

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20644

研究課題名（和文）緑藻で発見した多細胞発生多型から孢子体世代の進化的起源に迫る

研究課題名（英文）Approaching the evolutionary origin of the sporophyte generation from multicellular developmental variation in a green alga

研究代表者

堀之内 祐介（Horinouchi, Yusuke）

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・特任助教

研究者番号：10962714

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：多くの植物の主要な体である複相で多細胞の体は孢子体と呼ばれる。孢子体は単細胞の複相世代と、単相で多細胞の配偶体を持つ祖先藻類から進化した可能性があるが、その獲得機構は理解が乏しい。本課題では、祖先的な緑藻エゾヒトエグサの接合子が孢子体にも発生する特異な種内多型を、培養実験と核相解析、形態比較により詳しく調べた。これにより、配偶体の発生プログラムの流用により孢子体が獲得された間接証拠を示すと共に、多細胞の孢子体という新奇表現型の初期進化における発生多型の重要性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は孢子体世代の獲得により多様化し、複雑性を進化させてきた。孢子体が配偶体の発生プログラムを流用して獲得されたという仮説は近年着目されているが、それが実際に生じるのか、どのように生じるのかをについて説得力のある証拠は乏しい。本研究成果は孢子体が発生多型として、配偶体の発生プログラムを大規模に流用して獲得された可能性を示唆し、祖先藻類で複相の単細胞から多細胞体制への遷移が生じた有り得べき機構について知見をもたらす。

研究成果の概要（英文）：In many plants, the diploid multicellular body is called sporophytes. Sporophytes may have evolved from an ancestral alga with a unicellular diploid and multicellular haploid phase but its mechanism is largely unknown. In this project, I performed cultural experiments, ploidy analyses, and morphological comparisons to investigate a unique intraspecific variation found in an ancestral-like alga *Monostroma angicava*, where zygotes develop into both unicellular diploids and sporophytes. The results suggest that sporophytes are emerged by co-opting the gametophyte developmental program to the diploid phase. This study suggests the importance of developmental variation in early evolution of novel multicellular sporophytes.

研究分野：進化生物学、藻類学、生態学

キーワード：生活環 アオサ藻綱 世代交代 孢子体

1. 研究開始当初の背景

複相で多細胞の体である胞子体の進化は、海藻を含む植物の形態多様化と陸上や海岸での繁栄を引き起こした植物進化史の革新的イベントである。胞子体は、現在も一部の植物にみられる単細胞体の複相世代と減数分裂から発生した単相の配偶体を持つ祖先的生活環から進化したと考えられている。そのため、多くの植物は胞子体世代と配偶体世代を両方持ち世代交代を行う。しかし、多細胞の胞子体という発生的・形態的に全く新奇な形質がどのように進化したのかについては不明な点が多い。

緑色植物の胞子体の起源においては、主に 2 つの機械論的仮説が存在する： " 新生仮説 (de novo hypothesis) " と " 流用仮説 (co-option hypothesis) " である (Bowman et al. 2016) (図 1)。前者は、複相世代で多細胞発生を司る遺伝プログラム (発生プログラム) が全く新しく獲得されたとする仮説、後者は、先に配偶体で獲得された多細胞発生プログラムが、複相世代で一部または大規模に流用され胞子体が生じたとする仮説である。陸上植物や褐藻類では、配偶体と胞子体にそれぞれ特異的な発生プログラムの発現が、一つ又は少数の制御遺伝子によりスイッチが切り替わる (Sakakibara et al. 2013)。そのため、大規模な流用が生じ得ると考えられており、その場合、配偶体とよく似た形態の胞子体が生じる可能性がある (Kenrick 2018)。そこで、本課題では、実際に流用によって胞子体が獲得され得るのか?、という問いに取り組んだ。

