

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06792

研究課題名(和文)単細胞生物の危機避難機構が準備した動物多細胞性の進化

研究課題名(英文)Evolution of multicellularity and evacuation system of unicellular holozoans

研究代表者

菅 裕 (Suga, Hiroshi)

県立広島大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：30734107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生物の進化を引き起こしたのは、一体遺伝子のどのような変化なのか？限定された生物グループ内の「小進化」については近年研究が進んだが、生物がその姿を大きく変えるいわゆる「大進化」についてはまだ未解明である。本研究では、動物の多細胞化がどのような遺伝子レベルの仕組みにより起きたのか、という謎に挑むため、動物で細胞の足場として働く遺伝子や、細胞同士の接触を感知する遺伝子、そして細胞間の連絡を担う遺伝子を単細胞生物から発見し、それらの機能を調べた。その結果、単細胞生物では危機回避などに使われていた遺伝子が、動物で転用されて多細胞体制の構築にかかわったことを示す証拠が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物のゲノムがどんどん解読される時代になったが、その結果よくわかったのは、その中の遺伝子の機能はやはりまだほとんどわからない、という事実である。しかしゲノムは生物の設計図であるから、その情報を利用すれば、生物がどのように遺伝子を変化させて(あるいは変化させずに)進化したか、という生物学最大の謎の一つも解けるはず。本研究は、単細胞ホロゾアという、動物に近縁な単細胞生物の遺伝子情報を利用し、その細胞中の遺伝子の機能をいじってやることで、「動物がどのようにして多細胞化したか」という大きな問題に挑んだ。これにより、科学者ではない人たちにも生物学の面白さを伝えられればと考えている。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism that enabled the evolution of animal multicellularity has yet to be uncovered. To tackle this problem, we studied unicellular organisms, elucidating the function of their genes that are in animals used for scaffolding cells, sensing cell-cell contact, and enabling the remote communication between cells.

研究分野：生物進化学

キーワード：多細胞性の進化 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だろうか？近年の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、動物の多細胞化がどのような遺伝子レベルの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」が持つ3種類の遺伝子、「ラミニン」、「Notch」、「受容体型チロシンキナーゼ」の機能解明を行った。先行する基盤C研究(16K07468)により、ゲノム情報の基盤が整い、研究開始時には、多くの単細胞ホロゾアのゲノムにそうした「多細胞的な」遺伝子が含まれていることが明らかになってきたが、それらの具体的な機能はほとんど未解明であった。

2. 研究の目的

動物の多細胞化という「大進化」には、大幅な遺伝子レベルの変革、例えば細胞接着や細胞間連絡をはじめとする新しい機能の進化が必要であったことは間違いない。しかし近年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, 2013)。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ったと考えられる。ではその本来の機能は何であったか？本研究では、動物に近縁な原生物(単細胞ホロゾア)群のうち、特に遺伝子解析のツール整備が進んでいるカプサスポラに焦点をあて、カプサスポラがもつ3種類の「多細胞的な」遺伝子、「ラミニン」、「Notch」、「受容体型チロシンキナーゼ」の機能に迫った。また、カプサスポラ細胞におけるゲノム改変や遺伝子発現操作などの新規技術開発も並行して行った。

3. 研究の方法

(1) カプサスポラが持つラミニン様遺伝子については、特異的抗体による染色や、遺伝子の過剰発現、昆虫細胞システムの使用によって人工合成したタンパク質の性質解析などを中心に、その機能解明を行った。

(2) Notch様遺伝子については、特異的抗体や遺伝子過剰発現に加えて、動物で使われるNotch阻害剤を利用した解析を行い、この遺伝子が本当に動物のNotch遺伝子のホモログなのかどうかを確認した。更に人工的な組み換え遺伝子を細胞に導入してその活性化をモニターするシステムを作り、どのような条件下でNotch様遺伝子が活性化するか調べることで、その生物学的な役割の解明を行った。

(3) 受容体型チロシンキナーゼについては、様々な条件下でRNAseq解析を行い、どのような環境で受容体型チロシンキナーゼが活性化するかを調べた。また、受容体型チロシンキナーゼの下流に存在するMAPKカスケードの活性化をモニターするシステムを構築し、受容体型チロシンキナーゼがどのような条件下で活性化するかを間接的に解析した。

(4) (1)-(3)で行ったような個々の遺伝子解析と並行して、カプサスポラ細胞における遺伝子操作技術の拡充を行った。研究開始時にはまだ確立していなかったshRNAコンストラクトによるmRNAノックダウン、CRISPRiによる遺伝子プロモーターのブロック、またトランスポゾンベクターを利用した遺伝子ノックインの技術をカプサスポラ細胞に適用した。

4. 研究成果

(A) カプサスポラが持つ「多細胞的な」遺伝子の機能解析

ラミニン様遺伝子、Notch様遺伝子、受容体型チロシンキナーゼのそれぞれについて解明が進み(論文準備中)、単細胞生物におけるそれらの意外な役割が少しずつ分かってきている。個々の研究の詳細については発表予定の論文に紹介する予定であるが、全般として、これらの遺伝子は通常状態、すなわち生育条件が良好なうちはほとんど働いていないようである。しかし環境に変化が起き、自らの生活環ステージを変更する必要が生じた時に活性化する場合が多い。単細胞から多細胞への進化の過程において、そうした緊急時に使われる遺伝子が利用されたとすれば、動物多細胞化のような大進化が起きる仕組みも理解できる。

