

令和元年5月14日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18587

研究課題名(和文) 減数分裂の成り立ちと本質の理解～ミジンコの単為発生卵の形成機構解析から迫る～

研究課題名(英文) Understanding the origin and nature of meiosis - approaching from analysis of parthenogenetic oogenesis in *Daphnia pulex*

研究代表者

蛭田 千鶴江 (Hiruta, Chizue)

北海道大学・理学研究院・研究院研究員

研究者番号：20723018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ミジンコの単為発生卵形成でみられる「減数しない減数分裂」の過程が減数分裂をどのように改変させたものなのかを明らかにすることを目的に、ゲノム編集基盤を確立して、染色体の動態とその分子機構を解析する、分裂を人為的に制御するという2つのアプローチから研究を行った。その結果、CRISPR/Cas9による標的遺伝子のノックアウト法を確立することができた。さらに、TALENおよびCRISPR/Cas9を用いたノックイン法の確立を進めている。また、分裂にはMos-MAPK経路の関与が示唆されたことから、阻害剤を用いた解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単為生殖は、卵が受精することなく単独で発生して個体が生じる現象である。単為生殖は卵を形成する分裂である「減数分裂」を変化させて実現されているため、単為生殖の機構の解明は減数分裂の機構の理解につながる。本研究では、ミジンコを用いて単為生殖の機構を明らかにすることを旨とし、ゲノム編集法のひとつであるCRISPR/Cas9による標的遺伝子の破壊法を確立した。これにより、単為生殖に関わる遺伝子の機能を解析することが可能になったので、今後の研究進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to reveal the molecular mechanism of the parthenogenetic oogenesis in the water flea *Daphnia pulex*, the establishment of genome editing technique is needed. In this study, I conducted microinjection of CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes (Cas9 RNPs) into early embryos and examined the possibility of using CRISPR/Cas9 to edit the genome. As a result, I have succeeded the development of targeted gene disruption (knock-out) by using Cas9 RNPs in *D. pulex*. Moreover, I advance the research in the development of knock-in system by using both TALEN and CRISPR/Cas9.

研究分野：生殖発生生物学

キーワード：ミジンコ 単為生殖 減数分裂 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

単為生殖は、卵が受精することなく単独で発生して新個体が生じる現象であり、卵を介することから卵形成に必須である減数分裂を変化させて獲得した機構である。単為生殖は、有胎盤哺乳類を除く様々な分類群においてそれぞれ独立に獲得されており、その機構は多様である。例えば、減数分裂の第1または第2分裂を部分的に欠く機構などが報告される (Suomalainen et al., 1987; Schon et al., 2009)。研究代表者は、多様な単為発生機構を研究することで減数分裂の成立過程と本質に迫ることを目指している。

今回研究対象とするミジンコは、環境の変化にตอบสนองして単為生殖と有性生殖を切り換えることで繁栄している小型水生甲殻類である。実験動物としては、繁殖周期が短く、実験室内での大量飼育が容易で、発生段階を揃えた卵の採取が可能であり、甲殻類で初めて全ゲノムが解読される (Colbourne et al., 2011) など多くの利点を有している。しかし、遺伝子の機能を解析する手法の開発は、RNA 干渉法 (Hiruta et al., 2013) と TALEN によるノックアウト法 (Hiruta et al., 2014) に留まっていた。

ミジンコは、有性/単為生殖のいずれの生殖様式でも2倍体の個体を生み出す。研究代表者は、単為発生卵の分裂過程を経時的に追跡し、第1減数分裂に相当する分裂を途中でスキップし、第2減数分裂に相当する分裂のみが起こる「減数しない減数分裂」を行うことを発見した (Hiruta et al., 2010)。しかし、その詳細な染色体の動態と分子機構は明らかではない。

2. 研究の目的

ミジンコの単為発生卵形成でみられる「減数しない減数分裂」の過程が減数分裂をどのように改変させたものなのかを明らかにする事を目的に、次の2点からアプローチを行った。

- (1) ゲノム編集基盤の確立とそれをを用いた分子機構の解析
ゲノム編集法を確立することによって、分裂装置を構成するタンパク質にEGFPを挿入したレポーターミジンコを作出し、分裂装置の動態を詳細に解析すること、分裂時の染色体構築や分離/分配に関わる因子の機能を解析することを目指した。
- (2) 阻害剤等による分裂の制御
卵形成時の分裂を人為的に制御することを目指して、脊椎および無脊椎動物においてその関与が報告されている Mos-MAPK 経路に着目し、阻害剤等を用いて分裂の進行や停止の制御を試みた。

