

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06827

研究課題名(和文) ヒメミカツキモの染色体構造と性決定領域に注目した生殖様式の進化機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the evolutionary mechanism of mating systems focusing on the chromosomal structure and sex-determining regions in *Closterium*.

研究代表者

土金 勇樹 (Tsuchikane, Yuki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任研究員

研究者番号：20434152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒメミカツキモには、+型と-型の遺伝的に決定された性を持ち、両性の中で他殖するヘテロタリズム系統が存在する。また、1細胞由来のクローン細胞の間で接合子をつくり自殖するホモタリズム系統が存在する。これら生殖様式の進化はヒメミカツキモにおいて独立に複数回起きていることが明らかになっているが、どの様に生殖様式が変化するのか不明であった。そこで、ヒメミカツキモにおける複数系統のゲノム量の多様性を明らかにし、そのゲノム解析を行った。ゲノム構造を比較したところ、異なるヘテロタリズム系統の間で雑種が生まれ、そこからあるホモタリズム系統が進化したことを明らかにしている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒメミカツキモが属する接合藻類は陸上植物に最も近縁な藻類であり、植物の進化を考える上で注目されている。本研究は接合藻類のモデル生物としてヒメミカツキモに注目し、複数の野生株におけるゲノム量と染色体構造を明らかにした。また、ロングリードシーケンスによる正確なゲノム情報を得ることに成功し、細胞生物学的、分子生物学的基盤が整備された。これらの成果から陸上植物と接合藻類の比較解析も可能となり、今後、接合藻類を用いた進化生物学的な解析の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Members of the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* (*C. psl.*) complex are unicellular zygnematophycean algae. A zygospore is typically formed as a result of conjugation between mating-type plus (mt+) and mating-type minus (mt-) cells during sexual reproduction in heterothallic strains. On the other hand, zygospores are formed between genetically identical cells in homothallic strains. In this study, we measured the 1C genome size of the *C. psl.* complex. Genomes of the 6 heterothallic strains and 2 homothallic strains were sequenced. The genome structure of homothallic strain (NIES-4550) indicated that this strain was derived from a hybrid of different heterothallic strains.

研究分野：進化生物学、藻類学、生理学

キーワード：生殖様式 ホモタリズム ヘテロタリズム ゲノムサイズ ミカツキモ 染色体

## 1. 研究開始当初の背景

生物にはホモタリズムとヘテロタリズムの二つの生殖様式が知られている。クローン細胞間、あるいは同個体内で有性生殖が行なわれる場合をホモタリズムと呼び、自家不稔であり、有性生殖に別の系統が必要な場合をヘテロタリズムと呼んでいる。なぜ生物には多様な生殖様式が存在するのだろうか。どのような分子機構で制御されているのだろうか。このような生殖様式の問題を解決するために、酵母、粘菌など、多くの生物で研究が行われている(Bloomfield et al. 2010)。藻類においても、いくつかの分類群で解析が進められてきた。ヒメミカツキモ(*Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex) はホシミドロ目に属する陸上植物に最も近縁な単細胞藻類である。1形態種の中に、+型と-型の遺伝的に決定された性を持ち、両性の間で他殖するヘテロタリズム系統(以後、ヘテロ系統)が存在する。また、1細胞由来のクローン細胞の間で接合子をつくり自殖するホモタリズム系統(以後、ホモ系統)が存在する(Tsuchikane and Sekimoto 2019)。

## 2. 研究の目的

本研究ではヒメミカツキモの生殖様式の進化機構に注目する。ヒメミカツキモのヘテロ系統とホモ系統の染色体構造を観察することで、生殖様式と染色体数の関係を解明する。また、ホモ系統とヘテロ系統のシーケンス情報からゲノム構造を解析することで、ホモ系統がどのように進化してきたのかを考察する。

## 3. 研究の方法

ヒメミカツキモにおけるホモ系統とヘテロ系統を比較するために、野外から新規のホモ系統の系統保存株を確立した。得られたヒメミカツキモの野生株を中心に、フローサイトメーターによるゲノム量測定、染色体数の観察を行った。ホモタリズム系統2株とヘテロタリズム系統6株のロングリードシーケンスデータおよび、ホモタリズム系統6株、ヘテロタリズム系統16株のショートリードシーケンスを取得し、解析に用いた。

## 4. 研究成果

ミカツキモのゲノム量測定にはフローサイトメーターを用いた。DAPI染色による測定では、PI染色の測定値より41.8-65.2%程度の値であった。これはDAPIがAT配列得的に結合するためと考察した。また系統によりその割合が異なる理由であるが、AATTサイトの並びによって親和性が異なることが知られており(AATT >> TAAT ≈ ATAT > TATA ≈ TTAA, Breusegem et al. 2002) 系統によってこれらの配列の存在が異なることが原因であると考えている。そして、接合藻類のゲノム量の測定においてはPI染色による測定が適していることを確認した。また、ミカツキモ属の培養細胞では、DNAが倍化するG2期に存在する細胞が多く、G1に存在する細胞が少ない場合が観察された。フローサイトメーターなど測光によりゲノム量を測定する際は、細胞周期の調整を行う必要があることが明らかとなった。以上のように、接合藻類におけるフローサイトメーターを用いたゲノム量の測定方法を確立した。

