

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06778

研究課題名(和文) 原始紅藻類からみた性の獲得・進化機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of sex determination and evolution in the unicellular red algae

研究代表者

廣岡 俊亮 (Hirooka, Shunsuke)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・特任助教

研究者番号：70843332

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)：有性生殖は真核生物に普遍的に存在する現象である。性決定機構はそれぞれの系統で独自に獲得されている。有性生殖は、同形配偶からより複雑な異形配偶、卵生殖へと進化したと考えられており、同形配偶を行う単細胞真核生物は比較的単純な性決定領域をそのゲノム上に持つ。そのため、酵母や単細胞緑藻クラミドモナス等においては性決定領域、性決定機構の研究は比較的進んでいる。我々はこれまでに見つかっていなかったイデユコゴメ類の有性生殖過程を発見し、それを基に、遺伝的改変技術の開発や性決定領域の候補の同定に至った。今後、イデユコゴメ類を有性生殖研究におけるモデル生物系統群として利用するための基盤が整いつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イデユコゴメ類はアーケプラスチダの中でも、進化の初期に分岐したと考えられている。我々によって、イデユコゴメ類の有性生殖過程の存在が明らかになったことで、アーケプラスチダにおける有性生殖の進化を考える上で重要な要素が得られたことになる。さらに、イデユコゴメ類のゲノム解析、遺伝的改変技術等の基盤整備が進んだことによって、有性生殖に限らず様々な現象を解明する為のモデル研究系としてイデユコゴメ類を利用できると考えられる。また、イデユコゴメ類はその生態学的な特徴から産業利用に向けた研究が世界中で行われている為、本課題で得られた知見、遺伝的ツールを用いることで、今後のさらなる発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Sexual reproduction is ubiquitous in eukaryotes. Sex determining mechanisms have evolved repeatedly and independently in various lineages. Sexual reproduction was evolved from isogamy to oogamy through anisogamy. Isogamous organisms have a simple sex-determining region on their genomes. Thus, region and mechanism of sex determining have been well studied in the unicellular organisms such as yeasts and the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. We found that Cyanidiophyceae, which belongs to the unicellular red algae, undergo isogamous sexual reproduction. This discovery has enabled the development of genetic modification and the identification of a candidate sex-determining region. Cyanidiophyceae has been becoming a model lineage for the evolution of sexual reproduction.

研究分野：植物進化

キーワード：単細胞藻類 有性生殖 ゲノム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

有性生殖は減数分裂を介して遺伝的に多様な配偶子を形成し、それらが融合することで新たな遺伝子組成の個体を作る仕組みで、真核生物に普遍的に存在している。近年のゲノム解析の発展により、様々な生物で性決定領域、性決定遺伝子が明らかになり、性決定の仕組みは生物ごとに異なっており、種々の系統で独立に獲得されたことが示唆されている。有性生殖は、同形配偶からより複雑な異形配偶、卵生殖へと進化したと考えられており、同型配偶を行う単細胞真核生物の性決定領域は比較的単純なことが示されている。それゆえ、同形配偶を行う生物における研究は、性の獲得・制御を理解する上で重要であると考えられる。しかしながら、単細胞真核生物においては有性生殖自体が観察されていない系統群も多く、酵母 (Merlini *et al.* 2013) や単細胞緑藻クラミドモナス (Goodenough *et al.* 2007) といった限られたモデル生物種における研究しか行われてこなかった為、依然として、性がどのように獲得され、制御され、進化してきたのかについての理解は進んでいない。今後、これらの課題を解決するためには、より広い生物系統群での解析が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

