

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2010

課題番号：19580203

研究課題名（和文）渦鞭毛虫ヤコウチュウの核及びミトコンドリアの先行的小規模ゲノム解析

研究課題名（英文）Genome analyses of nucleus and mitochondria in the dinoflagellate *Noctiluca scintillans*

研究代表者

遠藤 浩 (ENDOHI HIROSHI)

金沢大学・自然システム学系・准教授

研究者番号：20272932

研究成果の概要（和文）：渦鞭毛虫ヤコウチュウの核ゲノム及び近縁種であるオキシリスのミトコンドリアゲノム解析を行った。得られたタンパク質をコードする2遺伝子を用いた系統解析は、ヤコウチュウがオキシリスに次いで祖先的であることを明らかにした。一方、オキシリスのミトコンドリアゲノムは数 kb のミニサークル DNA として存在し、ミニサークル当たり1ないし2個の遺伝子をコードする。さらに、総遺伝子数は4個であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：Genome analyses of nucleus and mitochondria in ancestral dinoflagellates were carried out. Phylogenetic analyses using 2 available protein-coding genes showed that *Noctiluca synthillans* is the next earliest branch after *Oxyrrhis marina*. On the other hand, mitochondrial genome analysis of *O. marina* revealed several peculiar natures of mtDNA. *Oxyrrhis* mtDNA consists of various kinds of minicircle with the sizes of ~ some kb and total number of genes encoded is only 4.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：原生動物学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：進化、原生生物、アルベオラータ、渦鞭毛虫、核ゲノム、ミトコンドリアゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

1990年代の後半以来、原生生物研究は、分子系統学的な解析技術発展とそれに伴う進化系統関係の見直しが大規模に行われ、飛躍的な発展を遂げて来た。真核生物はそれまでの伝統的な五界説の中の4界（動物界、植物界、菌界、原生生物界）から、6または8巨大系統群へと再編され、昨年度出版された生物学事典（東京化学同人）でも新たな分類体系が採用された。この分類体系では、大半

の系統は原生生物が占め、動物や菌類、植物といった従来メジャーだと思われていた分類群はそれぞれ一本の枝に過ぎないことが示され、真核生物は多様な原生生物からなる世界であることが明らかになりつつあった。この大改革は原生生物分類にも大きな影響を与え、それまで系統不明とされてきた原生生物の進化的位置が決定され、また系統的に遠縁だと思われていた分類群が極めて近縁である等の新知見が集まりつつあった。例えば、クロムアルベオラータ巨大系統群はアル

ベオラータとストラメノパイル大分類群からなる。前者は、ヤコウチュウなどを含む渦鞭毛虫類、マラリア原虫に代表されるアピコンプレクサ類、ゾウリムシやテトラヒメナといった繊毛虫類からなり、自由生活性や寄生性生物、従属栄養性原生動物、葉緑体をもつ藻類を含むなど、形態的、生態的には似ても似つかぬ生物群であるが、この三者は最も近縁な系統群であることが明らかにされた。

赤潮の原因生物である渦鞭毛虫類は自由生活種と寄生種の両方を含み、また葉緑体をもつ種（藻類）ともたない種（原生動物）がそれぞれ全体の半分を占める多様な生物群である。渦鞭毛虫類は、すべて寄生虫からなるアピコンプレクサ類ともっとも近縁で（ただし形態はまったく似ていない）、繊毛虫類とはやや遠縁の関係にある。彼らは真核生物の中で唯一ヒストンタンパク質をもたず、特異な進化を遂げて来たと想定されている。

## 2. 研究の目的

実験室内で全生活環をコントロールできる渦鞭毛虫の種は極めて稀で、培養できる種も多くはない。また比較的培養が容易な藻類の研究が多く、渦鞭毛虫（藻）については葉緑体関連の研究が主流で、独立栄養のいわゆる原生動物に属す渦鞭毛虫の研究は少ない。そんな中でヤコウチュウは培養ができる数少ない種のひとつで、19世紀以来記載的な研究が続けられて来た。しかしながら、増殖速度は遅く、高密度培養ができない、全生活環がわかっていないなどやはり扱いが難しい生物であるというデメリットをもっている。

