

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570007
 研究課題名（和文） 渦鞭毛虫のレンズ眼用器官の研究による光受容器としての眼の起源を分子、形態から探る
 研究課題名（英文） The origin of Dinoflagellate lens-eye from DNA and morphology

研究代表者
 池尾 一穂（IKEO KAZUHO）
 国立遺伝学研究所・生命情報・DDBJ 研究センター・准教授
 研究者番号：20249949

研究成果の概要：

渦鞭毛虫のうちレンズ型の眼を持つもの3種を採集し、cDNAライブラリの作成を終了した。その結果、幾つかの眼に関係する遺伝子候補を発見した。詳細に関しては、現在、論文を準備中である。また、免疫染色により渦鞭毛虫におけるタンパク質の局在を調べたところ、これらのうちのいくつかは、眼に局在もしくは偏在していることが示唆されており、渦鞭毛虫のレンズを持つ器官は、少なくとも機能性分子のレベルでは、他の生物種のレンズ眼に対応する可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

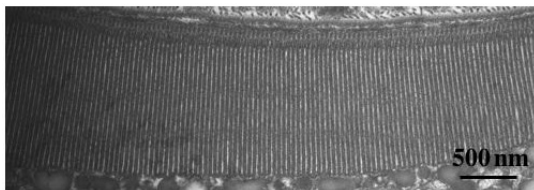
キーワード：進化遺伝、ゲノム

1. 研究開始当初の背景

眼の進化については、ダーウィンの時代より議論的となってきた。眼というものは、光を受け（受容体）、像を作り（レンズ）、それを認識する（神経）という要素がそろって初めて機能するという考え方からすると、眼はその出現時点からこれらの機能を持つ必要があり、簡単なものから複雑な眼に自然選択の力だけで進化することは不可能だとする考え方である。また、タコ等に見られるレンズ眼と哺乳類の眼は、両者の系統的距離に

関係なく非常に似た構造をしていることが知られている。このように複雑で完成された機能を持つ器官が、軟体動物と脊椎動物という離れた系統で出現したことは大きな謎である。近年、眼の共通祖先に関しては分子生物学の知見によりいろいろなことが明らかになってきた。PAX6という眼の発生分化をつかさどる遺伝子の発見である。これは、我々人を含めた三胚葉性の動物全てに存在することが示唆されており、あらゆるタイプの眼の発生を司ると考えられており、例えば、

ショウジョウバエにマウスの PAX6 遺伝子を導入すると、マウスの眼ではなく、ショウジョウバエの眼が形成される。また、もっとも原始的なレンズ眼のひとつであるクラゲの眼の発生にも PAX6 の祖先型と考えられる遺伝子が関与することが明らかになってきている。このことから、我々のレンズ眼、昆虫の複眼は、その形態と仕組みの大きな違いにもかかわらず、発生分化の仕組みは共通していることがわかり、この眼の発生の仕組みは、プラナリアでも保存されていることが明らかになっている (Solo, Ikeo et al. 2003)。では、このような仕組みはいつから存在したのか。全ての眼は起源が単一なのか。そこで、PAX6 の起源を調べたところ、三胚葉性の動物には見つかるが、二胚葉性の動物には見つからない。しかし、クラゲも枝足クラゲや行灯クラゲなどは、レンズを持つ眼を持つことが知られている。しかし、クラゲは眼で得た画像情報を処理するための中脳神経を持たない。一方、分子生物学の手法により、クラゲにおいても PAX6 の祖先型が見つかり、これがやはりクラゲの眼の発生に関与していることが明らかになってきた。したがって、再び、ダーウィンの時代の疑問が復活する。すなわち、眼で見たものを処理する能力もしくは必要性がないのになぜ、眼があるのか?もしくは眼が出来上がったのかという疑問である。そこで、我々が注目したのが渦鞭毛虫である。渦鞭毛虫は単細胞の生き物であり神経細胞は当然持たない。しかし、彼らの一部は、ある意味完成されたレンズ眼を持つ。この渦鞭毛の眼の起源は何か。これに関しては、数は少ないもののいくつかの報告が既に存在する。ただし、眼を持つ渦鞭毛虫は捕食性のため飼育が困難であり、分子レベルの知見はほとんどない。かなり古くから、電子顕微鏡を用いた観察などから渦鞭毛虫の眼は光受容の機能を持つだろうということが指摘されている。また、別な系統の渦鞭毛虫の研究から、彼らの持つ色素体が何度かの副次共生の結果、得られたものであることも指摘されてきている。我々と共同研究グループで、渦鞭毛虫にも光受容に関わる分子が複数存在することを見つけている (未発表)。渦鞭毛虫は、進化的のみならず、単細胞にもかかわらず特殊に分化した小器官を持つという点でもまさに興味深い生物であるといえる。



