

機関番号：32670

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570044

研究課題名（和文） ヒメミカヅキモの性フェロモン受容体同定と特性解析

研究課題名（英文） Identification and characterization of receptor for sex pheromones in *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex

研究代表者

関本 弘之 (SEKIMOTO HIROYUKI)

日本女子大学・理学部・准教授

研究者番号：20281652

研究成果の概要（和文）：

ヒメミカヅキモの性フェロモンの1つである PR-IP Inducer を結合する能力を有する受容体候補タンパク質について、分子生物学的手法により同定を行った。最終的に、コードする遺伝子3種をクローニングすることに成功した。さらに、これらの遺伝子の有性生殖、性フェロモン受容に関する役割の解明にも注目し、これらの遺伝子を導入した形質転換ヒメミカヅキモの作出にも取り組んだ。

研究成果の概要（英文）：

Using molecular biological techniques, we cloned three genes encoding proteins having sex pheromone-binding properties. We also tried to establish transgenic *Closterium* strains for clarification of the roles of genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：植物生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：ミカヅキモ、性フェロモン、受容体

## 1. 研究開始当初の背景

ヒメミカヅキモは、陸上植物と非常に近縁な単細胞接合藻類であり、その接合過程の進行には、特異的な糖タンパク質性フェロモンによる多段階にわたる細胞間情報伝達が不可欠である。これまでの研究により、ヒメミカヅキモの有性生殖に関わる EST 情報が蓄積し、さらには cDNA マイクロアレイにより、接合時に発現する遺伝子群、性フェロモンにより誘導される遺伝子群などが明らかになっている。一方、性フェロモンの受容体分子

については、これまでに明らかになっていなかったものの、その候補と思われる複数の受容体型タンパク質をコードする遺伝子 (*CpRLK1*, *CpRLP1*) が、近年の解析によりクローニングされていた。

また実際に、性フェロモン遺伝子を bait にした受容体候補分子の two-hybrid system による予備的なスクリーニングの結果、PR-IP の 19-kDa subunit および PR-IP Inducer のそれぞれと結合する可能性のある遺伝子群の存在が示唆されていた。

これらを踏まえ、性フェロモンの受容体解明を行い、情報がどのように伝達されるのかを明らかにするべく、研究を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究では、以下の点を目的とした。

(1) two-hybrid system により得られてきている性フェロモン受容体候補分子について遺伝子発現条件を中心に絞り込む。

(2) 得られた受容体候補分子の遺伝子発現抑制株、過剰発現株を作製して、生理機能を確認する。

(3) 組換え型性フェロモンを用いて、*CpRLK1*, *CpRLP1* 遺伝子がコードするタンパク質を中心にヒメミカヅキモ細胞膜上の性フェロモン結合分子を同定する。

(4) それらの遺伝子発現制御株を用いて、性フェロモンおよびその受容体の下流に位置する遺伝子ネットワークを cDNA マイクロアレイにより解析する。

## 3. 研究の方法

(1) Two-hybrid system による性フェロモン結合分子をコードする遺伝子のスクリーニング

ヒメミカヅキモの有性生殖を誘起し、有性生殖の各ステップより細胞回収、mRNA 精製、cDNA 合成を順次進め、cDNA ライブラリーを作製した。得られたライブラリーを用いて、性フェロモン遺伝子を bait として、two-hybrid system によるスクリーニングを行った。その際、PR-IP Inducer 遺伝子を bait として用い、結合する能力のあるタンパク質をコードする遺伝子を探索した。

(2) Real-time PCR による性フェロモン結合候補分子の遺伝子発現解析

two-hybrid system によるスクリーニングで得られたクローンの中で、出現頻度の高い 2 クローン (*Cp01-like*, *Contig2*) とその関連遺伝子 (*Cp01*) について、有性生殖過程における経時的変化、接合型特異性、フェロモン処理に対する反応性などに注目して、Real-time PCR による詳細な発現解析を行った。

