

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22405014

研究課題名(和文)接合藻ヒメミカツキモの種分化機構解明に向けた生殖隔離状況調査と実験的検証

研究課題名(英文)Analyses of reproductive isolation of *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex for the understanding of the speciation.

研究代表者

関本 弘之 (Sekimoto, Hiroyuki)

日本女子大学・理学部・教授

研究者番号：20281652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円、(間接経費) 3,420,000円

研究成果の概要(和文)：海外・国内数カ所の拠点において、ヒメミカツキモの分布調査と採集を進め、系統株の確立を行った。交配試験により生殖的隔離状況を検討するとともに、それぞれの系統学的関係を解析した。台湾から単離された新規ヘテロタリック株を足がかりとして、最終的に新規交配群Gを構成する系統株を確立した。これらは、ゲノム解読に用いられている交配群IEと部分的な接合反応を示し、生殖隔離の実態を分子生物学的に解析するための重要な研究対象と位置づけられた。

研究成果の概要(英文)：The *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (C. p-s-l. complex) is a unicellular alga, and is known to be composed of several reproductively isolated mating groups of heterothallic strains. We carried out field studies in foreign countries and in Japan, to isolate reproductively isolated C. p-s-l. complex. Finally, we established several unialgal clonal cultures from these fields. We studied phylogenetic relationship using DNA sequences of 1506 group I introns of these clones. Based on the alignment, significant phylogenetic relationships were observed between newly established mating group G and mating group I-E. Because genome project of cells belonging to the group I-E is ongoing, newly established group G would be suitable for the understanding of the mechanism of reproductive isolation, in the molecular biological aspect.

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：生物多様性・分類

キーワード：ミカツキモ 生殖隔離 性フェロモン 種分化

### 1. 研究開始当初の背景

生殖隔離・種分化について、これまで多くの生物種を用いた研究がなされてきたが、そのほとんどが種間の系統関係や、遺伝的差異の比較にとどまっており、生殖隔離に直結する雌雄配偶子細胞間のコミュニケーションに注目した研究は例がなかった。本研究では、生殖の成否を決める遺伝子に注目し、そのメカニズムに踏みこむことを目指しており、種分化・生殖隔離研究の先端を行く研究として立案された。

本研究で着目したミカツキモは、100種類を超える形態学的種から構成され、さらにある種の形態学的種については、雌雄にあたる2つの性(+型、-型)を持つヘテロタリックなもの、同一クローン内で接合子を生じるホモタリックなもの、接合はせずに単為胞子を形成するものなどを含む場合もある。さらにヘテロタリックなものは、交配群を超えた接合反応が全く起こらない完全に生殖隔離した集団や、低い頻度で接合子を形成できる不完全な生殖隔離交配群などを含んでおり、非常に分化が進んだ集団である。これまでに、Ichimuraらの一連の研究で、オオミカツキモ(*C. ehrenbergii*)の交配に基づく生殖隔離状況と生物学的種の存在について、いくつかの事実が得られている。しかしながら、用いられた株の多くは、分離からすでに30年以上が経過し、交配能力を失っているものが多く、これ以上の解析は困難になっている。

一方、我々はヒメミカツキモの有性生殖に関わる分子機構を解析してきた。これまでに、接合成立に不可欠な二種の性フェロモン(PR-IP, PR-IP Inducer)が単離され、それらをコードする遺伝子の配列が明らかになっている。また、cDNA マイクロアレイ解析により、有性生殖過程で機能する88種の遺伝子群の単離・解析なども進んでいる。さらに、最近、遺伝子導入系を確立して、原因遺伝子の影響を直接モニター出来るようになった。加えて、オオミカツキモからも有性分裂を誘導する性フェロモンを精製し、最終的にPR-IP Inducer と同定性を有する遺伝子として単離に成功しており、交配の成否に直接影響をもたらすような遺伝子について、様々な系統株から単離・解析できるようになった。

このような我々の先行研究を通して、ヒメミカツキモは、分子レベルで配偶子間の相互情報交換を解析し、種分化機構を検討できる、唯一の単細胞生物と位置づけられるようになった。しかしながら、現在系統保存されている株の多くは、35年以上前に単離されたものであり、現時点で交配能をもたないものが非常に多く、以後の解析には使用できない。

