

## 紅色植物門ウシケノリ目の系統解析のための新しい分子種 II型DNAトポイソメラーゼ遺伝子 (*TOP2*) について

下村謙悟<sup>1</sup>・山本 敏<sup>2</sup>・原山重明<sup>2</sup>・嵯峨直恆<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> 東海大学大学院海洋学研究科 (〒424-8610 静岡県清水市折戸3-20-1)

<sup>2</sup> (株)海洋バイオテクノロジー研究所釜石 (〒026-0002 岩手県釜石市平田75-1)

<sup>3</sup> 東海大学海洋研究所先端技術センター (〒424-8610 静岡県清水市折戸3-20-1)

Kengo Shimomura<sup>1</sup>, Satoshi Yamamoto<sup>2</sup>, Shigeaki Harayama<sup>2</sup> and Naotsune Saga<sup>1,3</sup>: A preliminary study on the type II DNA topoisomerase genes (*TOP2*) for phylogenetic analysis of Bangiales (Rhodophyta)\*. Jpn. J. Phycol. (Sôru): 48: 1-7.

Partial nucleotide sequences of the putative type II DNA topoisomerase gene (*TOP2*) of marine red algae *Porphyra tenera* strain TU-3 and *Bangia atropurpurea* strain OM-1 were determined by sequencing the cloned PCR fragments. Lengths of the nucleotide sequences of *P. tenera* TU-3 and *B. atropurpurea* OM-1 were 1,208 bp. The amino acid sequences deduced from the nucleotide sequences were shown to contain putative motifs (type II DNA topoisomerase motif and ATP/GTP-binding site motif). The G-C contents of the two nucleotide sequences were 62% and 61% for *P. tenera* TU-3 and *B. atropurpurea* OM-1 respectively, and the sequence identity between them was 84%. The genetic distance in the *TOP2* between the *P. tenera* TU-3 and *B. atropurpurea* OM-1 was much higher than that of the SSU rDNA. These results suggest that the *TOP2* is a promising tool to aid a study on phylogenetic analysis in Bangiales.

**Key index words:** *Bangia atropurpurea*- *Bangiales*- *molecular phylogeny*- *Porphyra tenera*- *red algae*- *type II DNA topoisomerase gene*

<sup>1</sup> Graduate School of Marine Science and Technology, Tokai University, 3-20-1 Orido, Shimizu, Shizuoka 424-8610, Japan

<sup>2</sup> Marine Biotechnology Institute Co., Ltd., Kamaishi Laboratories, 75-1 Hirata, Kamaishi, Iwate 026-0002, Japan

<sup>3</sup> Center for Advanced Technology, Tokai University, 3-20-1 Orido, Shimizu, Shizuoka 424-8610, Japan

### 緒言

近年、生物の系統関係をより明確にすることを目的として、DNAの塩基配列を使用した分子系統学的研究がさかんに行われるようになってきた (Olsen *et al.* 1994)。紅色植物門ウシケノリ目の分子系統解析においてはSSU rDNA, ITS, *rbcL*, *rbcS*, RUBISCOスパーサーなどの分子種をもちいて系統解析が行われてきた (Oliveira *et al.* 1995, Yamazaki *et al.* 1996, Brodie *et al.* 1997, 1998, Müller *et al.* 1998, Woolcott and King 1998, Kunimoto *et al.* 1999, Shimomura *et al.* 1999)。しかし、これらの分子種を用いても明確な系統関係を示すことのできないことがあるとの報告もされている (Yamazaki *et al.* submitted)。進化上近縁な生物間 (近

縁種、系統株など) での分子系統解析では、もちいる分子種によっては明確な系統関係を示せないことがある。これは解析にもちいた分子の進化速度が遅い場合、対象とする生物間で変異の蓄積がほとんど、あるいはまったく生じていないことが原因の一つと考えられる。これを補うためには、より進化速度の速い分子種をもちいた系統解析を行う必要がある。さらに、分子系統解析にもちいる分子種は対象生物間で普遍的に保存されており、水平伝播しにくいなどの性質が要求される。

DNA ジャイレースのBサブユニットをコードする遺伝子 (*gyrB*) はSSU rDNAを上まわる進化速度を持ち、細菌の分子系統解析における新規の分子種として有望であることが報告されている (Yamamoto and Harayama 1995, 1996)。II型DNAトポイソメラーゼはDNA2本鎖の両方を一過的に切断し2本鎖DNAに生じ

\*The sequences reported in this paper have been deposited in DDBJ/EMBL/GenBank under accession numbers AB034764 for *P. tenera* TU-3 and AB034765 for *B. atropurpurea* OM-1.

