



藻類学最前線 群体性ボルボックス目緑藻において超並列配列解読がもたらす進化生物学の革新

浜地貴志

パイロシーケンシングにもとづく 454 Life Science 社の超並列配列解読 (Massively Parallel Sequencing) プラットフォームが 2005 年に発表されたのが発端となって、配列解読はあたらしい時代にはいった (Margulies *et al.* 2005)。生物学者はこれを「次世代シーケンサー」の到来として捉えた。さらに 8 年が経過して、超並列配列解読プラットフォームも多様化し、また利用者のコミュニティも徐々に形成されつつある。こうした様々なプラットフォームは次世代シーケンサーとも第三世代シーケンサーとも呼ばれるが、本稿ではひとまとめに「超並列配列解読」と呼ぶことにする。

日本国内で行われている研究に超並列配列解読利用の「裾野」をひろげようという試みが、文部科学省・新学術領域「ゲノム支援」で進んでいる。筆者らのグループ (研究代表者・野崎久義准教授・東京大学、支援者・藤山秋佐夫教授・豊田敦特任准教授・情報システム研究機構) はこの「ゲノム支援」によって 8~16 細胞群体性同型配偶緑藻 *Gonium pectorale* (ボルボックス目) の全ゲノム配列解読を推進している。また、米国・カナダ・南アフリカ共和国・日本で進行中の群体性ボルボックス目緑藻のゲノム配列解読コンソーシアムにも協力している。

本稿では、超並列配列解読によってめざましい進展をみせる群体性ボルボックス目緑藻での全ゲノム配列プロジェクトのうち、相次いで報告された *G. pectorale* 並びに *Pleodorina (Ple.) starrii* の色素体とミトコンドリアのゲノム配列から明らかになった群体性ボルボックス目オルガネラゲノムの進化を紹介することで、超並列配列解読が進化生物学にとってはたす意義を論じる。

多様な超並列配列解読技術

冒頭でも述べた 454 ブランドのプラットフォームは「次世代」の到来を告げただけでなく、現在でも主力のひとつとして利用されている。2013 年 5 月時点の最新バージョンは 454 GS FLX+ と GS Junior で、GS FLX+ のリードは概ね 700 塩基程度 (最長 1,000 塩基) の配列を 1 ランあたり 100 万リード算出する強力なものである。GS Junior はこれの普及型として位置づけられており、1 リード 400 塩基、10 万リードと GS FLX+ の 1/10 で「ジュニア」と名付けられている。これらはダイデオキシ法 (サンガー法) で通常得られる鎖長と遜色なく (「ロングリード」とも呼ばれる)、しかも 1 リードあたりのランニングコストは格段に安価である。de novo genome sequencing のためには、454 のリードの長さは非常に強みがある。

現在 454 と並んで特に利用頻度の高いプラットフォームが illumina ブランドの HiSeq2500 と MiSeq である。こちらは鎖長が~100 塩基と短い (ショートリード) かわりに、核酸断片両端を一組として配列を決定する Paired-end (メイトペアとも呼ばれる) で HiSeq は 60 億リード、MiSeq も 3,000 万リードの配列を 1 ランで産出するため、主に RNA-seq などのトランスクリプトーム解析や ChIP-seq/RIP-seq (免疫沈降法で共沈した染色体・RNA 等の核酸断片プールを配列解読する手法) のような核酸動態の解析に利用されることが多い。454 も illumina も、さまざまな企業が受託解析を開始している。

超並列配列解読によって配列を決定する核酸断片プールは「ライブラリ」と呼ばれる。このライブラリは、454 も illumina も両端にアダプターが付加されて PCR 処理が可能となっている核酸断片の溶液と考えればよい。「3,000 塩基」「20,000 塩基」等、一定の断片長ごとのライブラリを複数準備して両端を Paired-end で配列決定することによって、離れた位置の配列断片間の距離を見積もることができるようになる。なお、サンガー法全盛の頃以来の BAC・Fosmid 等の各種ベクターを用いたものもライブラリと呼ばれ、ともに「整形された塩基断片の集合」というイメージを共有している。しかし、BAC ライブラリ等では核酸断片はベクターに組み込まれて宿主の形質転換を通じた増幅を前提したもので、超並列配列解読のライブラリとは異なる物理的実体なので注意が必要である。

