

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20643

研究課題名(和文) 繊毛虫テトラヒメナにおける配偶核選択の仕組みの解明

研究課題名(英文) Revealing the mechanism behind pronuclear selection in *Tetrahymena thermophila*

研究代表者

明松 隆彦 (AKEMATSU, Takahiko)

日本大学・文理学部・助教

研究者番号：90906637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：繊毛虫類に属する単細胞生物テトラヒメナの有性生殖では、同一の細胞内に混在する4つの核(半数体核小核)から1つが選ばれ、これが成熟して配偶子となり、異性細胞間での相互的な受精に使われる。本課題では、選択的な核の成熟機構を明らかにすることを旨とした研究を行い、これに寄与する2種類の新規遺伝子(Dear3, Mfs1)を見出した。これらの遺伝子の機能解析から、個々の核の運命決定における局所的な物質輸送、並びに位置情報とは異なるシグナルの関与が示唆された。本発見は、他の生物の有性生殖には見られない、核を単位とした世代交代の仕組みを理解するための重要な知見となるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

繊毛虫類の有性生殖は、動物の精子と卵に見られるような細胞の融合を伴うことなく、異性細胞間での核の交換により行われる点で極めてユニークである。この仕組みの解明は、より広い真核生物における有性生殖の多彩性を理解するための重要な研究課題である。本研究で得られた成果は、核を単位とした配偶子形成に必須な新規遺伝子を明らかにしたものである。配偶子形成に必要な遺伝子には、繊毛虫類に特異的なものと、多くの生物に広く保存されているものが含まれる。今後の研究の進展により、真核生物がもつ配偶子形成メカニズムの共通性と、進化的なバリエーションの理解に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Unlike other eukaryotes, the ciliated protist *Tetrahymena* has both germline and soma in a single cell as two spatially separate nuclei, germline (micro-) and somatic (macro-) nuclei, and the lifecycle is performed between the two types of nuclei without fusion or disintegration of the individual cells. During sexual reproduction in *Tetrahymena*, cells of complementary mating type pair undergo simultaneous meiosis and fertilize each other. In both mating partners only one of the four meiotic products is selected to give rise to gametic pronuclei. In this study, we screened genes that show a high expression level in the pre-zygotic period of mating and found two genes (Dear3, Mfs1) as essential factors for selective gametogenesis and the subsequent reciprocal fertilization. This finding provides a new insight into understanding the core and diversified parts of eukaryotic sexual reproduction.

研究分野：細胞生物学

キーワード：テトラヒメナ 繊毛虫類 配偶子 核 核膜 運命決定

### 1. 研究開始当初の背景

繊毛虫類は、大核と小核という二種類の分化した核をもち、核レベルでの体細胞系列と生殖系列の分離(二核性)を獲得している単細胞生物のグループである。接合と呼ばれる有性生殖では、減数分裂した小核(4の倍数個の半数体小核)が細胞内を動き回り、やがて1核のみが選択されて配偶子(配偶核)へと成熟する。一方、非選択核( $4n-1$ 核)は未熟な状態で速やかに消失する。これまで半数体小核の選択現象(核選択)は、細胞内の限定された領域でのみ起こると考えられてきた。配偶核への成熟は必ず接合面(異性細胞が連結する部分)へ付着した状態で起こることから、核選択における接合面、並びにその周辺領域の機能的な重要性が指摘されていた。しかしながら研究代表者らが2020年に発表した論文(引用文献)では、核選択が細胞内のあらゆる領域で起こる変異株が見出されたことから、これまでに描かれてきた機能領域仮説は大きく転換することになった。核選択が起こる仕組みを抜本的に見直し、当該分野の発展に寄与する新知見を提供するための研究が求められていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、配偶核形成に必須な核選択メカニズムの理解を深化させることを目的とした。実験材料には、繊毛虫類の中で半数体小核数が最少(4核)であり、且つ遺伝学的解析が可能なテトラヒメナ(*Tetrahymena thermophila*)を利用した。

引用文献より、配偶核の核膜に特異的に局在する膜タンパク質 Semi1 が同定されている。Semi1 は選択された核を接合面へ付着させて成熟させる機能を担っており、選択現象に寄与するタンパク質との物理化学的な相互作用が予想される。そこで、核選択に関わる遺伝子情報を集積するための足がかりとして、Semi1 と親和性を示す遺伝子群の機能解析を試みた。併せて、Semi1 と発現パターンの似た遺伝子群についても機能解析を試みた。スクリーニングされた候補遺伝子について細胞内局在解析を行い、4つの半数体小核に差異が生み出される時期を明らかにすると共に、それらのタンパク質と協調的に働く分子種を特定することを目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 機能解析による遺伝子群のスクリーニングには、「co-Deletion」と呼ばれるテトラヒメナ用が開発されたゲノム編集技術(引用文献)を用いた。各候補遺伝子が特異的に有するDNA配列(約1kb)を標的配列として選定し、専用のプラスミドへクローニングした。作製したプラスミドを遺伝子銃法によって接合中の細胞へ導入し、標的配列のコピーが全て削減された子孫細胞(ノックアウト株)を選別した。この工程を繰り返し、各候補遺伝子について2種類の異なる性をもったノックアウト株を確立した。作製したノックアウト株を交配した際の表現型は、顕微鏡による核の形態観察、並びに選択核にのみ局在することが分かっている分子種(引用文献)をマーカーとした蛍光観察によって解析した。

