

## 湖沼調査から新たなるブレイクスルーを目指して

野崎 久義

東京大学大学院理学系研究科 (〒 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)  
国立環境研究所生物多様性領域 (〒 305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2)

Hisayoshi Nozaki: Toward further breakthrough findings based on field-collections in large lakes. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 70: 1–12, March 10, 2022

Colonial or multicellular volvocine green algae originating from large lakes sometimes represent unique species that can be used as key organisms for resolving fundamental and important biological problems in evolution of sex. Here I summarize and introduce our exciting findings in our studies using colonial volvocine algal species collected from Lakes Sagami, Tsukui and Biwa, Japan. In 2006, we found a new male-specific gene “*OTOKOGI*” (*PlestMID*) (*Pleodorina starrii* minus dominance gene) from male culture strains of the anisogamous colonial volvocine green alga *P. starrii* originating from Lakes Sagami and Tsukui, Japan. The finding of this gene became a breakthrough for subsequent molecular/genomic studies of the evolution of anisogamy/oogamy from isogamy focusing on *MID* homologs and their harbored sex-determining regions (SDRs) in the colonial volvocine algae. Furthermore, our field collection works in Lake Biwa resolved existence of two closely related heterothallic and homothallic species of *Volvox*. Three new genomes from male and female strains of the heterothallic *Volvox reticuliferus* and a homothallic *V. africanus* strain, we resolved fates of male and female SDRs during evolutionary transition from heterothallic to homothallic species. Very recently, based on our long-term field surveys in Lakes Sagami and Tsukui and cultural studies of *P. starrii* from these lakes, we demonstrated that *P. starrii* actually has three sex phenotypes (male, female and bisexual) within a single biological species, representing a new life cycle in haploid species and an initial stage of evolutionary transition to a homothallic species. This interesting discovery in the haploid species will be the next breakthrough for further genomic/genetic studies of the origin and evolution of homothallism.

*Key Index Words:* cultural studies, evolution of sex, field collection, heterothallism, homothallism, large lakes, *Pleodorina*, sex-determining region (SDR), sex-specific genes, volvocine green algae, *Volvox*

Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan  
Biodiversity Division, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan

Contact information: nozaki@bs.s.u-tokyo.ac.jp

## はじめに

私は今から 40 年以上の昔、1977 年の学部 4 年生の時から群体性 / 多細胞性ボルボックス類の培養による研究をしていた。また、これまでにセミナーや研究紹介では「世界の誰も使用していない材料を用いて、世界の誰もが認める多様性と進化の研究を目指す」と言ってきたが、還暦を迎えた 2015 年あたりからようやくこの目標に近づきつつあると感じるようになった。元々は「培養をして生活環を回して色々なデータで研究ができれば良い」と考えていたわけで、材料は持ち帰りと保存が便利である泥の材料 (市村 1971) を手近な池や水田から集めて、それなりの材料が集められていた (野崎 1986)。従って、わざわざ大型湖沼へ行って、宴会・宿泊もしないで「水サンプルから分離作業」をする気にはなれなかった。

このような研究姿勢を大きく変えたきっかけは 1999 年から始まった湖沼調査である (図 1)。水田などの小さな淡水環境では 2 回目に採集しても同じ生物が得られない場合が多

い。1 回限りの採集ではその生物種の持つ本質的な特性は得られにくい。しかし、大型の湖沼は大体毎年同じ時期に同じ生物種が得られ、継続的な研究が可能である。また、大型の湖沼には水田等では見られない様々な群体性 / 多細胞性のボルボックス類の種が生育する。従って、1999 年から始まった大型湖沼の現地調査による我々の研究は「オス特異的遺伝子 “*OTOKOGI*” の発見」というブレイクスルー (Kirk 2006, Nozaki *et al.* 2006a, Nozaki 2008) を生み出したばかりではなく、継続された調査は新たなるブレイクスルーを生み出している。

本報では以上の研究経過を紹介し、更なる展望を述べることにする。尚、2006 年までの群体性ボルボックス類の研究経過に関しては野崎 (1986, 1995)、生活環と多細胞化の研究に関しては野崎 (2019) を参照されたい。

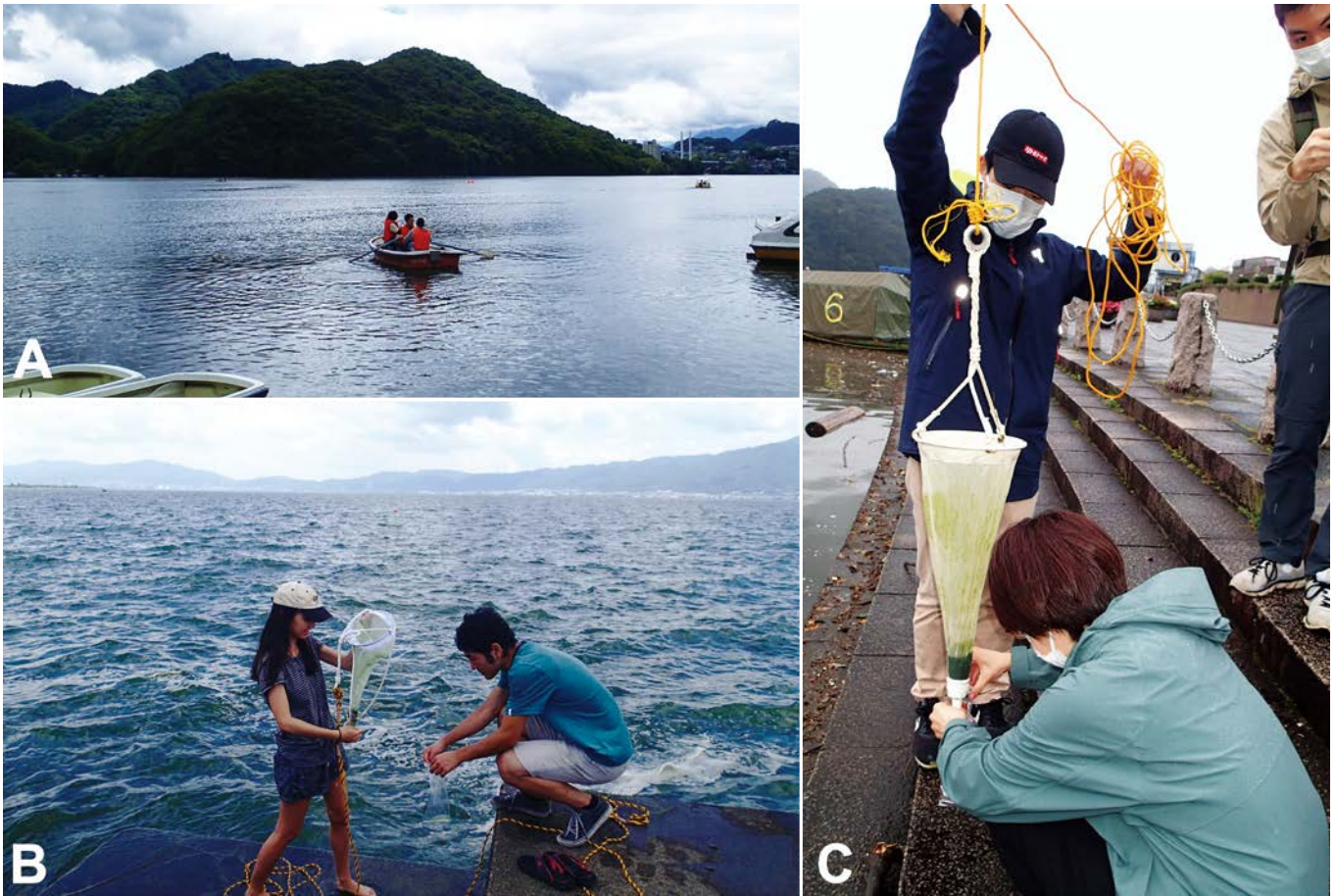


図 1. 緑藻ボルボックス系列の湖沼における現地調査. (A) 神奈川県相模湖の手漕ぎボートを利用した調査 (2013年6月14日). (B) 日本の唯一の古代湖である琵琶湖 (2017年7月6日). (C) コロナ禍における相模湖での調査 (2021年10月12日). プランクトンネットが緑色になるほど大量に *Volvox rousselletii* (Kimbara *et al.* 2019) が採集された.

