

氏名	能登 朋子
生年月日	
本籍	富山県
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第550号
学位授与の日付	2003年3月25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	Developmentally programmed DNA excision in the dicyemid mesozoans : Implication of DNA rearrangement and amplification (中生動物ニハイチュウの発生初期における DNA 再配列と増幅を示唆する環状 DNA 群の出現と消失)
論文審査委員(主査)	東 浩(理学部・助教授)
論文審査委員(副査)	櫻井 勝(理学部・教授) 山口 和男(学際科学実験センター・教授) 石田健一郎(理学部・講師) 笹山 雄一(自然計測応用研究センター・教授)

学位論文要旨

ABSTRACT

The dicyemid mesozoans are simple multicellular parasites with a long cylindrical axial cell that is surrounded by a single outer layer of 20 to 30 ciliated peripheral somatic cells. They have a constant cell number throughout their life span. The axial cell contains a single large polyploid nucleus, intracellular stem cells called axoblasts, and one to more than a hundred developing embryonic larvae, whose development proceeds within the axial cell. Here we demonstrate the appearance of extrachromosomal circular DNAs and their fate during early embryogenesis in *Dicyema japonicum*. These DNAs are highly heterogeneous in sequence, suggesting that they consist of unique but not repetitive elements. Potential ORFs were not evident in the elements, implying these DNAs are unlikely to have a protein-encoding function. *In situ* hybridization revealed that the circular DNA elements were restricted to the early embryonic larvae and gradually disappeared as the larvae approached maturity. Furthermore, Southern blot analysis and PCR analysis using high-molecular-weight

DNA as a template provided evidence that the extrachromosomal circles were originally present in the chromosome. Based on these observations, we propose a model in which large-scale DNA amplification and rearrangement occur during early embryogenesis concomitant with germ-line and soma differentiation.

[序論]

ニハイチュウ (dicyemid) はすべて底棲性の頭足類の腎囊を生活の場とする寄生生物である。ニハイチュウは多細胞生物であるが、極めて単純な体制をもち、わずか 20-40 個程度の細胞によって構成される。繊毛を備えた 20-30 個程度の体皮細胞 (peripheral cell) が薄い層のように、一つの大きな軸細胞 (axial cell) を取り囲んでいる。軸細胞は細胞質中に自身の大きな倍数性の核に加え、軸原細胞 (axoblast) と呼ばれる生殖細胞と発生段階にある幼生 (胚) 含んでいる。

一方、その生活史は複雑である (Fig. 1)。無性的に軸原細胞が直接胚発生を行うことにより、蠕虫型幼生 (vermiform) を生じるサイクルと、軸原細胞が両性腺 (hermaphroditic gonad) へ発達し卵と精子の受精を経て、有性生殖により滴虫型幼生 (infusoriform) を生じる二つのサイクルがあり、ニハイチュウ (二胚虫) の名は、これら二種類のまったく異なる幼生 (胚) が見られることに由来する。蠕虫型幼生を形成する個体を通常無性虫 (nematogen)、滴虫型幼生を形成する個体を菱形無性虫 (rhombogen) と呼ぶ。個体密度

