

令和元年6月5日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07468

研究課題名(和文) プリメタゾアモデルの拡充による動物多細胞性進化の機構解明

研究課題名(英文) Understanding the evolution of metazoan multicellularity by using the expanded premetazoan models

研究代表者

菅 裕 (Suga, Hiroshi)

県立広島大学・生命環境学部・准教授

研究者番号：30734107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子レベルのどのような変化が生物の進化を引き起こしたのか？近年の比較発生進化学の発展により、多くの知見が得られているものの、生物がその姿を大きく変えるいわゆる「大進化」についてはまだ研究が進んでいない。本研究では、動物の多細胞化が、遺伝子レベルのどのような仕組みにより起きたのか、という謎に挑むため、動物に最も近縁な単細胞生物「単細胞ホロゾア」をモデル生物として拡充、確立し、単細胞ホロゾアが持つ、一見多細胞生物にしか必要でないような遺伝子の、単細胞体制における機能を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物の設計図であるゲノムが解読され(1次元)、その働きかたを示すトランスクリプトーム(2次元)が明らかとなるとともに、こうした情報を実際の生物の体の作られ方に当てはめて捉えよう(3次元)という動きが活発です。比較的最近盛んになってきた進化発生学(本研究もその一つです)では、それを時間軸に沿って拡張し(4次元)、生物の進化の仕組みを遺伝子レベルで解き明かそうとしています。本研究は、特に動物が多細胞体制を進化させた「多細胞化」というイベントに注目し、動物に最も近い親戚である単細胞ホロゾアと呼ばれる単細胞生物群の研究を通じて、生物進化の仕組みの一部を解き明かそうとするものです。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism that enabled the evolution of animal multicellularity has yet to be uncovered. We established and expanded the repertoire of "unicellular holozoan" models, the closest unicellular relatives to animals, by sequencing their genomes and transcriptomes and by developing the means to analyze the functions of their "multicellular" genes.

研究分野：進化学

キーワード：多細胞性進化 単細胞ホロゾア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子レベルのどのような変化が生物の進化を引き起こしたのか？近年の比較発生進化学の発展により、多くの知見が得られているものの、生物がその姿を大きく変えるいわゆる「大進化」についてはまだ研究が進んでいない。本研究では、動物の多細胞化が、遺伝子レベルのどのような仕組みにより起きたのか、という謎に挑むため、動物に最も近縁な単細胞生物「単細胞ホロゾア」をモデル生物として拡充、確立することを目指した。

2. 研究の目的

動物の多細胞システムの進化には、細胞接着や細胞間連絡をはじめとする新しいメカニズムの進化が必要であった。しかし最近の比較ゲノム研究から、そうしたメカニズムを構成する遺伝子自体は、多細胞化以前からゲノムに存在していたことが分かってきた(King et al. 2008; Suga et al. 2008, 2012, 2013a)。すなわち、古くから存在した遺伝子(その本来の機能は不明)を、多細胞化という新しい目的に転用したことが動物多細胞化の鍵であると考えられる。本研究では、動物に近縁な原生生物(単細胞ホロゾア)群から、研究室で純粋培養が可能な種をできるだけ多数選び、ゲノム、トランスクリプトーム、遺伝子導入、遺伝子マーカー、ゲノム編集などのツールを整備し、それらを使って単細胞生物ゲノムに存在する“多細胞的な”遺伝子の機能を調べることで、動物多細胞性の起源に迫る。

3. 研究の方法

動物が多細胞化する以前の細胞の性質や遺伝子の機能を推定するため、動物に最も近縁な単細胞生物の一群、単細胞ホロゾアを、ゲノム情報と遺伝子機能の両面から解析する。そのため、(1)できるだけ多数種の単細胞ホロゾアにおいて、ゲノム及びトランスクリプトームの基礎データを整備し、情報面から動物の起源に迫るための基盤とする。(2)単細胞ホロゾアに対する遺伝子の導入法やライブ遺伝子マーカーコンストラクトの開発を行い、単細胞ホロゾア細胞で遺伝子の機能解析を行うための技術確立する。また、その技術を使用して、動物多細胞化の鍵となったと考えられる遺伝子の機能解析を進めていく。

4. 研究成果

(1) 情報面基盤構築

共同研究を通じ、単細胞ホロゾアであるクレオリマックス、アベオフォルマ、ピルム、コロキトリウムのゲノム決定を行うことができた。それに加え、新学術領域研究「ゲノム支援」からのサポートを受け、イクチオスポレア綱に属するスフェロフォルマのゲノム決定も行うことができた(論文準備中)。既に作出が完了している各種トランスクリプトームデータと合わせ、論文に発表した(表1、研究成果・雑誌論文)

綱	種(属名を示す)	ゲノム	トランスクリプトーム	遺伝子導入	
フィラステレア	カプサスポラ	●	●	●	
	クレオリマックス	●	●	●	
	イクチオスポレア	スフェロフォルマ	●	●	
		アメービディウム	●	●	
		ピルム	●	●	
	アベオフォルマ	●	●		
コロキトリア	コロキトリウム	●	●	●	

