

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14690

研究課題名(和文)アオサ藻綱スジアオリから見る配偶子の「認識」と「融合」のメカニズム

研究課題名(英文)The mechanism of recognition and fusion in Ulva gametes

研究代表者

市原 健介 (ICHIHARA, Kensuke)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・特任助教

研究者番号：60610095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生殖過程の分子機構の研究が遅れているアオサ藻綱を材料とし、配偶子の相互認識や融合に関するタンパク質を探索した。RNA-seqおよびプロテオーム解析から(1)配偶子形成過程の発現遺伝子カタログ、(2)雌雄配偶子、二本鞭毛性遊走子の鞭毛タンパク質、細胞膜タンパク質のカタログを作成し、GCS1やGEX2といった陸上植物で受精に関与する遺伝子が検出された。さらに、遺伝子機能の解析が困難であったアオサ藻綱における(3)Crispr-Cas9の実験系を構築することに成功し、(4)GEX2のホモログの欠損変異体を作出したところ、受精率の著しい低下が観察され、受精に関与する遺伝子を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複雑な構造を持つ顕花植物ではなく生殖細胞が組織に覆われていない藻類を用い、受精の研究することで、植物の生殖細胞の相互認識や細胞の融合に関する新たな知見を得ることができると考えられる。本研究によって明らかになりつつある緑色植物の受精の基本原則の解明は、陸上植物の育種にも応用が可能であろうと考えられる。また日本は海に囲まれた海洋国家であるが、その沿岸域に生育する海藻類の応用研究が遅れている。本研究結果は藻類の生殖機構を明らかにするもので、藻類バイオマスを利用した二酸化炭素固定などの環境問題対策にも利用できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the proteins involved in the recognition and the fertilization between male and female gametes in Ulvophyceae, whose molecular mechanisms of reproductive processes have been poorly understood, were searched. At first, transcriptomic analysis during gametogenesis and proteomic analysis in flagellar and plasma membrane of male and female gamete was carried out. Through these analyses, genes involved in fertilization in land plants, such as GCS1 and GEX2 were detected. Furthermore, the genome-editing experiment for gene function analysis in Ulva was tried to establish. Polyethylene glycol (PEG)-mediated transfection method made it possible to efficiently deliver the preassembled CRISPR/Cas9 RNP to Ulva gametes. By this genome-editing method, gex2 deficient male mutants were obtained and male gametes released from these mutants can't fertilize with female gametes. The results suggest that GEX2 is a conserved gene that controls fertilization in the green plant lineage.

研究分野：藻類学

キーワード：有性生殖 アロ認証 海藻 進化

1. 研究開始当初の背景

本研究の材料である藻類、特にアオサ藻綱では同形配偶子接合、異形配偶子接合から卵生殖という雌雄の配偶子サイズの二形化の進化的中間体と言える様々な生殖様式を示すグループが含まれている。正の走光性を持つアオノリの雌雄配偶子は水面に集まることでランダムに出会い、お互いの鞭毛の接触により同種の異性と認識されると、その直後に配偶子の融合が始まる。融合は細胞前端部にある接合装置と呼ばれる構造から始まり、この構造はアオサ藻綱の同形配偶子接合や異形配偶子接合をおこなう多くの種で保存的である (Fig. 1)。位置は雌雄で非対称性があり、雄(または mt-)では眼点と反対側に、雌(または mt+)では眼点の側に配置されている。

洗練された動物の精子と卵による受精や陸上植物の重複受精と比べると、スジアオノリの配偶子接合は非常に単純で原始的にみえる。しかし有性生殖の根幹である配偶子間の「認識」と「融合」の仕組みは、鞭毛と接合装置により十分に機能していることがわかる。一方で、この一連の接合反応に機能しているタンパク質や遺伝子については全く明らかになっていなかった。

