

論文の内容の要旨

論文題目：Physiological and molecular biological analyses of sex pheromones in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex.

(ミカツキモにおける性フェロモンの生理学的、分子生物学的解析)

氏名： 土金 勇樹

本論文は、ミカツキモ *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* (*C. psl.*) complex における性フェロモンの新規機能と作用機構、更にはその性フェロモンによる生殖隔離機構について解析したものである。

単細胞接合藻ミカツキモ *C. psl.* complex には、+型、-型と呼ばれる接合型(性)を持つヘテロタリック株が存在しており、実験室内で同調的に配偶子を形成させ、接合子を形成させる事が可能である。ミカツキモの有性生殖過程(図1)では、まずA)両細胞を混合する事で、B)多糖性の粘液を放出し合い、次にC)有性分裂(**Sexual Cell Division: SCD**)と呼ばれる特殊な分裂を行い、性的能力を保持する配偶子嚢細胞へ分化する。続いてD)相補的な配偶子嚢細胞同士のペア形成、E)それぞれの細胞からのプロトプラスト放出、F)最終的にプロトプラストの融合が行われ、接合子が形成される。*C. psl.* complex においては、**+型細胞から放出され、-型細胞のプロトプラスト放出を誘導する PR-IP**と、**-型細胞から放出され、+型細胞の PR-IP 産生を誘導する PR-IP Inducer**の二種の糖タンパク質性の性フェロモンが単離されており、性フェロモンが有性生殖の進行に深く関与することが明らかにされていた。

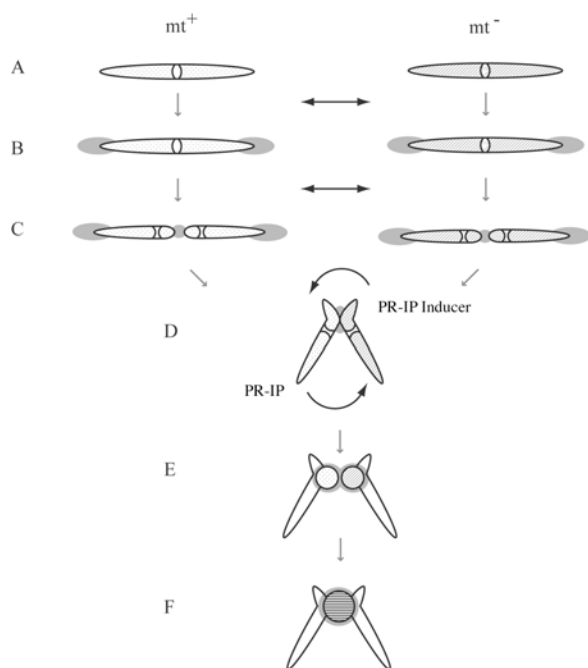


図 1. ミカツキモにおける有性生殖過程のモデル図。灰色の円:多糖性の粘液。黒色の矢印:性フェロモンによる情報交換

表. 交配群間における PR-IP Inducer のアミノ酸配列の相同性 (%)

	A	B	Homo	D
A	-	95.1	90.3	70.4
B		-	89.5	68.3
Homo			-	67.1

アルファベットはそれぞれの交配群名を示し、Homo はホモタリック株を示す。

Part I. ミカツキモ (*Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex) における有性分裂誘導フェロモンの発見

有性生殖の初期過程に起こる SCD に関しては、性フェロモンの存在が示唆されているものの、それまでに生化学的な研究は行われておらず、フェロモンの実体は全く不明であった。Part I では、両接合型細胞を混合し性フェロモンの放出を誘導した培地中から、**-型細胞が放出し、+型の有性分裂を誘導する因子と、+型細胞が放出し、-型の有性分裂を誘導する因子**、の存在を確認することに成功し、それぞれを SCD-IP-minus, SCD-IP-plus と名付けた。更に、生理学的、生化学的な特徴解析を行なったところ、両フェロモンの放出や作用の条件に光が必要であること、また、ゲル濾過カラムによる推定分子サイズの測定により、SCD-IP-minus は 90-100 kDa、SCD-IP-plus は 10-20 kDa であることが明らかとなった。

これらの性質は、すでに単離、同定された性フェロモンのものと極めて高い類似性を示したことから、**-型細胞から放出される SCD-IP-minus と PR-IP Inducer が、また+型細胞から放出される SCD-IP-plus と PR-IP が同一の物質である可能性が示唆された。**

