

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06242

研究課題名（和文）緑藻スジアオノリ配偶子の微細な性差から解く、細胞間の相互認識と融合の仕組み

研究課題名（英文）Minute sexual dimorphism in gametes of green seaweed *Ulva* shed light on cell-to-cell recognition and fusion mechanisms

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・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）：本研究は、海産緑藻アオノリの雌雄配偶子の間の「認識」と「融合（受精）」に重要な役割をもつタンパク質の実体と機能を明らかにすることを通して、原始的な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を明らかにすることを目的とした。雌雄配偶子の間の比較プロテオームから、「認識」と「融合（受精）」に関連するタンパク質を同定することができた。また、その内の一つのタンパク質（GEX2）について、ゲノム編集によって、遺伝子を破壊したオス配偶子では受精能を消失すること、このタンパク質はオスの接合装置（受精開始部位）付近に存在することを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アオノリの配偶子接合は非常に単純で原始的であるが、この単純さは有性生殖の根幹である配偶子間の「認識」と「融合」の仕組みを解き明かす上では、大きな利点である。被子植物や動物では受精時の配偶子間の細胞膜の動態を観察することは組織の複雑さから困難を伴うが、アオノリでは配偶子間の膜の接着や融合をより簡便に直接観察することができる。この構造的な単純さを利用することで、細胞がお互いを正しく認識し融合する仕組みを解き明かしたい。植物では受精に関わる遺伝子は藻類から陸上植物まで保存されているものが多く、海藻で明らかにした受精の仕組みを有用作物の品種改良などへ還元することも期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the entities and functions of proteins that play important roles in "recognition" and "fusion (fertilization)" between the male and female gametes of the marine green alga blue-green algae. From the comparative proteomes between male and female gametes, we were able to identify proteins related to "recognition" and "fusion (fertilization)". For one of the proteins (GEX2), we were able to show that the male gametes whose genes were disrupted by genome editing lost fertilization ability, and that this protein is located near the male mating structure (fertilization initiation apparatus).

研究分野：藻類学

キーワード：海藻 有性生殖 ゲノム編集 配偶子接合

1. 研究開始当初の背景

生物は、細胞間の相互作用・認識によって、生物学的に正しい相手である同種・異性を見つけ出し、有性生殖を行なう。動物では卵と精子、被子植物では重複受精と精巧な生殖システムが進化しているが、緑色海藻スジアオノリの生殖様式は単純な異形配偶子接合で、雌雄配偶子に形態的性差はほとんどない。雌雄の配偶子を混合すると、配偶子は凝集し、鞭毛の先でお互いの性や種を認識し、同種の異性であることがわかると瞬時に細胞融合が進む。この様にスジアオノリ配偶子の性差は、認識に機能する鞭毛と、細胞融合を開始する接合装置に集約されているようだ。

鞭毛による種や性の認識は緑藻やアオサ藻だけではなく、系統的に離れた褐藻でも報告されており (Müller 1966 *Planta* 98:57-68) 運動性ととも鞭毛によるアロ認証は収斂進化したものであろう。動物 (オピストコンタ) の鞭毛は運動性に特化した様に思えるが、植物や原生生物を含むバイコンタでは運動性だけでなく、最初に異性を認識する受容器官としても重要な役割を果たしているようだ。緑藻クラミドモナスでは鞭毛の先端部分の糖タンパク質アグルチニンが「種」と「性」の認識に関わっているとされているが、アオノリでも相同性を示すタンパク質が鞭毛から見つかった。このタンパク質の類縁な糖タンパク質ファミリー (HRGPs) は、陸上植物においても生殖器官での発現が多数報告されており、種の認識に機能する保存的なタンパク質ファミリーである可能性が示唆される。

精子と卵子の細胞融合に関わるタンパク質は、哺乳類では精子側では IZUMO1、卵子側では CD9 と JUNO が融合に必須な因子として同定されており、ウニでは Bindin、EBR1 と言うように異なるタンパク質が知られている。また動物やバイコンタにまたがる多くの系統では雄側の因子として GCS1/HAP2 が広く保存され、配偶子の膜融合に機能する。精細胞の接着に関わる因子として GEX2 も単離されているが、こちらも雄側の因子である。不思議なことに、植物では雄側の細胞接着、細胞融合に関わる因子は同定され、機能解析が行われてきているが、雌側の因子は未同定の状態が続いている。

2. 研究の目的

自然の環境の中には、多種多様な生物が生育しているが、なぜ生物はお互いに正しい「種」と「性」を認識し、受精を成立させることができるのだろうか。この配偶子間、および卵と精子の間の相互認識と融合に関わる機構は長くに渡って様々な生物種で研究が進められてきた。

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。アオノリの雌雄配偶子は、正の走光性で水面に集まり、多数の配偶子が凝集する。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多くの種で保存的である (Fig. 1)。位置は雌雄で非対称で、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 (Fig. 1)。本研究ではアオノリ配偶子間の「認識」と「融合」に重要な役割をもつタンパク質の実体と機能を明らかにすることを通して、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を明らかにしたい。

