

多細胞生物進化解明の基盤としての植物不等分裂に関わる遺伝子ネットワークの解明

●藤田 知道^{1),2)} ◆日渡 祐二¹⁾ ◆佐藤 良勝¹⁾ ◆村田 隆¹⁾ ◆内山 郁夫³⁾

1) 基礎生物学研究所生物進化研究部門 2) 現、北海道大学大学院理学研究科 3) 自然科学研究機構計算科学研究センター

＜研究の目的と進め方＞

細胞の不等分裂は、特定のmRNAやタンパク質の細胞内での不均等分布を始めとする細胞極性の形成と、引き続き細胞分裂により異なる二つの娘細胞が形成される過程である。多細胞生物は多様に分化した細胞の集合体であり、細胞分化の出発点である不等分裂の分子機構を解明することは多細胞生物の発生メカニズムを解明するうえで重要である。さらに、単細胞生物から多細胞生物が進化したときにどのような遺伝子の進化が重要であったかを推定する足がかりを提供するはずである。陸上植物は細胞壁を持ち細胞が移動できないため、発生過程における不等分裂の役割はとりわけ重要であるが、適切な実験材料がなかったために遺伝子レベルでの研究はほとんどない。また、後生動物と陸上植物は異なった不等分裂の分子機構を持つ可能性が高く植物における不等分裂の分子機構に関する研究が必要である。本研究では、ヒメツリガネゴケ幹細胞由来のプロトプラストに完全長cDNAを一過的に過剰発現させ、プロトプラスト再生過程の不等分裂に異常を引き起こすような遺伝子の網羅的単離、機能解析を目的とする。さらに、陸上植物の不等分裂と後生動物の不等分裂の分子機構を比較することにより、生物界で多細胞生物が共通祖先のもっていた分子機構をどのように改変することによって多細胞化したのかを推定する。

＜研究開始時の研究計画＞

(1) ヒメツリガネゴケの無処理原系体由来の完全長cDNAライブラリーに加え、オーキシンおよびサイトカイニン処理した原系体から作成した完全長cDNAライブラリーからそれぞれ15,000クローンについて両末端塩基配列を決定し、EST解析を行いカタログ化する。無処理原系体ライブラリーにおけるEST解析と同様に、得られたEST情報は順次データベース化し公開する。

(2) カタログ化したヒメツリガネゴケ完全長cDNAクローンの中から不等分裂に関係しないと考えられるクローンを除いた10,000クローンを選抜する。選抜したクローンを順次ヒメツリガネゴケ単離プロトプラストに導入し、一過的に過剰発現させる。このような一過的過剰発現スクリーニングを行い、不等分裂に関連する表現型を引き起こす候補遺伝子を同定する。この方法の利点は、既知配列の完全長クローンを用いてスクリーニングするので、表現型が得られればすぐに原因遺伝子が特定でき、詳細な機能解析が行えることである。

(3) 一過的過剰発現法で得られた不等分裂に関わる候補遺伝子（予備的実験から約100～300種類と予想）の網羅的機能解析を以下の方法で行う。

3-1) 候補遺伝子のcDNA全長域にわたる塩基配列を決定し、類似性検索や系統樹解析を行い機能予測する。

3-2) ゲートウェイクローニング法により作成したRNAiコンストラクトをプロトプラストに一過的に導入し、細胞極性、不等分裂への影響を観察する。

3-3) 候補遺伝子とGFPの融合遺伝子をゲートウェイ

法により作成し、プロトプラストで一過的に過剰発現させ、融合タンパク質の細胞内局在を調べる。

(4) ヒメツリガネゴケから単離したプロトプラストの細胞極性形成開始から不等分裂中の過程で発現している遺伝子群をこれまで以上に効率的かつ網羅的に単離するため、プロトプラスト第一不等分裂過程を多く含むステージの細胞および、ヒメツリガネゴケ胞子体の初期発生過程の胚からRNAを抽出し、完全長cDNAライブラリーを新たに作成し、それぞれから15,000クローンずつの両末端塩基配列を決定しEST解析を行いカタログ化する。新しく得られたEST情報は既存のデータベースから公開する。

