

研究終了報告書

「細胞エネルギー利用および多細胞化への分子進化」

研究期間: 2021年10月～2023年3月

研究者: 原田 彩佳

1. 研究のねらい

我々ヒトを含む全ての動物の体は、複数種に分化した多くの細胞から構成されている。このような多細胞性の生物は単細胞性の生物をその起源としており、真核生物の3つの主要な系統、すなわち動物、植物、菌類で独自に多細胞化が起きたと考えられている。動物の初期進化の過程で起きた多細胞化は、多様な動物門を生み出す上での最も重要な進化的要因であり、多細胞化という形態レベルの進化と遺伝子レベルでの多様化の関連性について理解することは重要である。動物の多細胞化の起源についてはゲノム解析から研究が進んでいるが、配列比較だけでは、実際どのようなメカニズムで遺伝子が多細胞化に貢献したのかは、分からないままである。

哺乳細胞においては、ATP が細胞の生存維持に不可欠で、その枯渇が細胞死を招くのに対し、GTP の枯渇は増殖停止を引き起こすものの細胞死を伴わないことが知られており、細胞が生存に必要なエネルギーと、増殖して複数の細胞になるのに必要なエネルギーを区別しているためだと考えている。よって、単細胞から多細胞への進化の過程で、エネルギー利用の制御機構も変化しているのではないかと考えた。ATP の濃度の変化は AMP 活性化キナーゼや mTOR といった複数の ATP センサーにより感知され、代謝応答や遺伝子発現を変化させているが GTP の濃度変化について近年発見された脂質キナーゼ PI5P4K β が GTP センサーとして機能していることが分かった。PI5P4K は酵母など単細胞の菌類には存在せず、菌類と動物(多細胞)が分岐した後に獲得された新しい遺伝子であることが分かった。この変化は単細胞から多細胞へ細胞が自己組織化する直前におこっていることから、細胞内エネルギーの使い分けと多細胞化には相関があると予測した。また、多細胞化への分化には細胞骨格、細胞内輸送や転写調節に関わる遺伝子もあり、それら遺伝子に対してもエネルギー利用の多様性があるのではないかと考えているが、エネルギーの使い分けと多細胞化への進化とを結びつける研究はこれまで行われていない。そこで本研究では、後生動物における細胞骨格、細胞内輸送や転写調節に関わる遺伝子の ATP と GTP に対する応答性を比較し、応答性が異なる遺伝子について構造生物学や生化学、発生学などの複数の分野技術を融合することでミクロな視点で明らかになる分子論的な差が表現型としてどう影響するのかを明らかにすることで、細胞エネルギー利用の多様化と多細胞化への進化解明を併せて理解することを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

PI5P4K の進化について構造生物学的な観点から検証するため、進化上鍵となる現存する進化的に古い生物をいくつか選択し、それぞれの PI5P4K の発現、精製、結晶化および回折強度データ収集を行い、古生物版 PI5P4K の立体構造をそれぞれ原子レベルで決定した。脊索動物の PI5P4K とは異なり、古生物の PI5P4K では、露出していた基質結合ポケットがループ領域で覆った状態となっており、両者の立体構造で違いが見られた。

古生物の PI5P4K では、脊索動物の PI5P4K と比較して ATP/GTP の加水分解活性が低いいため、ループ領域の構造の差が活性に影響を与えているものと考えた。

動物に近縁な単細胞生物である、*C. owczarzaki* や *M. brevicollis* に着目し、それら単細胞生物に多細胞生物がもつ遺伝子(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)が存在しているかについて解析を行なった。結果、いくつかの遺伝子が *C. owczarzaki* や *M. brevicollis* にも存在することが分かった。

また、単細胞生物を用いた、ATP/GTP に対する RNAseq を行うため、まずは *M. brevicollis* の培養系の確立を目標としたが、無菌培養系の確立が困難かつ培養液中にその他の共生生物が入ってしまい区別が難しく断念した。次に *C. owczarzaki* の培養を試みたところ、継代培養に成功した。さらに、*C. owczarzaki* の培養細胞を用いて、ATP/GTP を添加した場合に応答する遺伝子を見つけるため RNAseq を行った。結果、ATP/GTP 添加時と、非添加時において明確な違いが見られた。

(2) 詳細

研究テーマ A 「古生物版 PI5P4K の立体構造解析」

進化上鍵となる現存する進化的に古い生物をいくつか選択し、それぞれの PI5P4K について大腸菌を用いた発現系で大量培養、精製、結晶化および回折強度データ収集を行い、古生物版 PI5P4K の立体構造をそれぞれ原子レベルで決定した。結果、脊索動物の PI5P4K とは異なり、古生物の PI5P4K では、露出していた基質結合ポケットがループ領域で覆った状態となっており、両者の立体構造で違いが見られたことがわかった。さらに古生物の PI5P4K では、脊索動物の PI5P4K と比較して ATP/GTP の加水分解活性が低いいため、ループ領域の構造の差が活性に影響を与えているものと考えた。

研究テーマ B 「シグナル伝達経路に関わる遺伝子のオルソログ解析」

C. owczarzaki や *M. brevicollis* は動物に最も近縁な単細胞生物の一つとして、動物の多細胞性の起源を理解する上で重要な系統的位置を占めている。多細胞生物には、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が存在している。単細胞生物である *C. owczarzaki* や *M. brevicollis* において、シグナル伝達経路に関わる遺伝子に着目し解析を行なった結果、いくつかの遺伝子が *C. owczarzaki* や *M. brevicollis* にも存在することが分かった。