2. 研究の目的

眼は高度に完成された器官であり、光を受容し外部からの情報を得るための情報器官として広く動物に存在するとともに、機能的にも発生的にも脳と密接な関係を持つ中枢神経の一部と捉えることができる。しかしその形態や個数は動物種毎に非常に多様である。本研究の目的は、『高度な神経器官としての眼の進化を遺伝子発現の制御システムの進化の観点から比較進化学とバイオインフォマティクス的手法により明らかにする』ことである。具体的には、多様な形態の眼を有する無脊椎動物を主な材料として

I、最も原始的なレンズ眼を持つと考えられる渦鞭毛虫から遺伝子発現プロファイルを得ることを目的に EST の取得とその配列決定をおこなう。(各々について、3000 の冗長性のない配列の決定を目標とする)

II、得られた EST 配列を用いて DNA マイクロアレイを作成し、他の種 (マウス、ホヤ、タコ、プラナリア、クラゲなど) と発現を比較することにより遺伝子発現の特徴より神経器官の代表としての眼を定義することを試みる。

III、遺伝子発現プロファイルの比較進化学・情報科学的手法を導入した解析により、眼における発現遺伝子セットの再構築をおこない、機能・形態形成に関する生命システムの進化を調べる。(独自サンプル以外に、現在利用可能なプラナリア、ホヤ、マウス等のデータとの比較をおこなう) 渦鞭毛虫は、色素体を有し独立栄養のものと色素体を持たず従属栄養で生活するものに分かれる。このうち、従属栄養の種は、その形態的特長から色素体が眼点、特定の種ではレンズを有する眼に変化していると考えられている。これは、眼の起源および多様化のメカニズムを考える上で有効な材料となりうることが期待される。

現在、既に渦鞭毛虫のうちレンズ型の眼を持つもの 3 種を採集し cDNA ライブラリの作成を終了した。その結果、幾つかの眼に関係する遺伝子候補と同時に葉緑体に関連する遺伝子候補を見つけることに成功している。また、免疫染色により渦鞭毛虫におけるタンパク質の局在を調べることも可能になっている。

Results-3: Gene Identification based on blast hits

Table Result of Blast hits.
(2) photosynthesis-related genes

Clone Name	Length of EST clone	BLAST hit annotation (Species name)	E-value	Score
W02a12	518 bp	Chloroplast light harvesting complex protein (Heterocapsa)	1e-28	127
W02e05	756 bp	Light harvesting polyprotein precursor (Amphidinium)	2e-15	85
W02g07	631 bp	Photosystem I subunit VII (Cucumis)	6e-29	129
W06a09	755 bp	Chloroplast ATPH isoform 5 (Heterocapsa)	1e-30	135
W12e03	775 bp	Peridinin-chl a protein (PCP) (Heterocapsa)	1e-38	162

3. 研究の方法

2007年度

渦鞭毛虫のうち、従属栄養型でレンズ眼およびネマトシストをもつワルノピアおよびポリクリコスに関して、現在進めているEST配列による解析を進めるとともに、既に獲得済みの光受容関連遺伝子候補、葉緑体関連遺伝子候補の完全長cDNAの獲得と配列決定を行う。得られた配列情報を用いて抗体を作成し、免疫染色を行うことにより眼関連および葉緑体関連遺伝子の産物が渦鞭毛虫における眼に局在しているかどうかを調べる。また、同時に得られた遺伝子配列から分子系統樹を作成し、渦鞭毛虫の色素体の進化的起源を明らかにすることを試みる。また、共同研究者であるスイス・バーゼル大学ゲーリング教授のところへ解析が進んでいる枝足クラゲのレンズ眼関連遺伝子との関係を配列比較に基づく分子進化学的手法を用いて解析を進める。

2008年度

得られた候補遺伝子の配列決定と解析を引き続き行う。また、EST配列解析の結果を、既に申請者が有しているヒト、マウス、ホヤ、タコ、プラナリアおよびスイスの協力者の下で作成されているクラゲESTの結果と比べることにより比較ゲノム解析により遺伝子発現プロファイルの面から渦鞭毛虫の眼が他のレンズ眼と等価なものであるかどうかの検討を進める。

