

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32675

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07510

研究課題名(和文) 雌雄二極化に伴う異性間コミュニケーション戦略進化の分子基盤解明

研究課題名(英文) Exploring the molecular basis for the emergence of inter-sexual communication associated with the evolution of male-female dimorphism

研究代表者

豊岡 博子 (Kawai-Toyooka, Hiroko)

法政大学・生命科学部・助手

研究者番号：00442997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、雌がつくる「卵」と雄がつくる「精子」が、それぞれ配偶子として分化し、受精するまでに必須な「異性間コミュニケーション」が、同型配偶段階から進化した過程を解明することを目的とした。そのために、配偶子進化のモデル系統群の緑藻・ボルボックス系列を用い、同系列の雌雄二極化の初期段階にある異型配偶生物のユードリナにおいても、配偶子の誘導には、卵生殖段階で知られている「性フェロモンタンパク質」を介した「異性間コミュニケーション」が必要であることを示した。また同型配偶段階において配偶子同士の認識に機能する糖タンパク質FUS1が、ユードリナにおいて異性配偶子の認識に寄与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、ボルボックス系列の異型配偶生物では、(1)卵生殖生物と同様な性フェロモンタンパク質を介した配偶子誘導メカニズムが存在すること、(2)同型配偶生物と共通する因子が関与する配偶子認識メカニズムが存在する可能性が高いこと、を示した。そのため本研究は、配偶子の「異性間コミュニケーション」という観点での、異型配偶生物の中間段階としての性質を浮き彫りにし、今後のより詳細な解析の基盤を築いたといえる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the evolutionary process of inter-sexual communication, which triggers gamete induction and subsequent fertilization through the union of an egg (produced by a female) and a sperm (produced by a male). This was achieved by focusing on volvocine green algae, a model lineage for investigating gamete dimorphism. The results suggested that, as previously reported in oogamous Volvox species, a proteinaceous sex pheromone was involved in inter-sexual communication during gamete induction in an anisogamous Eudorina, which is an organism at an intermediate evolutionary stage of male-female dimorphism. The findings of this study also indicated that FUS1, a glycoprotein that functions in gamete recognition in isogamous volvocine algae, may contribute to inter-sexual gamete recognition in anisogamous Eudorina.

研究分野：細胞生物学

キーワード：異型配偶化 有性生殖進化 ボルボックス系列 性フェロモン 配偶子認識 配偶子進化

## 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、「雌」と「雄」という二つの性が存在する。雌はサイズが大きく運動性のない配偶子「卵」をつくり、雄は小さく運動性のある配偶子「精子」をつくる。卵に精子が到達し受精を完遂するためには、卵側の性フェロモンによる精子の誘引機構や卵と精子の接着に必要な認識機構など、両性間のコミュニケーションが必須である。卵と精子による受精(卵生殖)は、(1)同じサイズの配偶子同士の接合(同型配偶)から、(2)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、独立に複数回進化したと考えられる。両性配偶子の接合に必要な「異性間コミュニケーション」も、配偶子の雌雄二極化に応じて進化してきたと想定されるが、その進化過程に注目した研究は乏しい。その原因として、高等動植物に近縁な系統では異型配偶や同型配偶を行う生物が現存しないため、同型配偶から卵生殖への進化を比較生物学的に解析できないことが挙げられる。一方、緑藻の一系統群のボルボックス系列には、多細胞化・複雑化した過程の中間的段階の種が現存しており、(1)同型配偶、(2)異型配偶、(3)卵生殖という、配偶子の雌雄二極化の各段階の種が含まれている。さらに同系列はモデル緑藻クラミドモナスを含むため、分子レベルで配偶子の雌雄二極化過程を比較生物学的研究で解明できる唯一のモデル系統群である。近年、ボルボックス系列の各進化段階生物における全ゲノム配列の解読が盛んに行われ、本研究代表者も国際共同プロジェクト(日・米・南ア)に参画し、同型配偶生物のゴニウムの全ゲノム解読に貢献した(Hanschen *et al.* 2016 *Nat. Commun.*)。また本研究代表者は、このゴニウム全ゲノム情報を活用して、真核生物の幅広い系統で保存される配偶子融合因子GCS1のオルソログを単離し、詳細な発現・細胞内局在解析によりGCS1がマイナス(雄に対応)特異的に機能するために必要な制御機構を明らかにした(Kawai-Toyooka *et al.* 2014 *Eukaryot. Cell*)。さらに本研究代表者は、雌雄二極化の前後段階にある同型配偶生物のヤマギシエラと異型配偶生物のユードリナの全ゲノム解読にも携わり、その過程で「配偶子誘導要因の性フェロモン」と「配偶子認識因子FUS1」という2つの糖タンパク質に着目することで、「異性間コミュニケーション」の獲得・進化過程の解明に分子レベルで迫ることができると着想した。

