

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：23401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18742

研究課題名(和文)珪藻の性成熟を司る遺伝的因子の探索

研究課題名(英文)In search for genetic factors controlling the sexualization in diatoms

研究代表者

佐藤 晋也 (SATO, Shinya)

福井県立大学・海洋生物資源学部・講師

研究者番号：80709163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は有性生殖の誘導が可能な珪藻*Pseudostaurosira trainorii*の雌雄株を材料として用い、性差や有性化の遺伝的制御機構の解明を目的として行われた。比較ゲノム解析の結果、核ゲノム中に雌雄差が見出され、現在網羅的遺伝子発現パターンとの比較解析を進めている。オルガネラゲノムは完全長配列が得られた。葉緑体ゲノムでは水平伝搬による外来DNA断片の挿入を経てサイズが巨大化した可能性が示唆された。さらに両オルガネラゲノムが片親遺伝していることが明らかとなった。また珪藻の有性化に際し、培養株に存在している*Marinobacter*属細菌が性成熟に強く影響を与えている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This project was undertaken in order to reveal the genetic factors controlling the sexualization and sex determination in diatoms with *Pseudostaurosira trainorii* whose sex is readily controllable in a laboratory condition. Sequence analyses and comparative transcriptome analyses are currently ongoing for sex-specific region in its genome. Complete genome sequences were also obtained for mitochondrion and chloroplast: the latter was the largest in genome size among the diatom cp genome sequenced so far, and showed an evidence for a contribution of lateral gene transfer for its size expansion. Crossing experiment revealed uniparental inheritance of both organellar genome in this species. This study also suggested a possibility of an involvement of *Marinobacter* bacteria during a process of sexualization in the diatom - this finding would pave the way to better understand the mechanism of sexualization in diatoms.

研究分野：藻類学

キーワード：珪藻 生殖 ゲノム トランスクリプトーム 細菌 オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

珪藻はシリカから成る細胞壁をもつ単細胞藻類であり、10万種以上存在する巨大な生物群である。これまでに珪藻に関して多くの研究がなされてきた。近年の遺伝子導入や次世代シーケンサー技術の発展と普及も相まって、珪藻の生物学的理解は急速に深まっている。しかしこうした中で、いまだに大きな謎として残されているのが生殖に関する部分である。今日の生態系において大いに繁殖している成功者ともいえる珪藻生殖の理解は、性の進化といった生物学的疑問を解くうえでの大きなヒントとなるだけでなく、養殖業への貢献といった産業的なメリットも見込まれる。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでほとんど明らかになっていない珪藻のオルガネラゲノム遺伝様式、雌雄差を司る遺伝的因子、生殖をコントロールする要因等を明らかにし、これを通じ珪藻の性の進化について考察することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では生活環の完全なコントロールが可能な *Pseudostaurosira* 株を主な材料とし、まずは雌雄株の全ゲノム配列を HiSeqX および PacBio シーケンサーを用いてそれぞれ決定する。得られたオルガネラゲノム配列をもとに雌雄差を検出するためのマーカー領域を選定し、F1 株の解析を通じて各オルガネラゲノムの遺伝様式を調べる。核ゲノムについては雌雄間の比較解析から、性決定領域を探索する。また雌雄株の栄養増殖器および性成熟期、また生殖中といった各段階におけるトランスクリプトームを得る。さらに有性生殖の誘発に際して鍵となる外部的な要因を探索する。

4. 研究成果

本研究は有性生殖の誘導が可能な珪藻 *Pseudostaurosira trainorii* の雌雄株を材料として用い、性差や有性化機構の解明を目的として行われた。雌雄株の比較ゲノム解析の結果、オルガネラゲノム中に挿入/欠失部位が見られたことから、この部位を PCR 増幅するプライマーセットを設計した。これにより F1 世代が受け継いだオルガネラタイプを PCR 産物の電気泳動パターンにより判定できるようになった。その結果、葉緑体、ミトコンドリアとも基本的には片親遺伝するものの、それが父系か母系かはランダムに決定されている可能性が示された(図1)。興味深いことに、F1 世代の数株は両親の葉緑体を保持していた。こうした