(2) 機能解析によってスクリーニングされた遺伝子は相補的DNAをクローニングし、緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を融合したプラスミドを構築した。遺伝子銃法によってプラスミドを細胞へ導入し、発現した融合タンパク質の細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察した。

(3) 選択核に特異的な局在を示すタンパク質については位置情報との関連を調べるため、GFP遺伝子を融合したγチューブリン(GFP-Gtu)発現プラスミドを細胞へ導入し、核選択の時期における細胞骨格構造の変化を観察した。

### 4. 研究成果

(1) Semi1 と相互作用する遺伝子12種類、並びに発現パターンの類似した遺伝子20種類についてco-Deletionを行った結果、2種類の遺伝子(Dear3, Mfs1)ノックアウト株に配偶核形成不全の表現型が見られた(図1)。

Dear3 はテトラヒメナ属に特異的なタンパク質をコードする遺伝子で、既知の機能ドメインを一切有さなかった。Mfs1 は小胞アミントランスポーターに類似したタンパク質をコードする遺伝子で、12回の膜貫通ドメインをもつことが予測された。

Dear3 のノックアウト株(*dear3Δ*)では、いずれの半数体核小核も接合面に付着しない表現型が見られた。通常、選択核にはDNA修復因子の局

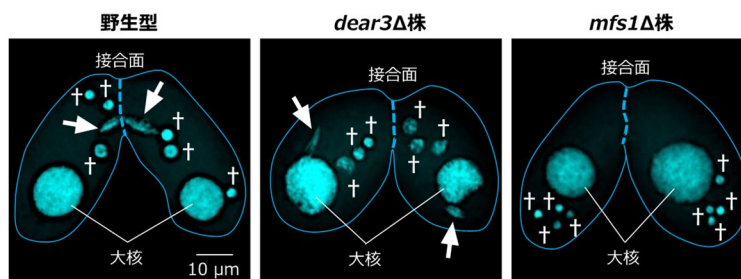


図1: 野生型、*dear3Δ*株、*mfs1Δ*株における核選択現象(DAPI染色像)

テトラヒメナの接合では、4つの半数体小核から1核が選択されて配偶核へと成熟する。

矢印は選択核を、+は退化中の非選択核を、そして破線は接合面を表す。

野生型(左)では、選択核は接合面に付着し、ここで配偶核へと成熟する。成熟中の選択核は、分裂を行うために細長く伸長する。*dear3Δ*株(中央)では核選択が細胞内のあらゆる領域で起こり、選択核が接合面へ付着しないため、成熟に異常をきたす。*mfs1Δ*株(右)では核選択が起きず、4つ全ての半数体小核が退化する。

在やヒストン H3 及び H4 のアセチル化が特異的に起こるが ( 引用文献 ) *dear3Δ* にはこれらマーカー分子への影響が見られなかった。すなわち、*dear3Δ* において核選択は細胞内のあらゆる領域で起きており、その後の接合面での成熟に異常をきたすものと考えられる。この表現型は、引用文献で見られた Semi1 ノックアウト株 (*semi1Δ*) のものと酷似していた。

Mfs1 ノックアウト株 (*mfs1Δ*) においても同様に、いずれの半数体核小核も接合面に付着しない表現型が見られた。しかし *dear3Δ* や *semi1Δ* の表現型とは異なり、選択核のマーカー分子が一切検出されなかった。このことは、*mfs1Δ* では核選択が抑制されていることを示している。Mfs1 タンパク質がトランスポーター用のドメインを有することから、核選択的な DNA 修復因子やヒストン修飾酵素の輸送に関与していることが考えられた。

(2) GFP を融合した Dear3 タンパク質 (GFP-Dear3) の細胞内局在を観察したところ、選択核の核膜に特異的に局在することが分かった。GFP-Dear3 は栄養細胞では一切発現しないが、減数分裂後期に発現が開始され、選択直後の 1 核の核膜上に集積する様子が観察された。これは GFP-Semi1 の局在パターンと一致するものであり ( 図 2 ) *dear3Δ* と *semi1Δ* が互いに酷似する表現型を示した結果と併せて、これら 2 種類のタンパク質の協調作用が考えられる。そこで、*dear3Δ* における GFP-Semi1 の挙動、並びに *semi1Δ* における GFP-Dear3 の挙動を観察したところ、タンパク質の局在パターンに大きな差異が見られた。すなわち、Dear3 の核膜局在には Semi1 が必要だが、Semi1 は単独で局在可能であることが分かった。以上の結果は、膜タンパク質である Semi1 が足場となり、Dear3 を含めた配偶核の成熟因子を核膜上へリクルートすることを示唆している。

