

纖毛虫の大核形成(2) : *Oxytricha* の場合

Oxytricha trifallax は旋毛類に属する纖毛虫である。この仲間は、大核形成の際に大胆にゲノムを縮小させる。大核形成の際にゲノム中から捨てられる配列の割合は、貧膜口類の *Tetrahynema* では 10 から 15% だが、*Oxytricha* では実に 95% もが捨てられる (Prescott 1984)。最終的には、長さが 2kb 程度で 1 つの遺伝子だけが載った極小染色体がおおよそ 30,000 種類で上がる。足し合わせても 50Mb ほどで、小核の 1Gb のたった 5% にしかない。ただし、大核は多数体なので、実際には、約 50Gb の DNA が大核 1 つに含まれる。ちなみに小核は約 120 の染色体で構成され、染色体の平均長は 10Mb である。削られる DNA の割合も驚きだが、*Oxytricha* では大核ゲノム形成の際に、DNA の順序や向きを入れ替えが起こる。順序の入れ替えには、短い相同 DNA 配列の関与が想定されている (Prescott 1984; Landweber et al. 2000)。この短い配列は pointer と呼ばれ、順序の入れ替えが起こる場合に、前側の大核に残る配列 (macronuclear destined segment: MDS) とその後ろ側の IES との境界と、後ろ側の MDS とその前側の IES との境界に 2 から 20 塩基の配列として見られる。この pointer が順序の入れ替えの際に組み換えの基質として働いているらしい。

O. trifallax の小核では、telomere-end-binding protein α (*TEBP α*) は 17 個の MDS に、DNA polymerase α (*pol- α*) は 48 個の MDS に分かれてコードされている。このどちらも、順序の入れ替えが無く IES を取り除くだけの反応と、順序の入れ替えを必要とし離れた位置にある MDS 同士をつなぎ合わせる反応の両方を介して大核の遺伝子が形成される。再編成後の大核 *TEBP α* 配列に相当する dsRNA を発現する大腸菌を *O. trifallax* に食べさせると、*TEBP α* の再構成に異常が生じる (Nowacki et al. 2008)。再編成の途中の配列では、順序の入れ替えの無い MDS の接続は比較的進んでいるものが多かったが、順序の入れ替えを必要とする MDS の接続は出来ていないものが多い傾向があった。また、同じ MDS が複数の位置にあるものがあった。この場合 1 つは再編成後の位置に、もう 1 つは再編成前の位置に見られた。また、おそらく pointer に似た配列と pointer との組換えによる大きな欠失が起こっているものもあった。*pol- α* の dsRNA を導入した場合には、*pol- α* の再編成に同様の異常が見られた。想定通り、dsRNA と異なる配列には異常は見られなかった。

Nowacki らは、RT-PCR により、mRNA 全長よりも長い RNA の存在を確認している。この RNA はテロメア反復配列を含んでいて (両側にあるかどうかは明記されていない)、栄養成長期には見られず、接合後 55 時間で消失した。しかもこの RNA は sense と antisense 両方の向きで転写されている。また、intron が含まれていたし、順序の入れ替えが必要ない MDS から再構成される遺伝子でも

認められた。小核の配列は IES を含んでおり、順序も違っているので、これら dsRNA は大核の極小染色体から転写されたと考えられる。*Tetrahymena* では、dsRNA は小核で転写され、大核にも存在する配列部分が分解されると考えられている。一方、*Oxytricha* では大核で転写され、分解されていない状態で観察されている点に違いがある。

この dsRNA がガイドとして大核での DNA 再構成に働いているとするならば、前述の RNAi 実験で導入された dsRNA が想定通り自然状態の dsRNA を分解するように働いているのか、逆に、自然状態の dsRNA と同様にガイドとして機能しているのかを調べる必要が出てくる。Northern hybridization により、mRNA が分解されていることが確かめられたことから、dsRNA が RNAi を引き起こしていることが確認された。さらに、sense 鎖、antisense 鎖の長い RNA が分解されていることも、RT-PCR により確認されている。従って、dsRNA の導入による再編成の異常は、RNAi によりガイドとなる dsRNA が分解されることで起こったと考えられる。

人為的に 7 番目と 8 番目の MDS の順序を入れ替えた *TEBP α* の DNA を大核染色体として大核にインジェクションすると、接合の数世代後には順序の逆転した *TEBP α* を大核に持つ細胞が増殖していた。人為的に導入した DNA と小核の DNA 由来で大核形成の際に新しく作られた DNA とは制限酵素サイトで区別できるように工夫されており、順序の逆転した大核染色体が小核由来の DNA から新しく作られたのは確かである。また、入れ替えた MDS の境界に pointer になるような配列を選ぶことで、小核由来の DNA から再編成が起こりうるようにも工夫されている。通常順序の入れ替えを伴わない遺伝子である *TEBP β* でも同様の結果が得られ、制限酵素サイトでもシーケンスでも確認できている。

TEBP β の順序入れ替えは、RNA 導入でも試されている。sense 鎖のみ、antisense 鎖のみ、両鎖の場合が試されているが、どれも順序の入れ替わった大核染色体が接合の数世代後に確認できる。一本鎖の場合にも再構成が変化することからは、dsRNA ではなく、ssRNA でもガイド RNA として再構成の順序を規定することが可能であることがわかる。

配列解析からは予想外の示唆が得られている。*TEBP β* の順序を入れ替えた DNA か RNA をインジェクションした際、小核由来の配列と区別するために、著者らは 4 番目の MDS の後ろから 4 塩基目に C から T の変異を入れて、XbaI 切断サイトを導入した。これはインジェクションした DNA と、小核由来の配列から新たに再構成された大核 DNA とを区別する手段となるはずであった。しかし接合の数世代後の配列を調べたところ、全てにおいてこの変異が観察された。これが多型によるものでないことは確認されている。他の変異についても数世代後に見つかる例があり、pointer から離れた変異ほど頻度が減少した。これは、

pointer での組換えの際に、ガイドとなる RNA を鋳型にした DNA 合成が起こり、両側の MDS を正確につなぐ補助をしている可能性を示している。以前紹介した「DNA ポリメラーゼによる *in vivo* での逆転写」では、RNA を鋳型にした DNA 修復が起こっている可能性が指摘されている。大核の再編成でも切断位置の再結合は DNA 修復系の働きなのかもしれない。

まだまだ *Oxytricha* の大核形成の機構には謎が多いが、どうやら *Tetrahymena* とは相当異なった機構が存在しているらしい。こうなってくるとまだ解析の行なわれていない別の纖毛虫でもさらに異なった機構が存在しているのではないかと期待が持たれる。機構の内、何処が基本的で纖毛虫全体に共通し、何処が派生的で一部の纖毛虫だけで見られるのかがわかってくれば、この不思議な大核形成の起源と進化についても理解が深まることは間違いない。

Prescott DM.

The DNA of ciliated protozoa.

Microbiol Rev. 1994 Jun;58(2):233-67. Review.

Landweber LF, Kuo TC, Curtis EA.

Evolution and assembly of an extremely scrambled gene.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Mar 28;97(7):3298-303.

Nowacki M, Vijayan V, Zhou Y, Schotanus K, Doak TG, Landweber LF.

RNA-mediated epigenetic programming of a genome-rearrangement pathway.

Nature. 2008 Jan 10;451(7175):153-8.

2008/05/09

小島 健司 著

禁 無断複写転載