

原始紅藻のゲノム解析に基づく真核生物の成立と進化に関する研究

●黒岩 常祥¹⁾ ◆佐藤 直樹²⁾ ◆野崎 久義³⁾ ◆田中 寛⁴⁾ ◆太田 にじ⁵⁾ ◆中村 宗一⁶⁾
 ◆牧野 龍¹⁾ ◆花井 亮¹⁾ ◆今井 竹夫¹⁾ ◆真島 恵介¹⁾

1) 立教大学理学部生命理学科 2) 東京大学大学院総合文化研究科 3) 東京大学大学院理学系研究科 4) 東京大学分子細胞生物学研究所
 5) 埼玉大学理学部分子生物学科 6) 琉球大学理学部海洋自然科学科

〈研究の目的と進め方〉

Cyanidioschyzon merolae (以下シズンとする)は、高温(45°C)、高硫酸、強酸性(pH1.5-2.5)の、いわゆる極限環境の温泉に生息する原始紅藻である。シズンは、細胞の直径が僅か1-2ミクロンと大腸菌に近いサイズであるが、真核生物特有の複膜系(細胞核、ミトコンドリア、葉緑体)と単膜系の細胞小器官(小胞体、マイクロボディ、ゴルジ体)をそれぞれ1個ずつ持っている。またそれらの細胞小器官をほぼ完全に同調的に分裂させ、且つ分離できることができる唯一の真核生物である。これまで細胞核のゲノムサイズはパルスフィールド電気泳動実験(Malezka,1993,Takahashi et al. 1993)で11.7-12.2メガ塩基対、VIM顕微測光で16.4メガ塩基対(Toda et al. 1995)と推定されている。このようなことから、シズンが真核生物の極めて「基」に近い生物と考えられた。

本研究の目的は、シズンのこのような特質に注目して、真核生物の起源と進化の解明を主眼に、真核植物や真核生物の最小の遺伝子セットの解明、オルガネラの分裂機構や細胞の極限環境への適応機構など、真核生物のもつ普遍的な生命原理を、独自に解読したゲノム情報を基盤に解明することである。

〈研究開始時の研究計画〉

ゲノム解読をおこなうにあたり、シズンのゲノム構成についてパルスフィールド電機泳動(PFGE)法により再度確認をおこなった。なぜならこれまでのゲノムサイズの推定値は11-16メガ塩基対と幅があり、また研究開始時点において機能の判明しているシズンの遺伝子は僅か9個であり、遺伝地図や物理マップ等は存在せず、前提となるゲノム情報が極めて少なかったからである。PFGEの結果によると染色体数は17本で、ゲノムサイズはおおよそ14.2M塩基対であることが示唆された。

ゲノム解読はゲノムサイズ、またマップ等が存在していないこと等を総合的に勘案して、ホールゲノムショットガン(WGS)法を採用する事にした。解読に先立ち解読用のゲノムDNAの調製を行ったが、トータルDNAではミトコンドリアや葉緑体といった細胞小器官のDNAが30%程混入していることが判明し、核ゲノム解析の妨げになることが明らかとなった。そこで塩化セシウム、ヘキストの密度勾配超遠心法を繰り返し、核ゲノムを純化して解析に資した。当初の目標としてはシズンゲノムの配列と遺伝子の全体像を把握するという事で、約15メガ塩基対のゲノムを10x分解読するだけの30万リードについてシーケンスを行う計画を立てた。また、ある程度アセンブルが進んでコンティグがまとまってきた時点でアノテーションも行う事とした。

〈研究期間の成果〉

国立遺伝学研究所のシーケンスセンター(小原雄治教授)に於いて、WGSクローンを取り始めてからおおよそ3ヶ月で、当面の目標としていた約30万リード、いわゆるドラフト配列である総延長314メガ塩基対の塩基配列の解

読を終えた。Phrapによりアセンブルをおこなったところ、928のコンティグが形成された。この時点での推定ゲノムサイズは17.3メガ塩基対であった。予想以上の短期間で核ゲノムの配列情報の概要が明らかとなった。しかし、依然として染色体とコンティグの関係は不明のままであった。そこで得られたコンティグの末端領域にプローブを設計して、PFGEで分離した染色体に対してサザンハイブリダイゼーションを行うことにより、それぞれのコンティグと染色体の関係を明らかにしていった。この作業の結果、染色体数は当初の予想の17本ではなく、20本であることが推定された。

