

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16197

研究課題名(和文) 酵母から学ぶ：フェロモンと受容体が共進化する仕組み

研究課題名(英文) Lesson from yeast: Mechanism of coevolution of sex pheromones and their corresponding receptors

研究代表者

清家 泰介 (Seike, Taisuke)

大阪大学・情報科学研究科・助教

研究者番号：80760842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：フェロモンと受容体はその分子適合性を保ちつつ変化する必要があるが、この共進化のメカニズムはよく分かっていない。そこで本研究では分裂酵母*S. pombe*と*S. octosporus*の間で、フェロモンと受容体遺伝子をスワップさせることにより、フェロモンと受容体間の特異性を検証した。その結果、M型フェロモンと受容体遺伝子は近縁種間で交換することはできないが、P型フェロモンと受容体遺伝子は交換できることが分かった。このことから、分裂酵母の2つのフェロモン/受容体の分子適合性には非対称性があることが示唆された。本結果は「フェロモンと受容体の新しい組み合わせが生まれる仕組み」を知る手がかりになるだろう。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フェロモン認識機構はその厳密なイメージとは裏腹に「遊び・曖昧さ」も残されており、これが進化の原動力になっていると考えられている。本研究では、分裂酵母の2つのフェロモンと受容体に着目し、近縁種の遺伝子と交換することで、一方のフェロモン認識は厳密だが、もう一方は柔軟に機能するというデータを得た。そのような非対称な仕組みがフェロモンと受容体の組み合わせの変化を可能にするのかもしれない。生物のフェロモン認識機構は種の維持にとって重要な「厳密な部分」と変化に柔軟に対応できる「曖昧な部分」を両方備え持っているようであり、本研究の成果はフェロモンの変化のメカニズムの手がかりを与えることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Most organisms have the ability to recognize individuals of the same species. In ascomycete fungi, mating between cells of opposite mating-type depends on the molecular recognition of two peptidyl mating pheromones by their receptors. However, very few studies have focused on the stringency of pheromone receptors. The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* has two mating types (sexes), Plus (P) and Minus (M). Here I investigated the stringency of the two receptors, Mam2 and Map3, for their respective pheromones, P-factor and M-factor, in fission yeast. I switched GPCRs between *S. pombe* and the closely related species *S. octosporus*, which showed that SoMam2 is partially functional in *S. pombe*, whereas SoMap3 is not interchangeable. Thus, the differences in these two receptors might reflect the significantly distinct stringency/flexibility of their respective pheromone/receptor systems, maybe allowing ascomycete fungi to generate novel prezygotic barriers within a population.

研究分野：遺伝学、進化学

キーワード：分裂酵母 フェロモン 分子適合性

1. 研究開始当初の背景

新しい種ができる原因の一つに「生殖隔離」が存在する。昆虫・両生類から酵母のような微生物まで、多くの生物では体外に性フェロモンを分泌して、異性と交配している。フェロモンとその受容体間の分子適合性は、種ごとに厳密に保たれており、フェロモンの構造がひとたび変わると、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、フェロモンとその受容体間の「分子適合性」の変化が、生殖隔離の原因になるという仮説が議論されてきた (Smadja et al., *Heredity*, 2008 他)。しかし、これを実験的に直接証明することは難しく、これまで明確な結論が出ていなかった。

申請者はこれまで、単細胞のモデル微生物である分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を使って、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 (**Plus**・**Minus** 型) があり、フェロモンを使って異性細胞間で交配して子孫を作る。そこで酵母の交配に注目し、フェロモンを人為的に変化させる (第 1 段階) → 変異型フェロモンを認識できる受容体を得る (第 2 段階) を経て、新しい生殖群を創ることに成功した。実際、変異型間でも野生型間とほぼ同程度で交配が起こったが、変異型と野生型の間では、遺伝子の交換は 1 千万匹に 1 つという頻度でしか起こらないことを確かめた。こうして、申請者はフェロモンとその受容体間の分子適合性の変化が生殖隔離を引き起こすことを、酵母を使って初めて実験的に示した (Seike et al., *Genetics*, 2012; *PNAS*, 2015)。

