

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：25406

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26891021

研究課題名(和文)動物多細胞性進化メカニズムの分子生物学的解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism for evolution of metazoan multicellularity

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) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：動物の多細胞システムはどのように進化したのか？これを分子レベルで解明するためには、動物に近縁ではあるが単細胞の生活環を持つ生物の解析が重要なカギを握る。そのような原生生物(単細胞ホロゾア)がもつ「多細胞的な」遺伝子、すなわち細胞接着や細胞間コミュニケーション、細胞増殖の制御、細胞がはい回るための足場(細胞外マトリクス)、臓器や器官のサイズ制御などにかかわる遺伝子の機能を解析し、単細胞生物が多細胞化を果たすためにどのような遺伝子レベルの進化が必要だったのか、解明に向けた研究を行った。

研究成果の概要(英文)：How did the multicellular system of animals evolve? Analysis of unicellular holozoans, the closest unicellular relatives of animals, is a key to solve this question. Surprisingly many “multicellularity genes”, which are in animals used for developing and maintaining multicellular bodies, have been found in the genomes of unicellular holozoans, suggesting that genes for cell adhesion, cell-cell communication, proliferation, extracellular matrix, and organ growth control were abundantly present already in premetazoans. In the project, we aimed to analyze these genes, taking advantage of the whole genome information of unicellular holozoans and the recently-developed method for transformation, in order to understand the molecular mechanisms for evolution of animal multicellularity.

研究分野：生物学

キーワード：多細胞性の進化 単細胞ホロゾア

### 1. 研究開始当初の背景

生物進化史上、多細胞動物の登場は特筆すべき出来事である。動物は多細胞化することで、単細胞生物に対する様々な優位性を獲得した一方、癌など多細胞システム特有の病にも悩まされることとなった。多細胞システム進化の背景には、どのような分子メカニズムが働いていたのか?ごく単純に考えて、細胞同士の接着や連絡を行う分子群が新たに作られたであろうことは想像できる。しかしこれを科学的に証明するためには、動物に近縁な単細胞生物、すなわち単細胞ホロゾアと呼ばれる一群の原生生物を解析し、動物と比較することが必要である。

研究開始当初、単細胞ホロゾア数種のゲノム解析が終了し(King et al., 2008; Suga et al., 2013a)、それらを比較する比較ゲノム学の立場から、ある仮説が立ち上がってきた。それは「多細胞システムの進化にあたり、生物は多細胞特有の新しい遺伝子を作り出したのみならず、単細胞時代から存在した古い遺伝子を細胞接着や連絡などの機能に転用した」というものである。主研究者らは、この仮説を更に詳細に解析しようと、カプサスポラ及びクレオリマックスという2種の単細胞ホロゾアを新たなモデルとして開発し、ゲノム配列決定、更に遺伝子導入法の開発などのツール整備に成功していた(Suga et al., 2013b)。

### 2. 研究の目的

(1) ゲノム解析から見つかった、単細胞ホロゾアが持つ「多細胞的な」遺伝子の機能を、分子生物学的な手法を用いて解明する。

(2) 既にモデル生物として使用できる目途がついている2種類の単細胞ホロゾア(カプサスポラ及びクレオリマックス)以外の種でも同様な解析ができるよう、ゲノム解読や遺伝子導入法を中心とした基礎的ツールの整備を行う。

### 3. 研究の方法

(1) カプサスポラが持つカドヘリン様分子(動物では細胞接着に関与)及びSrcチロシンキナーゼ(動物では細胞増殖の制御に関与)の機能を解析する。最近主研究者によって開発されたクレオリマックスに対する遺伝子導入法、および研究開始当時はまだ未開発であったが、その後確立された(後述)カプサスポラに対する遺伝子導入法を使用し、遺伝子の過剰発現、ドミナントネガティブ法やsiRNA法による遺伝子発現の抑制実験を行う。

