

令和元年6月5日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18480

研究課題名(和文)単細胞生物クラミドモナスのmiRNAによる生殖制御・環境適応制御の分子機構解明

研究課題名(英文)Uncovering a dynamic life of microRNA in the unicellular green alga
Chlamydomonas reinhardtii

研究代表者

山崎 朋人 (Yamasaki, Tomohito)

高知大学・教育研究部自然科学系理工学部門・助教

研究者番号：70512060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体内には遺伝子の発現を制御する仕組みが幾重にも存在し、その中にマイクロRNAと呼ばれる小さなRNAが関わるものがある。マイクロRNAは発生、分化などの生命現象の制御に深く関わり、がんなどにも関与している。こうしたマイクロRNAのはたらきは多細胞生物で良く調べられている一方、単細胞生物ではよく分かっていない。そこで私たちは単細胞緑藻クラミドモナスを使い、miRNAが機能しない突然変異体の単離や解析を行い、どの様にしてmiRNAが作られ、機能するのか、その分子メカニズムの一部を解明した。またこうして単離した変異体の表現型解析を行う事で、単細胞生物におけるmiRNAの役割の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロRNAは単細胞～多細胞生物の、広範囲の真核生物で見られる。しかしマイクロRNAの作られ方や役割は非常に多様である。これはそうした仕組みが動植物の共通祖先である単細胞真核生物で成立し、様々な生物への進化にあわせて進化してきたことを意味する。では、マイクロRNAの始原的な姿はどのようなものだったのか？そのヒントは単細胞生物にあるはずであるが、単細胞を使った研究は進んでいない。本研究はそうした謎の解明に寄与する学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotic organisms, there are several mechanisms that regulate gene expression, among which are microRNA (miRNA)-mediated system. miRNAs are deeply involved in the control of biological processes such as development and differentiation, and are also involved in cancer etc. While these miRNAs have been well studied in multicellular organisms, they are not well understood in unicellular organisms. Thus, we have isolated and analyzed several mutants which defective in miRNA-mediated gene regulation using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* to elucidate part of the molecular mechanisms of miRNA biogenesis and function. In addition, phenotypic analysis of the isolated mutants revealed some of the role of miRNAs in *Chlamydomonas*.

研究分野：遺伝子発現制御

キーワード：マイクロRNA クラミドモナス

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

1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA)は21-25塩基長の低分子RNAで、自身の配列と相補するmRNAに結合して発現を抑える。研究開始時には既にmiRNAは発生・分化、細胞増殖、アポトーシス、がん化など、特に多細胞生物で見られる多様な生命現象を制御することが分かってきていた。例えばmiRNAの働きに必須な遺伝子をロックアウトすると動物は胚性致死となり、陸上植物では重篤な発生異常が起こる。これは、真核生物の誕生直後に出現した始原miRNAシステムが、その後の進化の過程で、多細胞生物の生命活動を支える遺伝子発現制御システムへと役割を深化させてきたことを示唆していた。

一方、単細胞生物のmiRNAについては研究が進んでおらず、その具体的な役割はほとんど不明であった。未知である単細胞生物のmiRNA機能の解明は、真核生物にあるmiRNA機能の普遍性・多様性に関する研究や、新しい視座からのmiRNA研究への展開へとつながる重要な課題であった。

miRNAの存在が最初に確認された単細胞真核生物は緑藻クラミドモナスである。しかしmiRNAの機能が失われた変異株(miRNA変異株)が単離されてこなかったため、miRNAの具体的な機能や標的となる遺伝子は長らく研究されてこなかった。このような背景の中、我々は独自のスクリーニング系の確立、4万株のライブラリーの作成と選別を地道に行い、複数のmiRNA変異株を世界に先駆けて単離・解析し、本研究推進の基盤となる知見と成果を得ていた。