このように、フェロモンとその受容体間の分子適合性が変化すると、従来の集団から生殖隔離された新しい集団が生じることが分かった。しかし、フェロモン及び受容体の単独の変化は、交配能力の低下を引き起こすはずである。そのため、フェロモンと受容体はその分子適合性を保ちつつ共に変化する必要があるが、この共進化の仕組みはよく分かっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分裂酵母 *S. pombe* を使って、フェロモン (鍵) と受容体 (鍵穴) の新しい組み合わせが生まれる分子的な仕組み (=共進化) を実験的に理解することである。本研究では DNA 組換え反応により、1 細胞内でフェロモンと受容体の 2 つの遺伝子を連結させて、次世代シーケンサーで一斉に組み合わせを解析する手法を開発する。これにより、あらゆる組み合わせの中から、適合するものだけをハイスループットに定量できる。こうして遺伝学の得意な酵母の利点を生かし、次世代シーケンシング技術と合わせることにより、フェロモンとその受容体間の分子適合性 (鍵と鍵穴) が変化する仕組みを検証する。また近縁種 *S. octosporus* のフェロモンと受容体遺伝子をそれぞれ *S. pombe* のものとスワップさせることにより、フェロモンと受容体間の認識レベルの違いを検証する。以上のことから、フェロモンと受容体が共進化する仕組みの解明を目指す。

3. 研究の方法

1. 次世代シーケンサーによるフェロモンと受容体間の分子適合性の一斉定量

M 型フェロモン受容体遺伝子、および P 型フェロモン受容体遺伝子をそれぞれプラスミドに導入する。これらを鋳型として、各遺伝子に変異導入キットを用いてランダムに変異を導入する (数変異/遺伝子)。得られたプラスミドライブラリーを M 型細胞もしくは P 型細胞に導入して、それぞれの大規模な変異細胞集団を得る。これを使って、フェロモンと受容体間の分子適合性を検証する。酵母の交配には、フェロモンと受容体間の特異的な認識が必須なため、交配した二倍体細胞が持つフェロモンと受容体の組み合わせは必ず適合するペアである。そこでまず、ライブラリーを導入した変異 M 型・P 型集団を一斉に混合し、交配した二倍体細胞だけを選択する。次に組換え酵素 Cre を発現させ、細胞内でプラスミドを融合する (loxP, loxP-2272 は同じ配列を認識して特異的に組換える)。酵母からプラスミドを回収し、特異的なプライマーを使って 2 つの遺伝子が連結された PCR 産物を得る。最後に、次世代シーケンサーによる一斉定量により、フェロモンと受容体間の組み合わせとその頻度を網羅的に定量する。シーケンズデータを解析し「どのような組み合わせが存在するか」を調べる。また、定量値を分布化し「組み合わせの多様度」といった視点から M 型と P 型で鍵と鍵穴の特異性が異なるかを検証する。

2. フェロモンと受容体遺伝子のスワッピングによる認識レベルの検証

S. octosporus から M 型フェロモン遺伝子 (*Somfm1⁺*), 受容体遺伝子 (*Somap3⁺*), P 型フェロモン遺伝子 (*Somap2⁺*), 受容体遺伝子 (*Somam2⁺*) をそれぞれクローニングし、*S. pombe* の遺

伝子とスワップさせることにより、遺伝子を入れ替える。形質転換した *S. pombe* 株が交配できるかを調べることにより、フェロモンと受容体の分子適合性を調べる。また受容体間の各ドメインをさらに分割して交換し、フェロモンの認識に重要な領域を特定し、P型・M型フェロモンの認識レベルを検証する。

