

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32702

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23657067

研究課題名(和文) 中心体から得られた新奇DNAの真核生物における網羅的探索

研究課題名(英文) Comprehensive search for homologous sequences obtained from the Eukaryote with the unique DNA in the starfish sperm centrosome.

研究代表者

日野 晶也 (Hino, Akiya)

神奈川大学・理学部・教授

研究者番号：00144113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではイトマキヒトデの精子中心体の分画から発見した新奇DNAが、ヒトデ以外の生物にも保存される中心体特有のDNAであり、中心体を有する多くの真核生物にも同様に相同な塩基配列のDNAが存在すると考えた。また、広く真核生物に共通の分子マーカーとしても貢献すると考えた。そこで、中心体を有する真核生物からの網羅的な探索を試みた。その結果、海綿動物から脊索動物まで、96%以上の相同性が検出された。また、アメーボゾアの粘菌からも96%以上の相同性のあるDNAが検出された。更にコケ植物など、植物からも95%以上の相同配列が確認されたことから、真核生物に広く保存されるDNAであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, we isolated novel DNA from centrosomes in the sperm of the starfish *Asterina pectinifera*. Similar DNA sequences are also found other animal cells and the sperm of liverwort. In the present study, we examined whether this unique DNA contain in the Eukaryotic cells. We performed PCR analysis of total DNA from many Eukaryotic cells with Centrosome Spesfic primer. This pair of primers was designed to specifically amplify novel DNA in the starfish. In the case of *Physarum polycephalum*, we found that the size of PCR products were similar to those of starfish, i.e., approximately 500 bps. We determined nucleotide sequence similarities in the DNA of these PCR-amplified products of Amebozoa. The DNA sequences of *P. polycephalum* showed high homology (96.3% identity) with those obtained from the novel DNA. Our results show that Amebozoa have a conserved sequence that is similar to the novel DNA. This DNA is expected to be a new tool in the study of the origin of the eukaryotes.

研究分野：分子発生学

キーワード：centriole

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の背景は、イトマキヒトデの精子の中心体を含む鞭毛分画より新奇の DNA を発見し(Kawai *et al.*, 1998)、塩基配列の一部が決定できたことで、この DNA が既知の DNA とは異なる新奇 DNA であることが示唆された事に始まる。新奇 DNA は文字通り DNA のデータベースに登録される DNA に一致する配列はなく、また、1本鎖 DNA の可能性を示唆する酵素実験の結果から高次構造を有する新奇の DNA であると予測した。一方、イトマキヒトデから検出されたこの DNA 配列を基に、設計したプライマーを用いて、イトマキヒトデ以外の動物からも、PCR による相同配列が容易に増幅されることから、動物のみならず、中心体をオルガネラとして有する真核生物に広く存在するのではないかと考えた。その根拠として、既にイトマキヒトデ以外にも、ウニやゾウリムシ、珪藻、コケ植物の精子など、繊毛、鞭毛を有する細胞から、イトマキヒトデの新奇 DNA と相同な DNA の塩基配列が検出されたからである(Kawai *et al.*, 2007)。イトマキヒトデの新奇 DNA の塩基配列を基に、増幅し検出できるプライマーが他の生物に対しても有効であることが示唆されたことで様々な生物を対象とする解析が期待されると考えた。

(2) 新奇 DNA は、配列の特徴としてパルンドロームが多い配列的特徴がある。しかし、CS プライマーと名付けたプライマーは、比較的安定して鋳型 DNA と結合できる領域にあると考えられる、これまでの予備的な解析でも比較的容易に PCR による増幅が可能であると考えられた。CS プライマーはイトマキヒトデの塩基配列で設計した配列であるにも関わらず、種を越えてまた動物門を超えて使用可能なプライマーである点も大きな特徴と言える。

