

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月17日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657024

研究課題名（和文） ハテナ・アレニコラの次世代シーケンスを用いた核ゲノム解析

研究課題名（英文） Nuclear genome analyses of *Hatena arenicola* using by next generation sequencing

研究代表者

井上 勲 (INOUE ISA0)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：70168433

研究成果の概要（和文）：カタブレファリス類に属するハテナ・アレニコラは細胞内に一時的に共生藻を保持し、二次共生の中間段階にあると考えられている。しかし、本生物は培養ができないため、核ゲノム解析に十分な DNA 量を確保することが困難である。そこで、本生物の1～数細胞を全ゲノム増幅試薬に供し、どの程度その核ゲノムが解読できるか確かめることを目的とし、研究を行った。結果、ハテナ複数細胞を用いた場合、ハテナ由来の配列を得ることに成功したが、得られた配列のうちの約9割が2-4塩基の繰り返し配列であった。残りの約1割の配列に対し、BLASTxを行った結果、ハテナ由来と思われる配列が得られたが、この情報量ではハテナの核ゲノム全体をカバーするには非常に難しく、さらなる条件検討が必要であると判断した。

研究成果の概要（英文）：*Hatena arenicola*, a kathablepharid flagellate that maintains endosymbiotic algae temporary, is considered to be in the intermediate stage of secondary endosymbiosis. However, it is difficult to get an enough amount of DNA from *H. arenicola* because the flagellate cannot be cultured. Thus, we study the possibility of the genomic analyses using DNA amplified from single or a few cells. We succeeded to get genomic DNA sequences from plural cells of *H. arenicola*, but the most reads (about 90%) consisted of 2-4 base pair repeated sequences. We performed BLASTx for the remaining 10% reads and identified possible sequences originated from *Hatena* genome. However, it was difficult to cover the whole nuclear genome of *Hatena* using these sequences, thus we concluded that further examination is necessary.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	2,500,000	0	2,500,000
平成23年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	180,000	3,280,000

研究分野：植物系統分類学

科研費の分科・細目：生物多様性・分類

キーワード：ゲノム、細胞内共生、進化

1. 研究開始当初の背景

大昔、シアノバクテリアが捕食性真核生物

に細胞内共生することで葉緑体が誕生した。この事を一次共生と呼ぶ。一次共生によって生じた一次植物が、別の捕食性真核生物に細胞内共生することによって、二次共生が起こり、二次植物が誕生した。さらに二次植物が他の捕食性真核生物に取り込まれる三次共生の例も報告されている。現在の真核生物ドメインを見渡すと、一次共生はたった2回だけ起こったことが示唆されるが（緑色植物・紅色植物・灰色植物で一度、ケルコゾア *Paulinella chromatophora* で一度）、二次共生及び三次共生、つまり真核生物同士の共生は一次共生よりも数多く報告されている。このことは、真核生物同士の共生は、原核生物と真核生物とのそれよりも起こりやすく、二次共生や三次共生という現象が真核生物の多様性に大きく寄与している事が示唆される。このような共生の過程で、共生藻から宿主ゲノムへの遺伝子水平転移が必須であるが、二次共生でも三次共生においても、その共生初期にどのような遺伝子が水平転移をしたのかについては、現在までほとんどわかっていない。

2005年、我々はハテナと呼ばれる単細胞真核生物を発見した。ハテナはその共生藻として緑色植物ネフロセルミス（*Nephroselmis*）を細胞内に共生させているが、ネフロセルミスは細胞分裂時に片方の娘細胞にのみ受け継がれ、ハテナと共生藻の細胞分裂は完全には同調していない。この現象から、ハテナは二次共生の初期段階にあると捉えることができる。そこで、私たちは二次共生の初期にどのような遺伝子が共生藻から宿主ゲノムに移るのかを知ることがを目的に、ハテナの核ゲノム解析を計画した。しかしながら、現在までハテナの培養には成功していない。そこで、本研究では、将来的にハテナの全核ゲノムを解読する第一歩として、ゲノム増幅試薬を用いて、1～数細胞からどの程度、ハテナの核ゲノムを解読することができるか確かめることを目的とした。これらの研究を行うことにより、細胞内共生にはどのような遺伝子が“キー”になって、共生が成立するか、つまり細胞内共生の“原因遺伝子”が明らかになることが期待される。