3. 研究の方法

- (1) CRISPR/Cas9 による標的遺伝子の破壊 (ノックアウト) 法の確立
研究代表者は、すでに TALEN によるノックアウト法を確立していたが (Hiruta et al., 2014)、TALEN と CRISPR/Cas9 では利用できる派生技術が異なるため、CRISPR/Cas9 によるノックアウト法の確立にも取り組んだ。CRISPR/Cas9 の標的遺伝子として、*Distal-less (Dll)* を選定した。この遺伝子はホメオボックスをもつ転写因子であり、節足動物では付属肢の遠位部形成に関与することが分かっている。RNAi 法を確立する際に、すでにミジンコにおいて発現部位や表現型の解析を行っており、さらに TALEN によるノックアウト法の確立においても使用した。したがって、それらのデータと比較することで、CRISPR/Cas9 のシステムがミジンコにおいて機能しているかを検証することができる。*Dll* 遺伝子を標的とする CRISPR の mRNA を合成し、Cas9 タンパク質とともにマイクロインジェクションによって、産卵直後の胚に導入した。その後、発生した胚の *Dll* 遺伝子の塩基配列と表現型解析を行った。さらに導入した変異が次世代にも受け継がれるかどうか検証した。
- (2) 外来遺伝子の付加 (ノックイン) 法の確立
ノックイン法として、細胞周期に依存せず、相同組換えを必要としないマイクロホモロジー媒介末端結合を利用した TAL-PITCh 法 (Nakade et al., 2014; Sakuma et al., 2015) を用いることにした。レポーター遺伝子として蛍光タンパク質 (EGFP) を標的遺伝子の開始コドン直後または終止コドン直前に連結し、発現をモニターできるように TALEN およびドナーベクターを設計した。標的遺伝子には、ノックアウトで利用した *Dll* 遺伝子と、ヒートショックタンパク質 (HSP) 遺伝子を選定した。HSP 遺伝子は、時期あるいは組織特異的な遺伝子操作を行うために、ミジンコにおいてヒートショック応答が利用できるか確かめるために選定した。TALEN の mRNA を合成し、ドナーベクターまたはドナー PCR 産物と共にマイクロインジェクションによって、産卵直後の胚に導入した。その後、発生した胚において EGFP の発現と PCR による変異導入の確認を行った。
- (3) Mos-MAPK 経路に着目した分裂の制御
無脊椎動物から脊椎動物に至る様々な種で、未受精卵の分裂停止に Mos-MAPK 経路の関与が知られるが (Kishimoto 2003)、単為発生するミジンコ卵の第1減数分裂においてもその経路に関わるタンパク質の活性化をウェスタンブロット法によって確認している (未発表)。そこで、単為発生卵形成の各分裂過程において、リン酸化 MAPK 抗体を用いた免疫

染色により MAPK の活性化状態を解析した。さらに MEK 阻害剤の U0126 処理により、Mos-MAPK 経路の不活性化を試みた。

4. 研究成果

- (1) CRISPR/Cas9 の動物初期胚への導入方法には主に次の 3 種類がある。ベクター：Cas9 と一本鎖ガイド RNA (sgRNA) 組み込んだプラスミド DNA、RNA：Cas9 mRNA と in vitro 転写した sgRNA、RNP (リボ核タンパク質複合体)：Cas9 タンパク質と in vitro 転写した sgRNA の複合体。それぞれの手法に特徴があるが、Cas9RNP は細胞内で転写および翻訳を介さないため、初期胚へ導入されると直ちに機能すると考えられる。さらに、Cas9RNP はベクターや RNA よりオフターゲット変異が少ないことが報告されている (Kim et al., 2014; Liang et al., 2015)。そこで本研究では、を採用し、in vitro において Cas9 タンパク質と合成した sgRNA を混合し、Cas9RNPs の状態で初期胚に導入した。その結果、Cas9RNPs 導入個体では、*Dll* の RNAi および TALEN ノックアウト表現型と同様に第 2 触角を含む付属肢の遠位部の形成が阻害された表現型が得られた (図 1)。続いて、*Dll* 遺伝子の塩基配列を確認したところ、数～十数塩基の欠失または挿入が認められ、さらにその変異が次世代に受け継がれることも確認できた。このことから、ミジンコにおいて Cas9RNPs を初期胚に導入することで、標的遺伝子を破壊してその機能を解析することが可能になった (業績)