(B) カプサスポラにおける遺伝子解析ツールの開発

まず、CRISPR/Cas9については、積極的な国内外との共同研究を通じて早期の確立を目指したが、ポジティブな結果は得られなかった。おそらく、一部の菌類などと同様、CRIPR/Cas9に不可欠な非相同末端結合の仕組みを欠いているのではないかと考えられた。

一方で、多くの細胞に備わっている相同性組み換え機構を利用したゲノム改変には、米国、スペインとの共同研究により大きな進展が見られた。まだ効率は低いものの、ゲノムの狙った場所に蛍光タンパク質発現カセットを挿入し、遺伝子を破壊することができている。この技術を利用すれば、カプサスポラの遺伝子研究が大きく進み、多細胞性進化の謎に効率的に迫ることができると確信している。

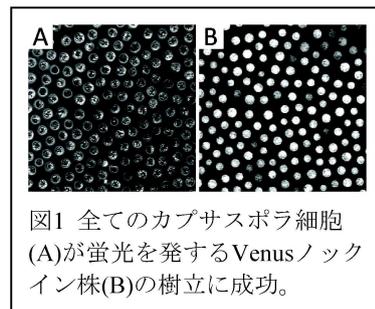


図1 全てのカプサスポラ細胞(A)が蛍光を発するVenusノックイン株(B)の樹立に成功。

また、トランスポゾンベクターを利用した遺伝子ノックインに挑戦し、恒常的に蛍光タンパク質Venusを発現する細胞株を得ることができた(図1)。ただ、これについては導入したVenus発現カセットがゲノムに挿入されているという証拠を得るには至っておらず、何らの未発見のメカニズムによって、導入したプラスミドがそのまま真核生物であるカブサスポラ細胞で維持されているという意外な結論を得た。ただ、この現象は、もしかしたら高効率の恒常的遺伝子導入法として応用可能であるかもしれない。

次に、shRNAを細胞に発現させることにより、特定の遺伝子のノックダウンを行う手法の確立を行った。その結果、shRNA発現ベクターをカブサスポラ細胞に導入することで、有意な遺伝子機能の低下を引き起こすことに成功した。ただ、この手法を使用した内在性遺伝子のノックダウン実験からは、生物学的に意味のある結果が得られていない。これまで我々がターゲットとしてきた遺伝子には、おそらく重複遺伝子などによるロバストな機能維持機構が働いており、その結果多少のノックダウンでは大きな表現型の変化が得られないのではないかと考えられた。

最後に、shRNAでは十分なノックダウン効果が得られなかったため、CRISPRi法による遺伝子ノックダウンに挑戦した。その結果、遺伝子の機能に明らかな変化を生じさせることが可能となっている(論文準備中)。ただし、同じようにCRISPRiを導入した細胞でも、表現型に変化を全く示さないものもあり、結果の不安定性が課題となっている。

以上のように、ノックダウン技術についてはまだ信頼性が高いものは得られていない。しかし前述したノックアウト技術と組み合わせて使用すれば、遺伝子機能解析のための強力なツールになると期待される。

<引用文献>

- ① 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.
- ② 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.
- ③ Suga, H., Dacre, M., de Mendoza, A. et al. 2012. Genomic survey of pre-metazoans shows deep conservation of cytoplasmic tyrosine kinases and multiple radiations of receptor tyrosine kinases. *Science Signaling* 5, ra35.
- ④ Suga, H., Chen, Z., De Mendoza, A. et al. 2013. The genome of *Capsaspora* reveals a complex unicellular prehistory of animals. *Nat Commun*, 4, 2325.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiroshi Suga	4. 巻 13
2. 論文標題 A comparison of bandwidth consumption between proprietary web conference services and BigBlueButton, an open source webinar system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioresource Science Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dudin, O., Ondracka, A., Grau-Bove, X., Haraldsen, A. A. B., Toyoda, A., Suga, H., Brate, J., and Ruiz-Trillo,	4. 巻 8
2. 論文標題 A unicellular relative of animals generates a layer of polarized cells by actomyosin-dependent cellularization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e49801-e49801
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.49801	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hiroshi Suga
2. 発表標題 Unicellular Notch signaling - what was is used for before multicellularity?
3. 学会等名 Symposium “Notch signaling in biological processes” in 44th Annual Meeting of The Molecular Biology Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅裕
2. 発表標題 The origin of Notch signaling and the evolution of multicellularity
3. 学会等名 日本進化学会第22回大会一般講演
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Suga
2. 発表標題 Evolution of multicellularity by gene co-option: Current Topics in Zoology and Evolution
3. 学会等名 Current Topics in Zoology and Evolution, Biozentrum, Basel, Switzerland (on line) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅裕
2. 発表標題 動物の多細胞化とゲノムの進化
3. 学会等名 国際植物の日 市民公開シンポジウム「進化のダイナミズム～生物のゲノム変化が暮らしを変えた～ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅裕
2. 発表標題 単細胞から多細胞へのトランジション 動物多細胞性進化のメカニズム
3. 学会等名 日本動物学会第90回年会シンポジウム「動物進化におけるメジャートランジション」 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Suga
2. 発表標題 Unicellular holozoans elucidate the evolution of metazoan multicellularity
3. 学会等名 International Workshop at Tutzing (Germany) "At the roots of bilaterian complexity: insights from early emerging metazoans" (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Suga Laboratory webpage
<https://www.pu-hiroshima.ac.jp/p/hsuga>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スペイン	CSIC/UPF進化生物学研究所			
スイス	スイス連邦工科大学ローザンヌ校			