### 相模湖・津久井湖の学部学生実習から始まった性進化研究のブレークスルー

緑藻類ボルボックス類を材料にした理由は培養条件下で生活環を研究できるからであったし、性 (sex) に関する遺伝子を研究できればと期待はしていた。4細胞以上の多細胞性のボルボックス類は通常日本では「群体性ボルボックス類」と呼び、単細胞性のクラミドモナスを含めて「ボルボックス系列」という。本系列は古くから多細胞化の研究に重要であると紹介され (Weismann 1892, Huxley 1912)、近年になって有性生殖の進化を同時に研究できる生物群として注目されていた (Bell 1985, Kirk 1998)。しかし、私が本生物群の研究を開始した1970–80年代は本群内部の系統関係が不明であったので、葉緑体5遺伝子6021塩基対を用いた分子系統解析を実施し、ある程度の系統関係を得ることができた (Nozaki *et al.* 2000) (図2)。系統関係の追跡も一応終わったので、性関連の遺伝子を研究しようと思い、ランダムプライマー等を用いてゴニウム (*Gonium*) やユードリナ (*Eudorina*) を材料として両性で異なる遺伝子等を探していたがうまく行かなかった。また、1999年米国セントルイスで開催された国際植物学会議

でご当地ワシントン大学の David Kirk 博士 (ボルボックスの分子遺伝学の専門家) に性遺伝子の共同研究を申し出て断られたこともあったし (野崎 2010)、そのころ当時の職場 (東京大学) のボス (黒岩常祥博士) が紅藻類のゲノムプロジェクトを開始し (Matsuzaki *et al.* 2004, Nozaki *et al.* 2007)、PCRによるギャップ埋めを担当していたので「性の研究」は忘れかけていた。

私の研究室は教員 (助教授) 1名の零細ラボであったので、1998年までは東京大学理学部生物学科植物学コースの4年生前期の実習を担当してはなかった。ところが、1999年度の教務の先生から「野崎さんやってみては？」とお誘いがあった。大研究室が奔めく東京大学の植物学教室の中で実習をやるには何か特徴のあることをする必要があったと考えた。その結果、他の研究室ではやっていない「現地調査してボルボックス類を採集し、研究室に持ち帰って培養株を確立し、形態と分子で同定する実習」を考えた。しかし、ボルボックス類は大型湖沼ではほぼ毎年同じ種が出現するが、出現する時期も限られる。従って、現地に行っても出現していない場合も多く、現地調査の結果「いなかった」では学生が興味を持っ

てくれない。また、東京大学本郷キャンパスから半日で行って帰ってきて、夕方研究室で培養株の作成ができることが条件であった。そこで思い出したのが、神奈川県相模川水系の相模湖・津久井湖であった。1988年5月に神奈川県谷ヶ原浄水場の斎藤昭二さんから「相模湖・津久井湖で発生するボルボックスの接合子」に関する問い合わせがあり、浄水場まで行ったところ大変丁寧な浄水場に関する説明を受けたのを思い出した。早速浄水場に問い合わせると斎藤さんは若くして故人となっていた。しかし、斎藤さんの仕事の後を引き継いだのが同浄水場の有井鈴江博士であり、その後20年以上の間、我々の実習や調査に非常に貴重な事前の現地情報を提供してくれた。この実習に学生とともに参加するうちに、新種 *Pleodorina starrii* Nozaki, F.D. Ott & A.W. Coleman が記載され、本種からオス特異的遺伝子“*OTOKOGI*” (*PlestMID*) が発見された(野崎 2008, 2010)。

“*OTOKOGI*” は同型配偶のクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard) の交配型マイナスを決定する転写型 minus dominance (*MID*) 遺伝子のホモログであり、本遺伝子のプレオドリナのオスにおける発見はクラミドモナスの交配型マイナスがオスに進化し、交配型プラスがメスに進化したという結論を導き出した(Nozaki *et al.* 2006a, Nozaki 2008) (図2)。これは生物界で初めて同型配偶の交配型とメス・オスの進化的関係を遺伝子データで示したという生物学的重要性を意味するだけではない。*MID* や“*OTOKOGI*” は片方の性(交配型)だけに存在する遺伝子であり、両性で遺伝子組成や配列が異なる部分「性決定領域」[sex-determining region (SDR) または同型配偶なので mating type locus (*MT*)、日本語で「性染色体領域」という場合もある]に位置する遺伝子であることは明らかである。すでに2002年にクラミドモナスの約200 kbのSDRは詳細に解明されており、*MID* は交配型マイナスのSDRに位置している(Ferris & Goodenough 1994, Ferris *et al.* 2002)。一方、理論的研究から両性で配列や遺伝子組成が異なり組み替えが抑制されているSDRのような領域に位置する遺伝子が同型配偶から異型配偶への進化の鍵となるという予測がなされていた(Charlesworth 1978)。従って、“*OTOKOGI*” の発見は異型配偶の群体性ボルボックス系列におけるSDR解明の糸口であり、同型配偶から異型配偶・卵生殖への進化の分子基盤を探る研究のブレークスルーになると期待された(Kirk 2006)。実際にその後日米の研究グループによる *OTOKOGI/MID* の研究が進展し、ボルボックス系列における同型配偶から異型配偶・卵生殖の各進化段階の生物の両性のSDRがゲノム配列情報から明らかになり(Ferris *et al.* 2010, Hamaji *et al.* 2016, 2018)、*OTOKOGI/MID* の卵生殖ボルボックスにおける精子形成機能が遺伝子導入実験から証明された(Geng *et al.* 2014)。

同型配偶のクラミドモナスのSDRは200 kb程度であり、2010年に卵生殖のボルボックス (*Volvox carteri* F. Stein) で巨大な1 MbのSDRが明らかになったとき(Ferris *et al.* 2010)、Charlesworth (1978) の予測もあったので、同型配偶から異型

配偶・卵生殖へ進化の原因はSDRの拡大とSDRにおける新規遺伝子の獲得と予想された(Charlesworth & Charlesworth 2010, 野崎 2010)。しかし、ボルボックス系列の有性生殖の各進化段階のSDRが明らかになると、SDR拡大とSDR新規遺伝子の獲得は卵生殖のボルボックスの起源で急に起きたことが予想された(Hamaji *et al.* 2018) (図3)。また、異型配偶のユードリナ (*Eudorina* sp.) のオスのSDRは70 kbと極めて小さく、性特異的遺伝子は *OTOKOGI/MID* だけである(Hamaji *et al.* 2018)。ボルボックスの本遺伝子の精子(雄性配偶子)形成という機能がユードリナでも同じであれば、本遺伝子の同型配偶におけるマイナス交配型決定という機能(Ferris & Goodenough 1997) が精子(小さい配偶子)形成という機能に進化したことだけ(即ち、*OTOKOGI/MID* という1遺伝子の機能進化)で同型配偶から異型配偶へ進化したと推察される。

### 琵琶湖のボルボックスからホモタリック種進化研究のブレークスルーを目指す

それでは巨大なボルボックスのSDRはどのような意味を持つのか? 2010年の時点ではSDRは20種以上記載されているボルボックスの1種 (*V. carteri*) の情報だけしかなかったので巨大なSDRの起源や進化は全く不明であった(図3)。また、SDRが明らかになったボルボックス系列の藻類(Hamaji *et al.* 2018) は両性(メス・オス、同型配偶の場合は交配型プラス・交配型マイナス)が遺伝的に異なるヘテロタリックのライフサイクルをもつ種で、本系列に広く存在する同じ遺伝子型で両性の配偶子をつくるホモタリック種の進化の分子基盤は殆ど不明であった。これら2個の進化生物学的問題を解ききかけとなったのが2013年から開始した琵琶湖調査であった。

琵琶湖は日本最大の湖で、日本で唯一の古代湖として有名である。本湖沼における水生植物や水産多細胞動物の研究が盛んに行われており、60以上の固有種または種以下分類群が知られている(西野 2018)。しかし、我々が研究を開始する前はボルボックス系列の藻類の分子情報を用いた研究はほとんどなく、採集された材料の栄養群体(無性群体)の光学顕微鏡の特徴から種が同定されていた(e.g. 玉・竹門 2008)。

