

氏名	栗田 ひろ子
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第800号
学位授与の日付	平成18年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	Programmed genome reorganization of mitochondria and nucleus coupled with germline-soma differentiation during development of the dicyemid <i>Dicyema japonicum</i> (Mesozoa) (中生動物ニハイチュウの体細胞分化に伴うミトコンドリア及び核ゲノムの再編成)
論文審査委員(主査)	東 浩(自然科学研究科・助教授)
論文審査委員(副査)	石田 健一郎(自然科学研究科・助教授), 櫻井 勝(自然科学研究科・教授), 西内 巧(学際科学実験センター・助教授), 山口 和男(学際科学実験センター・教授)

Abstract

Mesozoan dicyemids, obligatory parasites living in the kidney of cephalopods, are known to retain minicircles encoding mitochondrial genes, but it is unknown whether the minicircles represent an original mitochondrial genome. In this study, the following results were demonstrated: 1) a small copy number of high-molecular-weight (HMW) mtDNA does exist probably in germ cells separately from the minicircles, 2) amplification of mtDNA occurs during early development, 3) as development proceeds, the conspicuous reduction of the copy number takes place, and 4) many of the mitochondria in terminally-differentiated somatic cells no longer support DNA synthesis. Taking these observations into account, we propose an "amplification-dilution" model for mesozoan mtDNA. On the other hand, the during early somatic cell development, numerous unique DNA sequences called extrachromosomal circular DNAs are first amplified and then eliminated, leading to nuclear genome reduction. In this study, we demonstrate that the remaining sequences, single copy genes and repetitive sequences, have very different fates. Single copy genes are initially amplified but subsequently decrease in copy number through development, suggesting that the whole genome is initially amplified and then the amplified DNAs are simply diluted in successive cell divisions, with little DNA replication. In contrast, repetitive sequences are maintained, even in terminally-differentiated somatic cell nuclei and must be selectively endoreplicated, concomitant

with the increase of cell size. The biological significance of this mechanism is discussed as a unique dicyemid adaptation to parasitism.

[序論]

中生動物ニハイチュウはタコなど頭足類の腎嚢に寄生する、単純な体制の多細胞生物である(Fig. 1)。ニハイチュウのミトコンドリアでは minicircle DNA と呼ばれる環状 DNA の存在が報告されている(1)。これまでに見つかった minicircle DNA は6種類で、ミトコンドリアに局在する呼吸鎖タンパク質や rRNA を1つずつコードしている。大きさは 0.8-1.7 kb と小さく、非コード領域に共通配列は見られず、複製機構は不明である。近年様々な生物でミトコンドリアゲノムプロジェクトが進行し、様々な真核生物のミトコンドリアゲノムの特徴が明らかになってきた(2)が、ニハイチュウの minicircle DNA はどの真核生物のミトコンドリアゲノムにも似ていない。そのため minicircle DNA 以外にも mtDNA が存在するかもしれないと考え、ニハイチュウのミトコンドリアゲノム構造解析を行うことにした。また、ニハイチュウは発生初期に核ゲノムの再編成を行い、ある細胞において特定の DNA 配列が染色体上から捨てられる染色質削減という現象が報告されている(3, 4)。この時に捨てられると考えられる染色体外環状 DNA (EC)が最近報告され(5)、発生初期に増幅された後、削除されていることが分かった。しかしながらこの時見られる増幅という現象が、ゲノム全体で起きているのか、削除される EC 配列のみで起きているのか不明であった。今回新たに反復配列を同定し、 β -tubulin 遺伝子と共にプローブとして用い、この現象を更に詳しく調べることにした。さらに、ニハイチュウの mtDNA の配列情報は非常に限られており、6種類の minicircle DNA (6 遺伝子)、トータルで 7.9 kb しか明らかになっていない。典型的なミトコンドリアゲノムと同程度の遺伝子が minicircle DNA 上にコードされていると考えるならば、未だに見つかっていない minicircle DNA が存在する可能性が高い。そのため新規の minicircle DNA のクローニングを試みた。

[結果及び考察]

