

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440126

研究課題名(和文) 繊毛虫における有性生殖開始機構・性決定および性成熟機構の解明へ向けた網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis to identify the key molecules for sexual maturation, mating-type expression and the initiation of sexual reproduction in ciliate.

研究代表者

杉浦 真由美 (Sugiura, Mayumi)

奈良女子大学・自然科学系・准教授

研究者番号：60397841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：原生物繊毛虫の性成熟と性決定、有性生殖開始機構を解明し、その多様性と原点を探るため、比較的原始的な種と考えられているブレファリズマを用いて、以下のような研究を行った。ブレファリズマの子孫株を樹立し、未熟期から成熟期への性成熟過程の進行と接合型発現の様子を詳細に調べた。また、ブレファリズマの性成熟度の違いや接合型の違いを反映させたトランスクリプトームデータセットを構築した。さらに、それらのデータを用いて、ブレファリズマの交配フェロモン(ガモン2)の生合成に関わる酵素の同定とガモン2生合成経路の推定を行った。

研究成果の概要(英文)：The main aim of the present study was to conduct a comprehensive analysis to identify the key molecules involved in the mechanisms of sexual maturation, mating-type expression and the initiation of sexual reproduction (conjugation) in ciliate. We have used the putative ancestral species of ciliate, *Blepharisma stoltei*, in which conjugation is induced between complementary mating type cells, I and II, under food-deprived conditions. First, we produced progeny strains by crossing type I and II cells, and observed precisely their mating-type expression patterns during sexual maturation. Then, we performed de novo RNA-seq analysis to compare gene expression among sexually immature cells and mature-type I and II cells. Finally, from the constructed transcriptome data, we have identified the enzyme involved in the biosynthetic pathway of mating pheromone, gamone 2, which is a tryptophan-derivative compound secreted by type II cells.

研究分野：分子細胞生物学、原生生物学

キーワード：繊毛虫 接合 接合型 性成熟 交配フェロモン

1. 研究開始当初の背景

原生物織毛虫は、単細胞性の真核生物であり、ひとつの細胞から構成されている生物であるが、餌をとる細胞口や運動器官に相当する繊毛など、単一細胞内で構造的・機能的な著しい分化がみられる。大きな特徴として、二種類の核(大核と小核)をもち、体細胞系列と生殖系列が核レベルで分化している。多くの織毛虫は、富栄養条件下では二分裂によって増殖し、分裂回数を重ねるにつれて性的未熟期 - 成熟期 - 老衰期と発生段階を進行させるが、環境が変化し貧栄養状態になると性的成熟期にあった個体は異なる性(接合型)の細胞間で接合対を形成し、有性生殖(接合)を開始する。有性生殖過程へ入り接合を完了した個体は、それまでの分裂回数(分裂齢)をゼロにリセットし新しい世代へと生まれ変わる。

我々は、織毛虫の「接合開始の分子機構」や「性決定機構」の解明へ向けて、独特な有性生殖の形を残す織毛虫の中でも進化的に初期に分岐した種であり、原始的な特徴を保持していると考えられているプレファリズムを用いて研究を行っている。これまでに、主に、プレファリズムの接合誘導のシグナル因子である交配フェロモン(ガモン1)の単離・同定を行い、接合開始機構の分子レベルでの解析を進めてきた。織毛虫の中で、接合誘導因子が同定されている種はわずかであり、また比較的原始的な織毛虫であるプレファリズムは、交配フェロモンに他の織毛虫では見られない特異的な性質を残しており、接合形式にも独特な特徴が見られる。したがって、プレファリズムの接合開始機構や接合型決定機構の解明を目指すことによって、織毛虫の接合システムの多様性や原点を探るための貴重な知見が得られると期待している。