Table 1. Nucleotide sequences of the PCR primer.

sense primer	CGA	RAT	HII	IGT	NAA	YGC	NGC	NGA
antisense primer	GIS	WIC	CRT	CII	IRT	CYT	GRT	C

N = A, G, T, C; R = A, G; S = C, G; W = A, T; Y = C, T; I = inosine

た絡まりや結び目を解消するという機能を担っており、原核生物のDNA ジャイレースのホモログである (Lynn *et al.* 1986)。一般的にII型DNAトポイソメラーゼのN末端側をコードする領域は*gyrB*に相同性を持つ領域で、ATPaseに関するドメインなど高度に保存された部分を持つ (菊池・宮池 1997)。その中央部にはDNAの切断・再結合に関わる活性部位Tyrが存在し、酵母、マウス、ヒトではC末端側に核移行シグナルが存在している (Fig. 1, 菊池・宮池 1997)。これまでII型DNAトポイソメラーゼおよびそれをコードする遺伝子 (*TOP2*) は、幅広い生物群についてそれらの構造や機能に関する分子レベルの解析が行われており、多くの知見がすでに得られている。また、*TOP2*は真核生物に普遍的に存在しており、適度な進化速度を保持していると思われ、ウシケノリ目を含め真核生物の分子系統解析の新しい分子種として期待できる。しかしながら、実際に *TOP2*が真核生物の分子系統解析に適用されたことはいまだなく、ウシケノリ目を含め紅藻類からのそれに関する報告はない。上記のような背景のもと、著者らはウシケノリ目に属するアサクサノリ (*Porphyra tenera*) とウシケノリ (*Bangia atropurpurea*) から *TOP2*の塩基配列のうち *gyrB*に相同性を示すN末端側をコードする領域の単離および塩基配列の比較を行い、この分子種のウシケノリ目における分子系統解析に対する有効性の検討を行った。

#### 材料と方法

本研究でもちいた材料は、東海大学先端技術センターのカルチャーコレクション室 (所在地: 静岡県清水市折戸3-20-1) に保存されている単藻培養されたア

サクサノリ (*Porphyra tenera* Kjellman) TU-3株とウシケノリ (*Bangia atropurpurea* (Roth) C. Agardh) OM-1株である。培養条件は、ESS2培地 (Kitade *et al.* 1996) をもちい、長日周期 (14 hr 明期, 10 hr 暗期)、温度 15 °C、光量約 16.6  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  で通気培養した。

ゲノムDNAの抽出法は、Aljanabi and Martinez (1997)の方法を一部改変したもの、すなわちこの方法に QIAGEN Blood & Cell Culture DNA Midi Kit (キアゲン) の処理を加えた方法をもちいた。

PCRによる *TOP2*の増幅には、センスおよびアンチセンスの混合プライマー (Table 1) をもちいた。これらのプライマーは、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*, Xie and Lam 1994; DDBJ/EMBL/GenBank Accession No. L21015)、マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*, Cheesman *et al.* 1994; SWISS-PROT Accession No. P41001)、センチュウ (*Caenorhabditis elegans*, Wilson *et al.* 1994; SWISS-PROT Accession No. P34534)のII型DNAトポイソメラーゼのアミノ酸配列をもとに、*gyrB*と高い相同性を示す領域を増幅できるように設計した。また、プライマー配列は真核生物に特異的な領域に設計した。反応にはサーマルサイクラー Gene Amp PCR System 9600 (パーキンエルマー) を使用し、ポリメラーゼとして Gene Taq NT (ニッポンジーン) をもちいた。反応サイクルはアサクサノリについては 94 °C, 1 min; 60.5 °C, 1 min; 72 °C, 2 min, ウシケノリについては 94 °C, 1 min; 58 °C, 1 min; 72 °C, 2 min の反応をそれぞれ 35 サイクルとした。この PCR 産物を電気泳動した後、GENE CLEAN II Kit (フナコシ) をもちいて目的とするものと思われる 1,200 ~ 1,300 bp の DNA 断片を回収した。

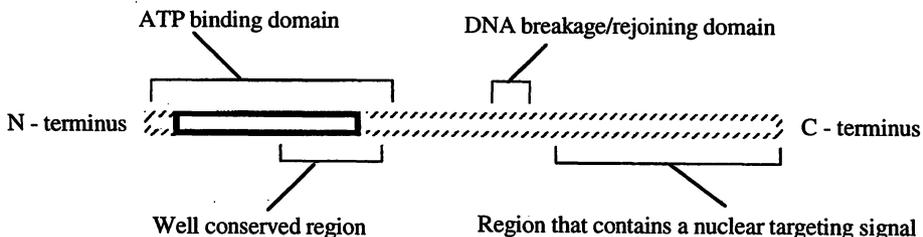


Fig. 1. The structure of type II DNA topoisomerase. A bold square indicates the putative region isolated in this study.

