

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19298

研究課題名（和文）エネルギー分配の分子メカニズムの解明—淡水の1次消費者ミジンコをモデルとして—

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanisms underlying energy allocation using the freshwater zooplankton *Daphnia magna*

研究代表者

加藤 泰彦（Kato, Yasuhiko）

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：60415932

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：限られたエネルギーを各生命活動へと配分するメカニズムを明らかにするために、環境応答研究のモデルであるミジンコを用いて研究代表者らが以前に見出していたエネルギー分配を司るDNMT3.1遺伝子の解析を行なった。DNMT3.1遺伝子へのノックインの過程で胚性致死が生じるという予想外の結果を得たが、新規のDNMT3.1遺伝子機能喪失変異体を作成すると共に新たなエネルギー分配制御因子を同定し、エネルギー分配の分子メカニズムの基盤を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物において、限られたエネルギーをいかに身体の維持、成長、繁殖などの各生物活動に配分するかは、個体群動態、個体における進化や適応、そして老化や疾患等の理解まで生命システムの幅広い階層における現象を理解する上で根源的な問題であるが、そのメカニズムはほとんど解明されていない。こうした中でミジンコにおけるエネルギー分配のメカニズムの基盤を遺伝子レベルで明らかにした本研究は、個体・個体群レベルでの進化や適応の原理のみならずエネルギー分配機構の生物間の共通性や多様性の理解に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：To understand mechanisms underlying energy allocation in organisms, we used the freshwater zooplankton *Daphnia magna* which has been used as a model for studying environmental responses. First, we attempted to introduce a reporter gene into the DNMT3.1 gene that controls energy allocation under starved conditions in *Daphnia magna*. Unexpectedly, attempts to introduce a reporter gene into the DNMT3.1 gene resulted in embryonic lethality. We established a novel DNMT3.1 null mutant and identified another gene responsible for energy allocation. These results contribute to understanding the molecular basis of energy allocation.

研究分野：環境分子生物学

キーワード：エネルギー分配 DNMT3 ミジンコ

### 1. 研究開始当初の背景

生物において、限られたエネルギーをいかに身体の維持、成長、繁殖などの各生物活動に配分するかは、生態系における個体群動態、生物個体における進化や適応、そして老化や疾患等におけるエネルギー利用の変化の理解まで生命システムの幅広い階層における現象を理解する上で根源的な問題である。限られたエネルギーが個体内でどのように分配されるかを明らかにするために様々な理論モデルが構築され、個体レベルでは老化のプロセス、生態レベルでは個体群動態の予測などに利用されてきた。

申請者は、環境応答のモデルとして用いられてきたオオミジンコの遺伝子機能解析法の開発を行い、これを用いて環境応答の分子メカニズムを個体レベルで解析してきた。その過程で、飢餓時に哺乳類の de novo DNA メチル化酵素 3 (DNMT3) のホモログ DNMT3.1 遺伝子がカロリー制限によって活性化することを見出した (図 1、左; 文献①)。DNMT3.1 遺伝子をノックアウトすると DNMT3.1 変異体はカロリー制限によってトランスクリプトームが野生型と比べて大きく変わることも明らかにした (図 1、右; 文献②)。

さらに変異によって飢餓時における生殖と成長に対するエネルギー分配が変化すること、寿命が短くなることも見出し、稀少な細胞で発現する DNMT3.1 がエネルギー配分のマスター因子であることが判明した。我々のこの発見は、DNMT3.1 発現細胞がエネルギー分配の中核細胞であることを強く示唆するものである。

