

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

研究代表者の専門分野：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、原生物、繊毛虫、渦鞭毛虫、アルベオラータ、核分化、ミトコンドリア

1. 研究計画の概要

繊毛虫テトラヒメナとヒメゾウリムシのゲノムプロジェクトが終了した。それらの解析によれば、これまで同定された 28,000 遺伝子のうち他の生物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、残りの 16,000 遺伝子はテトラヒメナだけが持つ特異的な遺伝子であることが判明した。これらのことはきわめて示唆的である。

ヤコウチュウは、渦鞭毛虫類の中でもっとも祖先的な系統的位置を占める古い系統のひとつである（Fukuda & Endoh, *Eur. J. Protistology* 44:27-33, 2008）。ヤコウチュウも繊毛虫類と同様に、赤潮生物を多く含む渦鞭毛虫類に特異的な遺伝子を多数持つことが予想される。アルベオラータに属す他の生物（いくつかの渦鞭毛藻類、マラリア原虫などのアピコンプレクサ類、テトラヒメナやゾウリムシなどの繊毛虫類）のゲノム解析との比較により、渦鞭毛虫類にのみ存在する遺伝子の同定を行う。このような遺伝子の存在は、他の生物に影響を及ぼすことなく、ヤコウチュウをふくめた渦鞭毛虫類の増殖を制御するための新たな方法の開発の可能性を追求するものである。

ヤコウチュウの先行的ゲノム研究の第一段階として、配偶子細胞をもとに核および

ミトコンドリアゲノムの小規模 EST プロジェクトの遂行を目指す。

2. 研究の進捗状況

ヤコウチュウは分裂速度が遅く、大量培養がむずかしい。配偶子形成細胞から生じた少量の配偶子集団から RNA を抽出し、随時 cDNA を合成してストックした。合成された cDNA サンプルごとに、少量の cDNA を用いて既存の遺伝子（18S rDNA や β -チューブリン等）が RT-PCR により増幅するかどうかを確認した。PCRが成功したサンプルを用いて、少量の cDNA ライブラリーを製作した。

大量培養系の構築、配偶子形成の誘導条件の検討も行っているが、十分な量の RNA が確保できておらず、cDNA のストック作りをさらに継続中である。

核ゲノムについては、一回の培養から得られる RNA の収量がきわめて少ないため、現在も小規模ながらくり返し cDNA ライブラリーを作成し、解析遺伝子数を増やしつつある。cDNA ライブラリーの規模を大きくするための方法を検討しているが、残念ながら現在のところ良い方法は見つかっていない。

ミトコンドリアゲノムについては、本研究室でクローニングしたヤコウチュウの *Cox1* 遺伝子の断片以外は同定されていない。一方

ヤコウチュウよりも古い系統の渦鞭毛虫であるオキシリス (*Oxyrrhis marina*) から mtDNA の単離に成功し、ほぼゲノムの全貌が明らかになった(論文準備中)。これまでに見つかった遺伝子は、*Cox1*、*Cob-Cox3* 融合タンパク質を作る遺伝子と、LSU rRNA 遺伝子の数種類の断片である。もっとも祖先的な渦鞭毛虫であるオキシリスのミトコンドリアゲノムは、わずか2~3個のタンパク質をコードする遺伝子とrDNAのみをコードする可能性が極めて高くなった。このミトコンドリア遺伝子数の極端な少なさ、マラリア原虫に代表される近縁なアピコンプレクサ類と同様である。このことは、渦鞭毛虫類とアピコンプレクサ類の共通祖先の段階で、ゲノムの縮小化が起こったことを強く示唆するものであり、両生物群の進化を考える上で重要な知見が得られたことを意味する。

3. 現在までの達成度

やや遅れている。

(理由)

根本的な困難さのために、達成度は高いとは言えない。また、上述したように、ヤコウチュウは分裂速度が遅い上に、大量培養がむずかしい。自然界では赤潮のようにしばしば大量増殖することもあるにもかかわらず、実験室内での高密度の培養系がまだ確立していないことによる。そのため、十分量のRNAを得ることにまだ成功していない。さらに細胞由来の反応を阻害する物質の混入等により、分子レベルでの実験(PCR、逆転写等)はしばしば阻害される。当初の計画では配偶子からRNAを抽出することでこの問題をクリアできると考えていたが、配偶子形成細胞の出現は夏季に多いとはいえ偶発的であるので、大量の配偶子細胞を用意することは難しいことが明らかになった。

4. 今後の研究の推進方策

能登半島周辺で発生する赤潮は、ヤコウチュウがほとんどを占めるケースがしばしば見られる。このように大量発生した赤潮を採取し、大量のヤコウチュウの細胞集団からRNAを抽出することで、この困難さを克服することができるかもしれないと現

在考えている。実験室内での培養から少量の遺伝子ライブラリーを制作することと同時進行で行う計画である。

渦鞭毛虫類に特異的な遺伝子の探索、分子系統解析は継続して行って行く予定である。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文](計3件)

1. 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

2. 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

3. Sugimoto H, Endoh H (2008) Differentially expressed genes during fruiting body development in the aggregative ciliate *Sorogena stoianovitchae* (Ciliophora: Colpodea). *Eur. J. Protistol.* 42, 209-219. 査読有

[学会発表](計7件)

1. 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)

2. Fukuda Y, Suzuki 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. Protist2008 (ISOP 59th and ISEP17th joint conference), 2008.7.23. Dalhousie University, Halifax (Canada)