

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06734

研究課題名(和文) 同型・異型配偶境界生物間の遺伝子発現プロファイル比較で解く雌雄性出現の分子基盤

研究課題名(英文) Reconstruction of gametic sexual dimorphism on the basis of transcriptomic profile analysis of volvocine algae

研究代表者

浜地 貴志 (HAMAJI, TAKASHI)

京都大学・理学研究科・特定研究員

研究者番号：10784556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：同型配偶ヤマガシエラと異型配偶ユードリナのそれぞれ両性の全ゲノム配列アセンブリの解析によって、研究代表者はこれらの生物の性決定領域を同定した(Hamaji et al 2018 Commun Biol)。特に異型配偶を獲得した直後に分岐したユードリナの性決定領域のサイズがオスでは7 kb、メスでは90 kbと極めてコンパクトで、それぞれの性で3つの遺伝子がコードされているに過ぎなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この成果によって、二億年という短い期間で多様化した近縁なボルボックス系列緑藻系統の間で、祖先的な同型配偶から派生的な異型配偶そして卵生殖の生物それぞれの性決定領域の構造が明らかにされたのである。近縁な系統の間での同型配偶・異型配偶・卵生殖の性決定領域の構造の比較は、真核生物の広大な系統の中でも初めてのものであり、ボルボックス系列緑藻で初めて可能となったものであると言える。

研究成果の概要(英文)：Anisogamy emerged in volvocine algae within 200 million years from ancestral isogamous algae. Therefore the comparative omics approaches in volvocine algae should clarify why and how the sexual dimorphism appeared evolutionarily. The present research showed that sex determining regions of anisogamous Eudorina and isogamous Yamagishiella were relatively compact and only two sex-specifically encoded genes: MID in male/minus and FUS1 in female/plus.

研究分野：性進化学

キーワード：異型配偶 卵生殖 同型配偶 クラミドモナス ボルボックス 進化 転写因子

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

1. 研究開始当初の背景

全ての真核生物のうちで、多細胞化と共に同型配偶から異型配偶化を経て卵生殖へと進化した過程が段階を追って現存しているのは、ボルボックス系列緑藻に限られる。単細胞から群体性を含むボルボックス系列には、配偶子形態の二極化を分子生物学的に研究するためのモデル系統群としての性格を三つ有する。第一は、この系統では(近縁なクラミドモナス含め)ゴニウムやパンドリナの同型配偶から、ユードリナやプレオドリナの異型配偶、ボルボックスの卵生殖に到るまで、有性生殖様式に関して同型配偶型の生物(プラスとマイナスの交配型)から異型配偶の生物が分岐して卵生殖が獲得される(雌と雄の性)までの進化的に途中段階にあたる生物が現存し、分子生物学的な比較が容易である(Kirk 2006, Curr. Biol.)。第二に、近縁な単細胞性の緑藻クラミドモナスで、様々な性特異的遺伝子が同定され、有性生殖の分子機構に関する知見が蓄積されている(Goodenough et al. 2007 Semin. Cell Dev. Biol.)。第三に、同型配偶クラミドモナスとゴニウム、卵生殖ボルボックスでゲノム配列が報告され(Marchant et al. 2007 Science; Prochnik et al 2010 Science; Hanschen et al 2016 Nat Commun・応募者は第4著者)、米国 Joint Genome institute と NCBI GenBank においてゲノムデータベースが公開され、比較ゲノム学的なアプローチが可能となっている。また同型配偶ヤマギシエラと異型配偶ユードリナでも、*de novo* 全ゲノム配列解読が進行し、研究代表者も参画して両性の核ゲノム全配列が決定しており(新学術ゲノム支援による)今後の遺伝子発現プロファイル決定が待たれていた。

