

論文内容の要旨

論文題目 Studies on the sexual reproduction process in *Ulva compressa* focused on organelle genetics オルガネラ遺伝学を中心としたヒラアオノリの有性生殖過程に関する研究

氏名 加賀美 弥生

序論

Correns (1909) と Baur (1909) が高等植物での非メンデル遺伝を記載して以来、多くの植物種で葉緑体 DNA (cpDNA) の母性あるいは両性遺伝が報告されてきた。生殖様式には、同形配偶、異形配偶、卵生殖があり、同形配偶が最も原始的で、卵生殖が最も進んだタイプとみなされている。同形配偶の緑藻クラミドモナスでは、cpDNA は交配型プラス (mt^+) 親から遺伝し (Sager and Lane 1972)、接合子の形成後に交配型マイナス (mt^-) 親に由来する葉緑体核様体が選択的に消失することが示されている (Kuroiwa et al. 1982)。一方で、異形配偶の緑藻ハネモヤツユノイト、卵生殖のシャジクモでは、配偶子形成過程で雄性配偶子の葉緑体核様体が消失し、母性遺伝となる (Kuroiwa et al. 1991, Lee et al. 2002, Sun et al. 1988)。このことから、生殖様式が同形から異形へと進化する過程で、次世代へ cpDNA を伝える側の交配型と異形配偶での雌性配偶子に相関があることが示唆される。しかし、緑藻において交配型と cpDNA の遺伝との連鎖が確かめられている種は、いくつかのクラミドモナス属と *Volvox carteri* のみである。

ヒラアオノリはアオサ属 (*Ulva*) の緑藻で、シオグサ型の同形世代交代をする (図 1)。有性生殖には、相補的交配型の+と-株の混合が必要であり、ヘテロタリックである。アオサ属の有性生殖様式は同形配偶性だが、種によっては異形配偶化の傾向があることが知られており、同形配偶から異形配偶への中段階にいと考えられる。

本研究では、ヒラアオノリ *Ulva compressa* のゲノムサイズを定量するとともに、雌雄生殖細胞分化と cpDNA 遺伝の関係を明らかにしたいと考えた。

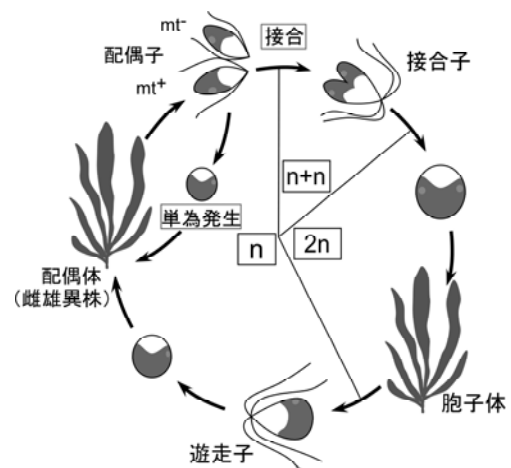


図 1 ヒラアオノリの生活環

結果と考察

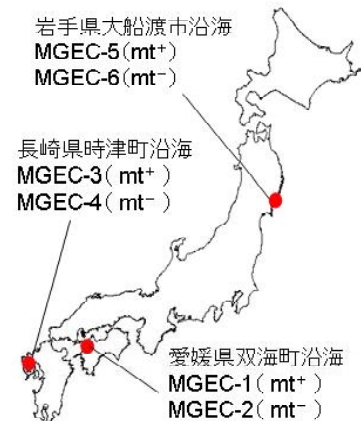
1. レーザースキャニングサイトメトリーによるゲノムサイズの定量

ヒラアオノリのゲノムサイズを定量するため、簡便かつ信頼性の高い手法としてレーザースキャニングサイトメーター法を用いた。愛媛系統 MGEC-1 配偶子の核をヨウ化プロピジウムで染色し、蛍光量を測定した。ゲノムサイズ既知の酵母 ($1C = 13.4 \text{ Mbp}$)、シロイヌナズナ ($1C = 157$