プレファリズムの接合は、相補的な接合型(I型、II型)細胞間で、交配フェロモン(ガモン1、ガモン2)を介した細胞間相互作用を経て開始される。研究開始当初の時点では、プレファリズムのガモン1、ガモン2の構造は決定されており、ガモン1は278アミノ酸からなる糖タンパク質、ガモン2はトリプトファン誘導体であることがわかっていた。また、プレファリズム属の複数種においてガモン1遺伝子の単離に成功しており、接合開始のキーファクターであるガモン1の発現が接合に必須である様々な内的・外的条件によって転写レベルで厳密に制御されていることが明らかとなっていた。さらに、ガモンは、相補的な接合型細胞に作用すると、一連の接合過程を制御している可能性のある接合関連遺伝子群の遺伝子発現を誘導すること、ガモン1遺伝子や接合関連遺伝子の一部には接合型特異的な発現パターンを示すものがあることなどが明らかになっていた。しかし、プレファリズムが、発生過程でどのように性成熟し、接合型を発現するのか、性成熟、接合型決定に関する分子レベルでの研究はほ

とんどされておらず、またガモン受容体や、ガモン2生合成酵素などの、ガモン以外の接合開始に關与する重要な因子については、ほとんど明らかになっていなかった。さらに、当時はプレファリズムのゲノムやトランスクリプトームなどの網羅的解析もほとんどされていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、研究期間内に以下の項目を行なうことを目的とした。

(1) プレファリズムにおける子孫株の樹立と性成熟過程の解析。プレファリズムの交配実験を行い、子孫株を樹立し、子孫株が発生過程において、どのように性成熟、接合型発現してくるかを解析する。

(2) 性的未熟期細胞と成熟期細胞における網羅的遺伝子発現解析。性成熟度や接合型の異なるプレファリズムを用いて、トランスクリプトーム解析を行う。得られたデータを整理し、性成熟や接合型の違いに注目したプレファリズムのトランスクリプトームデータセットを構築する。これによって、性成熟や接合型決定、および接合開始に關与する様々な候補因子の情報を得ることができると期待される。

(3) (2)のデータセットを用いて、接合型特異的発現を示す候補遺伝子を選別する。また、異なる接合型細胞間のヒストン修飾レベルを比較し、接合型特異的発現を示す遺伝子の発現制御にヒストン修飾が關与している可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) プレファリズムにおける子孫株の樹立と性成熟過程の解析。

プレファリズムの幾つかの種において接合を誘導し、正常に接合を完了し効率よく子孫株を樹立可能な株を選別する。樹立した子孫株を単離培養し、細胞分裂回数をモニターしながら、各分裂回数(分裂齢)における性成熟度、接合型を判定する。

(2) 性的未熟期細胞と成熟期細胞における網羅的遺伝子発現解析。

性成熟度が未熟期にある細胞(未熟期細胞)と、成熟期にある各接合型細胞(成熟I型細胞、成熟II型細胞)を調製し、これらの各細胞からRNAを抽出して、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行う。プレファリズムはゲノム情報が明らかになっていないため、まずは、参照配列に相当する配列情報を得るため、未熟期サンプルと成熟期サンプルから得られた配列情報を混合して、プレファリズムで発現されている全転写産物の情報を取得する。次に、未熟期細胞、成熟I型細胞、成熟II型細胞の各細胞における、全転写産物の発現量を解析し、比較する。

(3) 接合型特異的発現を示す候補遺伝子の選別と、それらの発現におけるヒストン修飾の関与の可能性。

ガモン1をはじめ、これまでに明らかにされている接合型特異的発現を示す遺伝子に加えて、(2)のトランスクリプトーム解析によって明らかになった転写産物の中から、接合型特異的な発現を示す可能性のある遺伝子を選別する。また、ブレファリズマでは接合型I型、II型の細胞共に、基本的に同じゲノムセットをもち、発現パターンの違いが接合型の違いを生じていると考えられていることから、まずは、主にヒストン修飾に注目し、I型細胞とII型細胞でヒストン修飾レベルの比較を行い、接合型特異的発現を示す遺伝子の発現制御にヒストン修飾が関与している可能性を検討する。

