

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25891009

研究課題名(和文)雄と雌の誕生に伴う配偶子融合機構進化の分子基盤解明

研究課題名(英文)Elucidating the molecular basis of evolution of gamete fusion mechanism associated with the establishment of male-female gamete dimorphism

研究代表者

豊岡 博子(Kawai-Toyooka, Hiroko)

東京大学・理学系研究科・特任研究員

研究者番号：00442997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：大きく運動性がない卵と小さく運動性がある精子との受精(卵生殖)は、同じサイズの配偶子同士の接合(同型配偶)から、サイズの大小があるが両者とも運動性を持つ配偶子の接合(異型配偶)を経て誕生した。本研究は、配偶子融合様式の3つの進化段階の生物を含む緑藻・群体性ボルボックス目を材料とし、同型配偶ゴニウムを用いて真核生物で保存的な配偶子融合因子GCS1が雄側で働くために必要な制御機構の解明や、接合構造の単離方法の開発を行った。また異型配偶ユードリナを用いて、同型配偶での配偶子接着因子FUS1のホモログ同定も行い、雌と雄の誕生(異型配偶化)に伴う配偶子融合機構の進化過程解明へ向けての知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Oogamy, which involves the fusion of a large non-motile female gamete (egg) and a small motile male gamete (sperm), appears to have successively evolved from isogamy (equal sized gametes) and anisogamy (large and small gametes). To elucidate the evolutionary transition of the gamete fusion mechanism, this project focused on the volvocine green algae, because they comprise a series of genera with all the three modes of gamete fusion. Using isogamous volvocine Gonium, this project first focus on the gamete fusion mechanism itself and clarified the cellular basis for male-specific action of the gamete fusion protein GCS1, and then established a method to isolate mating structures from both sex gametes. Moreover, this project identified an orthologous gene of isogamous gamete adhesion protein FUS1 in anisogamous Eudorina, providing insight into the molecular basis of evolution of gamete fusion mechanism associated with the establishment of male-female gamete dimorphism.

研究分野：細胞生物学

キーワード：配偶子融合 群体性ボルボックス目 ボルボックス系列 異型配偶化 GCS1 ゴニウム 有性生殖

1. 研究開始当初の背景

現在地球上で繁栄している高等動植物には、精子(サイズが小さく運動性のある配偶子)を作る“雄”と、卵(大きく運動性のない配偶子)を作る“雌”という二つの性が存在する。卵と精子の受精による有性生殖(卵生殖)は、同じサイズの配偶子同士の接合(同型配偶)から、サイズの大小があるものの両者とも運動性を持つ配偶子の接合(異型配偶)を経て誕生した。配偶子同士の接合/受精は、それぞれの性特異的に機能する配偶子の「接着」および「融合」を担う因子群によって誘導される。雄側因子としては、真核生物の幅広い系統で保存されている「融合」因子 GCS1/HAP2 が知られていた(例 Mori et al. 2006 Nat. Cell Biol.)。また雌側因子としては、単細胞モデル緑藻クラミドモナスのみで報告されている「接着」因子 FUS1(Ferris et al. 1996 Mol. Biol. Cell)など、個々の系統群によって異なる因子が接合/受精に採用されている。しかしこれらの因子が、どのような分子メカニズムで配偶子融合を引き起こしているのか、またそのメカニズムがどのように進化してきたのかは十分に明らかではなかった。特に、GCS1 や FUS1 は相手側の配偶子に存在するカウンターパート因子と相互作用して機能していると想定されていたが、このカウンターパート因子の実体は未知のままであった。

本研究の材料である緑藻・群体性ボルボックス目は、同型配偶・異型配偶・卵生殖という有性生殖の3つの進化段階の種を包含し、同型配偶クラミドモナスに近縁であるため、有性生殖の進化過程を分子レベルの比較生物学的研究で解明できるまたとないモデル系統群である(図1)。群体性ボルボックス目に近縁な同型配偶生物クラミドモナスでは、プラス交配型配偶子でアクチン繊維を軸とした突起構造「接合突起」が伸長し、これがマイナス交配型配偶子の接合構造(突起上ではない)に接着して細胞膜の融合が開始し、接合が達成される。この接合突起は、他の細胞構造から物理的に切り離して単離する系が既に確立されており、単離した接合突起がマイナス配偶子の接合構造に接着することも確認されている(Wilson et al. 1997 J. Cell Biol.)。プラス配偶子の接合突起には FUS1 (プラス交配型の性染色体領域にコード; Ferris et al. 1996 Mol. Biol. Cell) が、マイナス交配型接合構造には GCS1/HAP2 (常染色体上にコード; Liu et al. 2008 Genes Dev.) が局在し、それぞれ配偶子同士の接着と、その後の膜融合に機能していることが知られていた。また群体性ボルボックス目の最も進化した段階のボルボックスは卵生殖を行うが、そのゲノム中に FUS1 は存在