異質葉緑体ゲノムをもつ個体が自然界でも存在するかは不明だが、この株の性状解析から片親遺伝のメカニズムに迫るヒントが得られるかもしれない。

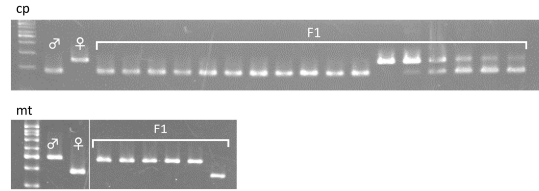


図1. 珪藻 *Pseudostaurosira trainorii* のオルガネラゲノム遺伝様式. 上の泳動像は葉緑体ゲノム、下はミトコンドリアゲノム. 左のレーンから、サイズマーカー、父親タイプのバンド、母親タイプのバンド、それ以外は F1 株のパターン. 葉緑体ゲノムでは F1 株の一部(右の5株)が両親タイプのバンドを示す。

ミトコンドリアについては F1 株で必ず片親のものが消失していることから、受精後に選択的な消化が行われている可能性がある。これについて詳細に知るため、その予備的調査として各有性生殖段階におけるミトコンドリア数を顕微鏡的に計数し、その消化のタイミングを調べた。その結果、接合後に同調的に消化が進むのではなく、次世代の栄養細胞を形成する際にクローン集団内で徐々にミトコンドリア数が減少することが分かった(図2)。

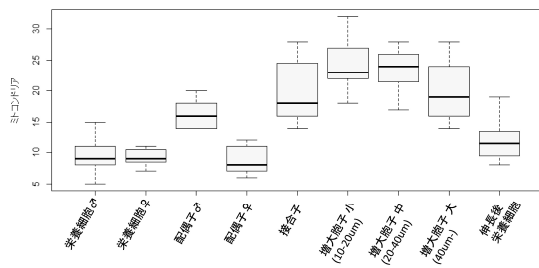


図2. 珪藻 *Pseudostaurosira trainorii* の各有性生殖段階における細胞内ミトコンドリア数の推移. 接合により倍化したミトコンドリアは発生の際と共に徐々に減少する。

各オルガネラゲノムの完全長配列を決定することができた。中でも葉緑体ゲノムサイズはこれまでに珪藻で知られているものの中で最大サイズであり、水平伝搬による外来遺伝子挿入を経てゲノムサイズが肥大化した可能性が示唆された(図3)。また核ゲノムについても雌雄株についてドラフト配列を得ることができた(表1)。雌雄ゲノムは配列や遺伝子数に差があり、こうした部位に性決定をコントロールする因子が存在している可能性がある。さらに雌雄株のトランスクリプトーム解析を行った結果、両株で発現量に有意な差が見られた

遺伝子をリストアップすることに成功した。今後はこうした因子を個別に精査することで、本種珪藻の性決定メカニズムの解明に迫ることが出来ると期待される。

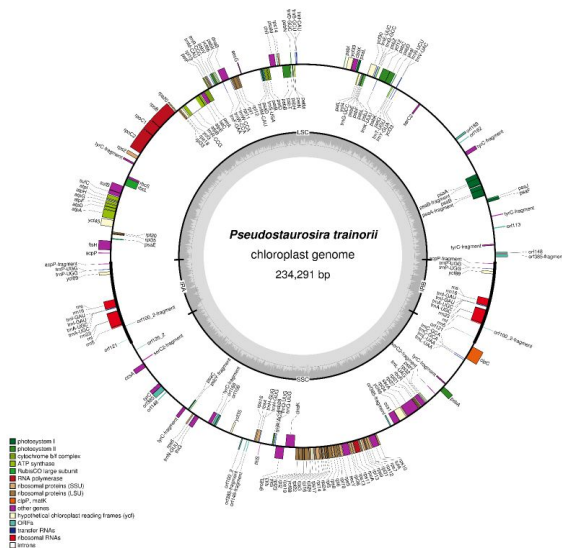


図3. 珪藻 *Pseudostaurosira trainorii* の葉緑体ゲノム地図。

表1. 珪藻 *Pseudostaurosira trainorii* 雌雄株の核ゲノム概要。

	male	female
# of scaffolds	3,801	3,494
Scaffold N50	33,284 bp	36,448 bp
Genome size	60.9 Mbp	59.4 Mbp
# of genes	17,356	17,154
GC content	45.1%	45.1%