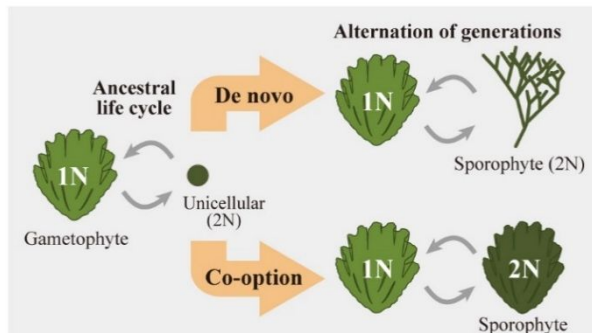


図 1. 胞子体の起源における 2 つの仮説。

2. 研究の目的

Horinouchi & Togashi (2023) を改変。

海産緑藻 (アオサ藻綱) のヒビミドロ目は、一般に祖先的な生活環を持つが、一部の種は派生的に胞子体を獲得し世代交代を行う (Kelly et al. 2004; Horinouchi et al. 2019)。研究代表者らは近年、通常は接合子が単細胞発生するエゾヒトエグサ (*Monostroma angicava*) において、一部の接合子が配偶体に似た多細胞体に発生するという種内多型を発見した。

本課題では、エゾヒトエグサで発見した多細胞体が、配偶体と共通の発生プログラムにより派生的に生じた胞子体かを検討し、緑藻の胞子体の起源として流用仮説を支持する証拠を得ることを目的とした。本研究では、i) 祖先的な緑藻で発見した多細胞発生多型と、ii) 種内で発生プログラムが共通ならば表現型も同一になり得ることに着目する。これにより、i) 配偶体と派生的な多細胞体 (研究開始当初に胞子体と推定) を種内で比較でき、ii) それらの形態発生の同一性を評価することで、胞子体獲得時の大規模流用を検証できると考えた。

3. 研究の方法

- 培養実験と核相解析による多細胞体解析：北海道室蘭市で採集したエゾヒトエグサから単藻培養株を作成し、人工気象器を用いた培養実験を行った。日長、温度などの条件を変えて培養し、接合子がた多細胞体に発生しやすい条件の探索を行った。性特異的分枝マーカー、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 法 (Horinouchi & Togashi 2021)、相対核蛍光量比較を行い、多細胞体が複相の胞子体に相当するのかを検証した。
- 系統解析：多くの種が単細胞の複相世代を持つヒビミドロ目の中で、胞子体の進化史を明らかにするため、有性生殖し、複相と単相の両方の世代を持つ近縁種において、単相培養株を作成し、系統解析に利用可能な 18S rDNA などの領域を取得した。これらの種に共通して報告されている配列をデータベース上から獲得し、最尤法により系統樹を構築した。
- 形態比較：配偶体と胞子体の形態発生の類似性を評価するため、同一の条件で培養した配偶体と胞子体の各発生段階の形態を比較した。

4. 研究成果

- エゾヒトエグサにおける多細胞の胞子体の発見 (図 2)：通常単細胞体に発生する接合子 (図 2b-c) は、同じ条件下でも一部の個体が多細胞体へ発生した (図 2a)。一方で、接合子は条件によって多細胞体への発生割合を変化させ、14 長日条件で最も多く多細胞体に発生した。性マーカーと FISH 法により (図 2i)、多細胞体は雌雄どちらかの遺伝因子しか持たない単相の配偶体と違い、雌雄特異的な遺伝領域を複数持つこと、配偶体の 2 倍の相対核 DNA 量を持つことを明らかにした。これらの結果は、エゾヒトエグサの接合子から発生した多細胞体は胞子体に相当することを明らかにした。この胞子体は、遊泳細胞を生産し、それらは単細胞の複相世代に発生、減数分裂により生じた遊走子を経て配偶体を生産した。これにより、エゾヒトエグサは接合子の発生多型に由来する 2 つの生活環経路を持つことを明らかにした。

- b) 目内での胞子体の進化史：構築した系統樹は、ヒビミドロ目内では、単細胞の複相世代を持つ生活環が祖先的であり、胞子体を持つ生活環が派生的であることを明らかにした。
- c) 配偶体と胞子体の形態は酷似：各発生段階で、配偶体と胞子体の形態を比較したが、全ての段階で、胞子体（図 2 e-h）と配偶体（図 2 j-m）で形態発生に違いは見られなかった。胞子体の体細胞サイズは、配偶体よりわずかだが有意に大きかった (Welch's t-test, $p < 0.0001$)。これは、核 DNA 量と細胞サイズの相関関係に由来すると考えられる。