このほか、Pacific Biosciences 社の PacBio シーケンサーは、DNA 断片を 1 分子ずつ処理し、1 リードが 1,000 塩基以上となる超長鎖の配列決定で注目されているが、正確性が 90% 前後と他の配列決定に比べて下がるのが弱点になっている。いずれにせよ、この分野は非常に進展が速く、本稿執筆時点 (2013 年 5 月) の記述はただちに古くなるため、注意が必要である。

進化の分子基盤の解明に向けて

生物現象の分子基盤となる遺伝子のネットワークはモデル生物を中心として研究が進んできたが、その進化を解明するためには、他の生物において遺伝子のホモログを同定する必要がある。高度に保存された保守的な遺伝子であればホモログの同定は決して困難ではない。しかし、ここで目的としているホモログは機能に変化をもたらした分子基盤であり、そのような遺伝子は変化しやすい、進化速度の速い遺伝子である可能性が充分にある。

既知遺伝子の未知のホモログを見つけるためには、保存的なアミノ酸配列に対して縮重プライマーを設計し、PCRによる増幅を目指す方法があるが、一般的にはこの方法による目的遺伝子の発見は難しい。保存的なアミノ酸配列の残基や領域、鋳型量やアニリング温度などの条件検討によって改善する余地はあるが、ホモログの同定は基本的に確率論的で、必ずしも確実ではない。そもそも、ホモログが2個以上既に同定されていないと、保存的な領域を見出せず、縮重プライマーの設計自体が困難である。

ボルボックス目で *Chlamydomonas reinhardtii* から分岐して群体化した系統群（ボルボックス系列緑藻 volvocine algae）は、3つの面で、祖先的な同型配偶から異型配偶・卵生殖の出現した過程を解明するモデル系統群とみなすことができる（図1）。まず、同型配偶・異型配偶・卵生殖の生物が段階的に現存し、分子生物学的な比較が可能である（Nozaki *et al.* 2000）。次に、同型配偶の *C. reinhardtii* において、6番染色体左腕にプラスとマイナスの交配型の間で組換えが抑制され異なる遺伝子構成が維持されている200～300 kbの性決定領域（mating locus, *MT*）をはじめとする、有性生殖過程が長年研究されてきている（Ferris & Goodenough 1994; Goodenough *et al.* 2007）。最後に、ボルボックス系列緑藻では既に *C. reinhardtii* と *Volvox carteri* でゲノム配列が決定されているため、多くの遺伝子で2つ以上のホモログを得ることが可能になっている（Merchant *et al.* 2007; Prochnik *et al.* 2010）。しかし、どちらか一方にしか見出されない遺伝子や、進化速度の速い遺伝子、ドメインや残基の繰り返しが含まれる遺伝子では、現実的には縮重プライマーが設計できる6残基程度の保存領域を2つ以上設定することができない。*C. reinhardtii* から同定された性決定領域に含まれる遺伝子で、遺伝学的に優性にマイナス交配型配偶子を分化させる転写因子をコードする *MID* と、プラス交配型のみにおいて配偶子の接合突起細胞膜上で配偶子間の接着に関与する膜タンパク質をコードする *FUS1* は、当初のハイブリダイゼーションによる探索では群体性ボルボックス目緑藻 *G. pectorale* と *V. carteri* からのホモログの同定が不成功であり、進化速度が速いと推定された（Ferris *et al.* 1996; Ferris & Goodenough 1997; Ferris *et al.* 1997）。2007年3月に作成された *V. carteri* ゲノム v.1.0（米国エネルギー省 Joint Genome Institute）は雌のもので、ここには *MID* も *FUS1* も見出されなかった。Nozaki *et al.* (2006) は *C. reinhardtii* に近縁な群体性ボルボックス目の *Ple. starrii* の雄性配偶子の mRNA から、縮重プライマーを使った RT-PCR によって *MID* ホモログを初めて同定し、*C. reinhardtii* のマイナス交配型と *Ple. starrii* の雄が相同であることが明らかになった。縮重プライマーの設計は、元になるホモログ配列が多いほど精度を向上することができるので、ひきつづいて同型配偶の *Gonium* 属各種、卵生殖の *Volvox* の *MID* ホモログの報告につながった（Hamaji *et al.* 2008; Ferris *et al.* 2010; Setohigashi *et al.* 2011; Hamaji *et al.* 2013b）。雌株の全ゲ