2. 研究の目的

miRNAは多細胞生物の発生・分化や増殖に必須な遺伝子発現制御因子であるが、単細胞生物における役割は不明である。申請者は単細胞緑藻クラミドモナスのmiRNA機能不全株を世界に先駆けて単離し、その表現型解析から、有性生殖の際に起こるオルガネラゲノムの片親遺伝や光合成においてmiRNAが極めて重要な役割をもつという傍証を得ていた。そこで本研究では、miRNAがどのようにして生合成され標的mRNAに働きかけるのか、また単細胞生物におけるmiRNAの多様な役割が解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

我々がもつクラミドモナスmiRNA変異体を中心に、次世代シーケンサー解析法や遺伝学的解析法を用いた研究を行った。詳しい研究方法は次の4.研究成果で一體的に記載する。

4. 研究成果

(1) miRNA生合成に必須なDUS16遺伝子の同定と解析

ランダム突然変異によってmiRNAが機能しない変異体を単離し、その責任遺伝子として2本鎖RNA結合タンパク質DUS16をコードする遺伝子を同定した。Small RNA-seq解析からDUS16変異体はほぼ全てのmiRNAが生合成できないこと、共焦点顕微鏡を使った局在解析の結果からDUS16タンパクは核内に局在すること、RNA免疫沈降解析からDUS16はmiRNA前駆体と結合している事、共免疫沈降とタンパク質量分析解析からDUS16はmiRNA前駆体のプロセッシング活性をもつDICER-LIKE3タンパク質と複合体を形成していること、などを明らかにし、論文発表した(雑誌論文)。

(2) クラミドモナス変異体スクリーニング系の確立

DUS16変異体を単離するにあたり、ハイスループットな変異体ライブラリーの作製と単離・特徴づけの方法を最適化した。具体的には遺伝子導入に使用する矩形波エレクトロポレーターを用い、核ゲノムに導入遺伝子が1コピーだけ導入される条件を見出した。また導入遺伝子のゲノム上の位置を決定する非対称PCR法の最適化、および任意遺伝子欠損株をゲノムDNAスーパープールから段階的に高効率スクリーニングする方法も確立し、それらの詳細について発表した(図書)。

(3) 栄養欠乏下におけるmiRNA機能の解析

Argonaute3 (AGO3)に結合するmiRNAをsmall RNA-seq解析で解読し、またAGO3変異株を用いて窒素欠乏下・硫黄欠乏下、光混合栄養培養条件・光独立栄養培養条件における表現型解析を行った。その結果こうした培養条件下ではクラミドモナスの細胞分裂速度にAGO3の欠損が全く影響を与えることは無く、栄養制御におけるmiRNAの機能は限定的であることを明らかにし、論文発表した(雑誌論文)。

(4) 新規クラミドモナスmiRNAの発見

Small RNA-seq解析を野生型株、AGO3欠損変異体、DUS16欠損変異体を用いて行い、それぞれの変異体でどういった種類のmiRNA生合成が影響を受けているかを、UNIXプログラムを用いて解析した。その結果これまでに同定されていなかった新規miRNAを9種類発見するとともに、それぞれのmiRNAの生合成や機能にどの程度AGO3やDUS16が関与するかを明らかにし、論文発表した(雑誌論文)。

(5) オルガネラDNA方親遺伝を制御する候補遺伝子の発見

野生型株において接合子特異的に発現が誘導される遺伝子群、即ち葉緑体DNAの片親遺伝制御に関わる可能性の高い遺伝子に注目し、野生型株とAGO3変異株の間で発現量が有意に異なる遺伝子を探索した。その結果、接合型+株の核ゲノム上の性決定領域にコードされ、接合直後

に発現が上昇する機能未知遺伝子 EYZ2 の発現誘導が AGO3 変異株で抑えられている事が分かった。立体構造モデルからその機能を予測した結果、DNase 活性を持つ可能性が示された。

