

藻類学最前線



西井一郎：ボルボックスの分子生物学 —最近の進展—

ボルボックス (*Volvox carteri*) は生殖細胞 (gonidium) と体細胞の2種類の細胞種のみからなり、その生活環において細胞分化やダイナミックな形態形成運動、性フェロモンによって誘導される卵と精子による有性生殖などが見られ、発生現象のモデルとして魅力ある生物である。分子遺伝学の進んだモデル生物であるクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) と近縁であることから、近年、クラミドモナスで培われたものをはじめとした分子生物学的な手法がボルボックスにも応用されている。さらに、ゲノムのドラフト配列も公開されたことから、ボルボックスの発生現象の分子レベルの研究や近縁種との系統進化関係に注目した研究が報告されつつある。本稿では、昨年10月に行われたボルボックスシンポジウムでの内容も踏まえ、最近のボルボックスの研究の進展に重要であるトランスポゾンを用いた突然変異体の解析とゲノム配列を利用した研究に関して紹介する。

ボルボックスは、2本の鞭毛を持つ小さな体細胞 (2000–4000 個) によって構成されており、その球の内部には鞭毛を持たない大きな栄養生殖細胞 (gonidia, 約16 個) が含まれている (図1A)。ボルボックスの無性生殖過程における生活環を図1Cに示した。生殖細胞は親の中で分裂を繰り返して、親と同じ細胞数を持つ胚となる。ただしこの時点では予定生殖細胞は外側に突出しており、次にインバージョンと呼ばれる形態形成運動を経て内側に取り込まれ、親と同じ形態をとるに至る。さらに親の中で成長を続けたのち (図1B)、親を破って孵化し、次世代に移る。ボルボックスは16時間明期/8時間暗期を繰り返すことにより同調的に培養することができるため、研究を行いやすい。

トランスポゾンによる突然変異体を用いた解析

ボルボックスはおよそ300年前にレーウェンフックによる顕微鏡観察が報告されて以来、現在までに19種が知られている。世界的に最も研究が進んでいる種は *Volvox carteri* であり、1960年代に兵庫県で故 R. C. Starr 博士が採集した株が広く用いられている (Starr 1968)。

数あるボルボックスの種から、Starr 博士が日本の株 (雌雄ペア) を選んだ理由は、この株を培養中に自然発生的な突然変異体を多く見つけることができたからだという。図1に変異体の例を2つ示した (図1D: *Reg*, 図1E: *Inv*)。野生型では、ボルボックスの生殖細胞は、胚の分裂期において非対称分裂によって形成される16個の大きな細胞に由来し、それが急速に成長することによって生殖細胞へと分化する。一方、残りの小さな細胞はあまり成長せずに体細胞として一生を終

える。図1Dの *Reg* 表現型では、小さいはずの体細胞が成長し、野生型の体細胞よりもはるかに大きくなっている (図1AとDを比較)。これら *Reg* の生殖細胞へと再分化した体細胞は、本来の生殖細胞よりは小さいながらも次世代をつくることができる。図1Eの *Inv* 表現型は形態形成に異常がある。野生型では、胚の分裂が終わった後に起こる形態形成運動 (インバージョン) によって、表裏が逆転し生殖細胞が外側から内側へと取り込まれるのであるが、それが途中で止まってしまったため、上の部分が開いたチューリップの花弁のような形の成体になっている。ここに挙げた以外にも、分裂や形態などに様々な異常を持つ変異体が単離され (表1)、交配に基づいた遺伝学的な解析が行われた (Sessoms & Huskey 1973, Kirk 1998)。このような突然変異体の存在はボルボックスを研究する上で非常に興味深い。古典的な遺伝学によって遺伝子まで同定するに至った例は、残念ながら未だない。

ボルボックスの突然変異体の原因遺伝子の同定はトランスポゾン・タギングによって行われている。*Jordan* と名付けられたカット&ペーストで転移する1.6 kbのDNA typeのトランスポゾンは、常温の培養温度 (32°C) 下では転移しないが、低温 (24°C) で培養することにより転移が誘導される (Miller *et al.* 1993)。すなわち、低温培養下において変異体を見つけることができれば、*Jordan* の挿入によって得られた変異体である可能性がある。また、*Jordan* は再転移の際に、3塩基 (もしくはその倍数) の挿入領域重複を引き起こすが、これはアミノ酸配列の読み枠を変えないことから、*Jordan* が抜け出した株は野生型に復帰しやすい。したがって、得られた変異体が常温の培養温度では安定した形質を示すが、低温で培養した時に野生型に復帰する株 (リバータント) が得られやすければ、その変異体は *Jordan* のようなトランスポゾンによる可能性が高い。*Jordan* の配列をプローブとして、ゲノムDNAをサザンブロット解析し、変異体のみに見つかるバンドを探すことにより、*Jordan* が挿入された遺伝子を同定することができる。表1で示した3つの変異体の原因遺伝子 *regA*, *glsA*, *invA* は *Jordan* の挿入によって得られた突然変異体から同定された (Kirk *et al.* 1999, Miller & Kirk 1999, Nishii *et al.* 2003)。