続いて染色体上におけるコンティグの向きと位置関係を明らかにし、その間のギャップ領域の配列を決定することとした。その為にはコンティグ間をブリッジするようなサイズの大きなゲノムクローンの獲得が必須であった。そこでBACライブラリの構築を、慶應大学医学部分子生物学教室(清水信義教授、浅川修一講師、石井康幸研究員)との共同研究でおこなった(31)。インサートサイズが50キロ塩基対と100キロ塩基対のライブラリを構築し、クローンの末端配列を解読してコンティグの位置関係と距離を明らかにした。研究開始当初は、ドラフト解析での公表という考えもあったが、なるべく完成に近い形での発表という方針に変更し、可能な限りギャップ領域を埋める事とした。当課題の計画研究期間の大半である3年を費やして、コンティグの修正やPCRブリッジングをおこない、論文発表時点までに16,520,305塩基対の配列を決定した(36)。既に配列解読を終えていたミトコンドリアと色素体(葉緑体)のゲノム(26)と併せて、シズンの3ゲノム全ての解読が終了した。

一方、並行してアノテーションの作業を行った。既知の遺伝子情報が極めて乏しいシズンにおいて、効率よくアノテーションを進める為には、転写領域情報の取得が有効な手段と考えられた。そこで、東京大学医科学研究所(現東京大学大学院新領域創成科学研究科)の菅野研究室(菅野純夫教授、鈴木稔助教授)との共同研究で、シズンの完全長cDNAライブラリの構築をおこなった。対数増殖期、明期、暗期の細胞からRNAを抽出し、これを基に50万クローンの完全長cDNAライブラリが作製された。このうち4万クローンについて末端配列を解読し、転写領域を検出したところ、驚いたことにシズンの遺伝子にはイントロンが殆ど存在しないことが明らかとなった(36)。1箇所イントロンを持つ遺伝子は僅か25で、2箇所イントロンを持つ遺伝子は1個で全遺伝子の0.5%に過ぎなかった。このようなゲノム特性の為、イントロンの存在を前提とした一般的な真核生物の遺伝子予測プログラムはシズンには有効に機能しなかった。最終的には転写領域、他生物の遺伝子との配列類似性が認められる領域で、300塩基(100アミノ酸)以上のORFを遺伝子と定義する事にした。その結果、シズンには5331個の遺伝子が存在し、そのうちタンパク質遺伝子をコードするものは4771個であり、その内訳は既知遺伝子のホモログが2700個、機能未知遺伝子のホモログが902個、そして新規

遺伝子が1169個であった。また、タンパク質をコードしないが転写は行われている、いわゆるnon-coding RNAに相当する遺伝子が518個あった。

シズンゲノムの大きな特徴の1つとしてrRNA遺伝子が挙げられる。通常、殆どの真核生物ではrRNA遺伝子は多コピーのクラスターを形成し、核内では核小体という構造を作って活発にrRNAの転写を行っている。しかし、明瞭な核小体構造をもつシズンでは18S-5.8S-28Sのセットが2本の染色体上の異なる3箇所にそれぞれ1セットずつあるのみであった(31)。また5SのrRNA遺伝子も3コピーであった。この特徴は真核生物における核小体の構築やrRNAの供給等に関して従来とは異なる新たな考え方を提起するものであり大変興味深い。補足であるが、塩基配列の解析の際に、3箇所あるこのrRNA遺伝子領域からはゲノムのショットガンクローンが全く得られず、配列はそれぞれrRNA領域を含むBACクローンの解析によって決定された。

tRNAに関しても、既製のtRNA遺伝子の検索プログラムを用いてもシズンのゲノム中からは30のtRNA遺伝子しか検出されてこなかったことから、構造遺伝子の検索と同様シズン独特な仕組みが存在する可能性が示唆された(36)。特にアスパラギン酸、グルタミンに翻訳する為のtRNAは1つも同定されていない。このことはシズンのtRNA遺伝子に関する未知の構造や修飾機構の存在を想定させる。検索で得られた30のtRNA遺伝子のうち4つは真核生物のtRNAには見られないD-roop領域のイントロン(古細菌で見つまっているタイプ)を持っていたことからシズンの始原性が伺える。唯一見つまっているイソロイシンのtRNAは原核生物タイプのGAUのアンチコドンであった。