## 2. 研究の目的

全ゲノム増幅試薬を用いてハテナ1～数細胞からどの程度、その核ゲノムを解読することができるか確かめることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ハテナの採集

ハテナはその生活環の中で、共生藻を持つ

植物相と共生藻を持たない捕食相という2つのステージを持つ。本研究では、共生藻由来ゲノムのコンタミが少ないと思われる捕食相のステージのハテナを和歌山市磯の浦海水浴場で採集後、使用した。

### (2) ハテナ1細胞からのゲノムDNAの増幅

(1)で採集したハテナ細胞をマイクロピペット法で1細胞ずつ単離し、付着したバクテリア除去のため、複数種の抗生物質の入った培地の中に入れて数日間培養した。その後、ddH<sub>2</sub>Oの入ったPCRチューブにハテナ細胞を再度単離して、全ゲノム増幅試薬を用いてハテナのゲノムDNAを増幅させた。

### (3) 次世代シーケンス解析へ供するDNAサンプルの選抜

(2)で調整したDNAを鋳型とし、18S rDNA遺伝子を増幅させた。その後、DNAシーケンサーで増幅させた遺伝子の配列を決定した。この結果から、ハテナのゲノムDNAが適切に増幅されているか確認した。また、葉緑体コード16S rDNA遺伝子プライマーを用いて、共生藻由来の遺伝子とそのサンプルで増幅されないかも確認した。これらのシーケンス結果により選抜されたサンプルを精製し、次世代シーケンス解析に必要なDNA量が含まれているかどうか、サンプルのDNA量を測定し、最終的に次世代シーケンス解析に供するサンプルを選抜した。

### (4) 次世代シーケンサーによる配列解析

以上の過程を通して得られた2つのDNAサンプルについて、文部科学省科学研究費新学術領域研究『生命科学系3分野支援活動』により、Roche 454 GS FLX Titaniumを用いて、それぞれ1/4プレートの解析が行われた。2つのうち、片方のDNAサンプルからハテナ由来の配列が得られたので、同じサンプルをさらにシーケンシングするつもりであったが、2011年3月11日に起こった震災により、サンプルが失われてしまったので、新たにサンプルを調整した。新たに調整した1DNAサンプルについて、タカラバイオ株式会社の受託シーケンシングに外注し、Roche 454 GS FLX+にて、1/2の解析を行った。

### (5) 得られた配列のアセンブルおよび相同性検索

これらの解析で得られた配列をアセンブルするとともに、BLASTxまたはBLASTnを用いて、配列の相同検索を行い、ハテナ由来および共生藻由来の遺伝子の探索を行った。

## 4. 研究成果

1細胞のハテナを用いて、全ゲノム増幅試薬により、1st・2ndの2回の反応を経て、ハテナの全ゲノム増幅を行なった。ハテナのゲノムが適切に増幅されていることを調べるため、18S rDNAプライマーを用いて、そのクオ

リティチェックを行ったが、ハテナ18S rDNAの増幅が認められたサンプルは1つもなかった。そこで、ハテナ複数細胞を用いて、同様に1st・2ndの全ゲノム増幅を行った。その結果、2サンプルにおいて、ハテナ18S rDNAの配列が確認された。ハテナ18S rDNAの配列が確認された2サンプルについて、Roche 454 GS FLX Titaniumを用いて、各々252,613リード、168,607リードを取得した。それぞれのリードをNewblerでアセンブルし、各々741本のコンティグ・45,704本のシングルトン、7,397本のコンティグ・52,256本のシングルトンを得た。これらの配列をBLASTxで、データベース上の配列との相同性検索をした結果、1つのサンプルは配列のほとんどがBoviniにヒットし、何らかの細胞が実験過程でコンタミネーションした可能性が示唆された。もう1つのサンプルからは、ハテナおよびその共生藻と思われる配列が得られた。

今回取得した配列数では情報量が少ないため、2つ目のサンプルをさらにシークエンスしようと計画していた。しかし、2011年の3月11日の震災により、2つ目のサンプルが紛失してしまった。そのため、2つ目のサンプルを作ったときと同じ1st産物を使い、2nd全ゲノム増幅を行った。このサンプルを外注に出し、Roche 454 GS FLX+にて、589,004リードを取得した。しかし、得られたリードの約9割に2-4塩基の繰り返し配列を多数含むリードが見られ、アセンブル開始から2週間経ってもアセンブルの進捗が見られなかった。そのため、解析に出したサンプルをこれ以上シークエンスしても全ゲノム解析に使えるサンプルが得られないと判断し、解析を中断した。得られた残りの約1割の配列について、BLASTxにて相同検索した結果、細菌・ウイルス由来の配列や後生動物・ストラモノパイル・アルベオラータなどにヒットする配列が得られた。細菌やウイルス由来の配列に関しては、ハテナ細胞内に含まれていた生物由来だと考えられる。また、それ以外の真核生物にヒットした配列に関しては、データベース上にハテナに近縁な生物由来の配列がないため、様々な分類群の配列にヒットしたと考えられる。

