

## 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 ◆桑山 秀一

筑波大学大学院生命環境科学研究科

### <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な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。細胞性粘菌は後生動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孢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。最もよく解析されている種である*Dictyostelium discoideum*ではゲノム解読が終了し、非常に多くのメンバーをもつ多数の遺伝子ファミリーの存在が示されている。

本課題では以下の2点についての研究を進める。

I. *D. discoideum* 遺伝子の生殖様式ごとの発現特異性を解析し、多重遺伝子ファミリーのライフサイクルにおける使い分けの実体を明らかにすることにより、遺伝子重複が複数の多細胞体制の成立に関与した過程を推察する。

II. *Dictyostelium*と同様に多細胞体制へと移行するものの、全細胞が孢子になって細胞分化が見られない別属の細胞性粘菌*Acytostelium*（セルロースによる非細胞性の柄が形成される）を比較材料として、*Dictyostelium*で柄細胞形成に関わる遺伝子群のオルソログを同定し、構造と機能を比較解析することによって細胞分化の機能が確立された過程を推察する。

### <2007年度の研究の当初計画>

I. *D. discoideum* 遺伝子の使い分けに関する研究：

i. *D. discoideum*には11種類の*ras*遺伝子と25種類の*gef*遺伝子が存在しており、その組合せでシグナル伝達の仕分けをしていると予想される。そこで、それらの発現パターンから各*Ras*について相互作用するGEF候補を絞り込むとともに、タグつき遺伝子を細胞内で共発現させることにより相互作用を検出する。

ii. サンガーセンターが作製した約10,000遺伝子がプリントされたDNAマイクロアレイを使用した共同研究を進め、有性生活環で発現が誘導または抑制される遺伝子群について発現変化の確認と機能解析を行う。

iii. 無性発生過程に関する研究で同定された接着分子・受容体・シグナリング分子について有性発生過程への関与を体系的に解析し、遺伝子の特異性と共通性について把握する。

II. *Acytostelium*における多細胞化遺伝子の系統解析：

i. *Acytostelium. subglobosum*のゲノム解析を進め、その結果を投入したゲノムデータベースを完成させ、公開する。

ii. ゲノム配列から信頼性の高い遺伝子予測を行うために、増殖期と発生期のcDNAライブラリーを作製し、できれば10,000クローンを目処に配列決定を行う。

iii. *D. discoideum*の柄細胞形成に関わる遺伝子のオルソログが*A. subglobosum*にどの程度存在し、機能しているかを把握する。

iv. *A. subglobosum*の系統株中に混在しており、増殖と発生に大

きく影響する未同定バクテリア（仮称UNY）との共生的関係について解析する。

### <2007年度の成果>

I. *D. discoideum* 遺伝子の使い分けに関する研究：

①全11個の*ras*遺伝子のN末端とC末端にYFP, CFPを連結した遺伝子の過剰発現株を作製した。FRETによって相互作用する*gef*遺伝子の候補を絞り込むために、現在タグつき*gef*の質質転換体を作製中である。

②アレイの解析によって有性生殖過程で特異的に発現が誘導される遺伝子と抑制される遺伝子のリストを取得し、定量PCRによって発現特異性の確認を行った。その結果、有性生殖過程で発現が2倍以上に増加する24遺伝子、1/2以下に減少する18遺伝子を新たに特定することができた。それらについての逆遺伝学の手法を用いた機能解析によって、細胞膜に存在するアクチン結合タンパク質でアクチンモノマーの重合を制御するPonticulinが有性生殖過程の細胞融合に阻害的に働くことが明らかになった。Ponticulinをコードする*ponA*には発現パターンが異なるパラログの*ponB*が存在するが、*ponA*過剰発現株では*ponB*の発現著しく抑制されており、*ponB*が細胞融合に重要な機能を担っていることも考えられる。

II. *Acytostelium*における多細胞化遺伝子の系統解析：

①分子生物学的解析の導入を想定して*A. subglobosum*アメーバのクローン化を行った。*A. subglobosum*の培養には入手した時点で未同定の黄色バクテリア（UNYと仮称）が共存していたが、クローニングの過程でそれらを分離することが出来た。両者の分離に成功したことは、以下に述べる生化学的解析・細胞学的解析にとって極めて重要な成果である。

②クローン化されたアメーバは増殖率にすぐれているが、ごく低密度でない限り子実体の形成が進まない。また、単離されたUNYは25℃でゆっくりとした増殖が可能だが、37℃では増殖できない。*A. subglobosum*のクローンにUNYを共存させるとアメーバとしての増殖は悪くなるが速やかに発生し、子実体が多数形成される。これらの結果は両者が共生関係にあるか、少なくとも*Acytostelium*の発生がUNYに依存していることを示唆しており、大変興味深い。

③*A. subglobosum*アメーバは発生を阻害する拡散性の物質を分泌すること、その物質は揮発性の低分子（空気より軽い）であることがわかった。UNY共存下ではその阻害効果が消失する。

④フローサイトメトリーによるゲノムサイズの同定を試み、*D. discoideum*との比較によって28Mb程度と予想された。

⑤ゲノム配列決定によって237 Mbのショットガン配列が得られ、6,800コンティグ（総延長33.2 Mb）にアセンブルされた。1 Kb程度の繰り返し配列が多数存在することに起因すると考えられるアセンブル上の問題が残っているが、カバー率は約6倍に達し、遺伝子比較には十分使用可能である。*D. discoideum*とで知られている孢子や柄胞への分化に関わる遺伝子のほとんどについてオーソログ遺伝子が見出され、細胞分化に必要な基本的構成要素は*Acytostelium*においてすでに獲得されていることが示唆された。