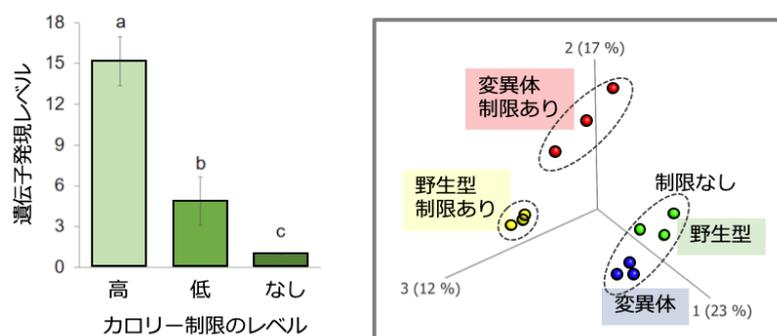


図 1

カロリー制限に応答した DNMT3.1 遺伝子の活性化 (左図) と DNMT3.1 変異体と野生型のトランスクリプトームの主成分分析 (右図)

### 2. 研究の目的

本研究では、オオミジンコの DNMT3.1 発現細胞をゲノム編集技術で蛍光標識して単離し、飢餓ストレスをモデルとしてストレス時の DNMT3.1 発現細胞におけるトランスクリプトーム解析、DNA メチル化解析により、飢餓ストレスによりエネルギー分配が変わる時に起こる遺伝子ネットワークを明らかにする。そして、飢餓以外のストレスに対する DNMT3.1 による遺伝子ネットワークの応答性を解析し、本遺伝子ネットワークがストレスに応答したエネルギー分配で普遍的に利用されるか検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) DNMT3.1 遺伝子を標的とする TALEN の構築と発現

まず、TALEN の標的配列を探索し 5 番目のイントロン内の配列に決定した。Cornell University の Web ツール「TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0」によって、標的配列の候補を検索した。決定した標的配列を認識する TALEN 発現プラスミドを、Golden gate TALEN 2.0 Kit (Addgene, Massachusetts, USA) と RCIscrip-Goldy TALEN plasmid (Addgene, Massachusetts, USA) を使用して、Addgene が推奨する Golden Gate TALEN Assembly protocol に従って構築した。続いて、Back bone plasmid である RCIscrip-Goldy TALEN plasmid (Addgene, Massachusetts, USA) に含まれる FokI に変異の導入を行った。TALEN-Left、-Right の FokI が同じアミノ酸配列をもつ Homodimeric TALEN ペアはオオミジンコにとって致死であるため、TALEN-right で FokI ドメインの E・H・I のアミノ酸をそれぞれ K・K・R に置換し、TALEN left で Q・N・I のアミノ酸を E・D・L に置換した。TALEN-left と-right で FokI のアミノ酸配列が異なる Heterodimeric TALEN ペアはミジンコ胚を生存させることがこれまでの研究から明らかとなっている。また、生殖細胞で特異的に発現するオオミジンコの vasa 遺伝子の非翻訳領域を TALEN の ORF (open reading frame) の両端に導入した。構築した DNA を鋳型として TALEN-left と-right mRNA を in vitro で合成した後、排卵直後の卵に注入し胚内で TALEN タンパク質の発現を行った。

#### (2) DNMT3.1 遺伝子のヌル変異体の作出

ヌル変異体を作製するため、最も N 末端側に存在するドメインである PWWP ドメインのエキソン領域を標的として gRNA の設計を行なった。作出した gRNA と Cas9 タンパク質のマイクロインジェクションを行った。インジェクションした個体 (G0) を 96 wells plate で 4~5 日飼育したのち、飼育水で満たした 24 wells plate に移し、成長に合わせてクロレラを与えて飼育した。次世代以降の個体からゲノムを抽出し、抽出した DNA を鋳型として PCR を行い、標的配列を含む

領域のみ増幅させた。得られた PCR 産物の電気泳動を行い、インデル変異が挿入されていた断片は、クローニング後にシーケンス解析を行った。

### (3) 生活史形質を制御する因子の探索

他の生物種で生活史形質を制御している遺伝子のオーソログを複数選定し、(2)で記した方法と同様の方法でヌル変異体の作出を行った。得られた変異体と野生型の個体の幼体を用いて栄養豊富条件、飢餓条件で飼育を行い、成長速度、繁殖力、寿命を調べた。1匹毎に40 mlの飼育水が入ったチューブで飼育を行い、栄養豊富条件、飢餓条件ではそれぞれ1匹あたり $5.12 \times 10^7$ 細胞、 $6.40 \times 10^6$ 細胞のクロレラを与えた。飼育水は毎日交換した。

