

平成22年3月31日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2009

課題番号：20017004

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Studies on the genomic basis for establishment of multicellular systems using the social amoebae

研究代表者

漆原 秀子（URUSHIHARA HIDEKO）

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：00150087

研究成果の概要（和文）： 柄細胞が分化しない細胞性粘菌 *Acytostelium subglobosum* のゲノム解を行い、13,400 個の遺伝子モデルを構築した。すでにゲノム解析の終了している代表種 *Dictyostelium discoideum* と比較したところ、細胞分化に関与する遺伝子のほぼすべてについてオーソログが存在していること、一方、多重遺伝子ファミリーの構成は両者でかなり異なっていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）： The genome and cDNA analyses were performed in *Acytostelium subglobosum*, a cellular slime mold species without stalk-cell differentiation, and approximately 13,000 genes were identified. They included orthologues for most of the cell-differentiation related genes in *Dictyostelium discoideum*, the most widely used species with cell-differentiation abilities. However, closer examination of multi-gene families revealed that the family compositions were dissimilar between the two species.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,000,000	0	8,000,000
2009年度	8,000,000	0	8,000,000
年度			
年度			
年度			
総計	16,000,000	0	16,000,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：微生物ゲノム、ゲノム進化、比較ゲノム、発生分化、細胞性粘菌

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞性粘菌は土壤中の真核微生物で、系統進化的には、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。単細胞として分裂増殖するが、飢餓を引き金として多細胞体制に移行し、胞子の塊とそれを支える柄からなる子実体を形成する独特の生活環をもつ。モデル生物として多用される代表種の *Dictyostelium discoideum* については、発生のメカニズムに関する研究成果が蓄積し、また、日本を中心とする cDNA の大規模解析と国際コンソーシアムによるゲノム解読が 2004 年度に終了している。

(2) 多細胞体制の高度化を考える上で最も興味深い細胞性粘菌として、*Acytostelium* 属を解析対象に選んだ。この属では子実体の形態は *D. discoideum* に類似しているものの柄が非細胞性で、柄細胞への分化が見られない。入手可能な *Acytostelium* の 5 種について培養と発生の操作性を比較検討し、*A. subglobosum* (LB1 株) を解析に用いる株として選抜した。

(3) LB1 株には未同定の黄色バクテリアが混在していること、その混在によって発生が促進されることが見いだされた。*A. subglobosum* の簡単なゲノム解析を行い、(A+T) 含率が 46% と *D. discoideum* の 78.8% と大きく異なり、ハイブリダイゼーションを基本とした比較解析が不適当であることが判明していた。

## 2. 研究の目的

*A. subglobosum* は柄細胞が分化せず、*D. discoideum* では細胞分化が可能となるという質的な違いに関するゲノム情報上の違いを比較ゲノムのアプローチで解析する。具体的には以下の目標で研究を進める。

- (1) *A. subglobosum* のゲノム解析を完了する。
- (2) *A. subglobosum* 遺伝子モデルを構築する。
- (3) *D. discoideum* と *A. subglobosum* で遺伝子レパートリーを比較し、発生に関与する遺伝子の異同を解析する。
- (4) *A. subglobosum* 遺伝子機能解析に必要な形質転換系を確立する。
- (5) *A. subglobosum* の発生に影響する因子を解析する。

## 3. 研究の方法

- (1) 無菌培養した *A. subglobosum* アメーバからゲノム DNA を抽出してショットガンの Bac ライブラリーを作製し、大規模配列決定を行う。アセンブリプログラムでコンティグを生成する。
- (2) ゲノム DNA から Fosmid ライブラリーを作製して両端の配列決定を行い、コンティグに貼り付けることによってスキャフォールドを生成する。
- (3) 増殖期と発生期細胞の RNA から cDNA ライブラリーを作製して EST 解析を行う。配列をクラスタリングして代表クローンを選抜し、全長を配列決定する。
- (4) 遺伝子モデルを構築するために、まず cDNA と EST、をゲノムコンティグにマッピングする。次に、*D. discoideum* のアミノ酸配列を TBLASTN 検索によりマッピングする。最後に、cDNA 情報をもとにして *ab initio* 遺伝子予測を行う。
- (5) *A. subglobosum* アメーバの薬剤耐性を詳細検討し、形質転換系を確立する。