これらの状況を踏まえて、これまでに、国内外でヒメミカツキモの分布調査、単離を進めてきており、接合試験による交配群確定、性フェロモン活性の差異などを解析してきた。その結果、確立された3種の交配群において、生殖隔離度と性フェロモンの活性、遺伝子変異度に有意な相関が見出され、性フェロモン遺伝子の変異が交配能力の第一義的な決め手であることが強く示唆された。今後、さらにこの事実を正確に把握するためには、既存の交配群と生殖隔離段階の異なる、出来

るだけ多くの系統株を、様々な地域から確立する必要があるが、現在、世界各国で系統保存されている株の数は、あまりにも少ない。そのような背景のもと、本研究を遂行する必要性が非常に高まっていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、1) 地域的に離れて遺伝子交流が出来ない海外数カ所の拠点(オーストラリア、ニュージーランド、フランス、ドイツ、タイ、韓国、台湾など)において、ヒメミカツキモの分布調査と採集を進め、2) 交配試験により生殖的隔離状況を検討し、3) 進化に中立な塩基配列情報を用いた詳細な系統解析、4) 性フェロモンを始めとする性関連遺伝子の分子系統解析を行うことで、地理的に隔離した集団と、同所的に存在しつつも遺伝子交流が出来なくなった集団の変異度を比較解析する。

さらに最近確立したヒメミカツキモへの遺伝子導入系を利用して、5) 生殖隔離した他系統由来の性フェロモン遺伝子を導入した形質転換ヒメミカツキモを作製し、隔離がどこまで回復するかも検討する。これらを通して、生殖隔離・種分化機構の分子遺伝学的基盤の解明を目指すことを最終目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 性フェロモン遺伝子の単離が完了しているヒメミカツキモを中心に、地域的に離れて遺伝子交流が出来ない海外数カ所の拠点からミカツキモを含む水サンプル、土壌サンプルを採集し、国内にて、1細胞由来の系統保存株を確立した。

(2) 国内からも系統保存株の確立を進め、これらの系統株を用いた接合試験により、生殖隔離状況と交配群を正確に把握した。

(3) 18S rDNA group I intron および ITS 領域の DNA 塩基配列を利用し、種間の系統関係を正確に把握するとともに、性フェロモン遺伝子を始めとする生殖隔離の直接の原因となる分子の構造を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 海外での採集

平成 22 年 8 月に台湾、10 月にネパール(カトマンズ、ポカラ)、平成 23 年 3 月にニュージーランド(南島)、6 月にアメリカ(ネブラスカ州)、8 月にスイス(チューリッヒ)、平成 24 年 3 月にオーストラリア(ウァーナンブル)、平成 25 年 8 月にアメリカ(フロリダ州)に滞在し、基本的にレンタカー利用または現地共同研究者に依頼し、それぞれ数カ所の拠点にて採集を行った。

#### (2) 国内での採集

宮崎県、静岡県、山形県、三重県、島根県、

北海道などを中心に、採集を行った。

### (3)系統保存株の確立

平成 22 年度は、台湾から 3 株、国内から 10 株のヒメミカヅキモを単離した。

平成 23 年度は、スイスおよびオーストラリアからは、それぞれ 3 株および 5 株のヒメミカヅキモ単離に成功したが、アメリカからはミカヅキモ属そのものを見いだせなかった。一方、国内からは 8 株の単離に成功した。

平成 24 年度は、当初中国（武漢）での調査を予定していたが、現地共同研究者からの社会情勢を踏まえた判断により、中止することとなった。それにより、研究期間を延長し、平成 25 年 8 月にアメリカ（フロリダ州）で調査を行ったが、ヒメミカヅキモ株の単離には至らなかった。一方、静岡（麻機遊水池）から 25 株のヒメミカヅキモ系統株確立に成功した。

### (4)生殖様式、交配関係、系統関係

得られた株について接合誘導実験を行い、ホモタリズム、ヘテロタリズム、単孢子形成のいずれの生殖様式であるかを評価したところ、確立された多くの株がホモタリズムであると考えられた。また、いくつかの株では、いずれの生殖様式も示さないことから、おそらくヘテロタリズムを行うものであると推定されたが、交配相手の細胞を単離できていないためか、接合条件が不適切であるためかは、ほとんどについて判断できなかった。

静岡（麻機遊水池）から単離したヒメミカヅキモ 25 株では、1 株がホモタリック株、16 株が同一交配群に属するヘテロタリック株、8 株が有性生殖反応を示さなかった。このヘテロタリック株は、既存の交配群（IIA, IIB, IE）との間に接合子を作らず、生殖的に隔離していた。この交配群は、台湾から採集された交配相手の見つからないヘテロタリック株との接合反応を足がかりにして、数回の調査を経て、ようやく確立に至ったものである。1 度目の調査では、麻機遊水池からは一方の接合型細胞のみが単離されており、台湾株との関係がなければ、新規交配群の確立に至らなかった可能性が高かった。