次に、フローサイトメーターによる測定、k-mer解析、コンティグ長の合計から算出したゲノム量を比較した。どれも相関があったものの、フローサイトメーターによる測定値が大きい傾向があった。実際に、アセンブリから推定したゲノム量は低く見積もられる傾向があり(Elliott and Gregory 2015)、k-mer解析では閾値の設定により数値が容易に変動することも知られている(Sekimoto et al. 2023, Kawaguchi et al. 2023)。

フローサイトメーターから測定したヒメミカツキモの野生系統におけるゲノム量は、0.53 - 1.42 Gbpと系統によって多様であった。ヘテロ系統は興味深いことに、接合子を形成する+型と-型の間でも6.1 - 31.5%の違いがあった。ヒメミカツキモには形態的に区別がつかないが、生殖隔離した交配群(生物学的種)と呼ばれる集団が知られている。同じ交配群に含まれ、接合子を形成するものの、31.5%のゲノム量の違いが存在した。この組み合わせの接合子が子孫を作れるか確認できていないものの、接合後隔離が存在する可能性があり、ヒメミカツキモの種生物学的研究において重要な知見であった。また、-型を決定する遺伝子*CpMinus1*に注目したところ、性特異的なゲノム量の違いは観察されなかった。さらに、ゲノム量と形態的特徴(細胞面積、細胞長、細胞幅)の間に正の相関が観察された。

比較的近縁なヘテロ系統(交配群II-A及びII-B)とホモ系統(Naga37s-1株及びYama58-4株)の染色体数を測定した。ヒメミカツキモの染色体はセントロメア構造が観察されないドット状であり、過去の報告にあるミカツキモ属の染色体構造と共通していた(Godward 1966)。バックグラウンドとの識別が困難であり、正確な測定はできなかったものの、染色体数は26.6±1.31から87.7±5.55本と多様であった。また、染色体数とゲノム量と正の相関が観察された。次にゲノム量と染色体数から染色体の長さの程度(ゲノム量/染色体数)を測定したところ、観察した系統の中で、ホモ系統が最も小さい値を示した。ヘテロ系統は異なる性を示す2つの系統の間で接合子を形成する。この場合、染色体数が大きく異なると接合後隔離を示す可能性がある。一方、

ホモ系統は、1細胞が細胞分裂し、細胞分裂後の姉妹細胞同士が自殖する姉妹接合子を形成する。この姉妹接合では、接合相手の染色体数は基本的に共通する。このため、ホモ系統は染色体の断片化を維持しやすいものと考えられた。

野生株における配列情報を精査し、ゲノム量の多様性は部分的な重複によるものと考えられている。また、ホモ系統 Naga37s-1 株 (NIES-4550) の配列情報を検討したところ、交配群 II-A に近縁な系統と、未知のクレードに属する系統のゲノム情報を含んでいることが明らかとなった。Naga37s-1 株は異なるヘテロ系統を親に持つハイブリッド株からホモ系統が生じた可能性が考えられた。