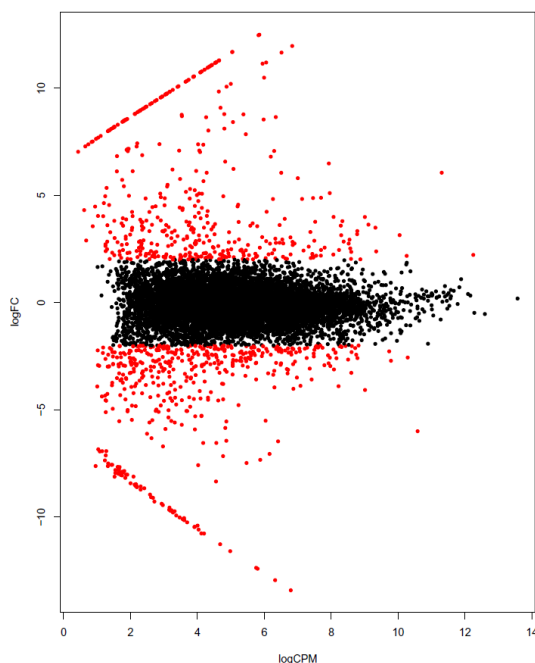


図4. 珪藻 *Pseudostaurosira trainorii* 雌雄株の比較トランスクリプトーム解析。雌雄で発現量に有意差のある遺伝子を赤色で表示。

本種の雄培養株中に共存している細菌へのストレス供与によって性成熟を誘導可能であることを明らかにした。細菌へのストレスとしてアミノグリコシド系抗生物質の投与が有効であるが、抗生物質の使用は珪藻細胞自体への影響も懸念されるため、これにより得られた結果の解釈が容易でないことが難点であった。このことから各種ストレス源を用い珪藻生殖誘導の可否を試験した結果、従属栄養性プロティスト（ラビリンチュラ類）が産生する消化酵素が、珪藻への影響を最小限に留めた状態で細菌にストレスを与えることが明らかになった。本種株の有性化に際し、培養株に存在している *Marinobacter* 属細菌が性成熟に強く影響を与えている可能性が示された。

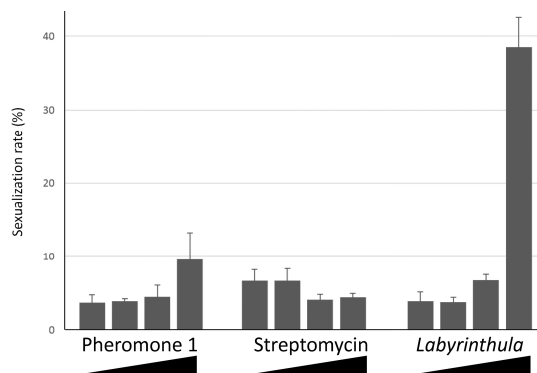


図5. 各種ストレス環境下における珪藻 *Pseudostaurosira trainorii* 雄株の性成熟率。珪藻の応答がストレス源に対し濃度依存적であることが分かる。左のフェロモン1は雌細胞が分泌する性フェロモン（ポジティブコントロール）。

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4件 すべて査読あり)

- 1) Idei M, Sato S, Nagumo T & Mann DG (2017) Valve morphogenesis in *Diploneis smithii* (Bacillariophyta). *Journal of Phycology*. 54: 171-186.
- 2) Carbelleira R, Trobajo R, Leira M, Benito X, Sato S & Mann DG (2017) A combined morphological and molecular approach to *Nitzschia varelae* sp. nov., with discussion of symmetry in Bacillariaceae. *European Journal of Phycology* 52: 342-359.
- 3) Li CL, Ashworth MP, Witkowski A, Dąbek P, Medlin LK, Kooistra WHCF, Sato S, Zgłobicka I, Kurzydłowski KJ, Theriot EC,