私は元々琵琶湖に関しては興味があったわけではない。しかし、色々な学会で琵琶湖の興味深い生物に関する講演を聞いたりしてゆくうちに「琵琶湖のボルボックスは?」と思うようになった。我々の琵琶湖調査が具体的に変わった理由は2005年に東大・理・野崎研に所属していた高橋文雄博士が琵琶湖に近い立命館大学へ着任されたことであった。新幹線で琵琶湖に行って午前中から昼にかけて採集し、その日の夕方に東京本郷の研究室に戻って培養株を作成するというスケジュールであった。その中の琵琶湖での調査協力の了解を高橋博士から得た。琵琶湖調査は2013年から開始し、新型コロナウイルスの感染防止対策で2020年に中止するまで毎年初夏に実施した。ビギナーズラックというか、最初の2013年に琵琶湖博物館の駐車場に面する棧橋で採取した水サンプルから、これまで

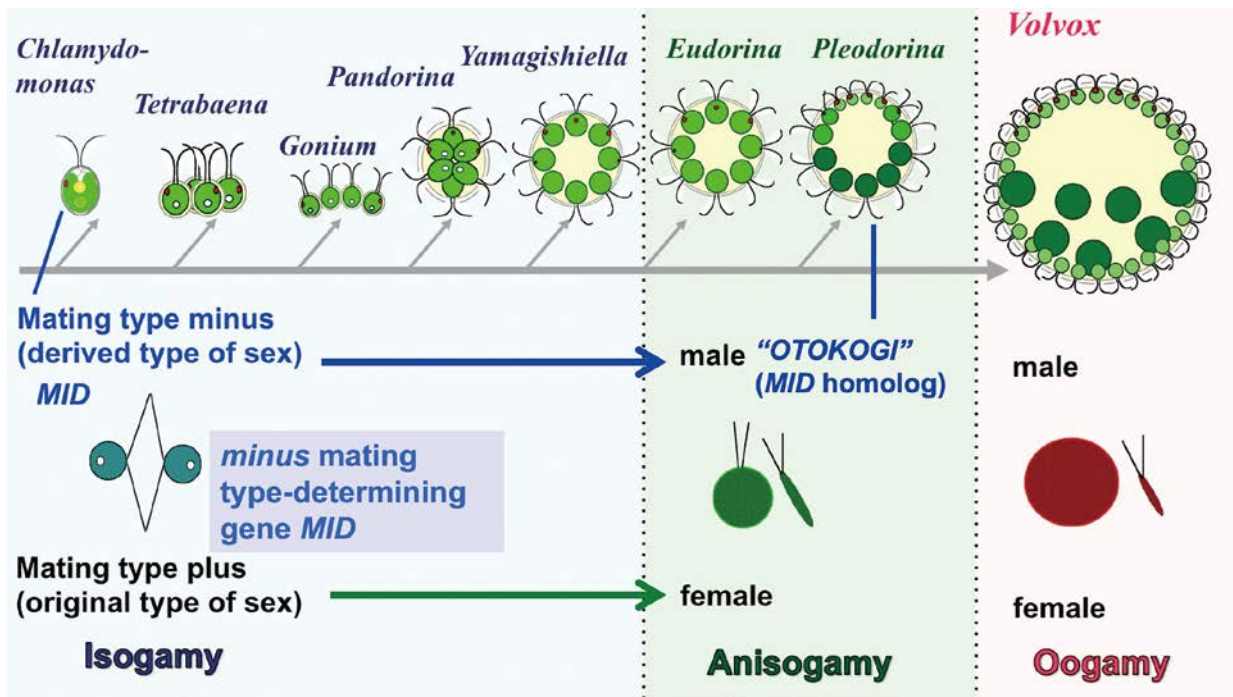


図2. 緑藻ボルボックス系列の大きな系統関係とオス特異的遺伝子 *OTOKOGI* (*PlestmID*) の発見 (Nozaki *et al.* 2006b, Nozaki 2008). 生物界で初めて同型配偶の交配型とメス・オスの進化的関係が遺伝子データで明らかとなった. 系統関係は葉緑体5遺伝子の配列 (Nozaki *et al.* 2000, Nozaki 2003) に基づく. 最近発表された核遺伝子トランスクリプトームデータによる大規模解析 (Lindsey *et al.* 2021) も *Tetraabaena* がこれらの外に位置する以外は基本的には本図と矛盾しない.

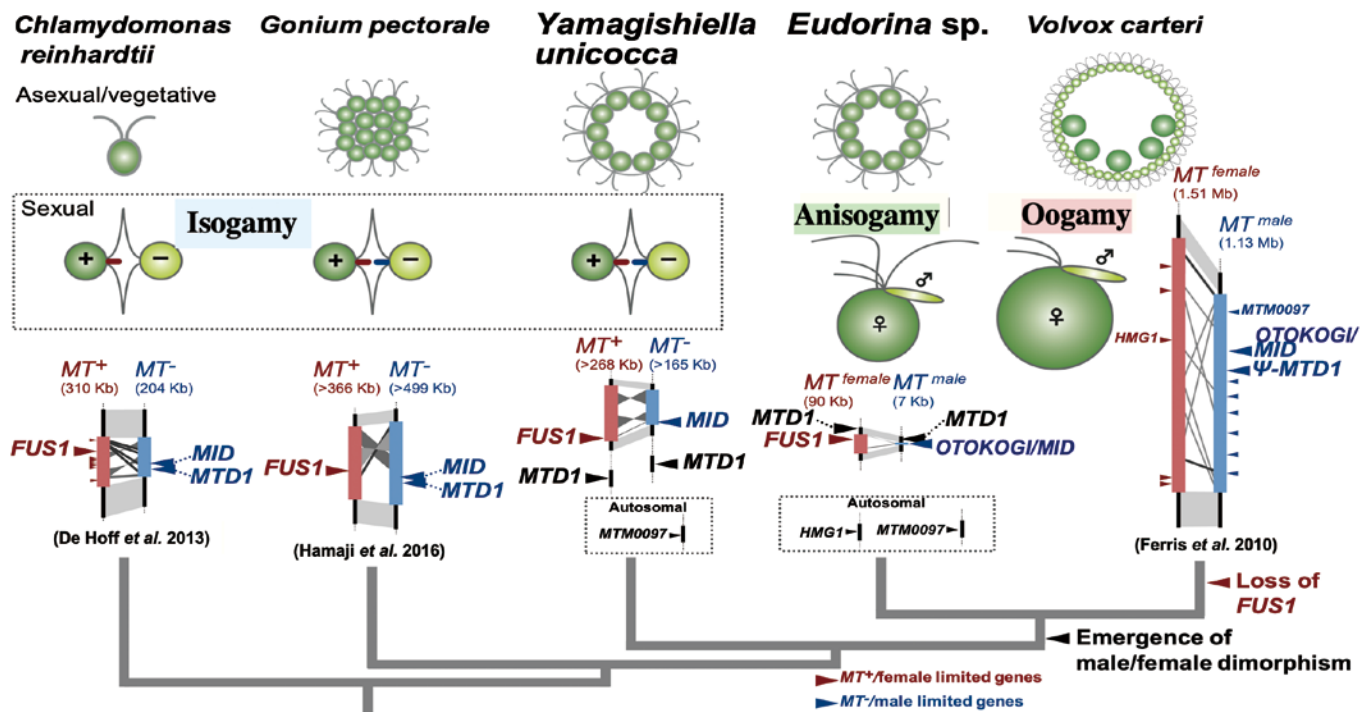


図3. 同型配偶のヤマギシエラ (*Yamagishiella*) の交配型プラスとマイナス株, 異型配偶のユードリナ (*Eudorina*) のメスとオス株, 合計4個の新規全ゲノムデータが明らかにした緑藻ボルボックス系列における性決定領域 (SDR, MT) の進化 (Hamaji *et al.* 2018). ユードリナで縮小された SDR が明らかになり, SDR の拡大と同型配偶 (isogamy) から異型配偶 (anisogamy) への進化には直接的に関連しない. MT (mating type locus) は同型配偶の交配型決定遺伝子座として使用される用語であり (Ferris & Goodenough 1994), ここでは SDR と同じである. 図は Hamaji *et al.* (2018) より一部改変して転載 (permitted by the Creative Commons CC BY license).