ゲノム(染色体)の特徴としては、ギャップ無しの染色体においても、明確な繰り返し配列をもつセントロメア領域は認められていない。但し、それぞれの染色体上の1領域に周辺領域よりもGC含量の低い、すなわちATリッチな領域が存在することから、この領域がセントロメアとして機能している可能性が考えられる。一方、テロメア配列は各染色体末端でAATGGGGGGというリピートであることが明らかとなっている。これは高等植物に見られる典型的なTTTAGGGという配列とは全く異なっており、ユニークである。現在までの解析手法ではテロメアのリピート回数はそれほど多くない(数リピート)という結果が示唆されている。テロメア領域の近傍には特定のエレメント構造をもつサブテロメア領域が認められた。紅藻の二次共生によって生じたと考えられる、クリプト藻のヌクレオモルフにも、類似のサブテロメア構造が認められるため、この点を詳しく解析することによって、海洋のほとんどを占める二次共生生物の染色体構造の進化が明らかにされるであろう。また、ヌクレオソーム形成から細胞核の構築に必須なヒストン遺伝子は14番染色体の1領域にクラスターを形成して1ないし2コピーずつ存在するが、これも真核生物としては最少セットである。

解読されたゲノム情報を基に、目的の1つであるオルガネラの分裂増殖の機構に関しても研究が著しく進展した(2,3,4,5,6,11,17,19,20,21,35,45,46)。ミトコンドリアや色素体は分裂装置と呼ばれるリング状の構造(MD/PDリング)によって分裂が行われる事がシズン類を用いて構造形態学的に示されてきたが(18,27,52)、長らくそれに関与する遺伝子(タンパク質)については明らかではなかった。ゲノム解析の結果、これまで知られていたバクテリア由来の分裂装置構成成分遺伝子であるftsZ遺伝子以外に

(30)、真核生物特有であるダイナミン遺伝子も、オルガネラ分裂に関与していることが明らかとなった(17,21)。高等動物植物に於いては、ダイナミン遺伝子はスーパーファミリーを形成して、主にエンドサイトーシスや小胞のくびりきりなどの膜系の分断に関与すると考えられて来たが、ダイナミン遺伝子が1つしかないシズンでは、その唯一の遺伝子がミトコンドリアの分裂に関与していた(21)。また、ダイナミン遺伝子と弱い相同性をもつ植物特有の類似遺伝子を見だし、同様に解析したところ、色素体の分裂に関与していることが明らかとなった(17)。これらシズンで見つかったオルガネラ分裂機構は、高等動物植物でも確認され、その一般性が証明された(19)。更に、タンパク質成分が超微量なため、従来のエドマン分析法からの遺伝子の同定が難しかった色素体分裂リング(PDリング)を構成する主たるタンパク質の遺伝子をTOF-MS解析によって同定することに成功した(論文投稿中)。これらの成果は全て解読されたゲノム情報に加え、シズンの遺伝子がイントロンを持たないという特徴を備えていたからこそ成し得ることが出来たものである。

更に、もう一つの目的である真核生物の起源と進化に関する解析からも、新たな知見が数多く得られた(22,23,30,32,40,43,44,48)。解読されたゲノム情報から、アクチン、EF1- α 、 α チューブリン、 β チューブリン、の合計1525個のアミノ酸配列を使用して、最節約法で分子系統解析を行った結果、真核生物はアメーバ界(Amoebozoa)、後方鞭毛生物界(Opisthokonta)、植物界(Plantae, Bikont)の3大系統群に分けられることが明らかとなった(22)。特に植物界は現在色素体を持たなくても、過去に1度色素体の細胞内共生を経験した分類群と提唱された。後にオックスフォード大学のCavalier-Smith博士によっても基本的にはこれと同様の分類形態が提唱されている。またシズンが後方鞭毛生物界と植物界の分岐した直後に位置することも明らかとなり、色素体分裂装置の構造形態学的解析から示唆されていた細胞の原始性を強く支持する結果となった。更に、シズンのそれぞれのタンパク質遺伝子に対して最も類似した相同遺伝子を与える分類群を調べると、551遺伝子は明らかに緑色植物の遺伝子に類似であるのに対して、ほぼ同数の537遺伝子が明らかに動物の遺伝子に類似であることが判明した。この結果はシズンが系統的に後方鞭毛生物界と植物界の分岐した直後に位置することを示唆していると同時に、紅色植物と緑色植物の間には高等動物と紅色植物との間に匹敵する程の差異があるという可能性も示唆している。一方、光合成のカルビン回路の遺伝子群について、シアノバクテリア由来か、宿主由来かというモザイク性を高等植物(シロイヌナズナ)と比較したところ、シズンとシロイヌナズナで全く同一の遺伝子組成を示したことから、このモザイク性は緑色植物と紅藻の共通祖先の段階で既に確立していたと考えられた(36)。すなわち、現存する色素体が過去に1度だけ生じたシアノバクテリアの細胞内共生に由来するという、色素体の単一起源性を強く示唆した。また、色素体へのタンパク質輸送に関わるTic/Toc複合体の組成も基本的に高等植物と共通であることが明らかとなり、これも色素体の単一起源説を支持した。このように、tRNAの件も含めて、シズンゲノムから得られた知見が藻類や植物の研究に有益であるというのみならず、真核生物全般の成立や進化、共通性や多様性の起源を議論する上で極めて重要な特徴を備えているということが出来る(37,40,42)。実際に計画班内の分担者の研究サブテーマに関してもシズンのデータが有効に活用され、それぞれの研究が発展した

