

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32670

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26650147

研究課題名(和文) ヒメミカヅキモの性決定遺伝子から迫る、ストレプトファイツ植物の性決定

研究課題名(英文) Sex determining mechanism in streptophytes approached by the sex determining gene of *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex

研究代表者

関本 弘之 (Sekimoto, Hiroyuki)

日本女子大学・理学部・教授

研究者番号：20281652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CpMinus1遺伝子の発現レベルを変動させた形質転換体を解析し、この遺伝子がヒメミカヅキモの性決定におけるマスター遺伝子であることを明らかにした。一方、CpMinus1と連鎖する、もう一つの未知性決定遺伝子であるCpMinus2は発見されなかった。さらに、雌雄異株種であるオーストラリアシャジクモを用いた性比較Iso-seq解析を行った結果、CpMinus1と弱い配列類似性を示す2種の遺伝子を見出し、そのうちの1種が雄株特異的に発現する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The CpMinus1 gene is a mt- genome-specific gene from the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (C. psl. complex). We developed the CpMinus1-expressing mt+ transformants. They showed a weak sexual reaction without mating partners, like as the case of homothallic strains, but tended to form zygotes with mt+ strain but not with mt- strain. The gene expression profile was drastically changed to that of wild mt- strains. We also obtained CpMinus1-knockout mutants from mt- background. The gene expression profile was quite similar to that of wild mt+ cells. We concluded that the CpMinus1 gene was a master gene for the sex determination in C. psl. complex. On the other hand, we could not find the CpMinus2 gene, which would be tightly linked to the CpMinus1 in the genome. Through the Iso-seq data of sexual dimorphic *Chara australis*, two gene showing weak similarity to the CpMinus1 was found. One of them expressed only in the male strain, although the expression level was very low.

研究分野：藻類生殖生理学

キーワード：ミカヅキモ 性決定 ゲノム解読 シャジクモ

1. 研究開始当初の背景

+型と-型の遺伝的に決定された性を持つヒメミカヅキモのヘテロ株を用いて、概要ゲノム解析およびRNAseq解析がなされ、豊富な遺伝情報を得られるようになった。その中で、-型細胞ゲノムのみが存在し、親株どうしの掛け合わせにより得られた子孫株の性表現(-型であること)と完全に連鎖する*CpMinus1* 遺伝子を発見した。*CpMinus1* 遺伝子は、bZIP 型の転写因子をコードしており、さらにこの遺伝子を+型細胞で強制発現したところ、多くの細胞が単独でプロトプラスト放出した(-型細胞の特徴)が、一部の細胞はホモ株のように自家接合能力を示した。なお、単独でプロトプラスト放出するためには、+型細胞から放出される性フェロモン(PR-IP)の作用が必要である。この事実は、

CpMinus1 遺伝子産物により-型細胞としての性質が発揮されること、+型細胞としての性質も保持しておりPR-IPが放出されていること、を示唆している。別種のみかヅキモを用いた研究では、+型細胞と-型細胞のゲノムを併せ持つヘテロ2倍体の接合型は-型となることが示されており(Kasai and Ichimura 1990)、+型ゲノム上に+型細胞としての性質を発揮させるための遺伝子が存在しているとは想定しがたい。そのため、-型細胞としての性表現を決定づける*CpMinus1* と、+型細胞としての特徴を抑制する未知遺伝子*CpMinus2* がセットとなり-型細胞のゲノムに存在することで、完全な-型細胞としての特徴を示すと考えられた。

一方で、ヒメミカヅキモには、1細胞由来の同一クローン同士で接合子をつくるホモ株が存在する。ホモ株では、一つの細胞が有性分裂を行うことで生じた、二つの姉妹配偶子嚢細胞同士で接合子を作りやすい(90%以上)ことが判明し、姉妹にヘテロ株に相当する性が生じていると考えられている(Tsuchikane et al. 2012)。ホモ株における性分化の実態についても、*CpMinus1*、*CpMinus2* 遺伝子オルソログの解析をすることで、詳細な情報が得られると期待される。