近年、我々はヤコウチュウの生活環を完全に回すことに成功し、特に栄養体と遊走子（配偶子）の形態観察から、ヤコウチュウは渦鞭毛虫の中でもっとも祖先的な形質を保持している種のひとつであり、系統的に古い種である可能性を指摘した（Fukuda and Endoh 2006）。しかしこれまでのところ、ヤコウチュウの遺伝子はrRNA遺伝子と発光に関与するルシフェラーゼ遺伝子が公開されているのみで、系統解析のための遺伝子情報はとても少なく、十分な解析はできない状況であった。ヤコウチュウが祖先的な渦鞭毛虫であることをさらに検証するためには遺伝子情報を増やす必要があり、そのためには核およびミトコンドリアのゲノム解析が不可欠である。本研究の目的はこの状況を改善するために計画された。

なお、本研究期間内にカナダのグループがオキシリス (*Oxyrrhis marina*) の EST 解析を行い、発表した。後述するように、オキシリスは渦鞭毛虫内でもっとも初期に分岐し、次いでヤコウチュウが分岐し、その後栄養体

において二倍体から半数体への核相の転移が生じ、大多数の渦鞭毛虫類が急速に放散し、種数を劇的に増加させた事がわかった（Fukuda and Endoh 2008）。そのため本研究では、オキシリスのミトコンドリアゲノムの解析をあわせて行った。

## 3. 研究の方法

一般的に渦鞭毛虫類はPCRなどの分子レベルでの反応を阻害する物質を多く含む生物が多いことが知られている。本研究でもそういった阻害は経験的に確認されていた。そこで、最初の2年は栄養体からではなく、配偶子を用いて小規模 cDNA ライブラリーの作成を試みた。

ヤコウチュウの有性生殖はまだ実験室内でコントロールすることはできないが、栄養体培養液中に散発的に遊走子形成細胞が分化し、遊走子が出現してくる。これらの細胞をナイロンメッシュで濾過して栄養体を取り除き、遠心して集めた後、RNA を抽出し、cDNA 作成を行った。

3年目以降は、RNA の絶対量を増やすため、大量培養した栄養体からの RNA 抽出を試みた。RNA の抽出には、3種類の異なったキットを使用し、cDNA 作成後クローニング、シーケンスを行った。得られた塩基配列の一部を用いて、系統解析を行った。

オキシリスのミトコンドリア DNA は最初に Hoechst-CsCl 法を用いてトータルDNAから単離した。解析後、遺伝子はすべて 10 kb 以下の環状のミニサークル DNA にコードされていることが本研究室の予備実験（サザンブロット、inverse PCR 等）からわかったため、mtDNA は環状 DNA 抽出キットを用いて単離し、その後のシーケンス解析等に使用した。

## 4. 研究成果

### 1) 遊走子から抽出した cDNA

前述したように、散発的に遊走子形成細胞が培養液中に出現するが、遊走子形成細胞の比率が低いうえ遊走子細胞数は少なく、電気泳動によって検出されるほどの RNA 量は得られなかった。1回のサンプリングで得た RNA からは、cDNA クローンはまったく得られなかった。そのため、12回分のサンプルを貯め、そこから RNA 抽出、cDNA 合成を行い、9個の cDNA 部分断片を得た。すべての断片長は 100 bp 以下で情報が乏しく、おそらく 3' UTR の領域が大半であると思われるが、2クローンは Hsp90 と  $\beta$ -t チューブリンの配列であることが特定できた。この配列をもとにプライマーを設計し、ゲノム DNA を鋳型として PCR により全長の 90% の情報を得た。この二つの遺伝子が真核生物の分子系統解析に広く使わ

れている配列であったのは幸いであった。なぜなら、rDNA を使った解析では、ヤコウチュウの位置は解析方法に依存して、祖先的な位置から進化的に新しい位置までを占めるなど不安定な結果を示し、ヤコウチュウの系統的な位置を特定できないからである。タンパク質をコードする遺伝子を使って、初めてヤコウチュウを含むアルベオラータ内での系統解析を行うことができた。その結果、ヤコウチュウはオキシリスに次いで祖先的であり、渦鞭毛虫類の原始的性質を保持している可能性が大きくなった。また、これらのデータと生活環や遊走子細胞の微細形態をもとに渦鞭毛虫類の初期進化についての理論的シナリオを発表した (Fukuda and Endoh 2008)。要約すると、以下の通りである。