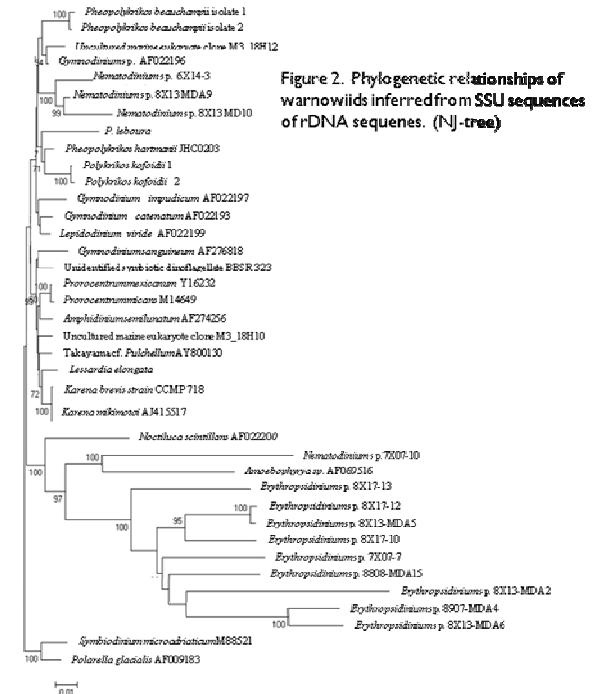
また、各遺伝子のゲノム配列の決定を進めることにより、眼にかかわる遺伝子がどのように進化して来たのかを、上流の転写制御配列を含めて、分進化学的手法およびバイオインフォマティクスを実験的アプローチに加えて総合的に解析をおこなう。

4. 研究成果

2007年度

最も原始的な眼を持つとされる渦鞭毛虫を用いて、EST配列による解析と光受容関連遺伝子候補、葉緑体関連遺伝子候補配列情報を用いて眼関連および葉緑体関連遺伝子の産物の渦鞭毛虫眼における機能解析を進め、同時に得られた遺伝子配列から分子系統樹を作成し、渦鞭毛虫の色素体の進化的起源を明らかにすることを試みたところ、渦鞭毛虫に関しては5千弱のEST解析を終了しており、そのうちから、光常用に関わる遺伝子候補、光合成に関わるもの、神経系に関する遺伝子、また、レンズタンパク遺伝子候補が見つかり、現在、これらの遺伝子の全長cDNA配列の決定を進めているところである。また、いくつかの遺伝子に関しては、渦鞭毛眼における局在を確認するとともに、渦鞭毛眼の電

子顕微鏡による微細構造の解析を進めている。一方、比較対象としてのクラゲに関しては、ゲノム配列解析のためのBACライブラリの作成に取り掛かっており、今後、これを用いて渦鞭毛、クラゲ双方の眼関連遺伝子の分子進化学的比較解析を進める予定である。



2008年度

全ての眼は起源が単一なのか。そこで、我々が注目したのが渦鞭毛虫である。渦鞭毛虫は単細胞の生き物であり神経細胞は当然持たない。しかし、彼らの一部は、ある意味完成されたレンズ眼を持つ。この渦鞭毛の眼の起源は何か。我々は、『高度な神経器官としての眼の進化を遺伝子発現の制御システムの進化の観点から比較進化学とバイオインフォマティクスの手法により明らかにする』ことを目的として比較進化学的解析を進めた。具体的には、多様な形態の眼を有する無脊椎動物を主な材料として

I、最も原始的なレンズ眼を持つと考えられる渦鞭毛虫から遺伝子発現プロファイルを得ることを目的にESTの取得とその配列決定。

II、得られたEST配列を他の種（マウス、ホヤ、タコ、プラナリア、クラゲなど）と発現を比較。III、遺伝子発現プロファイルの比較進化学・情報科学的手法を導入した解析により、眼における発現遺伝子セットの再構築をおこない、機能・形態形成に関する生命システムの進化について研究を進めた。

既に渦鞭毛虫のうちレンズ型の眼を持つもの3種を採集し、cDNAライブラリの作成を終了した。その結果、幾つかの眼に係る遺伝子候補を見つけている。詳細に関しては、現在、論文を準備中である。また、免疫染色

により渦鞭毛虫におけるタンパク質の局在を調べたところ、これらのうちのいくつかは、眼に局在もしくは偏在していることが示唆されており、渦鞭毛虫のレンズを持つ器官は、少なくとも機能性分子のレベルでは、他の生物種のレンズ眼に対応する可能性が示唆された。これらの成果に関しては、現在、投稿論文の準備中である