(2) コラロキトリウム、アマービディウム、スフェロフォルマを初めとした単細胞ホロゾアに対し、ゲノム配列決定、生活環の観察、遺伝子導入法の開発などを行う。

### 4. 研究成果

(1) カプサスポラへの遺伝子導入法の確立と改善

本研究の直接の成果ではないものの、研究室の学生を海外派遣するなどの人的交流などを経て、カプサスポラへのカルシウムグリセロール法による遺伝子導入法の開発と効率の向上を果たすことができた。また、カプサスポラに効果のあるドラッグを発見し、その耐性遺伝子導入実験も行っている。ゲノム配列が解読されている唯一のフィラステレア綱であるカプサスポラに対する形質転換への道が開けたことで、動物多細胞性進化の分子メカニズム解明に向けた動きが活性化される。

(2) カプサスポラカドヘリンの解析と細胞内小器官マーカーの作出

カプサスポラが持つカドヘリン様遺伝子を過剰発現させ、細胞を観察した。遺伝子が細胞膜に発現していることは確認できたものの、目立った表現型の変化は観察されなかった。RNA干渉法による遺伝子発現の抑制も行ったが、同様であった。そこで、光学顕微鏡下では観測不可能な細胞内微細構造に異常が生じている可能性を考え、そうした構造をライブで観察可能なマーカーコンストラクトを作出した。その結果、ミトコンドリア、アクチン、チューブリン、小胞体などのマーカーを確立することができた(図1)。これらの成果は、今後の研究の基礎ツールとして有用である。例えば、マーカーコンストラクトと目的遺伝子のコンストラクトとを共発現させることで、今後更に詳細な表現型の解析が可能となる。

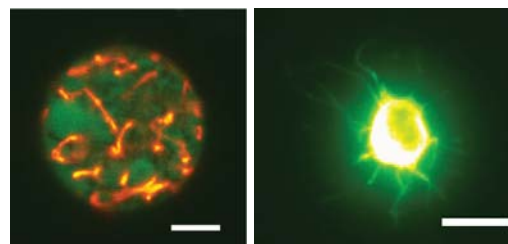


図1 開発したライブ観察マーカー  
左:クレオリマックスのミトコンドリア  
右:カプサスポラのアクチンフィラメント  
スケールバーは5  $\mu$ m

(3) クレオリマックス Src 遺伝子の解析

クレオリマックスのSrcを過剰発現させたところ、予想に反して細胞は増殖せず、死滅した。ドミナントネガティブ解析では、導入した遺伝子がむしろ細胞の成長を促すような表現型が得られた。ただし後者の結果については、(2)で開発したマーカーを共発現させるなど、更に詳細な解析が必要である。これらの結果を受け、当初の計画にはなかったカプサスポラにおけるSrc遺伝子の機能解析、

及びゲノム編集による遺伝子ノックアウトをスタートさせた（後者は広島大学との共同研究）。

(4) その他の「多細胞的な」遺伝子の解析当初の計画範囲を超え、以下の3種類の遺伝子群の解析を開始した。

#### ①Notch、Delta 様タンパク質

細胞間連絡や接着に関わり、多細胞体の発生に重要な役割を果たす Notch 様タンパク質、及びそのリガンドである Delta によく似たドメイン構成をもつタンパク質がカプサスポラに発見されている(Suga et al. 2013a)。Notch 様タンパク質については、既にカプサスポラの2遺伝子に対して過剰発現コンストラクトを作成しその表現型を得ている。

#### ②細胞外マトリクス様遺伝子

ゲノム解析の結果、カプサスポラには少なくとも18種類のラミニンGドメインを含むタンパク質が存在することが判明した。ラミニンGドメインは、動物では細胞外マトリクスと呼ばれる細胞の「足場」を作るために重要な要素である。そのような足場が不必要なはずの単細胞生物で、このドメインがどのような役割を果たしているのか？すでに2種類の遺伝子の過剰発現により、細胞に異常が現れることを確認している。

③Hippo パスウェイ遺伝子。動物で臓器サイズの制御などにかかわる Hippo パスウェイ遺伝子がカプサスポラに見出されている(Sebé-Pedrós et al., 2012)。Hippo 遺伝子の過剰発現実験を行った結果、やはり細胞の形態に異常を示した。

(5) 新たな単細胞ホロゾアモデル確立を目指したゲノム解析

当初の計画にあった、新規単細胞ホロゾアのクラロキトリウムに対する遺伝子導入実験については、蛍光タンパク質を発現させるコンストラクトを作出し、導入に挑戦したものの、残念ながら現時点でポジティブな結果は得られていない。そこで、クラロキトリウム以外の単細胞ホロゾアも標的に含め、これまで完全なゲノム情報がなかった2種、アメービディウムとスフェロフォルマについて全ゲノム解析をスタートさせた。解析にあたり、文科省「ゲノム支援」プロジェクトの支援研究に採択され、超ロングリードをはじめとした最先端のサポートを受けられることになった。

<引用文献>

① King et al. (2008). The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature* 451, 783-788.