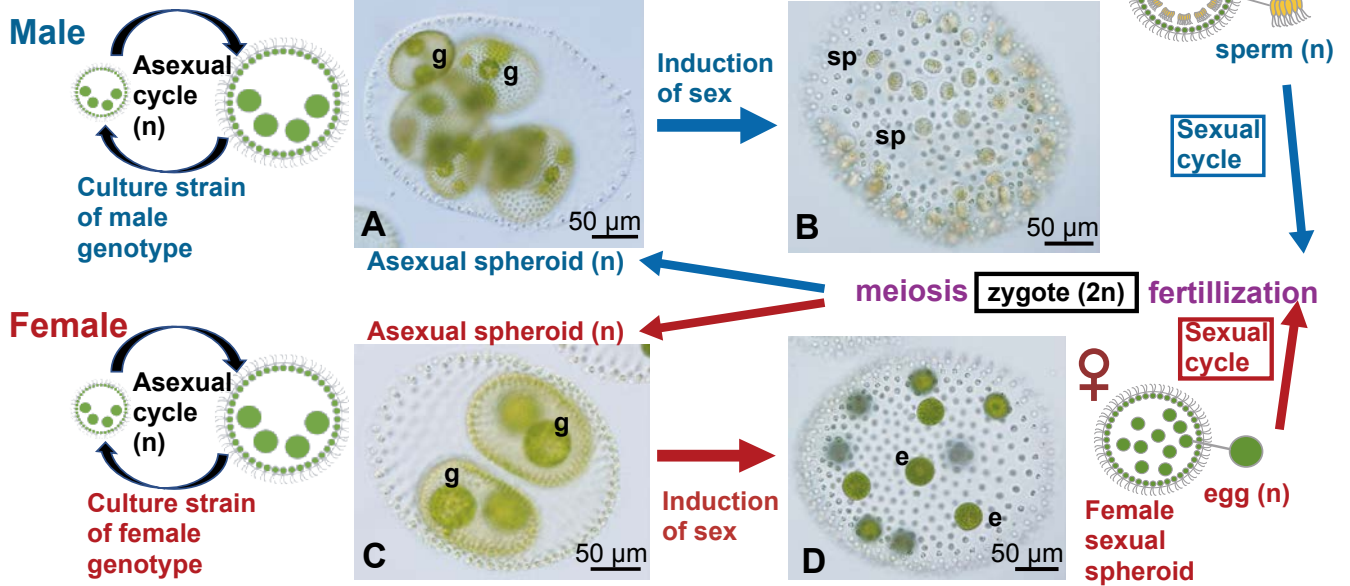
日本では報告のなかった *V. africanus* G.S. West に同定される 2 種が分離・培養された (図 4)。採集する前に琵琶湖博物館を見学し、珍しいボルボックスの写真があったので、「これどこで取れたのですか?」と尋ねた。博物館の方は親切に「毎朝あそこの棧橋から水を取って、ここでボルボックスを見せ

ていまして、その写真です。」と答えてくれた。この親切な情報のお陰で、ホモタリックからヘテロタリックの進化の転換とも言える近縁 2 種を材料とすることができ研究は大きく転換した。

琵琶湖から採取されたボルボックスの 2 種は無性群体 (多

### *Volvox reticuliferus*

#### Heterothallic mating system



### *Volvox africanus*

#### Homothallic mating system

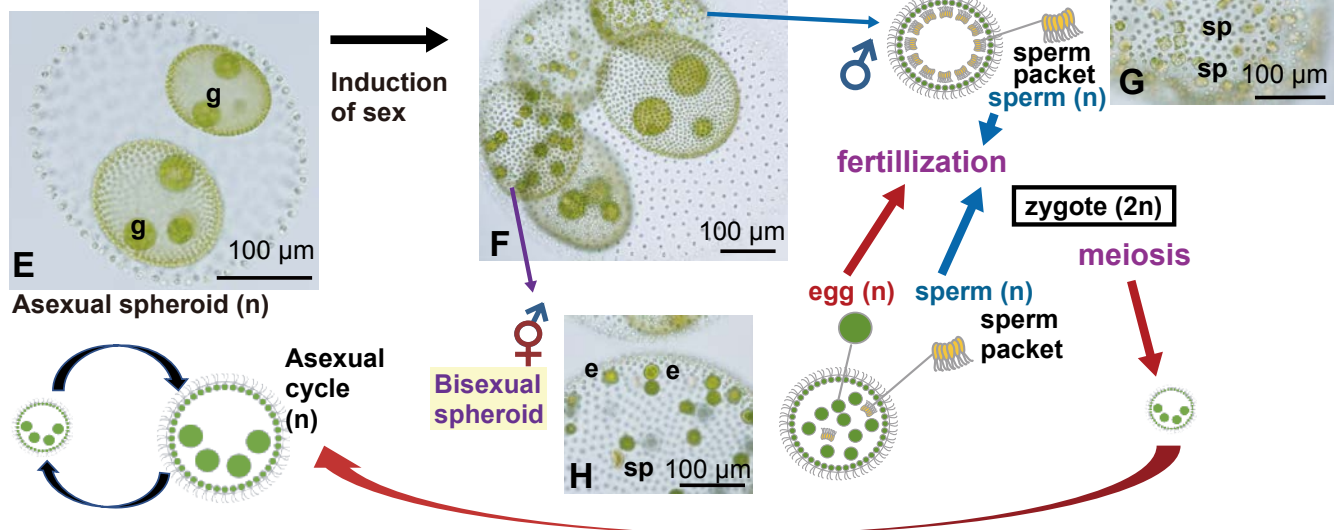


図 4. 琵琶湖産の 2 種のボルボックス (*Volvox*)。これら 2 種の無性群体は非常に類似している (A, C, E)。 *V. reticuliferus* の有性生殖はヘテロタリックであり、異なる遺伝子型の培養株でそれぞれオス群体 (male spheroid; B)、メス群体 (female spheroid; D) を形成する。 *V. africanus* は同じ遺伝子型の培養株の中で、雌雄同体の両性群体 (bisexual spheroid; H) とオス群体 (G) の両方をつくるホモタリック種である (Nozaki et al. 2015)。両種は非常に近縁でヘテロタリック種からホモタリック種への進化を探る比較生物学的研究に使用された (Yamamoto et al. 2017, 2021)。図は Yamamoto et al. (2021) より転載 (permitted by the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND))。

細胞生物だが通常「群体」とよぶ)の形態では *V. africanus* に同定されるようであったが、有性生殖が大きく異なり、ホモタリク種とヘテロタリク種であった(図4)。両者の有性生殖の形態と過去の文献を比較検討すると、ホモタリク種は日本新産 *V. africanus*、ヘテロタリク種は新種 *V. reticuliferus* Nozaki と同定された(Nozaki *et al.* 2015)。これら2種は Starr (1971) が世界各地から集めた“*V. africanus*”の4タイプの有性生殖の2タイプに相当する。Starr (1971) の“*V. africanus*”の4タイプはヘテロタリク1タイプとホモタリク3タイプであり、テキサス大学のカルチャーコレクション(UTEX-CCA)でしばらく保有されていたが(Starr & Zeikus 1993)、ホモタリク3タイプは絶滅していた(Nozaki *et al.* 2015)。

微細藻類では様々な系統でホモタリクとヘテロタリクの有性生殖が観察され、昔から興味深い問題として取り上げられてきた(市村 1973)。また、ボルボックス系列ではヘテロタリクからホモタリクへの有性生殖の進化が複数回起きていたと解析されていた(Hanschen *et al.* 2018)。しかし、この進化の分子基盤はほとんど明らかになっていなかった。琵琶湖のサンプルから確立されたこれらボルボックス2種は有性生殖の誘導も可能であったし、系統的に近縁でヘテロタリクからホモタリクへの進化の分子レベルの研究に好都合と考えられた。従って、我々は両種の性進化の分子基盤の重要な役割をもつと考えられた *OTOKOGI/MID* の比較解析(Yamamoto *et al.* 2017)、更に両種3株の全ゲノム比較解析を実施してヘテロタリクからホモタリクへの転換に伴うSDRの進化を全生物界で初めて明らかにした(Yamamoto *et al.* 2021)。