## 4. 研究成果

### (1) DNMT3.1 遺伝子座を標的とする TALEN による胚性致死の誘導

TALEN を用いて DNMT3.1 遺伝子のイントロンに蛍光タンパク質遺伝子をレポーター遺伝子として導入することを試みた。5番目のイントロンを標的とする TALEN-left mRNA、TALEN-right mRNA を注入し標的配列の切断を試みた。最初に、TALEN-left mRNA、TALEN-right mRNA を別々にインジェクションすると胚は生存したことから、それぞれの TALEN は胚に対して毒性を示さないことが明らかとなった。次に、両 mRNA をそれぞれ 50 ng/ $\mu$ l 以上の濃度で共注入したところ、胚性致死となった。そこで、25 ng/ $\mu$ l でインジェクションし生存した幼体でジェノタイピングを行ったが、変異は導入されていなかった。高濃度の TALEN mRNA のインジェクションでは、胚発生が開始後数時間以内に停止したことからジェノタイピングが困難であり標的配列が切断されたかどうかを確認することができず、胚性致死誘導の要因の特定に至らなかった。5番目のイントロン以外には TALEN の標的配列として適した特徴を有する配列を見出すことができなかったため、TALEN を用いた DNMT3.1 遺伝子座へのレポーター遺伝子の導入を見送り、当初の研究計画を見直すこととした。

### (2) DNMT3.1 遺伝子のヌル変異体の作出

以前に作出された DNMT3.1 変異体は C 末端側のメチル化ドメインの機能を欠失しているが、N 末端側の PWWP ドメインと ADD ドメインは壊れていない(文献②)。完全に DNMT3.1 遺伝子の機能を喪失した DNMT3.1 ヌル変異体を作成するために、CRISPR-Cas を用いて最も N 末端側に存在するドメインである PWWP ドメインのエキソン領域に変異を導入し、ヌル変異体を作成することに成功した。さらに、確立した変異体の表現型を栄養が十分にある条件下で調べた結果、成長速度、繁殖率は野生型と有意な差が無いことが判明した。今後、飢餓条件下における表現型の解析を行うことも可能であり、DNMT3.1 遺伝子の機能解析の基盤を整えることができた。

### (3) 生活史形質を制御する因子の探索

DNMT3.1 遺伝子が、他の生活史形質を制御する遺伝子とクロストークしている可能性を検証するために、昆虫等の他の生物種で生活史形質を制御していることが知られている遺伝子のオーソログを3つ選び、CRISPR-Cas を用いてそれぞれヌル変異体を作成することに成功した。栄養豊富条件、飢餓条件で変異体を飼育した結果、1つの遺伝子の変異体が飢餓条件下で寿命が短くなることが明らかとなった(図2)。さらに、成長速度、繁殖力も栄養豊富条件、飢餓条件ともに野生型と異なることを見出した。これらのことから本遺伝子は DNMT3.1 遺伝子と協調、もしくは相互作用をして寿命、成長速度、繁殖力を制御していることを強く示唆している。今後、DNMT3.1 遺伝子のみならず今回機能を明らかにした遺伝子の発現を可視化し、発現細胞における遺伝子発現、メチル化状態を解析することで、エネルギー分配の分子メカニズムの理解が大きく進展すると期待される。