(1,7,8,9,10,12,13,14,15,16,24,25,28,29,33,39,41,47,50,51)。

ゲノム解読が終わった後のプロジェクトの晩期には、九州大学との共同研究で全タンパク質遺伝子に対するオリゴマイクロアレイが作製され、ポストゲノム解析の一環として、細胞・オルガネラ分裂周期におけるトランスクリプトーム解析を開始した(49)。シゾンの高度同調培養系と組み合わせることによって、細胞周期がほぼ100%揃った遺伝子発現様式を網羅的に解読することが可能となった。また、シゾンの培養条件を変えることによって各種環境変動実験をおこない、シゾンの耐酸性・耐高温などに関与する遺伝子の探索も進められている。このマイクロアレイシステムはRT-PCRやReal Time-PCRで発現様式の再現性が確認されており、高精度であることが示されている。

そして、論文発表後も引き続き残っていた46箇所のギャップ埋めには、それまで以上の時間がかかり、漸く真核生物としては初めて全染色体について完全なtelomere to telomereの読みこぼしのない配列の解読に成功した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

シゾンは研究代表者がミトコンドリアと色素体の分裂の研究のためにイタリアから持ち帰り、分離した研究材料であり、国内外に於いてほとんど使われていなかった。従って本研究課題は極めてオリジナリティの高い研究となった。また、真核生物のゲノムとしては初めて一国の研究者のみによる解読完了であり、研究目的に応じて研究材料の探索・分離からゲノム解読までを一貫して行う「オーダーメイドゲノム解読」という特色がある。今回の核ゲノム解読により、既に解読されているミトコンドリア、葉緑体ゲノムと併せてシゾンの3ゲノムについて完全解読するに至った。2004年に研究成果をNature誌に発表したところ(36)、当論文は新着論文評価サイトFaculty of 1000で注目度3位の論文となり非常に高い評価を得た。また、Googleのキーワード検索における“Cyanidioschyzon”のヒット件数がゲノム論文の発表前は130件程度だったのに対して、2006/02/01現在では17万件にまで増加している。このような状況のもと、国内外から、試料の分与依頼や、共同研究依頼も多数寄せられている。研究の内容は、藻類や植物の研究の範疇に留まらず、染色体構造や、ヒトの疾患に関する遺伝子、また、シゾンの高温生息という特徴を生かしたタンパク質の高次構造解析など多岐にわたっている。

また、シゾン株を独立行政法人「国立環境研究所」に寄託したところ、環境研が参加している「新世紀重点研究創生プラン (RR2002)」の一環であるナショナルバイオソースプロジェクトの「藻類」における主要生物種としても取り上げられ、株の維持や配付等に関しての公的機関によるサポート体制も整った。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

1年遅れでの特定領域研究への参加であったが、核ゲノム解読と全遺伝子の抽出作業は達成され、且つ、期間内に論文公表も出来たことから、当初の目的は十分に達成されたと考えている。また、ゲノム情報を基に、細胞小器官の分裂増殖機構の解析も進み、更に、真核生物の大系統に関する新説も提唱する事が出来た。

研究を遂行するにあたって問題となった点は、殆どが技術的な部分に集約される。まず、当課題はゲノム解析にホールゲノムショットガン法を用いたが、アセンブルの結果できあがったコンティグに2つの問題点があった。1点目はphrapによるアセンブルの結果、繰り返し配列の

領域が本来とは正しくない場所にミスアセンブルされ、事実と異なる配列のコンティグが多数出来てしまったことである。これは後にARACHNEの解析によって確認が取れた部分もあったが、大半はこのコンティグ情報を基にしたギャップ埋め作業の段階で明らかとなった。BACクローンのエンドシーケンスやmate-pair情報を頼りに、コンティグの分断や配置換えといったミスアセンブルの修正を手作業で行ったため、莫大な時間と労力がこの点に費やされることになった。2点目は、出来上がったコンティグの中に、宿主と思われる大腸菌配列のコンティグや、他プロジェクトの生物ゲノム由来と思われるコンティグが多数混入していた点である。この点は、相同性検索ではじくことが出来たものはさほど問題にはならなかったが、他生物由来で配列がデータベースに登録されていなかったorphanコンティグについては、その所在確認に労を費やすことになった。それから、宿主である大腸菌の株との相性があるのかもしれないが、染色体上に3箇所ある約10kbpのrRNA遺伝子領域は、ショットガンクローンから全く見いだせなかった。再度、BACクローンを基に同領域のショットガンクローン取得を試みたが、同様の株では2度目も上手くいかなかった。当該箇所の1つについては慶應大学清水研究室で配列解読に成功し、この情報を基にPCR法を用いて他の2箇所についての解読を行った。塩基配列組成は見かけ上特異なものではなかったが、やはりクローニングされない箇所というものは存在するので、複数のベクターや宿主系を検討する必要があるということを経験した。