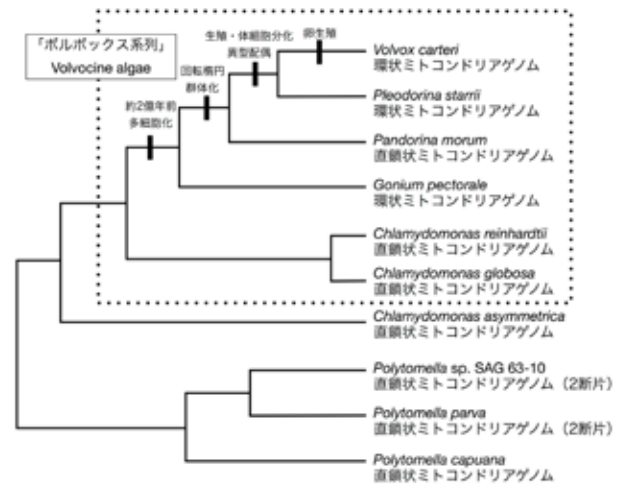


図1. *Reinhardtinia* クレード (Nakada *et al.* 2008) における系統関係とミトコンドリアゲノムの形状。系統関係は、Nozaki *et al.* (2000), Nozaki (2003), Herron *et al.* (2009) にもとづき模式的に示す。

ノム配列がサンガー法によって決定していた *V. carteri* では、雄株の BAC ライブラリをその *MID* ホモログによってスクリーニングして、隣接する BAC クローンを順次ショットガン配列決定した染色体歩行によって、雌雄双方の性決定領域のゲノム配列が解読された（Ferris *et al.* 2010）。*V. carteri* の雌雄の全ゲノム配列が判明してみると、依然として *C. reinhardtii* *FUS1* のホモログは同定されず、同型配偶から卵生殖に到る進化の過程で配偶子の接着と融合のメカニズムが変化して *FUS1* が消失したものと考えられた。今後は、*FUS1* の消失した系統的な位置を明らかにし、性決定領域構成・構造の変化を辿るために、進化の各段階の生物で両性のゲノムを配列解読して比較する必要がある。超並列配列解読と BAC ライブラリの解析に基づいた *G. pectorale* の両性ゲノムの解読が現在進行中である（Hamaji *et al.* unpublished）。

ゲノム配列全体を決定すれば、BLAST でホモログを探索することは容易である。超並列配列解読の到来以前は、比較対象となる生物群のすべての種・株で全ゲノム配列を決定することは、コスト・時間の問題から困難であった。しかし現在、超並列配列解読を利用して様々な生物で全ゲノム配列解読が毎週のように報告されるのを考慮すれば、非モデル生物とみなされるような生物の全ゲノム配列を解読して比較に供し、進化の分子基盤にアプローチすることは決して大それた試みではなくなりつつある。

超並列配列解読の波及的な効果

ある分析を目指して *de novo* 的な超並列配列解読を進めるときに、当初の目的とは別のデータが得られることがある。例えば核ゲノム配列を決定する目的で *de novo sequencing* を行うと、ミトコンドリアや色素体のオルガネラゲノムの配列断片も取得できる。緑藻の細胞内にはこれらのオルガネラゲノムはきわめて多コピー数で存在しているため、決定されたリードの数が多く、カバレッジも十分に確保できる。

表1. ボルボックス系緑藻のオルガネラゲノム.

| 生物 | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | <i>Gonium pectorale</i> | <i>Pleodorina starrii</i> | <i>Volvox carteri</i> |
|-----------------------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 細胞数 | 1 | 8 または 16 | 32 ~ 64 | ~ 2000 |
| 有性生殖 | 同型配偶 | 同型配偶 | 異型配偶 | 卵生殖 |
| 色素体ゲノムサイズ (kb) | 204.2 | 222.6 | 269.9 | ~ 525 |
| ミトコンドリアゲノム サイズ (kb) / 形状 | 15.8 / 直鎖状 | 16.0 / 環状 | 20.4 / 環状 | ~ 35 / 環状 |
| 文献 | Michaelis <i>et al.</i> (1990) | Hamaji <i>et al.</i> (2013b) | Smith <i>et al.</i> (2013) | Smith & Lee (2009, 2010) |