Mbp) と比較し、そのゲノムサイズを算定した結果 135 ± 7 Mbp であった。この値はアオサ属のなかで最も小さく、DNA レベルでの解析にも有用な材料であると考えられる。

2. 配偶子の雌雄性

本研究で調べたヒラアオノリの配偶体 3 系統 6 株の由来を図 2 に示す。交配型は長崎大学藻類学研究室で、次のようにして決定された。採集したヒラアオノリが放出した遊走細胞を単離して培養し、葉状体から放出された配偶子を光学顕微鏡下で混ぜ合わせ、接合の有無によって 2 つの性を区別する。このとき、愛媛系統の MGEC-1 の配偶子の交配型をプラス (mt^+)、MGEC-2 をマイナス (mt^-) と定めた。以降、この二株の配偶子と混ぜ合わせるとき、MGEC-1 と接合する配偶子の交配型が mt^- 、MGEC-2 と接合する交配型が mt^+ となる。長崎系統は MGEC-3 が mt^+ 、MGEC-4 が mt^- 、岩手系統は MGEC-5 が mt^+ 、MGEC-6 が mt^- と決定された。



配偶子の鞭毛基部から細胞後方までの長さを長軸、最大幅を短軸として大きさを測定した。体積を近似したところ 3 系統 6 株の細胞体積の大きさは以下の順となった。

株名	MGEC-6	>	MGEC-1	>	MGEC-5	>	MGEC-3	>	MGEC-4	>	MGEC-2
体積	$19.8 \mu m^3$	>	$18.6 \mu m^3$	>	$17.0 \mu m^3$	>	$13.5 \mu m^3$	>	$11.2 \mu m^3$	>	$10.1 \mu m^3$
交配型	mt^-	>	mt^+	>	mt^+	>	mt^+	>	mt^-	>	mt^-

上記の表から、ヒラアオノリにおいて、配偶子の大きさの違いによる雄、雌という呼称は、交配型を識別する適切な指標ではないことがわかる。

3. 接合後の葉緑体核様体の挙動

MGEC-1 と MGEC-2 を掛け合わせて、接合子を取り出し、接合直後から 6 時間後まで、1 時間ごとに固定して、DAPI で DNA を染色し、葉緑体核様体の挙動を蛍光顕微鏡で観察した。

接合 2 時間後では 9 割がハート型をしており、すべての接合子で両親由来の葉緑体に核様体が観察された。接合 3 時間後では約 4 割、4 時間後では 6 割、5 時間目以降では 8 割近くの接合子が球状へと変化した。接合 3 時間から 5 時間までは、下記の例外を除き、両親由来の葉緑体が別々に観察されたすべての接合子で、両親由来の葉緑体に核様体の蛍光が観察された。接合子が球状になると両親由来の葉緑体が重なり、核様体の消失が起こっているのかを判断できない個体が増加することから、接合 5 時間目以降の葉緑体核様体の挙動の観察は困難だと考えられた。 mt^- 由来と考えられる葉緑体核様体の蛍光が消失している接合子は接合 3 時間目と 4 時間目に 2 例のみ観察された。また、MGEC-1 × MGEC-6 では、片親の葉緑体核様体が消失している接合子は観察されなかった。そこで、葉緑体 DNA の遺伝様式を、遺伝マーカーを用いて確かめることにした。

4. マイクロサテライトマーカーの単離

ヒラアオノリは、接合に寄与しなかった配偶子が単為発生により葉状体を形成するため、単為発生による個体と、交配による個体を区別する方法が必要となる。そこで、種内での系統関係の解析にも広く用いられているマイクロサテライトマーカーを探索した。

正の走光性によって配偶子を濃縮し、ゲノミック DNA を抽出した後、アガロースゲルからの切り出し用キットで DNA を精製し、共生細菌と多糖を除去した。得られたゲノミック DNA を

図2 本研究で用いた株と由来

制限酵素で切断して、リンカーにつなぎ、(CA)₁₅, (CT)₁₅, (CAG)₁₀, (CAT)₁₀ の4種のプローブを用いた選択的ハイブリダイゼーションによって富マイクロサテライトライブラリを作成した。