RegA 変異体では体細胞が生殖細胞に再分化することから、野生型において *regA* は体細胞が生殖細胞化するのを抑える働きを持つ遺伝子発現の制御因子であると考えられている (Kirk *et al.* 1999, Stark *et al.* 2001)。*regA* によって葉緑体の生合成に関わる遺伝子の発現が抑えられており、体細胞は光合成能を抑えられることで生殖細胞化しないように制御されていると考えられる (Meissner *et al.* 1999)。

GlsA 変異体では、予定生殖細胞を作る第6分裂時 (32細胞)

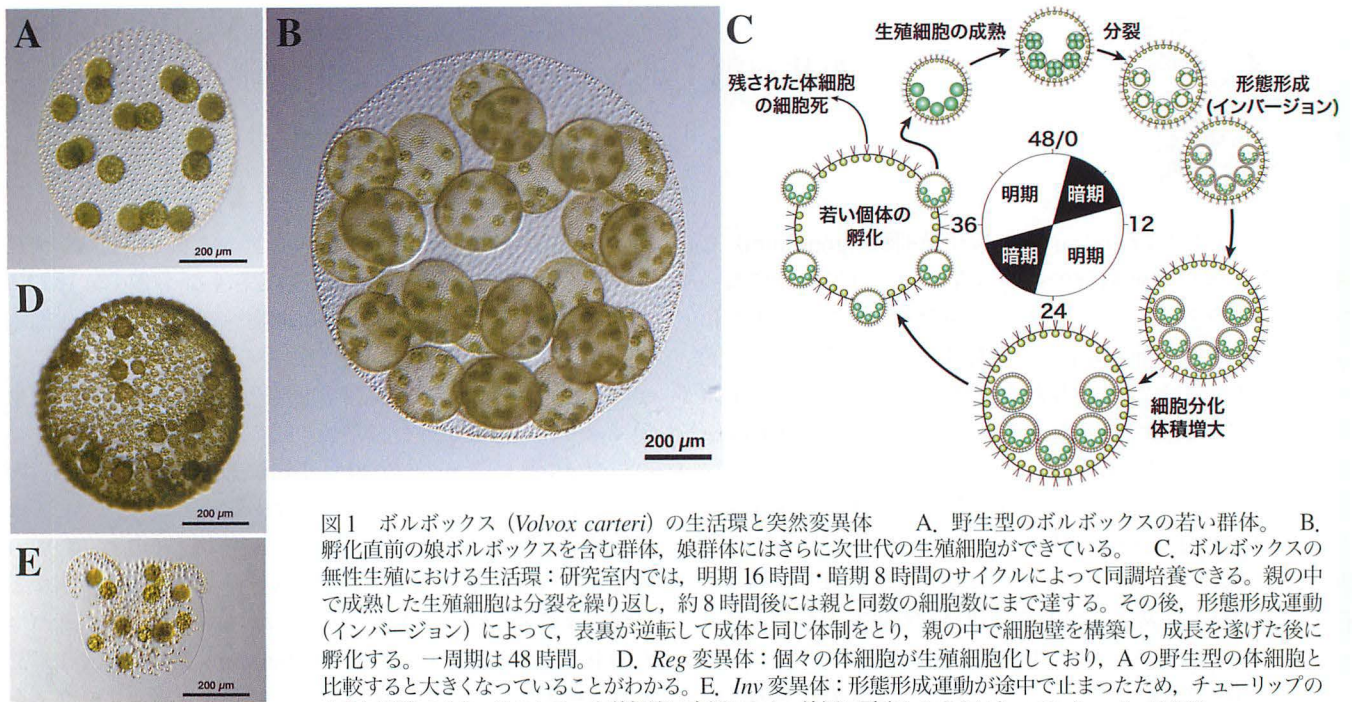


図1 ボルボックス (*Volvox carteri*) の生活環と突然変異体 A. 野生型のボルボックスの若い群体。 B. 孵化直前の娘ボルボックスを含む群体、娘群体にはさらに次世代の生殖細胞ができています。 C. ボルボックスの無性生殖における生活環：研究室では、明期16時間・暗期8時間のサイクルによって同調培養できる。親の中で成熟した生殖細胞は分裂を繰り返し、約8時間後には親と同数の細胞数にまで達する。その後、形態形成運動（インバージョン）によって、表裏が逆転して成体と同じ体制となり、親の中で細胞壁を構築し、成長を遂げた後に孵化する。一周期は48時間。 D. *Reg* 変異体：個々の体細胞が生殖細胞化しており、Aの野生型の体細胞と比較すると大きくなっていることがわかる。 E. *Inv* 変異体：形態形成運動が途中で止まったため、チューリップのような形態である。そのため、生殖細胞は内側になく、外側に露出したままになっている。バーは200 μ m。

