

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06766

研究課題名（和文）卵生殖出現をボルボックス系列緑藻で解明する性分化機構の進化発生学

研究課題名（英文）Evo-devo approach on the sex differentiation mechanism in volvocine algae to reconstruct the emergence of oogamy

研究代表者

浜地 貴志（HAMAJI, Takashi）

中央大学・研究開発機構・専任研究員

研究者番号：10784556

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）：同型配偶クラミドモナスと卵生殖ボルボックスの有性生殖において、性決定遺伝子MIDの有無によって配偶子の遺伝子発現プロファイルが変化することは知られていたが、その分子基盤は不明であった。本研究ではMIDと相互作用する因子VSR1を同定し、さらにVSR1がMIDの非存在化ではVSR1自身と相互作用してホモダイマーを形成することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同型配偶クラミドモナスにおいて1994年に性決定領域ならびに1997年にマイナス・オス性決定転写因子MIDが同定されて以来じつに30年近い年月にわたり一切不明であった、ボルボックス系列緑藻の性決定にかかわる遺伝子制御の分子基盤の実体が本VSR1の発見によりついに解明されたと信ずる。この結果はむしろ今後、どのような遺伝子群の発現が「性の実質」であるかを明らかにするためのスタートラインに立つものとして位置づけうるだろう。

研究成果の概要（英文）：The emergence of oogamy is one of the major issues in evolutionary biology. Both metazoans, including humans, and terrestrial plants, which account for a large biomass on earth, are producing sperms and eggs with marked differences in the motility and size. It is generally believed that heterogametes and oogamy evolved from isomorphic gametes. Based on the background of the evolutionary history of sexual reproduction in the Volvox lineage of green algae, which is the only extant species among all eukaryotic lineages including isogamy and oogamy in it, the process by which derivative heterogametes emerged from ancestral-type isomorphic gametes, the entire gene regulatory network involved in the mechanism of sexual differentiation in Chlamydomonas and Volvox was investigated.

研究分野：性進化学

キーワード：性分化 クラミドモナス ボルボックス 転写因子 RWP-RKドメイン

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(図1)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、ゴニウムおよびヤマギシエラ、異型配偶ユードリナ、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・申請者は第4著者; Hamaji et al 2018 Commun Biol)、米国 Joint Genome institute において全ゲノムが公開され、相同遺伝子を容易に取得して機能比較に供することができる比較ゲノム学的インフラが整備されている。

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、申請者の大学院課程の指導教員である野崎久義准教授は、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 型ロイジ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.)。引き続き申請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)。しかし、その後、MID のパートナーはどの生物でも見つからなかった。

2. 研究の目的

本研究は、有性生殖モデル生物の分子遺伝学と非モデル生物の比較ゲノム学の統合アプローチとして位置づけることができる。雌雄の二極化した異型配偶・卵生殖の生物が、祖先的な同型配偶から派生的・段階的に出現した過程が現存しているのは全真核生物中でもボルボックス系列緑藻のみである。この中の同型配偶クラミドモナスと卵生殖ボルボックスは既に研究が進んでいるモデル生物であり、雌雄性出現前後の同型配偶ヤマギシエラと異型配偶ユードリナを含めた中間段階の生物のホモログをただちに取得して研究を進めることも容易である独自性は高い。本研究によって、モデル生物クラミドモナスの性決定・分化に関与する遺伝子制御ネットワークの全体像を明らかにし、系統ワイドに相互に比較することによって、真核生物全ての中で初めて、「雌雄性の進化」の分子基盤が明らかになるのである。

これらの分子機構の知見から、卵生殖ボルボックスの有性生殖過程にわたる RNA-seq (浜地ら、投稿準備中)および他の生物のゲノムを比較することで、異型配偶・卵生殖における「相同」な遺伝子制御ネットワークの有無を調べ、雌雄二極化に伴いコ・オプションした性分化寄与遺伝子群のホモログをあぶり出す。ここに至れば、その遺伝子を異所的にクラミドモナスに発現させることで、同型配偶であるべきクラミドモナス配偶子を人為的に「精子」化し、雌雄二極化の分子基盤を進化発生学的に「実証」することも十分射程に入る。

3. 研究の方法

ボルボックス系列緑藻で、有性生殖過程のもっともよく解明されているモデル生物である、同型配偶クラミドモナスを用いて、性分化を制御する転写因子のロジックを解明しようとした。MID と RWP11 の生化学的・細胞生物学的な解析を進めて確実な検証を行った。一方、このヘテロダイマーはマイナス型特異的なものであるため、対となる性であるプラス型において RWP11 のパートナーとなっている転写因子 X の存在が推測されていた。従って同時に、プラス型配偶子側で転写因子として働いているタンパク質 X の探索・同定を酵母 2 ハイブリッド法や免疫共沈降法で進め、雌雄を決める性分化のメカニズムを解明することを目指した。

その後プラス・マイナス *rwp11* 突然変異体および、プラス制御タンパク質 X をコードする遺伝子の突然変異体をゲノム編集により作出し、突然変異の配偶子転写産物プロファイルへの影響

を RNA-seq によって明らかにしようとした。これによって MID-RWP11 ヘテロダイマーが制御するマイナス配偶子特異的下流遺伝子群が明らかになると同時に、その遺伝子群に共通しているプロモーター領域のシス制御エレメントが精度良く推定されることが期待された。つまり、これによって転写因子と被制御機構が浮かび上がるものとされた。申請者がこれまでに接合子の制御転写調節シスエレメントを同定した手法(Hamaji et al 2016b G3)と同様のルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイが可能となることが期待された。