回収したPCR断片はpT7Blue Vector (ノヴァージェン)にLigation Kit ver. 2 (タカラ)をもちいてライゲーションし、コンピテントセルJM109 (タカラ)に導入した。塩基配列の決定は、ABI Prism 310 Genetic Analyzer (パーキンエルマー)を使用し、TOP2の配列内部から新たに設計したプライマーをもちいて行った。得られた配列についてはゲノムネット提供によるサービスBLAST 2.0 ADVANCED BLAST SEARCH (Altschul *et al.* 1997)により相同性検索を行い、既知のII型DNAトポイソメラーゼ遺伝子との相同性を調べた。

また、ゲノムネット提供によるモチーフ検索プログラムをもちいてモチーフの検索を行った。その後、アサクサノリとウシケノリについてClustal W (Thompson *et al.* 1994)をもちいて多重アライメントを行い、配列の比較を行った。アライメントは塩基配列とアミノ酸配列の両方について行った。最後にTOP2とSSU rDNAの2つの分子種でアサクサノリとウシケノリの配列の遺伝距離を求め進化速度を検討した。遺伝距離の解析は多重置換の可能性も考慮し、TOP2のコードンの3番目の塩基を外した場合についても行った。遺伝距離の計算はコンピューターソフトウェアPHYLP3.5.1. (Felsenstein 1993)に含まれたプログラムDnadistをもちいて行った。

結果

混合プライマーを使ったPCRの後、PCR産物を電気泳動すると6本前後のバンドが安定して得られた (Fig. 2)。シーケンスの結果得られた塩基配列はアサクサノリとウシケノリどちらも1,208 bpとなった。

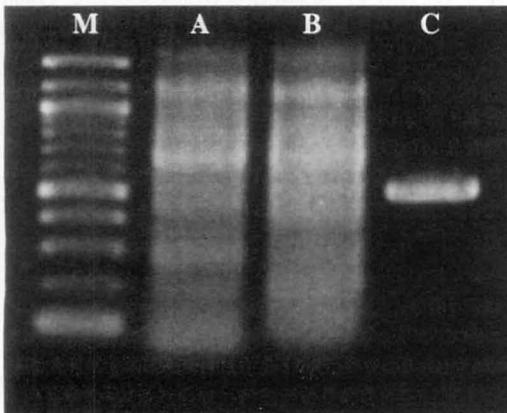


Fig. 2. Gel electrophoresis of the PCR products with degenerate primers. Lane M: molecular size marker; lane A: *P. tenera*; lane B: *B. atropurpurea*; lane C: positive control ( $\lambda$ -DNA).

