

中生動物ニハイチュウの寄生適応戦略：  
発生中のDNA増幅と削減，そして細胞分化後の反復配列の特異的増幅

栗田 ひろ子<sup>1,2</sup>，能登 朋子<sup>1,3</sup>，遠藤 浩<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>金沢大・院自然・生命科学，<sup>2</sup>総研大・葉山センター，

<sup>3</sup>Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences)

Parasitic adaptation of the dicyemid mesozoan *Dicyema japonicum*: Peculiar behavior of distinct chromosomal DNA elements during and after development

Hiroko AWATA<sup>1,2</sup>, Tomoko NOTO<sup>1,3</sup> and Hiroshi ENDOH<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Division of Life Sciences, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University; <sup>2</sup> Hayama Center for Advanced Studies, Graduate University for Advanced Studies;

<sup>3</sup> Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences)

#### SUMMARY

The dicyemid mesozoans are obligate parasites that inhabit the cephalopod renal appendage. They have a simple body, consisting of approximately 30 cells: one long cylindrical axial cell contains intracellular stem cells, called axoblasts, from which embryos are derived, and is surrounded by some 30 peripheral somatic cells. Cells divide at most eight times during their life span, and never divide after differentiation. During early development, numerous unique DNA sequences are first amplified and then eliminated in the form of extrachromosomal circular DNAs, leading to genome reduction. Here we show that different types of sequences, such as single copy genes or repetitive sequences, have different fates. Beta-tubulin represents single copy genes that are initially amplified, presumably via endoreduplication, but subsequently decrease in copy number through development. This suggests 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, tandemly-repeated sequences are likely to be selectively endoreplicated in the terminally-differentiated peripheral cell nucleus, concomitant with the increase of cell size, to maintain a general correlation between nuclear content and cell size. This is supported by the incorporation of BrdU. This peculiar behavior of distinct chromosomal DNA elements in dicyemids might have resulted from a unique adaptation to parasitism.

**【目的】** 寄生生物はきわめて特殊な環境に生息するため、さまざまな寄生適応を果たしている。寄生（あるいは内部共生）は核、オルガネラを問わず、生物のゲノムサイズを減少させることが多い。中生動物ニハイチュウは、軟体動物頭足類の腎囊表面に生息する細胞わずか30個程度からなる単純な体制の絶対寄生生物である。一個の大型の細長い軸細胞とそれを取り囲む30個ほどの体皮細胞からなる。奇妙なことに、軸細胞内には幹細胞に相当する軸原細胞が細胞内細胞の形で存在し、胚発生は軸細胞内で行われる。20世紀初頭には、発生の初期にクロマチン削減が行われるという記載がなされていたが、21世紀に入るまで分子レベルでの実態は解明されなかった。以前我々は、染色体外環状DNA群を同定し、これらが発生の初期に増幅すること、染色体から切り出され、最終的に体細胞ゲノムから排除されることを報告した（文献1）。しかし、切り出された環状DNAが選択的に増幅するのか、あるいは全ゲノムが一旦増幅した後、環状DNAが生成されるのかは不明であった。本研究はこの点を明らかにするために、上述した環状DNAに加え、シングルコピー遺伝子として $\beta$ -チューブリン遺伝子（文献2）と、新たに単離した直列重複型の反復配列をプローブとして、異なる染色体DNAエレメントの挙動を調べた。

**【材料と方法】** 反復配列はTotal DNAをHindIIIで完全分解し、ラダーの最小ユニットをアガロースゲルから回収して精製し、クローン化した。*in situ* hybridization用のProbeには、 $\beta$ -tubulin遺伝子の断片(BTdv1)、染色体外環状DNAの断片(Dc-10)、反復配列のcloneであるRS/HDIII-1を用い、DIG-11-UTPでラベルした。BrdU取り込み実験には、BrdU labeling and detection kit II (Roche)を用いて、BrdUを加えて1時間培養し、固定・Proteinase K処理後、シグナルを検出した。（詳細は文献1, 3, 4を参照）。

**【結果と考察】**  $\beta$ -チューブリン遺伝子は、発生の初期に大量増幅し、連続的な細胞分裂にもなってコピー数を減少させるという染色体外環状DNA群と似た挙動を示した。しかし、環状DNAが最終的に体細胞核から完全に消失するのに対し、チューブリン遺伝子は少数のコピーを維持していた。このことは、

発生初期の時点で全ゲノムが内部複製(endoreplication)により大量増幅し、その後DNA複製を伴わない細胞分裂によってコピー数(ploidy level)を減少させるということを示している。一方、反復配列は、発生初期の大量増幅、その後のコピー数の減少が確認されたが、その後の挙動は他のエレメントとはまったく異なっていた。細胞分化を終了し成虫になったニハイチュウは、その後分裂をすることなく細胞の肥大成長によって個体を大型化させる。個体成長に伴って分化した体細胞（例えば体皮細胞）核内では、反復配列は再びそのコピー数を増加させた。実際、分化した体細胞においてDNAの複製が行われていることは、BrdUの取り込みが見られることから支持される。

これらのメカニズムはニハイチュウの寄生適応の結果であると見なすことができる（文献4）。環状DNAの削減による体細胞ゲノムの小型化は、栄養源が制限された腎囊表面という環境に対する適応状態を反映している。またヌクレオチドプールとしての再利用に資するという利点もある。

発生初期におけるDNAの内部複製による増幅は、各細胞分裂周期におけるS期を省略することによって発生過程の短縮化に寄与していると考えられる。同様の寄生適応戦略はミトコンドリアゲノムにおいても見られる（文献3）。発生初期段階のミトコンドリアは、mtDNAを大量増幅し、その直後、mtDNAはミニサークル化し複製起点を失う。発生過程の進行にもなってミトコンドリアは分裂するが、核DNA同様mtDNAの複製は行われないため、次第にゲノムのコピー数を減少させる。

体細胞分化後、体皮細胞核内では反復配列が選択的に内部複製により増幅した。一般的に細胞の容積と核DNA量の関係には比例関係が認められる。DNA複製能力と細胞（核）分裂能力を失った体皮細胞は、DNA量を増加させるため、反復配列を通常の複製のメカニズムとは別個のやり方で増幅させるという戦略を採用し、複製能力を再獲得したと想定される。ニハイチュウにとって成虫の個体を大きくすることは軸細胞の大型化を意味し、多数の幼生に発生を提供することになり、個体数の増加に寄与するという意味で大きな利点があるようである。

## [文献]

- 1) Noto T, Yazaki K & Endoh H (2003) *Chromosoma* 111 (6): 359-368.
- 2) Noto T & Endoh H (2004) *BioSystems* 73 (1): 73-83.
- 3) Awata H, Noto T & Endoh H (2005) *Mol Genet Genomics* 273 (6): 441-449.
- 4) Awata H, Noto T & Endoh H (2006) *Chromosome Res* 14 (8): 817-830.