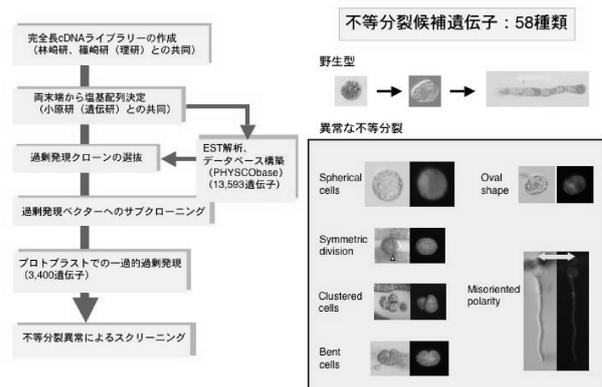
(5) 従来のライブラリーを用いたスクリーニングを継続、終了するとともに新規2種類の完全長cDNAライブラリーから1,000ないし2,000クローンを選抜し一過的過剰発現スクリーニングを行い、新たな不等分裂関連遺伝子を単離する。

(6) 新たに得た不等分裂候補遺伝子（約50個と予想）の網羅的機能解析を前述の3-1)~3-3)の方法で行う。

(7) 植物の細胞極性形成、不等分裂にどのような遺伝子がどのように関与しているかを考察し、植物不等分裂分子機構の全貌解明への作業仮説を提唱する。

以上不等分裂関連遺伝子スクリーニングの過程ならびに得られた表現型の分類を下図に示す。

＜完全長cDNA過剰発現による不等分裂遺伝子の同定＞



＜研究期間の成果＞

(1) 3種類の完全長cDNAライブラリーの作成とEST解析

ヒメツリガネゴケ完全長cDNAライブラリーを理研林崎研・篠崎研との共同研究により3種類（原系体無処理、オーキシン処理、サイトカイニン処理）作成した。これら3種類のライブラリーからそれぞれ10,000～15,000クローンを選び、5' と3' の両側から合計約90,000のEST配列を決定した（遺伝研小原研との共同研究）。ESTデータを解析した結果、これらのESTは13,593種類の完全長cDNAに分類できた。また、ヒメツリガネゴケ遺伝子の多くはシロイヌナズナにも共通して存在していることを

明らかにし、データベース(PHYSCObase)を作成、公開した(成果公表リスト2)。同時に、解析結果を論文発表した(成果公表リスト1)。

(2) 代謝、光合成など不等分裂には直接関わりが無いであろうと予想される遺伝子を除き、約4,000遺伝子を選択し、これらを順次、コケ過剰発現ベクターにサブクローニングした。そのうち約3,400遺伝子についての過剰発現実験を行い、約200遺伝子が再生過程に異常を引き起こすことがわかった。これらの表現型の再現性、不等分裂異常の頻度を総合し、不等分裂異常に関わると考えられる候補原因遺伝子を58種類に絞り込んだ(成果公表リスト3)。不等分裂異常に関わる表現型として、等分裂になるもの、不等分裂がおこらず等方位的に細胞が巨大化するもの、細胞が多分裂しクラスター化するもの、極性方向が正常に比べて直交するものなどのカテゴリーに分類できた。これら候補遺伝子の全塩基配列を決定したところ、後生動物や菌類などにおいて不等分裂や極性形成との関わりが報告されているものが14種類含まれていた。また、機能未知の遺伝子と類似するものが多数含まれており、真核多細胞生物に共通して存在するものや植物特異的なものなどが見いだされた。

(3) 不等分裂候補遺伝子の機能解析

得られた58種類の候補遺伝子すべてについて不等分裂時の細胞内局在の変化を追跡する。そのため、ジーンターゲット法により内在性遺伝子をYFP融合タンパク質遺伝子と置換したヒメツリガネゴケ形質転換体の作成し、内在性プロモーター制御下における融合タンパク質の局在変化を追跡した。これまで、36種類についてYFPタンパク質が正しくノックインできたラインを確立し、28ラインの観察を行った。融合タンパク質の蓄積が観察できた14ラインのうち7ラインにおいて不等分裂により生じる幹細胞特異的な蓄積が観察できた。また、RNAi用コンストラクトをゲートウェイクローニング法により作成し、18種類の候補遺伝子についてRNAiを行った。その結果、10種類の遺伝子について、プロトプラストの再生異常が観察できた。さらに、アクチン、チューブリン、液胞膜を可視化するためGFP-タリン、GFP- α チューブリン、gTIP-GFPをターゲットしたヒメツリガネゴケ株を樹立した。

