

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：11101
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24657160
 研究課題名（和文）細胞性粘菌に雌雄はあるか？オス特異的遺伝子“OTOKOGI”オーソログの機能解明

 研究課題名（英文）Male and female in social amoeba? Functional analysis of male-specific gene "OTOKOGI" orthologs in Dictyostelium discoideum

 研究代表者
 福澤 雅志 (Fukuzawa, Masashi)

 弘前大学・農学生命科学部・教授

 研究者番号：10231557

 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）：細胞性粘菌は雌雄の区別はなく、3つの交配型で有性生殖過程のマクロシスト形成が行われる。本研究は、藻類でオスの性決定に関わる転写因子OTOKOGI（MID）遺伝子のオーソログDdmidの機能解析を行った。Ddmidはすべての交配型に確認され、雌雄性には関与しないことがわかった。DdmidB過剰発現株はホモタリックな接合を行い、マクロシスト様構造を形成したことから、有性生殖での機能が示唆された。しかし、遺伝子破壊株はヘテロタリック接合に欠陥が見られなかった。これらの結果から、細胞性粘菌のMIDの機能は性決定ではなく、有性生殖を促進する遺伝子を制御するように進化した可能性が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The social amoeba Dictyostelium discoideum has a sexual cycle to form resistant macrocysts, in which two of the three mating types match to fuse. Although there is no "male and female" concept, it possesses orthologs of OTOKOGI (MID) gene that determines male gamete differentiation in algae. We have isolated three MID orthologs from Dictyostelium and characterized their functions in macrocyst formation. All Ddmids were detected in genomes of all three mating types, indicating that Ddmids are not sex determinant in this organism. DdmidB overexpression induced formation of macrocyst-like structure, suggesting that the gene has a role in sexual development; homothallic formation of macrocyst. However, inactivation of DdmidB did not interfere with macrocyst formation in either homothallic/heterothallic pair of mating types. These suggest the function of DdmidB not in sex determination but in enhancing macrocyst formation, by regulating relevant gene expression as a transcription factor.

研究分野：発生細胞生物学

キーワード：細胞性粘菌 有性生殖 雌雄性成立 同型配偶 ホモタリック接合 otokogi minus-dominance

1. 研究開始当初の背景

生物の雌雄性について、オス・メスの区別があるものについては研究が進んでいるが、細胞性粘菌のようにオス・メスの区別がない、雌雄性が生じる以前の原始的な性についての進化的意義やメカニズムに関する研究はほとんどなく、分子的な背景はまったく不明であった。

2. 研究の目的

高等な生物で見られる雌雄性の起源については、同型配偶から卵生殖までさまざまな様式の有性生殖が知られる緑藻類をモデル生物群として研究されてきており、オス特異的な遺伝子 OTOKOGI (MID) や、メス特異的な遺伝子群 HIBOTAN が明らかになっている。しかし、藻類はヘテロタリック接合であり、ホモタリック接合での研究例はない。

モデル生物「細胞性粘菌」は、有性生殖において同型配偶を行う。その主な交配型は藻類と同様にヘテロタリックで、タイプ1～3が規定する。細胞性粘菌にも MID オーソログがあり (Ddmid)、その一つ (DdmidB) をタイプ1株で過剰発現すると、ホモタリックにマクロシストを形成する。

本研究は、MID の遺伝子機能に注目し、細胞性粘菌における MID 遺伝子オーソログの解析と、それを利用して作出したホモタリックな同型配偶を行う実験系を用いて細胞性粘菌の性を解き明かし、藻類の雌雄異体の同型配偶とは異なる視点で雌雄性成立の進化的問題を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

以下の4つの方法により過剰発現系を中心として Ddmid の機能解析を行った。

(1) Ddmid は交配型特異的かどうか明らかにする。

藻類の同型配偶は雌雄異体であり、MID 遺伝子はオスのゲノムにあるがメスにはない。細胞性粘菌の同型配偶において、雌雄異体に相当する交配型であるタイプ1～3が MID 遺伝子の有無により成立しているのかどうか、ゲノム PCR で明らかにする。まずタイプ1～3に属する代表的な株を選定し、ストックセンターより入手する。ゲノム DNA を生成した後、DdmidA、B、C それぞれを特異的に増幅できるプライマーを合成し、ゲノム PCR により増幅を調べる。

