

多細胞生物起源の研究

●岩部 直之¹⁾ ◆藤 博幸²⁾ ◆隈 啓一³⁾

1) 京都大学大学院理学研究科 2) 九州大学生体防御医学研究所 3) 情報・システム研究機構国立情報学研究所

＜研究の目的と進め方＞

海綿からヒトに至る全ての動物の体は、複数種類に分化した多くの細胞から構成されている。このような多細胞性の生物は単細胞性の生物をその起源としており、真核生物の3つの主要な系統である動物・植物・菌類において、それぞれ独自に多細胞化が起きたと考えられている。特に、動物の初期進化の過程で起きた多細胞化は、様々なボディプランを持つ多様な動物門を生み出す上での最も重要な進化的要因であり、多細胞化という形態レベルの進化と遺伝子レベルでの多様化の関連性について理解することは、現在の進化研究に残された大きな課題の一つである。

本研究では、動物初期進化の過程で起きた多細胞化の分子の基盤の解明を目的として、多細胞動物に最も近縁な単細胞生物と考えられている立襟鞭毛虫 (*Monosiga ovata*) のゲノム解読を、「領域4：基盤ゲノム」の研究グループの全面的な協力のもとで行う。立襟鞭毛虫と他の真核生物のゲノム比較解析および各遺伝子族についての分子系統樹解析を行い、動物の多細胞化および細胞分化の獲得に関連した可能性が高い「重要遺伝子」の推定を試みる。そして、これら「重要遺伝子」については、国内外の研究者とも協力して、発現・機能解析を行い、進化的あるいは発生学的に重要な知見を得る。

＜2008年度の研究の当初計画＞

昨年度に引き続き、「領域4：基盤ゲノム」の研究グループの全面的な協力のもと、立襟鞭毛虫 (*M. ovata*) のゲノム全塩基配列決定 (ゲノム計画) を進める (岩部)。既にゲノム配列が決定された各種生物との比較解析を行い、遺伝子族別に整理・分類した二次データベースの整備を進める (隈、藤)。特に、シグナル伝達系・細胞接着・転写制御・アポトーシスに関与する遺伝子群を中心に、データベースを充実させる (隈)。なお、動物の多細胞化に関連する「重要遺伝子 (シグナル伝達系関連遺伝子、接着因子、転写因子、アポトーシス関連遺伝子など)」については、同一性検索を恒常的に行い (隈、岩部)、RT-PCR 法等も用いてコーディング領域の配列決定を行う (岩部)。これら「重要遺伝子」については、最尤法やベイズ推定などを用いた分子系統樹作成も随時行う (隈、藤、岩部)。なお、各種データベースについては、整備状況にあわせて随時公開する (藤、隈、岩部)。大阪大学微生物病研究所の岡田雅人教授の研究グループと共同で、*M. ovata* およびカワカイメン (淡水海綿) のチロシンキナーゼ Src, CSK などの機能解析を継続して行う (岩部)。また、岡田教授の研究グループと共同で、*M. ovata* への遺伝子導入・RNAi も引き続き試みる (岩部)。*M. ovata* の無菌培養系 (あるいは二員培養系：細菌1種のみによる培養系) の構築も、継続して試みる (岩部)。

＜2008年度の成果＞

昨年度に引き続き、国立情報学研究所の藤山秋佐夫教授 (領域2：比較ゲノム) および国立遺伝学研究所の小原雄治教授 (領域4：基盤ゲノム) の両研究グループの全面的な協力のもと、*M. ovata* のゲノム DNA ライブラリー (BAC, fosmid) を用いたホールゲノムショットガン (WGS) 法によるゲノム塩基配列決定を進

めた。昨年度までに作成していた *M. ovata* のゲノム配列データ (build2.0) には、配列特異的なシーケンスエラー (高 G+C 含量の影響によるもの) が含まれていることが判明したため、このエラー対策を行い、WGS 法による新たなゲノム塩基配列データを追加して、東京大学の森下真一教授 (領域1：生命システム情報) の研究グループのご協力のもと、scaffold の再構築を行った。なお、東京大学の菅野純夫教授 (領域4：基盤ゲノム)、藤山教授および小原教授の各研究グループのご協力のもと、*M. ovata* 完全長 cDNA の大量配列決定を昨年度までに進めている。

新たに作成したゲノム部分配列データ (WGS データの初期アセンブリーによる scaffold (build3.0)) を用いて予備解析を行った結果、現在までに、*M. ovata* ゲノムについて以下のことが明らかになった。

