

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32670

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23770093

研究課題名(和文)性フェロモンの分子進化による、生殖隔離・種分化の実証

研究課題名(英文)Reproductive isolation by sex pheromone

研究代表者

土金 勇樹(Tsuchikane, Yuki)

日本女子大学・理学部・助教

研究者番号：20434152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：接合藻ヒメミカツキモには、Plus型、Minus型と呼ばれる異性細胞間で有性生殖を行うヘテロタリック株が存在している。本種には、互いに生殖隔離した集団である交配群(生物学的種)が存在する。これらの生殖隔離機構を解析することで、種分化機構の解明が期待される。交配群IEと本研究により発見された新規交配群Gに注目し、隔離の状況を明らかにした。また、交配群IEの全ゲノム解析と、両交配群におけるRNA-seq解析を行なった。これにより、部分的な生殖隔離を示す交配群IIAとIIBにおける性フェロモンの多様性と共通項が見出され、生殖隔離機構の共通性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：reproductive isolation. The *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex is a unicellular alga, and it is composed of several reproductively isolated mating groups of heterothallic strains. However, only mating groups IIA, IIB, and IE can be maintained. I performed field studies to obtain reproductively isolated *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complexes. Then, I established a new mating group, G. I studied the phylogenetic relationship by using DNA sequences of 1506 group I introns of these mating group. According to the alignment, significant phylogenetic relationships were observed among mating groups IE and G, while mating groups IIA and IIB were distant from groups IE and G. Mating group IE was completely sexually isolated from mating group G. However, partial communication of the sex pheromone existed. Finally, I studied a sex pheromone and sexual isolation by comparing RNA-seq data of mating group G with those of mating group IE.

研究分野：進化生物学・植物生理学

キーワード：生殖隔離 種分化 性フェロモン ミカツキモ

1. 研究開始当初の背景

生物学的種概念に基づく種とは、生殖的に他の集団から隔離されている集団のことであり、種分化とは、生殖隔離が進んだ結果、起こることであると考えられている。生物の種を問わず、有性生殖過程の成立には、最終的に精細胞、卵細胞などの2個の配偶子細胞間の情報交換、認識が効率よく行われることが前提となっている。そして、この情報交換が何等かの理由により損なわれる事で、生殖隔離が起こるものと考えられている。しかし、この生殖隔離機構における分子生物学的な解析は、生物の種分化機構を考える上で、非常に重要な基盤になりうるにもかかわらず、細胞間情報交換物質の特定の問題も含め、植物においてその説明は遅れていた。

本研究で実験材料に選択した単細胞接合藻ヒメミカツキモ (*Closterium psl* complex) はこの障害を克服することのできる数少ない生物の一つである。この藻類は+型、-型と呼ばれる2つの性を持ち、実験室内で容易に有性生殖を制御できる。もっとも重要な点は、+型、-型それぞれの配偶子の特徴づけ、細胞間の情報交換を行なうタンパク質性である2種類の性フェロモン(+型細胞から放出される PR-IP と-型細胞から放出される PR-IP inducer) の存在と、それらをコードする遺伝子の配列が明らかにされていることである(J. Plant Res. 113:343-352, 2000)。一方、ヒメミカツキモでは、生殖的に隔離された交配群の存在が報告されている(Watanabe et al., 1978 Bot Mag Tokyo)。ヒメミカツキモにおける生殖隔離の実態を明らかにするためには、それぞれの交配群間の生殖隔離レベルと、性フェロモンの作用・構造との関係を比較する必要があるものの、現在保存されている交配群は IIA, IIB, IE の3群のみであり、生殖隔離が起こってきた状況を理解するにはあまりにも不足していた。

2. 研究の目的

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、ミカツキモにおいて、生殖の成否を直接決める因子である性フェロモンに注目し、生物が種分化する共通の機構の解明を目指す。最終的に、性的コミュニケーションを司る分子がどのように進化することで、生殖隔離機構が進化し、種分化に至るのかを考察する。

3. 研究の方法

止水淡水域から水サンプルを回収し、採集したヒメミカツキモについてピペット洗浄法を用いて単藻化を行い、系統株を確

立する。また、接合実験によりホモ株、ヘテロ株を鑑定する。形態学的な種同定を行なうとともに、18S rDNA を用いて分子系統解析を行なった。また、性フェロモン遺伝子についても分子系統解析を行った。また、代表的な系統において、全ゲノムショットガンシーケンスおよび RNAseq 解析を行い、性フェロモン遺伝子を中心とした比較解析を行った。

4. 研究成果

静岡県静岡市葵区麻機遊水池において、新規交配群 G の発見と系統保存株の確立・有性生殖の誘導に成功した。この新規交配群 G の特徴解析を行ったところ、新規交配群 G と IE の間には、接合子は形成されず、完全に生殖隔離しているものの、部分的に性フェロモンの作用が観察され、性フェロモンの作用が損なわれることによる生殖隔離が起こっていることが示唆された。

交配群 IE と G 間では、IE-Plus 型と G-Minus 型の混合において単独プロトプラスト放出が見られる。交配群 IE と G は形態的に区別が付かないため生体染色を行い掛け合わせたところ、G-Minus 型が単独でプロトプラストを放出している様子が観察された。以上のことから、交配群 IE の性フェロモン PR-IP が交配群 G に作用するが、交配群 G の PR-IP は交配群 IE に作用しないことが示唆された。さらに、交配群 IE から粗精製した PR-IP を、IE-Minus 型と G-Minus 型に与えたところ、どちらの交配群からも単独プロトプラストの放出が確認されたが、G-Minus 型の反応率は IE-Minus 型の反応率に比べ低い値を示した。これらの結果より、IE-Plus 型の放出する PR-IP は G-Minus 型に作用しているものの、その活性は低いことが示唆された。次に、交配群 IE と G がゲノムレベルでどの程度異なるかを確認するため両交配群の RNA-seq 解析と交配群 IE の全ゲノム解析を行った。交配群 IE と G の栄養増殖期、有性生殖期、接合子発芽期の細胞を、6 種のステージに分けて回収し、全生活環の Total RNA の抽出を行った。Hiseq2500 による RNA-seq 配列決定(ペアードエンド、101-bp)により性フェロモン遺伝子の仮想オルソログ配列を得た。性フェロモン PR-IP は細胞に作用する 19 kDa とキャリアである 42 kDa からなるサブユニットタンパク質である。交配群 IE と G における 19 kDa と 42 kDa の推定アミノ酸配列の相同性を比較すると、19 kDa は 87%、42 kDa は 91% で、実際に細胞に作用する 19 kDa の方が、相同性が低いことが示された。42 kDa サブユニットは PR-IP の活性や種の識別に関わらないため、種間で多様性が低い状態で保たれているものと考えた。一方、19 kDa サブユニットは直接細胞に作用するため、この 13% の違いにより、交配群 G の PR-IP が、交配群 IE の細胞に作用しなくなることも考えられた。今後さらに詳細

な実験を行い、交配群 IE と G 間における生殖隔離機構の解明をすすめることで、ヒメミカヅキモにおける生殖隔離の共通機構の解明が期待される。

また、両交配群において、PR-IP Inducer 遺伝子は + 型、- 型の両ゲノムともに 3 コピー存在し、それぞれ発現していることが示された。また、パラログも多数みられ、遺伝子重複が複数回起っていたことが示唆された。一方、PR-IP 遺伝子は少数のパラログは存在するものの、遺伝子そのものは両ゲノム中に 1 コピーずつしか存在しなかった。性フェロモン受容体に突然変異が起った場合、性フェロモン遺伝子が複数存在していれば、その 1 つに変異が入る事で対応し、多様な受容体に作用出来るものと考えられた。

一方、出芽酵母においても、性フェロモン α 因子と α 因子による生殖隔離が知られており、 α 因子の種間相互作用が起らない非対称な生殖隔離が知られている。近年の解析により前者は複数の遺伝子に、隔離の原因となる α 因子は 1 遺伝子にのみコードされていることが明らかとなった。これは本研究で明らかになった性フェロモンの特徴と共通しており、緑藻と酵母という、異なる生物に共通して単コピーの性フェロモンが原因となる生殖隔離が観察された。この現象の解析を進めることは、生物の種分化における共通の機構の解明へと繋がる。

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 8 件)

1. Naoko Hirano, Yuka Marukawa, Jun Abe, Sayuri Hashiba, Machiko Ichikawa, Yoichi Tanabe, Motomi Ito, Ichiro Nishii, Yuki Tsuchikane, Hiroyuki Sekimoto "A Receptor-like Kinase, Related with Cell Wall Sensor of Higher Plants, is required for Sexual Reproduction in the Unicellular Charophycean Alga, *Closterium peracerosum* -*strigosum* -*littorale* Complex" Plant and Cell Physiology. (2015). 印刷中 査読有
2. Yuki Tsuchikane, Ayaka Nakai, and Hiroyuki Sekimoto "Detailed analyses on the parthenospore formation in *Closterium moniliferum* (Zygnematomyceae, Charophyta)." Phycologia. (2014). Vol. 53, No. 6, pp. 571-578. 査読有
3. 土金勇樹 「藻類における生殖様式の多様性と進化」Bunrui 13(2):77-84 (2013) 査読無
4. Yuki Tsuchikane, Miki Tsuchiya, František Hindák, Hisayoshi Nozaki and Hiroyuki

Sekimoto "Zygospor formation between homothallic and heterothallic strains of *Closterium*." Sexual Plant Reproduction. (2012). 25(1): 1-9. 査読有

5. 土金勇樹・関本弘之「ミカヅキモの生殖について Sexual reproduction of *Closterium*」海洋と生物 (2012) 202 号 (Vol. 34-No.5). 426-434. 総説 査読無
6. Hiroyuki Sekimoto, Jun Abe, and Yuki Tsuchikane. "New insights into the regulation of sexual reproduction in *Closterium*" The International Review of Cell and Molecular Biology. (2012) 297:309-338. 総説 査読無
7. Jun Abe, Sachie Hori, Yuki Tsuchikane, Naoko Kitao, Misako Kato, Hiroyuki Sekimoto. "Stable Nuclear Transformation of *Closterium peracerosum*—*strigosum*—*littorale* complex." Plant Cell Physiol. (2011). 52(9):1676-85. 査読有
8. Yuki Tsuchikane, Miki Tsuchiya, Yume Kokubun, Jun Abe and Hiroyuki Sekimoto "Conjugation processes of *Penium margaritaceum* (Zygnematomyceae, Charophyta)" Phycological Research. (2011). 59(1):74-82. 査読有

[学会発表](計 20 件)

1. 土金勇樹・横山佳菜・鈴木穰・西山智明・関本弘之「ホモタリックなヒメミカヅキモにおける *CpMinus1* 相同遺伝子の機能解析」日本藻類学会第 39 回大会(九州大学・福岡県・福岡市) 2015 年 3 月 21 日
2. 小宮あゆみ、阿部淳、川井絢子、鈴木穰、豊田敦、藤山秋佐夫、大槻涼、土金勇樹、西山智明、関本弘之「ヒメミカヅキモの - 型細胞ゲノム特異的遺伝子 *CpMinus1* の機能解析」日本植物学会第 78 回大会(明治大学・神奈川県・川崎市) 2014 年 9 月 13 日
3. 土金勇樹「接合藻ミカヅキモの種生物学的研究」日本藻類学会第 38 回大会シンポジウム「若手研究者による緑色藻類研究最前線?何が何処までわかったのか?-」2014 年 3 月 15 日 (東邦大学・千葉・船橋) 招待講演
4. Tsuchikane Y. and Sekimoto H. "CHARACTERIZATION OF CONJUGATION PROCESSES IN HOMOTHALLIC *CLOSTERIUM PERACEROSUM-STRIGOSUM-LITTORALE* COMPLEX" '10th Seventh International Phycological Congress' CS22-8 (Florida USA, 4-10 August 2013)
5. Sekimoto, H., Hirano, N., Marukawa, Y., Abe, J., Tsuchikane, Y. "A NOVEL RECEPTOR-LIKE KINASE RESPONSIBLE FOR THE PROGRESS OF SEXUAL REPRODUCTION OF A

CHAROPHYCEAN ALGA, *CLOSTERIUM PERACEROSUM* –*STRIGOSUM* –*LITTORALE* COMPLEX" '10th Seventh International Phycological Congress' CS15-6 (Florida USA, 4-10 August 2013)

6. 田中 優希・関本 弘之・土金 勇樹、「同形配偶子接合を行うヒメミカツキモの接合過程における性特異的な挙動の探索」日本植物学会第 77 回大会(北海道大学・北海道・札幌市)2013 年 9 月 15 日
7. 平野 直子・土金 勇樹・丸川 祐佳・阿部 淳・関本 弘之、1aB02 「ヒメミカツキモの有性生殖に関わる受容体型 キナーゼ CpRLK1 の生理機能」日本植物学会第 77 回大会(北海道大学・北海道・札幌市)2013 年 9 月 13 日
8. 関本 弘之・平野 直子・大槻 涼・川井 絢子・土金 勇樹・西山 智明・阿部 淳、「シヤジクモ藻類ヒメミカツキモの有性生殖制御」日本植物学会第 77 回大会(北海道大学・北海道・札幌市)2013 年 9 月 13 日 シンポジウム
9. 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・山梨県・甲府市)2013 年 3 月 28 日
10. 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・兵庫県・姫路市)2012 年 9 月 15 日
11. 田中優希・土金 勇樹・関本弘之 「同型配偶子接合を行うヒメミカツキモの接合過程を追う」日本植物学会第 76 回大会、(兵庫県立大学・兵庫県・姫路市)2012 年 9 月 15 日
12. 平野直子・橋場彩有里・土金 勇樹・阿部淳・関本弘之 「ヒメミカツキモの有性生殖に関わる受容体型タンパク質キナーゼ CpRLK1 の特性解析」日本植物学会第 76 回大会、(兵庫県立大学・兵庫県・姫路市)2012 年 9 月 15 日
13. 関本弘之・滝口若菜・原真由美・高橋紗也香・土金 勇樹・阿部淳 1pD03 「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・兵庫県・姫路市)2012 年 9 月 15 日
14. 土金 勇樹 「藻類を用いた種分化研究;性フェロモンによる生殖隔離機構」第 6 回日本進化原生物学研究会(神戸大学梅田インテリジェントラボラトリ・大阪市・北区)2013 年 6 月 29 日
15. 土金 勇樹 「接合藻の生殖様式とその進化」第 3 回微細藻類研究会(岡崎コンファレンスセンター・愛知県・岡崎)、2013 年 6 月 15 日 招待講演
16. 土金 勇樹 「藻類を用いた種分化研究;性フェロモンによる生殖隔離と生殖様式の進

化」日本植物分類学会第 12 回大会(千葉大学・千葉県・千葉市)、学会奨励賞受賞記念講演、2013 年 3 月 16 日

17. Tsuchikane, Y., and Sekimoto, H., 「Sexual recognition between homothallic and heterothallic strains of *Closterium*」 『International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants』 P-48(Nagoya, Japan, November 12-16, 2012)
18. 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』 L-37 (Nagoya, Japan, November 12-16, 2012) 招待講演
19. 土金 勇樹 「フィールドで知るミカツキモの不思議」平成 24 年度海外学術調査フォーラム(東京)2012 年 6 月 30 日 招待講演
20. 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」日本植物学会第 75 回大会、(東京大学・東京都・目黒区)2011 年 9 月

〔図書〕(計 2 件)

1. Mechanism of sexual reproduction in fresh water microalgae (Sekimoto, H., Abe, J., Tsuchikane, Y.). In “Reproductive Biology of Plants”, Ramawat, K.G., Merillon, J.M., Shivanna, K.R. eds. CRC Press (2014).
2. Sexual reproduction of a unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Sekimoto, H., Tsuchikane, Y., Abe, J.). In “Sexual Reproduction in Animals and Plants”, Sawada, H, Inoue, N., Iwano, M. eds. Springer (2014).

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホ ム ペ ー ジ ;
<https://sites.google.com/site/tsuchikaneyuki/home>

6. 研究組織

(1)研究代表者

土金 勇樹 (TSUCHIKANE YUKI) 日本女子大学・理学部・助教 研究者番号: 20434152