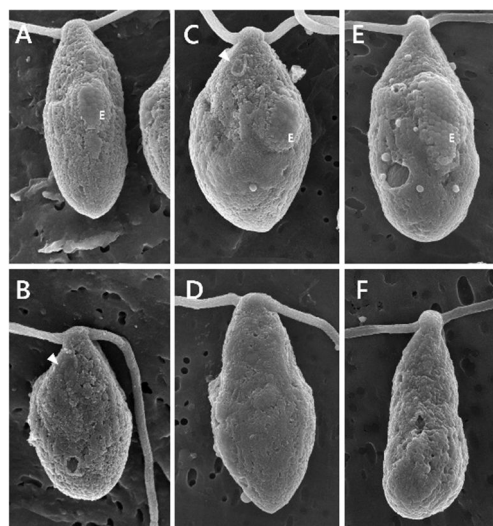


Fig. 1 雌雄配偶子と無性配偶子の構造
雄性配偶子 (A, B)、雌性配偶子 (C, D)、無性型二本鞭毛遊走子 (E, F)。図中 E は眼点を示す。配偶子には矢頭で示した位置に接合装置が存在するが、無性型二本鞭毛遊走子には確認できない。

2. 研究の目的

本計画の目的は、生殖過程の分子機構の研究が遅れているアオサ藻綱を材料とし、配偶子の相互認識や融合に関与する新規タンパク質を探索することで、真核生物全体の有性生殖進化に新たな視点をもたらすことである。原始的な雌雄であるスジアオノリのアロ(同種異個体)認証に関わるタンパク質や接合装置の構造タンパク質を網羅的に見つけることができれば、雌雄性というものがどのような構造の違いや性質の違いから始まったものであるか、また配偶子の融合に重要な役割をもつタンパク質を知ることができ、藻類だけでなく、陸上植物や動物での受精の研究にも大きな影響を与えられるだろう。

3. 研究の方法

アオサ藻綱スジアオノリのわずかに異形化した雌雄配偶子と、無性化し接合装置を失ったように見える二本鞭毛無性遊走子を用いて、鞭毛の接触による同種異性の「認識」と雌雄配偶子の「融合」がどのような分子機構によって実現されているのかを明らかにするために以下の実験をおこなった。

まず、雌雄配偶子の形成過程において発現している遺伝子情報を得ることを目的として、葉状体に配偶子形成誘導処理を施し、経時的にサンプリングを行い、配偶子形成過程におけるトランスクリプトーム解析を行った。

次に、雌雄配偶子の構造的な差異が集約されていると思われる鞭毛と細胞膜を単離し、プロテオームによる比較解析を計画した (Fig. 2)。雌雄配偶子および二本鞭毛性遊走子を回収し、カルシウムイオンショックと物理的ショックを組み合わせ、それぞれの細胞から鞭毛のみを単離した。また水性二層分配法を利用し、配偶子および遊走子細胞膜を単離した。これら鞭毛および細胞膜由来のタンパク質に対して、LC-MS/MS によるショットガン分析を行った。タンパク質同定のためのデータベースは上述のトランスクリプトームデータの de novo アセンブリとした。

これまで海藻類では逆遺伝学的な手法の開発が遅れており、それぞれの候補遺伝子が発見できても機能解析ができないと考え、ゲノム編集実験系の確立も試みた。最初に、効率的なゲノム編集株のスクリーニング系を作出するため、プリンサルベージ経路に関与する adenine phosphoribosyltransferase (APT) を標的とした実験を計画した。APT は

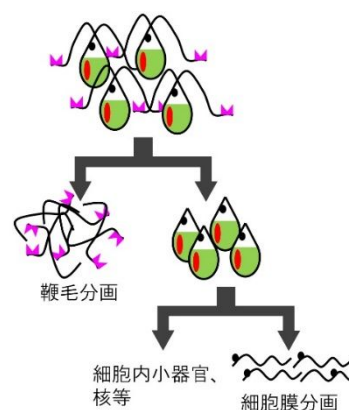


Fig. 2 鞭毛と細胞膜の単離のフローチャート
雌雄配偶子と無性型二本鞭毛遊走子を回収し、まず鞭毛を単離する。さらに細胞を破碎し、細胞膜分画を回収し、プロテオミクスをおこなう。

選択マーカー遺伝子として知られており、野生株はアデニンアナログである 2-Fluoroadenine (2-FA) 存在下では生育できないが、ゲノム編集によって APT の機能が欠損した株は 2-FA を含む培地で生育できる。Cas9 タンパク質と gRNA からなる RNP 複合体をスジアオリ配偶子へ導入するための手法は、アオリ配偶子の形質転換法として高い効率が確認されているポリエチレングリコール(PEG)法(Suzuki et al. 2016 *Phycol. Res.* 64: 176-184)を応用した。

