

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：63904

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20641

研究課題名（和文）ゾウリムシの自殖を制御する分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanisms regulating self-fertilization in Paramecium

研究代表者

川口 隆之（Kawaguchi, Takayuki）

基礎生物学研究所・クロマチン制御研究部門・助教

研究者番号：40947727

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：単細胞真核生物のゾウリムシ(*Paramecium tetraurelia*)は、異なる性の個体が接合する一般的な有性生殖に加えて、単一細胞内で有性生殖を完結させるオートガミーと呼ばれる特殊な生殖様式を有する。しかし、オートガミーを制御する分子機構の理解は乏しい。研究代表者は予備的な実験から、DNAのアデニンメチル化(6mA)がオートガミーの開始に必要なことを見出した。本研究では、DNAアデニンのメチル化酵素(MET)のノックダウン細胞で、野生型と比較して遺伝子発現が上昇していない遺伝子に対してRNAiによる遺伝子ノックダウンを行い、オートガミーの開始に重要な因子の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
生物の多様な生殖様式は種の維持だけでなく進化にも寄与してきた。したがって、多様な生殖様式の獲得機構やその分子基盤を明らかにすることは、生物学において極めて重要な研究課題の一つである。本研究成果は、長年不明であったオートガミーの開始機構を明らかにすることに成功しただけでなく、真核生物における減数分裂の開始を制御する普遍的な分子機構を理解する上で重要な発見である。

研究成果の概要（英文）：The unicellular eukaryote *Paramecium tetraurelia* produces progeny by self-fertilization (autogamy) in unpaired single cell, in addition to by sexual reproduction in paired cells. However, the molecular mechanisms regulating autogamy are poorly understood. In our preliminary experiment, we found that DNA adenine methylation (6mA) is required for the process of autogamy. In this study, we found genes that are regulated by 6mA, and these genes play important roles in the initiation of autogamy in *Paramecium*.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゾウリムシ DNAメチル化 オートガミー

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物の多様な生殖様式は種の維持だけでなく進化にも寄与してきた。したがって、多様な生殖様式の獲得機構やその分子基盤を明らかにすることは、生物学において極めて重要な研究課題の一つである。単細胞真核生物のゾウリムシ(*Paramecium tetraurelia*)は、異なる性の個体が接合する一般的な有性生殖に加えて、単一細胞内で有性生殖を完結させるオートガミーと呼ばれる特殊な生殖様式を有する。しかし、このオートガミーを制御する分子機構の理解は乏しい。申請者は予備的な実験から、DNAのアデニンメチル化修飾(6mA)が、オートガミーの開始に必要なことを見出した。しかし、6mAがどのようにオートガミーの開始を制御しているのかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、オートガミーという究極的な生殖戦略を持つゾウリムシに着目し、6mAによって制御される遺伝子を同定し、詳細に解析することで、オートガミーを制御する分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では以下の研究課題に取り組むことにより、オートガミー開始の分子機構の解明を目指した。

【研究課題1】オートガミーの開始に重要な遺伝子の同定

研究代表者は、オートガミーが起らないDNAアデニンのメチル化酵素(MET)のノックダウン細胞のトランスクリプトーム解析により、野生型細胞でオートガミー過程の初期に発現している遺伝子の内で約20の遺伝子の発現が上昇してないことを見出していた(研究代表者ら未発表)。本研究では、それらの遺伝子についてそれぞれRNAiを用いたノックダウンを試み、MET存在下で、オートガミーの開始が阻害されるかを検討した。

【研究課題2】6mAが制御するオートガミーの制御機構の解析

2-1) METによる遺伝子発現制御の解析:上記研究課題1で同定した遺伝子の6mAによる発現制御機構を明らかにするために、野生型及びMETのノックダウン細胞を用いて、それらの遺伝子領域における6mAの蓄積量の比較解析を行った。具体的には、野生型とMETのノックダウン細胞からゲノムDNAを抽出し、6mA依存的制限酵素で処理したのちに研究課題1で同定した遺伝子領域をPCRで増幅し、それぞれの6mAの蓄積量の変化の解析を行った。