せず(Ferris et al. 2010 Science)。配偶子融合の分子メカニズムは接合様式の進化の過程で大きく変化していることが予想されたが、実際の分子レベルでの進化過程は全く不明であった。

研究代表者の所属研究室では、群体性ボルボックス目の同型配偶生物ゴニウムにおいて各交配型単独での接合突起誘導法が確立され(Mogi et al. 2012 J. Phycol.)、また性染色体領域解読からプラス交配型特異的の遺伝子としてゴニウム FUS1 オルソログが同定され、その接合突起への局在が確認されていた(Hamaji et al. 2016 G3)。また既に本研究代表者らは、次世代シーケンサーによるゴニウム全ゲノム解読情報(国立遺伝学研究所との共同研究)を活用してゴニウム GCS1 オルソログを同定し、そのマイナス(雄に対応)配偶子における遺伝子発現の特異的上昇を示していた。さらに、抗ゴニウム GCS1 抗体を作製し、免疫染色法により、ゴニウム GCS1 がマイナス接合突起に局在することを示していた。前述のように GCS1 は、高等動植物を含む真核生物の幅広い系統で保存されている。そのため本研究代表者は、ゴニウムの特性を活かし、GCS1 を起点とした解析を行うことで、真核生物に共通して存在する配偶子融合機構の解明が期待できると考えた。また、群体性ボルボックス目において有性生殖進化の過程で失われた配偶子接着因子 FUS1 に着目した解析を行うことで、雄と雌の誕生(異型配偶化)に伴う配偶子融合の分子メカニズム進化の過程が解明できると考えた。

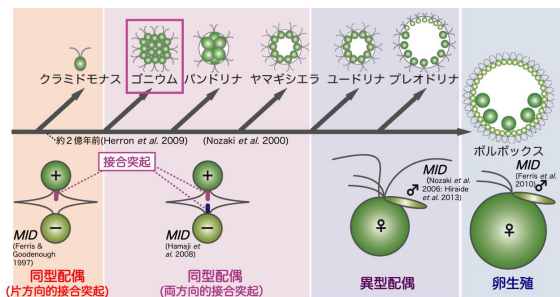


図1 群体性ボルボックス目: 配偶子融合メカニズムの進化解明へのモデル生物群

2. 研究の目的

本研究は、単細胞モデル緑藻クラミドモナスに近縁で、同型配偶子の形態に差異のない群体性ボルボックス目ゴニウムを用い、真核生物に保存的な雄(マイナス)特異的配偶子融合因子 GCS1 を起点とした解析を行うことで、真核生物に共通する配偶子融合機構の解明に迫ることを目的とした。そのためゴニウム両交配型の接合構造「接合突起」を単離する系を立ち上げ、この系を活用して GCS1 や

ラス特異的接着因子 *FUS1* のカウンターパート等の新規接合関連因子の同定を目指した。さらに配偶子融合機構が雌と雄の誕生（異型配偶化）に伴ってどのように進化したのかを、群体性ボルボックス目に属する異型配偶ユードリナ等の藻類を用いることで比較生物学的に解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究の主な研究材料ゴニウムは、群体性ボルボックス目に属する 8 または 16 細胞性の緑藻で、単細胞モデル緑藻クラミドモナスと同様に同型配偶を行う。クラミドモナスでは片方の性（プラス交配型）の配偶子でのみ、アクチン繊維を軸とする突起状の接合構造「接合突起」がみられるのに対し、ゴニウムでは両性（プラスおよびマイナス交配型）で接合突起が観察される。そのためゴニウムの両交配型の同型配偶子を比較解析することで、両交配型配偶子の形態的な差異にとらわれずに、配偶子融合関連因子の挙動の性差を調べることができる。また既に開発されていたクラミドモナスのプラス配偶子からの接合突起単離法(Wilson et al. 1997 J. Cell Biol.)をゴニウムに適用することで、両交配型の接合突起の比較解析も可能である。

本研究ではまずゴニウムの両交配型配偶子を用いて、真核生物における保存的な雄特異的配偶子融合因子 *GCS1* の、それぞれの交配型（マイナスおよびプラス）における挙動解析を行った。具体的には、両交配型の活性化前配偶子、および薬剤処理によって得られた活性化配偶子に対して、(1)ウエスタンブロットによる *GCS1* タンパク質の発現パターンの解析、(2)免疫染色による *GCS1* タンパク質の局在解析、を行った。