イデユコゴメ類は世界各地の高温強酸性 (pH 0.05 - 5.0, <56 °C) の温泉に生息する単細胞紅藻の一群であり、無性生殖によってのみ増殖するとされていた (Miyagishima & Tanaka 2021)。この藻類群は紅藻の基部で分岐していることに加え、数億年から十数億年前に分岐した種が存在している (Yoon *et al.* 2004)。これまでに国内外の研究グループにより、イデユコゴメ類はゲノムサイズが小さく (8.8-17.8 Mb)、遺伝子組成が単純な生物であることが明らかになっている。さらに、イデユコゴメ類の中でもシゾンは相同組換えによる遺伝的改変技術が確立されており、モデル生物として利用されている。我々はイデユコゴメ類の研究開発を行う過程で、偶然にも有性生殖過程 (減数分裂による2倍体から1倍体の発生) を発見することができた。そこで、本研究では単細胞紅藻イデユコゴメ類を有性生殖研究のモデル系として開発し、性の決定機構、その獲得及び進化過程を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) イデユコゴメ類の有性生殖の探索と1倍体クローンの株化

シアニディオコッカスとガルデリアは強固な細胞壁を持ち、内生孢子を形成し、無性的に増殖することが知られている。我々はイデユコゴメ類を特殊な環境下で培養することで、細胞壁を持つ2倍体から細胞壁を持たない1倍体が生じることを発見し、株の整備を行なっている。これまでに、シアニディオコッカスとガルデリアのそれぞれの2倍体1クローンより生じた1倍体の複数クローン (それぞれ6クローン程度ずつ) を維持している。本課題では新たに、シアニディオコッカスの別株 (シアニディオコッカスのクレードには5つのサブクレードが存在する) や、シアンジウムでの有性生殖の探索を行ない、得られた1倍体を顕微鏡下で一細胞を単離することで、クローンとして株化する。このように、イデユコゴメ類における有性生殖研究のための株を整備する。

(2) ゲノム解析と性決定領域の探索

イデユコゴメ類の性決定領域を明らかにするために、(1) で株化された株のゲノム、トランスクリプトーム情報の整備を行う。それぞれの藻類種の1倍体の1クローンに関してはロングリ

ード (PacBio Sequel II) を用いて Telomere-to-Telomere (T2T) のゲノム解読を行う (得られた数クローンの中から、1 クローンをリファレンス作製用として)。アセンブラーは Canu v2.0 (Koren *et al.* 2017) を使用し、エラーの修正には Pilon (Walker *et al.* 2014) を使用する。遺伝子予測は RNAseq のデータを活用し Augustus (Stanke *et al.* 2008) で行う。一般的に性決定領域は相同染色体間の組み換えが生じない領域に存在する。その為、それぞれの藻類種の 2 倍体 1 クローンより生じた 1 倍体の複数クローンのショートリード配列 (illumina) を取得し、それぞれのリードをリファレンス配列に Bowtie2 (Langmead & Salzberg 2012) でマッピングし、接合型間 (クローン化した株の中にそれぞれの接合型が存在すると仮定) で組換えが起こらないゲノム領域 (性決定領域の候補) の探索を行う。

(3) 遺伝的改変の確立

本研究の遂行にあたっては、遺伝的改変技術が有用なツールになる。例えば、遺伝的改変を用いることで、接合によって生じた 2 倍体を効率よく選抜することや、性決定領域の候補配列を改変し、それらの配列が性決定に関わっているかを明らかにするといったことが出来るはずである。イデユコゴメ類の中でも、細胞壁を持たないシゾンは遺伝的改変技術が真核藻類の中では比較的早くに確立しており、相同組換えによる染色体任意箇所の編集、外来遺伝子の安定的発現などを行うことができる。最初にシゾンで確立された遺伝的改変系では、ウラシル要求性の M4 株 (*URA5.3* に自然点変異) を親株とし、*URA5.3* 遺伝子をセレクションマーカーとして遺伝子導入することで、ウラシル非要求性の株を選抜することが可能である (Minoda *et al.* 2004)。その後、薬剤 (クロラムフェニコール) を使った遺伝的改変法が確立され、野生株における遺伝的改変も容易に行えるようになった (Zienkiewicz *et al.* 2017, Fujiwara *et al.* 2017)。本薬剤選抜系を利用することで、日本で株の単離を行なったシアニディオコッカスにおいても、遺伝的改変を確立することができていた。しかしながら、現状使える薬剤マーカーはクロラムフェニコール耐性遺伝子の 1 つのみである。そこで、シゾンを含むイデユコゴメ類で使用可能な薬剤マーカーの探索を行う。他生物で遺伝的改変の選抜用として使用されている薬剤を幾つか入手し、シゾンとそれらの薬剤を含む培地で培養し、感受性の有無を調べる。感受性を示した薬剤があった場合、その薬剤の耐性遺伝子を組み込んだ DNA 断片を作製し、PEG 法による遺伝子導入、薬剤での選抜実験を行う。また、シゾンとは 10 数億年前に分岐したと考えられているガルデリアにおいても、有性生殖の発見により細胞壁を持たない 1 倍体を得られたことから、シゾンで確立されている PEG 法による遺伝的改変を行う。