### (1) 配偶子誘導要因の性フェロモンによる異性間コミュニケーション

ボルボックス系列の同型配偶生物のクラミドモナス・ゴニウムでは、配偶子は窒素飢餓によって誘導されるのに対し、卵生殖生物のボルボックスでは、雄株から分泌される性フェロモンによって雌雄の群体の発生パターンが変化し、それぞれ卵と精子束を形成する有性群体を作ることが古くから知られていた(Darden 1966 *J. Protozool.*)。そのためボルボックス系列では、有性生殖の第一段階である配偶子誘導を、栄養飢餓という環境要因をトリガーとする戦略から、性フェロモンを介した同性および異性間コミュニケーションを必要とする戦略へと転換したといえる。異型配偶ユードリナにおいても、雄株の培養上清投与による精子束形成は報告されていたが(Szostak *et al.* 1973 *J. Phycol.*)雄側由来因子の雌側への影響は知られていなかったため、配偶子誘導に「異性間コミュニケーション」が必要か否かは不明であった。

### (2) 配偶子認識因子FUS1 による異性間コミュニケーション

同型配偶生物のクラミドモナス・ゴニウムのプラス配偶子の接合構造表面の細胞膜には、配偶子同士の認識を担う糖タンパク質FUS1 が局在しており(Ferris *et al.* 1996 *Mol. Biol. Cell*;

Hamaji *et al.* 2016 G3)、マイナス接合構造上のカウンターパート因子との相互作用を介して「異性間コミュニケーション」を担うと考えられていた。FUS1 は、クラミドモナス・ゴニウムではプラス交配型特異的に性染色体領域にコードされているが、卵生殖ボルボックス (*Volvox carteri*) では失われていることが示されていた (Ferris *et al.* 2010 *Science*)。そのため、異型配偶段階ではFUS1 を介した「異性間コミュニケーション」が保存されているか否かの解明が待たれていた。

## 2. 研究の目的

本研究は、雌がつくる「卵」と雄がつくる「精子」が、それぞれ配偶子として分化した後に会い、受精に至るまでに必須な「異性間コミュニケーション」が、雌雄の配偶子形態が未分化な同型配偶段階から進化した過程を分子レベルで解明することを目的とした。そのために単細胞モデル緑藻クラミドモナスに近縁で同型配偶・異型配偶・卵生殖という配偶子の雌雄二極化の各段階を包含する緑藻・ボルボックス系列を用いた。その際、先行研究および研究代表者らの発見から推察される2段階の「異性間コミュニケーション」戦略の進化過程において、中心的な役割を担う2つの糖タンパク質「配偶子誘導要因の性フェロモン」と「配偶子接着因子FUS1」の獲得・機能進化の解析を重点的に行うことで、「異性間コミュニケーション」戦略の進化の分子基盤解明に迫ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ユードリナにおける精子束誘導系の確立

