細胞性粘菌を用いた多細胞体制成立のゲノム基盤に関する研究

●漆原 秀子[1]　◆桑山 秀一[1]　◇川田 健文[2]
1) 筑波大学大学院生命環境科学研究科　2) 東邦大学理学部

＜研究の目的と進め方＞

多細胞生物では、遺伝情報を子孫に伝える生殖の機能から解放された体細胞がさまざまに分化した機能を発揮することによって、個体の高度な営みを可能にしている。本研究では、多細胞体制維持と細胞分化の機能がどのようにしてゲノム情報中に獲得されたかを知るために、独特の生活環をもつ細胞性粘菌を用いた研究を行う。細胞性粘菌は後生生物発生に至る道筋で、植物が分岐した後に分岐したと考えられている３属からなる生物群で、単細胞として分裂増殖するが、飢餓状態になると集合して多細胞体制に移行して胞子塊と柄から成る子実体を形成するという独特の生活環で知られている。また、過剰な水分と暗条件下では、細胞が性的に成熟して相補的な交配型の細胞と融合して有性生殖を行う。セカンドメッセンジャーとして知られるcAMPはこれらの過程でのシグナル分子として重要な働きを担っている。代表種の*Dictyostelium discoideum*では細胞運動や形態形成・細胞分化の分子メカニズムに関して多くの知見が得られており、ゲノムとcDNAの大規模解析も終了している。

一方、系統発生の初期に分岐した原始的なグループであると考えられている*Acytostelium*属では、柄は非細胞性で全細胞が胞子となり、細胞分化が見られない。そこで我々は生殖細胞と体細胞の役割分担が成立するために必要な遺伝情報の変化を推察することを目的として、*Acytostelium*の比較ゲノム研究に着手した。*Acytostelium subglobosum* LB1株を用いた実験系を確立し、支援班の協力のもとにそのゲノム解析を行ってきた。予備的な遺伝子予測によると、*A. subglobosum*にはほとんどの*D. discoideum*遺伝子についてオーソロガス遺伝子が存在すると予想されている。また、*A. subglobosum* LB1株には*Variovorax*と思われる未同定の黄色バクテリア（UNYと仮称）が共存し、胞子形成を強く促進していることを示唆する結果を得ている。これらの結果を確実なものとし、細胞分化能の獲得に関わる遺伝情報を明らかにする研究をさらに進める。

＜2008年度の研究の当初計画＞

*D. discoideum*で柄細胞分化に関与する遺伝子を中心に、*A. subglobosum*のオーソロガス遺伝子を特定して構造と機能の比較解析を行うことにより、*D. discoideum*で細胞分化を成立させているキー遺伝子またはキーとなる発現制御メカニズムを知ることを目標として以下の研究を進める。

（1）昨年度までに得られている*A. subglobosum*のゲノム配列をもとに、繰り返し配列、末端構造、トランスポゾンの有無等、ゲノム構造の基本的性質を整理する。
（2）増殖期と発生期のcDNA配列をゲノムにマップし、転写の開始と終結、イントロンの特徴、コドン使用頻度等について*A. subglobosum*遺伝子構造の特徴を把握する。
（3）これらの特徴を反映した遺伝子モデルを構築し、遺伝子比較データベースでビジュアルに表示する。その後*D. discoideum*で柄細胞形成に関与することが報告されている遺伝子（ターゲット遺伝子）のオーソロガス遺伝子について詳細な解析を行う。
（4）*A. subglobosum*で柄が形成される過程を明らかにするとともに、RT-PCR、イン・シチュ・ハイブリダイゼーションなどによってターゲット遺伝子の発現パターンを得る。
（5）ターゲット遺伝子の*A. subglobosum*オーソログを*D. discoideum*遺伝子破壊株で発現させることにより、両種間での遺伝子機能の異同を検討する。
（6）細胞性粘菌の分類体系の中で*A. subglobosum*と同じグループIIに含まれる*Polysphondylium pallidum*のゲノム解析が独・英で進行しているので我々の結果と照らし合わせて相同遺伝子をもとにしたシンテニー解析を行い、遺伝子制御メカニズムを比較することを国際共同研究として進める。
（7）*Variovorax*様のUNYが*A. subglobosum*の子実体形成を促進するしくみを細胞学的な実験によって解明し、中心的な役割を果たす分子を特定する。また両者に共生的関係があるかどうかを検討する。

