

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月6日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15181

研究課題名(和文)酵母のフェロモン/受容体の新しい組み合わせができる分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanism Role of pheromone recognition systems in creating new combinations of pheromone and receptor in yeast

研究代表者

清家 泰介 (Seike, Taisuke)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：80760842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：多くの動物や微生物は「性フェロモン」を利用して、異性と交配しています。そのため、フェロモンが変化と異性の認識ができなくなり、元の集団から隔離されてしまう。このリスクを抱えながら、どのようにしてフェロモンの多様性は生まれるのだろうか。そこで、私は世界22カ国の野生の分裂酵母で2種類のフェロモンの遺伝子解析を行った。その結果、一方のフェロモンは変化に富んだ柔軟性を示し、もう一方は同一の構造を厳密に維持していました。今回、新しく発見された分裂酵母の「厳密」でかつ「柔軟」な異性認識システムは、同種間の交配を維持しつつ、フェロモンの多様性を生み出す原動力になっているのかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、分裂酵母の一方のフェロモン/受容体のペアは厳密に保たれているが、もう一方のフェロモン/受容体のペアは柔軟に変化していることを発見することができた。これまで、交配という重要なイベントを司るフェロモンの認識機構は「厳密である」と考えられてきたが、同時にこのような「柔軟さ」も備わっており、これが生物の進化の原動力になっていると考えられる。この「非対称な」認識システムにより、フェロモンの分子適合性を変化させることが可能になると推測される。この成果は、フェロモンの多様性が生まれる仕組みや進化の原動力の理解につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Many animals and microorganisms use sex pheromones for attracting individuals of the opposite sex, but what happens to sex pheromones as new species emerge? I study sex pheromones in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, revealing an “asymmetric” pheromone recognition system in which one pheromone operates extremely stringently whereas the other pheromone is free to undergo a certain degree of diversification, perhaps leading to a first step towards speciation. My findings contribute new insights into the evolutionary mechanisms underlying the diversification of pheromones. Organisms might have such systems for creating new versions of pheromones, allowing them to persist enough long in a population to evolve adaptations of receptors. Before a mutant is completely lost, a second suppressor mutation may occur to recover the first defect. Thus, the coevolution of pheromones/receptors can proceed step-by-step.

研究分野：生物多様性, 遺伝学, 進化学

キーワード：酵母 フェロモン 受容体 多様性 進化

## 1. 研究開始当初の背景

生殖隔離機構は、種分化を促す重要な要因の一つである。昆虫や両生類、酵母といった微生物まで多くの生物では、体外に性フェロモンを分泌して、異性と交配する。フェロモンとその受容体の分子適合性は、種毎に厳密に規定されており、フェロモンの構造が変わると受容体とは結合できず、異性との交配が妨げられる結果になる。そのため、フェロモンもしくは受容体の構造が変化することが生殖隔離の原因となり、種が分かれる原動力の一つだとされてきた (Smadia et al, 2009 他)。

申請者はこれまで、モデル真核微生物である分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いて、この仮説を実験室で証明することに成功した。*S. pombe* には、2つの交配型 (P型・M型) があり、フェロモンを使って異性細胞間で交配する。そこで酵母の交配に着目し、フェロモンを人為的に変化させる (第1段階) 受容体にも変異を導入し、変異型フェロモンを認識できる変異型受容体を得る (第2段階) を経て、新しい交配型細胞を創ることに成功した。この新しい生殖群が元の集団から隔離されていることを示し、フェロモンと受容体の遺伝的な変化が生殖隔離を導くことを、酵母を用いて初めて実験的に示した (Seike et al., *Genetics*, 2012; Seike et al., *PNAS*, 2015)。

このようにフェロモンと受容体の分子適合性が変化すると、元の生殖集団と遺伝的交流が行われず、新しく有性生殖が成立する集団が生じることが分かった。しかし、フェロモンもしくは受容体の単独の変異は通常、交配能力の低下を引き起こすだけである。自然界でフェロモンと受容体の新しい組み合わせができるためには、どちらかが変化しても交配が (少なくとも一時的に) 維持できる仕組みが必要であるが、そのメカニズムの詳細はよく分かっていない。

## 2. 研究の目的

分裂酵母のP型フェロモンは単純ペプチドであり、一方M型フェロモンはC末端のシステイン残基が化学修飾された脂質ペプチドである。分裂酵母を含む子囊菌類では、このように化学的性質の異なる2種類のフェロモン系を使って交配することが知られている (Gonçalves-Sá et al., 2011)。フェロモンに関して、申請者はこれまでに以下の実験結果を得ている。