胞→64細胞)の上半球16個の細胞での非対称分裂が抑えられているため大きな生殖細胞が形成されない(この場合、致死になるので *Reg* との2重変異体として単離する)。GlsAタンパク質は熱ショックタンパク質のHsp40のホモログであり、Hsp40はHsp70と結合することにより機能することが知られる。32細胞期のボルボックス胚では、GlsAタンパク質

の発現は全ての細胞に見られるが、結合相手として確認されたHsp70Aは非対称分裂する上半球にのみ強い発現が見られる(Cheng *et al.* 2005, 2006)。Hsp70AとGlsAのコンプレックスはヒストンと共に核内でクロマチン近傍に局在が見られることから、上半球で非対称分裂に必須の遺伝子発現の調節に関わっている可能性が示唆されている。

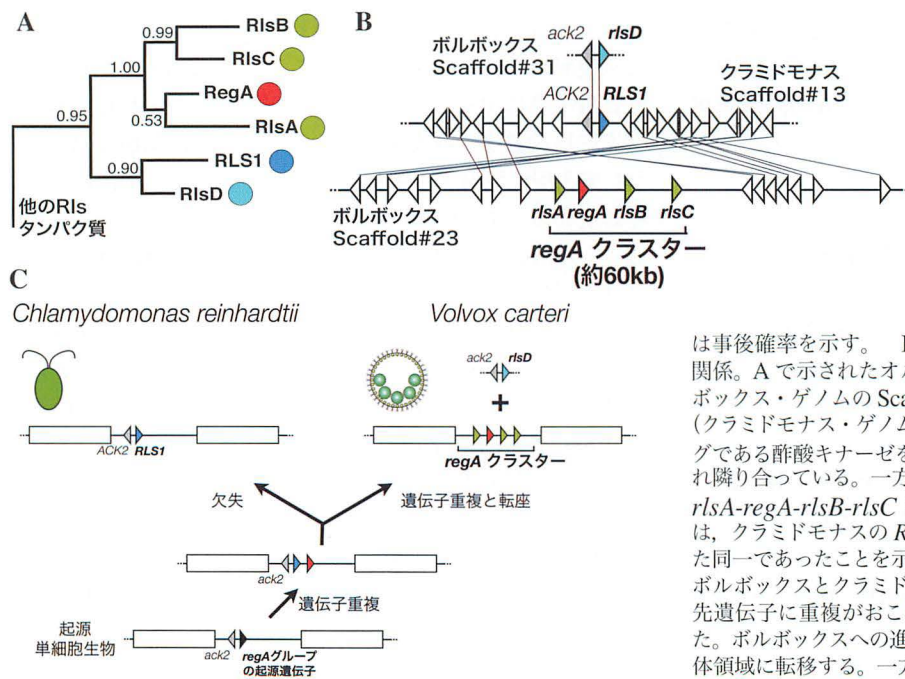


図2 ゲノム配列により明らかになったボルボックスの *regA* 遺伝子の進化過程 A. ボルボックスとクラミドモナスの *RegA* ホモログの系統樹：DNA結合ドメインであるVARL領域(約100アミノ酸残基)を用いてペイズ法で系統樹を作成し、*RegA*を含むクレードのみを示した。ボルボックスでは *RegA* に近いパラログは4個あるが(*RlsA/B/C/D*)、クラミドモナスのホモログは *RLS1* のみである。ボルボックスの *RlsD* はクラミドモナスの *RLS1* とオルソログである。値