コロニーハイブリダイゼーションでのスクリーニングを経て、繰り返し単位が7以上のマイクロサテライトを含む配列を20箇所単離した。このうち9箇所の特異的プライマーによる増幅が見られた。さらに、このうちの4遺伝子座では、2つのマイクロサテライトには含まれた領域が欠失したことによると考えられる、系統間・系統内での多型が見られた。この多型を利用して愛媛・長崎系統と岩手系統を識別する核マーカーを作製した。

5. 葉緑体遺伝マーカーの単離

ヒラアオノリの葉緑体遺伝様式を明らかにするために、cpDNAの多型を用いた葉緑体遺伝マーカーの作製を試みた。全葉緑体ゲノム配列が公開されている種の中で、最も近縁の *Pseudendoclonium akinetum* の遺伝子配置を参照し、*psbE-psaM*, *petD-accD* 遺伝子群に注目した。遺伝子上に縮重プライマーを設計し、PCR断片の配列を決定して、各系統間での多型を調べた。

psbE-psaM 遺伝子群では、岩手系統の *psbF-psbL* 遺伝子間領域が、愛媛・長崎系統に比べて24 bp長かった。この24 bpは葉緑体のゲノム再編にかかわるとされるSDR (Short dispersed repeat) 様の構造をしていた。*petD-accD* 遺伝子群には5箇所の多型があり、そのうち、*clpP* 遺伝子内での同義置換により岩手系統には *StyI* 制限酵素サイトがあった。これらの多型により愛媛・長崎系統と岩手系統の葉緑体遺伝子型がPCRとPCR-RFLPにより識別できる。

6. 遺伝マーカーによる胞子体葉緑体遺伝子型の同定

得られた遺伝マーカーを用いて、cpDNAの最終的な遺伝様式を確かめた。配偶子の交配型にもとづいて、MGEC-1の配偶子 (mt⁺; 愛媛系統) とMGEC-6の配偶子 (mt⁻; 岩手系統) を、MGEC-5の配偶子 (mt⁺; 岩手系統) とMGEC-2の配偶子 (mt⁻; 愛媛系統) を混合した。負の走光性を用いて回収した接合子を培養し、葉状体の一部を切り取ってDNAを抽出した。

核マーカーによる検査の結果 (図3a), MGEC-1 × MGEC-6では44個体中42個体が、MGEC-5 × MGEC-2では50個体中38個体が胞子体であることが確かめられた。MGEC-1 × MGEC-6の子孫の葉緑体遺伝子型を、*psbF-psbL* 遺伝子間領域のPCR解析と、*petD-accD*

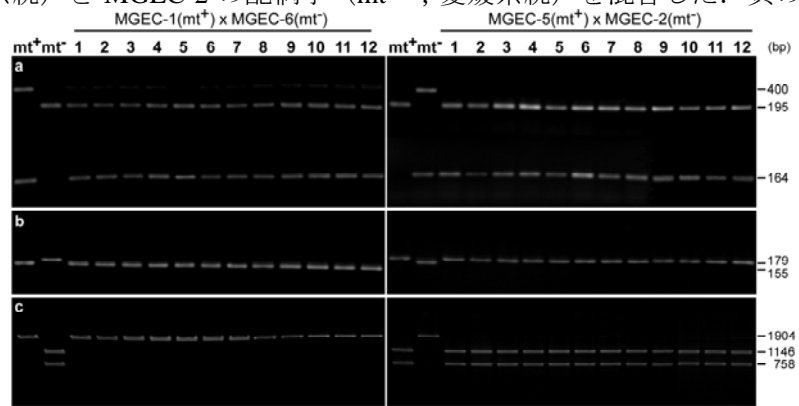


図3 胞子体の遺伝子型の検出。上段に掛け合わせた株名と交配型を示す。左カラムの mt⁺と mt⁻ は親配偶体。(a) 細胞核のマーカー。上段：愛媛・岩手系統共通領域でのPCR。下段：愛媛系統特異的プライマーを用いたPCR。(b) 葉緑体の *psbF-psbL* 遺伝子間領域。(c) 葉緑体の *petD-accD* 遺伝子間領域のPCR-RFLP。