4. 研究成果

原生物織毛虫の有性生殖開始機構、性成熟および性決定機構の解明を目指して、原始的な織毛虫の一種であるブレファリズマを用いて研究を行い、研究期間内に以下のような成果を得た。

(1) ブレファリズマにおける子孫株の樹立と性成熟過程の解析。

本研究室で維持している複数のブレファリズマ株を用いて交配実験を行い、最も高い確率で接合を完了できることがわかった株の組み合わせを用いて、複数の子孫候補株を樹立した。正常な接合過程を経て樹立された子孫株は性的に未熟期にあり、その後分裂を繰り返すことによって発生過程(性成熟過程)を進行させると考えられている。そこで、樹立した各子孫候補株を単離培養し、細胞分裂回数をモニターしながらサンプリングを行い、その時点における性成熟度と接合型の判定を行った。その結果、約13回分裂時には接合活性がみられず、性的未熟期にあることが確認された株が7株得られ、少なくともこれらの7株は子孫株であることが確認された。

次に、これらの子孫株を長期的に継代培養し、分裂に伴う性成熟過程と接合型の発現パターンを詳細に調べた。その結果、今回得られたブレファリズマ(*Blepharisma stoltei*)の子孫株のほとんどは、15回分裂前後で接合反応を示しはじめ、ごく初期の成熟期には優先的に接合型I型を発現していることがわかった。その後、分裂回数が進むにつれて、単一クローン内でII型を発現する細胞が現れ、I型とII型が混在する状態になり、さらに分裂回数が進んで100回以上分裂した頃になると、クローン内のほとんどの細胞は接合型がII型に固定化されている傾向にあることがわかった。このように、ブレファリズマは性成熟過程において複雑かつ不安定な接合型発現パターンを示す可能性が示された。今回得られた結果が、ブレファリズマ属の中で共通し

て見られる現象なのか、種や株による特徴なのか、今後確認する必要がある。

(2) 性的未熟期細胞と成熟期細胞における網羅的遺伝子発現解析。

ブレファリズマの性成熟過程では、「性成熟に関与する因子」や「接合型発現に関与する因子」、「接合誘導に関連する因子」など、有性生殖に関与する多くの因子が発現されてくると考えられる。これらの遺伝子を網羅的に解析するため、(1)で樹立したブレファリズマ子孫株の未熟期の段階にある細胞(未熟期細胞)と性的に成熟期にあるI型細胞(成熟I型細胞)、II型細胞(成熟II型細胞)の3株からRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いてRNA-seq解析を行った(図1)。

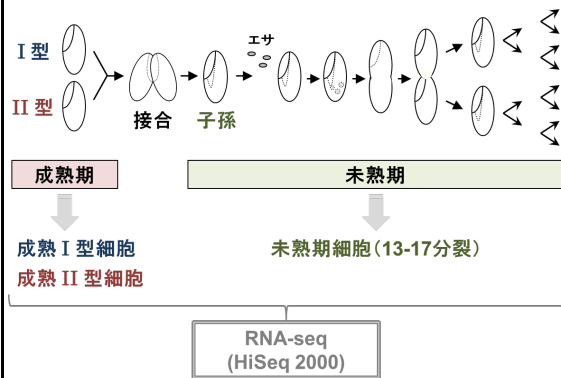


図1: 本研究で行ったブレファリズマのRNA-seq解析

得られた配列データを元にアセンブルを行った結果、今回用いたブレファリズマ細胞で発現されていた、およそ全ての転写産物に相当すると考えられる約57,000種類のコンティグの配列情報が得られた。次に、各コンティグの発現量を未熟期細胞、成熟I型細胞、成熟II型細胞間で比較し、その発現パターンを元に全データを整理し、最終的に性成熟度や接合型の違いを反映した、ブレファリズマのトランスクリプトームデータセットを構築した。このデータセットを元に、「性成熟」、「接合型」、「接合誘導」に関して重要なはたらきをもつ可能性がある様々な候補因子を得ることができ、今回構築したデータセットは、今後の研究の発展に大きく貢献することが期待される。