(3) そこで、対象生物を真核生物全体に広げ、新奇 DNA の保存性が真核生物にどの程度保持されるのか網羅的探索を試み、新奇 DNA の塩基配列の多様性が検出されるのか、それとも普遍的な高い保存性を有するのかを明らかにしたいと考えた。真核生物に対象生物を広げる意味は、真核生物の進化についても新しい分子マーカーとして、幅広く利用可能なツールになり得るのではないかと考えたからである。

(4) 真核生物に解析対象を広げることで、予測される塩基配列の保存性が真核生物においても高ければ、この DNA は真核生物においても極めて重要な機能に関連する DNA の可能性が高まる。新奇 DNA は現在のところイトマキヒトデ以外の動物の total DNA を鋳型に PCR 法により、増幅される DNA の塩基配列は 95%以上の極めて高い相同性があるが、存在が確認されている生物にとってどのような役割を果たすのかは不明である。しかし、網羅的探索により、真核生物全体に保

存されているならば、未知の重要な役割を担う可能性が高まり、その機能が解明されれば、真核生物共通の DNA として、その起源や進化の解明に繋がる一助になると確信した。

2. 研究の目的

イトマキヒトデから発見された新奇 DNA は、塩基配列の一部がクローニングに成功し、PCR による解析が可能となったことから、特定の約 500 bp を増幅するプライマーとして設計した CS プライマーを用いて、様々な生物を対象に類似配列の探索を目的とした PCR による解析が可能となった。新奇 DNA はイトマキヒトデの精子の中心体分画より発見した DNA であり、中心体の DNA である可能性が高いと考えている。そこで、中心体を有する真核生物がヒトデから発見した新奇 DNA と相同な塩基配列が存在するか否か、中心体を有する生物に共通に存在するかを検証したいと考えた。新奇 DNA が中心体を有する生物において保存されなければ、中心体以外の細胞機能に関連する可能性を考える必要があるが、中心体を有する生物に共通に保存される塩基配列であるとするれば、中心体に関連する何らかの役割を有する可能性が高まると考えた。中心体は真核生物の細胞において、謎の多いオルガネラであり、その起源も役割も多くは謎のままである。新奇 DNA が中心体に関連する DNA であるか否かを解明する 1つの手段として、中心体を有する細胞、生物には必ず存在するならば、その存在意義は高まるとともに、萌芽的研究として芽生える課題になると考えた。そこで、本研究は真核生物で中心体を有するオピストコンタに属する動物、オピストコンタと姉妹群を形成するアメーボゾアに属する粘菌を比較し、これまでに検出される動物と同様に粘菌類にも相同配列が検出されれば、真核生物において、オピストコンタとアメーボゾアを合わせたユニコンタに共通の DNA の可能性を示すことができると考えた。さらに、真核生物は、1鞭毛性の原始真核生物から2鞭毛性の真核生物が分岐してユニコンタ(動物や菌類の祖先型)からバイコンタ(植物など)の起源が分かれたと考えられており、この考え方が真核生物の誕生から進化に至る過程において、鞭毛の数とそれを形成する中心体の存在意義があることを指し示している。そこで、我々が発見した新奇 DNA が真核生物に広く保存される DNA であるならば、CS プライマーによりヒトデの新奇 DNA 配列が様々な真核生物の total DNA を用いた PCR 解析により検出できると考え、網羅的解析を試みた。

3. 研究の方法

動物細胞を用いた total DNA の抽出は QIAGEN 社の DNeasy Bool and tissue Kit を用いて鋳型 DNA を精製した。植物細胞の DNA 抽出は、同じく QIAGEN 社の Plant

mini Kit を用いて DNA 抽出を行った。粘菌からの DNA 抽出は、動物、植物、酵母などの DNA 抽出法では目的の CS プライマーを用いた PCR ができず、改良を加えた。粘菌細胞を予め、Proteinase K で、前処理した後、QIAGEN 社の Plant mini Kit を用いて DNA 抽出を行った。精製した鋳型 DNA を用いて CS プライマーによる PCR を行った。PCR には、QIAGEN 社の Hotstar Taq Master Mix を用いて、step1 ; 95 15 分、step 2 ; 94 1 分、step 3; 59 30 秒、step 4; 72 1 分、step5 ; step2 から step4 を 30 回繰り返し、step6 ; 72 10 分、step7; 4 30 分の条件で行った。増幅された PCR 産物を精製した後、シーケンス反応に用いた。