クラミドモナスには、「性別」を決定する染色体の一領域である性決定領域が存在し、これは動物の性染色体や酵母の MAT 遺伝子座に例えられる(Ferris and Goodenough, 1994, Cell; Ferris et al., 2002, Genetics)。この領域にはプラス型・マイナス型それぞれの「性」に特有の遺伝子が存在する。特に、マイナス型優性遺伝子(MID 遺伝子)はマイナス型の性決定領域にだけ存在する(Ferris and Goodenough, 1997, Genetics)。MID 遺伝子機能欠損変異体は不完全なプラス型として挙動し、接合が不能となることから、性別の主要決定因子であると考えられている。性の分化において最も重要な因子である、単細胞性緑藻クラミドモナスのマイナス交配型決定因子 MID と性認識タンパク質 FUS1 の同定の後、群体性ボルボックス目でホモログの探索は成功しなかった(Ferris et al. 1997, PNAS)。この状況を打開すべく、研究代表者の当時所属していた東京大学大学院理学系研究科多様性起源学研究室の野崎久義准教授は、マイナス交配型決定因子 MID が「RWP-RK ドメイン」と呼ばれる bZIP 型ロイシンジッパー構造をクラミドモナスホモログ間で保存していることに注目し、保存配列に対応した縮重プライマーによる RT-PCR を用いて群体性ボルボックス目の異型配偶・球形群体性緑藻プレオドリナ雄性配偶子(精子)から MID オーソログ「OTOKOGI」を同定した(Nozaki et al. 2006 Curr. Biol.)。引き続き研究代表者が同型配偶のゴニウムと卵生殖のボルボックスで MID を同定することで、両生物の性決定領域全体の遺伝子構成の決定につながった(Hamaji et al 2008 Genetics; 2016a G3; Ferris et al 2010 Science)。

このようにして、研究開始までの 10 年間で、研究代表者が中心となったボルボックス系列緑藻における性決定領域のゲノム学は飛躍的に進展していた。しかし、これらは配列レベルの比較に留まり、発現量データ・タンパク質相互作用解析に基づく分子基盤動態の決定には至っていない。有性生殖時のトランスクリプトーム解析も、研究代表者らによって同型配偶のクラミドモナスで報告されているものの、ボルボックス系列では雌雄性が出現する以前の基部で分岐している。雌雄性の出現イベント前後のヤマギシエラとユードリナで性決定領域を同定し、ボルボックス系列緑藻の同型・異型配偶生物間で遺伝子発現プロファイルを比較することによって、雌雄二極化に関与する遺伝子群をあぶり出し、ゲノム編集や網羅的挿入変異体ライブラリーを利用した逆遺伝学的アプローチを用いることによって、精子と卵の二極化をもたらした分子基盤が解明できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、祖先型の同型配偶の中から派生的な異型配偶が出現した過程が全真核生物の系統のうちで唯一現存している、ボルボックス系列緑藻での有性生殖の進化生物学的研究を背景として、同型・異型配偶生物の栄養生殖と有性生殖の遺伝子発現プロファイルを相互に比較解析することにより、雌雄性の進化の直接の原因となった候補遺伝子(群)を抽出したうえで分子遺伝学的手法によって検証し、雌雄二極化を分子基盤から実証することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は雌雄性の進化の直接の原因となった遺伝子(群)の変化を特定することを目的とする。従って、雌雄性の出現前後における同型配偶のヤマギシエラと異型配偶のユードリナの間で、プラス・マイナス、または雌雄の栄養生殖時と有性生殖時、合計 8 条件で RNA-seq を実施することを目指した。そのために必要なおのおのの生物の両性の性決定領域を同定して決定し、そこにコードされた遺伝子群を比較した。そしてこれらをベースとして、各生物で有性生殖時に片方の性でのみ発現する遺伝子群を抽出し、相同な性(プラスと雌、マイナスと雄)の間で、この遺伝子群で増減したものを見出すことを企図した。見出された遺伝子群については、モデル緑藻の逆遺伝学的アプローチによる実験的な検証を目指した。