<i>P. tenera</i>	AACAACCGGGTGTGGTGTGGAAACAATGGGGGGGATCCCGTGGCAATGCAGCCAAAG
<i>B. atropurpurea</i>	AACAACCGGGTGTGGTGTGGAAACAATGGGGGGGATCCCGTGGCAATGCAGCCAAAG
<i>P. tenera</i>	GAAAGGGGTACGTGCCGGAGCTCATCTTTGGCCACCTCTCACGTCTCCAACATGATGAC
<i>B. atropurpurea</i>	GAAAGGGGTACGTGCCGGAGCTCATCTTTGGCCACCTCTCACGTCTCCAACATGATGAC
<i>P. tenera</i>	GACGGGGAGAAAGGTGGTGGGGGCGCCGCAACGGGTATGGTGGCAAGTGGCCCAATC
<i>B. atropurpurea</i>	GACGGGGAGAAAGGTGGTGGGGGCGCCGCAACGGGTATGGTGGCAAGTGGCCCAATC
<i>P. tenera</i>	TTTTCAACAGCTTTGTGCTCGAGACGGCCGACGCTGCTGGGCAAGAGTCAAGCAG
<i>B. atropurpurea</i>	TTTTCAACAGCTTTGTGCTCGAGACGGCCGACGCTGCTGGGCAAGAGTCAAGCAG
<i>P. tenera</i>	ACGTTTAAAGCGCAACATGATGACCGGGGGAGCCCGCATCCGGGCTCGGGCAAGCCC
<i>B. atropurpurea</i>	ACGTTTAAAGCGCAACATGATGACCGGGGGAGCCCGCATCCGGGCTCGGGCAAGCCC
<i>P. tenera</i>	CGCGACACTGGAGCGGATACGCTTGGAGCGGACGCTGCAAGTTGGTATGGACCGG
<i>B. atropurpurea</i>	CGCGACACTGGAGCGGATACGCTTGGAGCGGACGCTGCAAGTTGGTATGGACCGG
<i>P. tenera</i>	CTCAACGAGGACCGCTGGCTCTCAATCGGGGTGGACATGGGGGTGGTGGT
<i>B. atropurpurea</i>	CTCAACGAGGACCGCTGGCTCTCAATCGGGGTGGACATGGGGGTGGTGGT
<i>P. tenera</i>	CCGGGATTGGGTGACCTCAACGGGGCAAGCTCAAGTT---AATCGTTCAAGCAG
<i>B. atropurpurea</i>	CCGGGATTGGGTGACCTCAACGGGGCAAGCTCAAGTT---AATCGTTCAAGCAG
<i>P. tenera</i>	TACGTGGACTTCACTTGGAGCGCCCGGACCGCCAGCGTCAAGCGCACGACGACGAGC
<i>B. atropurpurea</i>	TACGTGGACTTCACTTGGAGCGCCCGGACCGCCAGCGTCAAGCGCACGACGACGAGC
<i>B. atropurpurea</i>	GGGGGTGGGAGGTGGTGGTCTGTTGAGCGAGGGGAGATGAGCAGACAGCTTGTG
<i>P. tenera</i>	GGGGGTGGGAGGTGGTGGTCTGTTGAGCGAGGGGAGATGAGCAGACAGCTTGTG
<i>P. tenera</i>	AACAGCATCTACCACCAAGGGGGGACGACGCTCAATCATGTGGGACCAAGTGGTA
<i>B. atropurpurea</i>	AACAGCATCTACCACCAAGGGGGGACGACGCTCAATCATGTGGGACCAAGTGGTA
<i>P. tenera</i>	AGCGGATCGAGGACCAATTGCAAAAAGCAAGACTCTCAAGGTCAAGCCTTTCGAA
<i>B. atropurpurea</i>	AGCGGATCGAGGACCAATTGCAAAAAGCAAGACTCTCAAGGTCAAGCCTTTCGAA
<i>P. tenera</i>	ATCAAGTCCAGCTGCTCATCTACGTAAGTGCCTTGTGAAACCCCGGTTGACTCG
<i>B. atropurpurea</i>	ATCAAGTCCAGCTGCTCATCTACGTAAGTGCCTTGTGAAACCCCGGTTGACTCG
<i>P. tenera</i>	CAGACCAAGGAGATGCTACGTCGGGGCCGCTGTTGGGCTCAAATGGGTCTGCCCC
<i>B. atropurpurea</i>	CAGACCAAGGAGATGCTACGTCGGGGCCGCTGTTGGGCTCAAATGGGTCTGCCCC
<i>P. tenera</i>	GACCGGATGGCGAAGGACTATCAAGTGGGGGTGGTGGAGATGTGCTGAGCTCGCC
<i>B. atropurpurea</i>	GACCGGATGGCGAAGGACTATCAAGTGGGGGTGGTGGAGATGTGCTGAGCTCGCC
<i>P. tenera</i>	GAGTCAGGGAGGTCAAGGAGCTGGCCAAAGCAGGCGTGGGAAGCGCGCGGGGTGTG
<i>B. atropurpurea</i>	GAGTCAGGGAGGTCAAGGAGCTGGCCAAAGCAGGCGTGGGAAGCGCGCGGGGTGTG
<i>P. tenera</i>	GGCATTCCAAGCTGGAGACGCACTGGGGGGACCGGGGACAGCGCCAAAGTGGAC
<i>B. atropurpurea</i>	GGCATTCCAAGCTGGAGACGCACTGGGGGGACCGGGGACAGCGCCAAAGTGGAC
<i>P. tenera</i>	CTATCTCACTGAAAGGCACTCTGCAAGGCGCTGGCCATCTCGGGCTGTCTGTGCTG
<i>B. atropurpurea</i>	CTATCTCACTGAAAGGCACTCTGCAAGGCGCTGGCCATCTCGGGCTGTCTGTGCTG
<i>P. tenera</i>	GGCCGCACTTACGGGTTTTCCCGCTGGGGGAAGCTGCTCAAGTTGGGAGGCC
<i>B. atropurpurea</i>	GGCCGCACTTACGGGTTTTCCCGCTGGGGGAAGCTGCTCAAGTTGGGAGGCC
<i>P. tenera</i>	ACCCACAGCAGATTATGGACAGCGGGAGATCACCAACTCAAGAAATTATCGGGCTG
<i>B. atropurpurea</i>	ACCCACAGCAGATTATGGACAGCGGGAGATCACCAACTCAAGAAATTATCGGGCTG
<i>P. tenera</i>	CAGCAGGCAA
<i>B. atropurpurea</i>	CAGCAGGCAA