(2) Ddmid は有性生殖過程で特異的に発現するのか調べる。

藻類の MID 遺伝子はオスの配偶子が分化す

るにつれて発現が高くなる。そこで、DdmidA、B、C の発現が mating type の違いや有性生殖過程と連動するのかを調べる。実験系としてタイプ1株、タイプ2株を用いて、それぞれを有性生殖へ誘導した FC 細胞と、誘導しない IC 細胞から RNA を調製し、特異的なプライマーを用いて QPCR を行い DdmidA、B、C の発現量を比較する。また、プロモーター領域をクローニングし、レポーターコンストラクト (lacZ、GFP) を構築して組織での発現パターンも調べる。

(3) 過剰発現株、遺伝子破壊株を用いて有性生殖過程への影響を解析する。

タイプ1株での DdmidB 過剰発現はマクロシストを形成することを確認している。この過剰発現株をもちいて、ホモタリックな配偶過程と、通常のヘテロタリックな配偶過程におけるマクロシスト形成を比較解析する。また、DdmidB の遺伝子破壊株を作出する。具体的には、タイプ1株、タイプ2株に対して、それぞれ DdmidB の過剰発現株、遺伝子破壊株を作成しなければならない。細胞性粘菌のタイプ1では手法が確立しているが、タイプ2では野生型のため、過去に成功例はあるが困難が予測される。これらの株に対して全組み合わせで交配実験を行い、MID 遺伝子が有性生殖に関与するかどうかを明らかにする。

(4) 核融合のタイミングの可視化

有性生殖における核融合がどのように起きているのかは詳細にわかっていない。タイプ1株、タイプ2株に、それぞれ GFP/RFP マーカーを導入することで色分けし、FC 細胞へと誘導し、混ぜ合わせることで有性生殖をスタートさせ、ライブイメージング解析することで融合過程を調べる。また、DdmidB 過剰発現株でも行い、核融合などが起きているか調べる。

4. 研究成果

(1) 細胞性粘菌の交配型タイプ1～3についてゲノム PCR を行ったところ、DdmidA、B、C はすべての型のゲノムに確認されたことから、細胞性粘菌において MID は雌雄の区別には関与していないことが示唆された。また、DdmidB は、ホモタリック型である AC4 株でのみ、全長が短いことも明らかになった。ゲノムシーケンスの結果、AC4 株の DdmidB は3側の欠失がみられた。

(2) リアルタイム PCR 解析の結果、有性生殖における DdmidA、B、C の発現は、交配型特有の発現調節が示唆された (図1)。

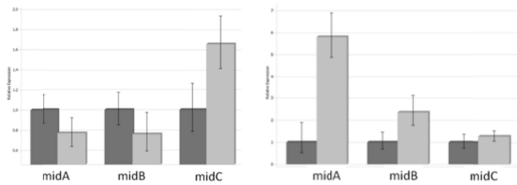


図1 DdmiA、B、Cの有性生殖過程での発現。左：タイプ1株、右：タイプ2株。

(3) DdmiB 過剰発現株をタイプ1で作成したところ、マクロシスト形成が観察された(図2)。

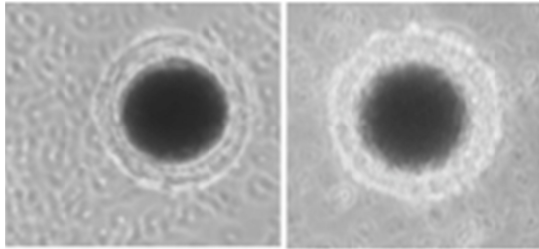


図2 DdmiB 過剰発現によるマクロシスト形成。左：AC4株(コントロール)、右：DdmiB 過剰発現株。

通常のヘテロタリックな配偶過程におけるマクロシスト形成と比較するため、いくつかの有性生殖に特有の項目について検証した。まず、細胞融合が起きているかを核染色して調べたところ、典型的な巨細胞が形成されており、多核となっていた(図3)。