4. 研究成果

(1) 配偶子形成過程のトランスクリプトーム解析

雌雄の葉状体(配偶体)に配偶子形成誘導を行い、配偶子形成途上の細胞から RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析を行うことで、雌雄配偶子形成時の網羅的な発現遺伝子カタログを作成することを試みた。雌雄それぞれ、配偶子形成誘導後 48、52、56、72 時間後にサンプリングを行いそれぞれ 8.0 Gb のデータを得た。雌雄ごとに 4 タイムポイントのデータを統合し、de novo アセンブリした後に、CD-HIT(Li & Godzik 2006 *Bioinformatics* 22: 1658-9)を用いて、雌雄それぞれから得られたコンティグを整理したところ、111,421 個の転写産物が同定できた。この遺伝子群の中には植物受精因子 GEX2 に類似性を示す遺伝子、雌雄配偶子の融合に関与すると思われる GCS1 様遺伝子、さらにクラミドモナスの鞭毛で接合型の認識に関与すると考えられているアグルチニンタンパク質に相同性を示す遺伝子も含まれおり、アオサ藻綱で初めてアロ認証や受精に関わる多くの候補遺伝子が単離された。

(2) 雌雄配偶子と二本鞭毛遊走子からの鞭毛と細胞膜の単離とプロテオミクス解析

当該年度は主に配偶子、二本鞭毛性遊走子から鞭毛を単離し、LC-MS/MS によるショットガン分析をおこなった。褐藻ワタモでの鞭毛単離の手法(Fu et al. 2014 *Protist* 165: 662-675)を参考に、EGTA の濃度を調整することでスジアオリの配偶子および遊走子から鞭毛を単離する手法を開発した。雌雄配偶子および二本鞭毛性遊走子から単離した鞭毛をプロテオーム解析したところ、全体で 976 個のタンパク質を同定することができた。このうち 375 個は雌雄配偶子および二本鞭毛性遊走子で共通性がみられた。この中には鞭毛構成タンパク質が多く含まれていたが、解糖系に関わる酵素も同様に含まれており、アオサ藻綱の鞭毛運動は解糖系からのエネルギーが利用されている可能性が示唆された。また雄特異的タンパク質が 37 個、雌特異的タンパク質が 102 個同定された。

雌雄配偶子の細胞膜のプロテオーム解析では、全体で 3768 個のタンパク質が検出され、雄特異的タンパク質が 195 個、雌特異的タンパク質が 189 個検出された。トランスクリプトーム解析で見出された GEX2 様タンパク質は雄の配偶子膜のみに特異的に検出され、アオサ藻綱の受精においても陸上植物と同じ遺伝子が同様の機能を持つことが示唆された。

(3) Crip-Cas9 系によるゲノム編集実験の確立

PEG 法により、APT 遺伝子をターゲットとした RNP 複合体を処理したスジアオリ配偶子は 2-FA を含む培地で多数の個体が葉状体へと発生し、これらの個体では APT 遺伝子に様々な変異が導入されていることが確認された。次に、Cas9 による DNA 二重鎖切断と一本鎖オリゴを利用して、蛍光タンパク質を内在遺伝子に連結し、発現させる系の構築を試みた(Fig. 3)。一本鎖オリゴで外来遺伝子をゲノムへ導入する系は哺乳類では盛んに研究されている(Yoshimi et al. 2015 *Nat. commun.* 10431)。本実験では植物の高発現遺伝子として知られる *rbcS*(ルビスコ小サブユニットをコードし、タンパク質は藻類ではピレノイドに集積する)をターゲットとした。*rbcS* に GFP を連結するために、*rbcS* の終止コドン付近に gRNA を設計し、*rbcS* と GFP の塩基配列を 50 塩基ずつ含む一本鎖オリゴを 5'側、3'側にそれぞれ合成した。RNP と 2 本の一本鎖オリゴ、PCR で増幅した GFP 塩基配列フラグメントを同時に配偶子へ導入したところ、ピレノイドに GFP シグナルが局在している個体が観察された。このことは *rbcS* に GFP が連結され、正常に発現していることを示唆している。また 8 株の GFP 発現個体の配列を確認したところ、50 % (4/8 個体)という高い効率で当初のデザイン通りの配列を有する遺伝子挿入株が得られていた。これらゲノム編集に関わる結果は現在論文として投稿する準備をほぼ終えている。