我々の群体性ボルボックス目ゲノムコンソーシアムにおいては、既に *G. pectorale* と *Ple. starrii* の全ゲノム配列決定が開始している。このコンソーシアムは、群体性ボルボックス目において獲得された多細胞性と雌雄性の過程をゲノム比較によって追跡しようという意図のもとに進行している。特に、*G. pectorale* のゲノム解読では先に述べた「ゲノム支援」により、ロングリードとショートリードを共に援用しており、コンソーシアムの旗艦プロジェクトと位置づけられている。核ゲノムのドラフトシーケンスとアノテーションは現在進行中である。我々は先行して、核ゲノムに比べてはるかに小さい、葉緑体とミトコンドリアのゲノムを報告した (Hamaji *et al.* 2013b)。また、*Ple. starrii* のオルガネラゲノムは illumina HiSeq2000 で配列決定され、こちらも *G. pectorale* と前後して報告された (Smith *et al.* 2013)。*G. pectorale* オルガネラゲノムを例として研究期間を紹介すると、2011年10月に抽出した全ゲノム DNA を用いて「ゲノム支援」を受けて得られたリードをベースに、2013年1月に論文が受理された。

C. reinhardtii と *V. carteri* のミトコンドリアおよび葉緑体ゲノムは既に報告されており、おおきな論点は2つに絞られていた。一つは、*V. carteri* の巨大なオルガネラゲノムが示唆する、群体性ボルボックス目でのオルガネラゲノムの巨大化傾向の実証で (Smith & Lee 2009; 2010)、もう一つは *C. reinhardtii*, *Chlamydomonas globosa* と *Pandorina (Pan.) morum* で報告されている直鎖状ミトコンドリアゲノムの系統的起源 (祖先的か派生的か) である。

最新のオルガネラゲノムのデータからは、*C. reinhardtii* と近縁な群体性ボルボックス目 (特に Tetrabaenaceae, Goniaceae および Volvocaceae からなる TGV クレード; Nozaki *et al.* 2000; Nozaki 2003; Herron & Michod 2008; Nakada *et al.* 2010) では、細胞数が多く、体制が複雑になるにつれて、オルガネラゲノムサイズが増大する傾向が見られた (表1)。ミトコンドリアゲノムにおいても葉緑体ゲノムにおいても、それぞれの生物でコードされている遺伝子はほぼ変わっておらず、ゲノムサイズの拡大には繰り返し配列の蓄積が寄与している。ゲノムサイズの増大を説明する説として現在 “mutational hazard hypothesis” が注目されており、 N_{μ} (次の世代にゲノムを残す個体数・特にここでは細胞数を反映する有効集団サイズと、1塩基あたりの世代毎の突然変異率の積) が影響するとされる (Lynch 2007)。*Ple. starrii* も *V. carteri* も細胞数が増加して一世代が長くなったことで、有効集団サイズが小さくなっていることが見積もら

れる。

今回報告された *G. pectorale* および *Ple. starrii* のミトコンドリアゲノムは、環状にアッセンブルされ、サザンブロットティングの結果もこれを支持している。*Reinhardtinia* クレード (sensu Nakada *et al.* 2008) の *C. reinhardtii*, *C. globosa*, *Chlamydomonas asymmetrica*, *Polytomella spp.*, *Pan. morum* では、ミトコンドリアゲノムが直鎖状であると報告されており (Moore & Coleman 1989; Michaelis *et al.* 1990; Laflamme & Lee 2003; Popescu & Lee 2007; Smith *et al.* 2010), *C. reinhardtii* と分岐した後の TGV クレードにおいてミトコンドリアゲノムの祖先形質は環状で、*Pan. morum* の直鎖状ミトコンドリアゲノムは派生的である可能性がある (図1)。

ボルボックス系緑藻ではオルガネラゲノムが片親遺伝することが報告されている。有性生殖の結果生じた接合子の発芽において、同型配偶の *C. reinhardtii* と *G. pectorale* ではプラス型の親から葉緑体ゲノムが、マイナス型の親からミトコンドリアゲノムがそれぞれ遺伝する (Boynton *et al.* 1987; Hamaji *et al.* 2008)。一方で、卵生殖の *V. carteri* では、ミトコンドリア・葉緑体双方のゲノムが雌親から遺伝する (Adams *et al.* 1990)。これらの片親遺伝によって、オルガネラゲノムの有効集団サイズは低下することとなる。

興味深いことに、片方の親からしか遺伝しない、あるいは組換えが生じないという点でオルガネラゲノムと共通する性決定領域 *MT* も、サイズが *C. reinhardtii* の 200 ~ 300 kb に比べて *V. carteri* では5倍程度の 1 Mb に拡大している (Ferris & Goodenough 1994; Ferris *et al.* 2002; 2010)。他のボルボックス系緑藻においても、多細胞化の程度に比例して性決定領域が拡大する傾向が見られるかどうかは今後明らかにする必要がある。