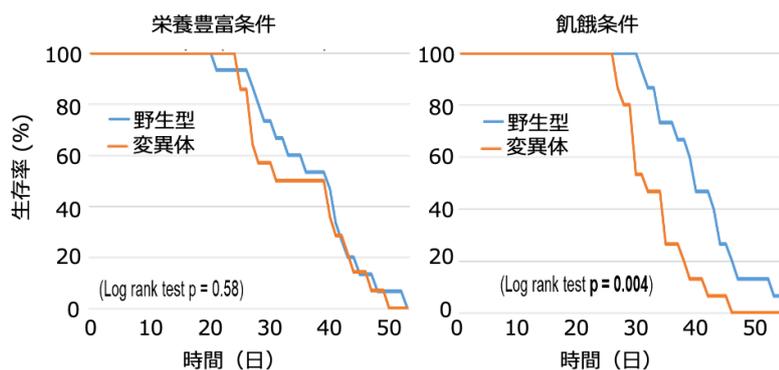


図2 栄養豊富条件(左図)と飢餓条件(右図)における野生型と変異体の寿命の比較

### <引用文献>

- ① Nguyen ND, Matsuura T, Kato Y, Watanabe H. Caloric restriction upregulates the expression of DNMT3.1, lacking the conserved catalytic domain, in *Daphnia magna*. *Genesis*. 2020 Dec;58(12):e23396.
- ② Nguyen ND, Matsuura T, Kato Y, Watanabe H. DNMT3.1 controls trade-offs between growth, reproduction, and life span under starved conditions in *Daphnia magna*. *Sci Rep*. 2021 Apr 1;11(1):7326.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kato Yasuhiko, Watanabe Hajime	4. 巻 10
2. 論文標題 Regulation of Doublesex1 Expression for Environmental Sex Determination in the Cladoceran Crustacean Daphnia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 881255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.881255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tirta Yusrifar Kharisma, Adachi Shungo, Perez Christelle Alexa Garcia, Adhitama Nikko, Nong Quang Dang, Natsume Toru, Kato Yasuhiko, Watanabe Hajime	4. 巻 17
2. 論文標題 CELFI1 represses Doublesex1 expression via its 5' UTR in the crustacean Daphnia magna	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0275526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0275526	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 加藤 泰彦	4. 巻 100
2. 論文標題 湖沼のヒロイン, ミジンコを分子の言葉で理解する	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 383 ~ 383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34565/seibutsukogaku.100.7_383	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kato Yasuhiko, Watanabe Hajime	4. 巻 -
2. 論文標題 The Mechanism for Establishing the Binary Sex with Environmental Signals in the Crustacean Daphnia magna	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Spectrum of Sex	6. 最初と最後の頁 203 ~ 219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-19-5359-0_12	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitamura Ayaka, Jiayue Chen, Suwa Tomoya, Kato Yasuhiko, Wada Tadashi, Watanabe Hajime	4. 巻 18
2. 論文標題 Neonatal administration of synthetic estrogen, diethylstilbestrol to mice up-regulates inflammatory Cxcl chemokines located in the 5qE1 region in the vaginal epithelium	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0280421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0280421	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Perez Christelle Alexa Garcia, Adachi Shungo, Nong Quang Dang, Adhitama Nikko, Matsuura Tomoaki, Natsume Toru, Wada Tadashi, Kato Yasuhiko, Watanabe Hajime	4. 巻 17
2. 論文標題 Sense-overlapping lncRNA as a decoy of translational repressor protein for dimorphic gene expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1009683	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nguyen Nhan Duc, Matsuura Tomoaki, Kato Yasuhiko, Watanabe Hajime	4. 巻 11
2. 論文標題 DNMT3.1 controls trade-offs between growth, reproduction, and life span under starved conditions in <i>Daphnia magna</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-86578-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Byeon Eunjin, Kim Min-Sub, Kim Duck-Hyun, Lee Yoseop, Jeong Haksoo, Lee Jin-Sol, Hong Sung-Ah, Park Jun Chul, Kang Hye-Min, Sayed Alaa El-Din H., Kato Yasuhiko, Bae Sangsu, Watanabe Hajime, Lee Young Hwan, Lee Jae-Seong	4. 巻 242