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Clemente, J.C., Ikeo, K., Valiente, G., Gojobori, T. (2009). Optimized ancestral state reconstruction using Sankoff parsimony. *BMC Bioinformatics*. Feb 7;10:51
- ② Kimura, A., Ikeo, K., Nonaka, M. (2008). Evolutionary origin of the vertebrate blood complement and coagulation systems inferred from liver EST analysis of lamprey. *Dev Comp Immunol*. 33 77-87.
- ③ Jin, L., Ikeo, K., et. al. (2008). The evolutionary relationship between gene duplication and alternative splicing. *Gene*. Dec 31;427(1-2):19-31.
- ④ Hwang, JS., Takaku, Y., Chapman, J., Ikeo, K., David, CN. and Gojobori, T. (2008). Cilium evolution: identification of a novel protein, nematocilin, in the mechanosensory cilium of Hydra nematocytes. *Mol. Biol. Evol.* 25(9): 2009-2017.
- ⑤ Matsuya, A., Ikeo, K., et. al. (2008). Evola: Ortholog Database of all human genes in H-InvDB with manual curation of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res.* Jan;36(Database issue):D787-792.
- ⑥ Nagayoshi, S., Ikeo, K., et. al. (2008). Insertional mutagenesis by the Tol2 transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: *tcf7* and *synembryn*-like. *Development*. Jan;135(1):159-69.
- ⑦ Hotta, K., Mitsuhara, Kenta., Takahashi, H., Inaba, K., Oka, K., Gojobori, T., Ikeo, K. (2007). A Web-Based Interactive Developmental Table for the Ascidian *Ciona intestinalis*, Including 3D Real-Image Embryo Reconstructions: I. From Fertilized Egg to Hatching Larva. *Developmental Dynamics*. 236:1790-1805.
- ⑧ Hwang, JS., Ikeo, K., et. al. (2007). The evolutionary emergence of cell type-specific genes inferred from the gene expression analysis of Hydra. *Proc Natl Acad Sci USA*. 11 ; 107 (37) 14735-14740.
- ⑨ Osato, N. Suzuki, Y. Ikeo, K., Adn Gojobori, T. (2007). Transcriptional interferences in cis natural antisense transcripts of humans and mice. *Genetics*. 176(2) 1299-1306.

[学会発表] (計 10 件)

- ① Hwang, JS., Ikeo, K., et.al. (2008). “Is there a common origin between cnidarian and dinoflagellate nematocysts.” 12th Evolutionary Biology Meeting 2008, (France) 24th September.
- ② Gojobori, T., Hwang, JS., Hayakawa, S., Noda, AO., Imanishi, T., Takaku, Y., Mineta, K., Ikeo, K. (2008). “Evolution of nervous system from the viewpoint of comparative genomic and gene expression.” International Congress of Genetics, (Germany) 12th July.
- ③ 池尾 一穂(2008). 「molecular anatomy の試み - 遺伝子データと形態データ」第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会、大分大学医学部 (大分県由布) 3 月 28 日
- ④ Ikeo, K. (2008). “Evolution of Eye towards the origin of sensory organ” 遺伝研国際シンポジウム：ゲノム進化の新視点から基礎生命活動を探る、如水会館 (東京都千代田区) 3 月 27 日
- ⑤ Hayakawa, S., Ikeo, K., et.al. (2008). “Search for the evolutionary origin of protozoan lens-eye.” The 12th Conference of Peace through Mind Brain, (静岡県浜松市) 2 月 7 日
- ⑥ 池尾 一穂 (2007). 「生物研究におけるデータベースの位置づけ」第三回マリンバイオ先端セミナー、筑波大学下田臨海実験センター (静岡県下田市) 12 月 20 日
- ⑦ 池尾 一穂 (2007). 「遺伝子発現データを用いたネットワーク構築の実際」沼津バイオインフォマティクス講座、沼津産業振興プラザ (静岡県沼津) 11 月 17 日
- ⑧ Ikeo, K. (2007). “Large Scale screening of human transcriptome: An Introduction of Human Genome Network Project.” Bose Institute Bioinformatics Centre. (Kolkata, India) 24th August.
- ⑨ Ikeo, K. (2007). “Large Scale screening of human transcriptome: An Introduction of Human Genome Network Project.” Symposium on Trends in Human Genetics, Toshali Sands (Orissa, India) 21st August.
- ⑩ Ikeo, K. (2007). “The proposal of gene expression data for molecular evolution as an example using the GNP platform.” SMBE 2007 Annual Meeting, Dalhousie University (Halifax, Canada) 28th June.

〔図書〕（計1件）

- ① Mineta, K., **Ikeo, K.** and Gojobori, T. (2008). Landes Bioscience. *Gene Expression in the brain and central nervous system in planarians. Planaria: A Model for Drug Action and Abuse, Edited by Robert B. Raffa and Scott M. Rawls.* 150 ページ

6. 研究組織

(1)研究代表者

池尾 一穂 (IKEO KAZUHO)

国立遺伝学研究所・生命情報・DDBJ 研究センター・准教授

研究者番号：20249949