Smith (2013) によれば、全ゲノム配列の解読を目して産出されたものでなくとも、もともと AT リッチであるオルガネラゲノム DNA や mRNA がオリゴ dT ビーズ (RNA-seq など) で poly-A 配列に特異的に結合させて核コード mRNA を精製するのに使用される) に非特異的に結合されることにより、配列決定されることがあり得ることとしている。その結果、米国 National Center for Biomedical Information の Sequence Read Archive (SRA) のような超並列解読配列アーカイブの中に、元々意図されていないオルガネラゲノムのデータが含まれていると考えられる。

超並列配列解読は確かにきわめて強力な手法である。しか

し、目的に応じて使い分ける必要がある。例えば、確立された継代培養株や単離細胞から、超並列配列解読を用いて、数種類の保存的な遺伝子マーカーを同定して分子系統を推定することは非効率である。超並列配列解読を利用した多様性の把握アプローチである「メタゲノム解析」と対照して考えるとよい。

超並列配列解読のもたらした配列解読のハイスループット化は、塩基プールが多様性を確かに高い精度で反映するものであり、生物学の歴史において、光学顕微鏡の導入によって微生物の多様性が認識されたのに匹敵する意義を持っているといえよう。また、顕微鏡の応用も現在進行形で拡大しつつあるのとまったく同じように、超並列配列解読の可能性も、まだ汲みつくされているのには程遠い。いま生物学者のおのおのが積極的にこの技術に参入し、その性質と限界を知り、コミュニティを形成して知識を蓄積・共有していくことが、新たな利用可能性を拓くことにもつながる。

