

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440223

研究課題名(和文) 性特異的遺伝子から明らかにする生殖様式の決定機構と進化

研究課題名(英文) Diversity and evolution of conjugation style in the alga

研究代表者

土金 勇樹 (Tsuchikane, Yuki)

日本女子大学・理学部・助教

研究者番号：20434152

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)：ヒメミカツキモには、+型と-型の遺伝的に決定された性を持つヘテロタリック株(以下、ヘテロ株)と、1細胞由来の同一クローン同士で接合子をつくるホモタリック株(以下、ホモ株)が存在する。ヘテロ株では、-型細胞ゲノムのみが存在し、接合型表現を制御するCpMinus1遺伝子が発見されている。ホモ株におけるCpMinus1相同遺伝子の発現抑制形質転換体の表現系観察から、CpMinus1N遺伝子がホモ化及びヘテロ化に関わることを示した。また、ヒメミカツキモにおける種内系統樹とCpMinus1相同遺伝子の解析から、ヘテロ株からホモ株が、複数回独立に進化したことを考察した。

研究成果の概要(英文)：Closterium is a unicellular isogamous charophycean alga. In this alga, two types of zygospore formation exist in natural populations. Some individuals form zygospores within single clones (homothallism), whereas others form zygospores between different clones (heterothallism). Using transcriptomic analyses of the homothallic strain, a homolog of CpMinus1 that is a mt- of the heterothallic strain genome-specific gene encoding a transcription factor was isolated and named CpMinus1N. Homothallic cells with knockdown of CpMinus1N showed reduced competence for sexual reproduction and formed a hybrid zygospore with mt+ cells of the closely related heterothallic strain. We suggest that the CpMinus1N gene regulates the type of zygospore formation. In addition, sequence information of CpMinus1N of various strains were determined by performing genomic analyses. The possibility that the homothallic strain evolved from the mt- cell of the heterothallic strain was considered.

研究分野：植物生理学

キーワード：ミカツキモ 種分化 生殖様式 ホモタリズム ヘテロタリズム 自殖

1. 研究開始当初の背景

生物にはホモタリズムとヘテロタリズムの二つの生殖様式が知られている。クローン細胞間、あるいは同個体内で有性生殖が行なわれる場合をホモタリズムと呼び、自家不稔であり、有性生殖に別の系統が必要な場合をヘテロタリズムと呼んでいる。なぜ生物には多様な生殖様式が存在するのだろうか。どのような分子機構で制御されているのだろうか。このような生殖様式の問題を解決するために、酵母、粘菌、菌類など、多くの生物で研究が行われている(Ruepp et al. 2004 Nucl Acids Res, Bloomfield et al. 2010. Science)。藻類においても、いくつかの分類群で解析が進められてきた。ヒメミカツキモ(*Closterium*

peracerosum-strigosum-littorale complex) はホシミドリ目に属する単細胞藻類である。1形態種の中に、ホモ株とヘテロ株が存在することが知られている。ヘテロ株には2つの、遺伝的に決定された性が存在する。通常は無性分裂を繰り返して増殖するが、ストレス条件下で、2性間の雌雄認識の結果、有性生殖が進行し、接合することが詳細に解析されている(図1a)(Sekimoto, Abe, and Tsuchikane. 2013. Int. Rev. Cell Mol. Biol.)。ホモ株では、接合に適した条件で培養することにより、同調的に細胞が分裂し、その分裂直後の姉妹細胞が高頻度で寄り添い、自殖することで接合子を作る(姉妹接合; 図1b)(Tsuchikane et al. 2010. Journal of Phycology)。先行研究から、1)ホモ株は接合する直前に必ず細胞分裂を行なう。2)ホモ株には分子系統学的に極めて近縁なヘテロ株が複数グループ存在し、この生殖様式は比較的容易に推移しうる可能性が示唆される。更に、3)分裂後のホモ細胞とヘテロ細胞とが接合することから、ホモ株にはヘテロ株における性の状態が存在することが示唆された。以上のことから、細胞分裂を介して、ヘテロタリズムの+型、-型細胞のような状態に分化することで、速やかに姉妹接合することが考えられた(Tsuchikane et al. 2012. Sexual Plant Reproduction)。