(4) 接合条件の探索

これまでに、様々な単細胞生物でそれらの接合条件の探索が行われ、生物種によって異なる条件が見つかってきている。そこで、これまでに蓄積されている他生物での接合誘導条件 (栄養飢餓ストレス、日長変化、化学物質等) を参考にし、研究室環境での接合条件を顕微鏡観察によって探索する。しかしながら、生物種によっては接合効率が低く、薬剤などによる選抜系が有効な場合があるため、クロラムフェニコール耐性マーカーと、後述のように新たに開発されたプラストサイジン耐性マーカーを利用した接合によって生じる 2 倍体の選抜系を開発する。

4. 研究成果

(1) イデユコゴメ類の有性生殖の探索と 1 倍体クローンの株化

既に株化されているシアニディオコッカスとガルデリアに加え、新たにシアニディオコッカスを国内の温泉でサンプリングし、2倍体2株をクローン化した。さらに、それぞれの2倍体から1倍体を誘導し、それぞれ6クローンずつを株化することができた。また、ストックセンターよりシアニジウムを取り寄せ、そこから1倍体を誘導し、5クローンを得ることができた。これらの株は全てフリーズストックを作製し、維持している。

(2) ゲノム解析と性決定領域の探索

ロングリード配列を用いたアセンブルの結果、シアニディオコッカス、シアニジウム、ガルデリアのT2Tゲノム情報を得られた。それぞれのゲノムサイズ、染色体数はシアニディオコッカスが12.1 Mb, 20本、シアニジウムが8.7 Mb, 20本、ガルデリアが17.8 Mb, 80本であった。シアニディオコッカスとガルデリアについては遺伝子予測も終了しており、ガルデリアは既に公共のデータベース(DDBJ/EMBL/GenBank)への登録を行なった(BioProject: PRJDB12742)。これらのリファレンス配列に対して、それぞれの1倍体数クローン由来のショートリード配列をマッピングし、クローン間(接合型間)によってマッピングのされ方が異なる領域の探索を行なった。シアニディオコッカスにおいてはマッピングのされ方が異なる領域を見つけることができた為、その領域の詳細な比較を行うために、Spades(Bankevich *et al.* 2012)を用いてショートリードのアセンブルを行なった。その結果、相同染色体間で組換えの起こらないゲノム領域(性決定領域の候補)を見つけることができた。本領域は他のシアニディオコッカスとシアニジウムにおいて共通していたが、ガルデリアには見られなかった。それゆえ、ガルデリアにおいては異なる性決定領域があると思われる。今後詳細な解析を行う予定である。