ニハイチュウから抽出した total DNA から高分子 DNA のみをアガロースゲルで単離し、これを鋳型として、minicircle DNA 上にコードされている *cox1* (cytochrome c oxidase subunit 1 gene) 特異的プライマーを用いて PCR・inverse PCR を行った。その結果、PCR でのみ増幅が見られ、inverse PCR では全く増幅が見られなかった。このことは minicircle 以外の形状で *cox1* をコードした mtDNA が存在することを示している。この結果を受けて minicircle 以外の mtDNA のサイズを調べるために、Southern blot を行なった。結果、minicircle に相当する位置に強いシグナルが見られ、高分子 DNA に相当するところに弱いシグナルが見られた (Fig. 2A)。このことはニハイチュウの mtDNA の大部分は minicircle として存在し、高分子 DNA はごく微量存在していることを示している。また滴虫型幼生の total DNA に高分子 mtDNA のシグナルが検出されなかったため、高分子 mtDNA の割合は変化し滴虫型幼生期にはその割合が低いことが示された。このことからニハイチュウには二種類の mtDNA が混在していることが明らかになった。更に minicircle 上には複製開始点となるような保存領域が存在しないことから、高分子 DNA から minicircle が作られ、それには mtDNA の複製が伴っていると考えられる。この mtDNA の再編成の時期を特定するために、*in situ* hybridization によってコピー数の変化する時期を調べた。その結果、生殖細胞や初期胚に強いシグナルが見られ、そのシグナルは発生が進むにつれ弱くなる傾向が見られた (Fig. 3A)。また体皮細胞など分化した細胞にはシグナルはほとんど検出されなかった。このことは、発生の初期に mtDNA の大量増幅が起き、その後発生の進行に伴ってコピー数の減少が起きていることを示している。更に aphidicolin 存在下で BrdU を取り込ませ mtDNA の合成能を調べた結果、分化細胞では一部のミトコンドリアでのみ mtDNA の合成が行われていた (Fig. 4A)。これらの結果からニハイチュウでは発生に伴ったプログラム化されたミトコンドリアの分化と mtDNA の構造変化が起きていると考え、次のようなモデルを想定している。高分子のミトコンドリアゲノムを維持する幹ミトコンドリアは未分化細胞にのみ主に存在する。発生の開始と共に mtDNA が大量増幅され、増幅された mtDNA から minicircle DNA が形成される。形成された minicircle DNA は複製開始点を欠いた構造であるために、その後はミトコンドリアの分裂に従い、複製されることなく分配されコピ

一数が減少する。その結果、minicircle DNA しか持たない体細胞ミトコンドリアが生じる。しかし体細胞ミトコンドリアは mtDNA の複製を行えないため自身では増殖できず、わずかに維持されている幹ミトコンドリアからまた新たに体細胞ミトコンドリアが形成されるというモデルである(Fig. 5)。

一方で、核ゲノムの再編成を調べるために、まずマーカーとして用いる反復配列を同定した。*Hind*III または *Eco*RI で消化した断片からクローニングしたところ、168-175 bp の類似した配列が9クローン得られた。CLUSTALW による multiple alignment、NJ 系統樹による解析の結果、この9クローンは同一ファミリーの反復配列であり、クローニングに用いた制限酵素によって2つのサブファミリーに分けられることが分かった。Southern blot の結果、未消化 DNA をプロットした場合には高分子 DNA 上に濃いシグナルが、クローニングに用いた制限酵素の消化断片ではラダー状のシグナルパターンが得られたことから (Fig. 2B)、同定した配列はまさしく反復配列であり、類似した配列がゲノム上にタンデムに並んで数多く存在していることが示された。これを受けて、この反復配列と染色体外環状 DNA (EC)、 β -tubulin 遺伝子をプローブとして、同条件で *in situ* hybridization を行なった。結果、EC・ β -tubulin をプローブとした場合、シグナルは初期胚に強く検出され、発生が進むにつれ弱くなり、成虫の分化細胞にはほとんど検出されなかった(Fig. 3B)。このことから β -tubulin においても EC 同様発生初期に増幅され、その後コピー数が減少することが示されたため、ニハイチュウは発生の初期にゲノム全体を増幅させることが明らかになった。その後、共にコピー数が減少することが示されたが、EC は染色質削減に伴い削除されるためにコピー数が減少し、一方 β -tubulin 遺伝子は複製されずに分配されるためにコピー数が減少されると考えられる。 β -tubulin のようなハウスキーピング遺伝子が低コピー状態に保たれるということは、分化細胞の細胞活性が低いと考えられる。このことは 18S rRNA をプローブとした *in situ* hybridization によって、分化細胞の体皮細胞ではタンパク質合成機構の一部を担うこの RNA が検出できなかったことから裏付けられた。更に反復配列をプローブとして用いた結果では、細胞分裂を伴う発生過程 (生殖細胞⇒幼生) では β -tubulin 同様、発生初期における増幅とその後の減少が見られたが、細胞分裂を伴わず細胞の肥大化でのみ成長する過程 (幼生⇒成虫) においては分化細胞が大きくなるにつれ、コピー数

