

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的に重要な知見を得る。

<2007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) および完全長 cDNA ライブラリーの EST 大量配列決定も並行して行う (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、データベース整備を充実させる (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、ゲノム解読・EST 配列決定の途中段階においても同源性検索を恒常的に行い (隈、岩部)、RT-PCR 法を用いてコーディング領域の配列決定をゲノム解読と並行して行う (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行う (隈、藤、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 と CSK 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* への遺伝子導入や RNAi なども引き続き試みる (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)。

<2007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ご協力のもと、*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。また、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 の大量配列決定も進めた。なお、*M. ovata* のゲノム部分塩基配列データおよび完全長 cDNA の配列データについては、2007年12月に、DDBJより公開した。

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、ゲノム部分配列 (WGS データの初期アセンブリーによる scaffolds) を用いた解析を行った結果、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) ゲノムの G+C 含量は約 57% である。(2) 反復配列が非常に多く、イントロンに「CACACA.../TGTGTG...」などの 2 塩基単位の配列が多く観察される。(3) 既知の cDNA 配列データと比較した結果、イントロンは比較的短いものが多く、平均長は 100 塩基前後と推定される。(4) ゲノムサイズは、当初の推定値である約 1.5 ~ 2 億塩基対よりも小さい (4 ~ 6 千万塩基対程度) 可能性がある。なお、ライブラリーに混入している真正細菌 (主に α -, γ -プロテオバクテリア) 由来の DNA は、約 3% 程度に抑えられているものと推定される。

上記 *M. ovata* のゲノム部分配列データ (scaffolds) 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同源性検索、(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) 同源性検索、(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についての網羅的系統樹推定 (近隣結合法による予備的解析)、(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などの予備的解析を行った。その結果、*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、ホスホリパーゼ C、ホスホジエステラーゼなど) が多数存在することが強く示唆された。なお、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。

昨年度に引き続き、大阪大学の岡田教授の研究グループと共同で、*M. ovata* および海綿動物 (カワカイメン) のチロシンキナーゼ Src と CSK の機能解析を進めた。なお、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る *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、これまでに確認されている。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の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が、この細胞接着の分子メカニズムに関与している可能性も十分考えられるので、現在、これら遺伝子産物の局在

および機能解析を行うべく、予備的な実験を進めている。

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つつあり、2007年3月に、*Monosiga brevicollis* のゲノム部分配列データ（scaffolds）がJGIより公開された。*M. ovata*（淡水性種）と *M. brevicollis*（海水性種）の配列データを網羅的に比較したところ、この2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ことが明らかとなった。今後、これら立襟鞭毛虫2種のゲノムの比較解析を行うことにより、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ると期待される。

<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、立襟鞭毛虫および海綿動物のチロシンキナーゼ Src, CSK の機能解析などの進展により、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。この成果は国内外の研究のきっかけとなることが期待される。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種類以上含まれていたことが判明している。なお、16SリボソームRNAの解析結果から、多剤耐性の常在菌も複数種含まれていることが判明しており、今のところ、抗生物質の使用による培養液中からの混在菌の完全除去は大変難しい状況にある（様々な種類の抗生物質を検討済み）。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、抗生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ているが、複数種の真正細菌（5~10種程度）が残存しており、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。なお、岩部が所属する京都大学大学院理学研究科では、2007年7月から2008年3月までの間、耐震補強工事が実施されており、狭い退避スペースで研究を行わざるを得ない状況にある。そのため、培養用スペースの縮小を余儀なくされ、様々な条件で立襟鞭毛虫の培養を試みるのが困難な状況にある。今後、研究環境が整備され次第、上記試みを再開する予定である。

<今後の課題>

M. ovata のゲノム計画および完全長 cDNA ライブラリーの大量配列決定は、かなり順調に進んでいる。しかし、*M. ovata* ゲノムには、2塩基の反復配列の頻度が高いなどの特徴があり、完成度の高いゲノム全塩基配列決定までには、幾つかの困難が予想される。また、*M. ovata* のゲノム配列には、'GC' という連続2塩基特異的なシークエンスエラーも数多く観察されている。今後、各領域の研究グループのご協力のもと、これら困難を克服し、遺伝子推定、推定された遺伝子産物のアノテーションおよびカテゴリー分類なども進め、*M. ovata* ゲノムの全貌を明らかにしたいと考え

ている。*M. brevicollis* のゲノム配列データとの比較解析も大変重要となるので、米国の研究グループ（カリフォルニア大学パークレー校の Nicole King を中心とする研究グループ）との有意義な情報交換も行いたいと考えている。

立襟鞭毛虫のゲノム計画（および遺伝子推定）の進展にあわせて、今後、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」などの推定を試みる。これら情報については、論文あるいは「多細胞化関連遺伝子データベース」上で、随時公表する予定である。

M. ovata の遺伝子産物の機能解析を効率良く行うためには、無菌培養系（あるいは二員培養系）の構築および遺伝子導入・RNAi などの実験系の確立が重要となる。現在、遺伝子導入・RNAi についても、大阪大学の岡田教授の研究グループと共同で予備実験を進めている。なお、多くの研究者が立襟鞭毛虫を用いた研究に参入できるように、培養・実験に関する技術の普及にも努めたいと考えている。

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可能性がある。淡水海綿の一種、カワカイメンは、比較的入手が容易であり、発現・機能解析などの実験にも適しているので、今後、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）を本研究で具体化したいと考えている。また、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、完全長 cDNA ライブラリーの作製および EST 配列決定を試み、「重要遺伝子」の単離と発現・機能解析などを、国内外の研究者と協力して進めたいと考えている。

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おり、入手が可能であれば、これら生物種の培養および遺伝子単離を試みたいと考えている。そして、動物の多細胞化を理解する上で、これら生物が系統的に重要であると確認された場合には、RT-PCR 法など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。

立襟鞭毛虫および海綿動物などのゲノム計画の進展に伴い、動物特異的に重複や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推定可能となる。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行きたい。

<成果公表リスト>

- 1) 論文/プロシーディング
特になし。
- 2) データベース/ソフトウェア
特になし。