一方、+型と-型の遺伝的に決定された性を持つヒメミカツキモのヘテロ株を用いて、概要ゲノム解析およびRNAseq解析が行なわれている。一連の解析を通して、-型細胞ゲノムのみが存在する *CpMinus1* 遺伝子が発見された。この遺伝子は、bZIP型の転写因子をコードしており、親株どうしの掛け合わせにより得られた子孫株の-型にのみ存在し、性表現と完全に連鎖した。さらにこの遺伝子を+型細胞で強制発現したところ、いくつかの特徴的な表現型を示す遺伝子導入株を得ることに成功した。ある遺伝子導入株では、-型細胞のようにふるまい、+型細胞の混合において接合子の形成が促進された。詳細な解析はこれからであるものの、*CpMinus1* 遺伝子がヘテロ株の性表現に影響

を与えており、性の決定に関わることが期待されている。また、別の遺伝子導入株においては、単独培養下、つまりクローン細胞間で接合が観察され、ホモ株のような表現型も観察された。このことから、*CpMinus1* 遺伝子が接合様式の決定にも関わるものと考えている。

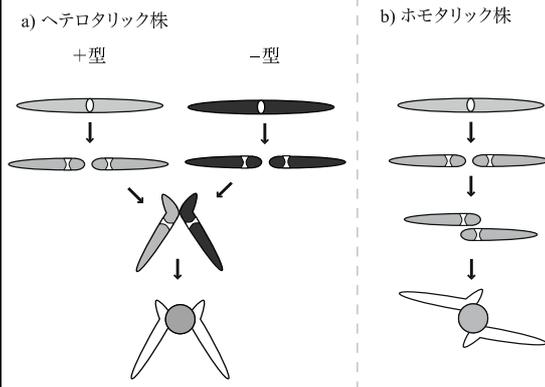


図1. ヒメミカツキモの接合過程。a) ヘテロタリック株の接合過程。二つの性の間で接合子が形成される。b) ホモタリック株における姉妹接合。1細胞由来の姉妹配偶子嚢細胞同士が主に接合する。

2. 研究の目的

ヘテロ株では概要ゲノム解析およびRNAseq解析により、性フェロモンや、受容体型キナーゼなど、接合時に発現する性特異的な遺伝子が同定されている。そこで、1)ホモ株においてもRNAseq解析を行い、このオーソログ遺伝子を単離し、発現解析を行なう。また、ヘテロ株において性表現に影響を与える *CpMinus1* のオーソログを単離し、遺伝子組換え体を作成する。遺伝子組換え体の表現型を、ヘテロ株の接合実験を行うことで、*CpMinus1* がホモ株の性表現に影響をあたえ、生殖様式を変化させるのかを検証する。つまり、ホモ株からヘテロ株を作成できるかを検証する。さらに、3)複数のホモ株とヘテロ株から *CpMinus1* を単離し、系統解析を行なうことで、生殖様式がどのようにして進化してきたの解明を試みる。

3. 研究の方法

ホモ株におけるRNAseq解析; ホモ株における各生活環の細胞からRNAを回収し、RNAseqデータを取得し、de novoアセンブルした。また、RNAseqデータを用いて、生活環を通してその他の性関連遺伝子がどのような挙動を示すのかを明らかにした。

ホモ株からの *CpMinus* オーソログの単離と解析; ホモ株のRNAseqデータを基に、*CpMinus1* オーソログのクローニングを行い、realtime PCRにより、有性生殖期における発現変動を確認した。

ホモ株における遺伝子導入株の作出と評価；ホモ株において、*CpMinus1* オートログの発現を抑えるために、アンチセンス RNA を利用したコンストラクトを遺伝子導入し、生殖様式に対する影響の検出を試みた。発現抑制株では、-型としての分化が出来なくなり、+型のように振る舞うことが期待された。先行研究において、ホモ株は近縁なヘテロ株との混合によりハイブリッド接合子が生じることがわかっており (Tsuchikane et al. 2012, Sexual Plant Reproduction), 生理実験を通して、ホモ株の性表現が固定されるのか、*CpMinus1* 遺伝子により制御されているのかを検証した。

性表現制御遺伝子の分子進化；ヒメミカツキモのホモ株とヘテロ株をフィールドから採集し、系統保存株を確立し、種内系統樹を作成した。また、代表的な系統からゲノムを抽出し、Resequencingを行なった。これらのデータベースから *CpMinus1* オートログを検出し、ホモ株、ヘテロ株に特異的な変異が存在するのか、また、その進化を考察した。