も増加していた(Fig. 3C)。更に BrdU を取り込ませて核 DNA の合成頻度を調べたところ、全ての核において活発な DNA 合成が見られたが、特に分化細胞において核 DNA 合成は細胞が大きくなるに従って不活発になる傾向が見られた(Fig. 4B)。このことから、ニハイチュウは発生の初期に細胞分化と同時に endoreplication によって短期間に DNA 合成を行なって多倍体化し、その後染色質削減によって不要な配列を捨て、体細胞染色質を形成すると考えられる。その後は体細胞染色質を細胞分裂に伴って分配し、分化細胞には体細胞染色質が維持される。しかし、分化細胞は細胞を肥大化させるために DNA 量を増加させる必要がある("C-value enigma")(6, 7)ため、反復配列のみを選択的に複製しコピー数を増加させることで、巨大な細胞を維持していると思われる(Fig. 5)。

また、これまでに既存の minicircle DNA と同じサイズの DNA を精製してランダムにクローニングを行ってきた。配列を決定した 58 クローン中、既存の minicircle DNA の配列をもつ 7 クローンの他に、通常 mtDNA コードの遺伝子である可能性のあるクローンを 30 クローン得ることができた。この可能性のある遺伝子は、*nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5*, *nad6*, *atp6*, *cob* などである。他にも一部の原生動物にしか mtDNA にコードされていない遺伝子(Jakobid 鞭毛虫の *secY*・*orf120*, Tetrahymena の *orf188*・*orf1386*)のホモログである可能性を示唆したクローンも見つかった。特に植物と原生動物でのみ mtDNA にコードされている *ymf16* (2)のホモログの可能性のあるクローンを見つけることができた。これが本当に *ymf16* ホモログであるならば、ニハイチュウの mtDNA は後生動物タイプではないことになるため、ニハイチュウの系統的位置の再考につながる可能性がある。

[参考文献]

1. Watanabe KI et al. (1999) *J Mol Biol* 286(3): 645-50
2. Gray MW et al. (1998) *Nucleic Acids Res* 26(4): 865-78
3. Hartmann M (1906) Untersuchungen über den Generationswechsel der Dicyemiden. *Mém. Acad. R. Belg. Ser. II* 1: 1-126.
4. McConnaughey BH (1951) The life cycle of the dicyemid mesozoa. *Univ Calif Publ Zool* 55: 295-336.
5. Noto T, Yazaki K, Endoh H (2003) *Chromosoma* 111(6):359-68
6. Cavalier-Smith T (1978) Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *J Cell Sci* 34: 247-278.
7. Gregory TR (2001) Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biol Rev Camb Philos Soc* 76: 65-101.