Fig. 3. A nucleotide sequence alignment of TOP2 from the two Bangiales members (*P. tenera* and *B. atropurpurea*). Length of the nucleotide sequences of *P. tenera* TU-3 and *B. atropurpurea* OM-1 were 1,208 bp. Regions corresponding to PCR primers were excluded from Alignment. The G-C content of the two nucleotide sequences were 62% and 61% for *P. tenera* TU-3 and *B. atropurpurea* OM-1 respectively, and the sequence identity between them was 84%. Astarisks indicate nucleotide identity.

```

P. tenera      NNGAGIPVAMHAKEGVYVPELIFGHLLTSSNYDDGEKKVVGGRRNGYAKLANIFSTRFVV
B. atropurpurea NNGAGIPVAMHAKEGVYVPELIFGHLLTSSNYDDGEKKVVGGRRNGYAKLANIFSTRFVV
*****

P. tenera      ETADASSGKTYKQTFKRNMDRGTPAIRASAKPRDTWTRITFEPDLAKFGMDRLNEDAVA
B. atropurpurea ETADAASGKTYKQTFTRNMDRGAPSIRASAKPKDAWTRITFEPDLPKFHMAALDADAVA
*****.*****.*****:*.*****:*.*****.* * *: ****
// // // // //
1

P. tenera      VLQMRVVDMAGVVPGIAYVLNGAKLKINSFKQYVDLHLADAPDAPRIHDATSGRWEVVVS
B. atropurpurea VLQMRVVDMAGVVPGIGVYVLNGARLKVRNFSQYVALHLADAPDAPRIHDDASGRWEVVVS
*****.*****:*.*** ***** *****

P. tenera      LSDGQLTQTSFVNSIATTKGGTHVNHVADQLVSRIQEHIAKKHKTLKVKPFQIKSQLSIY
B. atropurpurea LSDGQMQQTsfvnsisttkgthvthvadqlvsrixehiakrhkTLKVKPFIXSLSIF
*****: *****.*****.***** ***** ***** ** *:

P. tenera      VKCLVENPAFDSQTKEMLTSRPASFGSKWVCPDRMAKDLIKSGVVESVLSLAESRQVKEL
B. atropurpurea VKCLVENPAFDSQTKEMLTSRPSTFGSKWVCPDKMARDLMKSGVVESVLSLAESRQSKEL
*****.*****:*.*** ***** *****

P. tenera      AKTDGGKRARVSGIPKLDANLAGTRDSAKCTLILTEGDSAKALAIISGLSVVGRDYYGVF
B. atropurpurea AKTDGGKRARVTGIAKLDDANQAGTRDSAKCTLILTEGDSAKALAIISGLSVLGRDYYGVF
*****.***.***** ***** *****
2 3

P. tenera      PLRGKLLNVREATHKQIMDNAEITNLKKIIGLQHG
B. atropurpurea PLRGKLLNVREATHKQIMDNAEITNLKKIIGLQHG
*****

```

Fig. 4. An amino acid sequence alignment of *TOP2* from the two Bangiales members (*P. tenera* and *B. atropurpurea*). Bars indicate motifs [1-----: ADA(A/S)SGKT, putative ATP/GTP binding site motif; 2====: GGKR, putative amidation site motif; 3====: LTEGDSAKA, putative type II DNA topoisomerase motif]. Astarisks indicate amino acid identity, whereas colons and periods indicate highly conserved or conserved substitutions, respectively.