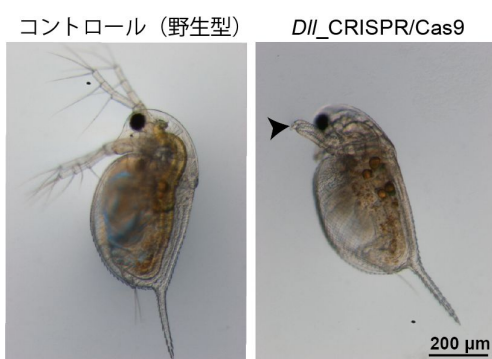


図 1 *Dll* 遺伝子のノックアウトにより、第 2 触角の先端部が欠失した (矢頭)。左：何も導入していないコントロール個体。右：*Dll* 遺伝子を標的とする Cas9RNPs を導入した個体。

- (2) ノックイン法の確立
レポーター遺伝子として EGFP を用い、*Dll* 遺伝子の開始コドン直後と *Hsp* 遺伝子の終止コドン直前にノックイン出来るように TALEN を設計した。TAL-PITCh のインジェクションの結果、発生個体では EGFP の発現は確認されず、発生が停止した卵のうちいくつかで EGFP の発現が確認された。これはドナーベクター単独で導入した場合にも確認されたことから、ドナーベクター内の SV40 プロモーターが機能してしまったことによるものと考えられた。そこで、ドナーベクター内の SV40 プロモーターを含む不要な配列の除去を行った。さらに EGFP にマイクロホモロジーを付加した直鎖 PCR 産物もドナーとして用いて再度実験を行った。その結果、発生した個体において EGFP の発現は確認されず、3' junction と 5' junction の PCR でも変異導入は確認できなかった。しかし、TAL-PITCh がミジンコにおいて機能するかどうかを判断するには、次の理由からも時期尚早だと考えられた。それは、所属機関変更によって実体顕微鏡などの機器が変更になったことや、北海道胆振東部地震の停電により試薬が使用に不適切な状態になるなど度重なるアクシデントに見舞われ、インジェクションの成功率自体も不安定であった。そこで、コンストラクトの作成から再実験を行うことにし、現在、TAL-PITCh 法がミジンコにおいて機能しているか検証中である。また、並行して別のノックイン法も検討中である。
- (3) 単為発生卵形成では、第 1 減数分裂で分裂が停止し、第 2 減数分裂に相当する分裂のみが起こり、2 倍体卵となることが分かっている。まず、リン酸化 MAPK 抗体による卵の免疫染色を行ったところ、第 1 減数分裂に相当する時期でシグナルが検出され、前後の時期にあたる卵核胞崩壊期と第 2 減数分裂に相当する時期ではシグナルは検出されなかった。これはウェスタンブロット法の結果とも一致しており、MAPK の活性化により分裂停止が引き起こされ、不活性化により細胞周期が再開する機構の関与を示唆するものである。続いて MEK 阻害剤の U0126 処理を行い、Mos-MAPK 経路を不活性化できるか検証したところ、不活性化が認められたが安定的な結果が得られておらず、薬剤処理のタイミングや濃度などの条件の検討を進めている。

本研究では、所属機関変更に伴う実験の一時的な停止や北海道胆振東部地震の停電による実験試薬の喪失によって、計画通りに実験を進めることができなかった。したがって、単為発生卵形成の分子機構については、今後の課題として引き続き研究に取り組んでいく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件；査読有)

Chizue Hiruta, Keiichi Kakui, Knut E. Tollefsen, Taisen Iguchi (2018) Targeted gene disruption by use of CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes in the water flea *Daphnia pulex*. *Genes to Cells* 23(6) 494-502 DOI: 10.1111/gtc.12589

〔学会発表〕(計2件)

蛭田千鶴江, 角井敬知, 井口泰泉, ミジンコのゲノム編集基盤の確立へ向けた現状と課題, 日本動物学会第89回大会, 札幌コンベンションセンター, 2018年9月13日

蛭田千鶴江, 佐久間哲史, 荻野由紀子, 山本卓, 井口泰泉, TAL-PITCh法を用いたノックイン法の確立へ向けて[Approach to establishing a knock-in system by using TAL-PITCh in the water flea *Daphnia pulex*]日本ゲノム編集学会第1回大会, 広島国際会議場, 2016年9月6日

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/chizuehiruta/>

6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。