2-2) 6mA結合タンパク質の解析:DNAシトシンメチル化修飾は、特異的な結合タンパク質によって認識され、様々なクロマチン制御因子や転写因子をリクルートすることが知られている。一方、6mAも同様に結合タンパク質を介した役割が示唆されているが、その分子的な実態は不明である(Wu, *Cancer Lett.* 2020)。そこで本課題では、6mA結合タンパク質の同定を試みるとともにその詳細な解析を行う。研究代表者はこれまでに、6mAを含むDNAプローブを用いたメチル化DNAプルダウン法と質量分析法を組み合わせて、ゾウリムシの細胞抽出液から6mA結合タンパク質を探索する方法を確立し、現在までに10種以上の候補タンパク質を見出している(研究代表者ら未発表)。本課題では、まずそれらの候補因子についての詳細なRNAiを用いた遺伝子ノックダウン解析を行った。

4. 研究成果

【研究課題1】オートガミーの開始に重要な遺伝子の同定

本研究課題では、METのノックダウン細胞のトランスクリプトーム解析により同定していた候補因子についてRNAiを用いたノックダウンを行い、オートガミーが阻害される因子の同定を試みた。その結果、ホメオドメインを含むタンパク質をコードする遺伝子をRNAiによってノックダウンするとオートガミーの開始が阻害されることを発見した。さらに、同定したホメオドメインを含むタンパク質が、異なる性の個体が接合する一般的な有性生殖の開始にも重要であるかをRNAiによってノックダウンした細胞で解析した。その結果、この因子は有性生殖の開始には必要でないことを見出した。興味深いことに、この因子はオートガミーの生殖様式を有していない近縁種では保存されていないことがわかった。

さらに、他の候補因子に対して同様に解析を遂行したところ、オートガミーの初期過程で高発現しているジंकフィンガードメインを含むタンパク質やリン酸化酵素をコードする遺伝子をそれぞれRNAiによってノックダウンすると、オートガミーの開始が阻害されることを見出した。近年、様々な生物種で減数分裂期に特異的に発現するジंकフィンガードメインを含むタンパク質やリン酸化酵素が減数分裂期の開始を制御するという報告がされている。したがって、本研究成果から真核生物における普遍的な減数分裂の開始機構がゾウリムシにも保存されていることが示唆された。

【研究課題 2】 6mA が制御するオートガミーの制御機構の解析

2-1) MET による遺伝子発現制御の解析: 上記研究課題 1 で同定したホメオドメインタンパク質の 6mA による遺伝子発現の制御機構を明らかにするために、野生型及び MET のノックダウン細胞からゲノム DNA を抽出し、その遺伝子領域における 6mA の蓄積量の比較解析を行った。その結果、MET のノックダウン細胞において、ホメオドメインタンパク質の遺伝子領域における 6mA の蓄積量が減少していることを見出した。上記の成果より、6mA はオートガミーの開始に必要な因子の遺伝子発現の制御機構に関与していることが示唆された。

2-2) 6mA 結合タンパク質の解析: 6mA 結合タンパク質の候補因子について RNAi 法による遺伝子ノックダウン解析を行った。しかし、MET のノックダウン細胞と同様の表現型を示す因子の同定には至らなかった。したがって、ゾウリムシの細胞から核を抽出する方法及び 6mA を含む DNA プローブを用いたメチル化 DNA プルダウン法の再検討が必要であることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川口 隆之、Alexis HARDAY、Amandine TOUZEAU、Sandra DUHARCOURT、中山 潤一
2. 発表標題 DNAアデニンメチル化修飾はゾウリムシの有性生殖の開始に重要な役割を果たす
3. 学会等名 第40回染色体ワークショップ・第21回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川口 隆之、中山 潤一、Sandra Duharcourt
2. 発表標題 ゾウリムシの自家生殖の開始にDNAアデニンメチル化修飾は重要な役割を果たす
3. 学会等名 第16回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川口 隆之、Sandra Duharcourt、中山 潤一
2. 発表標題 ゾウリムシの自家生殖の開始にDNAアデニンメチル化修飾は重要な役割を果たす
3. 学会等名 第56回日本原生生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川口 隆之
2. 発表標題 DNA adenine methylation is required for self-fertilization in Paramecium tetraurelia
3. 学会等名 BCC11
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------