シゾンは他の生物と比較しても繰り返し配列等は少ない方であったが、最後までギャップとして残っていた部分の大半は繰り返しとGC含量の高い部分であった。多くの場合、PCRをおこなうと極めて配列の似た複数の産物が増幅されてしまい、個々のバンドが染色体のどの領域から増幅されてきたのか判断することが非常に困難であった。この点はBACクローンを鋳型に用いることによって回避出来る部分が多かったが、BACクローンのない染色体末端領域は非常に苦労した。

〈今後の課題〉

当課題は、当初より細胞小器官の分裂増殖機構の解明と、真核生物の起源と進化に関する研究を行う為の、現象解明を目的として始められたゲノム解読である。ゲノムの完全解読が完了した現在、今後はその情報をこれら生物現象の解明にいかにか有効活用していくかということが重要な課題となる。これらの研究テーマに関するポストゲノム解析としては、現在、マイクロアレイのシステムが稼働しており、イントロンを殆ど持たないシゾンに於いては、トランスクリプトーム解析が様々な研究に有効に機能していることを確認している。また、シゾンの同調培養系を用いて単離された細胞小器官の分裂装置に関するプロテオーム解析も、TOF-MS法を導入したことによって微量のサンプルで解析が出来るようになり、それを構成するタンパク質遺伝子を従来の方法と比べて飛躍的に迅速に決定することが可能となった。ゲノム情報を基盤にしたポストゲノム解析の手法とリソースは一通り完備されたといつてよい。

更に、その先に関しての課題としては、シゾンの細胞を用いて遺伝子の機能解析を可能にすることである。すなわち、遺伝子の導入や破壊などの形質転換技術の開発である。これに関しては、先行研究においてシゾンのin vivoで外来DNAの相同組み替えが起きているという実験結果を報告しており(34,38)、今後、選抜マーカーや有用

プロモーターの開発を進めることによって、近い将来、シズン細胞を用いたの遺伝子機能解析が可能となると考えられる。
本研究をまとめるにあたり、三角修己博士（立教大学生研センター研究員）に感謝の意を表します。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文／プロシーディング（査読付きのものに限る）

1. 0602081921
Higashiyama, T., Yabe, S., Sasaki, N., Nishimura, Y., Miyagishima, S., Kuroiwa, H. and Kuroiwa, T. Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science* 293: 1480-1483 (2001).
2. 0602081921
Matsuzaki, M., Kikuchi, T., Kita, K., Kojima, S. and Kuroiwa, T. Large amounts of apicoplast nucleoid DNA and its segregation in *Toxoplasma gondii*. *Protoplasma* 218: 180-191 (2001).
3. 0602081929
Miyagishima, S., Kuroiwa, H. and Kuroiwa, T. The timing and manner of disassembly of the apparatuses for chloroplast and mitochondrial division in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Planta* 212: 517-528 (2001).
4. 0602081932
Miyagishima, S., Takahara, M. and Kuroiwa T. Novel filaments 5 nm in diameter constitute the cytosolic ring of the plastid division apparatus. *Plant Cell* 13: 707-721 (2001).
5. 0602081937
Miyagishima, S., Takahara, M., Mori, T., Kuroiwa, H., Higashiyama, T. and Kuroiwa T. Plastid division is driven by a complex mechanism that involves differential transition of the bacterial and eukaryotic division rings. *Plant Cell* 13: 2257-2268 (2001).
6. 0602081940
Takahara, M., Kuroiwa, H., Miyagishima, S., Mori, T. and Kuroiwa, T. Localization of the mitochondrial FtsZ protein in a dividing mitochondrion. *Cytologia* 66: 421-425 (2001).
7. 0602081943
Toda, K., Takano, H., Nozaki, H. and Kuroiwa, T. The second serine acetyltransferase, bacterial-type O-acetylserine (thiol) lyase and eukaryotic-type O-acetylserine (thiol) lyase from the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *J. Plant. Res.* 114: 291-300 (2001).
8. 0202261600
Sato, N., Nakayama M., Hase T. The 70-kDa major DNA-compacting protein of the chloroplast nucleoid is sulfite reductase. *FEBS Letters* 487, 347-350 (2001).
9. 0110310843
Sato N. Was the evolution of plastid genetic machinery discontinuous? *Trends in Plant Science* 6: 151-156. (2001)
10. 0202261600
Sato N., Ohta N. DNA-binding specificity and dimerization of the DNA-binding domain of the PEND protein in the chloroplast envelope membrane. *Nucleic Acids. Res.* 29: 2244-2250. (2001)