② Suga et al. (2013a). The genome of

*Capsaspora* reveals a complex unicellular prehistory of animals. *Nat Commun* 4, 2325.

③ Suga and Ruiz-Trillo (2013b). Development of ichthyosporeans sheds light on the origin of metazoan multicellularity. *Dev Biol* 377, 284-292.

④ Sebé-Pedrós et al. (2012). Premetazoan origin of the Hippo signaling pathway. *Cell Reports* 1, 13-20.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

① Carr, M. and Suga, H. (2014) “The holozoan *Capsaspora owczarzewski* possesses a diverse complement of active transposable element families” *Genome Biol Evol* 6, 949-963. <http://gbe.oxfordjournals.org/content/early/2014/04/02/gbe.evu068>

② Hayakawa, S., Takaku, Y., Hwang, J. S., Horiguchi, T., Suga, H., Gehring, W. J., Ikeo, K. and Gojobori, T. (2015) “Function and evolutionary origin of unicellular camera-type eye structure” *PLoS ONE* 10, e0118415.

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0118415>

③ De Mendoza, A., Suga, H., Permanyer, J., Irimia, M., Ruiz-Trillo, I. (2015) “Functional genomics of *Creolimax fragrantissima* reveals complex transcriptional regulation and independent evolution of fungal traits in a close relative of animals” *eLife* 4, e08904. <https://elifesciences.org/content/4/e08904>

④ Tatsuka, M., Fujiwara, M., Okamoto, M., Hori, M., Sugihara, Y., Jikihara, H., Nakaoji, K., Hamada, K., Suga, H., and Shimamoto, F. (2016) “Possibility of RhoGDI  $\beta$  as a molecular target for biomedical applications (in Japanese)” *J Life Environ Sci* 8, 1-12. <http://harp.lib.hiroshima-u.ac.jp/pu-hiroshima/list/journals/県立広島大学生命環境学術誌>

⑤ Fujiwara, M., Okamoto, M., Hori, M., Suga, H., Jikihara, H., Sugihara, Y., Shimamoto, F., Mori, T., Nakaoji, K., Hamada, K., Ota, T., Wiedemuth, R., Temme, A., and Tatsuka, M. (2016) “Radiation-induced RhoGDI  $\beta$  cleavage leads to perturbation of cell polarity: a possible link to cancer spreading” *J Cell Physiol* DOI: 10.1002/jcp.25362

⑥ Suga, H. and Ruiz-Trillo, I. (2015) “Unraveling the origin of animal multicellularity (in Japanese)” *実験医学 (Experimental Medicine)* 33, 968-973.

<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/>

〔学会発表〕(計3件)

- ① 菅裕 「動物の多細胞体制の進化」日本プランクトン学会若手の会 2014年9月4日 広島大学(広島県東広島市)
- ② 菅裕 「動物多細胞体制の進化に原生生物から迫る」日本進化学会年会 2015年8月21日 中央大学理工学部(東京都)
- ③ 菅裕 「動物多細胞性進化に迫る新しいモデル原生生物」日本分子生物学会年会 2015年12月1日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

〔図書〕(計1件)

- ① Suga, H. and Ruiz-Trillo, I. (2015) “2.2. Filastereans and Ichthyosporeans: Models to Understand the Origin of Metazoan Multicellularity” in Evolutionary Transitions to Multicellular Life (Ruiz-Trillo & Nedelcu, A. M. eds. ISBN 978-94-017-9641-5) 117-128 Springer, New York.

〔その他〕

ホームページ等

[www.pu-hiroshima.ac.jp/~hsuga](http://www.pu-hiroshima.ac.jp/~hsuga)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅 裕 (SUGA, Hiroshi)

県立広島大学生命環境学部生命科学科・准教授

研究者番号：30734107