(4) ヒメツリガネゴケから単離したプロトプラストの不等分裂初期過程の再生細胞を濃縮して回収する方法を確立した。プロトプラストを単離し、培養開始後2-3日目の時点で細胞を回収し、網目サイズ20mmのフィルターで再生中の細胞と死細胞を分ける操作を行った。回収した再生中の細胞はその後再生を続けていくことを確認し、この操作が再生細胞の成長に及ぼす影響は排除できると考えられた。このようにして回収した細胞からRNAを抽出し、プロトプラスト第一不等分裂由来の完全長cDNAライブラリーを作成した。また、造卵器を含む若い胚を実体顕微鏡下で大量に集め、完全長cDNAライブラリーを作成した。新たな2種類の完全長cDNAライブラリーのそれぞれから約10,000クローンずつの両末端塩基配列を決定しEST解析を行った。得られたEST情報は既存のデータベース、DDBJを通じて公開した。

<国内外での成果の位置づけ>

ヒメツリガネゴケは国内外で細胞極性、不等分裂の細胞生物学的研究がすすんでいるが広範に遺伝子機能解析を行っているグループはまだなく、国内外のグループと知見を交換しながら日本主導の先駆的な研究を行っている。新しく作成した第一不等分裂由来の細胞および若い

胚由来の完全長cDNAクローンには既存のクローンに加え、多くの新しい遺伝子が含まれていたと考えられ、新しいクローンに対するリクエストが増えている。完全長クローンは国内外60以上の研究室に分譲されている。また、完全長cDNA情報は、国際協力体制の下で行われているヒメツリガネゴケゲノム配列の遺伝子アノテーションのために重要な情報を提供している。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

不等分裂候補遺伝子の機能解析の一手段として、候補遺伝子とGFPの融合遺伝子をプロトプラストで一過的に過剰発現させ、融合タンパク質の細胞内局在を調べる計画を立てたが、候補遺伝子の数が60種類程度であることからYFP蛍光タンパク質遺伝子を候補遺伝子の全てにそれぞれノックインした安定形質転換体を作成し、内在性プロモーター制御下における融合タンパク質の局在変化を調べ、より正確な融合タンパク質の動態解析を行うことにした。しかし、相同組換えによるYFPノックインに必要な候補遺伝子のゲノム配列を得る作業が、予想以上に時間を要した。この作業の後半ではヒメツリガネゴケのゲノム配列の解釈が進み、データベースより相同配列が入手可能になり格段にスピードアップした。細胞極性、不等分裂に関わる遺伝子の大規模スクリーニングをより効率的に行うためには目的のmRNAがより濃縮していると考えられる完全長ライブラリーを出発材料とすべきである。この目的に合致したプロトプラスト単離後2-3日目の不等分裂初期過程の再生細胞を回収する方法の確立に手間取った。細胞の回収をいかに素早くかつストレスを与えずに行うかに工夫を要した。最終的によいサンプルが集められた。

<今後の課題>

(1) 新たな2種類のライブラリーから選抜したクローンについての一過的過剰発現スクリーニングを展開し、より多くの候補遺伝子を同定する必要がある(当初研究計画(5))。さらに得られた候補遺伝子のRNAi表現型、細胞骨格との関係、不等分裂時の遺伝子産物の局在変化を明らかにし、植物不等分裂にどのような遺伝子がどのように関与しているのかを考察する。

(2) これまでの不等分裂スクリーニングの結果、はじめに約200種類を候補とした。これらについて再度表現型を調べ、最終的に表現型の再現性が顕著であり、頻度が高いものから優先的に58種類の候補に絞り込んだ。現段階で候補から漏れた残り約140種類は表現型の浸透度が低いと解釈しているが、不等分裂過程において重要な機能をしているものも含まれると思われる。これらクローンの解析をどのような実験システムで可能にしていくのが今後の検討課題である。

<研究期間の全成果公表リスト>

1. 0404082331

Nishiyama, T., Fujita, T., Shin-I, T., Seki, M., Nishide, H., Uchiyama, I., Kamiya, A., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K., Kohara, Y. and Hasebe, M., Comparative genomics of Physcomitrella patens gametophytic transcriptome and Arabidopsis thaliana: Implication for land plant evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 100, 8007-8012 (2003).

2. 0404082345

Nishiyama, T., Fujita, T., and Hasebe, M., PHYSCObase, <http://moss.nibb.ac.jp/>, (2003).

3. 0404082357

Fujita, T., Nishiyama, T., Hiwatashi, Y. and Hasebe, M., Gene tagging, gene- and enhancer-trap systems, and full-length cDNA overexpression in *Physcomitrella patens*, In *New Frontiers in Bryology: Physiology, Molecular Biology & Applied Genomics*, Kluwer Academic Publishers, pp.111-132 (2004).