シーケンス反応は Applied Biosystems の BigDye Terminator v.3.1 Cycle sequencing Kit を用いて、解析には 3100Genetic Analyzer で解析した。塩基配列は、GENETYX-MAC, version 9.0 を用いてアラメントを行った。

4. 研究成果

ヒトデを含む動物では、これまでにヒトデと同じ棘皮動物門に属するパフンウニでは 98% という高い相同性の塩基配列が検出されており、動物においては棘皮動物よりも脊椎動物に近いとされる脊索動物門からホヤを用いた探索を試みた。その結果、新たに、シロボヤ (*Styelaplica*) で 96.1% の相同性がイトマキヒトデの新奇 DNA 配列との比較解析から明らかとなった。その結果を以下の図 1 に示す。

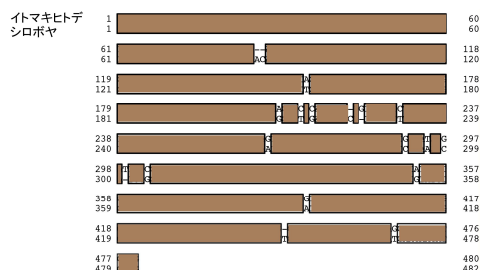


図 1 シロボヤとヒトデの塩基配列の比較

イトマキヒトデの新奇 DNA 配列とシロボヤの間で 96.1% の相同性が確認された。相同性の一致が見られた配列を塗りつぶし、異なった塩基を比較したところ、シロボヤでは 2 塩基の挿入が検出された。その結果、ヒトデでは 480bp の配列であるが、シロボヤは 482bp と 2 塩基ではあるが、増幅される塩基配列が長いことが明らかとなった。この挿入配列は AC と続いており、シロボヤのみに見られる特徴なのか、それとも、脊索動物以降の進化的特徴であるのかは、今後の研究で明らかにしたいと考えている。一方、同じ動物において起源的と考えられる海綿動物門における動物として、クロイソカイメン *Halichondria*

okadia による相同塩基配列の探索の結果、海綿動物からもヒトデの新奇 DNA と同様に、極めて高い相同性を有する塩基配列が PCR により増幅された。クロイソカイメンの total DNA を基に CS プライマーを用いた PCR で増幅された DNA の塩基配列とイトマキヒトデの新奇 DNA の配列を比較した結果を図 2 に示す。

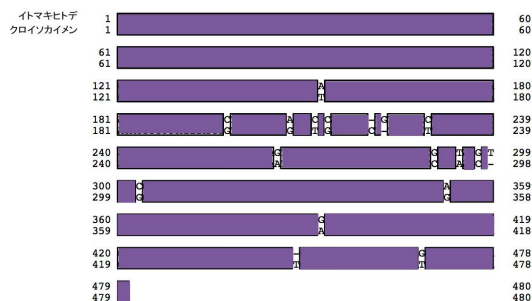


図 2 イトマキヒトデの新奇 DNA 配列とクロイソカイメンの塩基配列の比較

図 2 に示すように、クロイソカイメンから CS プライマーにより増幅された PCR 産物の塩基配列は、イトマキヒトデの新奇 DNA と 96.3% の相同性が解析の結果から明らかとなった。クロイソカイメンにも CS プライマーにより、増幅される類似配列が検出され、その相同性はこれまでに解析された他の動物の結果と同様に 95% 以上の高い相同性が保存されることが明らかとなった。この結果は、新奇 DNA は海綿動物から脊索動物まで広く動物界に保存される DNA であることが示された。この他に、ショウジョウバエやセンチュウなど既にゲノム解析が完了している動物からもカイメン同様にお互いに相同性が高い塩基配列が検出された。