は事後確率を示す。 B. *regA* および *rls* 遺伝子のゲノム上での位置関係。Aで示されたオルソログ関係にあるボルボックスの *rlsD* (ボルボックス・ゲノムの Scaffold#31 上にある)とクラミドモナスの *RLS1* (クラミドモナス・ゲノムの Scaffold#13 上にある)は、ともにオルソログである酢酸キナーゼをコードする遺伝子(*ack2*と *ACK2*)とそれぞれ隣り合っている。一方、ボルボックスゲノムの Scaffold#23 上にある *rlsA-regA-rlsB-rlsC* というクラスターの周囲の遺伝子のオルソログは、クラミドモナスの *RLS1* の周囲に存在しており、これらの起源もまた同一であったことを示唆している。 C. *regA* 遺伝子の進化モデル。ボルボックスとクラミドモナスの共通祖先において、*regA* 遺伝子の祖先遺伝子に重複がおこり、*RLS1/rlsD* 及び *regA* の祖先遺伝子が生じた。ボルボックスへの進化に伴い、*rlsD* は近傍の *ack2* と共に別の染色体領域に転移する。一方、*regA* の祖先遺伝子は4つに重複化しその一つが *regA* になった。クラミドモナスでは、*RLS1* は残ったが、ボルボックスで *regA* に進化した祖先遺伝子の方は再び失われて現在に至っていると考えられる。A-Cはいずれも Duncan *et al.* 2007 からの改変。

表1 ボルボックスの変異体

変異体	表現型	関連する遺伝子
<i>Inv</i>	インバージョンが完全または途中で停止	<i>invA*</i> , <i>invB**</i> , <i>invC**</i> , <i>invD**</i> , <i>invE**</i>
<i>Reg</i>	体細胞が再分化し生殖細胞になる	<i>regA*</i>
<i>Gls</i>	不等分裂がおこらず全ての細胞が体細胞化	<i>glsA*</i>
<i>Lag</i>	初期において生殖細胞が体細胞化	未同定
<i>Pcd</i>	細胞分裂が途中で終わり生殖細胞が増加	未同定
<i>Mul</i>	分裂パターンが変わり生殖細胞が増加	未同定
<i>Cle</i>	細胞分裂の異常	未同定
<i>Exp</i>	細胞壁構築が抑えられ矮小化	<i>invB***</i> , <i>invC***</i>
<i>Dis</i>	細胞壁が分解され単細胞化	未同定
<i>Rel</i>	孵化が遅れる, もしくはできない	<i>vheA</i> (Fukada <i>et al.</i> 2006)
<i>Rot</i>	個体の前後軸が逆転する	未同定
<i>Flg</i>	鞭毛がない	未同定
<i>Eye</i>	眼点の位置が異常	未同定
<i>Sex</i>	有性生殖に異常を持つ	<i>vcMid****</i>

変異体名はSessoms & Huskey 1973; Kirk 1998に基づく

**Jordan*によるトランスポゾン・タギングで同定された遺伝子

***Idaten*によるトランスポゾン・タギングで同定された遺伝子 (植木・豊岡・門田・石田・西井, 未発表データ)

****invB*, *invC*は細胞壁を構成する糖鎖の付加に関わっていることが示唆されている (植木・西井, 未発表データ)

*****vcMid*はボルボックスのオス特異的な遺伝子, プレオドリナの*OTOKOGI* 遺伝子 (Nozaki *et al.* 2006) のホモログ (Ferris・野崎・濱地・西井, 未発表データ)

InvA 変異体は, インバージョン中の胚の屈曲部位で見られる細胞の変形と細胞の移動のうち後者のみが阻害されている (Nishii *et al.* 2003)。*InvA* タンパク質は微小管モータータンパク質のキネシンであり, 移動の際の支点となる細胞間を繋ぐ原形質連絡近傍に局在していることから, 直接的に移動を駆動する働きを持つと考えられる。

最近, 私達の研究グループでは, 約 10 kb の長さを持つトランスポゾンを見つけ, *Idaten* と名付けた (植木・西井 未発表データ)。*Idaten* の転移もカット & ペースト型でかつ低温で誘導されることから, *Jordan* と同様の解析法により, 突然変異体の原因遺伝子を同定することができる。現在, *Idaten* の挿入によってインバージョンに異常を引き起こす変異体から原因遺伝子を同定し, 解析を行っている。その中には, シグナル伝達に関わる遺伝子などが含まれており (門田・植木・西井 未発表データ), インバージョンを引き起こす細胞レベルの分子メカニズムが明らかになりつつある。また, 表 1 に示したように, 多くの変異体に関して原因遺伝子がまだ決まっておらず, トランスポゾン・タギングによるさらなる解析が期待される。