表1 新規単細胞ホロゾアモデル基盤整備状況 ●, 発表済み; ●, 成功したが未発表

(2) 遺伝子機能解析基盤構築及び遺伝子機能解析

単細胞ホロゾアに対する遺伝子導入法は、共同研究を通じ、フィラステレア綱に属するカプサスポラにおいて新規開発することができた(表1、研究成果・雑誌論文)。さらに、コロキトリア綱のコロキトリウムについても、電気穿孔法によって遺伝子導入個体を得ており、更なる導入効率の向上を目指し改良を行っている(未発表)。

細胞に導入してその微細構造をラベルし、生きた状態で観察するためのライブマーカーコンストラクトについても、構築を完成した。すなわち、カプサスポラ及びイクチオスポレア綱のクレオリマックスの2種で、核、ミトコンドリア、アクチン繊維、微小管構造、ゴルジ体、細胞膜などをラベルできるコンストラクトを作出し、それらが目的通り機能することを確認した。

本研究開始時に、既に遺伝子の過剰発現系確立のめどは立っており、本研究では特に遺伝子をノックダウン、あるいはノックアウトする方法の模索に注力した。

RNAi 法によるノックダウンについては、合成 siRNA を用いる方法がクレオリマックス細胞で機能することを既に確認していたが (Suga et al. 2013b)、カプサスポラ細胞ではまだその効果が確認されていなかった。クレオリマックス細胞では、ノックダウン効率が十分でないこと、およびコストが大きいことが問題となっていた。そこでカプサスポラでは、shRNA コンストラクトを用いて RNAi を長期間にわたって起こす方法を試した。その結果、この方法がカプサスポラで機能することを確認できた (論文準備中)。

一方で、遺伝子ノックアウトを目的としたゲノム編集法については、内在性遺伝子に対して、まだその成功は確認されていない。しかしながら、成功に向けた重要なステップをクリアすることができた。すなわち、TALEN 法 (広島大学との共同研究) の適用によって、Single strand annealing (SSA) に起因する外来性 DNA の修復を確認した (未発表)。この実験では、TALEN によるターゲット DNA の切断が十分に配列特異的であること、および TALEN を一つ作用させるだけで (通常は 2 つの TALEN を、標的を挟み込むように作用させる) DNA の切断がおこる場合があることなどを確認している (未発表)。

次に、単細胞ホロゾアに見つかった「多細胞的な」遺伝子の機能解析については、クレオリマックスがもつ Src チロシンキナーゼについて、大きな進展があった (研究成果・雑誌論文)。動物細胞において Src はメジャーな癌原遺伝子であり、その活性に対するブレーキが外れることで組織を癌化させる。通常は Csk と呼ばれる別のチロシンキナーゼがブレーキ役を務めるが、クレオリマックスには Csk がなく、Src の機能とその活性制御機構は謎であった。我々がクレオリマックス細胞で Src を過剰発現させたところ、細胞の成長や増殖が止まり、多くの場合細胞が死滅した (図 1)。しかし、Src に変異を入れてタンパク質リン酸化能を消失させると、そのような現象は起きなかった。すなわち、クレオリマックス細胞において Src は、動物とは逆に、他のタンパク質のリン酸化を通じて細胞の増殖や成長を抑える役割をしている可能性が示された。更に、クレオリマックス細胞では、Csk の代わりに、タンパク質の脱リン酸化を行うチロシンフォスファターゼが Src の働きを抑えていることを示す結果が得られた。クレオリマックスゲノムには 7 種類のチロシンフォスファターゼがコードされているが、そのうちの一つだけが Src を特異的に脱リン酸化することも示すことができた。以上の結果より、動物の祖先では、多細胞体制を進化させるとき、Src の機能を細胞増殖に転換するとともに、その制御を Csk によるより厳密なものに変え、更にインテグリンなど細胞接着分子とのカップリングを成立させることで、多細胞システム構築に役立てた可能性がある。

他の単細胞ホロゾアの「多細胞的な」遺伝子についても、解析が大きく進んでいる。カプサスポラゲノムからは、動物で細胞同士の直接的な接触を通じてシグナル伝達を行う Notch と、細胞が動き回ったり細胞を支えたりする足場として働く細胞外マトリクス遺伝子の一種であるラミニンによく似た遺伝子が見ついている。こうした遺伝子を改変しながら過剰発現実験を行うことで、単細胞ホロゾアに、動物とよく似た分子機能が存在することも突き止めた (未発表)。

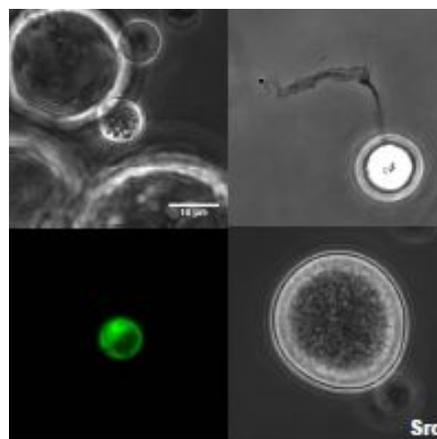


図 1 単細胞ホロゾア、クレオリマックス細胞への Src 過剰発現実験。形質転換細胞は成長せず (左上下)、細胞質が一点から漏れ出す特徴的な表現型を示す (右上)、しかし、まれに細胞が大きく成長する場合もある (右下)。

<引用文献>

King, N., Westbrook, M. J., Young, S. L. et al. 2008. The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature*, 451, 783-788.