(3) PR-IP Inducer と組換え型性フェロモン結合候補タンパク質の相互作用解析 1

性フェロモン結合候補分子について、大腸菌の組換え型タンパク質として産生させ、PR-IP Inducer との結合能を持つかを検討した。

(4) PR-IP Inducer の産生を誘導する新規性フェロモン活性の検出と抗体産生

(3)の相互作用を確認するにあたり、PR-IP

Inducer 産生条件の再検討を行った。また、検出に用いるための新たな抗 PR-IP Inducer 抗体産生を行った。

(5) PR-IP Inducer と組換え型性フェロモン結合候補タンパク質の相互作用解析 2

性フェロモン結合候補分子を、酵母の組換え型タンパク質として産生させ、(4)で検討して得たヒメミカヅキモ由来 PR-IP Inducer との結合能の有無を、新規抗体を用いて検討した。

(6) ヒメミカヅキモ形質転換系の確立と遺伝子導入株作出

ヒメミカヅキモを宿主とした、形質転換系確立を行った。また、性フェロモン結合候補分子を発現させるためのコンストラクトを作製した。

(7) *CpRLK1*, *CpRLP1* 遺伝子のヒメミカヅキモへの遺伝子導入

(6)で作製したコンストラクトを用いて、両遺伝子をセンス方向、アンチセンス方向に発現するようにベクターに挿入した。これらをヒメミカヅキモへ形質転換し、形質転換体の解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) Two-hybrid system による性フェロモン結合分子をコードする遺伝子のスクリーニング

性フェロモンである PR-IP Inducer を bait として、two-hybrid system によるスクリーニングを行った結果、213 の positive コロニーを得た。

そのうち、106 コロニーについて正確な配列を取得・整理し、重複を除いたところ、計 62 遺伝子に分かれ、その中で機能未知の既知遺伝子である *Cp01* と高い配列類似性を有する遺伝子が最も多く重複して得られ、*Cp01-like* と名付けられた。また、次に重複度が高かった遺伝子は、*Contig2* と名付けられた。スクリーニングされたクローンの中には、*Cp01* 自身も、1 クローンであるが含まれていた。

これらは、すべてファシクリン I (FAS1) と名付けられた動物、植物、菌類など様々な生物に保存されているドメインを持つことが判明した。

(2) Real-time PCR による性フェロモン結合候補分子の遺伝子発現解析

*Cp01-like* では + 型・- 型細胞を混合し、有性生殖を誘起した際に、+ 型細胞単独培養時に比べて約 190 倍に発現が上昇した。しかし *Cp01* 遺伝子とは異なり、PR-IP Inducer を与えても顕著な発現上昇は見られなかった。また、*Contig2* では + 型・- 型細胞混合時、PR-IP Inducer 投与時ともに常に発現しており、顕著な変動は見

られなかった。

(3) PR-IP Inducer と組換え型性フェロモン結合候補タンパク質の相互作用解析 1

性フェロモン結合候補分子について、大腸菌の組換え型タンパク質として産生させ、PR-IP Inducer と結合能を示すかを検討した。しかしながら、実験に用いるヒメミカヅキモ由来の PR-IP Inducer の量が不足し、また抗体の反応性が低くなっており、さらに非特異的な交差反応が見られたため、正確な相互作用を見ることが出来なかった。

(4) PR-IP Inducer の産生を誘導する新規性フェロモン活性の検出と抗体産生

PR-IP Inducer は、窒素源欠乏培地中で-型細胞から放出されるが、さらに+型細胞を培養した後の調製培地の中で培養することで、顕著に産生が促進されることが判明した。また、その際、既存の抗体では十分に Inducer を検出できなかったため、新たに二カ所のペプチドを抗原として、抗体産生を行った。その結果、反応性が高く、非特異的な反応のほとんどない抗体を調製することに成功した。