(3) 遺伝的改変の確立

他生物で薬剤選抜系に用いられている薬剤への感受性を、シゾンにおいて調べた。その結果、新たにプラストサイジン(1mg/ml)に対して感受性を示すことが明らかになった。そこで、プラストサイジン耐性遺伝子(*BSD*)の発現カセットを含むDNA断片を作製し、PEG法により導入後、プラストサイジン含有培地で選抜した。クロラムフェニコールでの選抜系と比較し、若干その効率は落ちるが、形質転換体を得ることができた。本成果は論文として公開されている(Fujiwara *et al.* 2021)。ガルデリアにおいても細胞壁のない1倍体を用いてシゾンで開発された薬剤選抜法を試した。クロラムフェニコールにおいては、様々な条件(光、温度、細胞の状態など)の影響を受けるためか、薬の効きが安定せず、形質転換体を得ることが現状できていない。しかし一方で、プラストサイジンにおいては薬の効きは安定し、形質転換株を得ることができた。シゾンと比較し、プラストサイジンの効きは良く低濃度(0.1 mg/ml)で効率よく形質転換体を得ることができた。本成果は論文として公開されている(Hirooka *et al.* 2022)。

(4) 接合条件の探索

2倍体株から減数分裂によって生じた1倍体クローンを様々な条件で、総当たりの接合実験を行なったが、接合による2倍体は得られなかった。そこで、遺伝的改変を用いて接合によって生じる2倍体を選抜する方法を遺伝的改変が確立されたシアニディオコッカスとガルデリアにおいて行なった。シアニディオコッカスにおいては1倍体6株のクロラムフェニコール耐性とプラストサイジン耐性株をそれぞれ作製し、共培養した後に、両方の薬剤を含む培地での選抜を行なった。しかしながら、接合による2倍体(両方の薬剤耐性遺伝子を持った株)は現状得られていない。ガルデリアにおいては使用できる薬剤マーカーが一つしかないため、薬剤耐性と栄養要求

性を組み合わせた選抜系を行なった。具体的には、まず *URAI* locus (ウラシル合成に關与する遺伝子) をプラストサイジン耐性遺伝子 (BSD) の発現カセットに置き換えた *URAI* 破壊株 ($\Delta URAI$) を作製した。この株はウラシル要求性かつ、プラストサイジン耐性を示す一方で、野生型はウラシル非要求性かつ、プラストサイジン感受性であるため、これらの株が接合した場合にのみ、ウラシル非要求性かつ、プラストサイジン耐性を示すヘテロ 2 倍体が生じ、プラストサイジン含有培地 (ウラシルは含まない) で選抜することができる。本方法により、接合による 2 倍体を選抜することができ、ガルデリアにおいては有性生殖を伴う生活環を実験室環境で再現することに成功し、論文として発表した (Hirooka *et al.* 2022)。現在、他のイデユコゴメ類に關しても同様の手法で接合によって生じる 2 倍体の選抜を試している。

今後、性決定領域の候補が見つかったシアニディオコッカスとシアニジウムの実験室環境での接合の誘導条件と、接合に成功したガルデリアの性決定領域の候補を見つけることが出来れば、イデユコゴメ類を有性生殖のモデル系として利用できるはずである。引き続き、単細胞紅藻イデユコゴメ類を有性生殖研究のモデル系としての開発を行い、性の決定機構、その獲得及び進化過程を明らかにするための研究を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujiwara T, Hirooka S, Miyagishima SY.	4. 巻 -
2. 論文標題 A cotransformation system of the unicellular red alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i> with blasticidin S deaminase and chloramphenicol acetyltransferase selectable markers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Plant Biol.	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) 10.1186/s12870-021-03365-z	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 Hirooka Shunsuke, Itabashi Takeshi, Ichinose Takako M., Onuma Ryo, Fujiwara Takayuki, Yamashita Shota, Jong Lin Wei, Tomita Reiko, Iwane Atsuko H., Miyagishima Shin-ya	4. 巻 119
2. 論文標題 Life cycle and functional genomics of the unicellular red alga <i>Galdieria</i> for elucidating algal and plant evolution and industrial use	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2210665119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2210665119	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣岡俊亮、一ノ瀬孝子、大沼亮、藤原崇之、山下翔大、Lin Wei Jong、 富田麗子、岩根敦子、宮城島進也
2. 発表標題 植物進化のミッシングリンク -単細胞紅藻の有性生殖過程の発見-
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022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
---------	---------