次に、動物、菌類が含まれるグループのオピストコンタに近く、1 鞭毛性の真核生物として同じユニコンタのグループに含まれるアメーボゾアについて解析した結果について示す。アメーボゾアに含まれる生物の代表として粘菌類が上げられる。粘菌類には鞭毛を形成し動物、菌類同様に遊走子を持つ変形菌と鞭毛をもたない細胞性粘菌が含まれるが、動物と同様に中心体を有する変形菌を用いた解析を行った。変形菌のモデル生物でもあるモジホコリ *Physarum polycephalum* から得られた DNA をもとに、これまでと同じく CS プライマーを用いた PCR 解析を行った。モジホコリ (フィザルム) から増幅された PCR 産物もこれまで動物細胞から得られた DNA と同様に、約 500 bp の明瞭なバンドが検出され、この PCR 産物の塩基配列を決定し、イトマキヒトデの新奇 DNA 配列と比較した結果を図 3 に示す。粘菌類のフィザルムの total DNA にイトマキヒトデの新奇 DNA と相同な DNA 配列が検出され、その相同性は 96.3% であった。即ち、粘菌は動物と同じ、ユニコンタに含まれるが、動物と菌類は、粘菌以上に近いグループとして、オピストコンタを形成している。

そのオピストコンタと姉妹群を形成するアメーボゾアに含まれる変形菌（粘菌）のフィザルムから、海綿動物の配列と一致する塩基配列が検出されたことは、この DNA が、オピストコンタとアメーボゾアの両方に保存される DNA であることが初めて示されたと言える。

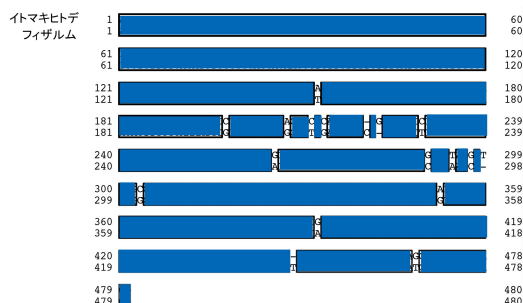


図3 フィザルムとイトマキヒトデの新奇 DNA 配列の比較

さらに、フィザルムから増幅された配列はクロイソカイメンから得られた塩基配列と100%一致した。動物界の生物で比較的原始的と考えられる生物である海綿動物と変形菌が同一の塩基配列を有することは、動物が属するオピストコンタと粘菌が属するアメーボゾアの共通の起源を考える上で重要な発見であると考えられる。この結果は、真核生物のもう一つのグループである植物を含めた比較により、さらに興味深い DNA であることが示唆される。植物は2鞭毛性の真核生物として、ユニコンタ（1鞭毛性の真核生物）から最初に分岐したバイコンタ（2鞭毛性の真核生物）を起源とすると言われている。植物を含めた様々な真核生物の多くはバイコンタであり、繊毛虫（ゾウリムシなど）やミドリムシなどもバイコンタに含まれる（Kawai and Hino 2004）。本研究では植物からは、コケ植物と裸子植物のイチョウとソテツについて比較解析を行った。ソテツについては、まだ十分な解析ができたとは言えないが、コケ植物の3つのグループについては解析ができた。その結果、コケ植物でも、動物、粘菌同様に、イトマキヒトデの新奇 DNA の塩基配列と95%以上の相同性があることが明らかとなった。コケ植物は配偶子に精子を持ち受精により有性生殖を行うことが知られている。コケの精子は2つの鞭毛を持ちこの鞭毛は中心体より形成される。一般的に、植物には中心体はないとされているが、これは誤りで精子を配偶子にもつ、多くの植物には動物の中心体と相同なオルガネラとして鞭毛基部に中心小体がある。従って、コケ植物からもイトマキヒトデの精子中心体から発見した新奇 DNA と相同な DNA が局在する可能性が示唆された。今後は、コケ植物の配偶子である精子を用いて、この DNA の細胞内局在がヒトデと同様に鞭毛基部であることを検証する必要がある。植物の精子においても局在が明らかとなれば中心体もしくは鞭毛基部構造に

