

令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06778

研究課題名(和文) ミジンコの単為発生を可能にする卵形成機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of parthenogenetic oogenesis in the water flea *Daphnia pulex*

研究代表者

蛭田 千鶴江 (Hiruta, Chizue)

北海道大学・理学研究院・特別研究員 (RPD)

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機構は、第1減数分裂が途中で停止しスキップされる「減数しない減数分裂」という様式であることが組織学的研究から分かっているが、詳細な染色体の動態と分子機構は未だ明らかになっていない。そこで、本研究ではミジンコの単為発生卵の形成過程を分子機構レベルで明らかにすることを目的とし、(1)ゲノム編集基盤の整備を完了すること、(2)第1減数分裂の染色体動態に着目することで減数分裂との違いを見出すこと、そして(3)その分裂を制御する機構を明らかにすることに取り組んでいる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ミジンコを材料に、受精することなく卵が単独で発生する単為生殖という生殖様式の詳細を明らかにしようとするものである。本研究では、生殖細胞を形成する機構である減数分裂がどのように改変されることによって単為発生が可能になるのかを検証中であり、最終的には動物界でみられる単為生殖の獲得と進化に関する理解を深めることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The water flea *Daphnia pulex* adopt parthenogenesis and sexual reproduction differentially in response to various environmental cues, resulting in the production of diploid offspring in both reproductive modes. Histological analysis revealed that the parthenogenetic *D. pulex* adopt "abortive meiosis", which skips a part of the first meiosis. However, little is known about its molecular mechanism. In this study, I advance the research in the establishment of genome editing system, and the elucidation of molecular mechanism of parthenogenetic oogenesis.

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 生殖細胞形成 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

単為発生は、卵が受精することなく単独で発生を開始する現象であり、生殖細胞を形成するための減数分裂の機構を獲得した生物において生じうる現象である。これまでに、有胎盤哺乳類を除く様々な分類群でそれぞれ独立に進化してきたことが分かっている。その機構には様々な種類が知られるが、第1または第2減数分裂を部分的に欠く機構などが報告されている (Schon et al., 2009)。

今回研究対象とするミジンコは、環境の変化に応答して単為生殖と有性生殖を切り換えることが知られている。通常はメスだけで増える単為生殖で増殖するが、短日、高密度や餌不足といった変化を感知するとオスを産み、有性生殖を行う。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、単為生殖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。ミジンコの単為発生機構についての研究は、動物界にみられる様々な単為発生機構の獲得と進化の理解に貢献することが期待される。

2. 研究の目的

ミジンコの単為発生卵が減数分裂をどのように改変させることでつくられるのかを分子機構レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究で取り組む課題は、ミジンコの単為発生卵の形成過程を分子機構レベルで解明することである。具体的には、(1)ゲノム編集基盤を確立すること、(2)第1減数分裂の染色体動態に着目することで減数分裂との違いを見出すこと、そして(3)その分裂を制御する機構を明らかにすることを目指す。

(1)ノックイン法確立による標的因子の可視化と時期/組織特異的な遺伝子発現制御:本研究でノックイン法を確立することによりゲノム編集基盤の整備を完了し、遺伝子の機能解析を進める。以上の実験によりノックインが可能となり次第、時期および組織特異的な発現遺伝子の操作の実現へ向けた実験へ移行する。飼育温度の上昇および IR-LEGO による特定細胞の加熱により遺伝子発現を操作できるか検証する。

(2)(1)で整備したゲノム編集技術を用いた単為発生卵の分裂様式の解析:(2)-1分裂過程の可視化:染色体の正確な分離・分配には紡錘糸が正しく動原体に接続し両極に引っ張られる必要がある。さらに不等分裂には分裂装置の位置が重要である。二価/一価染色体の維持に関わるコヒーシンや動原体タンパク質、分裂装置の位置を制御すると考えられるアクチンの局在などを蛍光標識して追跡し、染色体の挙動を詳細に解析して減数分裂との違いを解明する。(2)-2分裂を制御する因子の解析:真核生物に共通の減数分裂特異的遺伝子が、単為生殖の時にも発現することが報告されているので、コヒーシン Rec8、トポイソメラーゼ様酵素 Spo11、還元分裂特異的な動原体タンパク質 Moa1 などに着目し、機能解析を行う。並行してリアルタイム PCR を用いた発現解析も行う。

(3)「減数しない減数分裂」から「減数分裂」へ的人為的な誘導: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、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確認している。そこで、Mos-MAPK 経路の阻害および活性化を行うことで、人為的に減数しない減数分裂の停止や進行を制御し、その機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1)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 PITCH システム (Nakade et al., 2014; TAL-PITCH 法および CRIS-PITCH 法) を試した。TALEN と CRISPR/Cas9 では、利用できる派生技術が異なるため両方のノックインが可能になることが理想的であるので、並行して実験を行った。標的遺伝子はノックアウト法で実績のある *Distal-less* 遺伝子と後続の実験で使用予定の *Heat-shock protein* 遺伝子とし、蛍光タンパク質である EGFP を開始コドン直後または終始コドン直前に挿入して、成否を蛍光で判定できるようにした。まず、TAL-PITCH 法については、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。その結果、ドナーベクターにおいても、EGFP にマイクロホモロジーを付加した直鎖 PCR 産物のいずれにおいても 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

った。次に CRIS-PITCh 法については、CRISPR sgRNA を合成し、Cas9 タンパク質と混合して Cas9RNPs (リボ核タンパク質複合体) の状態でドナーベクターと共に初期胚に導入したが、こちらも残念ながら変異導入は確認できなかった。ゲノム編集法には数多くの手法が開発されており、生物種によって利用可能な方法に違いがみられることは珍しいことではない。実際、ミジンコのノックアウト法確立の際には、当時主流であった Golden TALEN を用いた方法では変異導入が認められなかったが、新法の Platinum TALEN を用いたところノックアウトに成功した(Hiruta et al. 2014)。従って、PITCh システムによるノックイン法についてはミジンコで機能しない可能性もあるため、引き続き導入濃度や挿入部位両端の相同配列などの条件検討を行いつつも別のノックインシステムを利用してさらに実験を進めているところである。

(2)(1)でのノックイン法の確立に時間を要しているため、ノックアウト法による機能解析から実験を進めている。また、リアルタイム PCR を用いた発現解析を行うために必要な卵の経時的なサンプリングを進めている。

(3) 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した結果が得られていないため、処理濃度と時間を検討中である。

本研究では全期間を通じて、新型コロナウイルス感染症流行による研究室の利用制限と育児休業による実験の中断により、継続的な実験に困難があった。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。当初の計画変更にもない、ミジンコの単為発生機構と比較を行うために真核生物の単為発生機構についての知見の収集と整理を進めた。特に甲殻類については文献調査を通して見落とされていた記載を探し出すことや、飼育観察による単為生殖種である可能性のある種を見出すことができたので、系統関係と単為発生機構の獲得および多様性についての考察を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------