BLASTによる同源性検索では他生物のII型DNAトポイソメラーゼ遺伝子が優位にエンタリーされ、アライメントによる解析では両塩基配列間の同源性は84%で、どちらの配列にもイントロンと思われる領域は確認できなかった (Fig. 3)。アミノ酸配列をもちいたモチーフ検索ではII型DNAトポイソメラーゼモチーフに同源性のある領域の他、ATP/GTP結合モチーフ、アミド化サイトモチーフに同源性のある領域が検索された (Fig. 4)。塩基置換が生じているサイトでは同義置換の割合が71%を占めていた。G-C含量はアサクサノリが62%、ウシケノリが64%であった。これは他生物II型DNAトポイソメラーゼ遺伝子の相同領域と比べると高い値であった。

*TOP2*のSSU rDNAとの遺伝距離の比較では、アサクサノリとウシケノリ双方のSSU rDNAの変異座位数が1,803 bp (イントロンは除く) 中136箇所、配列間

の遺伝距離は0.0705だったのに対し、*TOP2*では1,208 bp 中125箇所、遺伝距離は0.1562であった (Table 2)。*TOP2*のコードン第3番目の塩基を解析対象から外した場合、残った1,007 bpにはアサクサノリとウシケノリ *TOP2* 配列間で108箇所の塩基置換が存在し、アサクサノリとウシケノリの遺伝距離は0.3029であった。

なお、本論文で報告された遺伝子の塩基配列は、次の承認番号の元DDBJ/EMBL/GenBankへ寄託してある (アサクサノリ TU-3株: AB034764, ウシケノリ OM-1株: AB034765)。

Table 2. Genetic distance of *P. tenera* and *B. atropurpurea* on *TOP2* and SSU rDNA.

	<i>TOP2</i>	SSU rDNA
genetic distance	0.1562	0.0705

## 考察

本研究で作製したプライマーはシロイヌナズナ、マラリア原虫、センチュウのアミノ酸配列をもとに設計したものである。このプライマーによって規定される領域はII型DNAトポイソメラーゼのN末端側である。得られた配列には各ドメインのモチーフ配列と推定される配列が存在していた。また、これらの各ドメインのモチーフ配列と推定される配列は同一のアミノ酸フレーム上に乗っており、これらのことから本実験で得られた配列はII型DNAトポイソメラーゼのN末端側をコードする配列であることが推定される。

PCRの際のアニーリング温度はアサクサノリ 60.5℃、ウシケノリ 58℃とかなり高めの設定を必要とした。混合プライマーを使ったPCRの場合、非特異的な断片の増幅を防ぐためにも可能な限り高いアニーリング温度が望ましいと考えられる。本研究でも56℃以下では500 bp以下のバンドしか増幅できなかったが、アニーリング温度を上げることによって目的とする1,300 bp付近のバンドが確認された例があった。また、このアニーリング温度の高さは今回得たTOP2配列自体のG-C含量の高さが影響していると考えられる（アサクサノリ62%、ウシケノリ64%）。外国産アマノリ属の一種 *Porphyra purpurea* では核ゲノム全体のG-C含量が約45%と報告されている（Le Gall *et al.* 1993）ので、ウシケノリ目に属する生物自体の全ゲノム中のG-C含量が高いというわけではなく、TOP2自体にG-C圧がかかっているためと考えられる。この点はアサクサノリのTOP2においてコドン第3番目の約87%がGまたはCを採用していることから、本遺伝子にG-C圧の存在が示唆される。

このような場合、多重置換の影響を避けるため、コドン第3番目の塩基を解析対象から外して系統推定する方法がとられることがある。本研究で得られたTOP2についてもコドン第3番目を解析対象から外して遺伝距離の算出を行った。コドン第3番目を解析対象から外すと遺伝距離が0.1562から0.3029と大きくなったのは、解析対象となる座位数と置換座位数の割合が変わったためと考えられる。アサクサノリとウシケノリのTOP2ではコドン第3番目を解析対象から外して残った1,007 bp中には108箇所塩基置換が存在した。SSU rDNA配列間の塩基置換数は1,803 bp中136箇所であることを考えると、コドン第3番目を解析対象から外しても、アサクサノリとウシケノリのTOP2配列間の塩基置換数の割合はSSU rDNA配列間の塩基置換数の割合よりも大きいことを示している。多重置

換を考慮してもTOP2はSSU rDNAよりも進化速度が速いことが示唆された。今後重要なことは、実際に系統樹を推定しコドン第3番目の有無によって分岐の順序にどのような影響が出るかを確かめることであろう。