ゲノム配列

2007 年 5 月末から, 米国 JGI によってボルボックスのメス株のドラフトゲノムシーケンスが公開されている (<http://genome.jgi-psf.org/Volca1/Volca1.home.html>)。ゲノム全長にほぼ相当する 138 M 塩基対が読まれ, 総遺伝子数は 15,544 個と予測されている。最近, 報告されたクラミドモナスのゲノムは全長 121 M 塩基対, 総遺伝子数は 15,143 個で

あり (Merchant *et al.* 2007), 単細胞生物, 多細胞生物と体制の差はあるが, ゲノムレベルでは顕著な差があるようには見えない。JGI のボルボックスのホームページでは個々の遺伝子のアノテーションがされており, データベースから最も相同な遺伝子が Best hit の項目に挙げられているが, ほとんどの遺伝子がクラミドモナスのホモログとなっており, それらの相同性も非常に高い場合が多い。さらに, ゲノムブラウザでは, ボルボックスとクラミドモナスの両ゲノム配列間で blastn スコアの高い領域がゲノム上に重ね合わせられており, 多くの遺伝子のエキソン領域が保存されていることが一目瞭然となっている。一方, 以下に述べる *regA* 遺伝子のようにクラミドモナスには, オルソログの見つからない遺伝子も存在しており, クラミドモナスとボルボックスの共通祖先であった単細胞生物から多細胞生物への進化を考える上で興味深い。現在, JGI を中心にクラミドモナスのゲノムとの比較解析が進められており, 少ないながらも特徴的な差異が明らかになりそうだ。

クラミドモナスとボルボックスの間では多くの遺伝子が保存 (共有) されているが, その一方でボルボックスで特異に起こる発生現象に働く遺伝子はどのように進化してきたのだろうか。このことを考える上で, *RegA* 変異体の原因遺伝子である *regA* は非常に良いモデルであった。我々は, *RegA* の DNA 結合領域である保存配列 VARL 領域 (Volvocine algal *regA* like; Duncan *et al.* 2006) に基づいてゲノム配列を解析した結果, VARL 領域を持つ遺伝子がボルボックス (計 14 個) とクラミドモナス (計 12 個) のゲノム中に多数存在していることを明らかにした (Duncan *et al.* 2007)。これらの遺

伝子のうち、ボルボックスにおいて *regA* に非常に似た配列を持つ遺伝子は4つあり (*rlsA*, *rlsB*, *rlsC*, *rlsD*; *rls=regA-like sequence*, 図 2A), その4つのうち前者3つは, *regA* とともにゲノム上で 60 k 塩基対に渡って *rlsA-regA-rlsB-rlsC* とタンデムに並んでクラスターを形成していた (図 2B)。一方, *rlsD* はこれらの遺伝子の近傍にはない。*regA* に一番近いクラミドモナスのホモログは *RLS1* のみであり, これは *rlsD* のオルソログであった (図 2A)。このことは, ボルボックスの *rlsD* 上流にある遺伝子 *ack2* がクラミドモナスにおいても同様の配置にあることから支持される (図 2B)。*regA* クラスターは遺伝子重複によっておそらく最近進化したものであり, そのためクラミドモナスのゲノムには存在しないであろう。以上から, 多細胞化に伴いボルボックスの分化制御遺伝子 *regA* は, *RLS1/rlsD* の祖先遺伝子が重複化し, 進化した可能性が強く示唆された (図 2C)。クラスター上の *regA* 以外の遺伝子 (*rlsA/B/C*) に関しては, 現在解析を行っており, *regA* とよく似た発現パターンを示すことがわかっているが, *regA* と同様に分化の制御に働いているかどうかについてはまだ明からではない。