4. 研究成果

申請者は酵母ツーハイブリッド法を駆使した解析によりクラミドモナス RWP11 が性決定転写因子 MID とそれぞれのタンパク質の限られた N 末領域で相互作用することを見出した。この RWP11 の N 末相互作用領域をベイトとしてさらに酵母ツーハイブリッド解析を推進した結果、RWP11 の N 末相互作用領域は、RWP11 自身と相互作用することが示された。これは卵生殖ボルボックスのホモログにおいても同様であった。すなわち、予想された転写因子 X とは RWP11 それ自体であると考えられ、MID の存在しないプラス交配型ないしメス株において RWP11 あるいはそのホモログはホモダイマーを形成することが示唆された。同型配偶クラミドモナス RWP11 およびその卵生殖ボルボックスのホモログは VOLVOCINE SEX REGULATOR 1 (VSR1) の呼称が付与された。VSR1 の機能を欠損した突然変異体の解析および、免疫共沈降実験の結果は、米国ドナルド・ダンフォース植物科学センターのジム・ユーマン博士らの国際共同研究チームによって現在国際学術誌に受理済みである。

VSR1 の機能を欠損した突然変異体のトランスクリプトームデータはすでに取得済みであり現在解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takahashi Kohei, Suzuki Shigekatsu, Kawai-Toyooka Hiroko, Yamamoto Kayoko, Hamaji Takashi, Ootsuki Ryo, Yamaguchi Haruyo, Kawachi Masanobu, Higashiyama Tetsuya, Nozaki Hisayoshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Reorganization of the ancestral sex-determining regions during the evolution of trioecy in <i>Pleodorina starrii</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-023-04949-1	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 Takusagawa Mari, Kobayashi Yusuke, Fukao Yoichiro, Hidaka Kumi, Endo Masayuki, Sugiyama Hiroshi, Hamaji Takashi, Kato Yoshinobu, Miyakawa Isamu, Misumi Osami, Shikanai Toshiharu, Nishimura Yoshiki	4. 巻 118
2. 論文標題 HBD1 protein with a tandem repeat of two HMG-box domains is a DNA clip to organize chloroplast nucleoids in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2021053118	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 Yamamoto Kayoko, Hamaji Takashi, Kawai-Toyooka Hiroko, Matsuzaki Ryo, Takahashi Fumio, Nishimura Yoshiki, Kawachi Masanobu, Noguchi Hideki, Minakuchi Yohei, Umen James G., Toyoda Atsushi, Nozaki Hisayoshi	4. 巻 118
2. 論文標題 Three genomes in the algal genus <i>Volvox</i> reveal the fate of a haploid sex-determining region after a transition to homothallism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2100712118	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 該当する
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Yusuke, Odahara Masaki, Sekine Yasuhiko, Hamaji Takashi, Fujiwara Sumire, Nishimura Yoshiki, Miyagishima Shin-ya	4. 巻 184
2. 論文標題 Holliday Junction Resolvase MOC1 Maintains Plastid and Mitochondrial Genome Integrity in Algae and Bryophytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1870 ~ 1883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.20.00763	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 浜地貴志, 小林優介, 山岡尚平, 鹿内利治, 西村芳樹
2. 発表標題 陸上植物系統において真核生物型DNAリガーゼIが葉緑体局在を獲得した分子基盤
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会 (オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋昂平, 豊岡博子, 大槻涼, 浜地貴志, 東山哲也, 野崎久義
2. 発表標題 3つの性表現型を持つ緑藻ボルボックス系列Pleodorina starriiの性決定機構の解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会 (オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sa Geng, Takashi Hamaji, Patrick J Ferris, Mingle Gao, Yoshiki Nishimura, James G Umen
2. 発表標題 A conserved RWP-RK transcription factor VSR1 controls gametic differentiation in volvocine algae
3. 学会等名 Volvox 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋昂平, 豊岡博子, 山本荷葉子, 浜地貴志, 大槻涼, 鈴木重勝, 山口晴代, 河内正伸, 東山哲也, 野崎久義
2. 発表標題 3つの性別を持つ緑藻 <i>Pleodorina starrii</i> の発見と本種における性決定の分子遺伝学的基盤
3. 学会等名 日本植物分類学会第21回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahashi Kohei, Kawai Toyooka Hiroko, Ootsuki Ryo, Hamaji Takashi, Tsuchikane Yuki, Sekimoto Hiroyuki, Higashiyama Tetsuya, Nozaki Hisayoshi
2. 発表標題 THREE SEX PHENOTYPES IN A HAPLOID ALGAL SPECIES GIVE INSIGHTS INTO THE EVOLUTIONARY TRANSITION TO A SELF-COMPATIBLE MATING SYSTEM
3. 学会等名 The 75th annual Phycological Society of America Meeting (virtual) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋昂平, 豊岡博子, 山本荷葉子, 浜地貴志, 大槻涼, 鈴木重勝, 山口晴代, 河内正伸, 東山哲也, 野崎久義
2. 発表標題 緑藻ボルボックス系列 <i>Pleodorina starrii</i> における3つの性表現型を決定する分子遺伝学的基盤の解明
3. 学会等名 日本藻類学会第46回大会 (オンライン福井)
4. 発表年 2021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			
米国	ドナルド・ダンフォース植物科学センター			