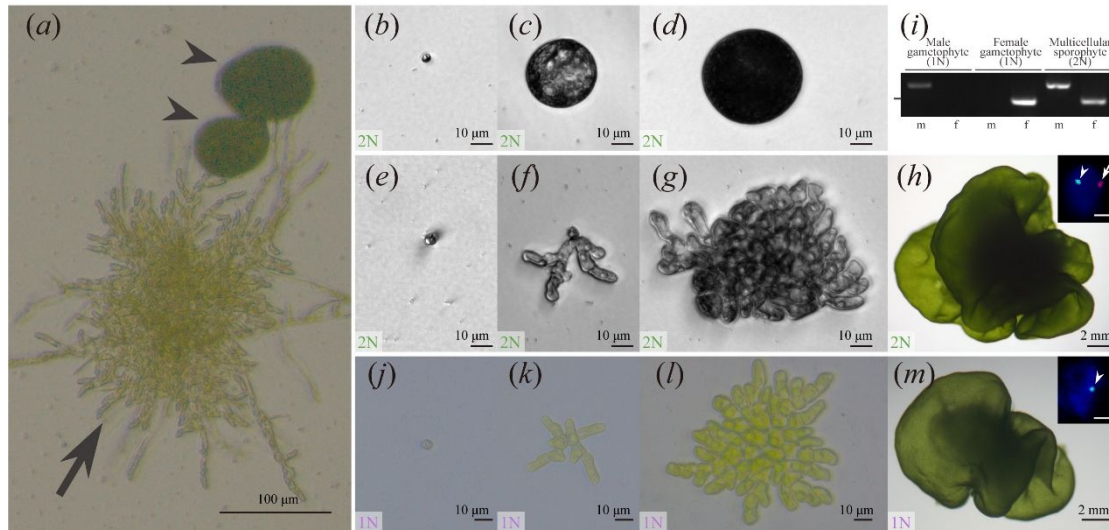


図 2. エゾヒトエグサの接合子の多細胞発生多型と胞子体。(a) 接合子は単細胞体にも多細胞体にも発生。(b-d) 通常の単細胞体への発生。(e-h) 多細胞胞子体への発生。(i) 性マーカーは胞子体が雌雄特異的ゲノム領域を両方持つことを示す。(j-m) 配偶体の発生過程。(h, m, insets) 配偶体と違い、胞子体は核内に雄(緑、矢頭)と雌(赤・矢印)の性特異的領域の FISH シグナルが両方存在。Horinouchi & Togashi (2023) を改変。

本研究により、エゾヒトエグサが接合子の単細胞/多細胞の発生多型を介して生活環の種内多型を持つことが初めて明らかになった。このような現象は、私たちの知る限り、緑色植物において初めての報告である。胞子体が配偶体と区別できない形態発生過程を示したことは、この 2 つの世代で同じ多細胞発生プログラムが発現していることを反映しているはずである。胞子体がヒビミドロ目が派生的であることを考慮すると、この緑藻において胞子体は配偶体発生プログラムの大規模な流用により生じたことが示唆される。これは胞子体起源の流用仮説と矛盾しない。本研究は、胞子体形成は、配偶体の発生プログラムを流用しながら、接合子発生の種内多型として、祖先的な生活環を持つ藻類で生じるかもしれないことを示唆する。これは胞子体、つまり植物の複相における単細胞から多細胞体制への進化変遷に知見を与える。