3. 研究の方法

本研究では緑藻スジアオノリの持つ配偶子という単純な生殖細胞を利用することで、有性生殖過程、特に配偶子間の鞭毛による相互の「認識」と膜の「融合」に関与するタンパク質の同定とその具体的な機能を明らかにすることを目標とする。まず これまでに細胞膜、鞭毛プロテームから同定された雌雄配偶子の「認識」と膜の「融合」に機能すると思われる候補遺伝子（アグルチニンや GEX2）の欠損変異体をゲノム編集により作出する。また雌雄配偶子の形成過程で経時的にサンプリングした RNAseq を行い、アロ認証および接合時の細胞融合に関わるとと思われる遺伝子群の発現変動を調べる。さらに、これらの遺伝子の局在や発現パターンを可視化するために、ゲノム編集を利用した遺伝子挿入法の系を確立候した。以上の手法を駆使して、GEX2 をはじめとする遺伝子の機能解析を試みた。

4. 研究成果

まず、細胞膜、鞭毛プロテームから同定された雌雄配偶子の「認識」と膜の「融合」に機能すると思われる候補遺伝子（アグルチニンや GEX2）の発現変動を明らかにするために、RNAseq 解析を行った。また、先進ゲノム支援を利用して、長鎖の RNA 産物を解析できる Iso-seq 解析をすることで、より正確な遺伝子モデルを予測する事ができた。解析の結果、GEX2 や GCS 1 と言った、陸上植物で既知の雌雄配偶子の融合に関与している遺伝子群は、スジアオノリでも配偶子の形成過程で発現量が上昇していることが明らかになった。またこれらの遺伝子に関しては、雌雄ともに配偶子の形成過程で誘導がみられた。

このうち GEX2 に関してスジアオノリ雌雄配偶体の KO 変異体を作成し、表現型を確認したところ、オス KO 変異体では形成された雄配偶子は雌配偶子との接合能を完全に失っていた。それに対し、メス KO 変異体由来の雌配偶子は、雄配偶子と接合が可能であった。このことは、GEX2 は雄でのみ機能していること、また雌では GEX2 は転写されているが機能していないと考えられた。

次に、タンパク質の局在解析などを可能にするために、ゲノム編集によるノックイン実験系の開発を試みた。当初は短い 2 本の ssDNA を利用し、DNA ドナーを切断箇所に挿入する系を構築した（現在論文を投稿中）が、効率や正確性の面で改善の余地があったため、切断箇所への相同配列を付加した長鎖の ssDNA を利用する手法の構築に取り組んだ。実験の結果、正確性、効率ともに改善され、ターゲット遺伝子である GEX2 の C 末端側に GFP を付加することに成功した。この挿入変異体由来の配偶子の観察から、GEX2 はオスの配偶子の先端部分、雌雄配偶子の接合の起点となる部位（接合装置）付近に局在することが明らかになり、この遺伝子がスジアオノリの雌雄配偶子の融合の最初のステップを支配している遺伝子であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 1件）

1. 著者名 Innami Ryoya, Miyamura Shinichi, Okoshi Masako, Nagumo Tamotsu, Ichihara Kensuke, Yamazaki Tomokazu, Kawano Shigeyuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Gamete dimorphism of the isogamous green alga (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>), is regulated by the mating type-determining gene, MID	5. 発行年 2022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/s42003-022-04275-y	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 Shen Yuan, Motomura Taizo, Ichihara Kensuke, Matsuda Yusuke, Yoshimura Ko, Kosugi Chika, Nagasato Chikako	4. 巻 -
2. 論文標題 Application of CRISPR-Cas9 genome editing by microinjection of gametophytes of <i>Saccharina japonica</i> (Laminariales, Phaeophyceae)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Applied Phycology	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） 10.1007/s10811-023-02940-1	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 Ichihara Kensuke, Yamazaki Tomokazu, Kawano Shigeyuki	4. 巻 70
2. 論文標題 Genome editing using a DNA free clustered regularly interspaced short palindromic repeats Cas9 system in green seaweed <i>Ulva prolifera</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Phycological Research	6. 最初と最後の頁 50～56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pre.12472	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5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 市原健介	
2. 発表標題 スジアオノリの多様な生殖様式：アポミクシスと有性生殖の分子メカニズム	
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会	
4. 発表年 2021年	

1．発表者名 市原健介
2．発表標題 ゲノム情報とゲノム編集で解き明かすスジアオノリの有性生殖と無性生殖
3．学会等名 第69回日本生態学会大会（招待講演）
4．発表年 2022年

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Cas9を利用 した遺伝子導入法の開発
3．学会等名 日本植物学会第87回大会
4．発表年 2023年

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Cas9と DNAドナーによる外来遺伝子導入法の開発
3．学会等名 日本藻類学会第48回大会
4．発表年 2024年

1．発表者名 市原健介
2．発表標題 藻類でもできるゲノム編集
3．学会等名 日本藻類学会第46回大会藻類学ワークショップ
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
---------	---------