## 4. 研究成果

- (1) LB1 株に混在している未同定の黄色バクテリアを除去し、クローン化と無菌培養に成功した。後にゲノム解析結果を行い、このバクテリアは *Varioborax* 属であると判定した。
- (2) Bac ライブラリーと Fosmid ライブラリーを作製して約 35 万リードの端読みを行った。現在次世代シーケンサーの配列データを追加してコンティグギャップを埋める作業を行っている。フローサイトメトリーを利用して *D. discoideum* と比較する方法で推定したゲノムサイズ約 28 Mbp に対し、コンティグ総延長は 31.1 Mbp である。ゲノム解析結果の概要を表 1 にまとめて示す。

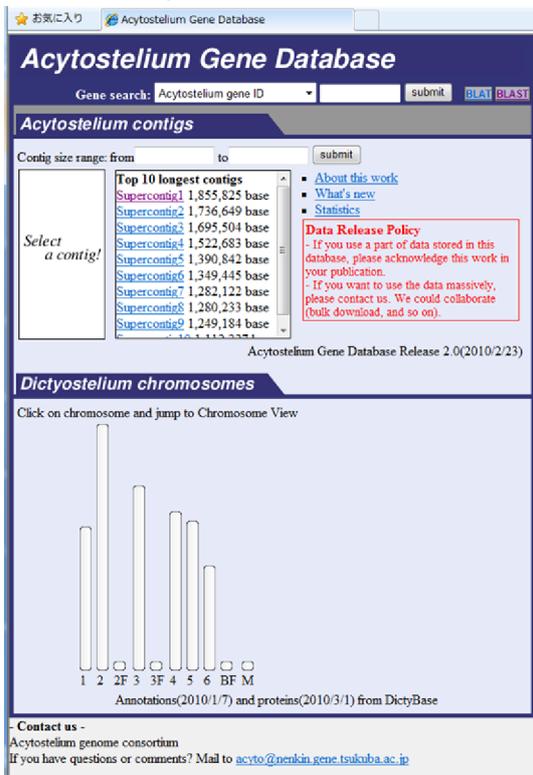
	Nature 2005, 435:43-57	This study
Data source		
Chromosome number	6	unknown
Genome size	34 Mb	28 Mb
(A+T) content	78.8%	43.7%
Contigs	309	318
Total nucleotides	33.9 Mbp	31.5 Mbp
EST (non-redundant)	8,402	5,749
Gene models	13,541 (12,500)	13,581

表1. *D. discoideum* と *A. subglobosum* ゲノム解析の比較

- (3) 増殖期ライブラリーから 13,837 クローン、発生期ライブラリー (Smart 法による完全

長) から 18,145 クローンについて EST 解析を行い、5,749 の独立遺伝子としてクラスタリングした。また、両端からの配列がマージしていない 712 遺伝子の cDNA クローンを選抜し、全長配列を決定した。

(4) *A. subglobosum* のゲノムコンティグに対して EST/cDNA および *D. discoideum* タンパク質のアミノ酸配列を追加マッピングすることにより、遺伝子モデル 9,269 個 (うち EST/cDNA は 3,315 個) を構築した。また、*ab initio* の遺伝子予測も進め、9,376 個の遺伝子を予測した。両者の和として、13,581 の遺伝子モデルが得られた。その結果はデータベース化してコミュニティに公開している (図 1)。



(5) *A. subglobosum* 遺伝子モデルのうち、約 90% が *D. discoideum* 遺伝子の相同遺伝子 (Coverage50%以上、Similarity が 30%以上) と判断され、遺伝子レパートリーの共通性は高い。実際、*D. discoideum* で発生に必要なとされている遺伝子のほとんどすべてについて、*A. subglobosum* に相同遺伝子が見出された。しかし、各遺伝子ファミリーの内容を比較すると、多くの遺伝子ファミリーについて 2 種間でメンバー同士の対応関係が見出される例は少なく、それぞれの種で別々にパラログが生じたケースの方が多いことがわかった。これは *A. subglobosum* と *D. discoideum* が系統発生的にかなり隔たっ