4. 研究成果

ホモ株 (naga37s-1)における、栄養増殖期、有性生殖期、接合子発芽期の細胞を5種のステージに分けて回収し、Total RNA の抽出を行った。

次に、HiSeq2500 による RNA-seq 配列決定(ペア - ドエンド、101-bp)を行った。得られた RNA-seq データベースから、*CpMinus1* 類似配列の発見に成功し、これを *CpMinus1N* 遺伝子とした。ゲノム DNA からのクローニングを行ったところ、*CpMinus1N* 遺伝子は *CpMinus1* と同じ位置に intron を持っていたことから、祖先を同じくする遺伝子であると考察している。

Real time PCR により、*CpMinus1N* 遺伝子の発現解析をおこなったところ、栄養増殖期にはほとんど発現せず、有性生殖期に顕著に発現した。

また、ホモタリク株における遺伝子導入系は確立されていなかったため、条件検討を行った。ボンバードメント法においては金粒子の打ち込み条件や、ハイグロマイシンを用いた薬剤選択の検討を行った。エレテクトロポレーション法においては、電気条件や導入緩衝液の検討を行い、安定した形質転換法を確率した。

CpMinus1N 遺伝子の機能を探るために、この遺伝子を形質転換用ベクター (pSA0104)にアンチセンス方向に挿入したコンストラクトを作出した。ホモタリク株にコンストラクトを導入して、合計7株の形質転換体を確立した。また、*CpMinus1N* 遺伝子の挿入されていない空のベクターをホモタリク株に導入して、合計3株のコントロール形質転換体を確立した。

7株の形質転換体を窒素源欠乏条

件下で単独培養したところ、2株で顕著に接合子形成率の低下が見られた。さらにこれらの株を近縁なヘテロタリク株の+型細胞または-型細胞と掛け合わせたところ、ヘテロタリク株の+型に対して選択的に有性生殖反応を示したことから、形質転換体の性が-型になっていることが示唆された。このことから *CpMinus1N* 遺伝子がホモ化及びヘテロ化に関わることが示された。

新規に採集・確立した株を含む種内系統樹を作成した。するとホモ株とヘテロ株が混在するグループが三つ存在し(図2。グループA, B, C)、ヒメミカツキモにおける自殖化が少なくとも三回、独立に行われたことが示唆された。このような、生殖様式の進化の回数において、詳細が解析されている生物は稀である。また、そのうちの代表的な12系統のホモ株、ヘテロ株ゲノムの Resequencing を行った(ペアードエンド、150bp)、様々な系統の *CpMinus1N* 遺伝子や性関連遺伝子の配列情報を得たところ、ヘテロ株のマイナス型特異的な遺伝子を、少なくともグループAとBのホモ株が保持していたことが明らかとなった。

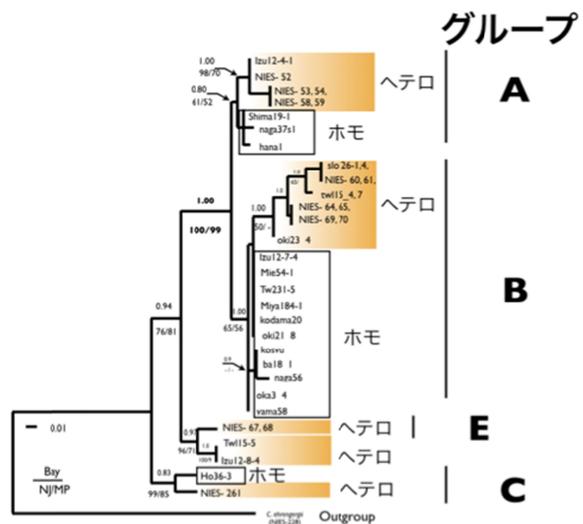


図2. ヒメミカツキモの種内系統樹。ホモ株、ヘテロ株を含むクレードが3つ存在することから、生殖様式の移行は少なくとも3回起きている。

ヘテロ株のマイナス型細胞から、ホモ株が進化した可能性を考察している。また、複数の野生株におけるゲノムデータの比較による、生殖隔離機構の解析、自殖化・他殖化の特徴解析などが可能となった。

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 3件)