ヤコウチュウの栄養体は、細胞表面の縦方向と横方向に走る典型的な渦鞭毛虫類に共通の特徴を欠き、また染色体は常に凝縮しておらず、オキシリスとともに二倍体の従属栄養性の細胞である。一方、ヤコウチュウとオキシリスを除くその他大多数の渦鞭毛虫 (コア渦鞭毛虫と呼ぶ) はこれらふたつの溝をもちそれに沿って日本の鞭毛が配置している、染色体は常に凝縮しており (ヒストンタンパク質をもたないためと考えられている)、核相は半数体である。このことは渦鞭毛虫の初期進化の過程で、核相の転移が起こり、同時にコア渦鞭毛虫の祖先は典型的な形態的特徴 (常に凝縮する染色体と二つの溝構造) を獲得したということの意味している。祖先的渦鞭毛虫とコア渦鞭毛虫というこれら二つの生物群の特徴をつなぐミッシングリンクとして、ヤコウチュウの遊走子の存在がクローズアップされることとなった。ヤコウチュウの遊走子は、二本の溝をもち、分化の程度の低い二本の鞭毛をもつ。また精子などの配偶子に似た凝縮した染色体をもち、半数体である。この遊走子がネオテニーを起し、有性生殖をすることなく分裂能力を獲得したと仮定すると多くのことが説明できる。特に核相の変化を合理的に説明できる点がこの説の重要なポイントである。半数体化したコア渦鞭毛虫の祖先は、突然変異形質をすぐに発現するため、その後の進化の過程で急速に放散し、様々な種を生み出したと考えられる。

この説は、2回の国際会議 (2008年国際進化原生生物学会 (カナダ)、2009年国際原生動物学会 (ブラジル)) でも発表され、大きな反響を呼んだ。また系統解析の結果についても追従者が現れ、我々の結論を支持する論文が3報発表された。

## 2) 栄養体から抽出した cDNA

栄養体からも cDNA ライブラリーを作製し、約 100 クローンシーケンスしたが、DNA の伸長反応が思わしくなく、配列は 50-100 bp 程度の長さで、得られた情報量は多くはない。

大半が「no hit」または「unknown」という結果であり、ほとんどが 3' UTR 部分のみを増幅させたものと考えられる。異なるメーカーの3種類のキットを使用した結果はすべて同じであった。DNA の伸長反応を阻害する何らかの物質が現状では取り除けていないものと判断している。しかし、3' 側の情報とランダムプライマーを使用して PCR による長い DNA 断片を得ることは可能であろう。今後この方法によって遺伝子を特定できた場合、情報を随時公表して行く予定である。

## 3) オキシリスのミトコンドリアゲノム

カナダのグループが公表した EST 解析情報の中に、2種類のミトコンドリア遺伝子 (Cox1, Cob-cox3 fusion タンパク) の断片が含まれていた。そこでこれらをプローブとしてトータル DNA およびミトコンドリア DNA に対しザンプロット解析を行ったところ、思いがけない結果が得られた。その後の解析を含めて、それらをまとめると以下ようになる。

i) オキシリスの mtDNA は大きなものでも数 Kb の環状 DNA からなる一般にミニサークルと呼ばれる構造をしている、ii) ひとつのミニサークルは基本的に一種類または二種類の遺伝子のみをコードしている、iii) それぞれのミニサークルには極めて多数の多型が存在する、iv) 2遺伝子をコードするミニサークルは、シングルミニサークル間での相同組み換えによって生じた、v) タンパク質をコードする遺伝子は3種類、2遺伝子だけである、vi) LSU rRNA 遺伝子の断片が数種類存在する、したがってミトコンドリアゲノムにコードされる全遺伝子はわずか4種類である。

オキシリスのミトコンドリアゲノムは、最も近縁な系統群であり寄生虫であるアピコンプレクサ類の著しく退化したゲノム (mtDNA サイズは 6 kb 程度、遺伝子数は rDNA を含めてわずか5種類) の構成と酷似している。これは、寄生適応によりミトコンドリアゲノムが退化・縮小したためと考えられている。このことから我々は、渦鞭毛虫類とアピコンプレクサ類の共通祖先は寄生虫であったが、渦鞭毛虫の祖先は分岐後自由生活に戻ったため、あたかも寄生虫のような遺伝子数の減少を伴う退化型ゲノムを保持しているであろうという仮説を提唱した (論文準備中)。

本研究は、最も祖先的であるオキシリスのミトコンドリアゲノムの解析を通して、渦鞭毛虫類とアピコンプレクサ類の初期進化についての見方を大幅に修正するものであり、昨年度の国際会議 (2010年国際進化原生生物学会) で発表され、世界的な権威である複数の研究者から高い評価と論文出版に対する激励を得た。今後、上記の新仮説の検証の