ヘテロタリク種の *V. reticuliferus* のSDRは約1 Mbと非常に大きく、オスのSDRには *OTOKOGI/MID* 等のオス特異的遺伝子が3個、メスのSDRにはメス特異的遺伝子が3個位置していた(図5)。ホモタリク種 *V. africanus* でもSDRに非常に類似した約1 Mbの性決定類似領域(SDLR)が1個保持されており、SDR/SDLR構成遺伝子の系統解析からSDLRは祖先ヘテロタリク種のメスのSDRに由来することが明らかになった(図5)。一方、オスのSDRに由来すると考えられる *OTOKOGI/MID* 等のオスの特性に重要な遺伝子は、SDLR以外のゲノム上の離れた場所に存在していた(図6)。また、ホモタリク種では *OTOKOGI/MID* が5個に縦列重複してクラスターを形成するという非常に興味深い結果を得た(Yamamoto *et al.* 2021)(図5)。

*Volvox reticuliferus* が約7千5百万年前に分岐した *V. carteri* と同様に(Ferris *et al.* 2010) 約1 Mbと非常に大きなSDRを性染色体上に保持していたことは、巨大なSDRがボルボックスの有性生殖で大きな意義を持つことを示唆する(図6)。さらに、ホモタリク種に進化しても祖先種のメスのSDRが巨大なまま残存してSDLRとなり、重要なオスの遺伝子がSDLRではない部分にバラバラに存在することは、祖先種のメス側のSDRを残存させたままオスの機能に重要な

*OTOKOGI/MID* 等の遺伝子を獲得して、メスとオスの両方の機能を備えるホモタリクが誕生したことを意味すると考えられる。ボルボックス系列において *OTOKOGI/MID* は、異型配偶・卵生殖の生物のオスまたは同型配偶生物のマイナス交配型に必ず存在する遺伝子であり(Hamaji *et al.* 2018)(図3)、同型配偶の生物ではマイナス交配型を決定する(Ferris & Goodenough 1997)。一方、最近の研究から *V. carteri* のメスに *OTOKOGI/MID* 遺伝子を導入すると精子を形成するようになることが明らかになっており(Geng *et al.* 2014)、この遺伝子が単独でメスの中でオスの機能を発現できることを示していると考えられる。一方、メスの機能を決定する、またはメスに必須の遺伝子は知られていない(Hamaji *et al.* 2018)(図3)。したがって、*V. africanus* で明らかになったホモタリク種におけるヘテロタリク祖先種のメスとオスのSDRの残存状態の差異は、メス機能とオス機能の発現機構の差異に関連する可能性を示唆する(図5, 6)。すなわち、メスの巨大なSDRが総和としてボルボックスのメスの機能を担っている可能性が考えられる。

Starr (1971) の“*V. africanus*”のホモタリクの3タイプは単系統群を構成し、ヘテロタリクのタイプ(*V. reticuliferus*)と姉妹群となる(Coleman 1999, Nozaki *et al.* 2015)。従って、ホモタリクへの進化は1回“*V. africanus*”の祖先で起き、その後ホモタリクの系統で3タイプへの多様化が起きたと考えられる。琵琶湖から再発見されたホモタリクの1タイプの培養株で明らかになった巨大なSDLRや *OTOKOGI/MID* クラスター(Yamamoto *et al.* 2021)(図5)が他のホモタリク2タイプでどのようなになっているかは非常に興味深い今後の問題である。

## 再び相模湖・津久井湖に戻り、新たなブレークスルーを目指す

職場の東京大学理学部生物学科の学部4年生を連れて相模湖・津久井湖の調査はほぼ毎年2010年あたりまでは行われていた。しかし、2011年以降状況は大きく変わった。東日本大震災が2011年3月に起き、世の中の情勢は大きく変わった。これは偶然かもしれないが、これ以降ある程度人気があった理・野崎研への学部実習希望者と院試希望者が急に無くなった(回復したのは2014年度で3名の4年生の希望者があった)。研究室は高齢化し、博士課程の学生がほとんどとなってしまった。このような情勢で若い学生をなんとか研究室に入れて研究室を活気づけようとして思いついたのが、理学部で実施しているUTRIP(海外の学部学生が理学系研究科5専攻の研究室に6週間滞在し、インターンシップを行う夏季短期プログラム)への参画である。2013年に最初のUTRIP生がシンガポール国立大学からやってきて、琵琶湖・相模湖・津久井湖の調査を実施した。私も学部学生と一緒に調査し、新規培養株を確立した。その結果が上述の琵琶湖の“*Volvox africanus*”2種(Nozaki *et al.* 2015)と相模湖・津久井湖に生育するホモタリク種 *Volvox* sp. Sagami (Nozaki *et al.* 2016)

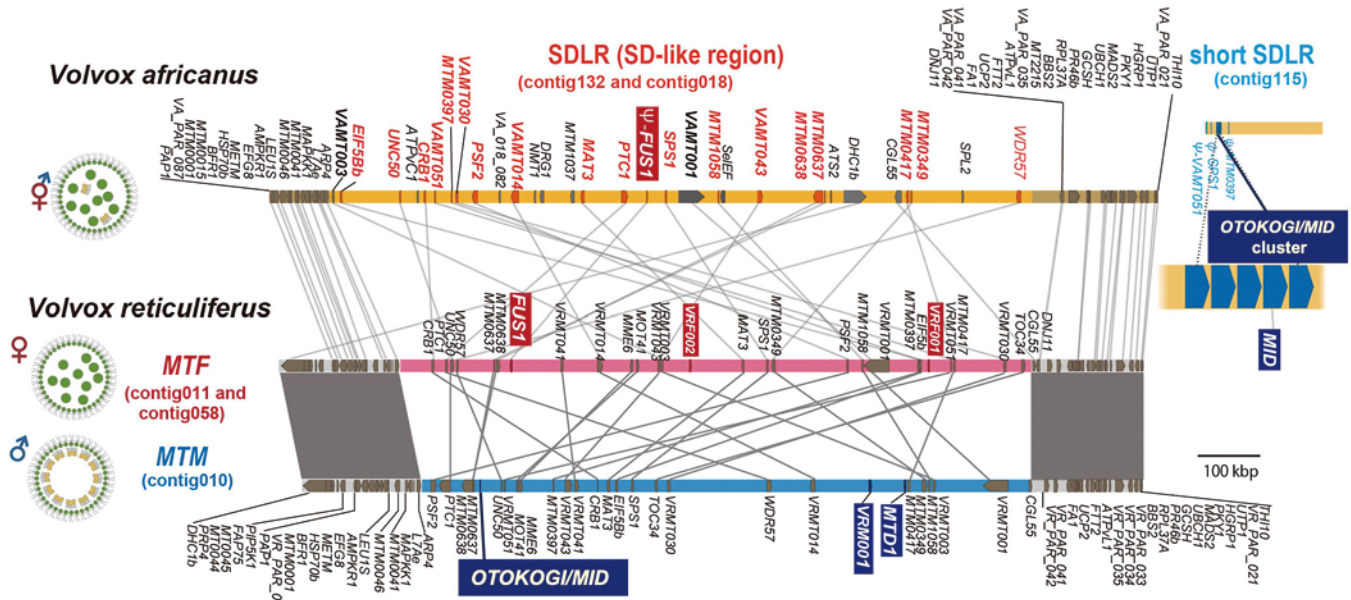


図5. 3個の全ゲノム比較解析の結果明らかになった、ヘテロタリック種 (*V. reticuliferus*) のメスとオスの性決定領域 [SDR (*MTF*, *MTM*)] と非常に近縁なホモタリック種 (*V. africanus*) のSDR相同領域 (SDLR) (Yamamoto *et al.* 2021). SDRとSDLRは約1 Mbpと巨大で、*V. africanus*のSDLRはメス由来の遺伝子をもち、オス由来の遺伝子は短い相同領域 (short SDR) に位置する。白抜きの遺伝子名は性特異的遺伝子またはこれに相同の遺伝子を表す。図はYamamoto *et al.* (2021)より転載 (permitted by the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND)).