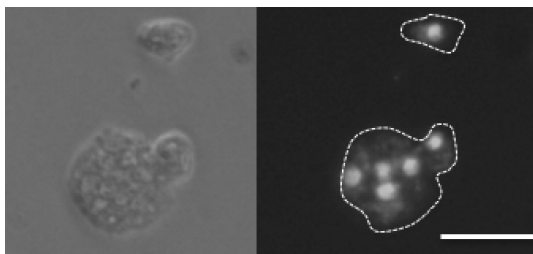


図3 DdmiB 過剰発現による巨細胞形成。左：明視野像、右：DAPI 染色像。Bar; 20 microm.

また、GFP/RFP それぞれでラベルした DdmiB 過剰発現株を1対1で混合すると、両者が混じっている融合細胞が観察された(図4)。

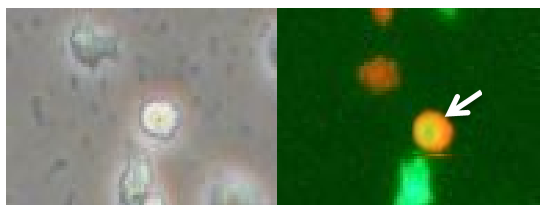


図4 DdmiB 過剰発現株の細胞融合。

つぎに、DdmiA、DdmiB に対して、タイプ

1株、タイプ2株それぞれを用いて遺伝子破壊を試み、いくつかの問題を克服しながら最終的に4株すべて作製できた。これらを用いて、4つの組み合わせで交配実験を行ったところ、すべてのヘテロタリックな交配ではマクロシスト形成が観察された。また、タイプ1同士、タイプ2同士のホモタリックな組み合わせでは、予想に反して、DdmiB を破壊してもマクロシスト形成には影響が見られなかった。

(4) 細胞融合時の核の動向を観察するため、タイプ1、タイプ2それぞれを核マーカーでラベルし、融合30分後の巨細胞を調べた(図5)。その結果、巨細胞の中ではすべての核が融合するわけではなく、局所的に融合することが初めて明らかになった。

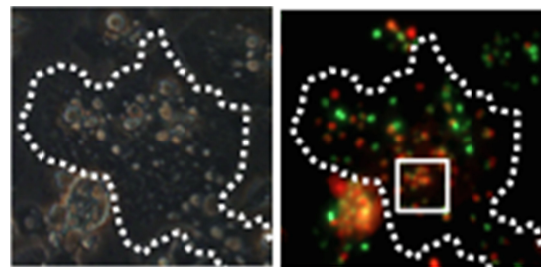


図5 巨細胞形成時の核の動向。左：明視野像、右：蛍光像。点線は巨細胞の外周を示す。四角の中の核は融合しているが、他のエリアは単独で存在する。

本研究により、細胞性粘菌の MID 遺伝子の一つが有性生殖過程であるマクロシスト形成の促進に関与することが明らかとなった。また、核をラベルして有性生殖時の細胞融合過程を詳細にイメージングすることが可能になった。オス・メスの区別がない生物である細胞性粘菌でしかなし得ない、これらの新しいシステムを用いて、原始的な有性生殖機構の解明に切り込んでいくことができると考えられ、今後の研究の展開が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計3件)

Senoo H, Araki T, Fukuzawa M, Williams JG: A new kind of membrane-tethered eukaryotic transcription factor that shares an auto-proteolytic processing mechanism with bacteriophage tail-spike proteins. *Journal of cell science*, 126, 5247-5258, 2013. (査読有り)

Sato YG1, Kagami HN, Narita TB, Fukuzawa M, Saito T: Steely enzymes are involved in prestalk and prespore pattern formation. Biosci Biotechnol Biochem. 77(10), 2008-2012,2013. (査読有り)

Senoo, H., Wang, H. Y., Araki, T., Williams, J. G., Fukuzawa, M: An orthologue of the Myelin-gene Regulatory Transcription Factor regulates Dictyostelium prestalk differentiation. Int J Dev Biol, 56, 325-334, 2012. (査読有り)

〔学会発表〕(計 10 件)

石坂綾花、福澤雅志: 転写因子 CudA と CudD の孢子形成における機能解析. 日本細胞性粘菌学会 第 4 回年会(東北大学) 2014.10.11-12.