まず既存のユードリナ (*Eudorina sp.*) の雌雄株を交配させ、有性生殖を活発に行う雌雄株を得た。それらの株を、炭素源および窒素源を多く含む培地を用いて、32度、明期16時間/暗期8時間の条件下で培養し、同調的に生育する無性群体を得た。得られた無性群体に、雄性群体株の培養上清を投与し、精子束(精子の束からなる群体)の形成を誘導した。培養上清は、既存の窒素欠乏培地を用いた方法で雄株の有性生殖を誘導し、精子束を多く含む培養液の上清を濾過して得た。

### (2) ユードリナの雄株特異的タンパク質の質量分析

雄株(精子束誘導活性を持つ)および雌株(活性を持たない)の有性生殖を誘導し、培養上清を回収して限外濾過フィルターを用いて濃縮した。これをSDS-PAGEで展開し、雄株特異的なタンパク質バンドを得た。このバンドを含むゲル片を切り出し、ユードリナ全ゲノムデータベースを参照した質量分析を外部委託にて行った。

### (3) ヤマギシエラおよびユードリナにおける配偶子認識因子 FUS1 の解析

ヤマギシエラのプラス株およびユードリナ雌株のゲノム配列データベースから、ゴニウム *FUS1* と相同性を持つ配列を取得し、RT-PCR および RACE 法によって各 *FUS1* 遺伝子の cDNA 全長配列を決定した。得られたヤマギシエラ・ユードリナの推定 *FUS1* アミノ酸配列について、既知のクラミドモナス・ゴニウムのものと併せて、ドメイン構造や二次構造、糖鎖修飾の比較解析を行った。さらに半定量的 RT-PCR 法により、ヤマギシエラ・ユードリナ *FUS1* 遺伝子の発現解析を行った。また、外注により抗ユードリナ *FUS1* ペプチド抗体の作製を行った。

### (4) ユードリナにおける配偶子誘導の遺伝子発現定量による解析

まずユードリナにおいて、雌雄それぞれの配偶子で特異的な発現上昇が予測される遺伝子群の

単離を行った。具体的には、ユードリナ雌雄株のゲノム配列データベースから、クラミドモナスのプラス配偶子特異的遺伝子 (*SAG1/GSP1*)、およびマイナス配偶子特異的遺伝子 (*SAD1/GSM1*) と相同性を持つ配列を取得し、RT-PCR および RACE 法によって各遺伝子の cDNA 全長配列を得た。得られた配列、および上記で単離したユードリナ *FUS 1* 遺伝子配列をもとにプライマーを設計し、SYBR Green を用いたリアルタイム PCR による遺伝子発現定量解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ユードリナにおける性フェロモンの解析

本研究ではまずユードリナの無性生殖の培養条件を検討し、約24時間周期の同調培養を可能にした。この条件で培養した雄株に対して、あらかじめ調整しておいた雄有性群体の培養上清を投与することで、約30時間で高頻度に精子束形成を誘導できるバイオアッセイ系を構築した。このバイオアッセイ系を用いて、雄培養上清の作用に対するタンパク質分解酵素プロナーゼの効果を検証したところ、その精子束誘導能が著しく阻害された。また窒素欠乏条件下のみならず、窒素が豊富な条件下でも、雄培養上清投与により精子束誘導されることが分かった。これらのことからボルボックス系列では、雌雄二極化が進んだ卵生殖の場合と同様に、その初期段階にある異型配偶生物においても、精子束(すなわち雄側の配偶子)の誘導にはタンパク質性の性フェロモンが主たる要因として機能することが明らかになった(国際誌に投稿準備中)。

さらに本研究では、このユードリナの性フェロモンタンパク質の分子同定を目指し、雄株の培養上清に特異的に含まれるタンパク質の質量分析を行った。その結果、23個の候補タンパク質を検出したが、近縁の卵生殖ボルボックスの性フェロモンに類似する配列は含まれなかった。そのためボルボックスとユードリナとは、独立に性フェロモンが獲得された可能性も考えられる。今後、これらの候補タンパク質の精子束誘導活性の検証等を通して、ユードリナの性フェロモンの分子同定を行うことで、性フェロモン獲得の進化過程解明に寄与することが期待される。