研究テーマ C 「単細胞生物の培養」

遺伝子導入を目的とし、*M. brevicollis* の培養系の確立を目標としたが、無菌培養系の確立が困難かつ培養液中にその他の共生生物が入ってしまい区別が難しく断念した。代わりに *C. owczarzaki* の培養を試みた。*C. owczarzaki* は、ATCC より購入し 17°C または 23°C で 2 から 3 週間ごとに継代培養を繰り返しており、培養に成功した。

研究テーマ E 「*C. owczarzaki* の ATP/GTP に対する RNAseq」

C. owczarzaki の生活環は、3 つの異なる細胞型をもつ 3 つの異なる段階から構成される。培養条件下において、*C. owczarzaki* の糸状仮足細胞は基質に付着し、急激な増殖期の終わりまで活発に複製する。次に細胞は分離し始め、分岐した糸状仮足を凝縮してシストを形成する。このシスト期の間、分裂は停止する。あるいは、アメーバは原因不明の要因によって活発に互いに凝集し、多細胞の凝集構造を形成し、細胞間の直接的接触を妨げていると思われる構造化されていない細胞外物質を分泌する。

C. owczarzaki の培養細胞を用いて、ATP/GTP 添加時に、どのような遺伝子が発現しているか調べるため、最終濃度 1 mM ATP または 1 mM GTP を添加し、一晩インキュベートしたのに対して RNAseq を行った。結果、ATP/GTP 添加時に、発現量が増加した遺伝子を 150 個同定することができた(図1, 2)。

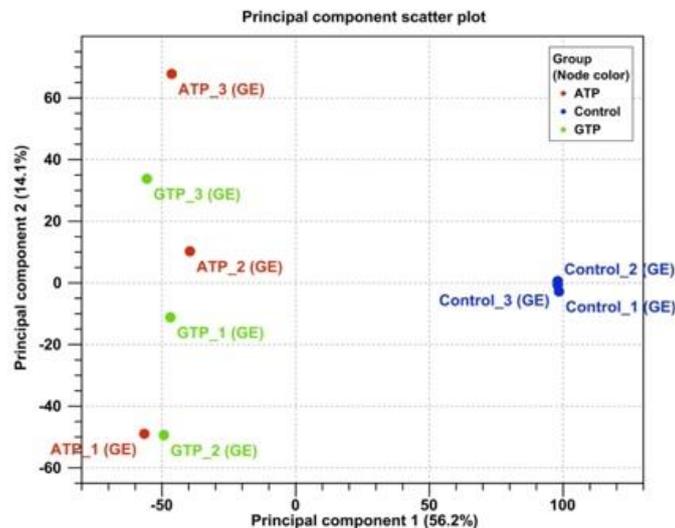


図1 RNAseq の PCA プロット

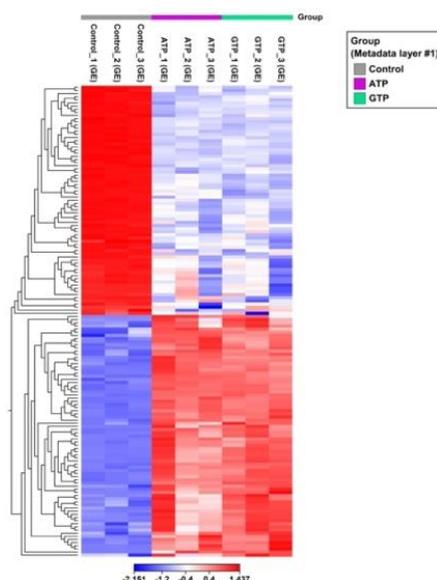


図 2 RNAseq の heatmap

3. 今後の展開

本研究は、エネルギー利用の多様性と多細胞化への分子進化を明らかにし、その機能が細胞あるいは個体においてどのような役割を担っていたかを明らかにしようとするものである。本研究を通して、多細胞生物がどのようにして進化的に生まれてきたかを理解する大きな鍵を提供するとともに、その背景にある、進化理論の構築にも大きな影響と与えることが期待できる。

本研究では、動物に最も近縁な単細胞生物の1つである *C. owczarzaki* について、ATP/GTP 添加時に発現した遺伝子の特定を進めることができた。今後は、*C. owczarzaki* の培養細胞中の ATP または GTP 結合性タンパク質について、ATP/GTP 誘導体を固定したアガロースビーズを用いて精製し、LC-MS/MS 解析を行い同定する予定である。また、細胞がどのようにして組織形状の変化を感知し、自身の分化方向を決めているのか、現時点ではその仕組みの詳細についてはまだ十分な理解には至っていない。よって、多細胞化という形づくりの仕組みを明らかにしていくことは、「細胞分化の制御」を可能にすることに繋がる。本研究によって得られる成果は、再生医療の実現に向けた「目的の細胞・組織への安定的な誘導手法の開発」に寄与できると期待できる。

4. 自己評価

採択初年度は年度途中で異動が決定し、異動先での本務に掛ける業務負担が大きくなってしまったため研究計画を予定通り進めることができなかった。2022 年度および 2023 年度については、本務の業務を調整することで当初の予定よりも遅れてはいるが進めることができた。ACT-X 研究では、これまでの自身の研究では経験してこなかった手法等にも挑み、今後の研究を進める上でとても良い経験をすることができた。この研究内容はまだまだ道半ばであるので、引き続き邁進していきたい。また、ACT-X は、領域内研究者とのネットワークを形

成することも目的となっているが、大学内での ACT-X 研究者との共同研究を開始しており交流を深めることができた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0 件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

なし