さらにヒメミカヅキモに留まらず、未だに明らかになっていないストレプトファイツ植物における性決定遺伝子、性決定機構に迫るために、陸上植物に近縁なシャジクモ藻類を中心に*CpMinus1*、*CpMinus2* 遺伝子オルソログを探ることが有効であると考えて、本研究の立案に至った。

2. 研究の目的

本研究では、*CpMinus1* 遺伝子の発現レベルを変動させた形質転換体の状態をRNAseqにより解析することで、性決定に対する貢献を評価すること、もう一つの未知性決定遺伝子である*CpMinus2* を発見することを目的とする。さらに、これらの遺伝子ホモログを、ヒメミカヅキモ以外のシャジクモ藻類他殖系統株における性比較 Iso-seq 解析により見出

し、ストレプトファイツ植物の性決定、性分化の普遍性を検証することも目的とする。

3. 研究の方法

(1) *CpMinus2* 遺伝子同定に向けたゲノム解読
ヒメミカヅキモのヘテロ株については、これまで新学術領域「ゲノム支援」のサポートを受けて、概要ゲノム情報が蓄積しつつある。しかしながら、繰り返し配列も多く、scaffold長、contig長ともまだ十分ではない。そこで、あらたに長い領域をつなぐメイトペアライブラリを作成して、illumina HiSeq2500によりデータを取得して scaffold 長を増やした。さらに PacBio RSII のロングリードデータを取得し、アセンブルに加えて contig 長を増やすことにした。

(2) *CpMinus1* の発現を誘導した+型細胞の作出と評価

CpMinus1 遺伝子を発現させるコンストラクトを作製し、+株にパーティクルガンを用いて導入した。得られた形質転換体について、性表現を確認し、遺伝子発現変動を qRT-PCR および比較トランスクリプトーム解析により評価した。

(3) *CpMinus1* 遺伝子を破壊した-型細胞の作出と評価

CRISPR/Cas9 システムを利用し、*CpMinus1* 遺伝子を破壊するためのコンストラクトを作製し、-株にパーティクルガンを用いて導入した。得られた形質転換体について、性表現を確認し、遺伝子発現変動を qRT-PCR および比較トランスクリプトーム解析により評価した。

(4) オーストラリアシャジクモの Iso-seq 解析

オーストラリアシャジクモの雌雄それぞれの株から RNA を抽出し、Iso-seq 解析を行った。得られた配列の中から、*CpMinus1* のホモログにあたる遺伝子の検出を試みた。

4. 研究成果

(1) *CpMinus2* 遺伝子同定に向けたゲノム解読
多くのペアエンドライブラリー、メイトペアライブラリーを新学術領域「ゲノム支援」のサポートを受けて作製し、HiSeq2500によりデータを取得した。また、PacBio については、P5-C3 ケミストリーに加えて、P6-C4 ケミストリーを用いて、ゲノム解読を行った。しかしながら、ヒメミカヅキモの染色体レベルでの配列重複などの影響もあり、アセンブルが非常に難航した。また Illumina short read data と PacBio データのハイブリッドアセンブラーの開発にも難航した。それを打開するために、10 x genomics の Chromium プラットフォームによる解読も進めたが、リード数が不足して、効率的な scaffolding はできなかった。

そんな中で、PacBio P6-C4 ケミストリーを用いたゲノム解読データを、バージョンアップしたアセンブラーFalcon を用いることにより、プラス株においては、primary contig が N50 416 kb で total 318 Mb、associated contig が N50 60 kb で total 42 Mb まで改善した。マイナス株の場合も、primary contig が N50 319 kb で total 302 Mb、associated contig が N50 58 kb で total 34 Mb まで改善した。そのうえで、子孫株の性表現と Illumina による解析の結果から、マイナス型特異的なゲノム領域は存在するものの、プラス型特異的なゲノム領域は存在しない可能性が高まった。また、*CpMinus1* を含む contig 自身は、あまり長く伸びてはいなかったため、その中から *CpMinus2* の候補配列は得られなかった。

