

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32641

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23770277

研究課題名(和文) シャジクモ藻類ヒメミカツキモから探る植物の発生進化の分子基盤

研究課題名(英文) Study of the molecular basis on evolution of plant development explored in a unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex

研究代表者

阿部 淳 (Abe, Jun)

中央大学・研究開発機構・機構助教

研究者番号：10424764

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)：陸上植物はシャジクモ藻類から進化したと考えられている。シャジクモ藻類における転写制御因子の多様化について調べるために、単細胞シャジクモ藻ヒメミカツキモのゲノム配列より転写制御因子ファミリーを検出した。その結果、緑藻(Chlorophyta)では認められず、陸上植物で認められる75%の転写因子ファミリーがヒメミカツキモに存在することが明らかとなった。また、ヒメミカツキモ転写因子の1つであるCpMinus1は-型ゲノムにのみ接合型特異的に存在し、性決定遺伝子の候補の1つとして有性生殖を制御している事が示された。

研究成果の概要(英文)：Charophycean green algae are the closest living relatives to land plants. To understand how plant transcription factors (TFs) diversified in Charophycean algae, we investigated genome in a unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. We found that 75% of "land plant-specific" TF families that not found in Chlorophycean algae present in *Closterium* genome. We also found a *Closterium* TF, named CpMinus1, only present in mating-type minus genome. Transformation analysis indicated that the CpMinus1 is responsible for the sex determination in *Closterium*.

研究分野：生物学

キーワード：ヒメミカツキモ シャジクモ藻類 転写因子 発生進化 有性生殖

## 1. 研究開始当初の背景

陸上植物は比較的体制の単純な淡水性のシャジクモ藻類より進化したと考えられている (McCourt et al. 2004)。シャジクモ藻類は、単細胞性のものから多細胞性の複雑な体制を持つ物までを含む多様な分類群であるが、陸上植物とともに「ストレプト植物」として一つのクレードを形成する。

ストレプト植物において、「有性生殖機構」「多細胞体制」などの発進進化史上重要なイベントは、このシャジクモ藻類の進化段階で起きている。このような発進プロセスの大きな変化は、マスター遺伝子となる転写因子の多様化とその下流で働く遺伝子群のネットワークの新たな確立による成されたと考えられる。これまでに、Riano-Pachon ら(2008)は、陸上植物で共通して見いだされる 23 種類もの転写因子群が、ストレプト植物と系統の離れたクラミドモナス (緑藻) やオストレオコッカス (プラシノ藻) には存在しないことを示している。このことは、シャジクモ藻類段階での転写因子ファミリーの劇的な進化および多様化が生じ、その後の植物の発進過程に重要な役割を果たしてきたことを示唆する。しかし、シャジクモ藻類は生活環をコントロールすることが難しく、そのため分子生物学・分子遺伝学的なアプローチからの研究がほとんど進んでいない。従って、どのような制御機構や遺伝子ネットワークがストレプト植物の有性生殖機構の獲得や多細胞化において重要な働きをしたのかはこれまで全く不明であった。

このような状況の中で、我々が研究対象としてきた単細胞接合藻ヒメミカツキモ (*Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex) は、以下に示す理由から上記の課題を克服できる数少ないシャジクモ藻類の 1 つとなりつつあった: (1) 有性生殖を含めた生活環を人為的かつ容易にコントロール

できる、(2) 2 種類の接合型細胞 (+型/-型) の概要ゲノム及びトランスクリプトーム情報が整備されつつある、(3) 核への形質転換が可能である (Abe et al. 2011)。

## 2. 研究の目的

以上のような背景を踏まえ、以下の 2 点を目的とした研究を立案した。

- (1) ヒメミカツキモのゲノム・トランスクリプトーム情報をもとに、シャジクモ藻類からコケ植物への多様化に影響を及ぼした転写制御因子ファミリーを推定する。
- (2) 「有性生殖機構」あるいは「多細胞体制」への関与が予想される転写制御因子について、ヒメミカツキモにおける機能を特定する。