桑名悟史、福澤雅志: 細胞集合における増殖期由来 pstA 細胞の機能. 日本細胞性粘菌学会 第 4 回年会(東北大学) 2014.10.11-12.

桑名悟史、福澤雅志: Vegetative origin of organizer cell differentiation in Dictyostelium 第 47 回 日本発微生物学会大会 (名古屋) 2014.5.27-30. Hiroshi Ochiai, Satoru Funamoto, Koki Nagayama, Masashi Fukuzawa, Tetsuo Ohmachi. Gp64 gene of Polysphondylium pallidum may have a Role in a Light Regulation of Lateral Branching. International Dictyostelium meeting, Potsdam, Germany. 2014.8.3-7.

田岡和晃、福澤雅志: REMI 法を用いた PstA 細胞の分化に異常のある変異体の分離と解析. 日本細胞性粘菌学会 第 3 回年会(京都大学) 2013.10.12-13. ベストプレゼン賞(1位)

工藤瑤、宮前知代、福澤雅志: 柄細胞群特異的プロモーターを用いた細胞機能の解析. 日本細胞性粘菌学会 第 3 回年会(京都大学) 2013.10.12-13. ベストプレゼン賞

森合修也、福澤雅志: 細胞性粘菌におけるオス特異的遺伝子ホモログ Dd mid family の機能解析. 日本細胞性粘菌学会 第 3 回年会(京都大学) 2013.10.12-13.

福澤雅志: 遺伝子プロモーターを用いた細胞分化マーカー. 日本細胞性粘菌学会 第 3 回年会(京都大学) 2013.10.12-13.

桑名悟史、福澤雅志: pstA 細胞群の起源. 日本細胞性粘菌学会 第 3 回年会(京都大学) 招待講演 2013.10.12-13. Hiroshi Senoo, Masashi Fukuzawa: エピジェネティックな制御による、増殖と

分化のバランス調節機構にかかわる遺伝子の探索. 第 45 回日本発微生物学会・細胞生物学会合同大会(神戸) 2012 年 5 月 28 日~31 日.

〔図書〕(計 1 件)

福澤雅志: 細胞性粘菌: 研究の新展開~モデル生物・創薬資源・バイオ 第 6 章 分担執筆、2012 年 9 月

〔その他〕

桑名悟史、福澤雅志: 細胞性粘菌における発生最初期オーガナイザー細胞の分化と機能. 招待講演(岩手生物工学研究所) 2014.9.12.

福澤雅志: 細胞性粘菌のオーガナイザー形成と細胞分化にかかわる遺伝子の同定. 基礎生物学研究所共同利用研究報告書、2014.

福澤雅志: The origin of organizer cells in Dictyostelium differentiation (and possible relations of them to chemotaxis) 細胞性粘菌の最初期オーガナイザーの分化について. 細胞動態システム科学グループミーティング VI 招待講演(大阪大学) 2013.11.28-30.

福澤雅志: The origin of organizer cells in Dictyostelium differentiation (and possible relations of them to chemotaxis) 細胞性粘菌の最初期オーガナイザーの分化について. 招待講演(東邦大学) 2013.12.21.

福澤雅志: 「細胞性粘菌のホモトリックな生殖はオス同士? 雄特異的遺伝子 otokogi の役割」Symposium 'Frontiers in Reproduction Research' 2013 年 7 月 10 日(弘前大学・農学生命科学部) (招待講演)

福澤雅志: 細胞性粘菌のオーガナイザー形成と細胞分化にかかわる遺伝子の同定. 基礎生物学研究所共同利用研究報告書、2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福澤 雅志 (FUKUZAWA MASASHI)
弘前大学・農学生命科学部・教授
研究者番号: 10231557

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし