

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 6 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19770068  
 研究課題名 (和文) 単細胞接合藻ヒメミカヅキモの性フェロモンによる生殖隔離機構の解析  
 研究課題名 (英文) Analysis of reproductive isolation by sex pheromones in unicellular conjugatophycean *Closterium*

研究代表者  
 土金 勇樹 (TSUCHIKANE YUKI)  
 日本女子大学・理学部・学術研究員  
 研究者番号：20434152

研究成果の概要 (和文)：ミカヅキモは陸上植物に最も近縁な単細胞生物の仲間である。また、雌雄にあたる接合型の間で性フェロモンによる相互認識が行なわれ、接合と呼ばれる有性生殖が進行する。そして、同じ採集地で得られた雌雄は接合するが、別の採集地間では接合しない生殖的に隔離された交配群が存在する。本研究ではこれら交配群の系統関係と性フェロモンの分子進化、交差活性を精査することで性フェロモンが生殖隔離に関わる事を明らかにした。そして、ミカヅキモは生殖隔離に直接関わる分子の解析が可能な数少ない生物の一つであることを示した。

研究成果の概要 (英文)：The *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* (*C. psl.*) complex is a unicellular charophycean alga and their sex pheromones, responsible for the progress of the sexual reproduction, are well characterized. The *C. psl.* complex is known to be composed of several reproductively isolated mating groups of heterothallic strains. In this study, we assessed the phylogenetic relationships among reproductively isolated mating groups of the *C. psl.* complex and sex pheromones. Cross-reactivities of sex pheromones among the groups are also analyzed. The existing degree of reproductive isolation can be explained by differences in molecular structures and physiological activities of sex pheromones of these heterothallic mating groups.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	0	1,400,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	570,000	3,870,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物多様性・分類

キーワード：ミカヅキモ、性フェロモン、有性生殖、生殖隔離、種分化、ヘテロタリック

## 1. 研究開始当初の背景

生物学的種概念に基づく種とは、生物的に他の集団から隔離されている集団の

ことであり、種分化とは、生殖隔離の機構が進化することであると考えられている。生物の動物・植物を問わず、有性生殖過程の成立

には、最終的には精細胞、卵細胞などの2個の配偶子細胞間の情報交換、認識が効率よく行われることが前提となっている。そして、この情報交換が何等かの理由により損なわれる事で、生殖隔離が起こるものと考えられている。しかし、この生殖隔離機構における分子生物学的な解析は、生物の種分化機構を考える上で、非常に重要な基盤になりうるにもかかわらず、細胞間情報交換物質の特定の問題も含め大きく遅れている。

本研究で実験材料に選択した単細胞接合藻ヒメミカヅキモ (*Closterium psl. complex*)はこの障害を克服することのできる数少ない生物の一つである。この藻類は plus 型、minus 型と呼ばれる2つの性を持ち、実験室内で容易に有性生殖を制御できる。もっとも重要な点は、plus 型、minus 型それぞれの配偶子の特徴づけ、細胞間の情報交換を行なうタンパク質性である2種類の性フェロモン (plus 型細胞から放出される PR-IP と minus 型細胞から放出される PR-IP inducer) の存在と、それらをコードする遺伝子の配列が明らかにされていることである (図1) (Sekimoto, J. Plant Res. 113:343-352, 2000)。更に、ヘテロタリックのヒメミカヅキモにおいて、生殖的に隔離された、幾つもの交配群の存在が報告されている (Watanabe and Ichimura, Bot. Mag. Tokyo. 95: 241-247, 1978)。

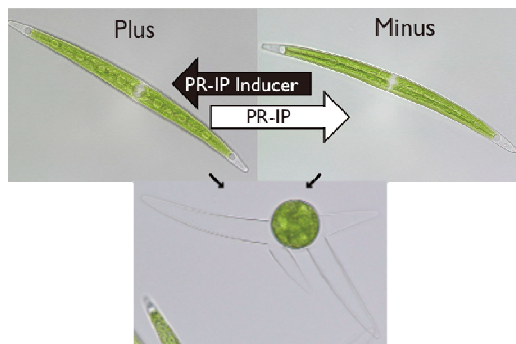


図1. ヒメミカヅキモ (交配群 IE) における性フェロモンのモデル図。窒素源の欠如により PR-IP Inducer が放出され、それを受容した相手方の細胞が PR-IP を放出することで雌雄認識が行なわれ、その結果、接合子が形成される。

## 2. 研究の目的

ヒメミカヅキモにおける生殖隔離は、交配群の間で有性生殖時の相互認識が失われることが原因の一つであると推定し、その原因因子として性フェロモンに注目した。

本研究では、ヒメミカヅキモにおけるそれぞれの交配群を用いて、交配実験を用いた生物学的距離、系統関係、性フェロモンの分子進化と交差活性を明らかにし、種間の系統関係を把握したうえで性フェロモンに

よる生殖隔離の状況を系統樹上で比較しながら検討することで、ミカヅキモの生殖隔離に、性フェロモンがどのように作用しているかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒメミカヅキモの採集

ヒメミカヅキモの採集を水田、湖沼から行なった。得られた細胞はキャピラリー洗浄法を用いて無菌化を行い保存株とし、接合実験を通して生殖隔離状況や交配群の特定を行なった。

### (2) それぞれの交配群における性フェロモンの生理活性の測定

それぞれの交配群の有性生殖を誘起し、PR-IP Inducer 及び PR-IP を培地中に放出させた後、この培養培地を回収し、他の交配群に添加した。有性分裂誘導活性を指標に、性フェロモンが交配群間でどの程度まで作用しうるのか、活性の強さを定量的に評価した。また、性フェロモンの発現パターンをリアルタイム PCR を用いて明らかにし、組換え型性フェロモンを酵母に産生させることで、詳細な特徴解析を行なった。

### (3) それぞれの交配群の系統関係と性フェロモンの系統関係の比較

PR-IP inducer と PR-IP の2種類の性フェロモン相同遺伝子の単離、rDNA 介在領域である 1506 group I intron の単離を行い、これらを指標とした系統樹の作成を行なった (Tsuchikane et al., J. Phycol. 44:1197-1203, 2010)。

## 4. 研究成果

### (1) ミカヅキモの採集

日本を中心として、山形、福島、埼玉、長野、静岡、岡山、山口、沖縄、台湾、インドネシア、スロバキアなどから採集を行なった。これまでに確立された21株の系統株には、雌雄にあたる2つの性 (plus 型、minus 型) を持つヘテロタリックなもの、同一クローン内で接合子を生じるホモタリックなものがそれぞれ存在していた。

また、ホモタリック株においてはその接合過程の詳細が不明だったため観察を行なったところ、一つの細胞由来の配偶子囊細胞同士が姉妹接合 (自殖) することを明らかにした (Tsuchikane et al., J. Phycol. 46:274-284, 2010)。

### (2) 交配群間の生物学的距離と系統関係

次に、得られた交配群間の系統関係を精査するとともに、各交配群内で用いられる性フェロモン配列の単離と系統解析を行なうことで、性フェロモン遺伝子の分子進化

を明らかにした (Tsuchikane et al., J. Phycol. 44(5):1197-1203. 2008)。

ヘテロタリック株においては、生殖隔離の程度と、18S rDNA の介在領域を用いた種内系統樹、性フェロモンの分子進化が相関することを明らかにした (図 2)。

交配群内では常に安定して有性生殖が行なわれ、接合子が形成されたが、交配群 IE は、他の交配群 (IIA, IIB) と生殖的に隔離されている。また、交配群 IIA の plus 型細胞と交配群 IIB の minus 型細胞の掛合わせでは接合が見られるものの、逆の掛合わせでは接合が見られない。これら交配群における性フェロモン遺伝子の発現解析を行なったところ、交配群 IIA、IIB およびそれらと完全に生殖隔離されている交配群 IE について、接合型の定義が偶然逆になっていたものの、性フェロモン遺伝子の発現パターンには本質的な差がないことが判明した。