これらを用いて、(3)で調製した3種の組換え型タンパク質との結合能力を調べたが、両者の間には相互作用が見られなかった。

(5) PR-IP Inducer と組換え型性フェロモン結合候補タンパク質の相互作用解析 2

3種の性フェロモン結合候補分子について、酵母の組換え型タンパク質として産生させ、前述のヒメミカヅキモ由来 PR-IP Inducer との結合能の有無を検討したところ、3者とも顕著な相互作用を示した。

(6) ヒメミカヅキモ形質転換系の確立と遺伝子導入株作出

ヒメミカヅキモを宿主とした、形質転換系確立を行い、抗生物質としてブレオマイシンを用いるスクリーニング系を確立した。また、任意の遺伝子を細胞内で発現させるため、プロモーター領域を変えた数種類の新規発現用ベクターを開発した。Cp01, Cp01-like 遺伝子を過剰発現させるためのコンストラクトを作製し、現在、ヒメミカヅキモへの遺伝子導入を進めている。

(7) CpRLK1, CpRLP1 遺伝子のヒメミカヅキモへの遺伝子導入

CpRLK1, CpRLP1 遺伝子をセンス方向、アンチセンス方向に配置し、ヒメミカヅキモへ遺伝子導入し、形質転換体作出を試みた。CpRLK1 については、ゲノミック PCR 法による遺伝子導入状況確認、realtime PCR 法による遺伝子発現レベル変化を確認した。特に、antisense 方向に遺伝子を導入した株の一部について、有性生殖能力の低下が見られた。

CpRLP1 については、現在形質転換体をス

クリーニング中である。

以上の研究を通して、ヒメミカヅキモの一方の性フェロモン (PR-IP Inducer) について、相互作用しうる新規のタンパク質を見出した。これらに共通して存在する FAS1 ドメインは、ショウジョウバエで発見されて以来、多くの動植物、菌類などで見出されており、細胞接着の他、情報伝達などにも関わることなどが示唆されているが、多くは具体的な生理機能が不明のままである。今後、これらの FAS1 ドメインを持つ遺伝子群の、有性生殖過程における役割を明らかにすることにより、性フェロモンの情報伝達経路、受容体解明へとつながることが期待された。

## 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 9 件)

- ① Tsuchikane, Y., Tsuchiya, M., Kokubun, Y., Abe, J., Sekimoto, H. (2011) Conjugation processes of *Penium margaritaceum* (Zygomatophyceae, Zygomatophyta). *Phycol. Res.* **59**: 74-82. (査読有)
- ② Tsuchikane, Y., Kokubun, Y., Sekimoto, H. (2010) Characterization and molecular cloning of conjugation-regulating sex pheromones in homothallic *Closterium*. *Plant Cell Physiol.* **51**: 1515-1523. (査読有)
- ③ Vannerum, K., Abe, J., Sekimoto, H., Inzé, D., Vyverman, W. (2010) Intracellular localization of an endogenous cellulose synthase of *Micrasterias denticulata* (Desmidiales, Chlorophyta) by means of transient genetic transformation. *J. Phycol.* **46**: 839-845. (査読有)
- ④ Tsuchikane, Y., Sato, M., Ootaki, T., Kokubun, Y., Nozaki, H., Ito, M., Sekimoto, H. (2010) Sexual processes and phylogenetic relationships of a homothallic strain in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Zygomatales, Charophyceae). *J. Phycol.* **46**: 278-284.
- ⑤ 坂山英俊、西山智明、関本弘之、伊藤元己 (2009) 「陸上植物の祖先「シヤジクモ藻類」の進化学 水中から陸上へのストーリー」 *Biophilia* **5**: 69-72. (査読無)
- ⑥ Yamada, T. K., Tsuchikane, Y., Wu, J.-T., Sekimoto, H., Miyaji, K., Nozaki, H. (2008) Morphology and molecular

phylogeny of *Eudorina* sp. (Volvocaceae, Chlorophyceae) from Taiwan. *Hikobia* **15**: 135-143. (査読有)

