Emiliana huxleyi* が283iを持つことから、これらの藻類と真菌類の一部には何らかの進化的な関係性があったことが示唆される。

植物系統のRPS13イントロンの特徴: 高等陸上植物に至る進化過程では、97iのイントロンが特徴的であり、この97iを持つ下等生物は、*Emiliana huxleyi* とペディノ藻 *Pedinophyceae* sp. だけである。特にペディノ藻は97iを単独で持つので、植物系統への起源にこれ

らの藻類が存在していたと考えられないだろうか。

動物系統のRPS13イントロンの特徴: ヒトに至る動物系統に見られる共通したイントロン位置は、152iである (Animal group 152i)。152iを持つ下等真核生物は、アメーバの *Lenisia limosa* のみであった。このアメーバが動物の起源である可能性はないだろうか。

RPS13イントロンを持たない下等真核生物と寄生虫
RPS13にイントロンを持たない生物は下等な単細



Fig. 6. Phylogenetic tree created from the nucleotide sequence homology of *RPS13* exons in parasitic and free-living lower eukaryotes and their percentages of genes with intron

Eight species of the flagellar protist Discoba, all of which have no intron in *RPS13* but three are free-living and four are parasitic, were compared with respect to the *RPS13* exon similarity and intron-containing gene ratio. Phylogenetic tree was created by the NJ method of Genetyx software using the nucleotide sequence of the exons of *RPS13* genes. Using more than 500,000 bp of contigs of their genomic sequences in NCBI database, the percentages of genes with introns are calculated.

胞生物であるということは共通していたが、藻類や鞭毛虫などであり、その中には寄生生活をするものが多かった。そこで、*RPS13*のイントロンの有無と寄生性、または、自由生活性の生活様式との関係を調べた。両方の生物が存在する鞭毛原生生物Discobaに注目し、*RPS13*にイントロンを持たない寄生性と自由生活性生物の*RPS13*のエキシソンのDNA配列から、系統樹を作成した (Fig. 6)。さらに、これらの原生生物のゲノムコンティグをNCBIで集め、50万塩基以上のコンティグに存在する遺伝子の中でイントロンを持つものと持たないものの数から、イントロン遺伝子の存在率を算出した。自由生活性を示す種は、10%以上のイントロン存在率を示すが、寄生性の種は、ほとんどイントロンを持たないことがわかった。したがって、寄生性生物であることがイントロン遺伝子の存在率を低くする要因と考えられる。寄生性であることがイントロンを削除しているのか、それとも、そのことが、イントロン挿入の機会をなくしているのか、どちらかが考えられる。

4. 結論

本研究では、下等単細胞真核生物から高等動物や植物に至る広い真核生物を対象として保存性の高いリボソーマルタンパク質遺伝子*RPS13*のイントロン挿入位置に基づいた系統分類を試みた。下等真核生物には、*RPS13*にイントロンのないものや単一のイントロンを持つものが存在するが、動物や植物など高等になるにつれ、4つや5つのイントロンを持つようになるので、進化の時間が長くなるとイントロン挿入数は増える様子がうかがえた。さらに、イントロン挿入位置は、高等動物や高等植物では完全に一致しており、位置と数により、長い進化時間におけ

る変化の指標となることが示唆された。イントロン挿入位置には、機能的な保存性があるとは考えにくいので、環境や生存戦略の中で、中立的な進化の歴史を維持してきたと考えられる。このことは、これまでの機能を持つタンパク質やRNA配列を利用することとは一線を画す分類法になると期待される。

高等動物が特徴的に持つ152iや高等植物が持つ97iなどは、下等単細胞真核生物で持つものはほとんど見られなかったため、それらを持つ数少ない下等真核生物は高等動物や植物との系図がつながるように思われた。

一方で、*RPS13*イントロン位置は、下等真核単細胞生物や真菌類では多様性を示したので、これらの生物における進化的な多様性が示唆された。その多様性の中にも、イントロン挿入位置で分類すると、既存の系統樹とは異なるグループが構成でき、今後の検証や議論が必要だと考えられた。

さらに、*RPS13*にイントロンを持たない真核生物がその後の生物の共通祖先であることも考えられるが、多くが寄生性であり、そのことがゲノム内の遺伝子においてイントロン存在率の低下を招いていたことがわかったので、寄生性環境は、イントロンの存在を減らす、または、増やさない条件となっていることが推測された (Fig. 6)。自由生活を行う下等真核生物において、イントロン存在率が低い生物がいれば、真核生物の起源に存在した生物に近いものであったと考えることができるかもしれない。*RPS13*や他のリボソーマルタンパク質遺伝子、および、ゲノムのイントロンを調べることで、真核生物の分岐や起源、さらには、詳細な分類にイントロン数と位置が有用な指標となると考えられる。