1つ目は、自然界から単離された35株の *S. pombe* について解析した結果、M型フェロモンの一次配列はいずれも完全に保存されていたが、P型フェロモンは極めて多様であった (Seike et al., *Genetics*, 2012)。2つ目は、*S. pombe* とその近縁種である *S. octosporus* の間で、M型フェロモンは厳密に種特異的に作用したが、P型フェロモンは、その一部のものが種を超えて作用した。このことを踏まえて、本研究では「酵母は2種類のフェロモン認識機構を保持することで、種の維持と多様性の創出の両方に対応している」可能性を検証することにした。

## 3. 研究の方法

本研究では、大きく2つの研究計画を立てた。

### (1) 野生酵母 *S. pombe* のフェロモンと受容体遺伝子の変異の調査

自然界から単離された未解析の株の *S. pombe* を対象に、フェロモンおよび受容体遺伝子のシーケンス解析を行い、実験室株の配列と比較することで、多型の調査を行う。*S. pombe* のM型フェロモンは、3つの重複遺伝子 (*mfm1+*, *mfm2+*, *mfm3+*) からそれぞれ合成される。一方、P型フェロモンは遺伝子 (*map2+*) から合成され、実験室株では遺伝子内にフェロモンをコードする領域が4コピー重複している。またM型・P型フェロモンの受容体の遺伝子は、それぞれ *map3+*, *mam2+* と呼ばれ、ゲノム上に1つずつ存在する。変異点の決定までの流れは、以下の通りである。

野生株からゲノムを回収。

該当遺伝子を各々の特異的なプライマーでPCRにより増幅。

PCR断片を精製し、それを鋳型にシーケンス用のプライマーでシーケンス解析。

得られた配列結果と、実験室株の配列を比較することで変異点を決定。

得られたフェロモンと受容体遺伝子の配列を基に、野生株の分類を行う。フェロモン遺伝子に関しては特に、フェロモンコード領域に変異点が存在するもの (塩基の欠失・挿入、重複なども含む) を選別し、受容体遺伝子に関してはアミノ酸が変わるような変異点を持つものを記録する。

### (2) 近縁種間でのフェロモンにおける認識特異性の解析

*S. pombe* と *S. octosporus* 間で、フェロモンの遺伝子を置き換える。ただし、生合成経路における影響が少なくなるように、成熟フェロモンとしてコードされる領域を対象にする。こうして作製されたキメラ遺伝子を発現させ、フェロモンにおける認識特異性の検証を行う。

#### 4. 研究成果

私はまず、世界各地に棲息する野生の分裂酵母 *S. pombe* (図 1) について、フェロモンとその受容体の遺伝子配列を解析した。

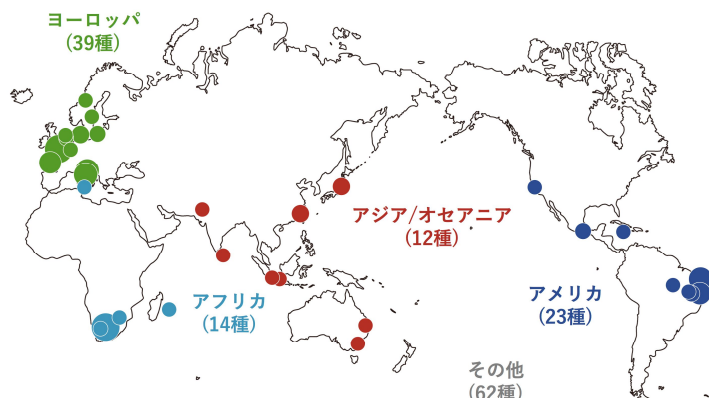


図 1: 本研究で解析された野生の分裂酵母 *S. pombe* の分布

日本 3 種を含む世界の 22 国以上の地域から単離された 150 種の酵母を解析対象にした。

解析の結果、M 型細胞が分泌する M 型フェロモンとその受容体の構造は、完全に同じであったのに対し、驚くべきことに、P 型細胞が分泌する P 型フェロモンとその受容体は、大きく変化していた。M 型フェロモンは 1 種類のペプチドが使われており、その受容体にもアミノ酸を変えるような変異はなかった (図 2)。しかしながら、P 型フェロモンには 6 種類の多型が見られ、その受容体にも 5 種類の多型が見られた。アミノ酸配列に基づくと、大きく日本、パキスタン、ブラジル、マルタから得られた株に特徴的な 4 つのグループに分類することができた。