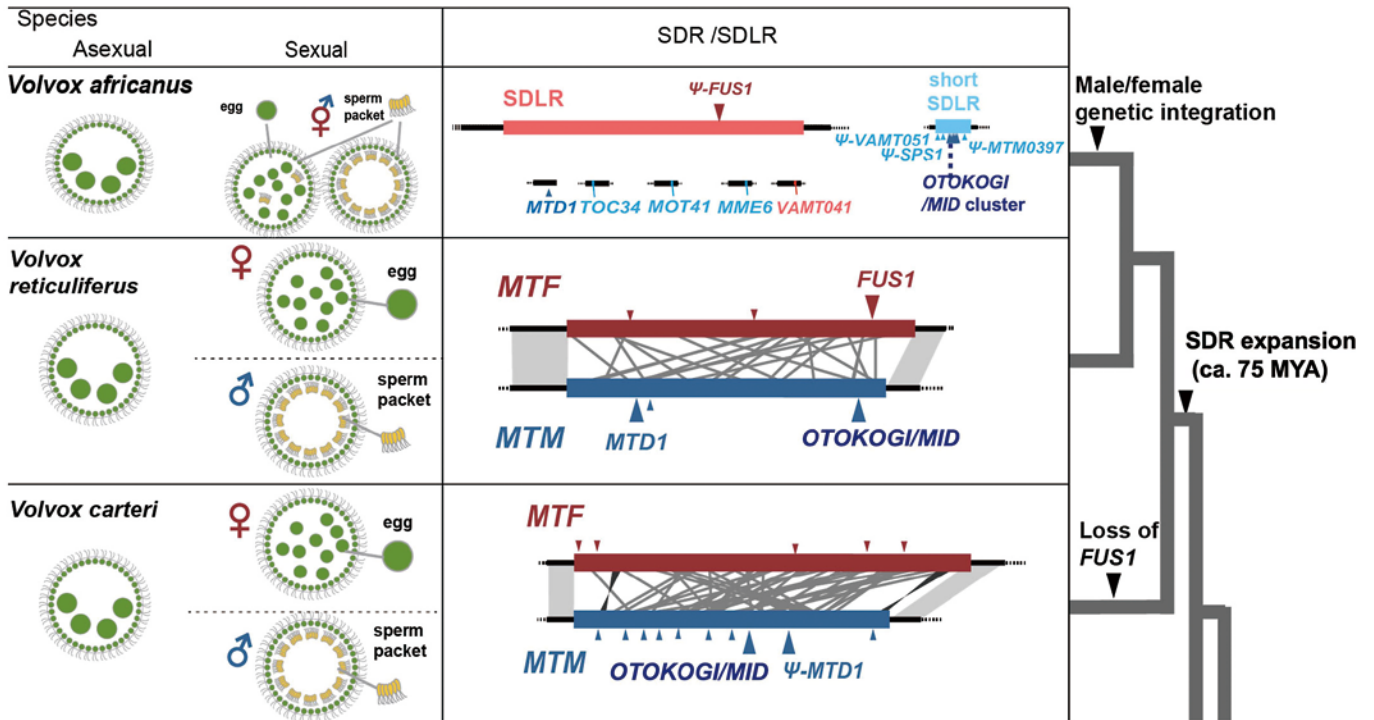


図6. 卵生殖のボルボックスの大きな単系統群 *Merriliosphaera* 節における性決定領域 [SDR (*MTF*, *MTM*)] とヘテロタリックからホモタリックへの進化 (male/female genetic integration) (Yamamoto *et al.* 2021). 本節の起源 (ca. 75 MYA) でSDRの拡大が起き、現在まで維持されていることが考えられる。図はYamamoto *et al.* (2021)より転載 (permitted by the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND)).

の研究である。

2017年にはアメリカのジョーンズホプキンス大学からのUTRIP生を迎えた。研究室のメンバーとはすぐに打ち解け、調査では積極的にサンプル採集に挑む元気な学生であった。UTRIP生は最後に研究発表をするのであるが、どんな研究をするのかなかなか決まらなかった。「簡単な実験で結果の明瞭なものはないか」と考えた結果、思い出したのが2013年に当時のシンガポールのUTRIP生と一緒に相模湖を調査し、確立した*Pleodorina starrii*の10株であった。本種は“OTOKOGI”を発見した記念すべき緑藻である。2013年の時点では「研究は大体終わっていたと思っていたが、新しい株は有性生殖が活発なので何かに利用できる」と思い培養株だけは維持していた。10株を窒素飢餓培地に入れて精子束が出るかどうか観察して、“OTOKOGI”のゲノムPCRでバンドの有無を確認することで簡単に形態と分子の両方のデータから雌雄が判別できる—そのように考えUTRIP生に実験を説明した。しばらくすると「先生、よくわかりません。見て下さい。」とUTRIP生とTAの院生から声がかかった。驚いたのは10株の中の1株に対してであった。単独で窒素飢餓にしたのに関わらず「接合子様休眠細胞」が形成されていた。このような単独で接合子をつくるホモタリク（両性型）株の*Pleodorina*は2007年に津久井湖から採集されていたのを思い出した。

2017年という年は私の定年まであと3年しかなく、興味深い両性型の*Pleodorina*を博士課程まで徹底的に研究する学生はないと思っていた。ところが2018年2月に研究室を変わって1年間で修士論文を仕上げたいという学生が突然現れた。彼は両性型株の*Pleodorina*に興味を持ち見事修士論文を仕上げ、現在博士課程で研究を継続している。ここではその途中までの成果を紹介したい。

2006年に*P. starrii*を相模湖から新種記載し(Nozaki *et al.* 2006b)、本種のオス株からオス特異的遺伝子“OTOKOGI”を発見(Nozaki *et al.* 2006a)した当時から、本種はヘテロタリク種であり、オス株とメス株しかないものと考えられていた。ところが同じ相模川水系の相模湖と津久井湖から同じ遺伝子型のクローン株の中でオスとメスの両方の配偶子を作る両性型と思われる*Pleodorina*の株がここ10年の間で2回得られていた。問題点は2個あった。第一は「休眠細胞は本当に配偶子が合体した接合子か」という問題である。ボルボックス系列では時々有性生殖しないで休眠細胞(aplanospore)を形成するものがある。相模湖に発生する*Eudorina unicocca* G.M. Smithはその1例である(Yamada *et al.* 2008)。第二は両性型と2006年に記載されたオス株・メス株からなる*P. starrii*が同じ種かどうかという問題である。微細藻類では形態的に類似して同種と同定されるものの中に遺伝的分化と生殖的隔離があり、複数の生物学的種から構成されているものが沢山ある(e.g. Coleman 1959, 1977)。

第一の問題は培養材料を窒素飢餓培地で性誘導し、DAPIによる蛍光染色でメス配偶子内へのオス配偶子核の侵入が観察され、同一株内での雌雄配偶子の接合が確認された

(Takahashi *et al.* 2021)(図7)。第二の問題は同種か別種かという問題であり、形態的種概念、分子系統学的種概念、更に生物学的種概念に基づき検討した。その結果、これらの株の間で形態・分子レベルの差異は認められなかった。また、メス・オス株と両性株の交雑実験を実施した結果、これらの株間の交雑接合子形成と子孫の生存率はメス・オス株間で交配したものとほぼ同一という結果が得られた(図8)。従って、両性株はメス・オス株と同じ種*P. starrii*であり、本種は「メス」、「オス」、「両性」という3種類の性表現型を持つ種であることが明らかになった(図9)。さらに、遺伝子解析の結果、両性型の株にはオス特異的遺伝子と考えられているOTOKOGI/MIDが存在することが明らかになった。交雑実験による遺伝学的解析から、両性株はOTOKOGIが存在するオス型のSDRをもち、常染色体領域に存在する両性型決定因子(BF)の存在が示唆された(Takahashi *et al.* 2021)。このことは*P. starrii*の3種類の性表現型が2組の独立の遺伝子領域で決定されることを示唆する(Roy 2021)(図10)。