遺伝子間領域のPCR-RFLP解析で調べた。すべての子孫で、mt⁺として用いた愛媛系統と同じバンドパターンを示した (図3b, c左)。MGEC-1 × MGEC-6の相反交雑であるMGEC-5 × MGEC-2でも、子孫の葉緑体遺伝子型はmt⁺として用いた岩手系統と同じパターンを示した (図3b, c右)。本結果をまとめると以下のとおりである。

株名	交配	結果	株名	交配	結果
株名	MGEC-1 × MGEC-6	→ MGEC-1	株名	MGEC-5 × MGEC-2	→ MGEC-5
体積	18.6 μ m ³ < 19.8 μ m ³	→ small	体積	17.0 μ m ³ > 10.1 μ m ³	→ large
交配型	mt ⁺ × mt ⁻	→ mt ⁺	交配型	mt ⁺ × mt ⁻	→ mt ⁺

このことから、cpDNA は片方の親から受け継がれ、それは配偶子の大きさではなく交配型に依存することが明らかになった。cpDNA の遺伝は交配型を決定付ける要素であり、本研究では、*Chlamydomonas reinhardtii* での定義に従って、ヒラアオノリの交配型を、 mt^+ が「葉緑体 DNA を子孫へ伝える側」、 mt^- が「伝えない側」と定義した。また、光学顕微鏡による接合子の観察結果と、遺伝マーカーの結果を合わせると、片親側の葉緑体核様体の蛍光が消失していた接合子では、*C. reinhardtii* 同様に、 mt^- 親の葉緑体核様体が接合子の中で能動的に消化されていたと考えられる。

結論

本研究では、ヒラアオノリのオルガネラ遺伝を中心に、以下のことを明らかにした。

- 1) ヒラアオノリのゲノムサイズは 135 Mbp でアオサ属の中では最小である。
- 2) マイクロサテライトライブラリから、9 個のマイクロサテライト遺伝子座を単離した。そのうち、系統間で2つのマイクロサテライト間の配列が欠失している遺伝子座があった。
- 3) 葉緑体遺伝子群の解析から、PCR と PCR-RFLP によって遺伝子型を区別できる 2 箇所の葉緑体遺伝マーカーを作製した。
- 4) 接合の有無によって区別される遺伝的な交配型と、cpDNA が遺伝する側の交配型は連鎖していた。したがって、cpDNA の遺伝様式により交配型を定義づけることができる。本研究では、 mt^+ を「cpDNA を子孫へ伝える側」、 mt^- を「伝えない側」と定義した。
- 5) 配偶子の異形化の傾向と交配型との対応関係は、愛媛系統で mt^+ 配偶子がやや大きい傾向が見られたが、岩手系統ではそのような傾向は見られなかった。

配偶子の異形化の方向性と、交配型との対応関係は、現段階では結論付けられない。今後多くの系統や、配偶子の異形化が見られる近縁のアオサ属等で検証していく必要がある。

発表論文

- 1) Kagami, Y., Fujishita, M., Matsuyama-Serisawa, K., Yamamoto, M., Kuwano, K., Saga, N. and Kawano, S. (2005) The DNA content of *Ulva compressa* (Ulvales, Chlorophyta) nuclei determined with laser scanning cytometry. *Phycol. Res.* 53; 77-83.
- 2) Kagami, Y., Arai, T., Mogi, Y., Kuwano, K. and Kawano, S. (2007) Development of microsatellite markers in the green algae *Ulva compressa* (Chlorophyta). *Mol. Ecol. Notes* submitted.
- 3) Kagami, Y., Mogi, Y., Arai, T., Yamamoto, M., Kuwano, K. and Kawano, S. (2007) Sexuality and uniparental inheritance of chloroplast DNA in the isogamous green alga *Ulva compressa* (Ulvophyceae). *J. Phycol.* submitted.