(6) AGO3 の主要作用モードは翻訳阻害であることから、miRNA の直接の標的を AGO3 の RNA immunoprecipitation-seq (AGO3 に結合する mRNA の網羅的解析) で解析したところ、二酸化炭素の濃縮機構で重要な働きをする CAS 遺伝子の翻訳が miRNA によって抑制されていることが見いだされた。CAS タンパクは AGO3 変異体、DUS16 変異体において増加しており、またその mRNA のポリ A 鎖長は miRNA 変異株において短くなっていた。こうしたことから、クラミドモナスにおける miRNA を介した翻訳阻害に動物で見られるようなポリ A の短鎖化は伴わず、むしろ mRNA の安定化や貯蔵に寄与している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Yamasaki T(山崎朋人), Onishi M, Kim EJ, Cerutti H, Ohama T.
RNA-binding protein DUS16 plays an essential role in primary miRNA processing in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2016, 113, 10720-10725.
doi: 10.1073/pnas.1523230113.

Kurniasih SD, Yamasaki T(山崎朋人), Kong F, Okada S, Widyaningrum D, Ohama T.
UV-mediated *Chlamydomonas* mutants with enhanced nuclear transgene expression by disruption of DNA methylation-dependent and independent silencing systems.
Plant Mol Biol. 2016, 92, 629-641.

Yamasaki T(山崎朋人), Cerutti H.
Cooperative processing of primary miRNAs by DUS16 and DCL3 in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.
Commun Integr Biol. 2017, 10, e1280208.
doi: 10.1080/19420889.2017.1280208.

Voshall A, Kim EJ, Ma X, Yamasaki T(山崎朋人), Moriyama EN, Cerutti H.
miRNAs in the alga *Chlamydomonas reinhardtii* are not phylogenetically conserved and play a limited role in responses to nutrient deprivation.
Sci Rep. 2017, 7, 5462.
doi: 10.1038/s41598-017-05561-0.

Aihara Y, Fujimura-Kamada K, Yamasaki T(山崎朋人), Minagawa J.
Algal photoprotection is regulated by the E3 ligase CUL4-DDB1DET1.
Nat Plants. 2019, 5, 34-40.
doi: 10.1038/s41477-018-0332-5. Epub 2018 Dec 31.

Tokutsu R, Fujimura-Kamada K, Yamasaki T(山崎朋人), Matsuo T, Minagawa J.
Isolation of photoprotective signal transduction mutants by systematic bioluminescence screening in *Chlamydomonas reinhardtii*.
Sci Rep. 2019, 9, 2820.
doi: 10.1038/s41598-019-39785-z.

[学会発表](計6件)

山崎朋人, The RNA-binding protein DUS16 plays essential role in primary-miRNA processing in *Chlamydomonas reinhardtii*, 17th international conference on the cell and molecular biology of *Chlamydomonas*, 2016

山崎朋人, 緑藻クラミドモナスの RNA 結合タンパク DUS16 は DCL3 と microprocessor 複合体として機能する、第 6 回植物 RNA 研究ネットワークシンポジウム、2016

山崎朋人, RNA-binding protein DUS16 and DCL3 work cooperatively as component of a microprocessor complex in the pri-miRNA processing in *Chlamydomonas reinhardtii*, 第 58 回日本植物生理学会年会、2017

山崎朋人, microRNA biogenesis and function in *Chlamydomonas reinhardtii*, ファイトジーンの可能性と未来 IX、2017

山崎朋人, miRNA を介した光防御機能の制御メカニズムの解明、日本植物学会第 82 回年会、2018

山崎朋人, クラミドモナスにおけるマイクロ RNA を介した qE クエンチングのファイン チューニング、第 60 回日本植物生理学会年会、2019

〔図書〕(計1件)

Yamasaki T(山崎朋人).

Isolation and Characterization of ARGONAUTE Mutants in Chlamydomonas.

Methods Mol Biol. 2017, 1640, 159-172.

doi: 10.1007/978-1-4939-7165-7_11.

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://science.cc.kochi-u.ac.jp/?course=4091>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: Heriberto Cerutti

ローマ字氏名: ヘリベルト セルーリー

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。