2. 論文標題 The freshwater water flea <i>Daphnia magna</i> NIES strain genome as a resource for CRISPR/Cas9 gene targeting: The glutathione S-transferase omega 2 gene	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aquatic Toxicology	6. 最初と最後の頁 106021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aquatox.2021.106021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fatimah Rizky Mutiara, Adhitama Nikko, Kato Yasuhiko, Watanabe Hajime	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of transgenic Daphnia magna for visualizing homology-directed repair of DNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-06526-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakai Hiroki, Isshiki Kinuka, Hattori Masato, Maehira Hiromasa, Yamaguchi Tatsumi, Masuda Keiko, Shimizu Yoshihiro, Watanabe Takayoshi, Hoshaka Takahiro, Shihoya Wataru, Nureki Osamu, Kato Yasuhiko, Watanabe Hajime, Matsuura Tomoaki	4. 巻 94
2. 論文標題 Cell-Free Synthesis of Human Endothelin Receptors and Its Application to Ribosome Display	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 3831 ~ 3839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.1c04714	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 加藤泰彦、渡邊肇
2. 発表標題 ゲノム編集ミジンコの作出と環境依存型性決定機構の解析への応用
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第7回大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤泰彦、渡邊肇
2. 発表標題 ノックイン技術で迫るミジンコにおける環境依存的な性決定の仕組み
3. 学会等名 日本動物学会 第93回早稲田大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤泰彦、渡邊肇
2. 発表標題 ミジンコの環境依存型性決定における doublesex1 遺伝子の発現制御
3. 学会等名 第8回生殖若手の会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田成樹、リー デイビッド、アディタマ ニッコ、加藤泰彦、渡邊肇
2. 発表標題 オオミジンコにおける有用タンパク質高発現ベクターの構築と利用
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原あや乃、アディタマ ニッコ、加藤泰彦、渡邊肇
2. 発表標題 オオミジンコにおけるCRISPR/dCas9を利用した遺伝子発現活性化システムの開発
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Lichi Hsieh, Nikko Adhitama, Yasuhiko Kato, Hajime Watanabe
2. 発表標題 Fluorescence live imaging of the apoptotic effects induced by a juvenile hormone analog, fenoxycarb, in the developing ovary of <i>Daphnia magna</i>
3. 学会等名 第 45 回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野啓太、アディタマ ニッコ、加藤泰彦、渡邊肇
2. 発表標題 甲殻類オオミジンコにおけるサーチェイン1遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第 45 回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuhiko Kato, Christelle Alexa G Perez, Hajime Watanabe
2. 発表標題 Analysis of the transactivation region of the 5' UTR overlapping lncRNA DAPALR in the crustacean <i>Daphnia magna</i>
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia (CSHA) RNA Biology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yusrifar K Tirta, Shungo Adachi, Christelle Alexa G Perez, Nikko Adhitama, Quang Dang Nong, Toru Natsume, Yasuhiko Kato, Hajime Watanabe
2. 発表標題 The RNA binding protein CELF1 represses the male determining gene Doublesex1 via its 5' UTR in the crustacean <i>Daphnia magna</i>
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia (CSHA) RNA Biology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tirta, Y. K., Adachi, S., Perez, C.A.G., Nong, Q.D., Natsume, T., Kato, Y., Watanabe, H.
2. 発表標題 Functional analysis of the lncRNA interacting protein CELF2 in regulating the sex-determining gene dsx1 in <i>Daphnia magna</i>
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Perez, C.A.G., Adachi, S., Nong, Q.D., Adhitama, N., Natsume, T., Wada, T., Kato, Y., Watanabe, H.
2. 発表標題 Sense-overlapping lncRNA as a decoy of translational repressor protein for dimorphic gene expression
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hsieh, L-C., 野田彩乃、Nikko Adhitama、加藤泰彦、渡邊肇
2. 発表標題 遺伝子編集ミジンコを用いた環境水中のホルモン様活性のバイオモニタリング
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021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
---------	---------