成果は、国際学術誌 *Biology Letters* 誌に掲載された(Horinouchi & Togashi 2023)。

<引用文献>

- Bowman JL, Sakakibara K, Furumizu C, Dierschke T. 2016 Evolution in the cycles of life. *Ann. Rev. Genet.* 50, 133-154.
- Kenrick P. 2018 Changing expressions: a hypothesis for the origin of the vascular plant life cycle. *Phil. Trans. R. Soc. B* 373, 20170149.
- Horinouchi Y, Yamaguchi M, Chibana H, Togashi T. 2019 Nuclear behavior and roles indicate that Codium phase is a sporophyte in *Monostroma angicava* (Ulotrichales, Ulvophyceae). *J. Phycol.* 55, 534-542.
- Horinouchi Y, Togashi T. 2021 Identification of genomic differences between the sexes and sex-specific molecular markers in *Monostroma angicava* (Ulvophyceae). *J. Phycol.* 57, 447-453.
- Horinouchi Y, Togashi T. 2023 Unicellular and multicellular developmental variations in algal zygotes produce sporophytes. *Biol. Lett.* 19: 20230313.
- O'Kelly CJ, Wysor B, Bellows WK. 2004 *Collinsella* (Ulvophyceae, Chlorophyta) and other ulotrichalean taxa with shell-boring sporophytes form a monophyletic clade. *Phycologia* 43, 41-49.
- Sakakibara K, Ando S, Yip HK, Tamada Y, Hiwatashi Y, Murata T, Deguchi H, Hasebe M, Bowman JL. 2013 KNOX2 genes regulate the haploid-to-diploid morphological transition in land plants. *Science* 339, 1067-1070.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Horinouchi Yusuke, Togashi Tatsuya	4. 巻 19
2. 論文標題 Unicellular and multicellular developmental variations in algal zygotes produce sporophytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology Letters	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsbl.2023.0313	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 Togashi Tatsuya, Parker Geoff A., Horinouchi Yusuke	4. 巻 19
2. 論文標題 Mitochondrial uniparental inheritance achieved after fertilization challenges the nuclear?cytoplasmic conflict hypothesis for anisogamy evolution	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology Letters	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsbl.2023.0352	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 該当する

1. 著者名 堀之内 祐介	4. 巻 73
2. 論文標題 海産緑藻の生活環多様化の理解に向けて	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本生態学会誌	6. 最初と最後の頁 49～56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18960/seitai.73.2_49	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 望月康生、堀之内祐介、富樫辰也	4. 巻 36
2. 論文標題 北海道室蘭産モツレグサ類の微視的胞子体の探索と単藻培養株の確立	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 海洋バイオシステム研究	6. 最初と最後の頁 2-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yusuke Horinouchi, Hisashi Ohtsuki, Tatsuya Togashi
2. 発表標題 Stochastic sporophyte development and implications for life cycle evolution in marine green algae
3. 学会等名 INTECOL 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀之内 祐介
2. 発表標題 緑藻の発生多様性からみる生活環の進化
3. 学会等名 令和4（2022）年度北海道植物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀之内 祐介、富樫 辰也
2. 発表標題 海藻と繊毛虫の見過ごされた相互作用
3. 学会等名 第70回日本生態学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀之内 祐介
2. 発表標題 コディオルム体を持つ海産緑藻エゾヒトエグサの生活環とその種内多型
3. 学会等名 日本藻類学会第47回大会
4. 発表年 2023年

1 . 発表者名 Yusuke Horinouchi
2 . 発表標題 Unicellular and multicellular developmental variations of zygotes cause a life cycle variation in <i>Monostroma angicava</i> (Ulotrichales, Ulvophyceae)
3 . 学会等名 37th Korean society of phycology (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 Yusuke Horinouchi, Hisashi Ohtsuki, Tatsuya Togashi
2 . 発表標題 Intraspecific variation can provide a framework to understand life cycle diversification in green algae
3 . 学会等名 2023 Ecological Society of America Annual Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 堀之内祐介、大槻久、富樫辰也
2 . 発表標題 海産緑藻の生活環多様化の理解に向けた理論的枠組み
3 . 学会等名 71回日本生態学会大会
4 . 発表年 2024年

1 . 発表者名 堀之内祐介、望月康生、市原健介、富樫辰也
2 . 発表標題 海産緑藻エゾヒトエグサの微視的胞子体の越冬生育地
3 . 学会等名 日本藻類学会第 4 8 回大会
4 . 発表年 2024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
---------	---------