普遍的な DNA である可能性もあると考える。コケ植物以外では、裸子植物のイチョウについても既に解析を行いその結果は、海綿動物や粘菌ほどではないが、それでも、イトマキヒトデと95%の相同性が得られている。従って、本研究において動物から植物までの広く真核生物における網羅的研究の第一歩は成し遂げられたと考えている。

イトマキヒトデの精子中心体の分画より発見した新奇 DNA は、ゲノム中には存在しない DNA 配列であるが、(1) PCRにより多くの真核生物の DNA より増幅可能な DNA であること、(2) その配列は広く保存される極めて相同性の高い DNA であり、保存される相同性はいずれも動物では96%以上の相同性があり、植物やゾウリムシなどのバイコンタに含まれる真核生物に於いても95%以上保存されること、(3) 既にゲノム解析が完了している生物（センチュウやショウジョウバエ、ウニ、ヒメツリガネゴケなど）からも増幅された DNA の配列は、データベースに登録されている配列に一致する配列がないことから、イトマキヒトデの精子中心体から発見した新奇 DNA は、イトマキヒトデ以外の真核生物にも広く検出され、真核生物において種を超え、門を超えて、保存されるゲノム以外の DNA であると考えられる。

イトマキヒトデの精子中心体分画より発見された DNA が動物のみならず、中心体を有する多くの真核生物に見出されたことは、驚くべき事実であり、その保存される塩基配列も当初の予測を超えて保存されていることが網羅的解析の結果明らかにできたと考えている。この新奇 DNA がこれまでの核 DNA やミトコンドリア DNA 葉緑体 DNA とは異なり、真核生物において多くの垣根を超えて保存される意味を考えると、保存性の高さ、配列の塩基置換の少なさ、動物のみならず、ゾウリムシやコケ植物、裸子植物など、真核生物が多様性を持ちながら進化する以前から共通に有している DNA 配列の可能性が高い。また多くの真核生物に保存される意味はおそらく、今現在においても必要且つ、普遍的機能や構造に関わる DNA であると考えられる。その意味において、中心体の機能及び複製に関わる未知の役割を担っていると予測するが、これを明らかにするには更なるこの DNA の役割の解明を目指す必要がある。新奇 DNA は PCR により容易に増幅できる塩基配列は少なくとも数回の繰り返し配列であることが示唆されており、全容解明を果たしたいと考える。

このように、新奇 DNA はおそらく核 DNA でもミトコンドリア DNA でもなく、新しいカテゴリーに分類される DNA であると考えられる。現在の DNA のデータベースには、このような新しいタイプの DNA を想定した登録制度がない。本研究を発展させることで新奇 DNA を登録する新たな登録システムの提案を予定している。

引用文献

Kawai S, Azumi Y, Kato HK and Hino A(1998)
Isolation, purification and analysis of
nucleic acids from a sperm tail fraction
in *Asterina pectinifera*. *Zygote* 6: 138.

Kawai S, Watai E, Sano T, Inoue K and Hino
A (2007) Detection of the centrosomal DNA
from the sperm of bryophyte *Marchantia*
polymorpha L. and *Physcomitrella patens*.
Science Journal of Kanagawa Univ. 18:
19-25.

Kawai S and Hino A (2004) Detection of
unique DNA localized on the basal bodies
from isolated cilia of *Paramecium caudatum*.
Zool. Sci. 21: 1286

6 . 研究組織

(1)研究代表者 日野 晶也
(Hino Akiya)

神奈川大学・理学部・教授

研究者番号： 00144113

(2)研究分担者 河合 忍
(Kawai Shinobu)

神奈川大学・総合理学研究所・客員研究員

研究者番号： 00409989

(3)研究分担者 出川 洋介
(Degawa Yosuke)

筑波大学・生命環境科学研究科(系)・助教

研究者番号： 00311431