

氏名	さの じゅんじ 佐野 順司
学位の種類	博士（生体情報）
学位記番号	論第2号
学位授与の日付	平成21年12月22日
学位授与の要件	論文博士 学位規則第4条第2項該当 (システム自然科学研究科生体情報専攻)
学位論文題目	渦鞭毛虫 <i>Oxyrrhis marina</i> におけるアクチン、 $\alpha$ -チューブリン、および HSP90 遺伝子のコピー数と核内での局在性の解析
論文審査委員	(主査) 教授 加藤 宏一 (副査) 教授 森山 昭彦 (副査) 准教授 湯川 泰 (副査) 教授 沼田 治 (筑波大学)

### 論文内容の要旨

渦鞭毛虫 *Oxyrrhis marina* (以下 *O.marina*)は、海産単細胞プランクトンで葉緑体を欠き、完全従属栄養原生生物である。細胞周期を通じて核膜が維持され、核内には常時凝縮染色体が存在する。この染色体は、ヒストンとヌクレオソームを欠き、またバンド染色(Cバンド、Gバンド、Qバンド)で染まらない等一般的な真核生物の染色体とは異なる特徴を有している。電子顕微鏡による微細構造の観察では、*O.marina* の染色体はねじれの無い平行走行するフィラメントの束からなる。このフィラメントの分子構造(molecular organization)は未だ明らかではないが、DNA2重ラセンが骨格となっていることが知られている。

本研究では、まず *O.marina* の細胞周期を FACS により解析した。その結果、静止期では約 3/4 の細胞が G1期で、1/4 の細胞が G2期で止まっている事が明らかとなった。また、DNA量と個体の大きさとの間にははっきりした相関は見られなかった。

次に、遺伝子の核内および染色体上での局在性を FISH (Southern fluorescence *in situ* hybridization)法により解析した。*O.marina* においてはタンパクをコードしている遺伝子としては、アクチン遺伝子、 $\alpha$ -チューブリン遺伝子、HSP90 遺伝子等の部分シーケンスが報告されている。本研究ではこれらのデータを基にプライマーを設計しそれぞれの遺伝子の部分配列に対する PCR product を得た。これをランダムプライム法で DIG ラベルしてプローブを作製し、FISH 法によって細胞核上にシグナルを検出した。シグナル数は、Actin で  $3 \pm 1.3$ (n=90)、 $\alpha$ -チューブリンは  $4.1 \pm$

1.4(n=70)、HSP90 は  $5.5 \pm 1.7$ (n=80)であった。

これら 3 種類の遺伝子の DNA あたりのコピー数は、PCR product を標準物質として Real-time PCRにより調べた。また、細胞あたりの DNA 量は、蛍光色素(Hoechst 33258)を用いて定量した。その結果、1 細胞あたりの DNA 量は 55.8 pg、アクチンのコピー数は 33.7、 $\alpha$ -チューブリンのコピー数は 10.4、HSP90 のコピー数は 5.4 であった。FISH 法で観察されたシグナル数と Real-time PCR で得られたコピー数が乖離している事から、可視化できた個々のシグナルの中には複数個の遺伝子が含まれているものがあると考えられる。

本研究の過程で得られたアクチン、 $\alpha$ -チューブリン、HSP90 の部分塩基配列は既知の配列とは部分的に異なっていた。これは遺伝的多型によるものと考えられ、アクチン(AB473566)、 $\alpha$ -チューブリン(AB473567)、HSP90(AB473568)として DDBJ に登録した。

渦鞭毛虫類において、タンパクをコードする遺伝子の核内での局在性の解析としては、本論文が初めての報告である。

### 論文審査の結果の要旨

*O. marina* の 3 種類のタンパク質遺伝子の染色体上での局在性を FISH により明らかにした。他の真核細胞とは異なり、渦鞭毛虫類は閥内に細胞周期を通じて特異的な染色体を有している。遺伝子はその染色体上にどのように存在した発現制御されているかは未だ明らかでなく、これを明らかにすることは生物全体を通じての染色体の機能構造やその進化過程を知る上でもきわめて有用である。申請者は各種の標本作製法と染色法を試み、染色体上における遺伝子の可視化に成功した。渦鞭毛虫におけるタンパク質をコードする遺伝子の局在性の証明は本研究が世界で初めてである。解析の過程では、染色体の脆弱性が確認され、ヒストンをもたない染色体の特徴が明らかとなった。

さらに、Real time PCR 法により各遺伝子の 1 細胞あたりのコピー数を算出した。その結果、FISH シグナル数と遺伝子コピー数の間に興味深い関連性が認められた。すなわち、FISH シグナル 1 個あたり数個～10 個程度の遺伝子コピーが存在する事が示され、分子生物学的な手法による先行研究を確認補強する結果となった。

これらの結果は渦鞭毛虫類の特異的な染色体の構造と機能を解明するための端緒として重要な意味がある。得られた結果およびそこに至るまでの各種テクニックの開発は博士の学位に相応しい。