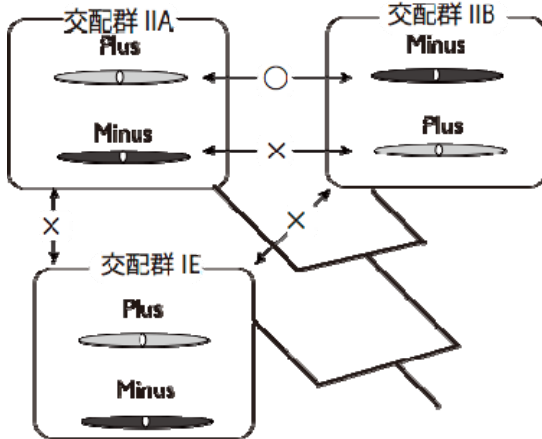


図 2. 交配群間の接合状況と系統関係。交配群内では接合子を形成するが、交配群 IE は交配群 IIA, IIB と完全に生殖的に隔離している。交配群 IIA の plus 細胞と IIB の minus 型細胞の組み合わせでは接合子が形成されるが、その逆では形成されない、非対称生殖隔離を示す。系統関係と生物学的な距離は相関した。○: 接合子が形成される。×: 接合子が形成されない。

### (3) 性フェロモンの交差活性

次に、各交配群の性フェロモンの交差活性を明らかにしたところ、完全に生殖隔離している交配群間では性フェロモン (PR-IP および PR-IP Inducer) が作用し合わず、交配群 IIA の - 型細胞が放出する性フェロモン (交配群 IE の PR-IP に相当) のみが、交配群 IIB の + 型細胞にほとんど作用しなかった (図 3)。

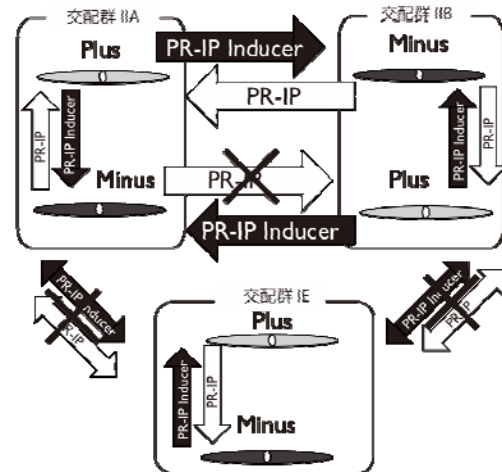


図 3. 交配群間の性フェロモンの作用状況。交配群内では性フェロモンは当然作用しあった。完全に生殖的に隔離した交配群 IE は他交配群との間では作用し合わなかった。非対称な生殖的隔離を示す交配群 IIA と IIB は、IIA の PR-IP が IIB の Plus 細胞に作用し難いことが明らかとなった。

また、交配群 IIA と IIB の間において、交差活性の存在する PR-IP Inducer の相関性は 95.1%であった。一方、交差活性が存在しなかった PR-IP であるが、19k と 42k Da のサブユニットからなる。42k Da サブユニットの相関性は 91.3%であった。これらと比較して、直接細胞に作用する 19k Da サブユニットの相関性は 82.9%であり相関性が低下していた。以上の結果から、交配群 IIA の 19k Da サブユニットの配列の違いにより、交配群 IIB の受容性が低下するものと考察した。

このような非対称な生殖的隔離はウニやハエなど、様々な生物で知られているが、原因因子を特定することで、性フェロモンによる接合前生殖的隔離の機構の詳細を明らかにした。