- S.M. Sabir JSM, Khiyami MA, Mutwakil MHZ, Sabir MJ, Alharbi NS, Hajarah NH, Qing S, Jansen RK (2015) New Insights into Plagiogrammaceae (Bacillariophyta) based on multigene phylogenies and morphological characteristics with the description of a new genus and three new species. PLoS ONE 10: e0139300.
- 4) Rovira R, Trobajo R, Sato S, Ibáñez C & DG Mann (2015) Genetic and physiological diversity in the diatom *Nitzschia inconspicua*. Journal of Eukaryotic Microbiology 62: 815-832.
- [学会発表](計13件)
- 1) Trobajo R, Mann DG, Li C, Sato S, Rimet F, Rovira L, Witkowski A (2017) A four-gene approach to the Bacillariaceae: establishing a framework for classifying a highly diverse and taxonomically difficult diatom group. 11th International Phycological Congress. Szczecin, Poland. 13-19th August.
- 2) Nakamura N, Sato S (2017) Comparison of genome between opposite mating types of *Pseudostaurosira trainorii*. 11th International Phycological Congress. Szczecin, Poland. 13-19th August.
- 3) Sato S, Toyoda K, Osada K, Idei M (2017) Whole genome sequencing of two closely related but morphologically distinct clones of centric diatom *Hydrosera*. 11th International Phycological Congress. Szczecin, Poland. 13-19th August.
- 4) Yamada K, Yamazaki M, Sato S, Yoshikawa S, Kuwata A, Ichinomiya M (2017) Silicified bolidophytes (Parmales, Bolidophyceae) is not monophyly as evidenced by the phylogenetic characterization of *Triparma retinervis*. 11th International Phycological Congress. Szczecin, Poland. 13-19th August.
- 5) Yoshikawa S, Sato S, Yamazaki M, Yamada K, Ichinomiya M, Saitoh K, Nakamura Y, Sato N, Kuwata A (2017) Morphological and transcriptome analysis in cell wall formation of *Triparma laevis*. The 73rd Fujihara Seminar "Molecular Life of Diatoms". Kobe, Japan. 9-13 July.
- 6) Sato S, Toyoda K, Osada K, Idei M (2017) Comparative genomics in two closely related but morphologically distinct clones of centric diatom *Hydrosera*. The 73rd Fujihara Seminar "Molecular Life of Diatoms". Kobe, Japan. 9-13 July.
- 7) Nakamura N, Sato S (2017) Comparison of organellar genome between opposite mating types of *Pseudostaurosira trainorii*. The 73rd Fujihara Seminar "Molecular Life of Diatoms". Kobe, Japan. 9-13 July.
- 8) Nakamura N, Sato S, Julius ML, Maeda Y, Tanaka T, Fujimoto K, Mayama S (2016) Variation in morphological characters of diatomepum in relation to valve ultrastructure. 2016 International Diatom Symposium. Quebec, Canada. 21st-26th August.
- 9) Rovira L, Trobajo R, Sato S, Kelly M, Ibáñez C, Krokowski J, Mann DG (2016) Genetic, morphological, and ecophysiological diversity in *Nitzschia inconspicua* (Bacillariophyta) and implications for ecological assessment of waterbodies. British Phycological Society Annual Meeting, Bornemouth, UK. 2nd-4th June
- 10) 中村憲章, 磯野弘之, 佐藤晋也 (2017) *Pseudostaurosira trainorii* におけるオルガネラの遺伝様式の解明. 珪藻学会第37回研究集会. 三方青年の家. 福井.
- 11) 中村憲章, 真山茂樹, 佐藤晋也 (2017) 汽水産珪藻 *Pseudostaurosira* の被殻を裏打ちする有機層の構造的, 生化学的特徴. 日本藻類学会第41回大会. 高知大
- 12) 佐藤晋也, 高尾祥丈 (2015) ストレスによる珪藻の生殖誘導と細菌との関わり. 第二回分子珪藻研究会. 関西学院大学大阪梅田キャンパス. 大阪.
- 13) 佐藤晋也 (2015) 細菌と珪藻生殖. 珪藻学会第35回研究集会. 日光交流促進センター. 栃木.