

祖先的渦鞭毛虫 *Oxyrrhis marina* のミトコンドリアゲノム解析北田 菜穂美¹, 福田 康弘², 遠藤 浩² (金沢大学・院自然・¹生物科学、²生命科学)Mitochondrial genome of the ancestral dinoflagellate *Oxyrrhis marina*Nahomi KITADA¹, Yasuhiro FUKUDA² and Hiroshi ENDOH² (¹Div. Biol. Sci., ²Div. Life Sci.,
Grad. Sch. of Natural Sci. and Technol., Kanazawa Univ.)

SUMMARY

Mitochondrial genomes have evolved in alveolates with drastic changes. Ciliates have a large mitochondrial DNA that contains genes for 2 rRNAs, 7 distinct tRNAs, 21 protein of known function, and 22 ciliate-specific open reading frames (ORFs). By contrast, apicomplexans have the smallest mitochondrial genomes, with only three protein-coding genes—cox1, cox3, cob—and fragmented versions of LSU and SSU rRNAs. These genes are arranged compactly on a 6 kb linear DNA molecule in *Plasmodium falciparum*. To date, mitochondrial genomes in dinoflagellates have been little studied: three mitochondrial genes encoding cox1, cox3, cob and fragmented rRNAs have been isolated. Nevertheless, these results are insufficient to reveal the mitochondrial genome evolution of dinoflagellates.

To gain greater insight into the nature of dinoflagellate mitochondria genomes, we isolated mtDNA from the most ancestral dinoflagellate *Oxyrrhis marina* by CsCl-Hoechst density ultracentrifugation. In this study, we obtained minicircles of various kinds carrying cox1 and cob-cox3 fusion genes, respectively, using Minipreps, a kit for isolating circular DNA. Some minicircles also carry fragmented rRNA genes. Furthermore, Southern blotting showed that the re-

spective minicircle molecules are <10 kb. These results suggest that a common ancestor of dinoflagellates and apicomplexans might have retained a highly reduced mitochondrial genome.

[目的] 渦鞭毛虫 オキシリス (*Oxyrrhis marina*) はアルベオラータに属す単細胞真核生物である。アルベオラータのミトコンドリアゲノムは非常に変化に富んでいる。アルベオラータ内でまず始めに分岐する織毛虫類は 40~47 kb の直鎖状ゲノムであり、2 つの rRNA、7 つの異なる tRNA、21 のタンパク質をコードする遺伝子を持つ^{1,3)}。さらに 22 個の特有の Open reading frames が見つかり、さらに多くの遺伝子がある可能性がある。次に分岐するアピコンプレクサ類は 6 kb の直鎖状ゲノムであり、タンパク質をコードする遺伝子は 3 つしか持っていない^{1,3)}。これは全生物の中でも最小のゲノムサイズである。rRNA は断片化して存在し、tRNA をもたない。一方アピコンプレクサ類と単系統をなす渦鞭毛虫類のミトコンドリアゲノムに関する知見は乏しい。これまでに3つの遺伝子 (cox1, cob, cox3) が見つかり、rRNA は断片化していることが明らかになっている³⁾。また派生的な種ではゲノムサイズが 20 kb 以上である可能性が示唆されている²⁾。しかしこれらは EST, shotgun sequencing, PCR 解析による情報のため、全貌は不明である。そこで本研究ではミトコンドリアゲノムの進化の詳細を明らかにすることを目的とし、渦鞭毛虫類の中で最も祖先的とされるオキシリス *Oxyrrhis marina* のミトコンドリアゲノムの解析を試みた。

[方法]

細胞の培養

オキシリスは、f/2 培養液を用いて、緑藻 *Dunaliella teriolecta* を餌として与え培養した。

mtDNA の単離

CsCl-Hoechst 密度勾配遠心法を用いた。フェノールクロロホルム抽出のみを行った Total DNA 約 20 µg に CsCl 4 g と Hoechst を 0.2 µg、さらに TE を加え、5 ml に調整した。超遠心用チューブに入れ、55,000 rpm (207,000 G)、20°C、8 h 20 min 遠心した。long wave UV light で照らしながら、バンドを注射針 (テルモ注射針 23G × 1/4") で回収した。TE-saturated-2-butanol を等量加え、12,000 rpm、5 min 遠心し、下層を新しいチューブに移した。これを 8 回繰り返した。3 倍量の TE を加え希釈し、エタノールで沈殿させ、滅菌水に再溶解した。

配列の解析

得られた mtDNA を BamHI と Pst I、EcoRI と HindIII の 2 種類の制限酵素で処理した後 pT7-blue vector に組み込み、クローニング・シークエンスを行った。解析は DDBJ (DNA Data Bank of Japan) の

BLASTN と BLASTX を使用した。

サザンブロット解析

DNA を 0.7% agarose tris-borate EDTA (TBE) gel にて電気泳動し、ナイロンメンブレン (GEヘルスケア社、Hybond-N+) にアルカリトランスファーした。検出には AlkPhos Direct Labelling and Detection System with CDP-Star (GEヘルスケア社) を用いた。

ミニサークルの単離

Promega 社の Minipreps を用いた。

[結果] CsCl-Hoechst 密度勾配遠心法により GC 比率の異なる 2 本のバンドが同定された。PCR によるミトコンドリア・核特異的配列の増幅の結果、上部のバンドは mtDNA に、下部のバンドは核 DNA に相当することがわかった。得られた mtDNA からは断片化された LSU rRNA の部分配列が見つかった。さらにサザンブロット解析では 10 kb 以下のスミアなシグナルに加え、3 kb 付近に複数のシグナルが同定された。また Minipreps により回収した DNA を鋳型とし、cox1、cob-cox3 の外向きに設計したプライマーを用いて PCR を行ったところ、共に複数の断片の増幅が確認された。それらの断片には、Stem-loop 構造をとりうる配列が多く存在していた。また、異なるミニサークル上に部分的に相同な配列が存在し、断片化された LSU rRNA の部分配列も見つかった。

[考察] オキシリスのミトコンドリアゲノムは遺伝子をコードする 10 kb 以下の複数のバリエーションをもつミニサークルであることが示唆された。これはオキシリスのミトコンドリアゲノムは祖先的形質を保持しておらず、極めて派生的であることを示している。よってアピコンプレクサ類と渦鞭毛虫類の共通祖先の段階でミトコンドリアゲノムは遺伝子が減少し、rRNA は断片化するなど、ゲノムの縮小が起きたと考えられる。アピコンプレクサ類は寄生生活を送るようになるにつれ、さらにゲノムサイズを縮小させた。一方渦鞭毛虫類は遺伝子の重複や断片化、ミニサークル化など、複雑なゲノムの再配列を行い、ゲノムサイズを拡大させている。

[文献]

- 1) Waller, R. F. and Jackson, C. J. (2009) BioEssays 31, 237-245.
- 2) Slamovits, C. H. et al. (2007) J. Mol. Biol. 372, 356-368.
- 3) Nash, E. A. et al. (2007) Mol. Biol. Evol. 24(7), 1528-1536.