ていることを示唆する。また、*D. discoideum* の発生においては、Ras のように、ファミリーの各メンバーが分子機能としては同一でありながら生理的に異なる役割を果たす例が数多く報告されており、異なるパラログの生成が細胞分化能の有無に重要な役割を果たした可能性が高いと考えられる。

(6) *D. discoideum* の遺伝子欠損株に *A. subglobosum* 遺伝子を導入して相補性の有無を調べるためのモデル実験として、セルロース合成酵素遺伝子の導入を行った。その結果、部分的な表現型の回復が観察された。回復が完全でない理由はコドン使用頻度の違いによる翻訳レベルの差や他のタンパク質との相互作用の効率などが関係している可能性もあり、ケーススタディとして引き続き解析することになっている。

(7) *A. subglobosum* における形質転換系の確立: *D. discoideum* で選択培養に使用される薬剤に対する *A. subglobosum* の感受性を調べたところ、それらのすべてに対して高度に耐性であることがわかった。この多剤耐性は薬剤を細胞外に運び出すトランスポーター活性が高いためではないかと考え、トランスポーター阻害剤である cyclosporin A を共存させたところ、薬剤感受性が高まるという結果が得られた (表 2)。

薬剤	濃度 (μg/ml)	0	10	30	100	300	1000
Blactidicin S		++	++	++	++	+	+
G418		++		-	-	-	-
Hygromycin B		++	++	++	-	-	-
Puromycin		++	++	++	++	+	+
Bleomycin		++	++	++	++	-	-
Zeocin		++	++	++	++	++	++

表2. Cyclosporin A 30 μg/ml 存在下での薬剤耐性  
++: 増殖 +; 増殖可 ±: 増殖不可 (生存可) -; 死滅

最も低濃度で致死効果のあった G418 を選択薬剤とし、EST 解析により構成的に高レベルで発現することが示されたりボソームタンパク質遺伝子 *rpl4*, *rps13* のプロモーターとターミネーター配列を *neo<sup>r</sup>* 配列の前後に配した G418 耐性カセットを構築してエレクトロポレーションにより細胞内に導入したところ、*neo<sup>r</sup>* 配列をもち、選択培養下で増殖する形質転換体を得ることに成功した。これにより、*A. subglobosum* で遺伝子操作を行う道が開かれた。

(8) *A. subglobosum* は高密度では自らが排出するアンモニアによって発生が阻害されることがわかった。アンモニウムトランスポー

ター遺伝子ファミリーの発現制御、混在 *Variovorax* との関係を解析する糸口として重要である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件、すべて査読有)

- ① Urushihara, H. The cellular slime mold: eukaryotic model microorganism. *Exp. Anim.* 58, 2009, 977-104.
- ② Sato, MJ., Kuwayama, H., van Egmond, WN., Takayama, ALK, Takagi, H., van Haastert, PJM., Yanagida, T., Ueda, M. Switching direction in electric signal-induced cell migration by cGMP and phosphatidylinositol signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 106, 2009, 6667-6672.
- ③ Kuwayama, H., Kubohara, Y. Differentiation-Inducing Factor-1 and -2 function also as Modulators for *Dictyostelium* Chemotaxis. *PLoS One* 4, 2009. e6658.
- ④ Urushihara, H., Developmental biology of the social amoeba: history, current knowledge and prospects. *Dev Growth Differ.* 50 Suppl 1, 2008, S277-281.
- ⑤ Miyagishima, H., Kuwayama, H., Urushihara, H., Nakanishi, H., Evolutionary linkage between cytokinesis and chloroplast division by dynamin proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 105, 2008, 15202-15207.

[学会発表] (計11件)

- ① 漆原秀子、桑山秀一、鹿児島浩、新井理、大石加寿子、伊藤武彦、谷口丈晃、豊田敦、野口英樹、内今日子、黒木陽子、畑敬士、磯辺拓海、小原雄治、藤山秋佐夫 「非分化性の社会性アメーバ、*Acytostelium*の遺伝子解析」第4回日本ゲノム微生物学会年会 20100309 九州大学
- ② 桑山秀一、上田昌宏、漆原秀子 「細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum*において生活環周期を調節する新規*rabGAP*の機能解析」第4回日本ゲノム微生物学会年会 20100309 九州大学
- ③ Urushihara, H., Kuwayama, H., Kagoshima, H., Shin-I, T., Itoh, T., Taniguchi, T., Uchi, K., Kuroki, Y., Kohara, Y., Fujiyama, A. "Gene repertoire of *Acytostelium subglobosum*, a group 2 species without stalk-cell differentiation" International *Dictyostelium* Conference 2009,

20090824, Denver, USA.