11. 0303241805
Kobayashi, T., Takahara, M., Miyagishima, S., Kuroiwa, H., Sasaki, N., Ohta, N., Matsuzaki, M. and Kuroiwa, T. Detection and localization of a chloroplast-encoded HU-like protein that organizes chloroplast nucleoids. *Plant Cell* 14: 1579-1589 (2002).
12. 0303241700
Nishimura, Y., Misumi, O., Kato, K., Inada, N., Higashiyama, T., Momoyama, Y., and Kuroiwa, T. An mt+ gemete-specific nuclease that targets mt-chloroplasts during sexual reproduction in *C. reinhardtii*. *Genes Dev.* 16: 1116-1128 (2002).
13. 0303250925
Sato N. Comparative analysis of the genomes of cyanobacteria and plants. *Genome Inform.* 13: 173-182 (2002).
14. 0204111024
Nozaki, H., Takahara, M., Nakazawa, A., Kita, Y., Yamada, T. Takano, H., Kawano, S. and Kato, M.. Evolution of rbcL group IA introns and intron open reading frames within the colonial Volvocales (Chlorophyceae). *Mol. Phylog. Evol.* 23: 326-338. (2002)
15. 0204111039
Nozaki, H., Onishi, K. and Morita, E.. Differences in pyrenoid morphology are correlated with differences in the rbcL genes of members of the Chloromonas lineage (Volvocales, Chlorophyceae). *J. Mol. Evol.* 55: 414-430. (2002)
16. 0303250938
Sekine, K., Hase T., Sato N. (2002) Reversible DNA compaction by sulfite reductase regulates transcriptional activity of chloroplast nucleoids. *J. Biol. Chem.* 277: 24399-24404.
17. 0303241924
Miyagishima, S., Nishida, K., Mori, T., Matsuzaki, M., Higashiyama, T., Kuroiwa H. and Kuroiwa, T. A plant-specific dynamin-related protein forms a ring at the chloroplast division site. *Plant Cell* 15: 655-665 (2003).
18. 0602091136
Miyagishima, S., Nishida, K. and Kuroiwa, T. An evolutionary puzzle: chloroplast and mitochondrial division rings. *Trends Plant Sci.* 8: 432-438 (2003).
19. 0303241820
Momoyama, Y., Miyazawa, Y., Miyagishima, S., Mori, T., Misumi, O., Kuroiwa, H. and Kuroiwa, T. The pleomorphic division of plastids by FtsZ in tobacco Bright Yellow-2. *Eur. J. Cell Biol.* 82: 323-332 (2003).
20. 0404081623
Sasaki, N., Kuroiwa, H., Nishitani, C., Takano, H., Higashiyama, T., Kobayashi, T., Sakai, A., Kawano, S., Murakami-Murofushi, K. and Kuroiwa, T. Glom is a novel mitochondrial DNA packaging protein in *Physarum polycephalum* and causes intense chromatin condensation without suppressing DNA function. *Mol. Biol. Cell* 14: 4758-4769. (2003)
21. 0303241945
Nishida, K., Takahara, M., Miyagishima, S., Kuroiwa, H., Matsuzaki, M. and Kuroiwa, T. Dynamic recruitment of dynamin for final mitochondrial severance in a primitive red alga. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 2146-2151 (2003).

22. 0211291236
Nozaki, H., Matsuzaki, M., Takahara, M., Misumi, O., Kuroiwa, H., Hasegawa, M., Shin-i, T., Kohara, Y., Ogasawara, N. and Kuroiwa, T. The phylogenetic position of red algae revealed by multiple nuclear genes from mitochondria-containing eukaryotes and an alternative hypothesis on the origin of plastids. *J. Mol. Evol.* 56: 485-497 (2003).
23. 035021903
Nozaki, H., Ohta, N., Matsuzaki, M., Misumi, O. and Kuroiwa, T. Phylogeny of plastids based on cladistic analyses of gene loss inferred from complete plastid genome sequence. *J. Mol. Evol.* 57: 377-382 (2003).
24. 0303041256
Nozaki, H., Misumi, O. and Kuroiwa, T. Phylogeny of the quadriflagellate Volvocales (Chlorophyceae) based on chloroplast multigene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29: 58-66. (2003)
25. 0401291717
Higuchi, S., Kawamura, M., Miyajima, I., Akiyama, H., Kosuge, K., Kato, M. and Nozaki, H. Morphology and phylogenetic position of a mat-forming green plant from acidic rivers in Japan. *J. Plant Res.* 116: 443-453. (2003).
26. 0404021701
Ohta, N., Matsuzaki, M., Misumi, O., Miyagishima, S., Nozaki, H., Tanaka, K., Shin-i, T., Kohara, Y. and Kuroiwa, T. Complete sequence and analysis of the plastid genome of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *DNA Res.* 10: 67-77 (2003).
27. 0602081950
Kuroiwa, T. Mitochondria and chloroplast divisions are controlled by same ancient rings. *Japan Journal of Microbiology* 17: 128-136 (2003).
28. 0403301322
Sato N., Terasawa, K., Miyajima K., Kabeya Y. Organization, developmental dynamics and evolution of the plastid nucleoid. *Int. Rev. Cytol.* 232: 217-262. (2003)
29. 0404071812
Nakazato, E., Fukuzawa, H., Tabata, S., Takahashi H. Tanaka K. Identification and expression analysis of cDNA encoding a chloroplast recombination protein REC1, the chloroplast RecA homologue in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 2608-2613. (2003)
30. 0602081953
Miyagishima, S., Nozaki, H., Nishida, K., Nishida, K., Matsuzaki, M. and Kuroiwa, T. Two types of FtsZ proteins in mitochondria and red-lineage chloroplasts: the duplication of FtsZ is implicated in endosymbiosis. *J. Mol. Evol.* 58:291-303 (2004).
31. 0602081958
Maruyama S, Misumi O, Ishii Y, Asakawa S, Shimizu A, Sasaki T, Matsuzaki M, Shin-i T, Nozaki H, Kohara Y, Shimizu N, Kuroiwa T. The minimal eukaryotic ribosomal DNA units in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *DNA Res.* 11:83-91 (2004).
32. 0401291709
Nozaki H, Matsuzaki M, Misumi O, Kuroiwa H, Hasegawa M, Higashiyama T, Shin-I T, Kohara Y, Ogasawara N, Kuroiwa T. Cyanobacterial genes transmitted to the nucleus before divergence of red algae in the Chromista. *J Mol Evol.* 59:103-113 (2004).
33. 0602082001
Sakai A, Takano H, Kuroiwa T. Organelle nuclei in higher plants: structure, composition, function, and evolution. *Int Rev Cytol.* 238:59-118 (2004).
34. 0404071812
Minoda A, Sakagami R, Yagisawa F, Kuroiwa T, Tanaka K. Improvement of Culture Conditions and Evidence for Nuclear Transformation by Homologous Recombination in a Red Alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Plant Cell Physiol.* 45:667-671 (2004).
35. 0602082005
Nishida K, Misumi O, Yagisawa F, Kuroiwa H, Nagata T, Kuroiwa T. Triple Immunofluorescent Labeling of FtsZ, Dynammin, and EF-Tu Reveals a Loose Association Between the Inner and Outer Membrane Mitochondrial Division Machinery in the Red Alga *Cyanidioschyzon merolae*. *J Histochem Cytochem.* 52:843-849 (2004).
36. 0404081529
Matsuzaki M, Misumi O, Shin-I T, Maruyama S, Takahara M, Miyagishima SY, Mori T, Nishida K, Yagisawa F, Nishida K, Yoshida Y, Nishimura Y, Nakao S, Kobayashi T, Momoyama Y, Higashiyama T, Minoda A, Sano M, Nomoto H, Oishi K, Hayashi H, Ohta F, Nishizaka S, Haga S, Miura S, Morishita T, Kabeya Y, Terasawa K, Suzuki Y, Ishii Y, Asakawa S, Takano H, Ohta N, Kuroiwa H, Tanaka K, Shimizu N, Sugano S, Sato N, Nozaki H, Ogasawara N, Kohara Y, Kuroiwa T. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428:653-657 (2004).
37. 0602082010
Kuroiwa T, Nozaki H, Matsuzaki M, Misumi O, Kuroiwa H. Does cell size depend on the nuclear genome size in ultra-small algae such as *Cyanidioschyzon merolae* and *Ostreococcus tauri*? *Cytologia* 69:93-96 (2004).
38. 0602082013
Yagisawa F, Nishida K, Okano Y, Minoda A, Tanaka K, Kuroiwa T. Isolation of Cycloheximide-resistant Mutants of *Cyanidioschyzon merolae*. *Cytologia* 69:97-100 (2004).
39. 054010920
Nakamura, S., Misumi, O., Aoyama, H., van Woesik, R., Kuroiwa, T. Monokaryotic chloroplast mutation has no effect on non-Mendelian transmission of chloroplast and mitochondrial DNA in *Chlamydomonas* species. *Protoplasma* 224, 107-112 (2004).
40. 040421719
Ohta, N., Kuroiwa, T. Complete nucleotide sequence analysis of the mitochondrial and the chloroplast genomes of *Cyanidioschyzon merolae*: Their gene contents and gene transfer analyses. *Endocytobiosis and Cell Res.* 15: 278-285 (2004).
41. 0504010922
Nakamura, S., Misumi, O., Aoyama, H., van Woesik R., Kuroiwa T. Monokaryotic chloroplast mutation has no effect on non-Mendelian transmission of chloroplast and mitochondrial DNA in *Chlamydomonas* species. *Protoplasma* 224, 107-112 (2004).
42. 0602082016
Misumi, O., Matsuzaki, M., Nozaki, H., Miyagishima, S.,

- Mori, T., Nishida, K., Yagisawa, F., Yoshida, Y., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. Cyanidioschyzon merolae genome: A tool for facilitating comparable studies on organelle biogenesis in photosynthetic eukaryotes. *Plant Physiol.*, 137, 567-585 (2005).
43. 051191533
Nozaki, H., Matsuzaki, M., Misumi, O., Kuroiwa, H., Higashiyama, T., Kuroiwa, T. Phylogenetic implications of the CAD complex from the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae* (Cyanidiales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 41, 652-657 (2005).
44. 0502191504
Nozaki, H.. Origin and evolution of "Plants" as deduced from genome information. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 56, 11-20 (2005).
45. 0602082029
Nishida K., Yagisawa F., Kuroiwa H., Nagata T., Kuroiwa T. Cell Cycle-regulated, Microtubule-independent Organelle Division in *Cyanidioschyzon merolae*. *Mol. Biol. Cell* 16, 2493-2502 (2005).
46. 0602082034
Yagisawa F., Nishida k., Kuroiwa H., Nagata T., Kuroiwa T. Identification of lysosomes-like structures in a unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Cytologia* 70, 351-354 (2005).
47. 0303250915
Kabeya Y., Sato N. Unique translation initiation at the second AUG codon determines mitochondrial localization of the phage-type RNA polymerases in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol.* 138: 369-382. (2005)
48. 0602090952
Nozaki H. A new scenario of plastid evolution: plastid primary endosymbiosis before the divergence of the "Plantae," emended. *J Plant Res.* 118, 247-55. (2005)
49. 0602091707
Minoda A., Nagasawa K., Hanaoka M., Horiuchi M., Takahashi H., Tanaka K.. Microarray profiling of plastid gene expression in a unicellular red alga, *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Mol Biol.* 59, 375-85 (2005).
50. 0602091353
Mori T, Kuroiwa H, Higashiyama T, Kuroiwa T. GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization. *Nat. Cell Biol.* 8, 64-71(2006)
51. 0602091358
Nishimura Y, Yoshinari T, Naruse K, Yamada T, Sumi K, Mitani H, Higashiyama T Kuroiwa T. Active digestion of sperm mitochondrial DNA in single living sperm revealed by optical tweezers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 1382-1387 (2006)
52. Kuroiwa T., Nishida K., Yoshida Y., Fujiwara T., Mori T., Kuroiwa H., Misumi O. Structure, function and evolution of mitochondrial dividing apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* in press (2006)

2) データベース/ソフトウェア

1. *Cyanidioschyzon merolae* genome project web site
(ゲノムデータベース、その他*Cyanidioschyzon merolae*全般に関する総合ウェブサイト)

- <http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/>
2. *Cyanidioschyzon merolae* chromosome list
(*Cyanidioschyzon merolae*ゲノムに関する簡易版ウェブサイト)

<http://dolphin.lab.nig.ac.jp/publish/ShowChromos.php?proj=gszw>
 3. DBTSS
(*Cyanidioschyzon merolae*の完全長cDNAに関する転写開始点データベース)
<http://dbtss.hgc.jp/>
 4. 0303251016
佐藤直樹 GenoMapソフトウェア
 5. 0303251023
佐藤直樹 SISEQソフトウェアVer. 1.3