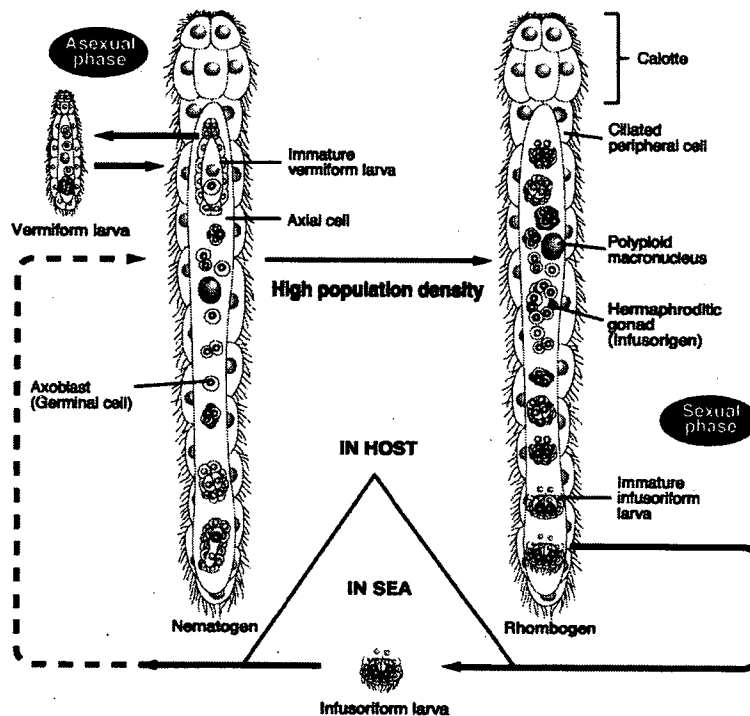


Fig. 1. ニハイチュウの生活環

が高くなると有性生殖サイクルに切り換わるとされており、滴虫型幼生は宿主の尿と共に海水中に出て、新しい宿主に寄生すると考えられている。

なお、どちらの場合も発生全過程は軸細胞内で進行し、発生終了以降、成虫（親）の体外へ放出され、生殖細胞以外は分裂を行わない。その発生過程における染色質削減（chromatin elimination）が古くから示唆されていたが、分子機構については不明なままである。本研究では、ニハイチュウの Total DNA 中に検出される染色体外環状 DNA と染色質削減との関わりについて述べる。

[結果及び考察]

ニハイチュウ total DNA 中には、その約半分を占める量の 100-500 bp の染色体外環状 DNA 群が存在する (Fig. 2)。精製した環状 DNA 群を、制限酵素 (*DraI*) 処理後ランタ

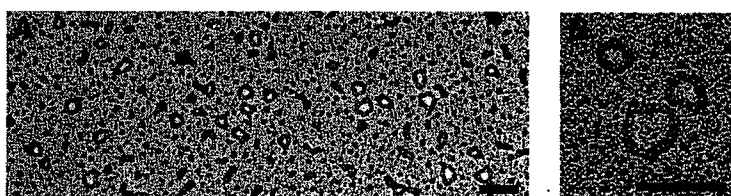


Fig. 2. 走査型電子顕微鏡観察による染色体外環状DNA群
Scale bar: 100 nm.

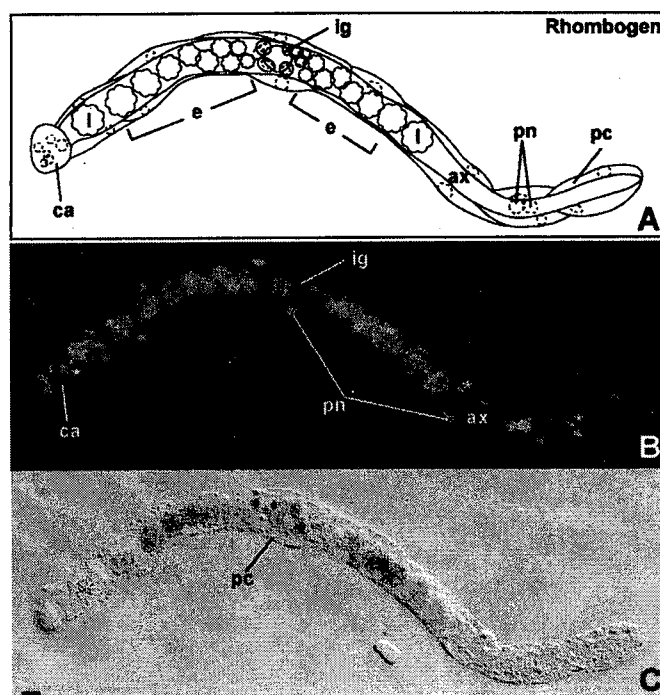


Fig. 3. DIG標識プローブを用いた *in situ* hybridization による環状DNA群の局在。A 菱形無性虫（成虫）。軸細胞 (ax) の中央に両性腺 (ig) が位置し、その周辺には発生中の胚が前、後方両端に向かって列んでいる（より発生が進んだ胚ほど両性腺から離れて位置している）。B DAPIによる核蛍光染色写真。C DIG検出パターン。初期胚 (e) に最も強いシグナルが検出され、発生が進むにしたがってシグナルは弱くなっていく。発生を終えた胚 (l: 幼生) や成虫にはシグナルは検出されない。pc: 体皮細胞, pn: 体皮細胞核, ca: 極帽。Scale bar: 10 μ m.