Part II. ミカツキモの性フェロモン (PR-IP Inducer) が保持する二種の生理活性の発見

SCD-IP-minus と PR-IP Inducer が同一の物質であることを証明するために、酵母を用いて組

換え型 PR-IP Inducer を産生し、その SCD 誘導活性を測定した。+型細胞に組換え型 PR-IP Inducer を投与し PR-IP 産生および SCD 誘導活性を測定したところ、組換え型 PR-IP Inducer は、PR-IP 産生誘導活性のみならず、SCD 誘導活性をも保持していることが示された。更に、組換え型 PR-IP Inducer の処理時間や、両活性の濃度に対する反応性を比較したところ、SCD 誘導活性は低濃度、短時間の組換え型 PR-IP Inducer の処理で観察された。以上の結果から、**有性生殖過程において PR-IP Inducer が SCD-IP-minus としても機能することが強く示唆された。また、PR-IP Inducer は 2 つの異なる生理機能を持つものの、両者は濃度、作用時間により活性が異なることが示唆された。**

これまで、有性生殖の各段階で機能する性フェロモンが、個別に存在するものと考えられていた。Part II では、PR-IP Inducer という 1 つの性フェロモンが少なくとも 2 つの生理活性を担い、有性生殖を制御することを初めて明らかにした。(なお、共同研究による後の研究の結果、精製 PR-IP が SCD-IP-plus としての活性をもつことも示されている。 Akatsuka et al. 2005 *Phycol. Res.* In press)

Part III. ミカヅキモの交配群における性フェロモンの単離と系統学的解析

ヘテロタリックの *C. psil.* complex では生殖的に隔離された交配群 (mating group) の存在が報告されている。交配群内の +型細胞と -型細胞は常に安定した割合で接合子を形成するが、生殖的に隔離されている交配群 (Group D) は他の交配群の細胞と接合を試みても有性生殖が観察されない。また、生殖的な隔離が不完全に行なわれている交配群 (Group A、Group B)の間では有性生殖が観察され、若干の接合子が形成される。交配群間の生殖隔離は、その相互認識が失われることが主要因であると推定されていたが、相互認識に関わる情報交換物質の特定も含め、生理学的、分子生物学的な解析は行なわれていなかった。一方、*C. psil.* complex にはクローン細胞同士で接合が観察されるホモタリック株の存在が知られている。しかしながら、ヘテロタリックな株との系統関係、性フェロモンの存在やその機能に関しては未だに明らかになってはいない。

各交配群の系統関係を明らかにするために、SSU rDNA における 1506 group I イントロンを各交配群から単離し、系統樹の推定を試みたところ、Group A と Group B は近い関係にあり、**完全な隔離の観察される Group D との関係は遠いものであることが判明した。**また、ホモタリック株を新たにフィールドから回収し、系統関係を推定したところ、ヘテロタリックである Group B との関係が近いことが明らかとなった。次に、それぞれの交配群の性フェロモンが他の交配群に作用するかどうかを明らかにするため、交配群ごとに接合を誘起し、その培地中に含まれる SCD 誘導活性を測定した。完全な隔離が行なわれている Group D の培地中には Group A および Group B に対する SCD 誘導活性は観察されなかった。しかし、不完全な隔離が行なわれている Group A の培地中には Group B に対する活性が、また、Group B の培地中には Group A に対する部分的な活性が存在しており、**交配実験から得られる生殖隔離の程度は、性フェロモンの活性と相関する事が明らかとなった。**実際、それぞれの交配群における PR-IP Inducer 遺伝子の単離を行ない、配列を比較したところ、Group A と Group B の

間で高い相同性(95.1%)が得られた(表1)。また、それらと比較して Group D の相同性(70.4 - 68.3%)は低いものであった。この様に、ヘテロタリックな交配群においては、生殖隔離の程度、系統関係、SCD 誘導活性、PR-IP Inducer の相同性に高い相関が見いだされた。一方、ホモタリック株では、ヘテロタリック株(Group B)に近縁であるにも関わらず、その培養培地中には他の交配群に対する SCD 誘導活性は観察されなかった。更にその PR-IP Inducer 遺伝子においては Group B のものとの間に 89.5% の相同性が見られ、この 10% 程度の違いが活性の有無に重要であると考えられた。

以上の結果から、生殖隔離を誘起する原因因子の一つが、性フェロモンであることが示唆された。また、ホモタリック株および Group D の PR-IP Inducer における特有のアミノ酸変異が活性の有無に重要であり、このような変異は地理的な隔離、ホモタリック化など、何らかの要因でそれぞれの交配群間の遺伝子交流が失われた事によるものと考えられた。

陸上植物や藻類において、性フェロモンが有性生殖過程を制御している例が幾つか知られている。その様式は種によって異なるものの、相補的性を示す 2 個の配偶子細胞間の活性物質を介した情報交換、相互確認とそれに基づく両細胞の融合(受精)という点で共通した現象である。しかしながら、その解明は有性生殖の機構ばかりか活性物質の特定においても立ち後れている。本論文は単細胞接合藻ミカツキモ *C. psil complex* の、有性生殖における、性フェロモンの重要性や生殖隔離との関係性を明らかにしたものであり、今後、植物の有性生殖や生殖隔離、さらには種分化機構を包括的に理解する上で一つのモデルとなるものと考えられる。