### (4) ホモタリック株の解析とヘテロタリック株を用いた接合実験

また、細胞分裂後の姉妹細胞同士で接合 (自殖) することが明らかとなったホモタリック株において、性フェロモン相同遺伝子を単離し、酵母を用いて産生することで、その生理活性を明らかにした。また、混合実験から、近縁なホモタリック株とヘテロタリック株の間で部分的な接合が観察された。これは両者の間で性フェロモンによる情報交換が正確に行なわれたことを示唆している。このように交配様式が異なっているも、性フェロモンの一次構造によっては生殖隔離の壁が取り除かれることが明らかになり、ヒメミカヅキモの生殖隔離における性フェロモ

ンの重要性が示された (土金勇樹 日本植物分類学会第 8 回大会 2009)。

種分化とは生殖隔離の機構が進化することであると考えられており、生殖隔離機構を解析するためには、有性生殖時の情報交換機構が明らかになっていなくてはならない。有性生殖の詳細が明らかとなっているヒメミカヅキモを用いて生殖隔離機構を解析することで、性フェロモンの一次構造の変異により、交配群同士での認識が低下し生殖隔離が起きている事が示唆された。このように、ミカヅキモは生殖隔離に直接関わる分子の解析が可能な数少ない生物の一つであり、今後もミカヅキモを用いた更なる種分化研究が期待される。

#### 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 3 件)

- ①. Yuki Tsuchikane, Machiko Sato, Tomoko Ootaki, Yume Kokubun, Hisayoshi Nozaki, Motomi Ito and Hiroyuki Sekimoto. Sexual processes and phylogenetic relationships of homothallic strain of the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Zygnematales, Charophyceae). Journal of Phycology. 査読有 46(2):274-284. (2010).
- ②. Toshihiro K. Yamada, Yuki Tsuchikane, Jiunn-Tzong Wu, Hiroyuki Sekimoto, Kazuyuki Miyaji, and Hisayoshi Nozaki. A taxonomic study of *Eudorina elegans* (Volvocaceae, Chlorophyceae) from Taiwan, based on morphology and molecular phylogeny. HIKOBIA. 査読有. 15:135-143. (2008).
- ③. Yuki Tsuchikane, Motomi Ito and Hiroyuki Sekimoto. Reproductive isolation by sex pheromones in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Zygnematales, Charophyceae). Journal of Phycology. 査読有 44(5):1197-1203. (2008).

[学会発表] (計 16 件)

国際会議における発表  
ポスター発表

- ①. Sayuri Hashiba, Yuka Marukawa, Machiko Ichikawa, Ichiro Nishii, Satoko Akatsuka, Yuki Tsuchikane, Jun Abe and Hiroyuki Sekimoto. 「Characterization of a novel receptor-like protein kinase relating to the sexual reproduction of a unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex」 『International Symposium of Cell-Cell

Communication in Plant Reproduction from pollination to fertilization』 (Nara, Japan, March, 2010)

- ②. Yuki Tsuchikane and Hiroyuki Sekimoto. 「Asymmetric reproductive isolation by sex pheromones in a unicellular charophycean alga, *Closterium*.」 『International Symposium of Cell-Cell Communication in Plant Reproduction from pollination to fertilization』 p29 (Nara, Japan, March, 2010)

(2)口頭発表

- ③. Yuki Tsuchikane, Yume Kokubun, and Hiroyuki Sekimoto. 「Sexual processes and phylogenetic relationships of a homothallic strain in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Zygnematales, Charophyceae)」 『9th International Phycological Congress』 379 (Tokyo, Japan, 3 August, 2009)
- ④. Sekimoto, H., Akatsuka, S., Ichikawa, M., Marukawa, Y., Takekawa, Y., Abe, J., Tsuchikane, Y. 「Characterization of two receptor-like proteins relating to the sexual reproduction of a unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex.」 『The Vth Asian Pacific Phycological Forum』 F 1100 LT2 (Wellington, New Zealand, November, 2008)