- ④ Kuwayama, H., Uchi, K., Kagoshima, H., Shin-I, T., Ohishi, K., Itoh, T., Taniguchi, T., Kuroki, Y., Kohara, Y., Fujiyama, A., Urushihara, H., "Cell-differentiation related genes in a non-differentiating cellular slime mould revealed by its genome analysis" 第42回日本発生物学会年会、20090530、新潟トキメッセ
- ⑤ Tohyama T., Kuwayama, H. and Urushihara, H. "Analysis of a cell-differentiation related gene in a non-differentiating cellular slime mould" 第42回日本発生物学会年会、20090529、新潟トキメッセ
- ⑥ 漆原秀子、桑山秀一、鹿児島浩、新井理、大石加寿子、伊藤武彦、谷口丈晃、内今日子、黒木陽子、小原雄治、藤山秋佐夫 「*Acytostelium*属細胞性粘菌のゲノム解析」第3回日本ゲノム微生物学会年会 20090305 中央大学後楽園キャンパス
- ⑦ Urushihara, H. Two resource sites from Japan. International *Dictyostelium* Conference 2008 (Workshop), 20080920 Tsukuba, Japan
- ⑧ Urushihara, H., Kuwayama, H., Uchi, K., Kohara, Y., Kagoshima, H., Shin-I, T., Ohishi, K., Itoh, T., Taniguchi, T., Fujiyama, A. "Developmental genes in *Acytostelium subglobosum*, a group 2 species without cell-type differentiation" International *Dictyostelium* Conference 2008, 20080918, Tsukuba, Japan.
- ⑨ Uchi, K., Kuwayama, H., Yoshino, R. and Urushihara, H. "Developmental inhibitor secreted by *Acytostelium subglobosum*, a primitive social amoeba without cell differentiation" International *Dictyostelium* Conference 2008, 20080918, Tsukuba, Japan.
- ⑩ Furuya, Y., Kunitani, M., Muramoto, T., Kuwayama, H., and Urushihara, H. "Functional analysis of *rasX* group genes" International *Dictyostelium* Conference 2008, 20080918, Tsukuba, Japan.
- ⑪ Saeki, K., Satoh, T., Muramoto, T., Skeleton, J., Kay, RR., Kuwayama, H., and Urushihara, H. "Differential gene expression between sexually mature and immature cells of *Dictyostelium discoideum*" International *Dictyostelium* Conference 2008, 20080918, Tsukuba, Japan.

[図書] (計3件)

- ① 漆原秀子 「dictyBase—社会性アメーバ『細胞性粘菌』の総合データベース—」細胞工学分別冊 「バイオリソース&データベース

活用術」秀潤社、2009、124-131

- ② 漆原秀子「研究をささえるモデル生物—実験室いきものガイド」第10章「単細胞と多細胞の架け橋—細胞性粘菌がわかる10.1 概論」化学同人 2009、182-189
- ③ 漆原秀子「研究をささえるモデル生物—実験室いきものガイド」第10章「単細胞と多細胞の架け橋—細胞性粘菌がわかる」10.2 最新研究「細胞性粘菌の多細胞化のしくみにゲノム科学で迫る」化学同人 2009、190-192

#### [その他]

Acytostelium gene database (AcytoDB)

・公開版：

<http://acyto.sequence.info/>

・開発版：(近日公開)

<http://gbas201002.www2.sequence.info/>

研究室ホームページ

<http://nenkin.gene.tsukuba.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

漆原 秀子 (URUSHIHARA HIDEKO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：00150087

### (2)研究分担者

桑山 秀一 (KUWAYAMA HIDEKAZU)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・講師

研究者番号：40397659

### (3)連携研究者

川田 健文 (KAWATA TAKEFUMI)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：30221899