(1) 推定されるゲノムサイズは約 64Mb である。(2) 推定遺伝子数は約 12,700、平均遺伝子長は約 4,300bp である。(3) ゲノムの G+C 含量は 58.4% である。(4) 遺伝子当たりの平均イントロン数は約 6.7、平均イントロン長は約 330bp である。(5) イントロンやスペーサーなどの非コード領域に「ACACAC.../GTGTGT...」などの 2 塩基単位の配列が多く観察される。なお、この (AC) *n* / (GT) *n* の繰り返し配列はゲノムの約 2.3% (約 135 万塩基対) を占める (6) 動物型のテロメア様配列 (CCCTAA) *n* / (TTAGGG) *n* が全体で約 80 カ所検出された。このことから約 40 の染色体からゲノムが構成されている可能性が示唆された。(7) scaffold 中に真正細菌 (主に α -, γ -プロテオバクテリア) 由来の DNA が約 10% 含まれており、ライブラリーには 20 ~ 30% 程度の真正細菌由来の DNA の混入があった可能性がある。

上記 *M. ovata* のゲノム部分配列データ (build3.0) を用いて、

(1) 各種生物のゲノムおよび遺伝子に対する網羅的の同一性検索、(2) タンパク質の各種ドメインに関する (Pfam Hidden Markov Model を用いた) 同一性検索、(3) シグナル伝達系・細胞接着・転写制御・アポトーシスに関与する遺伝子群および各種ドメインについての網羅的系統樹推定 (近隣結合法による解析)、(4) *M. ovata* ゲノムに多数存在するカドヘリン関連遺伝子のドメイン構造推定、(5) 上記解析結果を閲覧できるデータベース (仮称：DAGMAN) およびブラウザの試作・改良を行った。*M. ovata* ゲノムには、動物特異的と考えられていたシグナル伝達系関連遺伝子 (チロシンキナーゼ、チロシンホスファターゼなど) が多数存在するが、接着因子、転写因子、アポトーシス関連遺伝子については、このような傾向は観察されなかった。

立襟鞭毛虫のゲノム計画については、国外 (米国) でも研究計画が進み、2008年2月に *Monosiga brevicollis* のゲノム部分配列データ (scaffolds) に関する論文が発表された。なお、*M. ovata* (淡水性種) と *M. brevicollis* (海水性種) の遺伝的距離は脊椎動物 (ヒト) と節足動物 (ショウジョウバエ) の遺伝的距離とほぼ同等である。*M. ovata* のゲノムサイズ (約 64Mb) は *M. brevicollis* (約 42Mb) の約 1.5 倍であり、推定遺伝子数も *M. brevicollis* の 9,196 に対して *M. ovata* は約 12,700 と 1.4 倍程度である。現在、これら立襟鞭毛虫 2 種のゲノムの詳細な比較解析を進めており、動物と立襟鞭毛虫でのみ共通性の高い遺伝子や、動物との分岐後に立襟鞭毛虫の系統で多様化した遺伝子などに関する進化的に重要な情

報が得られつつある。各種動物ゲノムとの比較解析の結果も含めて、論文および「多細胞化関連遺伝子データベース」を公表すべく、現在急ぎ準備を進めている。

<国内外での成果の位置づけ>

動物の多細胞化に焦点を絞り、立襟鞭毛虫のゲノム配列決定、他の生物との比較ゲノム解析および海綿・刺胞・有櫛動物の「多細胞性や細胞分化と関連する遺伝子」の機能解析などを総合的に行おうとする試みは、国内外でも他に例がないものである。また、大阪大学の岡田教授のグループと進めている立襟鞭毛虫および海綿動物のチロシンキナーゼ Src, CSK の機能解析により、動物の多細胞化に関連する分子メカニズムの一端が明らかになりつつある。現在、この研究成果はさきがけ的な内容として国内外で一定の評価を得ている。今後、立襟鞭毛虫の細胞間コミュニケーション（シグナル伝達）や群体形成（細胞接着）などに関与していると推定される遺伝子を特定し、それらの機能解析を進めることにより、重要な知見が得られることが期待される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

PCR 法により増幅した 16S リボソーム RNA の部分塩基配列決定を行った結果、ATCC より購入した *M. ovata* のサンプルには、真正細菌（一部は *M. ovata* の餌と考えられる）が少なくとも 40 種類以上（一部は多剤耐性常在菌）含まれていたことが判明している。また、立襟鞭毛虫の細胞体は直径が 3~8 μm 程度とかなり小さいため、フィルターやナイロンメッシュなどを用いた混在菌の除去も困難な状況にある。昨年度に引き続き、抗菌物質を含む植物抽出液を用いた培養などによって、混在菌の種類数の削減を試みたが、複数種の真正細菌（多剤耐性菌含む）が残存しており、今のところ無菌培養系（あるいは二員培養系）の確立には至っていない。