シンポジウム

- ⑤. Yuki Tsuchikane and Hiroyuki Sekimoto. “Biological speciation in *Closterium* (Zygnematales, Charophyceae): Reproductive isolation by sex pheromones” The Vth Asian Pacific Phycological Forum, TH 1300 LT2 (Wellington, New Zealand, November, 2008)  
招待講演

国内学会における発表

ポスター発表

- ⑥. 土屋美紀・土金勇樹・関本弘之 P-02 「接合藻ヒメミカヅキモにおけるホモタリック株の解析:ヘテロタリック株との接合実験から明らかになった「性」の存在」 日本植物分類学会第 9 回大会、(愛知) 2010 年 3 月
- ⑦. 國分夢・土金勇樹・関本弘之、P64 「単細胞接合藻ヒメミカヅキモのホモタリック株における接合調整分子の発見と特性解析」 日本藻類学会第 33 回大会、(沖縄) 2009 年 3 月
- ⑧. 土金勇樹・佐藤真知子・中原千春・國分夢・野崎久義・伊藤元己・関本弘之、P-003 「ホモタリックな接合藻ヒメミカヅキモの系統関係と接合機構の解析」 『日本植物学会第 72 回大会』 (高知) 2008 年 9 月
- ⑨. 佐藤真知子・土金勇樹・関本弘之

P-93 「ヒメミカヅキモの有性生殖過程のタイムラプス解析」 日本植物学会 71 回大会、(東京)、2007 年 9 月

口頭発表

⑩. 土金勇樹・加納亜子・関本弘之  
L-26 「単細胞接合藻におけるホモタリスⅡム  
の分子系統」 日本植物分類学会第 9 回大会、  
(愛知) 2010 年 3 月

⑪. 土金勇樹・土屋美樹・日向淑恵・関  
本弘之 A21 「接合藻ヒメミカツキモのホモ  
タリック株における「性」の発見」 日本藻  
類学会第 34 回大会、(つくば) 2010 年 3 月

⑫. 土金勇樹・國分夢・関本弘之  
1aE04 「ホモタリックな接合藻ヒメミカヅキ  
モにおける接合調整分子の解析」 日本植物  
学会 73 回大会、(山形)、2009 年 9 月 口頭  
発表賞受賞

⑬. 土金勇樹・関本弘之 L-02 「接合藻  
ヒメミカヅキモの生殖隔離：性フェロモン  
(PR-IP)の認識低下による非対称な生殖隔離」  
日本植物分類学会第 8 回大会、(仙台) 2009  
年 3 月

⑭. 土金勇樹・山崎華奈子・伊藤元己・  
関本弘之 B12 「接合藻ヒメミカヅキモの非  
対称な生殖隔離に関わる性フェロモン」 日本  
藻類学会第 32 回大会、(東京)、2008 年 3 月

⑮. 土金勇樹・大滝知子・中原千春・佐  
藤真知子・野崎久義・伊藤元己・関本弘之  
1aD03 「ホモタリックな接合藻ヒメミカヅキ  
モの有性生殖機構」 日本植物学会 71 回大  
会、(東京)、2007 年 9 月

⑯. 土金勇樹・伊藤元己・関本弘之  
1aD02 「接合藻ヒメミカヅキモの性フェロモ  
ンによる生殖隔離」 日本植物学会 71 回大会、  
(東京)、2007 年 9 月

[図書] (計 1 件)

1) 土金勇樹 「8.4 免疫応答の利用」, 『細胞  
生物学実験法』(野村港二 編著), 朝倉書店  
(2007)

[その他]

ホームページ等

[http://web.mac.com/tsuchikane\\_01/tsuchikane\\_yuki/home.html](http://web.mac.com/tsuchikane_01/tsuchikane_yuki/home.html)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

土金 勇樹 (TSUCHIKANE YUKI)

日本女子大学・理学部・学術研究員

研究者番号： 2 0 4 3 4 1 5 2