謝辞

本研究にあたり、酵母のリボソームタンパク質遺伝子のデータ取得に携わっていただいた、研究補佐員的美澄幸恵さん、2020年山口大学工学部ゲノム生命機能工学研究室修士2年生、1年生、並びに学部4年生の皆様に感謝を申し上げます。

参考文献

1. 武山 尚生, 高橋 佑歌, 永田 祥平, 澤木 佑介, 佐藤 友彦, 丸山 茂徳, 金井 昭夫. 真核生物の起源における原核生物の重要性と当時の地球環境. 地学雑誌. 2019, 129 (6), 899-912.
<https://doi.org/10.5026/jgeography.129.899>.
2. Conrad L. Schoch, Stacy Ciufu, Mikhail Domrachev, Carol L. Hottel, Sivakumar Kannan, Rogneda Khovanskaya, Detlef Leipe, Richard Mcveigh, Kathleen O'Neill, Barbara Robbertse, Shobha Sharma, Vladimir Soussov, John P. Sullivan, Lu Sun, Seán Turner, Ilene Karsch-Mizrachi. NCBI Taxonomy: A Comprehensive Update on Curation, Resources and Tools. Database. 2020, 2020, 1-21.
<https://doi.org/10.1093/database/baaa062>.
3. Sina M. Adl, Alastair G. B. Simpson, Christopher E. Lane, Julius Lukeš, David Bass, Samuel S Bowser, Matthew W. Brown, Fabien Burki, Micah Dunthorn, Vladimir Hampl, Aaron Heiss, Mona Hoppenrath, Enrique Lara, Line Le Gall, Denis H. Lynn, Hilary McManus, Edward A. D. Mitchell, Sharon E. Mozley-Stanridge, Laura W. Parfrey, Jan Pawlowski, Sonja Rueckert, Laura Shadwick, Conrad L. Schoch, Alexey Smirnov, Frederick W. Spiegel. The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2012, 59 (5), 429-493.
<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.20.12.00644.x>.
4. Sina M. Adl, David Bass, Christopher E. Lane, Julius Lukeš, Conrad L. Schoch, Alexey Smirnov, Sabine Agatha, Cedric Berney, Matthew W. Brown, Fabien Burki, Paco Cárdenas, Ivan Čepička, Lyudmila Chistyakova, Javier Del Campo, Micah Dunthorn, Bente Edvardsen, Yana Eglit, Laure Guillou, Vladimír Hampl, Aaron A. Heiss, Mona Hoppenrath, Timothy Y. James, Anna Karnkowska, Sergey Karpov, Eunsoo Kim, Martin Kolisko, Alexander Kudryavtsev, Daniel J. G. Lahr, Enrique Lara, Line Le Gall, Denis H. Lynn, David G. Mann, Ramon Massana, Edward A. D. Mitchell, Christine Morrow, Jong Soo Park, Jan W. Pawlowski, Martha J. Powell, Daniel J. Richter, Sonja Rueckert, Lora Shadwick, Satoshi Shimano, Frederick W. Spiegel, Guifré Torruella, Noha Youssef, Vasily Zlatogursky, Qianqian Zhang. Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2019, 66 (1), 4-119.
<https://doi.org/10.1111/jeu.12691>.
5. Laure Guillou, Dipankar Bachar, Stéphane Audic, David Bass, Cédric Berney, Lucie Bittner, Christophe Boutte, Gaétan Burgaud, Colombar de Vargas, Johan Decelle, Javier del Campo, John R. Dolan, Micah Dunthorn, Bente Edvardsen, Maria Holzmann, Wiebe H.C.F. Kooistra, Enrique Lara, Noan Le Bescot, Ramiro Logares, Frédéric Mahé, Ramon Massana, Marina Montresor, Raphael Morard, Fabrice Not, Jan Pawlowski, Ian Probert, Anne-Laure Sauvadet, Raffaele Siano, Thorsten Stoeck, Daniel Vaultot, Pascal Zimmermann, Richard Christen. The Protist Ribosomal Reference Database (PR2): A Catalog of Unicellular Eukaryote Small Sub-Unit rRNA Sequences with Curated Taxonomy. *Nucleic Acids Research*. 2013, 41 (D1), D597-D604.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks1160>.
6. Alastair G. B. Simpson, Jamie R. Stevens, Julius Lukeš. The Evolution and Diversity of Kinetoplastid Flagellates. *Trends in Parasitology*. 2006, 22 (4), 168-174.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.006>.
7. Xing-Xing Shen, Dana A. Opulente, Jacek Kominek, Xiaofan Zhou, Jacob L. Steenwyk, Kelly V. Buh, Max A. B. Haase, Jennifer H. Wisecaver, Mingshuang Wang, Drew T. Doering, James T. Boudouris, Rachel M. Schneider, Quinn K. Langdon, Moriya Ohkuma, Rikiya Endoh, Masako Takashima, Ri-Ichiroh Manabe, Neža Čadež, Diego Libkind, Carlos A. Rosa, Jeremy De Virgilio, Amanda Beth Hulfachor, Marizeth Groenewald, Cletus P. Kurtzman, Chris Todd Hittinger, Antonis Rokas. Tempo and Mode of Genome Evolution in the Budding Yeast Subphylum. *Cell*. 2018, 175 (6), 1533-1545.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.023>.
8. Diane P. Genereux, Aitor Serres, Joel Armstrong, Jeremy Johnson, Voichita D. Marinescu, Eva Murén, David Juan, Gill Bejerano, Nicholas R. Casewell, Leona G. Chemnick, Joana Damas, Federica Di Palma, Mark Diekhans, Ian T. Fiddes, Manuel Garber, Vadim N. Gladyshev, Linda Goodman, Wilfried Haerty, Marlys L. Houck, Robert Hubley, Teemu Kivioja, Klaus-Peter Koepfli, Lukas F. K. Kuderna, Eric S. Lander, Jennifer R. S. Meadows, William J. Murphy, Will Nash, Hyun Ji Noh, Martin Nweeia, Andreas R. Pfenning, Katherine S. Pollard, David A. Ray, Beth Shapiro, Arian F. A. Smit, Mark S. Springer, Cynthia C. Steiner, Ross Swofford, Jussi Taipale, Emma C. Teeling, Jason Turner-Maier, Jessica Alfoldi, Bruce Birren, Oliver A. Ryder, Harris A. Lewin, Benedict