動物の多細胞化を理解する上では、海綿・刺胞・有櫛動物などの「多細胞性や細胞分化と関連する遺伝子」の発現・機能解析も必要不可欠である。動物の初期進化を理解するためには、特に海綿動物の遺伝子の解析（分子系統樹解析）が重要となるが、残念ながら、海外で行われている海綿動物（*Amphimedon queenslandica*; 以前の表記は *Reniera* sp.）のゲノム計画で決定された配列データには、遺伝子多型に伴う配列多様性の問題が含まれている可能性が高い。そのため、海綿動物の遺伝子を含む分子系統樹解析等が進展せず、進化的に有意義な情報がなかなか得られない状況にある。淡水海綿の一種、カワカイメンは、発現・機能解析などの実験にも適しているため、カワカイメンのゲノム部分配列決定（ゲノム計画）および完全長 cDNA の大量配列決定（EST 計画）は今後重要となる。本年度、実験に使用可能なカワカイメンの入手を試みたが、国内の生息環境の悪化などの影響のため、十分な量の試料が入手できなかった。これについては、国内の海綿の研究者と情報交換を行いながら、来年度以降も継続して試みる予定である。なお、石灰海綿（ケツボカイメン）、有櫛動物（ウリクラゲ、ペニクラゲムシ）についても入手を試みているが、完全長 cDNA ライブラリーの作製等に必要試料（質・量ともに）が今のところ得られていない。これについても、今後継続して試みる予定である。

<今後の課題>

現在、様々な遺伝子族について最尤法などによる詳細な分子系統樹解析を行い、「立襟鞭毛虫と動物だけに存在する重要遺伝子」や「多細胞化と関連した可能性の高い動物特有の重要遺伝子」などの推定を進めている。特に 2008 年 8 月に論文発表された板状動物（*Trichoplax adherens*）のゲノム配列データは「動物の初期進化」を理解する上で大変重要であり、現在これを含めた詳細な解

析を進めている。なお、各種真核生物のゲノム計画由来の推定遺伝子配列の中には、推定精度が低いものや「真正細菌のコンタミの可能性が高い配列」も予想以上に多く含まれており、これらデータを含めた分子系統樹解析には信頼性の面での不安がある。今後、各種データの信頼性を客観的・網羅的に評価する方法を考案し、より信頼性の高いデータに基づく分子系統樹解析が行えるよう対策を立てることが重要と思われる。

立襟鞭毛虫と多細胞動物の分岐の前後に、幾つかの原生物のグループ（中動菌類 (DRIPs) など）が分岐していた可能性が示唆されている。今年度、動物・立襟鞭毛虫に近縁な可能性のある原生物 *Ministeria vibrans* を ATCC より入手することができ、現在この大量培養を試みている。動物の多細胞化を理解する上で *M. vibrans* が系統的に重要であると確認された場合には、RT-PCR 法を用いた遺伝子の単離と配列決定、完全長 cDNA ライブラリー作製および EST 配列決定なども試みる予定である。

大阪大学の岡田教授の研究グループとの共同により、Src 特異的阻害剤を *M. ovata* の培養液に加えると、単独性種と言われていた *M. ovata* が集合体（群体）を形成し、近接した細胞とフィロポディア様の突起によって接着することが確認されている。この *M. ovata* の細胞接着分子メカニズムの解明は、動物の多細胞化を分子（遺伝子）レベルで理解する上で大変重要な知見をもたらすものと期待される。*M. ovata* ゲノムから発見された複数のカドヘリン関連遺伝子（および他の重要遺伝子）の局在および機能解析を行うべく、遺伝子導入・RNAi 等の予備的な実験を継続して試みる。

立襟鞭毛虫および海綿・板状動物などのゲノム計画の進展に伴い、動物特異的に重複ドメインシャフリングなどで多様化した遺伝子族や、動物の系統のみで獲得された遺伝子などが、詳細な分子系統樹解析によって判明しつつある。そのような遺伝子の中でも特に、「細胞の集合体形成、および細胞分化」と「それらの分子メカニズム」の関連について注目することにより、「遺伝子の多様化」と「動物の多細胞化」との関連性について、進化的あるいは発生学的な側面から理解を深めていきたい。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. 0803041406

Suga, H., Sasaki, G., Kuma, K., Nishiyori, H., Hirose, N., Su, Z.H., Iwabe, N., and Miyata, T.: Ancient divergence of animal protein tyrosine kinase genes demonstrated by a gene family tree including choanoflagellate genes. *FEBS Lett.* 582 (5), 815-818 (2008)

2. 0806021632

Katoh, K., Toh, H.: Improved accuracy of multiple ncRNA alignment by incorporating structural information into a MAFFT-based framework. *BMC Bioinformatics* 9, 212 (2008)

3. 0806132010

Katoh, K., Toh, H.: Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* 9 (4), 286-298 (2008)

2) データベース/ソフトウェア

特になし。