ウシケノリ目内の分子系統解析においてはSSU rDNAをもちいた場合、十分な解像度が得られない場合があることが報告されている。Yamazaki *et al.* (submitted) は、アサクサノリと近縁種であるスサビノリ (*Porphyra yezoensis*) の系統関係をSSU rDNAをもちいて解析したが、系統樹の枝の信頼度が非常に低くなってしまったということを見いだしている。これはSSU rDNAの変異がアサクサノリとスサビノリの間で少なく、たがいの遺伝距離が小さいためと考えられる。一方、SSU rDNAとTOP2を比較すると、TOP2の方が進化速度が明らかに速いと考えられる。配列間の遺伝距離を比べる限り約2倍の値を示していた。この結果は細菌のSSU rDNAよりも *gyrB* の進化速度の方が速いという報告（Yamamoto and Harayama 1995, 1996）とも一致し、本研究を始めた際の著者らの予想を支持するものであった。

本実験で使用したウシケノリでは残念ながら色素体コードの *rbcl*, *rbcs*, RUBISCO スペーサーについてのデータがまだないためTOP2との直接の進化速度の比較はできなかった。しかし、Müller *et al.* (1998), Yamazaki *et al.* (submitted) はアサクサノリがスサビノリと近縁であることを分子系統学的に示唆しており、また、著者らは本実験でもちいたウシケノリが北アメリカ産のウシケノリの一種（Müller *et al.* 1998）と分子系統学的に近縁であることを見出ししている（未発表データ）。このスサビノリとウシケノリの一種の間のSSU rDNAを基にした遺伝距離は0.0703であり、*rbcl* を基にした遺伝距離は0.0832であった（未発表データ）。また、RUBISCO スペーサーは非コード領域であるが、Brodie *et al.* (1998), Woolcott and King (1998) はRUBISCO スペーサーが種間の分子系統解析のマーカーとして有効であることを示している。*rbcl* の比較と同様、アサクサノリと近縁なスサビノリのRUBISCO スペーサーの塩基配列（Brodie *et al.* 1998）と本実験でもちいたウシケノリと近縁なウシケノリの一種のRUBISCO スペーサーの塩基配列を基にした両者の遺伝距離は0.2337であった（未発表データ）。これまで紅藻の分子系統解析においてSSU rDNAをもちいた解析範囲とRUBISCO スペーサーをもちいた解析範囲の中間的進化速度を持った分子としては *rbcl* や *rbcs*

がほとんどであった (Brodie *et al.* 1997, 1998, Woolcott and King 1998, Müller *et al.* 1998)。これらのデータは著者らが実験に使用したアサクサノリとウシケノリの同一種・株による直接の比較から得たものだけではないため、これらの結果から直ちにウシケノリ目内の分子系統解析のための分子種の有効性について一般化して考察することには慎重を期さねばならないが、上記のデータは *TOP2* がウシケノリ目内において *rbcl* と RUBISCO スペースターの間に位置する進化速度を持つことを示唆し、また、*TOP2* をもちいることによるウシケノリ目内のより精度の高い分子系統解析の可能性をも示唆している。

分子系統解析を行う上で重要な事は、同じ生物群についていくつかの分子種をもちいた解析結果を重ね合わせ慎重に検討することであろう。また、ミトコンドリアや色素体といったオルガネラ由来の情報と核由来の情報を重ね合わせることは、その生物の系統関係についてより深い考察をもたらしてくれるはずである。こういった意味からも、核コードの遺伝子である *TOP2* の持つ可能性は大きいと考えられる。今後、*TOP2* に関してパラローガスな比較をさけるための対処が必要であり、アイズザイムの存在の検討が必要と考えられる。現在のところ、鳥類と哺乳類については  $\alpha$ 、 $\beta$  のアイズザイムが存在する (菊池・宮池 1997) が、それ以外の生物でアイズザイムの存在の報告はない。ウシケノリ目においても *TOP2* のアイズザイムの存在の有無をハイブリダイゼーションなどの手法もちいて確認する必要がある。著者らは、ウシケノリ目に属するいくつかの種からの *TOP2* の単離と塩基配列の決定に関する研究を引き続き行っている。このような研究にもとづく *TOP2* に関する情報の蓄積は、ウシケノリ目の分子系統解析に多大な貢献をするであろう。

#### 謝辞

本研究を進めるにあたり御助言を頂いた東海大学海洋研究所先端技術センター北出幸広博士に感謝する。また、御協力を頂いた東海大学嵯峨研究室所属の院生ならびに卒研生の諸氏に感謝する。なお、本研究の一部は、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の「複合生物系等生物・資源利用技術開発プロジェクト」、および文部省・私学事業団・東海大学の「ハイテク・リサーチ・センター・プロジェクト」からの研究助成によるものである。

