

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06710

研究課題名(和文) 単細胞緑藻クラミドモナスにおけるmiRNAシステムの分子基盤解明

研究課題名(英文) Understanding the molecular basis of the miRNA system in the unicellular green alga *Chlamydomonas*.

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内にあるマイクロRNA (miRNA)は、遺伝子の発現を抑制する小分子RNAである。本研究では、単細胞緑藻クラミドモナスにおいて、マイクロRNA(miRNA)が作られ、遺伝子の発現を制御する仕組みの解明を目指した。その結果、miRNAを作るために必要なタンパク質複合体の新規構成因子や、miRNAが遺伝子に作用するために必要なタンパク質複合体の新規構成因子を発見することに成功した。またmiRNAが働きかける遺伝子を発見するための手法をクラミドモナスで初めて確立し、発現が制御される遺伝子を発見するに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miRNAは、動物・植物などの真核生物に広く存在する、遺伝子の発現を制御する重要な分子である。miRNAの作り方、作用の仕方、そしてその役割は多細胞生物でよく理解されている一方で、単細胞生物における知見はほとんどなかった。本研究によって単細胞緑藻クラミドモナスのmiRNAシステムの一端が明らかになったことで、多細胞生物との相同性や相違性についての解析が進み、miRNAシステムの進化史の謎に迫る基盤を形成することができた。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs (miRNAs) are small RNA molecules that repress gene expression. In this study, we aimed to understand the mechanisms of microRNA production and regulation of gene expression in the unicellular green alga *Chlamydomonas*. As a result, we succeeded in discovering novel components of protein complexes that are necessary for miRNA production and for miRNAs to act on genes. We also established a method for discovering genes that miRNAs act on for the first time in *Chlamydomonas*, leading to the discovery of genes whose expression is regulated.

研究分野：遺伝子発現制御

キーワード：microRNA クラミドモナス 次世代シーケンサー

## 1. 研究開始当初の背景

生物の多様な生命現象は、遺伝子発現を調節する様々な仕組みの上に成り立っている。こうした発現制御の仕組みの1つに miRNA が関わるものがある。miRNA は細胞内で作り出される 20~30 塩基長の 1 本鎖 RNA で、相補性の高い mRNA に作用して発現を負に調節する (図 1)。

miRNA を持つ生物には、数百~数千種類の miRNA を作り出し作用させる miRNA 作動システムが備わっている。一般に miRNA はヘアピン型の前駆体 RNA から Dicer (RNA 切断酵素) と dsRBP (2 本鎖 RNA 結合タンパク) の協働により作られ、AGO (作用タンパク) と複合体を作り mRNA に作用する (図 1)。この反応は miRNA を持つ生物に共通して見られる普遍的な基本反応である。一方でそれ以外の重要な反応、例えば前駆体切断の様式や翻訳抑制メカニズムなどは様々である。

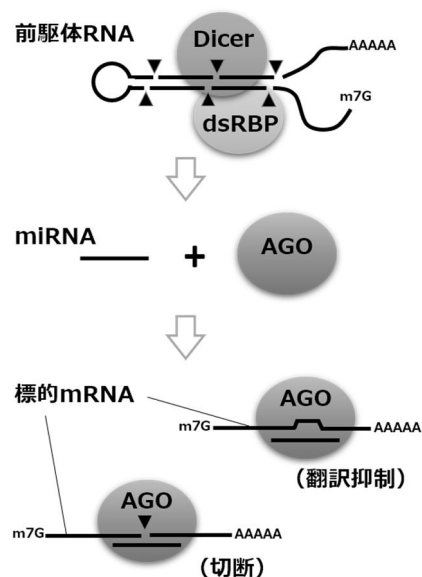


図 1 miRNA 作動システムに普遍的な基本反応

多細胞モデル生物を使った研究から、miRNA 作動システムは動植物の共通祖先となった単細胞生物が獲得し、進化の過程でその作動様式をダイナミックに変化させながら様々な生命現象を制御する役割を獲得してきたと推測されている。では、その始原の miRNA 作動システムはどのような姿だったのだろうか？また、進化における miRNA 作動システム多様化の過程をより深く理解するためにはどうすればよいのだろうか？こうした問いの答えにたどり着くための重要な手掛かりは、単細胞生物にあると考えたが、単細胞生物における miRNA 作動システムについてはほとんど分かっていなかった。