M型フェロモン (1種類)	<b>M</b>	YTPKVPYMC
P型フェロモン (6種類)	<b>P1</b>	<u>S</u> YADFLRV <u>Y</u> QSWNTF <u>A</u> NPDRPNL
	<b>P2</b>	TYADFLRAYQSWNTFVNPDRPNL
	<b>P3</b>	<u>S</u> YADFLRAY <u>H</u> SWNTFVNPDRPNL
	<b>P4</b>	<u>S</u> YADFLRV <u>Y</u> QSWNTFVNPDRPNL
	<b>P5</b>	TYADFLRAYQSWNTFVNL <u>D</u> RPNL
	<b>P6</b>	TYADFLRAY <u>H</u> SWNTFVNPDRPNL

図 2: 分裂酵母の 2 つのフェロモン  
野生株を解析した結果、M 型フェロモンは全て 1 種類のもが使われていたが、P 型フェロモンには 6 種類ものタイプがあることが分かった。P 型フェロモンの間で異なるアミノ酸を太字・下線で示してある。

さらに、私はこの 2 つのフェロモンに見られる多様性の違いが、*S. octosporus* においても見られる普遍的な現象であることを見出した。このことから、分裂酵母では M 型フェロモン/受容体のペアは厳密に保たれているが、P 型フェロモン/受容体のペアは比較的柔軟性に富んでおり、その認識も曖昧になっていることを示唆している。

次に、私は自身のフェロモンの代わりに、他種のフェロモンを作らせるとどうなるかを調べた。そこで、*S. pombe* と *S. octosporus* の間でフェロモンを入れ替えると、P 型フェロモンは他種のもので交換しても機能することができた。つまり、*S. pombe* の M 型細胞は *S. octosporus* の P 型フェロモンを分泌する P 型細胞と交配することができ、逆もまた然りだった。一方で、M 型フェロモンは他種のもので交換することはできなかった。M 型フェロモンは種特異的に作用するが、P 型フェロモンは種を超えて作用するということの意味する。実際にペプチドを化学合成して細胞に処理すると、M 型細胞は他種の P 型フェロモンに反応する様子が見られる。しかしながら、酵母の交配には「相互の」フェロモン認識が必須なため、間違っても異なる種と交配することはないと考えられる。

今回私は、分裂酵母の M 型フェロモン/受容体のペアは厳密に保たれているが、P 型フェロモン/受容体のペアは柔軟に変化することができるという「非対称性」を発見することができた。これらのフェロモン認識における「厳密さ」と「柔軟さ」の両方を兼ね備えた認識システム (図 3) は、酵母が同種間の交配を保ちつつも、フェロモンの多様性を生み出すことを可能にしていると考えられる。こうして、変化したフェロモンを特異的に結合できるように変化した受容体

が集団内に出現すると、それらの子孫は元々の集団から隔離され、新たな種として進化していくのかもしれない。これまで、交配という重要なイベントを司るフェロモンの認識は厳密であると考えられてきたが、同時に「曖昧さ」も備わっており、これが生物の進化の原動力になっていると考えられる。今後は、片方の「鍵と鍵穴」の認識を(わざと?)緩くしておくことに、どういう生物学的なメリットがあるのかを解明していきたいと思う。

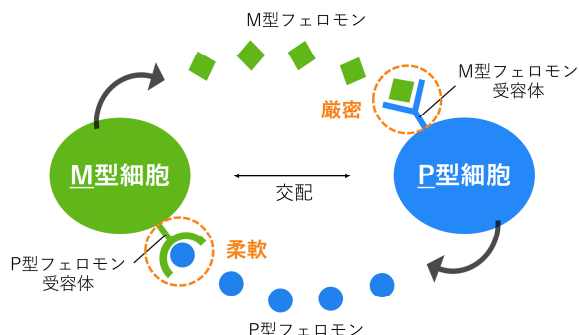


図3：酵母の「厳密」かつ「柔軟」なフェロモン認識システム

M型フェロモンの認識は「厳密」であるが、それに比べてP型フェロモンの認識は「柔軟」であることが示唆された。この「厳密と柔軟」なフェロモン認識システムは、酵母が種を維持しつつ、多様性を生み出すのに貢献していると考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