これらの結果から、ハテナにおいては細菌やその他の原生生物で行われているようなシングルセルからのゲノム増幅は難しいことがわかった。これは、細胞から核のみをマイクロマニピレーターで単離した場合でも同様だった。ハテナ複数細胞からの全ゲノム増幅では、ハテナ由来と思われる配列を取得することに成功したが、得られた総リードのほとんどが2-4塩基の繰り返し配列であり、今後は

全ゲノム増幅の際のさらなる条件検討が必要であると考えられる。

#### 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5件)

1. Y Kodama, I Inouye & M Fujishima. Symbiotic *Chlorella vulgaris* of the ciliate *Paramecium bursaria* plays an important role in maintaining perialgal vacuole membrane functions. *Protist* 162: 288-303 (2011). 査読有 DOI:10.1016/j.protis.2010.06.005
2. T Nakayama, Y Ikegami, T Nakayama, K Ishida, Y Inagaki & I Inouye. Spheroid bodies in rhopalodiacean diatoms were derived from a single endosymbiotic cyanobacterium. *J. Plant. Res.* 124: 93-97 (2011). 査読有 DOI: 10.1007/s10265-010-0355-0
3. T Matsumoto, F Shinozaki, T Chikuni, A Yabuki, K Takishita, M Kawachi, T Nakayama, I Inouye, T Hashimoto & Y Inagaki. Green-colored plastids in the dinoflagellate genus *Lepidodinium* are of core chlorophyte origin. *Protist* 162: 268-276 (2011). 査読有 DOI: 10.1016/j.protis.2010.07.001
4. H Yamaguchi, T Nakayama, A Kai & I Inouye. Taxonomy and phylogeny of a new kleptoplastidal dinoflagellate, *Gymnodinium myriopyrenoides* sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae), and its cryptophyte symbiont. *Protist* 162: 650-667 (2011). 査読有 DOI: 10.1016/j.protis.2011.01.002
5. H Yamaguchi, S Suda, T Nakayama, RN Pienaar & I Inouye. Taxonomy of *Nephroselmis viridis* sp. nov. (Nephroselmidophyceae, Chlorophyta), a sister marine species to freshwater *N. olivacea*. *J. Plant Res.* 124: 49-62 (2010). 査読有 DOI: 10.1007/s10265-010-0349-y

[学会発表] (計5件)

1. 山口晴代・井上勲、渦鞭毛藻に見られる現在進行中の共生現象、日本地球惑星科学連合2011年度連合大会、2011年5月26日、幕張メッセ
2. 井上勲、藻類から見た地球進化と地球環境、日本地球惑星科学連合大会2011年度連合大会、2011年5月26日、幕張メッセ

3. 笠井文絵・川井浩史・井上勲・中山剛・河地正伸・中山卓郎・石渡邊信・山岸隆博・石田健一郎・渡邊信、NBRP「藻類」：未来を支える藻類リソース、第33回日本分子生物学会、2010年12月7日-10日、神戸国際会議場
4. 河地正伸・川井浩史・井上勲・中山剛・石田健一郎・渡邊信・羽生田岳昭・山岸隆博・甲斐厚・中山卓郎・笠井文絵、NBRP「藻類」：日本における藻類の収集・保存・提供-ナショナルバイオリソースプロジェクトの活動、第62回日本工学会大会、2010年10月27日-29日、宮崎市シーガイア
5. 山口晴代・中山剛・井上勲、*Hatena arenicola* は近縁な複数種の *Nephroselmis* を共生体とする、第74回日本植物学会、2010年9月11日、中部大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井上 勲 (INOUE ISAO)  
筑波大学・生命環境系・教授  
研究者番号：70168433

### (2) 研究分担者

中山 剛 (NAKAYAMA TAKESHI)  
筑波大学・生命環境系・講師  
研究者番号：40302369