さらに本研究では、ゴニウムの両交配型配偶子から接合突起を単離する手法を開発した。まず配偶子誘導条件、薬剤処理による配偶子活性化条件を改善した。この条件を用いて得られた活性化配偶子をホモジナイザーで破碎し、ショ糖密度勾配遠心法により細胞破碎液を分画した。得られた各画分に対して、蛍光標識ファロイジン染色によってアクチンを可視化して接合突起を多く含む画分を選別した。同時に、各画分に対して抗アクチン抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。また得られた接合突起濃縮画分を用いて、予備的な液体クロマトグラフ-タンデム質量分析(LC/MS/MS)解析も行った。

また本研究では、プラス交配型特異的な配偶子接着因子 *FUS1* の同型配偶マギシエラ・異型配偶ユードリナにおけるホモログ同定を行った。具体的には、本研究代表者所属研究室(国立遺伝学研究所との共同研究)にて構築した両生物のゲノムデータベースを

基に特異的プライマーを設計し、RT-PCR 法、RACE 法により、両生物の *FUS1* ホモログ遺伝子を同定した。また同遺伝子の発現パターンを半定量的 RT-PCR 法により解析した。

### 4. 研究成果

本研究開始時点では、ゴニウム *GCS1* 転写産物は、プラス(雌に対応)配偶子と比較して、マイナス(雄に対応)配偶子でより多く存在していることが分かっていた。しかし本研究で両交配型配偶子において *GCS1* タンパク質の発現量を解析したところ、*GCS1* 遺伝子の転写レベルの量的制御は、*GCS1* タンパク質の存在をマイナス側に限定するには不十分で、プラス配偶子においても *GCS1* は相当量発現していた。本研究で両交配型配偶子の *GCS1* タンパク質の挙動を詳細に検証した結果、マイナス配偶子では、活性化前は *GCS1* が細胞の前部(接合突起の原基)に局在し、活性化されると接合突起の表面に移行すること、プラス配偶子では、活性化前は *GCS1* が細胞の内部に留まり、活性化に伴って消失することが明らかになった(図 2 参照)。このように *GCS1* タンパク質が、それぞれの性によって異なった転写後制御を受けることにより、*GCS1* はマイナス特異的な配偶子融合因子として機能しうると考えられる(雑誌論文)。本研究によりゴニウムで見出された *GCS1* の挙動の性差は、真核生物における雌雄差の根源的性質である可能性もあり、今後の研究の進展が期待される。

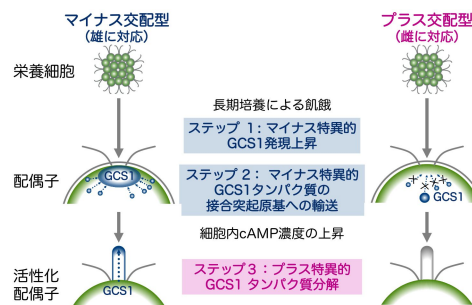


図 2 ゴニウムにおける配偶子融合因子 *GCS1* の性特異的制御モデル (Kawai-Toyooka et al. 2014 Eukaryot. Cell)

さらに本研究では、ゴニウムの両交配型(プラス・マイナス)の活性化配偶子から接合突起を単離する手法を開発した。既にクラミドモナスのプラス配偶子からの接合突起単離法(Wilson et al. 1997 J. Cell Biol.)は報告されていたものの、適切な配偶子誘導・活性化条件、密度勾配遠心の条件は、クラミドモナスとゴニウムとでは大きく異なることが分かり、ゴニウムに適した方法に改善するためには、詳細な条件検討が不可欠であった。本研究ではまず、多くのステップを要する免疫染色法に代わり、接合突起の軸を構成

するアクチン繊維を直接染色できる蛍光標識ファロイジンを用いることで簡便にゴニウム接合突起を可視化する方法を確立した。この方法を用いることで配偶子活性化条件検討をスムーズに行うことが可能になり、細胞密度を高くして追加培養したサンプルを用いることで、これまで安定して得ることができなかった活性化配偶子（接合突起を形成）を高頻度（40-70%程度）で得ることに成功した。またこの蛍光標識ファロイジン染色を、細胞破碎液からショ糖密度勾配遠心法によって接合突起濃縮画分を得る際にも適用し、接合突起が多く含まれる画分を顕微鏡下で選別することを可能にした。得られた接合突起濃縮画分に関して、ウエスタンブロット解析によりアクチンが濃縮されていることを確認した。また、プラス配偶子由来の接合突起画分では、プラス特異的配偶子接着因子 FUS1 が、マイナス配偶子由来の接合突起画分ではマイナス特異的配偶子融合因子 GCS1 がそれぞれ濃縮されていた。また細胞体から単離した接合突起を用いた生理学的解析により、単離接合突起は相対する交配型の活性化配偶子の接合突起と接着することが確認できた。したがって単離接合突起には、接合突起同士の間で必要な因子（群）が保持されていることが期待された。（学会発表）

得られた両交配型由来の接合突起濃縮画分を用いて LC/MS/MS 解析を行ったところ、マイナス由来接合突起画分からは GCS1 に相当するペプチドが検出されたが、プラス由来接合突起からの FUS1 のペプチドの検出ができなかった。その原因の一つとして FUS1 の糖鎖修飾が考えられる。今後、脱糖鎖処理等の条件検討を行った上で、LC/MS/MS 解析を実施し、ゴニウム全ゲノム配列データベースに基づいた比較プロテオーム解析を行うことで、GCS1/FUS1 カウンターパート因子を含む新規な性特異的接合関連タンパク質の発見が期待される。

さらに本研究では同型配偶ヤマギシエラ・異型配偶ユードリナにおいて、プラス（雌）特異的にコードされる配偶子接着因子 FUS1 のオルソログ遺伝子を同定した。FUS1 はこれまで同型配偶のクラミドモナス（Ferris et al. 1996 Mol. Biol. Cell）とゴニウム（Hamaji et al. 2016 G3）でのみ存在が確認されており、卵生殖のボルボックスでは消失していることが分かっていた（Ferris et al. 2010 Science）。本研究で異型配偶ユードリナにおいても FUS1 が存在することが示されたことから、異型配偶段階では同型配偶生物と共通した配偶子接着機構が存在しており、卵生殖段階でその機構が大きく変化したことが推察される。また FUS1 遺伝子発現は、同型配偶ヤマギシエラにおい

ては、他の同型配偶生物同様、プラス配偶子において上昇していたが、異型配偶ユードリナにおいては雌雄の株を混合した場合のみで上昇していた。このことから FUS1 遺伝子の発現制御機構が異型配偶化に伴って変化した可能性も考えられる（学会発表）。今後さらに FUS1 について重点的な比較生物学的解析を行うことで、異型配偶化に伴う配偶子接着機構の進化過程の解明が期待される。

## 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 5 件)

Hanschen E.R., Marriage T.N., Ferris P.J., Hamaji T., Toyoda A., Fujiyama A., Neme R., Noguchi H., Minakuchi Y., Suzuki M., Kawai-Toyooka H., Smith D.R., Sparks H., Anderson J., Bakarić R., Luria V., Karger A., Kirschner M., Durand P.M., Michod R.E., Nozaki H., Olson B.J.S.C. The *Gonium pectorale* genome demonstrates co-option of cell cycle regulation during the evolution of multicellularity. (2016) *Nat. Comm.* 7: 11370 (査読有). DOI: 10.1038/ncomms11370

Matsuzaki R., Kawai-Toyooka H., Hara Y., and Nozaki H. Revisiting the taxonomic significance of aplanozygote morphologies of two cosmopolitan snow species of the genus *Chloromonas* (Volvocales, Chlorophyceae). (2015) *Phycologia* 54: 491-502 (査読有). DOI: <http://dx.doi.org/10.2216/15-33.1>

Mori T., Kawai-Toyooka H., Igawa T., and Nozaki H. Gamete Dialogs in Green Lineages. (2015) *Mol. Plant* 8: 1442-1454 (査読有). DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2015.06.008>

Kawai-Toyooka H., Mori T., Hamaji T., Suzuki M., Olson B.J.S.C., Uemura T., Ueda T., Nakano A., Toyoda A., Fujiyama A., and Nozaki H. Sex-specific posttranslational regulation of the gamete fusogen GCS1 in the isogamous volvocine alga *Gonium pectorale*. (2014) *Eukaryot. Cell* 13: 648-656 (査読有). DOI: 10.1128/EC.00330-13

Arakaki Y., Kawai-Toyooka H., Hamamura Y., Higashiyama T., Noga A., Hirono M., Olson B.J.S.C. and Nozaki H. (2013) The simplest integrated multicellular

organism unveiled. *PLoS ONE* 8: e81641 (査読有).  
DOI:10.1371/journal.pone.0081641

[学会発表](計 11 件)

Kawai-Toyooka H., Hamaji T., Uchimura H., Suzuki M., Toyoda A., Noguchi H., Minakuchi Y., Fujiyama A., Miyagishima S., and Nozaki H. Evolution of volvocine

mating-type/gender-specific genes deduced from *de novo* genome sequencing of isogamous *Yamagishiella* and anisogamous *Eudorina* (ポスター発表). **The 17th international Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*** (2016年6月26日-7月1日予定), 国立京都国際会館(京都府京都市).

豊岡博子, 森稔幸, 中澤志織, 山田力志, 鈴木雅大, 茂木祐子, 浜地貴志, 宮城島進也, 澤田均, 野崎久義. 緑藻ゴニウムのプラス/マイナス配偶子からの接合突起の単離と解析-新規接合関連因子の同定を目指して-(口頭発表). **日本植物学会第79回大会** (2015年9月8日), 朱鷺メッセ(新潟県新潟市).

Kawai-Toyooka H., Mori T., Nakazawa S., Yamada L., Suzuki M., Mogi Y., Hamaji T., Miyagishima S., Sawada H. and Nozaki H. Isolation and characterization of the *plus* and *minus* tubular mating structures from the isogamous volvocine alga *Gonium pectorale* (口頭発表). **The 3rd International Vo/vox Conference** (2015年8月20日), ケンブリッジ(イギリス).  
Nozaki H., Kawai-Toyooka H., Suzuki M., Mori T., Hamaji T., Toyoda A., Noguchi H., and Fujiyama A. Genome data of the evolutionary time machine colonial volvocales unveiling origins of genders and multicellularity (ポスター発表). **International Symposium on Genome Science 2015** (2015年1月20-21日), 一橋大学一橋講堂(東京都千代田区).

豊岡博子. 群体性ボルボックス目ゴニウムを用いた配偶子接合メカニズムの解析(招待講演). **微細藻類研究会 2014** (2014年12月23日), 基礎生物学研究所(愛知県岡崎市).

豊岡博子, 森稔幸, 鈴木雅大, 茂木祐子, 浜地貴志, 宮城島進也, 野崎久義. 群体性ボルボックス目ゴニウムにおけるプラス/マイナス交配型配偶子からの接合

突起の単離(ポスター発表). **日本植物学会第78回大会** (2014年9月12-14日), 明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市).

豊岡博子, 浜地貴志, 茂木祐子, 鈴木雅大, 森稔幸, 野崎久義. 群体性ボルボックス目で探る配偶子融合の分子メカニズムとその進化(招待講演). **日本植物学会第77回大会シンポジウム** (2013年9月13日), 北海道大学(北海道札幌市).

Kawai-Toyooka H., Mori T., Hamaji T., Suzuki M., Olson B.J.S.C. and Nozaki H. Mating type-specific two-step regulation for the *Gonium pectorale*. (ポスター発表). **The 2nd International Vo/vox Conference** (2013年7月31日-8月3日), フレデリクトン(カナダ).

Arakaki Y., Kawai-Toyooka H., Hamamura Y., Higashiyama T., Noga A., Hirono M., Olson B.J.S.C. and Nozaki H. The simplest multicellular organism *Tetrabaena socialis* (口頭発表). **The 2nd International Vo/vox Conference** (2013年8月2日), フレデリクトン(カナダ).  
Hamaji T., Ferris P.J., Nishimura Y., Toyoda A., Noguchi H., Fujiyama A., Suzuki M., Kawai-Toyooka H., Olson B.J.S.C., Marriage T.N., Umen J.G., Nishii I., and Nozaki H.

「Evolutionary dynamic features of mating loci inferred from *de novo* genome sequencing of *Gonium pectorale* (Volvocales, Chlorophyta) (口頭発表). **The 2nd International Vo/vox Conference** (2013年8月2日), フレデリクトン(カナダ).

Olson B.J.S.C., Hanschen E.R., Marriage T.N., Hamaji T., Durand P., Nozaki H., Ferris P.J., Featherston J., Suzuki M., Kawai-Toyooka H., Fujiyama A., Toyoda A., Brown S., Coleman M., and Michod R.E. The Volvocales genome project. (口頭発表). **The 2nd International Vo/vox Conference** (2013年8月2日), フレデリクトン(カナダ).

[その他]

ホームページ等

東京大学・理学系研究科・生物科学専攻・多様性起源学研究室ホームページ  
<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/tayousei/index.html>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

豊岡 博子 (Kawai-Toyooka Hiroko)  
東京大学・大学院理学系研究科・特任研究  
員  
研究者番号：00442997