(3) 接合型特異的発現を示す候補遺伝子の選別と、それらの発現におけるヒストン修飾の関与の可能性。

(2)で構築したトランスクリプトームデータセットの中から、ある特定条件下でのみ特異的に発現上昇している遺伝子を抽出し、接合型特異的な発現を示す可能性のあるI型候補遺伝子、II型候補遺伝子を選別した。これら候補遺伝子が示す接合型特異的な発現にヒストン修飾が関与している可能性を探

るために、プレファリズマ属の複数種において I 型、II 型細胞を準備し、ヒストン修飾の検出に向けた条件検討を行ったが、研究期間内には、以下のような理由から有意な結果を得て議論するまでに至らなかった。

その理由としては、(2) のプレファリズマのトランスクリプトーム解析の結果、当初予想していた以上の興味深い結果が得られたことから、項目(2)の発展的な研究として、研究開始当初には計画していなかったが本研究課題の将来的な目標であった、以下(4)の研究課題を新たに計画し優先的に進めたためである。(4)の研究課題に関しては、研究期間内に大きく進展させることができ、その研究成果を2報の査読付き国際学術誌に掲載することができた。

(4) プレファリズマの接合開始に必須である交配フェロモン(ガモン2)の生合成に関わる酵素の同定と生合成経路の推定。

プレファリズマの II 型細胞が合成、分泌する交配フェロモン、ガモン2はトリプトファンから作られるアミノ酸誘導体である。ガモン2の生合成経路については、トリプトファン代謝経路を元に何通りか推定されているものの、ガモン2生合成に関与する酵素はまだひとつも同定されておらず、生合成経路も特定できていない。(2)で行ったプレファリズマのトランスクリプトーム解析の結果、プレファリズマは、トリプトファン代謝に関与する酵素のひとつとして知られる、インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase)を少なくとも4種類もっていることが明らかになった。これらの IDO 相同遺伝子がガモン2生合成に関わっている可能性を検討するため、遺伝子発現解析や酵素活性測定を行った結果、プレファリズマがもつ4つの IDO はそれぞれ異なる発現パターンや基質親和性を示し、その中のひとつ(IDO-I)がガモン2の生合成に関与していることが強く示唆された。プレファリズマの IDO-I は、他の IDO とは異なり、トリプトファン(L-Trp)に対してほとんど触媒活性を示さず、5-ヒドロキシトリプトファン(5-HTP)に対して高い触媒活性を示すという特徴的な基質親和性を示した。本研究期間中に、高知大学湯浅創准教授との共同研究によって、この IDO-I のもつ特異的な基質親和性に寄与するアミノ酸残基を生化学的実験によって特定することに成功した。また、本研究によって、トリプトファンからガモン2が生合成される過程で、5-HTP が中間産物となっていると考えられ、この結果とトリプトファンの一般的な代謝経路を元にガモン2生合成経路を推定した。

本研究によって、繊毛虫プレファリズマのガモン2生合成に関わる酵素、IDO-I が初めて同定され、その特性が明らかとなった。本研究で構築した、性成熟や接合型の違いを反映させたプレファリズマのトランスクリプ

トーム解析データを用いることによって、今後もプレファリズマの性成熟、接合型、接合誘導に関わる様々な重要な因子の同定を進めたいと考えている。

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4件)

Yuasa HJ, Sugiura M, Harumoto T. A single amino acid residue regulates the substrate affinity and specificity of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 査読有, 640, 1-9. (2018)
DOI: 10.1016/j.abb.2017.12.019

Sugiura M, Yuasa HJ, Harumoto T. Novel specificity of IDO enzyme involved in the biosynthesis of mating pheromone in the ciliate *Blepharisma stoltei*. *Protist*, 査読有, 168(6), 686-696. (2017)
DOI: 10.1016/j.protis.2017.09.003