＜2008年度の成果＞

①フォスミドライブラリーを構築して約7,000クローンの末端配列決定を行った。昨年度までのショットガンデータと合わせて再アセンブルすることにより、最長1.5 Mbpに達するゲノムスキャフォールドを得た。トランスポゾンと思われる繰り返し配列を見出し、解析中である。
②発生期細胞を同調的に大量調製する実験系を開発し、発生期RMAを用いてSMART法による完全長cDNAライブラリーを作製した。約6,000クローンの配列決定を行って2,296の独立遺伝子に整理した。昨年度得た増殖期cDNAと合わせて3,294の独立遺伝子を得た。
③遺伝子比較データベースのビジュアル表示を改良し、*Acytostelium* Gene Databaseとして研究者コミュニティに対し公開した。現在、上記ゲノムとcDNAの最新情報を反映するための更新作業を進めている。また、解析のターゲットとなる*D. discoideum*で柄細胞形成に関与する遺伝子のオーソロガス遺伝子を選抜した。
④ターゲット遺伝子の一部についてリアルタイムPCRによる発現特異性の解析を行い、*D. discoideum*での発現特異性に一致するものとそうでないものに分類した。
⑤遺伝子機能を解析する実験系を確立するために、２種間で同じ機能をもつと期待されるcellulose synthase遺伝子について*D. discoideum*遺伝子破壊株に*A. subglobosum*遺伝子の導入を行った。現在形質転換系を得て解析中である。
⑥榊原班の協力によって*D. discoideum*とのシンテニー解析を試みた。塩基組成の違いが大きく、オーソロガス遺伝子の検出や、明らかなシンテニーの同定は困難であったが一定程度のアンカーを検出することができた。
⑦*A. subglobosum* LB1株は高密度では自身が分泌する揮発性の物質によって高密度では発生が阻害されること、UNYはその阻害物質を吸収あるいは解毒することを見出した。阻害物質は*Dictyostelium mucoroides*で発生を阻害することが知られているエチレンではないかと予想されたが、実験的にはその可能性は低いことが示された。
（上記のうち、①〜③は支援班の協力を得て行った。）

＜国内外での成果の位置づけ＞

細胞性粘菌における、形態形成と細胞分化および細胞運動等の分子メカニズムは、国内外の研究者によってさかんに研究されている。個別遺伝子の相同性解析や一般的な手法による系統進化的研究は行われているが、多細胞体制成立過程にはっきりと焦点を絞った比較ゲノム解析は全く行われていない。*D. discoideum*のゲノム解析終了後、細胞性粘菌研究者のコミュニティではさまざまな観点から近縁種のゲノム解析を行う動きが始まり、米・英・独で異なる種のゲノム解析が手がけられている。*Acytostelium*は細

胞性粘菌の中でも多細胞体制でありながら細胞分化が見られない独特の属であり、日本でのゲノム解析には多大な関心が寄せられている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

①ゲノム配列のアセンブルで1 Kb ～2 Kbの短いコンティグが大量に残り、コンティグ総延長がゲノムサイズから著しく逸脱した値になってしまっている。

②ゲノム配列のアセンブルで1 Kb ～2 Kbの短いコンティグが大量に残り、コンティグ総延長がゲノムサイズから著しく逸脱した値になってしまっている。これらの短いコンティグには相互に類似した配列が存在しておりその配列でいくつかにグループ化されるが、外側の配列が異なっているためにそれ以上のアセンブルはできない。トランスポゾン様の配列が含まれており、その性質が関係している可能性があるので詳しい解析が必要だと考えている。現状ではこれらの短い配列は別扱いしている。

②ヒトアデノウイルスゲノムに極めて相同性の高い配列が混入している。これまでに*Sal*Iによる部分消化のライブラリー、ショットガンライブラリー、フォスミドライブラリー、cDNAライブラリーを作製し、筑波大学と遺伝研で配列決定を行ったが、いずれの場合にも検出され、どのようにして混入したか全くの謎である。かつ、この配列が上述の短いコンティグ中に繰り返し出現している。

