

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 9 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26610129

研究課題名(和文) 遺伝子解析によるソリトン波の形成・維持メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of biological soliton by gene analysis

研究代表者

桑山 秀一 (KUWAYAMA, Hidekazu)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：40397659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサによりソリトン株であるKI-5株、KI-10株及びそれらの親株であるXP55株それぞれの全ゲノム配列を決定し一塩基多形(SNP)解析を行った。その結果、KI-5において75箇所、KI-10においても75箇所の塩基置換が見出された。さらに、遺伝子発現の大規模解析の結果、ソリトン現象後において16倍以上発現量が増加している遺伝子はKI-5において105遺伝子、KI-10において19遺伝子存在すること等が判明した。変異の見つかった遺伝子のうちソリトン表現型に対する責任遺伝子同定を行った。その結果、一つのものについてソリトン形質に影響があることが判明した。

研究成果の概要(英文)：By the next generation DNA sequencer, we determined all the genome sequences of two soliton strains, KI-5 and KI-10, and their parental strain. By analysis of SNP, 75 genes of KI-5 and 75 genes of KI-10 were found to be changed. Furthermore, by deep-sequencing, 105 genes of KI-5 and 19 genes of KI-10 were found to increase during soliton. Next we tried to look up the responsible genes. Among those mutated genes, one gene was found to be related to soliton phenomenon by molecular biology technique.

研究分野：生物物理学

キーワード：ソリトン

### 1. 研究開始当初の背景

ソリトン波とは、衝突しても形や運動量を崩さず安定に存在し続ける波であり、これまで様々な物理現象において観察されている。現在では光ファイバー通信の長距離化などへの応用も研究されており、ソリトン波現象は数学、理論物理学、工学にとって非常に重要な基礎現象となっている。しかしながら、ソリトン波の性質を示す生物学的な現象、とりわけ細胞レベルの現象はこれまで報告されていなかった。

申請者は、細胞性粘菌のある走化性に関連した変異体がソリトン波の法則に従う細胞集団(細胞ソリトン波)を形成することを発見し、生物現象に関わるソリトン波の存在を世界で初めて報告した(Kuwayama and Ishida, Scientific Reports, 2013)。細胞性粘菌は単細胞アメーバであるが、飢餓状態になると10万個程の細胞が走化性運動により集合し、最終的にカビに良く似た淡黄色の子実体を形成する。細胞性粘菌は土壌に生息するアメーバ細胞でありながら多細胞体となる基礎生物研究のモデル生物である。細胞性粘菌にはヒト相同遺伝子が多数あり、解析に必要な分子生物学的手法がヒト培養細胞と比べてはるかに簡便であり培養系も確立されている(Williams, Genetics, 2010)。また、遺伝子破壊効率が高く(Kuwayama and Nagasaki, J. Mol. Microbiol. Biotech., 2008)、半数体であるためヒト細胞では困難な遺伝子タギング法による突然変異株の作出が可能である。また、遺伝子解析の基本となる全ゲノムデータやcDNAデータも公表されている(<http://dictybase.org/>)。

申請者は細胞性粘菌の細胞運動研究の過程で偶然、細胞性粘菌のある突然変異体が自発的に波状の細胞集団を形成し、波状構造を維持したまま一定の速度で運動することを発見した。さらに、波状の細胞集団は、互いに衝突しても形や運動量を崩すことなくすり抜けることを見出した(2013年7月29日付朝日新聞デジタル版)。詳細な解析の結果、波状の細胞集団は、前方の細胞を取り込みつつ、後方に細胞を取り残しながら動的平衡を保っていた。また衝突時には、2つの波状細胞集団間で細胞のシャフリングが起こり、細胞が混合された状態で分離した。さらに、波状細胞集団の大きさや方向性は衝突・分離後も維持された。これらの観察結果は、波状の細胞集団の大きさや運動量は集団として記憶され、個々の細胞に依存していないことを意味している。

### 2. 研究の目的

申請者は、細胞性粘菌のある変異体においてソリトンの性質を示す細胞集団運動(細胞運動ソリトン)を行うことを発見し、細胞集団がソリトン波形成を行うことを初めて報告した(Kuwayama and Ishida, Scientific Reports, 2013)。細胞性粘菌とは、単細胞アメーバであ

るが、飢餓状態になると約10万個の細胞が走化性応答により集合し、最終的にカビに良く似た淡黄色の子実体を形成する。申請者は遺伝子に傷をつけることにより走化性能を欠く突然変異体(KI株と命名)を独自に分離し、それらの性質を細胞学的、生化学的に研究を進めてきた(Kuwayama et al., Journal of Cell Biology, 1993; Kuwayama et al., Science, 1996)。その結果、それらの突然変異体の多くがcGMPという外部からの情報に応じて細胞内で合成される物質の代謝が異常であることを明らかにした。この研究の過程で、KI-5とKI-10の2株が飢餓状態においてこれまでに観察されなかったソリトン様の細胞集団運動をすることが分かった。このソリトン突然変異体は走化性応答能を欠き、飢餓状態において集合できない。したがって、細胞が集団にならないと予想された。しかしながら、これらの突然変異体は自発的にアーチ状の細胞集団運動を形成し、一定の速度で直進運動を行うことが観察され、さらに波の方向性や大きさに関係なくすり抜けることが観察された。

