

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32670

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657161

研究課題名(和文)ヒメミカヅキモのホモタリック株における「性」の実体解明

研究課題名(英文)Critical analyses of "Sex" in homothallic *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・教授

研究者番号：20281652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒメミカヅキモのホモタリック株(以下、ホモ株)は、一つの細胞が有性分裂を行うことで生じた、二つの姉妹配偶子嚢細胞同士で接合子を作りやすく、近縁なヘテロ株と掛け合わせると低頻度でハイブリッド接合子を作る。まず、ヘテロタリック株と安定してハイブリッド接合子を形成するホモタリック株(naga37)の確立に成功した。さらに、このハイブリッド接合子から、子孫株の確立を目指したが、成功しなかった。新型シーケンサーを用いたRNAseq解析を行い、アイソフォームを含む132329のtranscriptを取得した。

研究成果の概要(英文)：In *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex, two types of conjugation produce zygotes; one is a conjugation between two complementary mating-type cells (mt+ and mt-) and the other is a conjugation between clonal cells. The former is referred to as heterothallism and the latter as homothallism.

Heterothallic mating group II-B and homothallic strains (naga37) are phylogenetically closely related. The formation of hybrid zygotes between the homothallic cells and either heterothallic cells was confirmed. These results suggest that at least some of the homothallic gametangial cells possess the same characteristics as heterothallic mt- and/ or mt+ cells. On the other hand, progenies derived from the hybrid zygotes could not be obtained.

Total RNA was collected from cells in several asexual and sexual reproductive stages and large scale RNAseq data was obtained by using new generation sequencer Hiseq2000. Finally, 132329 transcripts including many isoforms were established.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：ミカヅキモ 有性生殖 ホモタリズム ヘテロタリズム 性分化 性決定

1. 研究開始当初の背景

本研究で注目した単細胞接合藻類であるヒメミカヅキモは、+型と-型の遺伝的に決定された性を持つヘテロ株と、1細胞由来の同一クローン同士で接合子をつくるホモ株が存在する。ヘテロ株では、二種類の糖タンパク質性の性フェロモンを介した細胞間コミュニケーションの実体が明らかにされており、さらに生活環の様々なステージにある細胞から5種の完全長 cDNA ライブラリーが作製され、両端からの EST シークエンスが行われ、これまでに約 17 万配列の EST が得られている。さらに 2010 年度のゲノム支援により、新型シークエンサーを用いたヒメミカヅキモの概要ゲノム解析がなされることが決定し、豊富な遺伝情報を得られるようになった。

ホモ株では、一つの細胞が有性分裂を行うことで生じた、二つの姉妹配偶子嚢細胞同士で接合子を作りやすい(90%以上)ことが判明し、有性分裂によって、姉妹にヘテロ株に相当する性が生じていると示唆された。実際に、このホモ株と極めて近縁な系統関係にあるヘテロ株では、ホモ株との混合により、ハイブリッド接合子を作ることも判明した。また、両株は完全な生殖隔離関係にはなく、比較的新しい過去に、ごく少数の遺伝子の変異のみによって、全く異なる生殖様式をとるよう進化したことも示唆された。

植物において、生殖様式がどのように進化してきたのかについて、その見解は種ごとに異なっており、多くの植物では生殖機構の進化について、原因遺伝子の特定につながるものが期待される研究例はほとんどない。これらの背景を踏まえて、ホモ株における性分化の実態を解明すべく、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、まず、ヘテロタリック株と安定してハイブリッド接合子を形成する近縁なホモタリック株を確立する。また、新型シークエンサー (Illumina) を用いた RNAseq により、どのような遺伝子群が発現するのかを検討し、ヘテロタリック株の情報と比較解析する。その株を用いて、有性分裂後の姉妹配偶子嚢細胞をそれぞれ単離培養し、特定の接合型細胞に分化しているかを、ヘテロ株との掛け合わせで確認する。近年開発したヒメミカヅキモへの遺伝子導入ベクター系を用いて、姉妹細胞間で顕著に異なる発現プロファイルを示す遺伝子群(性フェロモン遺伝子を想定)を元のホモ株内で過剰発現させ、ヘテロ型へ変化するかを検証する。