初めて miRNA が見つかった単細胞生物はクラミドモナスである。本研究の開始直前には、イギリスや応募者グループが Dicer の DCL3、dsRBP の DUS16、AGO の AGO3 の遺伝子の変異体を相次いで単離解析し、多細胞生物と共通する miRNA 作動システムの基本反応が存在することが明確になっていた。一方で、生化学的解析や遺伝子構成の比較から、作動システムの基本反応以外の特徴は動物と植物のどちらとも異なることが示唆されており、共通性や多様性の解明につながる第三極のモデル生物として注目され始めていた。

## 2. 研究の目的

単細胞生物にある miRNA 作動システムの作動原理は多細胞生物よりもおそらく単純で、始原 miRNA 作動システムの姿の推測に資する特徴を多く備えていると期待される。始原的 miRNA 作動システムはどのような姿であったのか、どんな生命現象を制御していたのか (図 2)、そういった miRNA の起源に関わる謎の解明に迫ることを最終的な目標に、本研究では、研究の進んだ多細胞モデル動植物と異なるクラミドモナスの miRNA 作動システムに必須な未知遺伝子を遺伝学的・生化学



図 2 miRNA 作動システムの起源

的手法によって多数同定、機能解析し、クラミドモナス miRNA 作動システムの分子機構を明らかにすることとした。また miRNA が調節する未知の遺伝子を同定して、単細胞生物における

miRNA の役割を明らかにすることで、システムの分子基盤の全貌を解明すること目的とした。

### 3 . 研究の方法

miRNA 作動システムを、『miRNA を作る』と『作用させる』部分に分けて考え、3つの研究計画を実施した。

1 ) miRNA を作る Dicer/dsRBP 複合体のタンパク質構成を明らかにする。

DUS16 と FLAG エピトープタグの融合遺伝子を発現する *dus16* 変異レスキュー株から、DCL3/DUS16 複合体を、FLAG 抗体と protein G 磁性ビーズで精製した。次に PDS-PAGE、銀染色後、陰性対象にない特異的バンドのタンパク質を質量分析で同定した。さらに同定したタンパク質をコードする遺伝子を CRISPR-Cas9 でノックアウトして変異体を作製し、変異体において、miRNA の量変化を解析した。

2 ) miRNA を作用させる AGO/miRNA 複合体のタンパク質構成を明らかにする。

AGO3 と FLAG エピトープタグの融合遺伝子を発現する AGO3 変異レスキュー株から、AGO3/miRNA 複合体を精製し、DUS16 の場合と同様にタンパク質の同定、変異体解析を行った。

3 ) AGO3/miRNA 複合体が作用する mRNA の同定。

クラミドモナス細胞を対象とした non-RI HITS-CLIP 法を確立し、miRNA が作用する遺伝子を同定した。具体的には、生細胞に 254 nm の紫外光を照射して RNA と近接する FLAG-AGO3 をクロスリンク後、FLAG 抗体と protein G 磁性ビーズで FLAG-AGO3 タンパク複合体をアフィニティー精製、生成物中の RNA から次世代シーケンサー解析用ライブラリを作製し、リードを取得した。取得したリードの情報解析から、複数の miRNA 標的遺伝子候補の発見を試みた。

### 4 . 研究成果

1 ) miRNA を作る Dicer/dsRBP 複合体のタンパク質構成を明らかにする。

タンパク質量分析の結果、DUS16 タンパク質と結合するタンパク質として、DUS16 とは異なる2種類の2本鎖 RNA 結合タンパク質、3' 5' エキソリボヌクレアーゼタンパク質が見つかった。これらのタンパク質をコードする遺伝子の変異体を取得し、miRNA の量変化を解析したところ、2種の2本鎖 RNA 結合タンパク質遺伝子の欠損変異体では miRNA 量が減少し、エキソリボヌクレアーゼ遺伝子の欠損変異体では miRNA 量が増加していた。これらの結果から、タンパク質量分析によって発見された2種類の2本鎖 RNA 結合タンパク質とエキソリボヌクレアーゼが miRNA を作る機構に関与していることが示唆された。