(2) *CpMinus1* の発現を誘導した + 型細胞の作出と評価

CpMinus1 の cDNA を *HSP70* 遺伝子プロモーターの下流で強制発現するようなコンストラクトを + 型細胞に導入することで、あたかも - 型細胞のように振る舞うようになった 1 株を用いて、比較 transcriptome のためのデータを取得したところ、元株である + 型との間に多くの発現変動遺伝子(DEG)が見出された。これらの DEG は、+ 型と - 型の間でも DEG として検出されるものがほとんどであり、遺伝子発現レベルでも、形質転換体の性表現が切り替わったことが示された。さらに、性フェロモン遺伝子、性特異的発現を示すいくつかの遺伝子を標的にして、qRT-PCR 解析を行い、比較 transcriptome 解析結果との一致を確認した。

CpMinus1 の cDNA を用いた場合、完全に性表現が切り替わらない株が含まれていたため、*CpMinus1* 遺伝子を *CpMinus1* native promoter 下流に連結したコンストラクトをあらたに作製し、+ 株にパーティクルガンを用いて導入した。これらの株では、*CpHSP70* promoter にて *CpMinus1* 遺伝子を発現させた場合に比べて、遥かに高い発現上昇が示され、- 型細胞と比べても、その 10 倍近い発現レベルを示した。これらは顕著に - 型化傾向を示したものの、依然として自家生殖能力を示した。これらから、*CpMinus2* 遺伝子、または + 型細胞ゲノムのみが存在し、+ 型細胞で特異的に発現する遺伝子群の発現を正に制御する遺伝子(*CpPlus1*)が存在することが確定的となった。

(3) *CpMinus1* 遺伝子を破壊した - 型細胞の作出と評価

CRISPR/Cas9 システムを利用し、*CpMinus1* 遺伝子を破壊するためのコンストラクトを、- 株にパーティクルガンを用いて導入し、5 株の遺伝子破壊株を得た。その結果、遺伝子を破壊された - 型細胞は、自家接合能を示さず、ほぼ完全に + 型へと性表現をシフトした。しかし、接合時に発現する遺伝子が接合条件で

ないにも関わらずわずかに発現したことから、*CpMinus1* が性表現の決め手となるものの、発現を微調整する *CpMinus2* を破壊しない場合、100.00% 性転換出来ないことがあらためて示唆された。また、遺伝子破壊により + 型へとシフトしたことから、+ 型細胞において、+ 型らしさを発現するために必要な遺伝子(*CpPlus1*)が存在することは、完全に否定された。

(4) オーストラリアシャジクモの Iso-seq 解析

オーストラリアシャジクモの雌雄それぞれの株から RNA を抽出し、Iso-seq 解析を行った。得られた配列の中から、*CpMinus1* のホモログにあたる遺伝子の検出を試みたが、転写因子遺伝子のように発現量が少ないものはほとんど含まれておらず、ホモログと言えるものは、2 種しか見出されなかった。そのうちの 1 種は、雄株のみで発現が見られた。今後、Illumina による RNAseq データを加えて、発現変動を検証することが必要とされた。

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 9 件)

Kanda, N., Ichikawa, M., Ono, A., Toyoda, A., Fujiyama, A., Abe, J., Tsuchikane, Y., Nishiyama, T., Sekimoto, H. (2017) CRISPR/Cas9-based knockouts reveal that *CpRLP1* is a negative regulator of the sex pheromone PR-IP in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Sci. Rep.* 7: 17873 (2017). 10.1038/s41598-017-18251-8 (査読有り)

Sekimoto, H. (2017) Sexual reproduction and sex determination in green algae, *Journal of Plant Research* 130: 423-431. 10.1007/s10265-017-0908-6 (査読有り)

Abe, J., Hori, S., Sato, M., Sekimoto, H. (2016) Concanavalin A disrupts the release of fibrous material necessary for zygote formation of a unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Frontiers in Plant Science* 7:1040. 10.3389/fpls.2016.01040 (査読有り)

Abe, J., Hirano, N., Komiya, A., Kanda, N., Fujiwara, A., Hori, S., Tsuchikane, Y., Sekimoto, H. (2016). Preparation of knockdown transformants of unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Bio-protocol* 6(10): e1813.