③*Acytostelium*遺伝子モデル構築の際、遺伝子の位置や大まかな構造は推定できるものの、*Dictyostelium*タンパク質との相同性のみに準拠した場合にはイントロン－エクソン構造について予測の信頼性が不明瞭である。そのため、分子遺伝学的解析、とりわけプライマー設計に困難が生じた。

<今後の課題>

（1）*A. subglobosum* ゲノム構造の確定：
これまでに決定した配列情報を整理して *A. subglobosum* ゲノム構造を確定する。そのためには現在問題視している短いコンティグや混入の可能性を想定しているヒトアデノウイルスゲノム様配列についての処理について態度を決定する必要がある。

（2）遺伝子モデルの充実：
本研究では *D. discoideum* と *A. subglobosum* 間遺伝子比較を行うことが基本なので *A. subglobosum* 遺伝子モデルを充実することが必須である。それには cDNA 情報を拡充することが最も有効であると考えられるので、少なくとも 5,000 個程度のユニ・ジーン情報を得ることを目標に、発生期と増殖期の cDNA 解析を追加する。また、コミュニティに公開しているデータベース利用者からのフィードバックを反映させる。

（3）オーソロガス遺伝子対応表の整理：
ゲノム構造の確定、遺伝子モデルの構築にもとづいて *D. discoideum* で細胞分化に関与することが報告されている遺伝子のオーソロガス遺伝子（ターゲット遺伝子）を対応表として整理し、*A. subglobosum* で欠けている遺伝子の有無を検討する。

（4）*A. subglobosum* における形質転換系の確立：
下記ターゲット遺伝子の機能解析のうち、直接的に *A. subglobosum* での遺伝子操作を可能にするための形質転換系確立に向けて、昨年度予備的実験でデータを得た薬剤耐性条件等にもとづいて形質転換の条件を検討する。

（5）遺伝子機能の比較：
ターゲット遺伝子が両種間で同等の機能を担っているかどうかを知るために、発現と機能の解析を行う。発現解析は時期及び部位特異性を検討する。機能解析のためには、遺伝子破壊株を作製して種間で遺伝子の交換を行い、機能補完の有無を調べる。

（6）中間種のゲノム情報の入手：
D. discoideum と *A. subglobosum* は系統的にかなり隔たっているため、両種間でのゲノム情報の差異が今回問題としている細胞分化に関係しているか否かを判定するためにその間に位置する *Polysphondylium pallidum* などのゲノム情報が大きく役立つと期待される。

（6）UNY の種特定と発生促進メカニズムの解明：
「*Variovorax* 様」と推定している UNY について、ゲノム配列決定を行って種を特定する。また、*A. subglobosum* の発を促進するメカニズムを解析することによって、多細胞体成成立への生物間相互作用の役割を明らかにする。

<成果公表リスト>

1）論文／プロシーディング（査読付きのものに限る）

1. 0901141159
Miyagishima, H., Kuwayama, H., Urushihara, H., Nakanishi, H., Evolutionary linkage between cytokinesis and chloroplast division by dynamin proteins. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 105:15202-15207（2008）

2. 0901141215
Urushihara, H., Developmental biology of the social amoeba: history, current knowledge and prospects. *Dev Growth Differ.* 50 Suppl 1:S277-81, 2008.

3. 0801290927
Yoshino, R. *et al.*, Regulation of ammonia homeostasis by the ammonium transporter AmtA in *Dictyostelium discoideum. Eukaryot Cell.* 6:2419-28, 2007.

4. 0801290919
Kuwayama, H. Nagasaki, A., Desalted deep sea water increases transformation and homologous recombination efficiencies in *Dictyostelium discoideum. J. Mol. Microbiol. Biotech.*, 14:157-62, 2008.

5. 0801290922
Kuwayama, H., Yanagida, T., Uyeda, M. DNA Oligonu*CLE*otide-assisted genetic manipulation increases transformation and homologous recombination efficiencies; evidence from gene targeting of *Dictyostelium discoideum. J. Biotech.* 133:418-23, 2008

2）データベース／ソフトウェア

1. 0901141228
Acytostelium Gene Database
URL: http://acyto.sequence.info/cgi-bin/index.cgi

<その他>

1）榊原班とのシンテニー解析に関する共同研究

2）上記以外で公開しているデータベース：
Dictyostelium cDNA Database
URL: http://dictycdb.biol.tsukuba.ac.jp/cDNAproject.h*tml*

比較ゲノム