4. 研究成果

同型配偶ヤマギシエラと異型配偶ユードリナのそれぞれ両性の全ゲノム配列アセンブリの解析によって、研究代表者はこれらの生物の性決定領域を同定した(Hamaji et al 2018 Commun Biol)。この成果によって、生物学史上で初めて、近縁な系統の間で祖先的な同型配偶から派生的な異型配偶そして卵生殖の生物それぞれの性決定領域の構造が明らかにされたのである。特に異型配偶を獲得した直後に分岐したユードリナの性決定領域のサイズがオスでは7 kb、メスでは90 kbと極めてコンパクトで、それぞれの性で3つの遺伝子がコードされているに過ぎなかった。雌雄でコードされている遺伝子の違いとして、オスで性決定転写因子 *MID* ホモログが、そしてメスにおいて異型配偶で初めて配偶子膜局在タンパク質コード遺伝子 *FUS1* ホモログが同定された。この異型配偶の系統に最近縁な同型配偶ヤマギシエラにおいても、プラス型で *FUS1*、マイナス型で *MID* がそれぞれコードされていた。両生物ともにこれ以外の性特異的コード遺伝子は見出されなかった。性特異的発現遺伝子の機能解析については、現在までに既に公表されているクラミドモナス配偶子特異的遺伝子発現プロファイル (Joo, Nishimura, et al 2017 Plant Physiol) をベースとして、クラミドモナスにおけるゲノム編集手法 (Greiner et al 2017 Plant Cell) の応用による遺伝子破壊とその配偶子分化における寄与を試みている。また同時に、性決定転写因子 *MID* の相互作用因子を探索するために現在、酵母ツーハイブリッド法を応用した相互作用解析を進めているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1. Gaouda H, Hamaji T, Yamamoto K, Kawai-Toyooka H, Suzuki M, Noguchi H, Minakuchi Y, Toyoda A, Fujiyama A, Nozaki H, Smith DR (2018) Exploring the limits and causes of plastid genome expansion in volvocine green algae. *Genome biology and evolution* 10(9):2248-2254 doi:10.1093/gbe/evy175 査読あり
2. 浜地貴志, 西村芳樹 (2018) ゲノム編集の時代における「緑の酵母」クラミドモナスの復権. *生物工学会誌* 96(8):475. https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9608/9608_biomed_4.pdf 査読無し
3. Tsuchikane Y, Hamaji T, Ota K, Kato S (2018) Establishment of a clonal culture of unicellular conjugating algae. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* (137): e57761. DOI:10.3791/57761 査読有り
4. Hamaji T, Kawai-Toyooka H, Uchimura H, Suzuki M, Noguchi H, Minakuchi Y, Toyoda A, Fujiyama A, Miyagishima S, Umen JG, Nozaki H (2018) Anisogamy evolved with a reduced sex-determining region in volvocine green algae. *Communications Biology* 1:17. doi:10.1038/s42003-018-0019-5 査読あり
5. Yamamoto K, Kawai-Toyooka H, Hamaji T, Tsuchikane Y, Mori T, Takahashi F, Sekimoto H, Ferris PJ, Nozaki H (2017) Molecular evolutionary analysis of a gender-limited MID ortholog from the homothallic species *Volvox africanus* with male and monoecious spheroids. *PLOS ONE* 12(6):e0180313. doi:10.1371/journal.pone.0180313 査読あり
6. Hamaji T, Kawai-Toyooka H, Toyoda A, Minakuchi Y, Suzuki M, Fujiyama A, Nozaki H, Smith DR (2017) Multiple independent changes in mitochondrial genome conformation in chlamydomonadalean algae. *Genome Biology and Evolution* 9(4):993-999. DOI:10.1093/gbe/evx060 査読あり
7. Grochau-Wright ZI, Hanschen ER, Ferris PJ, Hamaji T, Nozaki H, Olson BJSC, Michod RE (2017) Genetic basis for soma is present in undifferentiated volvocine green algae. *Journal of Evolutionary Biology* 30(6):1205-1218. doi:10.1111/jeb.13100 査読あり