## 3. 研究の方法

- (1) ヒメミカツキモ概要ゲノム配列 (+型; 325Mbp, -型; 340Mbp) と EST 配列および RNA-seq contigs に対し、植物転写因子ファミリーを特徴付ける様々なドメイン配列 (DNA 結合配列など) を植物転写因子データベース「PlantTFDB (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn>)」より網羅的に抽出し相同性検索を行った。得られた配列のタンパク質コード領域を EST 配列等の情報をもとに精査し、紅藻・緑藻・陸上植物を含む計 20 種類の転写因子ファミリーと比較した。
- (2) ヒメミカツキモ RNA-seq contigs の情報より接合型特異的な発現を示す転写因子を検索し、ゲノム上での接合型特異性を各接合型概要ゲノム情報より確認した。その後、両接合型細胞およびその子孫株から回収したゲノム DNA を鋳型として PCR により接合型特異性を決定した。内在性 *HSP70* 遺伝子のプロモーターの下流に該当遺伝子のコード領域を連結したコンストラクトを作製し、パーティクルガン

(IDERA-III; タナカ製)を用いてヒメミカヅキモへ形質転換して表現型を精査した。

#### 4. 研究成果

(1) ヒメミカヅキモ概要ゲノム配列と EST 配列および RNA-seq contigs に対する転写因子ファミリーのスクリーニングにより 70 種類の転写因子ファミリーが検出された。いっぽう、緑藻類(Chlorophyta)およびコケ植物に対する同様の解析からは、それぞれ 55 種類、75 種類の転写因子ファミリーが検出されており、緑藻類には確認されずコケ植物で認められる転写因子ファミリーのうち実に 75%が単細胞藻類であるヒメミカヅキモで既に存在している事が示された。これらの中には、NAC、TCP、GRAS、ARF、AUX/IAA、EIL などの転写制御/転写調節因子ファミリーが含まれており、シャジクモ藻類からコケ植物への進化段階で、形態形成や植物ホルモンシグナル伝達などに関わると予想される転写制御因子の急激な多様化が生じている事が示された。

(2) 接合型特異的な発現を示すヒメミカヅキモ RNA-seq contigs の中から-型細胞特異的に発現する転写因子を見出した。この転写因子の接合型特異性を概要ゲノム情報とゲノミック PCR 法を用いて調べた結果、本遺伝子は+型細胞のゲノムには存在せず、-型細胞のゲノムのみが存在する接合型特異的遺伝子であることが明らかとなった。また、連鎖解析の結果より-型細胞の表現型と連鎖している事も示され、*CpMinus1* と名付けた。*CpMinus1* 遺伝子を *HSP70* 遺伝子プロモーターの下流で強制発現させるコンストラクトを作製し、+型細胞へ遺伝子導入したところ、本来は+型細胞であるにもかかわらず、多くの細胞で-型細胞に特徴的な現象である「単独で

のプロトプラスト放出」が確認され、かつ一部の細胞は自家接合能力を有した。以上より、*CpMinus1* 遺伝子産物は-型細胞の性質を発揮させる能力を持っており、ヒメミカヅキモの有性生殖関連遺伝子の発現を統合する性決定遺伝子の候補の1つとしてヒメミカヅキモの有性生殖を制御している事が示された。

#### 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5件)

1. Hirano, N., Marukawa, Y., Abe, J., Hashiba, S., Ichikawa, M., Tanabe, Y., Ito, M., Nishii, I., Tsuchikane, Y., and Sekimoto H. 2015 “A receptor-like kinase, related to cell wall sensor of higher plants, is required for sexual reproduction in the unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex”. Plant Cell Physiol. In press. DOI: 10.1093/pcp/pcv065. 査読有
2. Hiraide, R., Kawai-Toyooka, H., Hamaji, T., Matsuzaki, R., Kawafune, K., Abe, J., Sekimoto, H., Umen, J. and Nozaki, H. 2013 “The evolution of male-female sexual dimorphism predates the gender-based divergence of the mating Locus Gene *MAT3/RB*”. Mol. Biol. Evol. 30: 1038-1040. DOI: 10.1093/molbev/mst018. 査読有
3. Hori, S., Sekimoto, H. and Abe, J. 2012 “Properties of cell surface carbohydrates in sexual reproduction of the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Zygnematophyceae,