最後に, 2007 年 10 月 15 日に David Kirk 博士のこれまでの功績を記念して行われたボルボックス・シンポジウム (米国セントルイス・ワシントン大学) について特記したい。シンポジウムでは, 11 人の研究者ら (米 5・日 3・独 2・加 1) によって, ゲノム・非対称分裂・形態形成運動・分化・細胞壁の構築・孵化・有性生殖・細胞死・新種などボルボックスに関する多くの研究報告がなされた。孵化の機構に関しては, 京大の白石博士の研究グループにより, 親の細胞壁を溶かす酵素 VheA が同定されている (Fukada *et al.* 2006)。この酵素のホモログはクラミドモナスでも発現している。どうして娘群体自身の細胞壁は分解されず, 親群体の細胞壁のみが分解されるのかは, ボルボックスにおける非常に興味深い問題である。有性生殖過程に関しては, 米ソーグ研の Umen 博士や東大の野崎博士らが研究を行っており, JGI のゲノム解析に基づいてメスの性染色体の領域が同定されている。オス株に関しては, BAC ライブラリが作成され JGI により性染色体領域の配列決定が進められている。クラミドモナスの性染色体領域と比較することにより, 同型配偶接合である単細胞生物から卵生殖の多細胞生物への進化過程を解き明かすゲノムレベルの研究として注目される。

まとめと展望

トランスポゾン・タギングにより, ボルボックスの発生過程の分子機構に働く遺伝子が明らかになってきた。ゲノム配列を利用することにより, これらの研究はますます加速していくだろう。また, 未だ原因遺伝子の決まっていない多くの突然

変異体に対してもマッピングなどによりアプローチできるのではないだろうか。これらの遺伝子のボルボックスでの働きのみならず, クラミドモナスでのホモログの解析を行うことにより, 動物や陸上植物とは異なる面から, 多細胞生物への進化に関する理解を得られれば意義深いと考えられる。

引用文献

- Cheng, Q., Pappas, V., Hallmann, A. & Miller, S. 2005. Hsp70A and GlcA interact as partner chaperones to regulate asymmetric division in *Volvox*. *Dev Biol* 286: 537–48
- Cheng, Q., Hallmann, A., Edwards, L. & Miller, S. 2006. Characterization of a heat-shock-inducible *hsp70* gene of the green alga *Volvox carteri*. *Gene* 371: 112–20
- Duncan, L., Nishii, I., Howard, A., Kirk, D. & Miller, S. 2006. Orthologs and paralogs of *regA*, a master cell-type regulatory gene in *Volvox carteri*. *Curr Genet* 50: 61–72
- Duncan, L., Nishii, I., Harryman, A., Buckley, S., Friedman, N., A., & Miller, S. 2007. The VARL gene family and the evolutionary origins of the master cell-type regulatory gene, *regA*, in *Volvox carteri*. *J Mol Evol*. 65: 1–11
- Fukada, K., Inoue, T. & Shiraishi, H. 2006 A posttranslationally regulated protease, VheA, is involved in the liberation of juveniles from parental spheroids in *Volvox carteri*. *Plant Cell* 18: 2554–66
- Kirk, M., Stark, K., Miller, S., Müller, W., Taillon, B., Gruber, H., Schmitt, R., & Kirk, D. 1999. *regA*, a *Volvox* gene that plays a central role in germ-soma differentiation, encodes a novel regulatory protein. *Development* 126: 639–47
- Kirk, D. 1998. *Volvox*: Molecular-genetic origins of multicellularity and cellular differentiation. Cambridge: Cambridge University Press.
- Meissner, M., Stark, K., Cresnar B., Kirk, D. & Schmitt, R. 1999. *Volvox* germline-specific genes that are putative targets of RegA repression encode chloroplast proteins. *Curr Genet* 36: 363–70
- Merchant, S. *et al.* 2007 The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 31: 245–50
- Miller, S. & Kirk, D. 1999. *glcA*, a *Volvox* gene required for asymmetric division and germ cell specification, encodes a chaperone-like protein. *Development* 126: 649–58
- Miller, S. Schmitt R. & Kirk D. 1993. *Jordan*, an active *Volvox* transposable element similar to higher plant transposons. *Plant Cell* 5: 1125–38
- Nishii, I. Ogiwara S. & Kirk, D. 2003. A kinesin, *invA*, plays an essential role in *Volvox* morphogenesis. *Cell* 113: 743–53.
- Nozaki, H., Mori, T., Misumi, O., Matsunaga, S., & Kuroiwa, T. 2006. Males evolved from the dominant isogametic mating type. *Curr Biol*. 16: R1018–20
- Sessoms, A. & Huskey, R. 1973. Genetic control of development in *Volvox*: isolation and characterization of morphogenetic mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 1335–8
- Stark, K., Kirk, D., & Schmitt, R. 2001. Two enhancers and one silencer located in the introns of *regA* control somatic cell differentiation in *Volvox carteri*. *Genes Dev*. 15: 1449–60
- Starr, R. C. 1968. Cellular differentiation in *Volvox*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 59: 1082–8