〔学会発表〕(計14件)

1. 山本荷葉子, 浜地貴志, 豊岡博子, 野口英樹, 水口洋平, 豊田敦, 野崎久義 (2019) *Volvox* 属 *Merrillosphaera* 節における性染色体領域の拡大. 日本藻類学会第43回大会(京都).
2. 西村芳樹, 小林優介, 浜地貴志, 鹿内利治. (2019) 葉緑体核様体のかたちを司る DNA リガーゼの同定. 第60回日本植物生理学会年会(名古屋).
3. 山本荷葉子, 浜地貴志, 豊岡博子, 新垣陽子, 野口英樹, 豊田敦, 水口洋平, 野崎久義 (2018) 雌雄異株種・同株種ボルボックスの性染色体領域・相同領域における比較ゲノム解析. 日本植物学会大会第82回大会(広島).
4. 浜地貴志, 山岡尚平, 鹿内利治, 西村芳樹 (2018) 母性遺伝メカニズムの解明に向けたクラミドモナス有性生殖のゲノム編集アプローチ. 日本植物学会大会第82回大会(広島).
5. 豊岡博子, 豊岡博子, 浜地貴志, 西村芳樹, 宮城島進也, 箕浦高子, 野崎久義 (2018) ボルボックス系列異型配偶ユードリナにおける配偶子誘導要因の解析. 日本植物学会大会

第 82 回大会（広島）。

6. 西村芳樹, 浜地貴志, 小林優介, 鹿内利治 (2018年9月) 葉緑体核様体ネットワークの動態制御機構。日本植物学会大会第 82 回大会（広島）。
7. 浜地貴志, 豊岡博子, 鈴木雅大, 野崎久義 (2018年3月) 雌雄性の獲得と性染色体領域の進化。日本植物分類学会大会第 17 回大会（金沢）。
8. 浜地貴志。(2017) ボルボックス系列緑藻の性決定ゲノム領域と性の進化 第二回・性と生殖の懇談会。
9. 豊岡博子, 浜地貴志, 他, 野崎久義。(2017) ボルボックス系列緑藻を用いた異型配偶化の解析：縮小した性決定領域を持つ異型配偶ユードリナ。日本植物学会第 81 回大会（野田）。
10. 浜地貴志, 豊岡博子, 豊田敦, 水口洋平, 鈴木雅大, 藤山秋佐夫, 野崎久義, SMITH, David Roy。(2017) *de novo* ゲノム配列決定で明らかになったボルボックス科緑藻におけるミトコンドリア DNA 形状の進化過程。日本植物学会第 81 回大会（野田）。
11. Tyagi A, Hamaji T, Kawai-Toyooka H, Suzuki M, Noguchi H, Minakuchi Y, Toyoda A, Fujiyama A, Nozaki H, Olson BJSC。(2017) The volvocales genomes project. The Fourth International *Volvox* Conference。
12. Yamamoto K, Hamaji T, Kawai-Toyooka H, Noguchi H, Minakuchi Y, Toyoda A, and Nozaki H。(2017) Mating type locus-like regions in the homothallic species *Volvox africanus*. The Fourth International *Volvox* Conference。
13. Hamaji T, Kawai-Toyooka H, Uchimura H, Suzuki M, Noguchi H, Minakuchi Y, Toyoda A, Fujiyama A, Miyagishima S, Umen J, and Nozaki H。(2017) Anisogamy evolved with the reduced sex-determining region. The Fourth International *Volvox* Conference。
14. Kawai-Toyooka H, Hamaji T, Uchimura H, Suzuki M, Noguchi H, Minakuchi Y, Toyoda A, Fujiyama A, Miyagishima S, Nozaki H。(2017) Identification and Characterization of Gamete Adhesion Factor FUS1 Orthologs in Isogamous *Yamagishiella* and Anisogamous *Eudorina*. The Fourth International *Volvox* Conference。

6. 研究組織

該当なし

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。