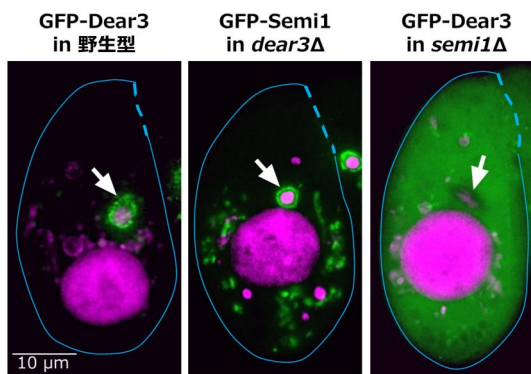


図2 : GFP標識したDear3、並びにSemi1の局在  
矢印は選択核、破線は接合面を表す。(左) 野生型において、Dear3はSemi1と同様に選択核の核膜上に特異的に局在する。(中央) Semi1の核膜局在はDear3の発現を必要としない一方で、(右) Dear3はSemi1非存在下では核膜局在を示さなくなる。

一方、GFP を融合した Mfs1 タンパク質 (GFP-Mfs1) は、細胞内に多数存在する膜小胞の表面に局在することが分かった。核選択が起こる時期では、GFP-Mfs1 の局在した膜小胞が選択核の周囲に集積する様子が観察された。このことから、トランスポーター機能を介した膜小胞と核間での局所的な物質輸送が核選択の分子基盤となっている可能性がある。

(3) 野生型細胞における GFP-Gtu の局在を観察したところ、選択核の周囲にのみ微小管がバスケット状に形成され、接合面の方向へ引き込まれる様子が観察された。一方で、*dear3Δ* 並びに *semi1Δ* を用いて同様の観察を行ったところ、選択核周辺における GFP-Gtu シグナルの集積は見られなかった。このことは、細胞内骨格分子による核の位置取りは選択後の成熟プロセスに寄与する一方、核選択には一切関与しないことを示唆している。今後、核選択が完全なランダム現象であるのか、あるいは位置情報とは別の規則性があるのかについて、さらなる解析を進める予定である。

#### < 引用文献 >

- Akematsu, T., Sanchez-Fernandez, R., Kosta, F., Holzer, E., and Loidl, J. (2020). The Transmembrane Protein Semi1 Positions Gamete Nuclei for Reciprocal Fertilization in Tetrahymena. *iScience* 23, 100749.
- Hayashi, A., and Mochizuki, K. (2015). Targeted Gene Disruption by Ectopic Induction of DNA Elimination in Tetrahymena. *Genetics* 201, 55-64.
- Akematsu, T., Fukuda, Y., Garg, J., Fillingham, J.S., Pearlman, R.E., and Loidl, J. (2017). Post-meiotic DNA double-strand breaks occur in Tetrahymena, and require Topoisomerase II and Spo11. *Elife* 6, e26176.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Patricia Silvia Romano, Takahiko Akematsu, Sebastien Besteiro, Annina Bindschedler, Vern B. Carruthers, Zeinab Chahine, Isabelle Coppens, et al.	4. 巻 2
2. 論文標題 Autophagy in protists and their hosts: When, how and why?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Autophagy Reports	6. 最初と最後の頁 2149211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/27694127.2022.2149211	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 該当する

1. 著者名 Fukuda Yasuhiro, Akematsu Takahiko, Bando Hironori, Kato Kentaro	4. 巻 10
2. 論文標題 Snf2 Proteins Are Required to Generate Gamete Pronuclei in Tetrahymena thermophila	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 2426 ~ 2426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms10122426	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 明松 隆彦, Rosalia Sanchez-Fernandez, Felix Kosta, Elisabeth Holzer, Josef Loidl
2. 発表標題 繊毛虫テトラヒメナの配偶核形成におけるSemi1の働き
3. 学会等名 第54回日本原生生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田 康弘, 明松 隆彦, 岩本 政明, 伴戸 寛徳, 加藤 健太郎
2. 発表標題 テトラヒメナの二価染色体形成における減数第一分裂前期特異的タンパク質Mep1の役割
3. 学会等名 第54回日本原生生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田康弘, 明松隆彦, 岩本政明, 伴戸寛徳, 加藤健太郎
2. 発表標題 繊毛虫テトラヒメナの二価染色体形成におけるSnf2様タンパク質の役割
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 明松隆彦, 福田康弘, 岩本政明
2. 発表標題 繊毛虫テトラヒメナの配偶核形成におけるSemi1とSemi2タンパク質の協調作用
3. 学会等名 第55回日本原生生物学会大会
4. 発表年 2022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
研究協力者	福田 康弘  (FUKUDA Yasuhiro)		
研究協力者	岩本 政明  (IWAMOTO Masaaki)		

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			
オーストリア	ウィーン大学			
カナダ	トロント州立大学			