- Paten, Tomas Marques-Bonet, Kerstin Lindblad-Toh, Elinor K. Karlsson. A Comparative Genomics Multitool for Scientific Discovery and Conservation. *Nature*. 2020, 587, 240-245.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2876-6>.
9. Sandra Álvarez-Carretero, Asif U. Tamuri, Matteo Battini, Fabrícia F. Nascimento, Emily Carlisle, Robert J. Asher, Ziheng Yang, Philip C. J. Donoghue, Mario dos Reis. A Species-level Timeline of Mammal Evolution Integrating Phylogenomic Data. *Nature*. 2022, 602, 263-267.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04341-1>.
10. Leslie Grate, Manuel Ares Jr. Searching Yeast Intron Data at Ares Lab Web Site. *Methods in Enzymology*. 2002, 350 (22), 380-392.
[https://doi.org/10.1016/S00766879\(02\)50975-7](https://doi.org/10.1016/S00766879(02)50975-7).
11. Ewa A. Grzybowska. Human Intronless Genes: Functional Groups, Associated Diseases, Evolution, and mRNA Processing in Absence of Splicing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012, 424 (1), 1-6.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.06.092>.
12. Stephen F. Altschul, Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, David J. Lipman. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990, 215 (3), 403-410.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
13. Naruya Saitou, Masatoshi Nei. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*. 1987, 4 (4), 406-425.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
14. Akihiro Nakao, Maki Yoshihama, Naoya Kenmochi. RPB: The Ribosomal Protein Gene database. *Nucleic Acids Research*. 2004, 32, D168-D170.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh004>.
15. Cyrielle Petibon, Mustafa Malik Ghulam, Mathieu Catala, Sherif Abou Elela. Regulation of Ribosomal Protein Genes: An Ordered Anarchy. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*. 2021, 12 (3), e1632.
<https://doi.org/10.1002/wrna.1632>.
16. Frederik Leliaert, David R. Smith, Hervé Moreau, Matthew D. Herron, Heroen Verbruggen, Charles F. Delwiche Olivier De Clerck. Phylogeny and Molecular Evolution of The Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2012, 31 (1), 1-46.
<https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615705>.

(2023年1月31日受理)