さらに、ホモ株とヘテロ株との間で生じたハイブリッド接合子から子孫株を得て、その表現型と分離比を解析し、生殖機構を決める遺伝子が1つか複数か、またマッピングできるかを検討する。これらを総合して、ホモ株の特性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) kodama20 株の姉妹配偶子嚢細胞の表現形
kodama20 株を有性分裂させた後、姉妹配偶子嚢細胞をそれぞれキャピラリーにより単離培養した。これらの自家接合子形成率、ヘテロ株との混合によるハイブリッド接合子形成率、性フェロモン遺伝子の発現量を調べた。

(2) 新規ホモタリック株の確立

新たに複数のフィールドからヒメミカヅキモを採集し、キャピラリーを用いて細胞を洗浄し、クローン系統株として確立した。得られた系統株の中から、ホモタリック株を選別した。

(3) 系統解析と表現形

各系統株からゲノム DNA を調製し、18S rDNA の group 1 intron 領域の配列情報を取得し、系統解析を行った。これらから、交配群 IIB に近縁な株を選択し、ヘテロタリック株 (slo26-1, 26-4 株) と掛け合わせ、両性のヘテロ株ともハイブリッド接合子を形成しうる株を選抜した。

(4) ハイブリッド接合子からの子孫細胞回収

ヘテロ株とホモ株との混合により生じたハイブリッド接合子からの子孫発芽について、接合子の成熟、乾燥処理条件などを検討した。

(5) RNAseq 解析

選抜されたホモ株について、栄養増殖期、接合誘起前期、接合誘起中期、接合誘起後期、発芽期の細胞を、それぞれ誘起時間を変えて回収し、これらから RNA を抽出した。次世代シークエンサー (Illumina HiSeq2000) を用いた transcriptome 解析を行い、データの de novo assemble を行った。

4. 研究成果

(1) 有性分裂後の姉妹配偶子嚢細胞の単離培養と生理学的特性解析

これまでにヘテロ株とのハイブリッド接合子形成能力を示していた kodama20 株を用いて、有性分裂直後の複数の姉妹配偶子嚢細胞をキャピラリーにより分離し、あらたにクローン株を作出した。これらのクローン株は自家接合子形成率が低下するものが多かったが、その場合ヘテロ株との混合でもハイブリッド接合子形成が見られなかった。さらに、これらの株では PR-IP Inducer 遺伝子の発現量の低下も見られた。

(2) 新規ホモタリック株の確立と表現形

これまでに予備的な解析を重ねてきたホモ株 (kodama20; NIES-2666) は、+型のヘテロ株とはハイブリッド接合子を形成するが、-型とは形成しなかった。そこで、新たにフィールドからいくつかのホモ株を単離

し、交配群 IIB に近縁な 2 種のコモ株 (hana1, naga37) を見いだした。これらをヘテロ株 (slo26-1, 26-4 株) と掛け合わせたと、両性のヘテロ株ともハイブリッド接合子を形成しうることを見いだした。以上の結果より、コモ株の有性分裂後に生じる姉妹配偶子嚢細胞は、ヘテロ株の+型、-型の両性に相等する性を持った細胞である可能性が高まった。

(3) ハイブリッド接合子からの子孫細胞回収

ヘテロ株とコモ株との混合によりハイブリッド接合子が生じるが、このハイブリッド接合子からの子孫発芽については、接合子嚢として放出された後、子孫細胞の形成が起こらず、最終的に成功しなかった。この点は、最も困難であると当初から考えられていた点である。

(4) RNAseq 解析

選抜されたコモ株 (naga37s) について、様々な生活環ステージにて培養した細胞を回収し、抽出した RNA をもとに、Illumina HiSeq2000 による transcriptome 解析を行った。現時点で、de novo assemble された transcript 数は、アイソフォームを含み、132329 となったが、詳細な発現頻度解析まで進まなかった。

(5) 今後の展望

132329 の contig 配列の中から、ヘテロ株の-型細胞特異的に存在する *CpMinus1* 遺伝子のオルソログと思われる contig 配列を見いだした。この contig は、ヘテロ株と同様に、窒素源欠乏条件下で発現レベルが高まるということが予備的な解析により示唆された。現在、cDNA library からの全長クローニングを進めている。また、ヘテロ株の性フェロモン遺伝子のオルソログも見いだされており、生殖様式の進化と生殖関連遺伝子群の解析をするための基盤がようやく整った。

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 10 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) 「ミカツ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) Zygosporangium 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) 「単細胞シャジクモ藻類ミカツ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

[学会発表](計 36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「ヒメミカツ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「接合藻ヒメミカツ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) 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