ためにヤコウチュウの mtDNA の解析が重要になるだろう。

最後に、まだ公開していない配列をふくめて、これまでに42の配列を DDBJ に登録済みである。上述した3'UTR のみの情報しかない配列についてはまだ登録しておらず、研究の進展にあわせて随時、登録、公開を予定している。繊毛虫テトラヒメナのゲノムプロジェクトがすでに終了しているが、これまで同定された 28,000 遺伝子のうち繊毛虫類以外の生物グループの遺伝子との相同性が確認されたのはおよそ 12,000 遺伝子だけであり、残りの 16,000 遺伝子はテトラヒメナを含む繊毛虫類だけが保持する繊毛虫特異的な遺伝子であることが判明した。これらを考慮すると、今回解析した、あるいは解析中のヤコウチュウの遺伝子には渦鞭毛虫類だけが保有する特異的な遺伝子が含まれている可能性が高い。これらの遺伝子は赤潮対策のためのターゲット遺伝子として今後役に立つものと期待される。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

1. Akematsu T, Pearlman R. E, Endoh H (2010)  
Gigantic macroautophagy in programmed nuclear death of *Tetrahymena thermophila*. *Autophagy* 6, 901-911. 査読有
2. Akematsu T, Endoh H (2010)  
Role of apoptosis-inducing factor (AIF) in programmed nuclear death during conjugation in *Tetrahymena thermophila*. *BMC Cell Biol.* 11, 13-27. 査読有
3. Fukuda Y, Endoh H (2008)  
Phylogenetic analyses of the dinoflagellate *Noctiluca scintillans* based on beta-tubulin and Hsp90 genes. *Eur. J. Protistol.* 42, 209-219. 査読有
4. Sugimoto H, Endoh H (2008)  
Differentially expressed genes during fruiting body development in the aggregative ciliate *Sorogena stioanovitchae* (Ciliophora: Colpodea). *J. Eukaryot. Microbiol.* 42, 209-219. 査読有

[学会発表] (計9件)

1. Kitada N, Fukuda Y, Endoh H.  
Mitochondrial genome of the ancestral dinoflagellate *Oxyrrhis marina*,

*The 18th International Society for Evolutionary Protistology*, 2010年7月6日, 石川県立美術館 (石川県)

2. 北田菜穂美、遠藤 浩  
ミトコンドリアゲノムからみた渦鞭毛虫類とアピコンプレクサ類の初期進化,  
第43回日本原生動物学会, 2010年11月6日, 茨城大学 (茨城県)

3. 北田菜穂美、遠藤 浩  
祖先的渦鞭毛虫 *Oxyrrhis marina* のミトコンドリアゲノム解析,  
第42回日本原生動物学会, 2009年10月31日, 石巻専修大学 (宮城県)

4. Fukuda Y, Endoh H.  
New details from the complete life cycle and gamete morphologies of the red tide dinoflagellate *Noctiluca scintillans* (Ehrenberg) McCartney,  
*The 13th International Congress of Protistology*, 2009.8.26, Hotel Atlantico Buzios Convention and Resort, (ブラジル)

5. 福田康弘、洲崎敏伸、遠藤 浩  
ヤコウチュウの生活環と渦鞭毛虫の初期進化,  
ユーグレナ研究会第24回研究集会,  
2008年11月15日, 近畿大学 (奈良県)

6. Fukuda Y, Suzaki T, Endoh H.  
Theoretical consideration of early history of dinoflagellates: Haploid core-dinoflagellates might have evolved from a zoospore of ancestral diploid dinoflagellates via neoteny,  
*Protist 2008 Conference (The 59th International Society of Protistology and the 17th International Society for Evolutionary Protistology, Joint conference)*, 2008.7.23, Dalhousie University (カナダ)

7. Fukuda Y, Endoh H.  
Life cycle and phylogenetic position of dinoflagellate (*Noctiluca scintillans*).  
*The 5th European Congress of Protistology and the 11th European Conference on Ciliate Biology (joint conference)*, 2007.7.24, Saint Petersburg State University (ロシア)

8. 福田康弘、遠藤 浩  
ヤコウチュウ (*Noctiluca scintillans*) の全生活環、および形態と分子からみた系統的位置,  
第3回日本進化原生生物学研究会, 2007年7月7日, 海洋研究開発機構横浜研究所 (神奈川県)

9. 福田康弘、遠藤 浩  
渦鞭毛虫の初期進化：遊走子のネオテニーと  
コア渦鞭毛虫の出現,  
第40回日本原生動物学会, 2007.11.18  
富山大学 (富山県)

[図書] (計1件)  
生物学事典、共著 (分担執筆)、  
2010年12月10日、東京化学同人

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠藤 浩 (ENDOHI HIROSHI)  
金沢大学・自然システム学系・准教授  
研究者番号：20272932

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし