

ヌクレオモルフゲノムをモデルとした共生者ゲノムの縮小進化に関する比較ゲノム解析

●石田 健一郎

筑波大学大学院生命環境科学研究科

<研究の目的と進め方>

細胞内共生生物は、一般にゲノムサイズが小さい。葉緑体やミトコンドリアなどのオルガネラゲノムはその最もよい例である。そのオルガネラゲノムの縮小の中間段階として、真核藻類を共生者とする「二次共生」由来のクロララクニオン藻の葉緑体に付随する祖先共生藻の退化核（ヌクレオモルフ）や、*Paulinella chromatophora* が保持するシアノバクテリア由来の葉緑体様シアネレはよいモデルである。ヌクレオモルフは、極端に縮小した（約400 kb）真核ゲノムをもつことが知られ、研究代表者の研究（平成16年度特定領域ゲノム生物学公募研究）によって、系統群ごとにゲノムサイズが異なることも明らかとなった。本研究では、クロララクニオン藻のヌクレオモルフおよび *P. chromatophora* のシアネレをモデルとして、共生藻のオルガネラ化に伴って、共生者核ゲノムがどのように縮小したのかを解明する。そのために、サイズの異なるヌクレオモルフゲノムを持つクロララクニオン藻の2種について、ヌクレオモルフゲノムの全塩基配列（430 kb および 360 kb）を決定し、既にヌクレオモルフゲノム配列決定が完了している1種の配列（373 kb）を加えて、ゲノム構造、遺伝子組成、遺伝子配置、イントロン、スペーサー領域、テロメア配列などについて詳細な比較ゲノム解析を行なう。その結果をもとに、ヌクレオモルフゲノムの縮小と進化について考察する。さらに、*P. chromatophora* のEST解析を進め、既にドイツで先行しているシアネレゲノム解析と相補する形で、シアネレから核ゲノムへ転移した遺伝子を探索し、シアネレのオルガネラ化の初期進化を考察する。

<2007年度の研究の当初計画>

クロララクニオン藻 *L. amoebiformis* および RCC365 株（昨年度ヌクレオモルフゲノムサイズが1 Mb 以上と推定された）のヌクレオモルフゲノム配列決定を行なう。*L. moebiformis* については、昨年度ライブラリー作成とドラフトシーケンスを支援班に依頼してあるため、その結果をもとにアセンブルし、得られたドラフト配列にギャップがあればPCR等によりギャップ領域を増幅して全塩基配列の決定を目指す。RCC365については、正確なヌクレオモルフゲノムサイズをPFGEとサザンプロットにより推定し、*L. amoebiformis* と同様にライブラリー作成と配列決定を行なう（支援班のサポートを受けられない場合外注する）。各リード配列は、無料ゲノム解析ソフトウェア「Staden」を用いてアセンブルする。

得られたヌクレオモルフゲノム配列について、ウェブ上のデータベースを利用して得られた配列のアノテーションを行ない、各染色体配列のキャラクタリゼーションを行なう。既に配列のわかっている *Bigeloviella natans* のヌクレオモルフゲノム配列を含め、クロララクニオン藻3種のゲノム配列を比較し、ゲノム構造、遺伝子組成、遺伝子配置、イントロン、スペーサー、テロメアな

どを中心に共通点と相違点を明らかにする。その結果をもとに、ヌクレオモルフゲノムの縮小と進化について考察する。

一次共生の初期進化における共生者ゲノムの縮小のモデルとする *P. chromatophora* について、コンタミのほとんどない培養株を既に確立しており、これまでに全RNAの抽出を完了し、現在cDNAライブラリーの作成中である。本年度は、支援班によるサポート（可能であれば）および外注により、10,000リード（10,000クローン）をメドに予算の許す限りEST配列を決定する。得られたEST配列の中からシアネレの祖先シアノバクテリア由来であると思われる遺伝子を探索し、ドイツで進行中のシアネレ全ゲノム配列のデータと照らし合わせることで、一次共生初期進化におけるシアネレから核への遺伝子転移について考察する。

これら2つの研究結果をもとに、一次、二次共生における共生者ゲノムから宿主ゲノムへの転移と共生者ゲノムの縮小について、両進化課程に共通の（あるいは特異的な）現象の有無を精査し、葉緑体獲得における共生者ゲノムの縮小進化の理解を飛躍的に押し進める。

<2007年度の成果>

新規クロララクニオン藻のヌクレオモルフゲノムサイズの推定：昨年度1.0 Mbを超えるヌクレオモルフゲノムを持つことが推定された新規クロララクニオン藻RCC365株（新属新種として論文発表予定）について、より正確な染色体およびゲノムのサイズ推定を行なった。約300～400 kbという各染色体サイズレンジに対するパルスフィールドゲル電気泳動の条件の最適化を行なうことにより、各染色体DNAの分解能を向上させ、ヌクレオモルフのテロメア配列をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、染色体数は3本であり、各染色体DNAのサイズはおよそ443.9 kb、333.2 kb、281.6 kbで、全部で約1.058 Mbのサイズとなることを明らかにした（図1）。これは既知のヌクレオモルフの2～3倍のゲノムサイズとなり、クロララクニオン藻のヌクレオモルフゲノムの進化を明らかにする上で大きく貢献するであろう発見である。

また、昨年度まで進めていたクロララクニオン藻群内のヌクレオモルフ

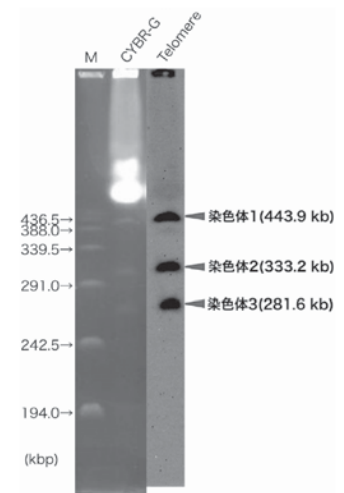


図1：RCC365株のパルスフィールド電気泳動結果。
M：サイズマーカー
CYBR-G：CYBR Green 染色
Telomere：ヌクレオモルフテロメア領域をプローブとしてサザンハイブリダイゼーション

ゲノムサイズの多様性に関するデータは、カナダ・ダルハウジー大学の Archibald 博士と共同で論文にまとめ、国際誌 *Journal of Eukaryotic Microbiology* に掲載された。

クロララクニオン藻2種 (*L. vacuolata*, *L. amoebiformis*) のヌクレオモルフゲノム全配列の決定：これまでに調査されたクロララクニオン藻の中で最も小さなヌクレオモルフゲノム (約 330 Kb) を持つ *L. amoebiformis* について、パルスフィールドゲル電気泳動により分離されたヌクレオモルフ染色体 DNA をゲルより精製した。本種においては3本のヌクレオモルフゲノム染色体とミトコンドリア DNA のバンドが近接しているため、精製した DNA はヌクレオモルフとミトコンドリア DNA が混在したサンプルとなった。それを本領域の支援班へ送付し、ショットガンシーケンス法による全ゲノム配列の取得を試みた。その結果、ドラフト配列として、886,639 bp、(552 断片) を得た。現在、さらなるアセンブルを進めており、これまでに全断片数を 93 (うち主要断片は 12 本) まで減少させることができている。このうち 23 本 (305,958 bp) はおそらくヌクレオモルフ DNA の断片であると思われる、4 本がミトコンドリア、3 本が葉緑体 DNA であると思われる、残る 63 本が由来不明の断片となっている。今後はヌクレオモルフ由来の 23 本に焦点を当て、ギャップを埋めて完全配列の取得に努めるとともに、*B. natans* の既知のゲノム配列との比較を行なう予定である

また、*L. vacuolata* については、パルスフィールドゲル電気泳動により分離されたヌクレオモルフ染色体 DNA をゲルより精製し、現在支援班によりドラフト配列の決定が進められている。

Paulinella chromatophora の EST 解析：*Paulinella chromatophora* の培養株より純度の高い全 RNA の抽出法を検討し、最終的に 2 μ g の高純度の RNA を得た。現在、民間の受託サービスにより cDNA ライブラリーの作成と配列決定を進めている。

<国内外での成果の位置づけ>

クロララクニオン藻のヌクレオモルフゲノムサイズの多様性に関する論文は、我々の専門分野において高く評価されている。

RCC365 株で発見された 1.0 Mb を超えるサイズのヌクレオモルフゲノムは、これまでのヌクレオモルフゲノムサイズに関する一般的な見解を覆すものであり、今後ヌクレオモルフゲノムの進化に対する新たな知見が得られると期待される。

クロララクニオン藻2種のヌクレオモルフゲノム全配列の決定については、これまで複数種間でヌクレオモルフゲノム配列の比較が行なわれたことはなく、本研究が世界中でそれを達成する最も近い位置に到達している。これから行なう実際の比較ゲノム解析に寄せられている期待は大きい。

Paulinella chromatophora の EST 解析に関しては、世界で複数の研究室がしのぎを削ってきたが、cDNA ライブラリーの作成までこぎつけたのは我々の研究室以外にない。我々は最も純度の高い培養株を独自に保有しているため、他の研究グループに比べて有利な状況にある。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

これまで、パルスフィールドゲルからの DNA 回収に手間取ってきたが、エレクトロエリクション法を導入して、条件を最適化することにより改善された。これによりドラフト配列決定まで

進めることができた。

また、昨年度支援班に依頼したゲノム配列決定は、担当者の交代の際の引継ぎがうまく行かず、解析が半年以上滞ってしまった。結局 DNA を取り直してゲノムシーケンスを開始した。

RCC365 株の大きなヌクレオモルフゲノムについて、今年度詳しい解析を始める予定であったが、パルスフィールド電気泳動の条件の最適化とより正確なゲノムサイズの推定を行なったことにより、詳細な解析は来年度以降に行なうことになった。

Paulinella chromatophora の EST 解析においては、細胞の大量培養が最も大きな困難であった。本種は増殖が極端に遅く、時にはほとんど増殖しないような場合もあった。この原因はまだ解明されていない。今回は、スモールスケールでの培養の数を増やし、なんとか 2 μ g の RNA を取得することができたが、今後安定して材料供給できるように培養条件を検討する必要がある。

<今後の課題>

L. amoebiformis と *L. vacuolata* のヌクレオモルフゲノム全配列の決定：得られた (得られる予定の) ドラフトゲノム配列から contig 間のギャップを埋めて全配列を早急に得る。同時に確定した領域の配列について、既にヌクレオモルフゲノム配列が確定している *B. natans* を含めて 3 者でゲノム構造、遺伝子組成、遺伝子配置、イントロン、スペーサー領域、テロメア配列などの比較ゲノム解析を進め、クロララクニオン藻内のヌクレオモルフゲノムの進化を明らかにする。

Paulinella chromatophora の EST 解析：得られる予定の EST データの中から、核コードのシアネレ (初期葉緑体) タンパク質遺伝子を探索し、その情報をもとにシアネレが葉緑体としてどの程度宿主細胞に統合され、どのように維持されているかを推察する。これにより一次共生における共生者の葉緑体化のモデルを考察する。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング (査読付き)

1. 0706281517

Silver, T.D., Koike, S., Yabuki, A., Kofuji, R., Archibald, J.M., and Ishida, K.: Phylogeny and nucleomorph karyotype diversity of chlorarachniophyte algae. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54(5):403-410, (2007).

2. 0801291321

Hirakawa, Y., Kofuji, R. and Ishida K.: Transient transformation of a chlorarachniophyte alga, *Lotharella amoebiformis* (Chlorarachniophyceae), with uidA and egfp reporter genes. *Journal of Phycology* (in press)