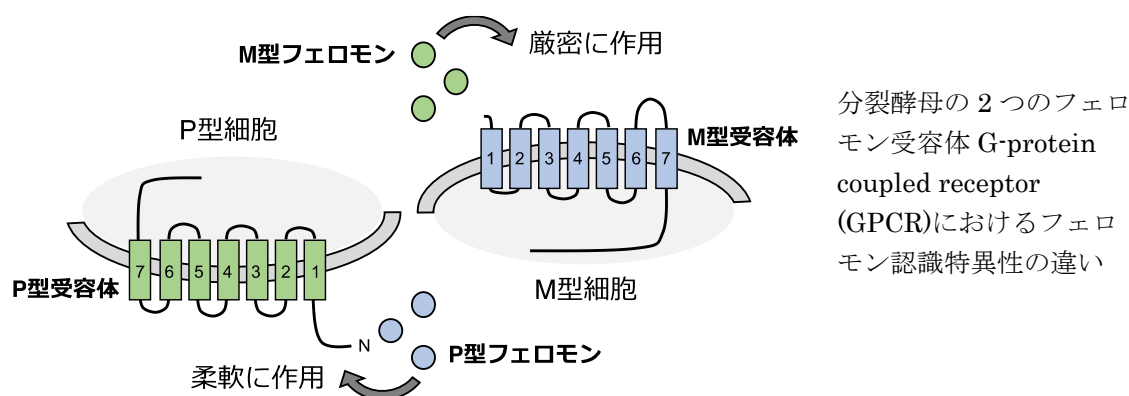
4. 研究成果

1) フェロモンと受容体間の分子適合性を一斉に定量できる解析法の開発を目指した。まずフェロモン受容体遺伝子 (*map3^t*, *mam2^t*) をプラスミドにクローニングし、このプラスミドを鋳型として TaKaRa の Random mutagenesis kit を使って、遺伝子全長にランダムに変異導入を行った。さらに loxP, lox2272 および 15 bp からなる DNA バーコードを挿入し、プラスミドライブラリーを作製した。これを受容体遺伝子を欠失したヘテロタリク一倍体細胞に、プラスミドライブラリーを導入し、交配により生じた二倍体細胞を異なる薬剤耐性遺伝子 (G418 と Nat) を選択マーカーとして選別した。二倍体細胞内で Cre-loxP を β -エストラジオール誘導下で発現させると、確かに二種類のプラスミドが融合し、2つの遺伝子が連結した PCR 産物が得られることを確認した。

そこでまずこれらのプラスミドライブラリーを酵母細胞に導入して、1,000 個程度のランダムな変異受容体を発現する細胞集団を作製した。続いて、この細胞集団を交配を誘導する培養環境下で継代培養し、有性生殖をした細胞 (つまり、フェロモンを認識できる受容体を発現する細胞) を濃縮した。最終的に得られた細胞集団からプラスミドを回収し、DNA バーコード部分の種類と数をイルミナシーケンサー MiSeq で解析した。変異受容体と DNA バーコードを含む PCR 断片をナノポアシーケンサー minION で解析することにより、受容体の変異とバーコードの種類に対応づけを行い、バーコードを解析することで変異が分かるようにした。現在は解析中であるが、酵母の遺伝学を駆使した実験系を使うことで、フェロモン受容体の「変異への許容性の違い」が議論できると期待している。

2) 分裂酵母 *S. pombe* と *S. octosporus* の間で、フェロモンと受容体遺伝子をスワップさせることにより、フェロモンと受容体間の特異性を検証した。その結果、M型フェロモンと受容体遺伝子は近縁種間で交換することはできないが、P型フェロモンと受容体遺伝子は交換しても機能することが分かった。さらなる遺伝子解析により、M型フェロモン受容体の6番目の膜貫通領域が特異性に大きな影響を与えていることを見出した (Seike et al., bioRxiv, 2020)。

本研究を通じて、分裂酵母の2つのフェロモン/受容体の分子適合性には非対称性があることが示唆された。こうして *S. pombe* のフェロモン認識における「厳密性」と「柔軟性」を生み出す分子的な仕組みの理解が分かりつつある。この一連の解析を基にさらなる研究を行うことにより、フェロモンと受容体とその分子適合性を保ちつつも多様性を作る分子メカニズムについて、重要な手がかりが得られると期待している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 *Seike T, Sakata N, Shimoda C, Niki H, Furusawa C	4. 巻 -
2. 論文標題 Distinct specificity of two pheromone G-protein coupled receptors, Map3 and Mam2, in fission yeast species.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.07.22.215566	査読の有無 無
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9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Seike T, Shimoda C, Niki H
2. 発表標題 Role of pheromone recognition systems to create a new species.
3. 学会等名 10th International Fission Yeast Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清家泰介, 阪田奈津枝, 下田親, 仁木宏典, 古澤力
2. 発表標題 近縁種の作るフェロモンを使って、S. pombeを交配させる実験的試み
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清家泰介
2. 発表標題 酵母のフェロモンが多様化する仕組み
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清家泰介
2. 発表標題 酵母の大規模交配実験: フェロモン分子はどのように多様化するか?
3. 学会等名 第13回日本ゲノム微生物学会若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清家泰介, 小谷葉月, 古澤力
2. 発表標題 フェロモンが変化できる進化パスを実験的に探索する
3. 学会等名 第14回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清家泰介
2. 発表標題 酵母界において「絶望の定理」は成り立つか?
3. 学会等名 酵母研究若手の会第六回研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清家泰介
2. 発表標題 野生の分裂酵母におけるフェロモン多様性と種分化
3. 学会等名 生物工学webシンポジウム2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清家泰介, 阪田奈津枝, 小谷葉月, 古澤力
2. 発表標題 環境pH変化に依存した酵母のフェロモン活性の揺らぎ
3. 学会等名 第15回日本ゲノム微生物学会若手の会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清家泰介, 阪田奈津枝, 古澤力
2. 発表標題 移動性の高いショウジョウバエからの野生酵母の単離と多様性
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021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