

氏名	尾張 智美		
学位の種類	博 士 (生物科学)		
学位記番号	博 乙 第 2787 号		
学位授与年月日	平成 28年 3月 25日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第2項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Intracellular Localization and Sequence Variation of the Dinoflagellate Minicircle DNA (渦鞭毛藻ミニサークルDNAの細胞内局在と配列変異に関する解析)		
主査	筑波大学教授	学術博士	橋本 哲男
副査	筑波大学教授	博士 (農学)	鈴木 石根
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	石田 健一郎
副査	筑波大学准教授	理学博士	宮村 新一

## 論 文 の 要 旨

渦鞭毛藻の葉緑体には様々な色素組成のものが知られているが、最も基本的なものは渦鞭毛藻特有の色素であるペリディニンを含む紅藻由来の二次葉緑体である。その他の色素組成の葉緑体は、ペリディニンタイプの葉緑体から置き換わったものであり、渦鞭毛藻の細胞進化と多様性を理解するためには基本型であるペリディンタイプの葉緑体の特徴を明らかにすることが極めて重要である。

渦鞭毛藻の葉緑体 DNA の実体は長年不明であったが、1999 年に葉緑体遺伝子をコードする小さな環状 DNA 分子「ミニサークル DNA」の存在が報告された。この DNA は、約 2~6 kb の環状 DNA で葉緑体遺伝子を 1 つずつコードしており (1 gene - 1 circle)、サイズ、構造ともに一般的な葉緑体 DNA とは大きく異なる。このミニサークル DNA が葉緑体に局在するいわゆる葉緑体 DNA なのか、それとも葉緑体外に局在する DNA なのかは、渦鞭毛藻の葉緑体 DNA の進化を理解する上で重要な問題となる。しかし、これまでに *Symbiodinium* 属においてミニサークル DNA にコードされる *psbA* 遺伝子の mRNA が葉緑体内に局在するなど、ミニサークル DNA の葉緑体局在に対する間接的な証拠がある一方で、*Ceratium* 属の 1 種ではミニサークル DNA が核に局在しているという報告もあり、ミニサークル DNA の細胞内局在性に関する確たる証明はなされていない。

本研究はミニサークル DNA が細胞内のどこに局在するかを直接的に立証することを第一の目的とした。まず、ミニサークル DNA の局在観察に適していると考えられる渦鞭毛藻として、海産の *Amphidinium massartii* および淡水産の *Hemidinium nasutum* を選定して、ミニサークル DNA 配列を取得した。続いて、これらの種について単細胞 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法を確立した。次に、*A. massartii* において、細胞核 28S rRNA 遺伝子、ミニサークル DNA の *psbA* 遺伝子、非遺伝子領域のコア配列 (異なる遺伝子をコードするミニサークル DNA 間で保存された領域) の各プローブについて、細胞内局在を蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、核遺伝子である 28S rRNA 遺伝子プローブのシグナルは核小体付近に、ミニサークル DNA コードの *psbA* 遺伝子、コア配列のシグナルはともに葉緑体自家蛍光内部および周縁部に点

在し、細胞核には観察されなかった。また、*H. nasutum*についても、細胞核 28S rRNA 遺伝子とミニサークル *psbA* 遺伝子の局在を観察したところ、細胞核 28S rRNA 遺伝子シグナルは核小体付近に、*psbA* 遺伝子シグナルは葉緑体内に局在することがそれぞれ示唆された。これらの結果から、*A. massartii* および *H. nasutum* のミニサークル DNA は共に葉緑体内に局在することが直接的に示された。本研究により、ミニサークル DNA の葉緑体内局在を系統的に離れた二種 (*A. massartii* と *H. nasutum*) について示したことで、先行研究における間接的な葉緑体局在の示唆とあわせて、渦鞭毛藻の多くの系統でミニサークル DNA が葉緑体に局在していることが明らかになった。

また、*H. nasutum* のミニサークル DNA 配列を取得した際に、本種のミニサークル DNA には“異常”なコピーが多く存在することが示された。既知の多くのミニサークル DNA では、同一株内において大きな配列変異は存在しないため、この事実は興味深い結果である。そこで本研究では、その配列変異を詳しく解析し、ミニサークル DNA 配列の維持機構と進化を理解するための基礎情報を得ることを第二の目的とした。

*H. nasutum* の *psbA* 遺伝子領域について、55 個の部分配列をミニサークル DNA から直接取得して比較したところ、塩基置換、挿入/欠失ともに非常に頻度が高く、1 配列として同一の配列は取得できなかった。そこで、cDNA から 11 個の部分配列を得たところ、3 配列が同一配列であったが、8 配列は異なる配列だった。フレームシフトを伴う変異を含む配列の割合も DNA レベルで 95%、cDNA レベルで 64% と非常に高かった。非遺伝子領域については、*psbA*、23S rRNA 遺伝子ミニサークル DNA に共通の約 150 bp のコア配列が 1 個確認された。コア配列内にもコード領域同様の変異が高頻度に存在していた。コア配列以外の非遺伝子領域は領域全長にわたって短い繰り返し配列で構成されていて、長さが配列ごとに違っていた。このような遺伝子領域、非遺伝子領域の配列変異をもつミニサークル DNA は他の渦鞭毛藻で報告されていない。多数の配列変異が存在したことは、*H. nasutum* のミニサークル DNA において配列の修復機構が正常に機能していない可能性が示唆された。また、配列間での変異の比較から組換えも頻繁に起こっていることも示唆された。DNA のフレームシフトを含む配列の割合が RNA より高かったことは興味深く、転写、翻訳レベルで何らかの選択あるいは修復のメカニズムが存在するのか、単にプロモーター領域が不活化した変異ミニサークル DNA が多く存在するのか、今後の興味深い研究テーマの一つである。

本研究において、渦鞭毛藻ミニサークル DNA の葉緑体局在が初めて実証されたことは、今後の渦鞭毛藻の細胞生物学、代謝生理学をはじめ、渦鞭毛藻細胞の理解に大きく貢献するものである。また、*H. nasutum* にもミニサークル DNA の存在が確認でき、海産、淡水産に関わらずペリディニンタイプの渦鞭毛藻葉緑体にミニサークル DNA が存在することも、初めて得た知見である。今後、本研究で得た知見をもとに、渦鞭毛藻の葉緑体のミニサークル DNA の進化の解明がさらに進むことが期待される。

## 審 査 の 要 旨

ペリディニンを含む葉緑体をもつ渦鞭毛藻では、一般的な葉緑体 DNA が見つからない一方で、ミニサークル DNA と呼ばれる葉緑体遺伝子をコードするプラスミド様の小さな環状 DNA が見つかっている。本論文は、*A. massartii* と *H. nasutum* という 2 つのペリディニンを含む渦鞭毛藻について、単細胞 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法を導入することにより、ミニサークル DNA が葉緑体に局在する“葉緑体 DNA”であることを初めて直接的な証拠とともに示した点で高く評価できる。また、*H. nasutum* のミニサークル DNA 配列において、配列変異が異常に高いという現象を発見し、その変異を詳細に解析することにより、本種のミニサークル DNA の維持機構と進化に関する興味深い示唆を与えている点も、今後のこの分野の発展に寄与する大きな成果といえる。

平成 28 年 1 月 28 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験学力の確認を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。