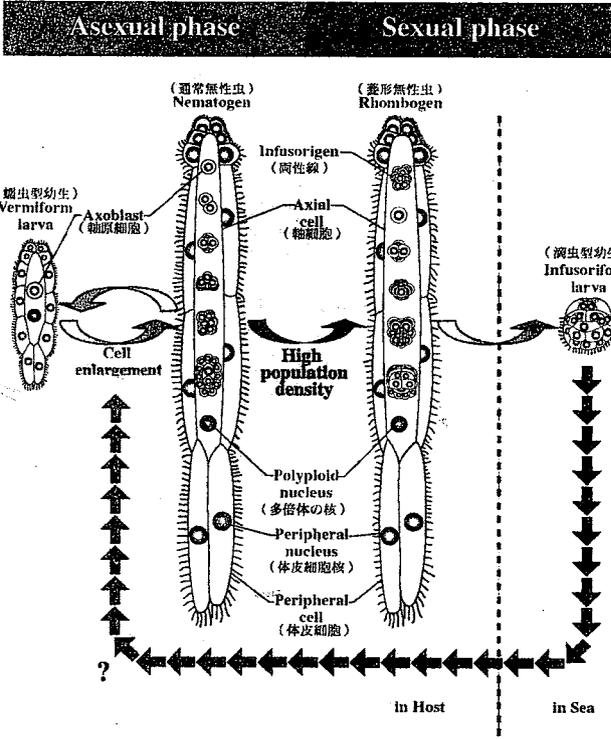


Fig. 1 ニハイチュウの生活環

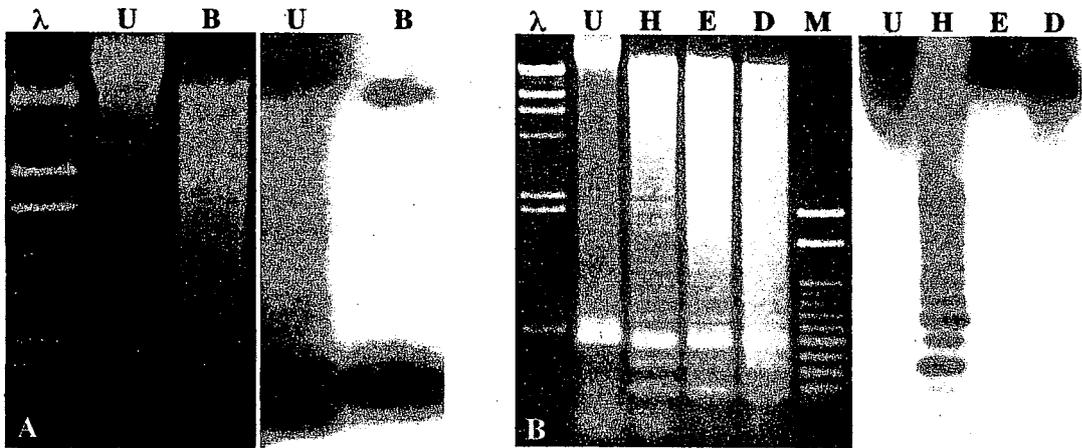


Fig. 2 Southern blot analysis による高分子 mtDNA の検出 (A) と反復配列の検出 (B)
 両パネルともに左側が EtBr 染色パターン、右側が $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$ で検出したシグナルパターン。プローブは A は minicircle DNA にコードされている *cox1* partial fragment, B は今回同定した反復配列の *HindIII*-subfamily に属する RS/HDIII-1。
 λ: λ-*HindIII*, U: undigest, B: *Bam*HI digest, H: *HindIII* digest, E: *Eco*RI digest, D: *Dra*I digest, M: 100 bp ladder. A: 2kb 弱の位置に相当する minicircle DNA の濃いシグナルの他に、約 23 kb の位置に弱い高分子 mtDNA のシグナルが検出された。B: cloning に用いた *HindIII* digest ではシグナルがラダー状で検出された。最も小さいシグナルがプローブの長さ (174 bp) に相当し、その 2 倍、3 倍... の大きさにシグナルがラダー状になっていることから、類似した配列がゲノム上にタンデムに並んで数多く存在していると考えられる。