1. Jun Abe, Naoko Hirano, Ayumi Komiya, Naho Kanda, Anri Fujiwara, Sachie Hori, Yuki Tsuchikane and Hiroyuki Sekimoto "Preparation of Knockdown Transformants of Unicellular Charophycean Alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* Complex" Bio-protocol. (2016), 6(10). <http://www.bio-protocol.org/e1813> 査読有り
2. Naoko Hirano, Yuka Marukawa, Jun Abe, Sayuri Hashiba, Machiko Ichikawa, Yoichi Tanabe, Motomi Ito, Ichiro Nishii, Yuki Tsuchikane, Hiroyuki Sekimoto* "A Receptor-like Kinase, Related with Cell Wall Sensor of Higher Plants, is required for Sexual Reproduction in the Unicellular Charophycean Alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* Complex" Plant and Cell Physiology. (2015). 査読有り
3. Yuki Tsuchikane, Ayaka Nakai, and Hiroyuki Sekimoto "Detailed analyses on the parthenospore formation in *Closterium moniliferum*(Zygnematophyceae, Charophyta)." Phycologia. (2014). Vol. 53, No. 6, pp. 571-578. 査読有り

〔学会発表〕(計 11件)

招待講演

1. 土金勇樹「自殖するヒメミカツキモの有性生殖と *CpMinus1* 相同遺伝子」日本植物学会第 80 回大会シンポジウム(沖縄コンベンションセンター、宜野湾市)「Sex in water and on land ~ゲノム解析から見えてきた性の多様性と共通性~」2016年9月16-18日
2. 土金勇樹「ヒメミカツキモの種生物学的研究~新規交配群の発見と生殖隔離機構の解析~」第42回つくば藻類・プロティストフォーラム(筑波大学)、2016年6月20日

国際学会

1. Kanda, N., Ichikawa, M., Ono, A., Tsuchikane, Y., Abe, J., Sekimoto, H. Characterization of a sex-specific receptor-like protein, expressing during the conjugation of heterothallic *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. 6th European Phycological Congress. London, 23-28 August 2015.

国内学会

1. 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(神奈川) 2014年9月13日
2. 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(神奈川) 2014年9月13日
3. 土金勇樹・西山智明・関本弘之「接合藻ヒメミカツキモにおけるホモタリズムの進化」日本植物学会第 78 回大会(神奈川) 2014年9月13日
4. 土金勇樹・横山佳菜・鈴木穰・西山智明・関本弘之「ホモタリックなヒメミカツキモにおける *CpMinus1* 相同遺伝子の機能解析」日本藻類学会第 39 回大会(福岡) 2015年3月21日
5. 土金勇樹・渡邊樹梨・加藤万智・鈴木穰・西山智明・関本弘之「接合藻ヒメミカツキモにおける新規交配群 G の発見とトランスクリプトーム解析」日本植物学会 79 回大会(新潟) 2015年9月6日
6. 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「*CpMinus1* 遺伝子はヒメミカツキモの性を決定する」日本植物学会 79 回大会(新潟) 2015年9月6日
7. 土金勇樹・吉田睦未・関本弘之「ヒメミカツキモにおける組換え型性フェロモンを用いた生殖隔離障壁の解析」日本藻類学会第 40 回大会(東京) 2016年3月20日
8. 小林弘佳・加藤万智・関本弘之・土金勇樹「接合藻ヒメミカツキモの性フェロモンによる生殖隔離と生殖干渉」日本植物分類学会第 16 回大会 P02 2017年3月9-12日(京都市) 大会発表賞受賞

〔図書〕(計 3件)

1. 土金勇樹 「ミカツキモの性」iBooks, Apple. 総ページ数 36 (2016)
2. Hiroyuki Sekimoto, Jun Abe, Yuki Tsuchikane "Mechanism of Sexual Reproduction in Fresh Water Microalgae" Reproductive Biology of Plants, CRC press (2014)
3. Sekimoto, H., Tsuchikane, Y., Abe, J. "Sexual reproduction of a unicellular charophycean alga, *Closterium*

“peracerosum-strogosum-littorale complex.” Sexual Reproduction in Animals and Plants, Springer (2014)

〔その他〕

ホームページ等

;

<https://itunes.apple.com/jp/book/id1183243875>

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・助教

研究者番号; 20434152