- ⑦ Tsuchikane, Y., Ito, M., Sekimoto, H. (2008) Reproductive isolation by sex pheromones in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Zygnematales, Charophyceae). *J. Phycol.* **44**: 1197-1203. (査読有)
- ⑧ Abe, J., Hiwataishi, Y., Ito, M., Hasebe, M., Sekimoto, H. (2008) Expression of exogenous genes under the control of endogenous *HSP70* and *CAB* promoters in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Plant Cell Physiol.* **49**: 625-632. (査読有)
- ⑨ Abe, J., Sakayori, K., Sekimoto, H. (2008) Effect of antibiotics on cell proliferation in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Charophyceae, Chlorophyta). *Biologia* **63**: 932-936. (査読有)

[学会発表] (計34件)

- ① 土金勇樹、馬場未悠、日向淑恵、関本弘之 「接合藻ヒメミカヅキモのホモタリック株における接合機構の解析」日本藻類学会(富山大学) 2011年3月28日
- ② 阿部淳、堀早知恵、野崎睦、佐藤眞美子、関本弘之 「前培養処理がヒメミカヅキモの接合と細胞内形態変化に及ぼす影響」日本植物学会(中部大学) 2010年9月11日
- ③ 堀早知恵、阿部淳、佐藤眞美子、関本弘之 「接合藻ヒメミカヅキモの有性生殖過程における Con A の影響とその微細構造比較」日本植物学会(中部大学) 2010年9月9日
- ⑤ 土金勇樹、関本弘之 「接合藻ヒメミカヅキモにおけるホモタリック株の接合は性フェロモン(PR-IP Inducer)により促進される」日本植物学会(中部大学) 2010年9月9日
- ⑥ 土屋美紀、土金勇樹、関本弘之 「単細胞接合藻ヒメミカヅキモのホモタリック株は、「性分化」する」日本植物学会(中部大学) 2010年9月9日
- ⑦ 堀早知恵、阿部淳、野崎睦、佐藤眞美子、関本弘之 「Con A がヒメミカヅキモの有性生殖過程に及ぼす影響とその微細構造学的解析」日本顕微鏡学会(名古屋国際会議場)、2010年5月24日
- ⑧ 土金勇樹、土屋美紀、日向淑恵、関本弘之

「接合藻ヒメミカヅキモのホモタリック株における「性」の発見」日本藻類学会(つくば)、2010年3月20日

- ⑨ 阿部淳、堀早知恵、関本弘之 「ヒメミカヅキモ性フェロモン遺伝子過剰発現株の作出と評価」日本植物生理学会(熊本)、2010年3月20日
- ⑩ Hashiba, S., Marukawa, Y., Ichikawa, M., Nishii, I., Akatsuka, S., Tsuchikane, Y., Abe, J., Sekimoto, H. “Characterization of a novel receptor-like protein kinase relating to the sexual reproduction of a unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex” International symposium of cell-cell communication in plant reproduction – from pollination to fertilization –, Nara, Japan, March 2010.
- ⑪ Sekimoto, H. “Sexual Reproduction of a Unicellular Alga, *Closterium*” International Symposium of Intercellular Recognition and Allogeneic Authentication: Perspectives of Reproduction and Mechanisms Shared by Animals and Plants, Nagoya, January 14, 2010. (招待講演)
- ⑫ 丸川祐佳、西井一郎、市川真知子、伊藤元己、関本弘之 「ヒメミカヅキモの有性生殖関連受容体型タンパク質の特性解析」日本植物学会(山形)、2009年9月18日
- ⑬ 堀早知恵、阿部淳、関本弘之 「ヒメミカヅキモの有性生殖過程に及ぼすレクチンの効果」日本植物学会(山形)、2009年9月18日
- ⑭ 阿部淳、堀早知恵、関本弘之 「ヒメミカヅキモの有性生殖機構解明に向けての形質転換系開発」日本植物学会(山形)、2009年9月18日
- ⑮ 土金勇樹、国分夢、関本弘之 「ホモタリックな接合藻ヒメミカヅキモにおける接合調整分子の解析」日本植物学会(山形)、2009年9月18日
- ⑯ 市川真知子、丸川祐佳、赤塚さと子、関本弘之 「ヒメミカヅキモの受容体型タンパク質 CpRLP1 の特性解析」日本植物学会(山形)、2009年9月19日
- ⑰ Sekimoto, H. “Biologically active molecules involved in the sexual