##### (2) ヤマギシエラおよびユードリナにおける配偶子認識因子 *FUS1* の解析

本研究では、ボルボックス系列の同型配偶生物でのみ知られていたプラス交配型特異的な配偶子認識因子 *FUS 1* について、同系列の雌雄二極化の前後段階の生物である同型配偶ヤマギシエラと異型配偶ユードリナを用いての解析を行った。まず、ヤマギシエラおよびユードリナの全ゲノムシークエンスに基づいた解析を行い、*FUS1* 遺伝子がそれぞれの生物でプラス/雌特異的に性染色体領域にコードされていることを示した。また半定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析により、*FUS1* 遺伝子は、ヤマギシエラでは他の同型配偶生物と同様にプラス配偶子特異的に発現するのに対し、ユードリナでは雄株と混合すると発現上昇することを示した。さらに、ボルボックス系列の *FUS1* の包括的な一次構造解析を行い、各 *FUS1* で検出された 5 つのリピート配列を、アクチン繊維架橋タンパク質フィラミンの免疫グロブリン様リピートに相同性を持つ「*FUS1* リピート」として新たに定義した。併せて、各 *FUS1* において複数の糖鎖修飾予測部位が保存されていたことから、ボルボックス系列では *FUS1* の免疫グロブリン様リピート/糖鎖を介した異性認識機構が、同型配偶・異型配偶で共通して存在することを示唆した。以上の結果を *Communications Biology* 誌に発表した (Hamaji\*, Kawai-Toyooka\* *et al.* 2018 *Commun. Biol.*; \*equally contributed)。また本研究では、抗ユードリナ *FUS1* ペプチド抗体の作製を試みたが、この抗体を用いたウエスタンブロット解析では特異的なシグナルが検出できなかった。上記で述べた遺伝子発現解析により、ユードリナ *FUS 1* の発現量は現状では極めて少ないことが予想されており、今後 *FUS1* がより

高レベルで発現する条件を見出し、さらなる解析を行うことで、ボルボックス系列の異型配偶段階におけるFUS1の細胞内局在や機能が明らかになることが期待される。

### (3) ユードリナにおける配偶子誘導の遺伝子発現定量による解析

異型配偶段階にあるユードリナでは、雄側の配偶子誘導は精子束という特殊な群体の形成によって容易に目視で確認できるが、雌側の配偶子は無性群体の細胞と形態で識別することが困難である。そのため雌雄配偶子のマーカーとなり得る遺伝子を単離し、その発現定量解析を行うことで、雌側の配偶子誘導の顕在化を試みた。まず、ユードリナ雌雄株のゲノム配列データベースに対して、クラミドモナスでのプラス配偶子特異的遺伝子 (*SAG1/GSP1*)、およびマイナス配偶子特異的遺伝子 (*SAD1/GSM1*) をクエリーとしてBLAST探索を行い、各1コピーずつのゲノム配列を得た。各遺伝子のcDNA配列を決定したところ、クラミドモナス-ユードリナ間で、一部の例外を除き、概ねエキソン-イントロン構造が保存されていた。また各遺伝子がコードするアミノ酸配列を比較したところ、それぞれにおいてドメイン構造が保存されていた。そのためこれらの遺伝子は、それぞれオルソログ関係にあり、タンパク質の機能も保存されていることが推察された。

これらの遺伝子について、(1)で述べたバイオアッセイ系の条件下でユードリナ雌雄株サンプルを培養・RNA単離を行い、リアルタイムPCRによる遺伝子発現定量解析を行った。その結果、雄配偶子特異的と推測される遺伝子群 (*SAD1/GSM1*) は、雄群体に雄培養上清を投与し、精子束形成を誘導した場合に著しく発現上昇した。一方、雌配偶子特異的と推測される遺伝子群 (*FUS1/SAG1/GSP1*) は、窒素欠乏条件下で雌群体に対して雄培養上清を投与した場合にのみ顕著に発現上昇した。そのため、ユードリナの雌配偶子の誘導には、雄株由来の性フェロモンと窒素欠乏という二つの主要因が関与すると考えられた。