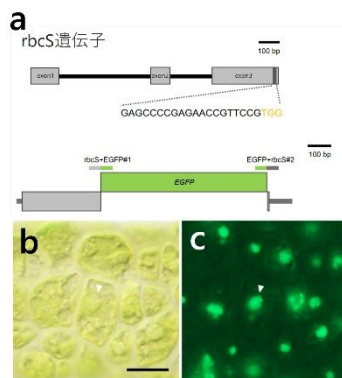


Fig. 3 ゲノム編集を利用した外来遺伝子の挿入。a. 実験のデザイン。b. *rbcS*-GFP 株の細胞の光学顕微鏡像。c. 蛍光顕微鏡像。ピレノイドに GFP が集積している。

(4) ゲノム編集による変異体の作出と表現型解析

雄配偶子の細胞膜に特異的に局在することが示唆された GEX2 遺伝子について、ゲノム編集によりノックアウト個体の作出を試みた。スクリーニングのために、APT 遺伝子を標的とした RNP を同時に導入し、2-FA による選抜を行った。得られた 2-FA 耐性株を単離し、GEX2 遺伝子の配列を確認したところ、71 % (5/7 個体)で GEX2 遺伝子の配列にも変異が導入されていた。この *gex2* 変異体(*gex2-1*、*gex2-2*)由来の雄配偶子と *rbcS*-EGFP 形質転換体の雌配偶子で掛け合わせの接合実験を行ったところ、両変異体(*gex2-1*、*gex2-2*)ともに雌配偶子と

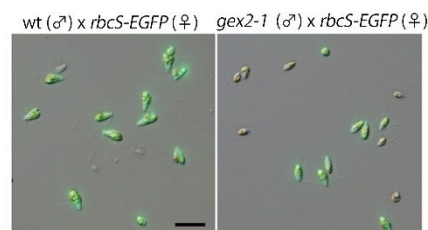


Fig. 4 *gex2* 変異体の表現型解析。雌雄配偶子の区別のために *rbcS*-EGFP 株の雌配偶子と接合実験をおこなった。

の凝集反応は起きていたが、接合子の形成は観察されず、細胞融合が阻害されていることが示唆された(Fig. 4)。今後、GEX2の局在解析等、さらなる実験が必要ではあるが、GEX2遺伝子は植物の系統では非常に広く保存された雄側の受精をコントロールする重要な因子であることが示唆された。

以上の研究から、アオサ藻綱のアロ認証・受精の分子メカニズムについて、(1)配偶子形成過程の発現遺伝子カタログ、(2)雌雄配偶子、二本鞭毛性遊走子の鞭毛タンパク質、細胞膜タンパク質のカタログを作成することに成功した。さらに、これまで逆遺伝学的な手法がなく、遺伝子機能の解析が困難であったアオサ藻綱における(3)Crispr-Cas9の実験系を構築することに成功し、(4)実際に、トランスクリプトーム、プロテオーム解析から見出されたGEX2の欠損変異体も得ることができた。雄の*gex2*変異体では受精率の著しい低下が観察されたことから、アオサ藻綱と陸上植物の間で保存的な受精を司る分子メカニズムが存在することが示唆された。またこのゲノム編集技術により、アオサ藻綱でも任意の遺伝子の欠損変異体の作出や蛍光タンパク質の付加等が可能となり、本生物群の様々な研究が加速度的に進捗することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shinichi Miyamura, Kensuke Ichihara, Tomokazu Yamazaki, Kazuyoshi Kuwano & Shigeyuki Kawano.	4. 巻 84
2. 論文標題 Visualization of Gamete Mating Structure of Marine Green Alga by FE-SEM.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytologia	6. 最初と最後の頁 191-192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1508/cytologia.84.191	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 -

〔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 市原健介、山崎誠和、河野重行
2. 発表標題 緑藻スジアオノリにおけるゲノム編集技術の確立と応用
3. 学会等名 日本藻類学会第45回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎誠和、市原健介、桑野和可、宮村新一、河野重行
2. 発表標題 日本沿岸域に生育する2種のアオノリの比較ゲノム解析
3. 学会等名 日本藻類学会第44回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎誠和、市原健介、桑野和可、宮村新一、河野重行
2. 発表標題 アオサ藻綱アオサ目に属するショウジョウアオノリとスジアオノリの比較ゲノム解析
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤康太、市原健介、大田修平、山崎誠和、工藤恭子、宮村新一、平田愛子、河野重行
2. 発表標題 アオノリの雌雄性と接合初期から葉状体発達過程における雌雄オルガネラの排除と選択
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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