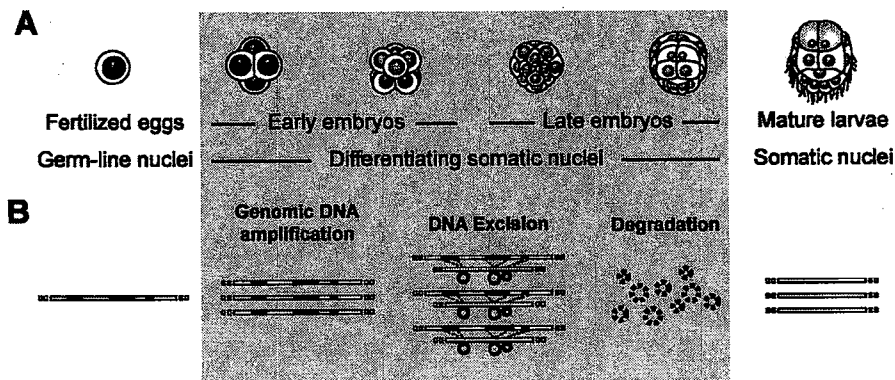


Fig. 4. 環状DNA形成機構のモデル. A 滴虫型幼生の胚発生模式図. 8-16細胞期において生殖細胞系列と体細胞系列の分化が起こる. B DNA増幅-削減モデル. 発生初期において体細胞系列の核において, 染色体上から環状構造を経てDNAが除去される.

ムクローニングを行い、これまでのところ 20 クローンの塩基配列を決定したが、相同な配列をもつものは得られていない。しかし、いずれも AT-rich で、長い ORF が存在しないことからタンパク質はコードしていないと考えられる。いくつかのクローンについて、単離した環状 DNA 群を鋳型に用いて inverse PCR を行い、実際に環状 DNA として存在していることを確認していた。これらの環状 DNA の塩基配列をプローブとして *in situ* hybridization を行ったところ、環状 DNA の局在を示すシグナルは初期胚に最も強く検出された (Fig. 3)。しかし、発生の進行に伴い、8-16 細胞期を過ぎるころにはシグナルは徐々に減少し、発生が終了し成虫の体外へ放出される直前や、既に放出された幼生、また成虫の体細胞には全く検出されなかった。この結果は、成熟した滴虫型幼生 (infusoriform) のみから得た total DNA 中には環状 DNA 群が確認されないということからも支持される。したがって、これらの染色体外環状 DNA は発生過程において一時的に形成されるものであることから、本来は染色体上に存在している可能性が示唆されたため、次の方法を用いて検証した。環状 DNA の配列をプローブに用いた Southern blot では、環状 DNA を示す強いシグナル以外に高分子側に弱いシグナルが検出され、また、精製した高分子染色体 DNA を鋳型とした inverse PCR において予想される大きさの DNA 断片が増幅されなかった。この結果は環状 DNA に相当する配列が染色体上に存在することを示している。

以上の結果から、ニハイチュウの発生初期胚において、染色体由来と考えられる環状 DNA 群が形成され、幼生の成熟とともに消失することが確認された。これまでのところそれぞれの環状 DNA の塩基配列に相同性は無く、多種の分子が存在すること、*in situ* hybridization において成熟した幼生 (がもつ生殖細胞) にシグナルが検出されなかったことから、染色体上におけるコピー数は少ないと推測されるため、これらの配列が反復配列である可能性は低い。したがって、発生初期胚における強いシグナルは DNA の増幅を示している。この DNA 増幅が示された発生初期 (4-8 細胞期) は、体細胞系列と生殖細胞系列の分化が起こる時期に相当する (Fig. 4)。実際、ニハイチュウは数回の細胞分裂