⑥遺伝子構造を中心に*D. discoideum*との比較が可能のようにビジュアルなインターフェイスを整備したゲノムデータベースを

作成した。現状では非公開であるが、できるだけ早く公開の体制を整えたい。

⑦増殖期の cDNA ライブラリーを作製し、約 10,000 クロンの配列決定を行った。このデータは上記データベースに投入している。cap3 によるラフなアセンブルでは約 2,500 の独立遺伝子に整理された。また、発生期の cDNA ライブラリーも構築し、一部のクローンについて配列決定を行った。

上記のうち、③～⑦は支援班の協力を得て行ったものである。

#### <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>

I. *D. discoideum* 遺伝子の使い分けに関する研究に関して：

① YFP, GFP を融合させた *ras* 遺伝子の形質転換体を作製するのに手間取り、相互作用する分子の同定を行うまでにはいたらなかった。これはたまたま最初に手がけた *rasC* 遺伝子についての形質転換体で蛍光量が低くこれを改善しようといろいろ試みていたためである。2 番目以降に作業した遺伝子については問題なく、*rasC* で困難だった理由は不明である。

II. *Acytostelium* における多細胞化遺伝子の系統解析に関して：

①ゲノム配列決定の初期に DNA サンプルの質が保存中に著しく低下し、低分子化してしまうという困難に遭遇した。バクテリアとの 2 員培養で増殖させているアメーバは強いヌクレアーゼ活性をもっており、これを除去しきれなかったことに起因すると考えられる。上述した UNY から分離されたクローンは無菌培養可能であり、この問題は無事解決した。

②ゲノム配列のアセンブルに困難があった。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た。配列クオリティが不十分とみなすことも出来るかもしれないが、この短いコンティグには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している。

③ゲノムデータベースの公開にいたっていない。これは論文としての発表との関連性によるものである。

④ cDNA ライブラリーの作製過程で、極端に短いインサートが挿入されているクローンが無視できない割合で生じ、配列決定の効率に悪影響を及ぼした。クローニングキット内のベクターをサイズ分画してから使用すると改善されたため、製品の精製過程が不十分であったことによると考えている。

#### <今後の課題>

I. *D. discoideum* 遺伝子の使い分けに関する研究に関して：

現在進めている *rasX* グループのようなメンバーの多いファミリー以外にも数多く存在する多重遺伝子、特に多細胞化やシグナル伝達に関わるものについて、機能の分化を網羅的に解析する必要がある。また、それらが細胞内で具体的にどのパスウェイに関与するかを明らかにするためには細胞性粘菌におけるタンパク質間相互作用検出系の確立が望まれる。

II. *Acytostelium* における多細胞化遺伝子の系統解析に関して：

①遺伝子モデルの構築：現時点でもゲノム DNA 配列から遺伝子モデルの構築を行っているが、*A. subglobosum* の遺伝子構造に

関する情報はこれまでは全く得られておらず、cDNA 配列とのすり合わせ、個別遺伝子の他種細胞性粘菌配列との比較が必要である。前者については増殖期 cDNA 配列が得られているのでそれを利用するとともに、発生期 cDNA の配列決定も行うことを予定している。個別遺伝子の検討については研究者コミュニティから協力者を募るのが有効だと考えている。そのためにも早急にデータベースを公開できる形にしていきたい。

②遺伝子間の比較解析：*D. discoideum* で細胞分化に関わることが明らかにされている遺伝子の *A. subglobosum* オーツロガス遺伝子をリスト化し、詳細な構造比較を行う。

③遺伝子機能の解析：上述のオーツロガス遺伝子がどのような機能を担っているかの解析が不可欠である。*A. subglobosum* における遺伝子操作法の確立が必須であるが、その準備が整うまでの間は *A. subglobosum* 遺伝子を *D. discoideum* に導入しての機能解析を行う。

④当面の目標としては *D. discoideum* との遺伝子間比較を目指しているが、トランスポゾンと思われる配列の解析など、*A. subglobosum* のライフサイクルを規定しているゲノム配列そのものの性質を明らかにすることが長期的には必要である。

⑤ *D. discoideum* の柄細胞形成に関わる遺伝子のオルソログが *A. subglobosum* にどの程度存在しているかを把握することが重要である。また、それらの発生過程での発現情報を得る必要がある。

⑥ *A. subglobosum* と UNY (共存していた未同定バクテリア) の相互依存関係を解明する。たとえば、UNY は *A. subglobosum* が分泌する阻害物質を失活させる一方で高温耐性である胞子から何らかの形で温度耐性を獲得しているのではないかと想像されるが、そのような可能性を検証する実験を行っていく。可能であれば遺伝情報の上でも依存関係があるかどうかを検討する。

#### <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)

1. 0 606241340

Urushihara, H., Muramoto, T., Genes involved in *Dictyostelium discoideum* sexual reproduction, *Eur. J. Cell Biol.*, 85: 961-968 (2006)

2. 0702081441

Muramoto, T., Kuwayama, H., Kobayashi, K., Urushihara, H., A stress response kinase, KrsA, controls cAMP relay during the early development of *Dictyostelium discoideum*, *Dev. Biol.*, 305: 77-89.

3. 0801290922

Kuwayama, H., Yanagida, T., Uyda, M. DNA oligonucleotide-assisted genetic manipulation increases transformation and homologous recombination efficiencies; evidence from gene targeting of *Dictyostelium discoideum*. *J. Bacteriol.* [Epub ahead of print] (2007).

2) 公開しているデータベース

1. 0507070107

*Dictyostelium* cDNA database (Dicty\_cDB): 細胞性粘菌 cDNA の配列情報、アノテーション、空間的発現情報などを公開している

URL: <http://dictycdb.biol.tsukuba.ac.jp/cDNAproject.html>