得られたそれぞれの系統株について、18S rDNA group I intron 配列および ITS2 領域の配列を決定し、系統樹を作成した。その結果、形態による同定結果を支持し、得られた株のほとんど全てが既存のヒメミカヅキモクレードに含まれた。さらに静岡（麻機遊水池）から単離したヘテロタリック株は、これまでゲノム解読が進行中の交配群 IE と近縁であることが判明し、両者を混合することで、若干の生殖反応が観察された。この交配群を新規交配群 G とし、次に、交配群 IE と交配群 G の間で性フェロモンが作用し合うかを精査したところ、異なる交配群の有性分裂を誘導する活性が観察され、部分的に性フェロモンが作用することが明らかとなった。さらにウ

エスタンプロットングを行ったところ、交配群 IE の PR-IP に対する抗体では、交配群 G の PR-IP は検出されなかったものの、PR-IP Inducer に対する抗体では、弱いながらも交配群 G の PR-IP Inducer と思われるバンドが検出された。

### (4)今後の展望

交配群 IE と交配群 G の間にある隔離障壁が他の交配群との隔離障壁と共通するのかを解析することで、生殖隔離の共通機構の解明が期待される。また、交配群 G は、ゲノム解読が進行中の交配群 IE と近縁であることから、生殖隔離の実態を分子生物学的に解析するための有効な研究対象とな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 13 件)

Sato, M., Sakayama, H., Sato, M., Ito, M., Sekimoto, H. (2014)

Characterization of sexual reproductive processes in *Chara braunii* (Charales, Charophyceae). *Phycol. Res.* in press. (査読有り)

Hiraide, R., Kawai-Toyooka, H., Hamaji, T., Matsuzaki, R., Kawafune, K., Abe, J., Sekimoto, H., Umen, J., \*Nozaki, H. (2013) The evolution of Male-Female sexual dimorphism predates the gender-based divergence of mating locus gene *Mat3/RB*. *Mol. Biol. Evol.* 30(5): 1038-1040. (査読有り) doi: 10.1093/molbev/mst018.

\*Sekimoto, H., Abe, J., Tsuchikane, Y. (2012) New insights into the regulation of sexual reproduction in *Closterium*. *International Review of Cell & Molecular Biology*. 297: 309-338 (査読なし) doi: 10.1016/B978-0-12-394308-8.00014-5.

Hori, S., \*Sekimoto, H., \*Abe, J. (2012) Properties of cell surface carbohydrates in sexual reproduction of the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale*

complex (Zygnematophyceae, Charophyta). *Phycol. Res.* 60: 254-260 (査読有り) DOI: 10.1111/j.1440-1835.2012.00656.x

\*土金勇樹、関本弘之 (2012) 「ミカヅキモの生殖について」『海洋と生物』34 巻、5 号、426-434. (査読なし)

\*Tsuchikane, Y., Tsuchiya, M., Hindák, F., Nozaki, H., Sekimoto, H. (2012)

Zygosporium formation between homothallic and heterothallic strains of *Closterium*. Sex Plant Reprod. 25: 1-9. (査読有り) doi: 10.1007/s00497-011-0174-z.

\*関本弘之 (2012)「単細胞シヤジクモ藻類ミカヅキモにおける生殖隔離、種分化機構の研究」IFO Research communications 26巻、71-85. (査読有り)

Yang, Y., Maruyama, S., Sekimoto, H., Sakayama, H., \*Nozaki, H. (2011) An extended phylogenetic analysis reveals ancient origin of “non-green” phosphoribulokinase genes from two lineages of “green” secondary photosynthetic eukaryotes: Euglenophyta and Chlorarachniophyta. BMC Research Note, doi:10.1186/1756-0500-4-330. (査読有り)

\*Abe, J., Hori, S., Tsuchikane, Y., Kitao, N., Kato, M., \*Sekimoto, H. (2011) Stable nuclear transformation of *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. Plant Cell Physiol. 52(9): 1676-1685. (査読有り) doi: 10.1093/pcp/pcr103.