一つの種が3タイプの性表現を持つ交配システムはトリオシー(trioecy)と呼ばれ、陸上植物や無脊椎動物では稀に「メス」、「オス」、「両性」個体が共存する種が認められている(Ray 2021)。しかし、藻類や菌類のようなシンプルなハプロイドの生物の有性生殖は種によってヘテロタリクとホモタリクの場合があり、前者は2種類の性表現型(メス, オス)、後者は1種類の両性型の性表現型を持つとされていた。ところが、相模湖川水系の湖の長期フィールド調査と培養・交配実験から、緑藻ボルボックス系列の*P. starrii*がメスとオスに加えて両性型の3番目の性表現型を持つことを明らかにした(Takahashi *et al.* 2021)。メス, オス, 両性型の3個の性表現が同一種に存在するトリオシーの交配システムを持つ種はシンプルな性決定システムともつとされてきた藻類・菌類では初めての発見であり、3種類の性表現型が2組の独立の遺伝子座により決定されているのは全生物界でこれまでに報告がない(Roy 2021)。

*Pleodorina starrii*はメスとオスが分かれているヘテロタリクの種から両性型のホモタリクの種への進化的初期段階とも考えられる。3個の性表現のSDRはどのようなになっているのか？両性型では同じ遺伝子型でどのような分子メカニズムでメス群体とオス群体を分化するのか？オス型SDRをもつものを両性型にする決定因子BFは常染色体領域に存在すると予想されるヘテロタリク種からホモタリク種へ転換する進化の鍵遺伝子であり、一体どのような遺伝子か？次のブレークスルーへの展望は色々考えられる。従って今後、本種の3個の性表現型の分子遺伝学的基盤の解明のためのゲノム生物学的研究が期待される。また、他の種にも*P. starrii*のように3個の性表現を持つ微細藻類が自然界には実際に存在することが十分考えられる。従って、他種における長期間の同様の継続的研究が期待される。



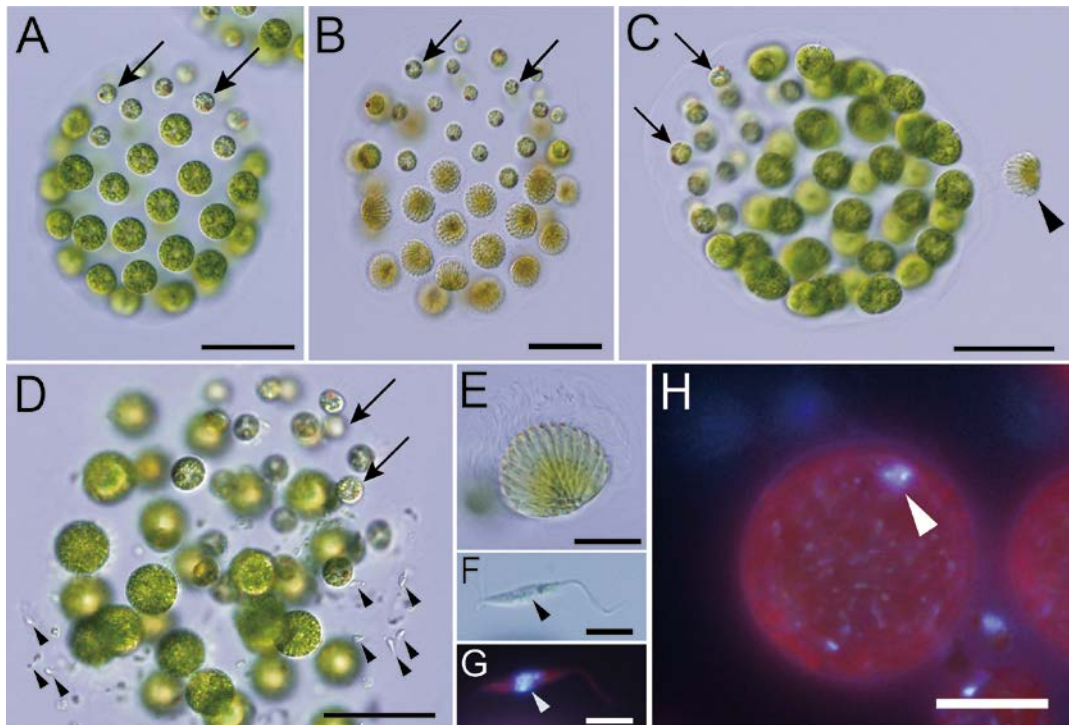


図7. 相模湖産のプレオドリナ (*Pleodorina*) の両性型株の無性群体と有性生殖 (Takahashi *et al.* 2021). (A) 無性群体. これまで本湖沼から報告されていたメスまたはオスの *Pleodorina starrii* の単性型株 (Nozaki *et al.* 2006a) と差異は認められず, 群体の前方部に小さな非生殖細胞 (矢印) をもつ. スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ . (B–H) 有性生殖. 窒素飢餓培地で培養すると単独株中で雌雄の配偶子を形成し, 接合が完了する. スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  (B–D), 10  $\mu\text{m}$  (E, H), 5  $\mu\text{m}$  (E, G). (B) オス群体. 生殖細胞がオス配偶子 (精子) の集合体である精子束に分化している. 矢印は非生殖細胞. (C) メス群体とオス群体から飛び出した精子束 (矢尻). メス群体は生殖細胞がメス配偶子に分化している. 矢印は非生殖細胞. (D) メス群体に到達した精子束は分離して単一のオス配偶子 (矢尻) となりメス群体内に突入する. 矢印はメス群体の非生殖細胞. (E) 精子束. (F) 単一のオス配偶子. 矢尻は核を示す. (G) DAPI による蛍光染色により, オス配偶子の核 (矢尻) は強く染色される. (H) DAPI による蛍光染色でメス配偶子内へのオス配偶子核 (矢尻) の侵入が観察され, 同一株内での雌雄配偶子の接合が確認された. 写真は Takahashi *et al.* (2021) から転用, 写真の配列と文字・記号を高橋昂平氏が改変 (permitted by the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (CC BY-NC 4.0)).

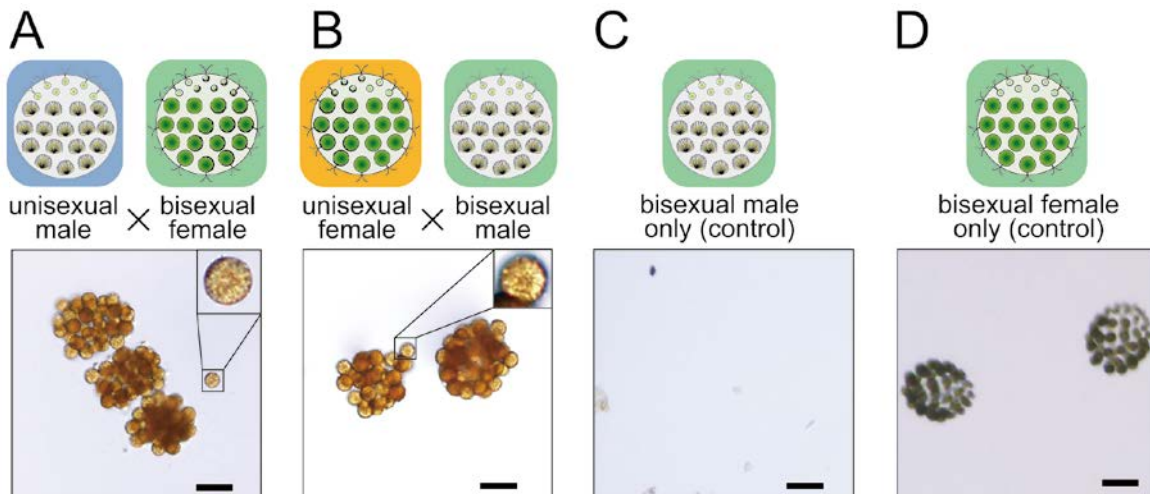


図8. 相模湖産のプレオドリナ (*Pleodorina starrii*) の単性型メス・オス株 (unisexual male/female) と両性型株 (bisexual) の交雑実験 (Takahashi *et al.* 2021). 全てのスケールバーは 50  $\mu\text{m}$ . 単性型オス株と両性型株から分離したメス群体との交雑 (A) と単性型メス株と両性型株から分離したオス群体との交雑 (B). どちらも単性型オスとメスを交配させた場合と同じように接合子が形成される. この接合子から得た F1 群体の生存率も単性型オスとメスを交配させた場合と同様に 80% 程度であり, 両者に生殖的隔離はない. (C, D) 両性型株からオス群体だけ (C), またはメス群体だけ (D) 分離して培養しても接合子はできないので, 交雑実験 (A, B) で両性型同士の接合子が形成されないのがわかる. Takahashi *et al.* (2021) から転載 (permitted by the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (CC BY-NC 4.0)).