Suga, H., Sasaki, G., Kuma, K. et al. 2008. Ancient divergence of animal protein tyrosine kinase genes demonstrated by a gene family tree including choanoflagellate genes. *FEBS Lett.*, 582, 815-818.

Suga, H., Chen, Z., De Mendoza, A. et al. 2013a. The genome of *Capsaspora* reveals a complex unicellular prehistory of animals. *Nat Commun*, 4, 2325.

Suga, H. & Ruiz-Trillo, I. 2013b. Development of ichthyosporeans sheds light on the origin of metazoan multicellularity. *Dev Biol*, 377, 284-292.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Denbo, S., Aono, K., Kai, T., Yagasaki, R., Ruiz-Trillo, I., and Suga, H. (corresponding author) "Revision of the *Capsaspora* genome using read mating information adjusts the view on premetazoan genome" *Dev Growth Differ* 61, 2019, 34-42. doi: 10.1111/dgd.12587

Bråte, J., Neumann, R. S., Fromm, B., Haraldsen, A. A. B., Tarver, J. E., Suga, H.,

Donoghue, P. C. J., Peterson, K. J., Ruiz-Trillo, I., Grini, P. E. and Shalchian-Tabrizi, K. "Unicellular origin of the animal microRNA machinery" *Curr Biol* 28, 2018, 3288-3295. doi: 10.1016/j.cub.2018.08.018

Parra-Acero, H., Ros-Rocher, N., Perez-Posada, A., Kozyczkowska, A., Sánchez-Pons, N., Nakata, A., Suga, H., Najle, S. R. and Ruiz-Trillo, I. "Transfection of *Capsaspora owczarzaki*, a close unicellular relative of animals" *Development* 23, 2018, 145. doi: 10.1242/dev.162107

Suga, H. (corresponding author) and Miller, W. T. "Src signaling in a low-complexity unicellular kinome" *Sci Rep* 8, 2018, 5362. doi: 10.1038/s41598-018-23721-8

Gentekaki, E., Curtis, B. A., Stairs, C., Klimeš, V., Eliáš, M., Salas, D., Herman, E. K., Eme, L., Arias, M. C., Henrissat, B., Hilliou, F., Klute, M. J., Suga, H., Malik, S.-B., Pightling, A. W., Kolisko, M., Rachubinski, R. A., Schlacht, A., Soanes, D. M., Tsaousis, A. D., Archibald, J. M., Ball, S. G., Dacks, J. B., Clark, C. G., van der Giezen, M., Roger, A. J. "Extreme genome diversity in the hyper-prevalent parasitic eukaryote *Blastocystis*" *PLoS Biology* 15, 2017, e2003769. doi: 10.1371/journal.pbio.2003769

Grau-Bové, X., Torruella, G., Donachie, S., Suga, H., Leonard, G., Richards, T. A., Ruiz-Trillo, I. "Dynamics of genomic innovation in the unicellular ancestry of animals" *eLife* 6, 2017, e26036. doi: 10.7554/eLife.26036

〔学会発表〕(計6件)

Hiroshi Suga, The evolution of multicellularity – a unicellular holozoan point of view, The 46th Naito Conference "Mechanisms of evolution and biodiversity", 2018.

Hiroshi Suga, Transition from protists to animals: the evolution of metazoan multicellularity (in the symposium "Major Transitions in Animal Evolution"), The 89th Annual Meeting of Zoological Science of Japan, 2018.

Hiroshi Suga, The origin of cell adhesion and communication: a view from unicellular holozoans (in the symposium "Metazoan Cell-Cell Junctions: Molecules, Structures, Mechanics, and Evolution"), Joint Annual Meeting of 51st Japanese Society of Developmental Biology and Japan Society for Cell Biology, 2018.

菅裕, 多細胞システムの胎動 - モデル生物としての単細胞ホロゾア, 日本進化学会第19回大会シンポジウム「それは原生生物から始まった 真核生物の誕生から多細胞性進化前夜まで」, 2017

Hiroshi Suga, Unicellular holozoans: new models revealing the mechanisms of multicellularity evolution" The Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan. 2016.

菅裕, 単細胞生物が持つ「多細胞的な」遺伝子の機能, 第18回日本進化学会年会, 2016

〔図書〕(計1件)

菅裕, 朝倉書店、アメーバのはなし 3.7章多細胞性の進化、2018、124-130

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pu-hiroshima.ac.jp/~hsuga>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: Iñaki Ruiz-Trillo

ローマ字氏名: イニャキ・ルイストリリヨ

研究協力者氏名: Todd Miller

ローマ字氏名: トッド・ミラー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。