1. **\*Seike T**, Maekawa H, Nakamura T, Shimoda C (2019)  
The asymmetric chemical structures of two mating pheromones reflect their differential roles in mating of fission yeast.,  
**J Cell Sci**, in press
2. **\*Seike T** (2019)  
The evolution of peptide mating pheromones in fission yeast.,  
**Curr Genet**, in press (査読有)  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00294-019-00968-w>
3. **清家泰介** (2019)  
酵母の巧妙なフェロモン認識システム - 曖昧さが進化の鍵!?,  
**academist Journal**, (査読無)  
<https://academist-cf.com/journal/?p=10141>
4. **\*Seike T**, Shimoda C (2019)  
Role of pheromone recognition systems in creating new species of fission yeast.,  
**Microbial Cell**, 6(4): 209-211 (査読無)  
doi: 10.15698/mic2019.04.675
5. **Seike T** (2019)  
How do pheromone recognition systems evolve to create a new species?,  
**Science Trends**, (査読無)  
<https://sciencetrends.com/how-do-pheromone-recognition-systems-evolve-to-create-a-new-species/>
6. **\*Seike T**, Shimoda C, Niki H. (2019)  
Asymmetric diversification of mating pheromones in fission yeast.,  
**PLoS Biol**, 17(1): e3000101 (査読有)  
doi: 10.1371/journal.pbio.3000101
7. **清家泰介** (2018)  
2018 年受賞研究・若手賞「酵母の種分化機構におけるフェロモン/受容体の共進化」,  
**日本ゲノム微生物学会ニュースレター**, 17: 8-9. (査読無)  
[http://www.kuba.co.jp/sgmjphp/pdf/newsletter/sgmj\\_no17.pdf](http://www.kuba.co.jp/sgmjphp/pdf/newsletter/sgmj_no17.pdf)

[学会発表](計15件)

1. **清家泰介**,  
酵母のフェロモンはどのようにして多様化するか?,  
酵母研究若手の会第五回研究会, 和光, 2019年3月23日(口頭, 査読無)

2. ○清家泰介, 仁木宏典, 古澤力,  
酵母のフェロモンが多様化する仕組みを実験的に探る,  
第13回日本ゲノム微生物学会年会, P098, 東京, 2019年3月7日 (ポスター, 査読無)
3. ○清家泰介,  
酵母のフェロモン/受容体の新しい組み合わせができる分子機構,  
第6回生態発生進化コロキウム, 東京, 2018年12月28日 (口頭, 招待講演)
4. ○清家泰介,  
酵母の性フェロモンが非対称的に多様化する生物学的意義の考察,  
第195回酵母細胞研究会例会, 横浜, 2018年11月2日 (口頭, 受賞講演)
5. ○清家泰介,  
酵母において性フェロモンと受容体の組み合わせが変化する仕組み,  
日本動物学会第89回大会, 札幌, 2018年9月13日 (口頭, 招待講演)
6. ○清家泰介, 下田親, 仁木宏典,  
分裂酵母におけるフェロモンと受容体の認識特異性の解析,  
第51回酵母遺伝学フォーラム研究報告会, V-4, 博多, 2018年9月11日 (口頭, 査読有)
7. ○下田親, 清家泰介,  
分裂酵母 *S. pombe* の接合フェロモン系の人為的改変,  
第51回酵母遺伝学フォーラム研究報告会, V-3, 博多, 2018年9月11日 (口頭, 査読有)
8. ○清家泰介, 下田親, 仁木宏典,  
酵母におけるフェロモン/受容体の共進化メカニズム,  
日本進化学会第20回大会, O-1F-6, 東京, 2018年8月22日 (口頭, 査読無)
9. ○清家泰介,  
分裂酵母の性フェロモンの非対称な進化,  
2017年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システム細胞内装置の構造と機能」,  
三島, 2018年3月22日 (口頭, 招待講演)
10. ○清家泰介,  
酵母は別種の性フェロモンを使って交配できるか?,  
酵母研究若手の会第四回研究会, 東岡崎, 2018年3月9日 (口頭, 査読無)
11. ○清家泰介,  
酵母の種分化機構におけるフェロモン/受容体の共進化,  
第12回日本ゲノム微生物学会年会, 京都, 2018年3月6日 (口頭, 受賞講演)
12. ○清家泰介, 仁木宏典,  
分裂酵母におけるフェロモン/受容体の共進化の実態解明を目指して,  
第12回日本ゲノム微生物学会年会, 1P-32, 京都, 2018年3月6日 (ポスター, 査読無)
13. ○清家泰介, 仁木宏典,  
分裂酵母のフェロモン多様性における非対称な進化,  
第50回酵母遺伝学フォーラム研究報告会, XIV-4, 東京, 2017年9月13日 (口頭, 査読有)
14. ○Seike T, Niki H,  
The Evolution of Pheromone Diversity in Fission Yeast.,  
28th ICYGB/Yeast2017, PS17-21, Prague Congress Centre, Aug. 29, 2017  
(ポスター, 査読無)
15. ○Seike T, Niki H,  
Evolution of sex pheromones accelerates asymmetrically in fission yeasts.,  
9th International Fission Yeast Meeting, 151, Banff Centre, May 18, 2017  
(ポスター, 査読無)

[その他]

ホームページ等: <https://tbtsjlpnghrs.wixsite.com/saypombe>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。