このソリトン波状細胞集団は、細胞集団が進行方向前方の細胞を取り込みつつ、後方に細胞を取り残していく動的平衡を保ちながら一定の大きさに維持される。さらに、衝突し融合した細胞ソリトン波の中では、細胞集団のシャフリングが起こり、衝突後形成される波状細胞集団は2つの波由来の細胞が混合されたヘテロな細胞集団となった。その後、ヘテロな細胞集団を維持したまま、波は2つに分離することがわかった。この時、波状細胞集団の大きさや方向性は分離後も維持された。これらの観察結果は、波状の細胞集団の大きさや運動量は集団に記憶され個々の細胞に依存していないことを意味している。本申請課題では、ソリトン波の原因となる遺伝子を明らかにし、遺伝子という視点からソリトン現象を生物学的に解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

申請者はソリトン波を形成する変異体(KI-5, KI-10)を2株、独自に作製した(Kuwayama et al., J. Cell Biol., 1993)。これらの変異体は、変異前の株(野生株)であるXP55株を強力な突然変異剤ニトロソグアニジンで処理することにより分離されたものである。これらの株の全ゲノム配列と親株の全ゲノム配列を「ゲノム支援」により次世代シーケンサを用いて決定し、一塩基多形(SNP)解析を行った。それにより変異の見つかった遺伝子のうちソリトン表現型に対する責任遺伝子同定のため、対応する正常遺伝子を発現ベクターに組み込み、ソリトン株に形質転換し正常遺伝子を発現する。ソリトン形質を相補する遺伝子、あるいはソリトン形質に影響を与える遺伝子を同定する。

#### 4. 研究成果

次世代シーケンサによりソリトン株である KI-5 株、KI-10 株及びそれらの親株である XP55 株それぞれの全ゲノム配列を決定し、それぞれ約  $2.4 \times 10^7$ 、 $2.6 \times 10^7$ 、 $2.1 \times 10^7$  リードの配列、total bps としてはそれぞれ、 $6.0 \times 10^9$ 、 $6.6 \times 10^9$ 、 $6.1 \times 10^7$  の塩基数の配列を元に bowtie2 および bwa による相互マッピングを行い、一塩基多形(SNP)解析を行った。その結果、親株 XP55 とタンパク質コード領域において塩基配列の異なる箇所が、KI-5 において 75 箇所、KI-10 においも 75 箇所見出された。これらのうち、74 箇所が KI-5 と KI-10 に共通の変異であることが分かった。さらに、KI-5 株、KI-10 株それぞれのソリトン現象前後での遺伝子発現の大規模解析の結果、ソリトン現象後において 1.6 倍以上発現量が増加している遺伝子は KI-5 において 105 遺伝子、KI-10 において 19 遺伝子存在することが判明した。逆に、ソリトン現象後において 1.6 倍以上発現量が減少している遺伝子は KI-5 において 384 遺伝子、KI-10 において 57 遺伝子存在することが判明した。これらのうちで、KI-5 株と KI-10 株に共通する遺伝子は、1.6 倍以上増加するもので 6 遺伝子、1.6 倍以上減少するもので 24 遺伝子であった。

変異の見つかった遺伝子のうちソリトン表現型に対する責任遺伝子同定のため、対応する正常遺伝子のうち 12 遺伝子を発現ベクターに組み込み、ソリトン株に発現した。その結果、1 つのものについてソリトン形質に影響があることが判明した。その遺伝子が発現されるとソリトン波の形成能が減少することが分かり、その遺伝子はソリトン波の形成能に関連することが示唆された。また野生株において当該遺伝子の破壊を行ったところ、その形質は発生段階において細胞性粘菌多細胞体のオーガナイズングセンターであるチップの形成が多数でき、移動体期を経ないでそのまま子実体形成を行ってしまうという表現型であった。その遺伝子の分子レベルでの機能解析はこれまで報告がなされていない新規遺伝子であり、現在分子生物学的手法により遺伝子機能の解析を行った。その結果、今後は、その関連の分子的レベルでも関連性を解析する予定であり、遺伝子産物の動態について蛍光タンパク質タグによる細胞内局在の解析等を行う予定である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

桑山秀一

ソリトン波様細胞集団運動における接着分

子の役割 (口頭発表)

第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会年会大会、合同大会  
神戸ポートアイランド、(兵庫県神戸市)  
2015 年 12 月 1-4 日

潘愷、桑山秀一

細胞性粘菌の形態形成における走化性運動の役割についての解析  
第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会年会大会、合同大会  
神戸ポートアイランド、(兵庫県神戸市)  
2015 年 12 月 1-4 日

潘愷、桑山秀一

細胞性粘菌の形態形成における走化性運動の役割についての解析  
第 5 回日本細胞性粘菌学会例会  
弘前大学、(青森県弘前市)  
2015 年 10 月 10 日-10 月 11 日

桑山秀一

走化性不能株を用いた細胞性粘菌の形態形成における細胞接着性の重要性  
第 67 回日本細胞生物学会大会、  
タワーホール船堀、(東京都江戸川区)  
2015 年 6 月 30 日-7 月 2 日

潘愷、桑山秀一

細胞性粘菌の形態形成において走化性運動の必要性についての解析  
第 67 回日本細胞生物学会大会、  
タワーホール船堀、(東京都江戸川区)  
2015 年 6 月 30 日-7 月 2 日

桑山秀一

ソリトン波様細胞集団運動における接着分子の役割  
第 4 回日本細胞性粘菌学会例会  
東北大学、(宮城県仙台市)  
2014 年 10 月 11-12 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~hidekuwayama/>

6．研究組織  
(1)研究代表者  
桑山 秀一 (KUWAYAMA Hidekazu)  
筑波大学・生命環境系・准教授  
研究者番号：40397659