<http://www.bio-protocol.org/e1813>,
[10.21769/BioProtoc.1813](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1813) (査読有り)

Hirano, N., Marukawa, Y., Abe, J., Hashiba, S., Ichikawa, M., Tanabe, Y., Ito, M., Nishii, I., Tsuchikane, Y., Sekimoto, H. (2015) 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 Cell Physiol.* 56: 1456-1462. 10.1093/pcp/pcv065 (査読有り)

[学会発表] (計 45 件)

Sekimoto, H. “New insights into the sexual reproduction in unicellular zygnematophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex” The 65th NIBB Conference Marchantia Workshop 2017 “Renaissance of *Marchantia polymorpha* – the genome and beyond”, Okazaki, Aichi, December 17, 2017.

Sekimoto, H., Kanda, N., Kon, S., Nishiyama, T., Tsuchikane, Y. “Functional analyses of sex specific *receptor-like proteins* in *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex, using CRISPR/CAS9 system” 11th International Phycological Congress, Szczecin, Poland, August 14, 2017.

Kanda, N., Tsuyuki, N., Kon, S., Nishiyama, T., Tsuchikane, Y., Sekimoto, H. “CRISPR/CAS9-induced knockout in unicellular zygnematophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex” 11th International Phycological Congress, Szczecin, Poland, August 14, 2017.

関本弘之「シャジクモ藻類ヒメミカツキモの性決定機構の解析」日本植物学会第80回大会(沖縄・沖縄コンベンションセンター)2016年9月16日

Hiroyuki Sekimoto「Sexual reproduction and sex determination of green algae」第79回日本植物学会(新潟大学)シンポジウム“Fusion” in Fertilization: Interdisciplinary Collaboration among Plant and Animal Scientists, 2015年9月7日

[図書] (計 3 件)

Sekimoto, H., Tsuchikane, Y., Abe, J. (2014) Sexual reproduction of a unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strogosum-littorale* complex. In “Sexual Reproduction in Animals and

Plants”, Sawada, H. et al. eds. Springer. Pp. 345-357.

Sekimoto, H., Abe, J., Tsuchikane, Y. (2014) Mechanism of sexual reproduction in fresh water microalgae. In “Reproductive Biology of Plants”, Ramawat, K.G. ed. CRC press. Pp. 29-56

野崎久義、関本弘之「動植物の受精学」(澤田均 編著)第4章 藻類の有性生殖」化学同人(京都)(2014).60-75 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://mcm-www.jwu.ac.jp/~sekimoto/Site/Home.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

関本 弘之 (SEKIMOTO, Hiroyuki)
日本女子大学・理学部・教授
研究者番号 : 20281652

(2)研究分担者

坂山 英俊 (SAKAYAMA, Hidetoshi)
神戸大学・理学研究科・准教授
研究者番号 : 60391108

(3)連携研究者

西山 智明 (NISHIYAMA, Tomoaki)
金沢大学・学際科学実験センター・助教
研究者番号 : 50390688

土金 勇樹 (TSUCHIKANE, Yuki)
日本女子大学・理学部・助教

研究者番号： 20434152

阿部 淳 (ABE, Jun)
日本女子大学・理学部・学術研究員
研究者番号： 10424764

(4)研究協力者

川井 絢子 (KAWAI, Junko)
日本女子大学・理学部・学術研究員
研究者番号： 30727673

小宮 あゆみ (KOMIYA, Ayumi)
日本女子大学・理学研究科・大学院生
研究者番号：

藤原 安理 (FUJIWARA, Anri)
日本女子大学・理学研究科・大学院生
研究者番号：

神田 奈保 (KANDA, Naho)
日本女子大学・理学研究科・大学院生
研究者番号：

露木 奈津美 (TSUYUKI, Natsumi)
日本女子大学・理学研究科・大学院生
研究者番号：