

ミジンコ(*Daphnia Magna*)遺伝子の網羅的解析

●勝 義直 ◆渡邊 肇 ◆井口泰泉

自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター

〈研究の目的と進め方〉

動物プランクトンであるミジンコは生態系の中でももっとも下位に位置し、生態系において非常に重要な位置を占めている。またミジンコは、その生活環の全てを水中で過ごすことから、環境の指標としても重要な生物であり、長年、環境や毒性の評価などにおいて、世界中の研究室で利用されてきている。特に近年、地球環境の重要性が認識されるにつれ、環境指標の生物としての重要性を増してきている。

ところが、ミジンコの重要性が認識されてきているにもかかわらず、その遺伝子情報は驚くほど乏しい。例えばNCBIのデータベースでは、*Daphnia*で登録されている遺伝子はわずか271遺伝子でその大半がリボソームRNAとヘモグロビン遺伝子であり、実際にアノテーションされている遺伝子は12種類に過ぎない。様々な生物種のゲノムやEST情報が読まれているなかで、環境の指標として今後重要性を増して行くであろうミジンコにおけるこの遺伝子情報は皆無に近いといえる。そこで本研究では、ミジンコについての基本的な遺伝情報を取得することを目的として、まずEST解析を行い、データの収集と解析を行う。

〈研究開始時の研究計画〉

ミジンコ(*Daphnia Magna*)からRNAを調製し、オリゴdTを用いてcDNAライブラリーを作製する。ミジンコ(*Daphnia Magna*)は、大型で飼育しやすい点、比較的毒性物質に敏感な点などから毒性試験の標準標準生物として各国で用いられている種である。対象とする系統は、環境研究所で長年維持されているほとんどオスを産まない(0.1%以下)系統を用いる。この際に、3つの集団のミジンコを用いた3種類のライブラリーを作製する。即ち、一つは野生型でほとんどオスを産まない集団。もう一つは、メトプレンによって100%オスを産むように変化した集団、もう一つは全てオスの集団を用いる。従来は、オスの数が非常に少なくオスだけを選択し、解析に供することは困難であったが、我々の系を用いることにより、全てオスの集団を得ることが可能になり、オスのRNAを調製することが可能になった。

これらのcDNAライブラリーを用いて、EST解析を行う。この際に、最低限ライブラリーの5'から及び3'からのワンパスシーケンスを行い、ミジンコEST配列のデータベース化を行う。このEST解析においては、現有の通常のDNAシーケンサーでは能力的に不足しており、総括班の設備の借用を依頼したい。データベース化に関しては、すでに研究所内でも別の生物種のEST配列などに関して実績があり、実施可能である。このデータベースに関しては、クラスタリング解析など一連の解析の後になるべく速やかに公開することにより、全体に貢献する。

さらにこれらの情報を基盤としてオスとの間で発現の異なる遺伝子を明らかにする。また野生型とオスしか産まないミジンコにおいて発現の異なる遺伝子を明らかに

する。前者からは、ミジンコの性特異的に発現している遺伝子の同定、後者からは単為生殖と両性生殖との差に関連した遺伝子の同定を目標とする。

〈研究期間の成果〉

*Daphnia Magna*からRNAを調製し、ポリARNAを精製した後に、オリゴdTを用いてcDNAライブラリーを当該年度に作製した。このcDNAライブラリーを用いて、EST解析を行った。EST解析にあたっては、ランダムに選択したクローンの5'から及び3'からのワンパスシーケンスを行った。得られた配列情報をもとに、コンテグ解析を行い、ミジンコEST配列のデータベース化を行った。

このRNAのソースとしては、(1)野生型でほとんどオスを産まない集団、(2)オスを産むように変化した集団、(3)生まれてきたオスの集団の3種類を用いた。これらの遺伝子を網羅的に解析することにより、単に基本的な遺伝子情報を取得できるのみならず、通常は単為生殖を行っているミジンコについて、その性差に関連した遺伝子について明らかにできると考えた。特にミジンコは環境の悪化により両性生殖に移行することが知られていることから、環境刺激と生殖機構の関連の解明の糸口となる。

〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究の実施と時期を同じくして国際的に*Daphnia* Genome Consortium が立ち上がり、*Daphnia*に関する系統、ゲノム情報、遺伝子操作技術開発に関して討議が行われた。本研究の実施年度にあたる2003年11月に開催された会議では、本研究により*Daphnia*に関してEST解析を行うことが決定していたために、非常に高い関心を持たれた。米国を中心とする*Daphnia* Genome Consortiumは、この時に*Daphnia pulex*という*magna*と近縁の種について、ゲノム配列の取得、EST配列の取得を正式に決定した。

*Daphnia*に関する遺伝子情報については、EST配列取得時は、一時的に我々のデータベースが一番の情報を有していたが、2006年1月時点で、*Daphnia pulex*のゲノム配列の解析は終了しており、EST配列に関しても100万に至り、状況はこの1-2年で大きく変化している。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

EST配列の取得が予想外に時間がかかり、年度内の種々の計画を変更せざるを得なかった。実際にEST配列が判明したのは、2004年度後半になってしまい、連続性のある研究の提案、進行が非常に困難であった。

〈今後の課題〉

*Daphnia*は環境毒性を評価する上でも基準となる生物種であり、今後環境への関心の高まりにあわせて重要度が増すと思われる。米国がモデル生物などについていち早く*Daphnia*のゲノム解析に取り組んだのもその現れで

ある。現在米国でも企画している *Daphnia magna* のゲノム解析が進めば、比較ゲノム学的にも、環境生物学的にも重要な知見が得られると思われる。

また、*Daphnia* に関しては、現在遺伝子操作ができない。今後こうした基礎的技術の開発も必須である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

Daphnia magna EST data base (Daphnia base)

<http://daphnia.nibb.ac.jp>