Charophyta)". *Phycol. Res.* 60: 254-260.  
DOI: 10.1111/j.1440-1835.2012.00656.x.  
査読有

4. Tsuchikane, Y., Tsuchiya, M., Kokubun, Y., Abe, J. and Sekimoto H. 2011  
"Conjugation processes of *Penium margaritaceum* (Zygnemophyceae, Carophyta)". *Phycol. Res.* 59: 74-82.  
DOI: 10.1111/j.1440-1835.2010.00602.x.  
査読有
5. Abe, J., Hori, S., Tsuchikane, Y., Kitao, N., Kato, M. and Sekimoto, H. 2011  
"Stable nuclear transformation of *Closterium preacerosum-strigosum-llitoralle* complex". *Plant Cell Physiol.* 52: 1676-1685. DOI: 10.1093/pcp/pcr103.  
査読有

[学会発表](計 21 件)

1. 阿部淳, 井出曜子, 高木さつき, 今村壮輔, 原山重明 「油脂生産性緑藻 *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株における形質転換と導入遺伝子発現系の開発」 第 9 回日本ゲノム微生物学会 2015 年 3 月 7 日 神戸大学(神戸)
2. 川井絢子, 阿部淳, 鈴木穰, 豊田敦, 藤山秋佐夫, 土金勇樹, 西山智明, 関本弘之 「シャジクモ藻類ヒメミカツキモにおける陸上植物特異的な転写因子の探索と発現解析」 日本植物学会第 78 回大会 2014 年 9 月 13 日 明治大学(川崎)
3. 市原健介, 滝口若菜, 原真由美, 土金勇樹, 阿部淳, 関本弘之 「ヒメミカツキモの性フェロモンと結合するファシクリン I タンパク質の機能解析」 日本植物学会第 78 回大会 2014 年 9 月 12 日 明治大学(川崎)
4. 小宮あゆみ, 阿部淳, 川井絢子, 鈴木穰, 豊田敦, 藤山秋佐夫, 大槻涼, 土金勇樹, 西山智明, 関本弘之 「ヒメミカツキモの型細胞ゲノム特異的遺伝子 *CpMinus1* の機能解析」 日本植物学会第 78 回大会 2014 年 9 月 12 日 明治大学(川崎)
5. 小宮あゆみ, 阿部淳, 川井絢子, 鈴木穰, 豊田敦, 藤山秋佐夫, 大槻涼, 土金勇樹, 西山智明, 関本弘之 ヒメミカツキモの型細胞特異的遺伝子 *CpMinus1* の解析 第 55 回日本植物生理学会年会 2014 年 3 月 18 日 富山大学(富山)
6. Abe, J., Takagi, S., Imamura, S. and Harayama S. "Reporter genes useful in unicellular green alga *Pseudochoricystis ellipsoidea*" International Symposium on Microalgal Biofuels and Bioproducts. 21.Nov.13. Tokyo, Japan
7. 関本弘之, 平野直子, 大槻涼, 川井絢子, 土金勇樹, 西山智明, 阿部淳 「シャジクモ藻類ヒメミカツキモの有性生殖制御」 日本植物学会第 77 回大会 2013 年 9 月 13 日 北海道大学(札幌)
8. 平野直子, 土金勇樹, 丸川祐佳, 阿部淳, 関本弘之 「ヒメミカツキモの有性生殖に関わる受容体型キナーゼ *CpRLK1* の生理機能」 日本植物学会第 77 回大会 2013 年 9 月 13 日 北海道大学(札幌)
9. 阿部淳, 吉満勇也, 高木さつき, 福原いずみ, 藏野憲秀, 今村壮輔, 原山重明 「石油生産藻類 *Pseudochoricystis* における安定した導入遺伝子発現系の開発」 第 7 回日本ゲノム微生物学会 2013 年 3 月 9 日 長浜バイオ大学(滋賀)
10. 平野直子, 橋場彩有里, 土金勇樹, 阿部淳, 関本弘之 「ヒメミカツキモの有性生殖に関わる受容体型タンパク質キナーゼ *CpRLK1* の特性解析」 日本植物学会第 76 回大会 2012 年 9 月 15 日 兵庫県立大学(姫路)