## 引用文献

- Bloomfield, G., Skelton, J., Ivens, A., Tanaka, Y. & Kay, R. R. 2010. Sex determination in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Science* **330**:1533-6.
- Breusegem, S. Y., Clegg, R. M. & Loontjens, F. G. 2002. Base-sequence specificity of Hoechst 33258 and DAPI binding to five (A/T)<sub>4</sub> DNA sites with kinetic evidence for more than one high-affinity Hoechst 33258-AATT complex. *Journal of Molecular Biology* **315**:1049-61.
- Elliott, T. A. & Gregory, T. R. 2015. What's in a genome? The C-value enigma and the evolution of eukaryotic genome content. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **370**:20140331.
- Godward, M. B. E. 1966. The Chromosomes of Algae. *Ann Hum Genet* **25**:427-27.
- Kawaguchi, Y., Tsuchikane, Y., Tanaka, K., Taji, T., Suzuki, Y., Toyoda, A., Ito, M., Watano, Y., Nishiyama, T., Sekimoto, H., & Tsuchimatsu, T. 2023. Extensive copy number variation explains genome size variation in the unicellular zygnematophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *bioRxiv* 540557 doi: <https://doi.org/10.1101/2023.05.13.540557>.
- Sekimoto, H., Komiya, A., Tsuyuki, N., Kawai, J., Kanda, N., Ootsuki, R., Suzuki, Y., Toyoda, A., Fujiyama, A., Kasahara, M., Abe, J., Tsuchikane, Y. & Nishiyama, T. 2023. A divergent RWP-RK transcription factor determines mating type in heterothallic *Closterium*. *The New phytologist* **237**:1636-51.
- Tsuchikane, Y. & Sekimoto, H. 2019. The genus *Closterium*, a new model organism to study sexual reproduction in streptophytes. *The New phytologist* **221**:99-104.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takahashi Kohei, Kawai Toyooka Hiroko, Ootsuki Ryo, Hamaji Takashi, Tsuchikane Yuki, Sekimoto Hiroyuki, Higashiyama Tetsuya, Nozaki Hisayoshi	4. 巻 75
2. 論文標題 Three sex phenotypes in a haploid algal species give insights into the evolutionary transition to a self compatible mating system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Evolution	6. 最初と最後の頁 2984 ~ 2993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/evo.14306	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 -
1. 著者名 Kobayashi Hiroka, Sekimoto Hiroyuki, Tsuchikane Yuki	4. 巻 70
2. 論文標題 Rediscovered mating group II-C of <i>Closterium peracerosum-strigosum-littorale</i> complex.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Jpn. J. Phycol.	6. 最初と最後の頁 117 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 Sekimoto Hiroyuki, Komiya Ayumi, Tsuyuki Natsumi, Kawai Junko, Kanda Naho, Ootsuki Ryo, Suzuki Yutaka, Toyoda Atsushi, Fujiyama Asao, Kasahara Masahiro, Abe Jun, Tsuchikane Yuki, Nishiyama Tomoaki	4. 巻 237
2. 論文標題 A divergent RWP RK transcription factor determines mating type in heterothallic <i>Closterium</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1636 ~ 1651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.18662	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 -
1. 著者名 Kawaguchi Yawako W., Tsuchikane Yuki, Tanaka Keisuke, Taji Teruaki, Suzuki Yutaka, Toyoda Atsushi, Ito Motomi, Watano Yasuyuki, Nishiyama Tomoaki, Sekimoto Hiroyuki, Tsuchimatsu Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Extensive Copy Number Variation Explains Genome Size Variation in the Unicellular Zygnematophycean Alga, <i>Closterium peracerosum-strigosum-littorale</i> Complex	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 540557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.05.13.540557	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Tsuchikane Yuki, Watanabe Misaki, Kawaguchi Yawako W, Uehara Koichi, Nishiyama Tomoaki, Sekimoto Hiroyuki, Tsuchimatsu Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 DIVERSITY OF GENOME SIZE AND CHROMOSOME NUMBER IN HOMOTHALLIC AND HETEROTHALLIC STRAINS OF THE CLOSTERIUM PERACEROSUM-STRIGOSUM-LITTORALE COMPLEX (DESMIDIALES, ZYGNEMATOPHYCEAE, STREPTOPHYTA)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 538656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.05.01.538656	査読の有無 無
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10件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川口也和子 土金勇樹 田中啓介 太治輝昭 豊田敦 西山智明 関本弘之 土松隆志
2. 発表標題 ヒメミカツキモ種内にみられる大規模なゲノムサイズ変異の進化的起源
3. 学会等名 日本進化学会第23
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川口也和子 土金勇樹 田中啓介 太治輝昭 豊田敦 西山智明 関本弘之 土松隆志
2. 発表標題 ヒメミカツキモにおける顕著なゲノムサイズ多型の進化的起源と遺伝子発現パターンへの影響
3. 学会等名 日本生態学会第69回
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土金勇樹
2. 発表標題 接合藻ヒメミカツキモにおけるゲノムサイズの多様性
3. 学会等名 日本植物学会85回大会関連集会・日本シダ学会・集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺実咲 村田隆 堤元佐 大友康平 根本知己 川口也和子 土松隆志 西山智明 土金勇樹 関本弘之
2. 発表標題 蛍光タンパク質融合CenH発現によるヒメミカツキモの染色体解析とゲノム進化
3. 学会等名 日本植物学会85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土金勇樹
2. 発表標題 ミカツキモの有性生殖
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺実咲・村田隆・堤元佐・大友康平・根本知己・西山智明・土金勇樹・関本弘之
2. 発表標題 ヒメミカツキモにおける蛍光標識CenH3タンパク質の発現による染色体可視化
3. 学会等名 第45回日本藻類学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土金勇樹・川口也和子・上原浩一・土松隆志
2. 発表標題 ゲノム量から明らかにするヒメミカツキモの多様性
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川口也和子・土金勇樹・田中啓介・太治輝昭・豊田敦・西山智明・関本弘之・土松隆志
2. 発表標題 全ゲノムデータからみたヒメミカツキモの自殖系統におけるホメオログ間組み換え
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土金勇樹・川口也和子・上原浩一・土松隆志
2. 発表標題 接合藻ヒメミカツキモにおけるゲノム量の多様性
3. 学会等名 日本植物分類学会第19回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川口也和子・土金勇樹・田中啓介・太治輝昭・豊田敦・西山智明・関本弘之・土松隆志
2. 発表標題 接合藻ヒメミカツキモにおける生殖様式の平行進化：全ゲノムデータから探る
3. 学会等名 日本進化学会第21回大会
4. 発表年 2019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
---------	---------