#### 引用文献

- Aljanabi, S. M. and Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucl. Acids Res.* 25: 4692-4693.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Brodie, J., Hayes, P. K., Barker, G. L. A. and Irvine, L. M. 1997. Speciation with the genus *Porphyra* (Bangiophyceae, Rhodophyta): evidence for a Pacific element within the Atlantic flora. *Phycologia* 36 (suppl.): 11.
- Brodie, J., Hayes, P. K., Barker, G. L. A., Irvine, L. M. and Bartsch, I. 1998. A reappraisal of *Porphyra* and *Bangia* (Bangiophyceae, Rhodophyta) in the Northeast Atlantic based on the *rbcl-rbcS* intergenic spacer. *J. Phycol.* 34: 1069-1074.
- Cheesman, S., McAleese, S., Goman, M., Johnson, D., Horrocks, P., Ridley, R. G. and Kilbey, B. J. 1994. The gene encoding topoisomerase II from *Plasmodium falciparum*. *Nucl. Acids Res.* 22: 2547-2551.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny inference package) 3.5.1 c. University of Washington, Seattle.
- 菊池韶彦・宮池光子 1997. トポイソメラーゼによる細胞の機能調節. *細胞工学* 16: 1576-1580.
- Kitade, Y., Yamazaki, S. and Saga, N. 1996. A method for extraction of high molecular weight DNA from the macroalga *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 32: 496-498.
- Kunimoto, M., Kito, H., Kaminishi, Y., Mizukami, Y. and Murase, N. 1999. Molecular divergence of the *ssu rRNA* gene and internal transcribed spacer 1 in *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 11: 211-216.
- Le Gall, Y., Brown, S., Marie, D., Mejjad, M. and Kloareg, B. 1993. Quantification of nuclear DNA and G-C content in marine macroalgae by flow cytometry of isolated nuclei. *Protoplasma* 173: 123-132.
- Lynn, R., Giaever, G., Swanberg, S. L. and Wang, J. C. 1986. Tandem regions of yeast DNA topoisomerase II share homology with different subunits of bacterial gyrase. *Science* 233: 647-649.
- Müller, K. M., Sheath, R. G., Vis, M. L., Crease, T. J. and Cole, K. M. 1998. Biogeography and systematics of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) based on the Rubisco spacer, *rbcl* gene and 18S rRNA gene sequences and

- morphometric analyses. I. North America. *Phycologia* 37: 195-207.
- Oliveira, M. C., Kurniawan, J., Bird, C. J., Rice, E. L., Murphy, C. A., Singh, R. K., Gutell, R. R. and Ragan, M. A. 1995. A preliminary investigation of the order Bangiales (Bangiophycidae, Rhodophyta) based on sequences of the nuclear small-subunit ribosomal RNA genes. *Phycol. Res.* 43: 71-79.
- Olsen, G. J., Woose, C. R. and Overbeek, R. 1994. The winds of (evolution) change: Breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* 176: 1-6.
- Shimomura, K., Yamazaki, S., Fukuda, S., Miyata, T. and Saga, N. 1999. A preliminary study on phylogenetic position of *Bangia atropurpurea* strain OM-1 (Bangiales, Rhodophyta) based on the SSU rDNA sequence. *Bull. Inst. Ocean. Res. Develop., Tokai Univ.* 20: 99-102.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Wilson, R. *et al.* 1994. 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* 368: 32-38.
- Woolcott, G. W. and King, R. J. 1998. *Porphyra* and *Bangia* (Bangiaceae, Rhodophyta) in warm temperate waters of eastern Australia: Morphological and molecular analysis. *Phycol. Res.* 46: 111-123.
- Yamamoto, S. and Harayama, S. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1104-1109.
- Yamamoto, S. and Harayama, S. 1996. Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *Intl. J. Syst. Bacteriol.* 46: 506-511.
- Yamazaki, S., Kitade, Y., Maruyama, T. and Saga, N. 1996. Phylogenetic position of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) based on the 18S rDNA sequence. *J. Mar. Biotechnol.* 4: 320-322.
- Yamazaki, S., Shimomura, K., Shin, J.-A. and Saga, N. Composition with the variable regions and the phylogenetic positions based on the SSU rDNA sequences of three strains of *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta). *Eur. J. Phycol.* : (submitted).
- Xie, S. and Lam, E. 1994. Characterization of a DNA topoisomerase II cDNA from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 106: 1701-1702.

(Received 30 Aug 1999, Accepted 30 Nov 1999)