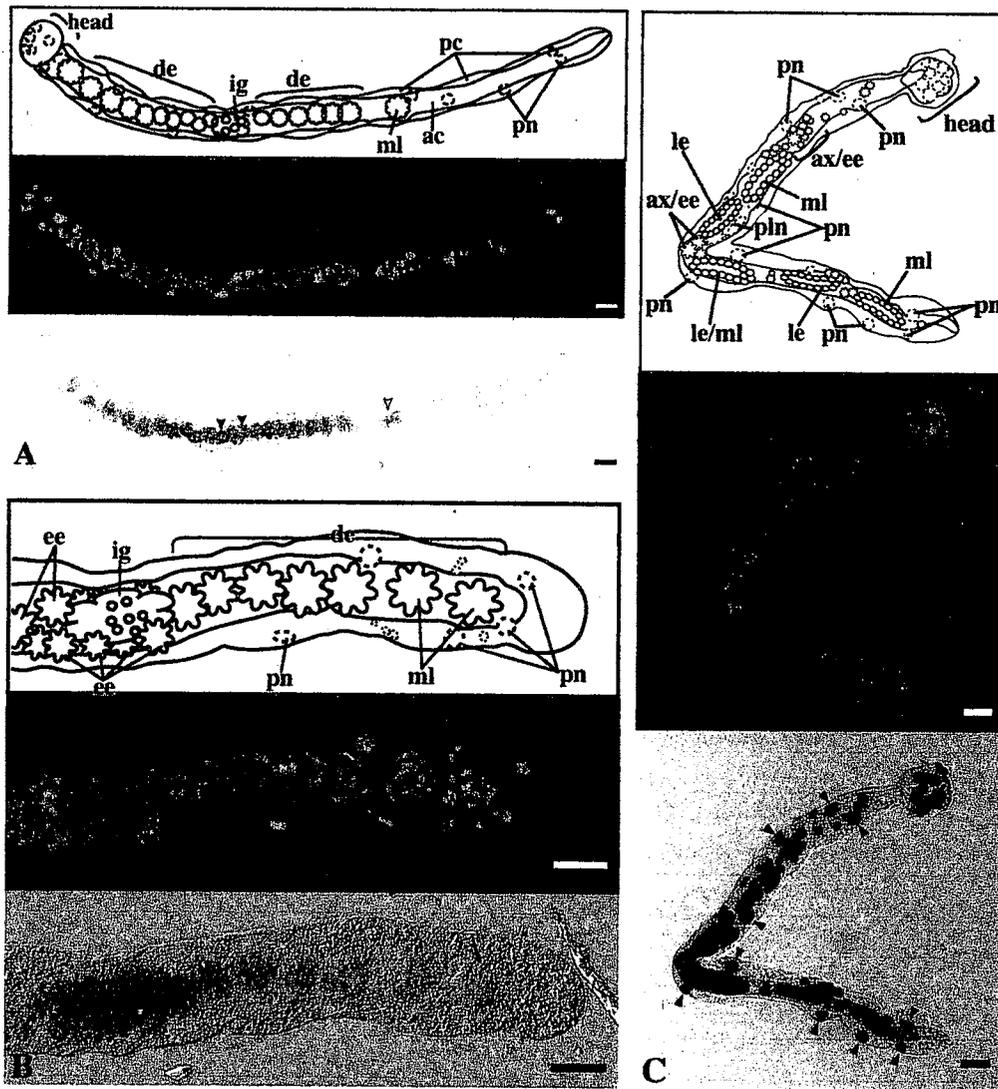


Fig. 3 *in situ* hybridization による DNA のコピー数の変化

各パネルごとに上から模式図、DAPI 染色像、DIG で検出されたシグナルパターン。用いたプローブは Panel A: *cox1*、Panel B: β -tubulin、Panel C: 反復配列。Panel A: Rhombogen(有性生殖過程の成虫)の全体像。軸細胞の中心に生殖腺(Infusorigen:ig)が位置し、そこから前端または後端に離れるにしたがって、発生の進んだ胚が順に位置している。シグナルは生殖腺や初期胚で強く(black arrowheads)、発生が進むにつれシグナルは弱くなり(open arrowhead)、成虫の分化細胞には全く検出されない。このことは発生の初期に mtDNA の大量増幅が起き、発生が進むにつれコピー数の現象が起きていることを示す。Panel B: Rhombogen の後端部分。左端に生殖腺が位置し、そこから右に行くに従い発生の進んだ胚が位置する。mtDNA(panel A) 同様の傾向が見られ、 β -tubulin も発生の初期にコピー数が増大し、発生が進むにつれコピー数が減少していることが示されている。この傾向は染色体外環状 DNA と同様でもあることから、ニハイチュウは発生初期に核ゲノム全体を増幅し、その後ゲノムの再編成により染色体外環状 DNA は捨てられ、 β -tubulin は増幅されることなく分配されて低コピーになることを示している。Panel C: Nematogen(無性生殖過程の成虫)の全体像。(有性生殖過程とは異なり、発生の順に並んで位置することはない)全ての核においてほとんど同レベルの濃いシグナルが検出された。特に分化細胞である体皮細胞核のシグナルは、個体が大きくなるほど濃くなる傾向が見られた。このことは細胞を肥大化させる時に反復配列のコピー数が増大していることを示す。ac: 軸細胞、ax: 軸原細胞、de: 発生途中の胚、ee: 初期胚、ml: 発生が完了した幼生、pc: 体皮細胞、pin: 多倍体の核、pn: 体皮細胞核。Bar: 20 μ m。

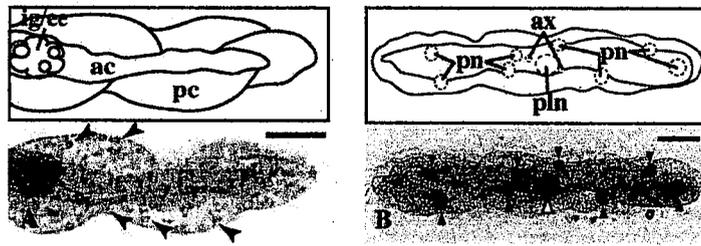


Fig. 4 BrdU の取り込みによる DNA 合成の検出

A、B 両パネルとも上が模式図、下が DIG で検出したシグナルパターン。A は成虫の後端部分、B は若い成虫全体像。A は BrdU を取り込ませる前に核 DNA 合成阻害剤である aphidicolin で前処理し、mtDNA の合成を検出している。arrowheads は分化細胞である体皮細胞 (pc) においてわずかに検出された mtDNA 合成を行なっているミトコンドリアのシグナルを示す。左端に見える生殖腺 (ig) や初期胚 (ee) とは異なり、mtDNA の合成頻度が低いことが示された。B は阻害剤による処理なしで BrdU を取り込ませて、核 DNA 合成を検出している。white arrowhead は軸細胞に存在する多倍体の核 (pln) を、black arrowheads は体皮細胞の核 (pn) を示す。全ての核においてシグナルが検出された。

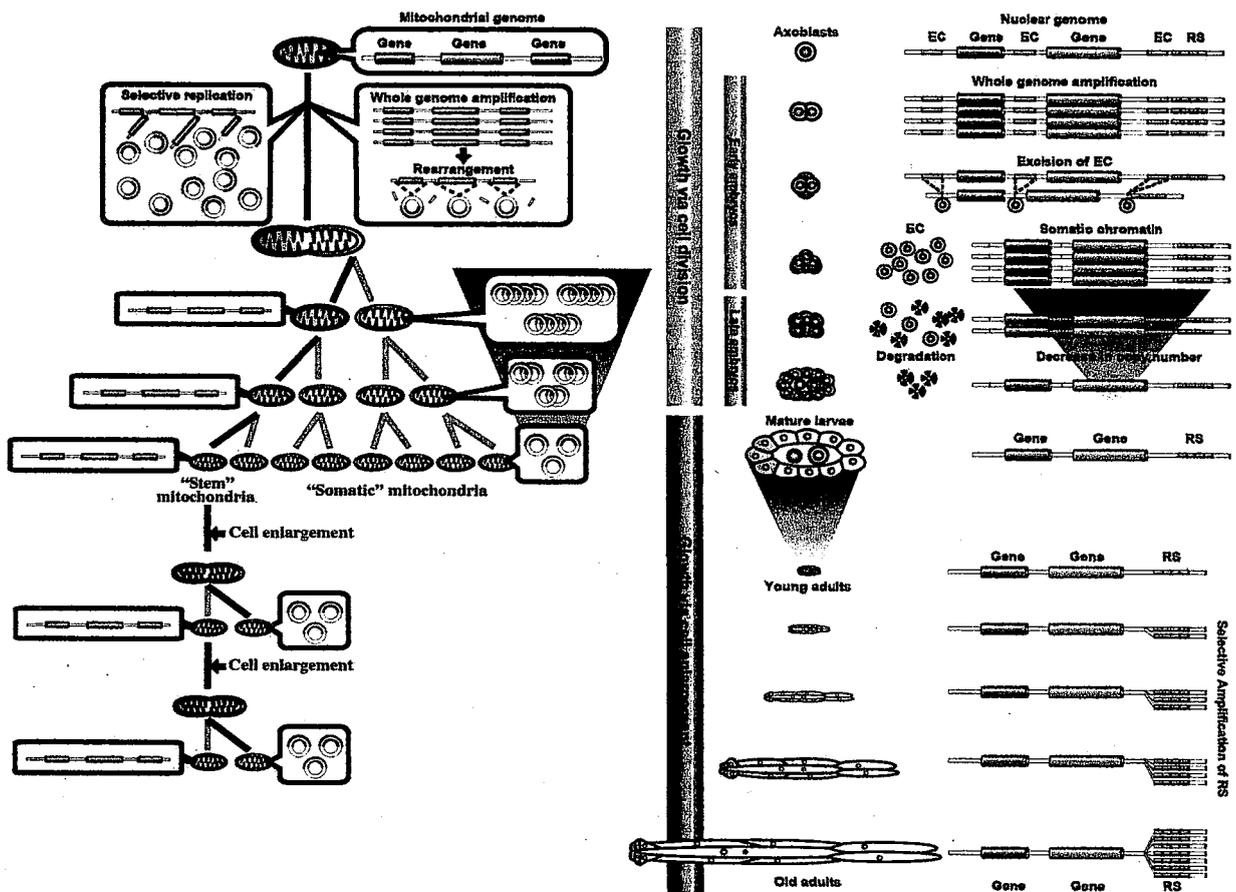


Fig. 5 核・ミトコンドリア両ゲノムで予想されるプログラムされた再編成モデル

中央にニハイチュウの発生過程を、それに対応するように左側にミトコンドリアの、右側に核の再編成モデルを示す。核・ミトコンドリアとも発生初期に DNA の大量増幅が起き、その後再編成により核では染色体外環状 DNA (EC) の形成・削除、体細胞染色質の形成・コピー数の減少、細胞の肥大化に伴う反復配列 (RS) の選択的増幅が起き、ミトコンドリアでは自律的複製の不可能な minicircle DNA の形成・コピー数の減少、体細胞ミトコンドリアの分化、分化細胞におけるごくわずかな幹ミトコンドリアの保持とそれからの体細胞ミトコンドリアの新たな形成が起きる。

学位論文審査結果の要旨

中生動物ニハイチュウは、細胞数わずか 30 個程度からなる極めて単純な体制を持つ多細胞の絶対寄生性生物である。ニハイチュウの進化的起源については、三胚葉動物が寄生退化により単純化したとする説と、単細胞の原生動物が独自に多細胞化したとする説が併存している。この進化的位置の曖昧さの原因は、寄生適応による特殊化のためと考えられ、ニハイチュウの寄生適応の実態を明らかにすることが急務であった。本研究によって明らかになったのは以下の点である。1) mtDNA は発生の初期に大量増幅し、その後、複製起点をもたないミニサークルへと構造変換される、2) 発生の進行にともなって mtDNA は複製されることなく分配され、コピー数を減少させる、3) 分化した“体細胞”ミトコンドリアの大半は、複製能力を喪失したミニサークルのみを保持するが、一部の“幹”ミトコンドリアは複製能力を持つ高分子 mtDNA を保持しており、細胞の肥大化にともない、mtDNA を複製して分裂する。一方、核 DNA も mtDNA とよく似た挙動をとり、発生の初期における全ゲノムの増幅、一部の DNA の環状化と体細胞ゲノムからの消失、発生の進行に伴った DNA の複製を行わない連続的な細胞分裂によるコピー数の減少、が確認された。特筆すべきは、分化した体細胞では、直列重複型の反復配列 (tandemly repetitive sequences) が選択的に増幅することによって細胞の大型化を可能にしていることである。これらのミトコンドリアと核 DNA の奇妙な挙動は、エネルギーコストの節約、発生時間の短縮化、分化後の細胞の肥大成長のための独自の寄生戦略を反映している。

本研究は、中生動物ニハイチュウの特殊な寄生適応戦略をゲノム DNA の側面から明らかにした点で高く評価される。とりわけ、体細胞分化時に mtDNA の構造変化が起こり、それに伴ってミトコンドリアの分化が起こるという発見は、これまでに全く類例をみないものである点で独創的である。これらの内容をふまえ、本論文は博士 (理学) に値すると判定した。