2 ) miRNA を作用させる AGO/miRNA 複合体のタンパク質構成を明らかにする。

タンパク質量分析の結果、AGO3 タンパク質と結合するタンパク質として、RNA ヘリカーゼ、RNA 結合タンパク質、リボソームタンパク質遺伝子が複数見つかった。その中から6つの遺伝子に着目し、これらの遺伝子の変異体を取得、miRNA が制御する標的遺伝子の発現をウエスタンブロットで調べた。その結果、6遺伝子のうち1つの遺伝子(RNA ヘリカーゼをコード)の欠損変異体において、miRNA による遺伝子発現抑制効果が弱まっていることが確認できた。この結果から、少なくとも1種類の RNA ヘリカーゼが、AGO3/miRNA 複合体が標的 mRNA に作用するのに必要とされていることが示唆された。

3 ) AGO3/miRNA 複合体が作用する mRNA の同定。

研究開始当初は、AGO3 変異レスキュー株の新生 RNA に4-チオウリジン(4-SU)を取り込ませ、

AGO3/miRNA/標的 mRNA の 3 者複合体をクロスリンクして精製し、AGO3 とクロスリンクされた RNA を次世代シーケンサーで解析する PAR-CLIR 法を行う予定であった。しかし予備実験の結果、クラミドモナスは 4-SU の取り込み効率が低く、PAR-CLIP の実施は困難となった。そこで架橋効率は

幾分落ちるものの、アナログを用いず、生細胞に 254 nm の紫外光を照射することでタンパク質と RNA をクロスリンクさせる方法 (HITS-CLIP) にシフトした。先進ゲノム支援のサポートを受け、放射性同位元素を使わずに AGO3 に対する HITS-CLIP を行う手法を確立し、AGO3/miRNA 複合体が作用する mRNA の同定を行った。HITS-CLIP ライブラリを調製して次世代シーケンサー解析を行い、得られたリードの情報解析を行った結果、複数の標的 mRNA の候補を検出することに成功した。

複数検出された遺伝子の中から、コードするタンパク質特異的な抗体が利用可能であった CAS 遺伝子に着目し (図 3A)、研究を進めた。野生型株と AGO3 欠損変異体を明暗周期下で同調培養し、各タイムポイントにおいて CAS タンパク質量を比較解析した結果、おもに明期の後半において CAS タンパク質量の増加が認められ (図 3B)、このタイミングで CAS 遺伝子の発現が AGO3/miRNA によって抑制されていることが示唆された。

以上の研究の結果、単細胞緑藻クラミドモナスにおける miRNA の分子基盤の解明を大きく進めることができた。

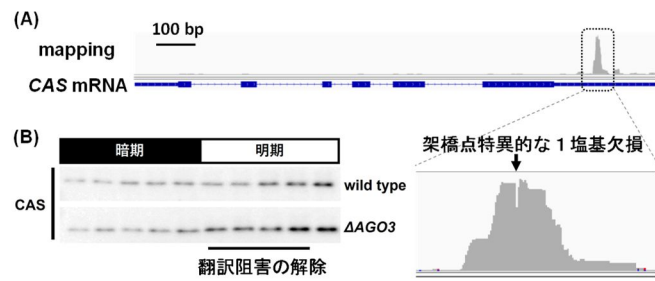


図 3 CAS 遺伝子の発現は miRNA で抑制される

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Pan Xiaowei, Tokutsu Ryutaro, Li Anjie, Takizawa Kenji, Song Chihong, Murata Kazuyoshi, Yamasaki Tomohito, Liu Zhenfeng, Minagawa Jun, Li Mei	4. 巻 7
2. 論文標題 Structural basis of LhcbM5-mediated state transitions in green algae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 1119 ~ 1131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-021-00960-8	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 -

1. 著者名 Tokutsu Ryutaro, Fujimura-Kamada Konomi, Yamasaki Tomohito, Okajima Keisuke, Minagawa Jun	4. 巻 185
2. 論文標題 UV-A/B radiation rapidly activates photoprotective mechanisms in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1894 ~ 1902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiab004	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 Tokutsu Ryutaro, Fujimura-Kamada Konomi, Matsuo Takuya, Yamasaki Tomohito, Minagawa Jun	4. 巻 10
2. 論文標題 The CONSTANS flowering complex controls the protective response of photosynthesis in the green alga <i>Chlamydomonas</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-11989-x	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎朋人、高橋弘喜
2. 発表標題 HITS-CLIP によるクラミドモナスmiRNA 標的遺伝子の同定
3. 学会等名 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究成果の概要をホームページにまとめ、発信している。  
<http://science.cc.kochi-u.ac.jp/?course=4091>

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
---------	---------