Sugiura M, Yamanaka M, Suzaki T, Harumoto T. Rapid response to nutrient depletion on the expression of mating pheromone, gamone 1, in *Blepharisma japonicum*. *Jpn. J. Protozool.*, 査読有, 49(1,2), 27-36. (2016)
DOI: https://doi.org/10.18980/jjprotozool.49.1-2_27

Kobayashi M, Miura M, Takusagawa M, Sugiura M, Harumoto T. Two possible barriers blocking conjugation between different megakaryotypes of *Blepharisma*. *Zoological Science*, 査読有, 32, 53-61. (2015)
DOI: 10.2108/zs140151.

[学会発表](計12件)

杉浦真由美、プレファリズマの環境応答「共食い・接合・休眠」、日本動物学会第88回大会、シンポジウム「原生生物の魅力と研究材料としての有用性」、富山市、2017年9月21日~23日

杉野亜優、杉浦真由美、春本晃江、繊毛虫 *Blepharisma* 属における異種間接合を防ぐ仕組みの解明に向けて、第50回日本原生生物学会大会・第1回日本共生生物学会大会合同大会、つくば市、2017年11月17日~19日

湯浅創、杉浦真由美、春本晃江、トリプトファン分解酵素の分子進化の新局面 IX、2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸市、2017年12月6日~9日

杉浦真由美、湯浅創、春本晃江、繊毛虫プレファリズマにおいてガモン2生合成に関与する新規 IDO の同定、日本原生生物学会第49回大会、岡山市、2016年10月8日~10日

杉野亜優、杉浦真由美、春本晃江、繊毛虫 *Blepharisma* の異なる megakaryotype 間での異種間接合、日本原生生物学会第49回大会、岡山市、2016年10月8日~10日

Sugiura M and Harumoto T. Mating type expression during sexual maturation in *Blepharisma stoltei*. Ciliate Molecular Biology Conference, Camerino, Italy, July 10-16, 2015

Kobayashi M, Nishihara Y, Miura M, Takusagawa M, Sugiura M, Harumoto T. Mating pheromone gamone 1 plays an important role in speciation of the ciliate *Blepharisma*. Ciliate Molecular Biology Conference, Camerino, Italy, July 10-16, 2015

春本晃江、小林真弓、杉浦真由美、篠原きよの、田草川真里、繊毛虫ブレファリズマにおける交配フェロモンの多様性と種分化、日本動物学会第 86 回大会、新潟市、2015 年 9 月 17 日～19 日

杉浦真由美、春本晃江、ブレファリズマの性成熟過程における接合型発現パターンと遺伝子発現解析、日本原生生物学会第 48 回大会、東京都、2015 年 11 月 6 日～8 日

杉浦真由美、Molecular mechanism of induction of sexual reproduction in the ciliates. 第 37 回日本分子生物学会年会、ワークショップ「原生生物～モデル生物としての大いなる可能性を探る～」招待講演、横浜市、2014 年 11 月 25 日～27 日

春本晃江、山岸由和、岩崎祥子、杉浦真由美、小林真弓、飯尾英夫、ブレファリズマの交配フェロモン（ガモン 1）の糖鎖構造とその役割、日本原生生物学会第 47 回大会、仙台市、2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日

小林真弓、田草川真理、杉浦真由美、春本晃江、繊毛虫 Blepharisma 属における交配フェロモン gamone1 の多様性と種分化、日本原生生物学会第 47 回大会、仙台市、2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 真由美 (Sugiura Mayumi)
奈良女子大学・自然科学系・准教授
研究者番号：60397841

(2) 連携研究者

春本 晃江 (Harumoto Terue)
奈良女子大学・自然科学系・教授
研究者番号：80198936

(3) 研究協力者

湯浅 創 (Yuasa Hajime J)
高知大学・理工学部・准教授
研究者番号：40322797