による胚発生を終えた後、体細胞は分裂を行わず、細胞の肥大によって成長し、それにともない核もその容積を増す。そのため、軸細胞の核のみならず体皮細胞の核においても倍数化が起こっている可能性がある。しかしながら、軸細胞および体細胞の大きな核にシグナルが検出されないという事実は、一度増幅された配列が、体細胞系列と生殖細胞系列の分化において体細胞系列からのみ除去されることを示唆している。このような環状 DNA は原生生物繊毛虫類で大核分化時の DNA 再編成の際にも観察されており、ニハイチュウの発生においても DNA の増幅と再配列が起こっていることが示唆される。

その体制の単純さから、ニハイチュウは古くから系統進化上、原生動物と後生動物をつなぐ生物として、中生動物門に分類されきた。しかしその後、ニハイチュウが示す体制の単純さは特殊な生息環境に適応したことによる退化的なもので、扁形動物段階からの寄生退化型の動物であるとする説が唱えられ、以降、ニハイチュウ系統進化的な位置について長く論争が続いている。近年、18S rDNA や Hox-type 遺伝子の解析からニハイチュウと lophotrochozoans との近縁関係が示されており、寄生退化型説を支持している。実際、本研究における β -tubulin 遺伝子による系統解析においてもニハイチュウを三胚葉動物群内に位置付ける結果がえられた。しかしながら、螺旋形卵割を行うことの他に動物との有力な形態的共有形質は少なく、一方で、神経系や腸はもちろん、器官をもたない体制の単純さに加え、ニハイチュウにおける二本の繊毛ネックレス構造、管状ミトコンドリアクリステ、エンドサイトーシス能力、コラーゲンの欠除、生殖サイクルの明確な分割等の特徴は原生生物とのつながりを強く連想させる。したがって本研究も含め、これらの形態についての分子生物学的な情報を増やすことがニハイチュウの進化を探るために必要であると考えられる。

【参考文献】

- 1) Lapan, A. E. and Morowitz, H. (1972) *Sci. Am.* 227, 94-101.
- 2) Noto T, Yazaki K and Endoh H (2002) *Chromosoma*, in press.
- 3) Bardele, C. F., Huttenlauch, I. and Schoppmann, H. (1986) *Symposia Biologica Hungarica* 33, 115-124.
- 4) Halanych, M. K. (1991) *Mol. Biol. Evol.* 8, 249-253.
- 5) Cavalier-Smith, T. (1993) *Amer. Micros. Soc.* 57, 953-994.
- 6) Czaker, R. (2000) *The Anatomical Record* 259, 52-59.

学位論文審査結果の要旨

中生動物ニハイチュウ（二胚虫）はわずか 30 個程の細胞からなる単純な体制をもつ絶対寄生性の多細胞生物である。その単純な体制のため、19 世紀に始まった進化的位置についての論争はいまだに決着していない。本研究では、ニハイチュウの発生初期に数千から数万種類の染色体外 DNA 群が出現し、発生が進むにつれて消失するというメカニズムを明らかにした。電顕観察、分子構造解析はともにこの DNA が環状で多様であり、少なく見積もってもゲノムの半分以上を占める因子であることを示している。この環状 DNA の消長を *in situ* hybridization で追跡したところ、初期胚において大量に存在し、発生が進行するにつれて完全に消失し、成熟した幼生にはほとんど確認されなかった。また、この環状 DNA が生殖細胞では染色体上の因子として高分子の DNA 上に存在することが長時間露光のサザン、およびゲルから抽出した高分子 DNA と環状 DNA を鋳型とした PCR、成熟した幼生の分離方法の開発等によって示唆された。これらの結果は、ニハイチュウの発生初期に生殖系列と体細胞系列が分化する際、ゲノム DNA が大量に増幅し、体細胞機能に関与しないゲノムの多くの部分が切り出され、捨てられることを示している。これは寄生生活における高度な適応形態であると考えることができる。

本研究は、1907 年にクロマチン削減が起こるとする現象が記載されて以来明らかにされてこなかった現象を分子レベルで解明した初めての研究である。また寄生に対するゲノムレベルでの適応形態を明らかにした点でも高く評価される内容をもつ。したがって、本論文は博士（理学）に値するものと判定した。