11. 関本弘之, 滝口若菜, 原真由美, 高橋紗也香, 土金勇樹, 阿部淳 「ヒメミカヅキモの性フェロモン PR-IP Inducer 結合分子の特性解析」日本植物学会第 76 回大会 2012 年 9 月 15 日 兵庫県立大学(姫路)
  12. 阿部淳, 関本弘之 藻類の遺伝子操作の現状と課題 単細胞シャジクモ藻類ヒメミカヅキモを例として 日本植物生理学会第 53 回大会(招待講演) 2012 年 3 月 18 日 京都産業大学(京都)
  13. Abe, J., Sakayama, H., Suzuki, Y., Toyoda, A., Tsuchikane, Y., Sekimoto, H. and Nishiyama, T. “*Closterium* and *Chara* genome and transcriptome analyses” Plant and Animal Genome XX Conference 14.Jan.12. San Diego, USA
  14. Abe, J., Hori, S. and Sekimoto H. “Construction of stable transformation system for a unicellular charophycean alga, *Closterium-peracerosum-strigosum-littorale* complex” International Symposium on Algal Biofuels. 17.Nov.11. Tokyo, Japan
  15. Abe, J., Taki, K., Nishiyama, T., Tsuchikane, Y. and Sekimoto H. “Identification and phylogenetic analyses of aquaporins from the unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex” 6th Asian Pasific Phycological Forum 13.Oct.11. Yeosu, Korea
  16. Abe, J., Hori, S. and Sekimoto, H. “Stable transformation system for a unicellular charophycean alga, *Closterium-peracerosum-strigosum-littorale* complex” 6th Asian Pasific Phycological Forum 13.Oct.11. Yeosu, Korea
  17. Hori, S., Abe, J., Sato M. and Sekimoto H. “Effect of lectin on the sexual reproduction of *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex” 6th Asian Pasific Phycological Forum 13.Oct.11. Yeosu, Korea
  18. Hirano, N., Marukawa, Y., Hashiba, S., Tsuchikane, Y., Abe, J. and Sekimoto, H. “Characterization of a novel receptor-like protein kinase, CpRLK1, involved in the sexual reproduction of a unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex” 6th Asian Pasific Phycological Forum 13.Oct.11. Yeosu, Korea
  19. 堀早知恵, 阿部淳, 佐藤眞美子, 関本弘之 「ヒメミカヅキモの接合過程に関与する Con A 標的分子の局在と機能」日本植物学会第 75 回大会 2011 年 9 月 19 日 東京大学(駒場)
  20. 阿部淳, 関本弘之 「単細胞シャジクモ藻ヒメミカヅキモのゲノミクス」日本植物学会第 75 回大会(招待講演) 2011 年 9 月 18 日 東京大学(駒場)
  21. 阿部淳, 瀧薫, 西山智明, 土金勇樹, 関本弘之 「単細胞シャジクモ藻ヒメミカヅキモから見た植物アクアポリンファミリーの進化」日本植物学会第 75 回大会 2011 年 9 月 18 日 東京大学(駒場)
- 〔図書〕(計 1 件)
- Sekimoto, H., Abe J. and Tsuchikane. Y. 2012 New insights into the regulation of sexual reproduction in *Closterium*.

In “International review of cell and  
molecular biology” Jeon, K.W. ed.  
Academic Press Academic Press, vol.  
297: 309-338.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

阿部 淳 (Abe Jun)

中央大学・研究開発機構・機構助教

研究者番号： 10424764