Tsuchikane, Y., Tsuchiya, M., Kokubun, Y., Abe, J., \*Sekimoto, H. (2011) Conjugation processes of *Penium margaritaceum* (Zygnematophyceae, Zygnematophyta). Phycol. Res. 59: 74-82. (査読有り)

DOI: 10.1111/j.1440-1835.2010.00602.x  
\*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. (査読有り) doi: 10.1093/pcp/pcq110.

Vannerum, K., Abe, J., Sekimoto, H., Inze, D., \*Vyverman, W. (2010) Intercellular localization of an endogenous cellulose synthase of *Micrasterias denticulate* (Desmidiaceae, Chlorophyta) by means of transient genetic transformation. J. Phycol. 46: 839-845. (査読有り)

DOI: 10.1111/j.1529-8817.2010.00867.x  
\*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 (Zygnematales, Charophyceae). J. Phycol. 46: 278-284. (査読有り) DOI: 10.1111/j.1529-8817.2010.00806.x

[学会発表](計 42件)

Tsuchikane, Y., Sekimoto, H. “Characterization of a conjugation processes in homothallic *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex” 10th International phycological congress, Orlando, Florida USA, August 9, 2013.

Sekimoto, H., Hirano, N., Marukawa, Y., Abe, J., Tsuchikane, Y. “A receptor-like kinase responsible for the progress of sexual reproduction of a charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex” 10th International phycological congress, Orlando, Florida USA, August 6, 2013.

土金勇樹、西山智明、関本弘之「生殖隔離に関わる性フェロモンのゲノムレベルでの特徴」日本藻類学会第37回大会(山梨大学)2013年3月28日

Sekimoto, H., Hirano, N., Marukawa, Y., Tsuchikane, Y., Abe, J. “Intercellular communication in sexual reproduction of a unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex” International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants, Nagoya, November 16, 2012.

Tsuchikane, Y., Sekimoto, H. “Sexual recognition between homothallic and heterothallic strains of *Closterium*” International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants, Nagoya, November 15, 2012.

関本弘之、滝口若菜、原真由美、高橋紗也香、土金勇樹、阿部淳「ヒメミカヅキモの性フェロモン PR-IP Inducer 結合分子の特性解析」日本植物学会第76回大会(兵庫県立大学)2012年9月15日

土金勇樹、西山智明、関本弘之「接合藻ヒメミカヅキモにおける生殖隔離に関わる性フェロモンの進化」日本植物学会第76回大会(兵庫県立大学)2012年9月15日

Sekimoto, H. “Identification of binding molecules for sex pheromone, PR-IP Inducer, in *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex.” The 6th Asian Pacific Phycological Forum, Yeosu, Korea, October 13, 2011.

阿部 淳、西山 智明、関本弘之「単細胞

シャジクモ藻類ヒメミカツキモのゲノミクス」日本植物学会（東京大学）シンポジウム「ゲノム解析によって解き明かされる植物の多様性」2011年9月18日

関本弘之、原真由美、高橋紗也香、山田紗也佳、宮城絢乃、土金勇樹、阿部淳「単細胞接合藻類ヒメミカツキモの性フェロモン PR-IP Inducer 結合分子の探索」日本植物学会（東京大学）2011年9月17日

土金勇樹、関本弘之「接合藻ヒメミカツ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

土屋美紀、土金勇樹、関本弘之「単細胞接合藻ヒメミカツ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

〔図書〕（計 4 件）

野崎久義、関本弘之（2014）第4章 藻類の有性生殖（澤田均 編著「動植物の受精学」、化学同人（京都）。（査読なし）  
\*Sekimoto, H., Abe, J., Tsuchikane, Y. (2014) Mechanism of sexual reproduction in fresh water microalgae. In "Reproductive Biology of Plants", Ramawat, K.G. ed. CRC press. (査読なし)

\*Sekimoto, H., Tsuchikane, Y., Abe, J. (2014) Sexual reproduction of a unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strogosum-littorale* complex. In "Sexual Reproduction in Animals and Plants", Sawada, H. et al. eds. Springer. (査読なし)

\*関本弘之(2012) 性フェロモン（渡辺信他 編著「藻類ガイドブック」、エヌ・ティー・エス（査読なし）

〔その他〕

ホームページ等

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・教授  
研究者番号：20281652

(2) 研究分担者

野崎 久義 (NOZAKI, Hisayoshi)  
東京大学・大学院理学系研究科・准教授  
研究者番号：40250104

(3) 連携研究者

土金 勇樹 (TSUCHIKANE, Yuki)  
日本女子大学・理学部・助教

研究者番号：20434152

(4) 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