引用文献

- Adams, C. R., Stamer, K. A., Miller, J. K., McNally, J. G., Kirk, M. M. & Kirk D. L. 1990. Patterns of organellar and nuclear inheritance among progeny of two geographically isolated strains of *Volvox carteri*. *Curr. Genet.* 18: 141–153.
- Boynton, J. E., Harris, E. H., Burkhart, B. D., Lamerson, P. M. & Gillham N. W. 1987. Transmission of mitochondrial and chloroplast genomes in crosses of *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 2391–2395.
- Ferris, P. J., Armbrust, E. V. & Goodenough, U. W. 2002. Genetic structure of the mating-type locus of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 160: 181–200.
- Ferris, P. J. & Goodenough, U. W. 1994. The mating-type locus of *Chlamydomonas reinhardtii* contains highly rearranged DNA sequences. *Cell* 78: 1135–1145.
- Ferris, P. J. & Goodenough, U. W. 1997. Mating type in *Chlamydomonas* is specified by mid, the minus-dominance gene. *Genetics* 146: 859–869.
- Ferris, P., Olson, B. J. S. C., De Hoff, P. L., Douglass, S., Casero, D., Prochnik, S., Geng, S., Rai, R., Grimwood, J., Schmutz, J., Nishii, I., Hamaji, T., Nozaki, H., Pellegrini, M. & Umen J. G. 2010. Evolution of an expanded sex-determining locus in *Volvox*. *Science* 328: 351–354.
- Ferris, P. J., Pavlovic, C., Fabry, S. & Goodenough, U. W. 1997. Rapid evolution of sex-related genes in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 8634–8639.
- Ferris, P., Woessner, J. & Goodenough, U. 1996. A sex recognition glycoprotein is encoded by the plus mating-type gene *fus1* of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Biol. Cell* 7: 1235–1248.
- Goodenough, U., Lin, H. & Lee, J.-H. 2007. Sex determination in *Chlamydomonas*. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18: 350–361.
- Hamaji, T., Ferris, P. J., Coleman, A. W., Waffenschmidt, S., Takahashi, F., Nishii, I. & Nozaki, H. 2008. Identification of the minus-dominance gene ortholog in the mating-type locus of *Gonium pectorale*. *Genetics* 178: 283–294.
- Hamaji, T., Ferris, P. J., Nishii, I., Nishimura, Y. & Nozaki, H. 2013a. Distribution of the sex-determining gene MID and molecular correspondence of mating types within the isogamous genus *Gonium* (Volvocales, Chlorophyta). *PLoS ONE* 8: e64385.
- Hamaji, T., Smith, D. R., Noguchi, H., Toyoda, A., Suzuki, M., Kawai-Toyooka, H., Fujiyama, A., Nishii, I., Marriage, T., Olson, B. J. S. C. & Nozaki, H. 2013b. Mitochondrial and plastid genomes of the colonial green alga *Gonium pectorale* give insights into the origins of organelle DNA architecture within the Volvocales. *PLoS ONE* 8: e57177.
- Herron, M. D. & Michod, R. E. 2008. Evolution of complexity in the volvocine algae: transitions in individuality through Darwin's eye. *Evolution* 62: 436–451.
- Herron, M. D., Hackett, J. D., Aylward, F. O. & Michod, R. E. 2009. Triassic origin and early radiation of multicellular volvocine algae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 3254–3258.
- Laflamme, M. & Lee, R. W. 2003. Mitochondrial genome conformation among CW-group chlorophycean algae. *J. Phycol.* 39: 213–220.
- Lynch, M. 2007. *The Origins of Genome Architecture*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S. et al. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376–380.
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., et al. 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318: 245–250.
- Michaelis, G., Vahrenholz, C. & Pratje, E. 1990. Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the gene for apocytochrome b and the complete functional map of the 15.8 kb DNA. *Mol. Gen. Genetics* 223: 211–216.
- Moore, L. J. & Coleman, A. W. 1989. The linear 20 kb mitochondrial genome of *Pandorina morum* (Volvocaceae, Chlorophyta). *Plant Mol. Biol.* 13: 459–465.
- Nakada, T., Misawa, K. & Nozaki, H. 2008. Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses. *Mol. Phylogenet. Evol.* 48: 281–291.
- Nakada, T., Nozaki, H. & Tomita, M. 2010. Another origin of coloniality in volvocales: the phylogenetic position of *Pyrobotrys arnoldi* (Spondylomoraceae, Volvocales). *J. Eukaryot. Microbiol.* 57: 379–382.
- Nozaki, H. 2003. Origin and evolution of the genera *Pleodorina* and *Volvox* (Volvocales). *Biologia* 58: 425–431.
- Nozaki, H., Misawa, K., Kajita, T., Kato, M., Nohara, S. & Watanabe, M. M. 2000. Origin and evolution of the colonial Volvocales (Chlorophyceae) as inferred from multiple, chloroplast gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 17: 256–268.
- Nozaki, H., Mori, T., Misumi, O., Matsunaga, S. & Kuroiwa, T. 2006. Males evolved from the dominant isogametic mating type. *Curr. Biol.* 16: R1018–R1020.
- Popescu, C. E. & Lee, R. W. 2007. Mitochondrial genome sequence evolution in *Chlamydomonas*. *Genetics* 175: 819–826.
- Prochnik, S. E., Umen, J., Nedelcu, A. M., Hallmann, A., Miller, S. M., Nishii, I., Ferris, P., Kuo, A., Mitros, T., Fritz-Laylin, L. K., Hellsten, U., Chapman, J., Simakov, O., Rensing, S. A., Terry, A., Pangilinan, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Salamov, A., Shapiro, H., Schmutz, J., Grimwood, J., Lindquist, E., Lucas, S., Grigoriev, I. V., Schmitt, R., Kirk, D. & Rokhsar, D. S. 2010. Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green alga *Volvox carteri*. *Science* 329: 223–226.
- Setohigashi, Y., Hamaji, T., Hayama, M., Matsuzaki, R. & Nozaki, H. 2011. Uniparental inheritance of chloroplast DNA is strict in the isogamous Volvocalean *Gonium*. *PLoS ONE* 6: e19545.
- Smith, D. R. 2013. RNA-Seq data: a goldmine for organelle research. *Brief. Funct. Genomics* doi:10.1093/bfgp/els066.
- Smith, D. R., Hamaji, T., Olson, B. J. S. C., Durand, P. M., Ferris, P., Michod, R. E., Featherston, J., Nozaki, H. & Keeling, P. J. 2013. Organelle genome complexity scales positively with organism size in volvocine green algae. *Mol. Biol. Evol.* 30: 793–797.
- Smith, D. R., Hua, J. & Lee, R. W. 2010. Evolution of linear mitochondrial DNA in three known lineages of *Polytomella*. *Curr. Genet.* 56: 427–438.
- Smith, D. R. & Lee, R. W. 2009. The mitochondrial and plastid genomes of *Volvox carteri*: bloated molecules rich in repetitive DNA. *BMC Genomics* 10: 132.
- Smith, D. R. & Lee, R. W. 2010. Low nucleotide diversity for the expanded organelle and nuclear genomes of *Volvox carteri* supports the mutational-hazard hypothesis. *Mol. Biol. Evol.* 27: 2244–2256.

(京都大学大学院理学研究科, 日本学術振興会特別研究員

PD)