以上の雌側遺伝子の発現定量解析結果により、ボルボックス系列では雌雄二極化の初期段階の異型配偶生物においても、配偶子誘導の際には性フェロモンを介した「異性間コミュニケーション」が関与することが示唆された。また(1)の解析結果との比較により、ユードリナの配偶子誘導における窒素欠乏の役割は、雄側では必須でないのに対し、雌側ではより重要であると考えられ、両性でその必要性に差異があることが示唆された。これらのことから、ボルボックス系列では雌雄二極化の進行に伴って、配偶子誘導のトリガーが、環境要因(窒素欠乏)から性フェロモンを介した「異性間コミュニケーション」を必要とする過程に段階的に変遷したと考えられる(国際誌に投稿準備中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takashi Hamaji, Hiroko Kawai-Toyooka, Haruka Uchimura, Masahiro Suzuki, Hideki Noguchi, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Shin-ya Miyagishima, James G. Umen, Hisayoshi Nozaki	4. 巻 1
2. 論文標題 Anisogamy evolved with a reduced sex-determining region in volvocine green algae	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-018-0019-5	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 該当する

〔学会発表〕 計25件（うち招待講演 0件／うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Hiroko Kawai-Toyooka, Takashi Hamaji, Yoshiki Nishimura, Shin-ya Miyagishima, Takako Kato-Minoura, Hisayoshi Nozaki
2. 発表標題 Sex pheromone-induced gametogenesis in anisogamous Eudorina
3. 学会等名 The 5th International Volvox Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊岡 博子, 浜地 貴志, 西村 芳樹, 宮城島 進也, 箕浦 高子, 野崎 久義
2. 発表標題 ボルボックス系列異型配偶ユードリナの性フェロモンによる配偶子誘導
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊岡 博子, 浜地 貴志, 西村 芳樹, 宮城島 進也, 箕浦 高子, 野崎 久義
2. 発表標題 ボルボックス系列異型配偶ユードリナにおける配偶子誘導要因の解析
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroko Kawai-Toyooka, Takashi Hamaji, Haruka Uchimura, Masahiro Suzuki, Hideki Noguchi, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Shin-ya Miyagishima, Hisayoshi Nozaki
2. 発表標題 Identification and characterization of gamete adhesion factor FUS1 orthologs in isogamous Yamagishiella and anisogamous Eudorina
3. 学会等名 The 4th International Volvox Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takashi Hamaji, Hiroko Kawai-Toyooka, Haruka Uchimura, Masahiro Suzuki, Hideki Noguchi, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Shin-ya Miyagishima, James Umen, Hisayoshi Nozaki
2. 発表標題 Anisogamy evolved with the reduced sex-determining region
3. 学会等名 The 4th International Volvox Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 豊岡 博子, 浜地 貴志, 内村 悠, 鈴木 雅大, 豊田 敦, 野口 英樹, 水口 洋平, 藤山 秋佐夫, 宮城島 進也, 野崎 久義
2. 発表標題 ボルボックス系列緑藻を用いた異型配偶化の解析：縮小した性決定領域を持つ異型配偶ユードリナ
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>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  <a href="http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~tayousei/">http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~tayousei/</a>          プレスリリース「最初のオスとメスを生み出した性染色体領域を全ゲノム解読から解明」  <a href="https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2018/5786/">https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2018/5786/</a>          研究室の扉「オスとメスを生み出した設計図を発見」野崎久義准教授、豊岡博子特任研究員  <a href="https://www.youtube.com/watch?v=enZFrACFavM">https://www.youtube.com/watch?v=enZFrACFavM</a></p>
--

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
連携研究者	野崎 久義  (Nozaki Hisayoshi)  (40250104)	東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授    (12601)	

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		
米国	ドナルド・ダンフォース植物科学研究センター		