reproduction of *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex” The Ninth international phycological congress, Tokyo, Japan, August 4, 2009. (招待講演)

⑱ Tsuchikane, Y., Kokubun, Y., Sekimoto, H. “Sexual processes and phylogenetic relationships of a homothallic strain in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Zygnematales, Charophyceae).” The Ninth international phycological congress, Tokyo, Japan, August 3, 2009.

⑲ 土金勇樹、関本弘之「接合藻ヒメミカヅキモの生殖隔離：性フェロモン(PR-IP)の認識低下による非対称な生殖隔離」日本植物分類学会(仙台)、2009年3月14日

⑳ 丸川 祐佳、西井 一郎、関本 弘之「単細胞接合藻ヒメミカヅキモの受容体型キナーゼ CpRLK1 の特性解析」日本藻類学会(沖縄)、2009年3月27日

㉑ 國分 夢、土金 勇樹、関本 弘之「単細胞接合藻ヒメミカヅキモのホモタリック株における接合調整分子の発見と特性解析」日本藻類学会(沖縄)、2009年3月28日

㉒ Sekimoto, H., Akatsuka, S., Ichikawa, M., Marukawa, Y., Takekawa, Y., Abe, J., Tsuchikane, Y. “Characterization of two receptor-like proteins relating to the sexual reproduction of a unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex” The Vth Asian Pacific Phycological Forum, Wellington, New Zealand, November 14, 2008.

㉓ Abe, J., Hori, S., Ito, M., Sekimoto, H. “Transformation of *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Zygnematales) by particle bombardment” The Vth Asian Pacific Phycological Forum, Wellington, New Zealand, November 14, 2008.

㉔ Tsuchikane, Y., Sekimoto, H. “Biological speciation in *Closterium* (Zygnematales, Charophyceae): Reproductive isolation by sex pheromones” The Vth Asian Pacific Phycological Forum, (Wellington, New Zealand), November 13, 2008. (招待講演)

㉕ 関本弘之「シャジクモ藻類ヒメミカヅキモの有性生殖に関わる性フェロモン」日本植物学会シンポジウム「藻類から解き明かされる

生殖と発生の原理」(高知)、2008年9月27日(招待講演)

㉖ 阿部 淳、堀 早知恵、伊藤元己、関本弘之「外来遺伝子導入によるヒメミカヅキモ形質転換系の確立」日本植物学会(高知)、2008年9月27日

㉗ 阿部 淳、堀 早知恵、関本弘之「ヒメミカヅキモの生殖細胞分化に対する、細胞密度の影響」日本植物学会(高知)、2008年9月26日

㉘ 土金勇樹、佐藤真知子、中原千春、国分夢、野崎久義、伊藤元己、関本弘之「ホモタリックな接合藻ヒメミカヅキモの系統関係と接合機構の解析」日本植物学会(高知)、2008年9月26日

[図書](計1件)

① 関本弘之「藻類ハンドブック(「性フェロモン」を分担執筆)」2011年印刷中。(株)エヌ・ティー・エス

[その他]

ホームページ等

<http://mcm-www.jwu.ac.jp/~sekimoto/Site/Home.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

関本 弘之 (SEKIMOTO HIROYUKI)  
日本女子大学・理学部・准教授  
研究者番号：20281652

### (3) 連携研究者

阿部 淳 (ABE JUN)  
日本女子大学・理学部・学術研究員  
研究者番号：10424764