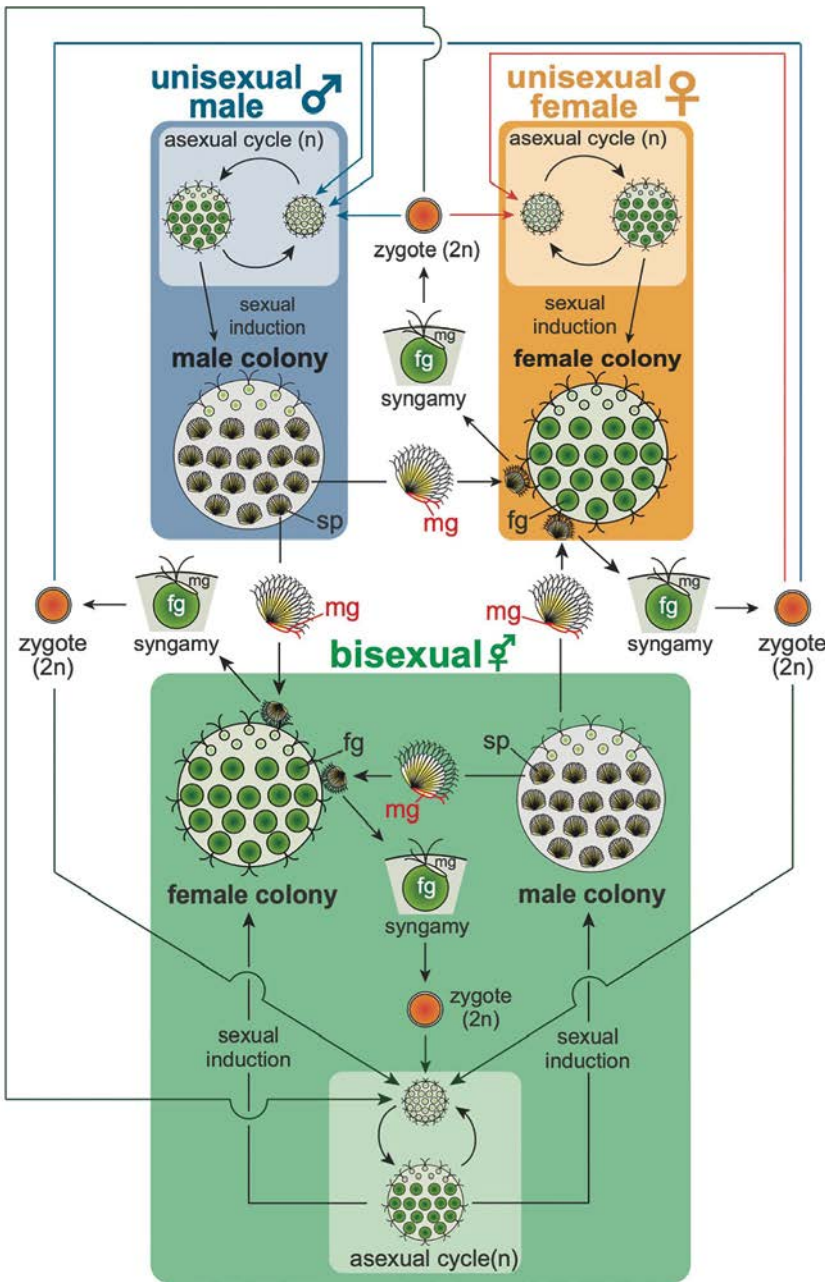


図9. 長期間にわたる相模川水系の湖沼現地調査と培養実験から明らかになった3タイプの性表現型〔単性型オス (unisexual male), 単性型メス (unisexual female), 両性型 (bisexual)〕を持つ群体性ボルボックス系列の1種 *Pleodorina starrii* の推定される生活環. いずれのタイプも栄養増殖条件下ではハプロイド (n) で無性生殖 (asexual cycle) で増殖する. 窒素飢餓等による性誘導 (sexual induction) すると, 単性型オスは生殖細胞がオス配偶子 (male gamete, mg) の集合体である精子束 (sperm packet, sp) に分化したオス群体 (male colony) のみ, 単性型メスは生殖細胞がメス配偶子 (female gamete, fg) に分化したメス群体 (female colony) のみを形成する. 一方, 両性型は性誘導するとオスとメス両群体を形成する. 単性型または両性型のオス群体から飛び出した精子束は, 単性型または両性型のメス群体に泳いで到達後単一のオス配偶子に分かれてメス群体内部のメス配偶子と接合 (syngamy) し, ディプロイド (2n) の接合子 (zygote) を形成する. 接合子からは交配の組み合わせによって異なる割合で3タイプのいずれかに発達する. Takahashi *et al.* (2021) から転載 (permitted by the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (CC BY-NC 4.0)).

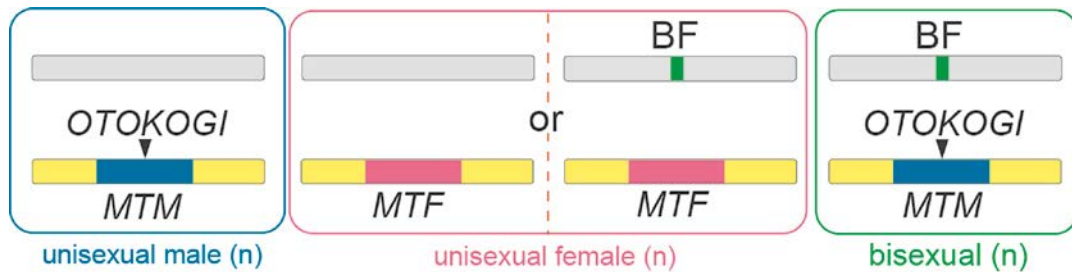


図10. *Pleodorina starrii* (図9) の交配実験による遺伝学的解析結果から予想される遺伝子型 (上段枠内) と性表現型 (下段). 本種の3タイプの性表現型〔単性型オス (unisexual male), 単性型メス (unisexual female), 両性型 (bisexual)〕は常染色体領域 (灰色) に存在する両性型決定因子 (BF) と “*OTOKOGI*” が位置する性決定領域 [SDR (オス *MTM* またはメス *MTF*)] で決定される. 2組の独立の遺伝子座から3個の性表現型が決定されるトリオシー (trioecy) の種は陸上植物や無脊椎動物を考慮してもこれまでに報告がない (Roy 2021). Takahashi *et al.* (2021) から転載 (permitted by the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (CC BY-NC 4.0)).

## さいごに

平日に都心を抜け出して電車・新幹線に乗り、別世界とも思える湖を訪れる。ボートにも乗れる。これが以上の研究の研究上の興味以外の大きなモチベーションであり、採集するものをあまり期待しなくても長年調査が継続できた理由でもある。その結果、思いがけない発見があり、藻類研究が大きく発展した。このような研究態度に飽きもしないで研究協力をしてくださった現地の方々、共同研究者に感謝したい。プレオドリナの種小名は私が若いころいつも優しく応援してくれたテキサス大学の Richard Starr 博士 (1924–1989) に献名したものである (Nozaki *et al.* 2006b)。本稿で紹介したように本種から 2 個の大発見があったのは Starr 博士の草葉の陰からの応援によるものかもしれないと思っている。ここに厚く御礼申しあげたい。

## 引用文献

- Bell, G. 1985. The origin and early evolution of germ cells as illustrated by the Volvocales. In: Halvorson, H. O. & Monroy, A. (eds.) The origin and evolution of sex. pp. 221–256. Alan R. Liss, New York.
- Charlesworth, B. 1978. The population genetics of anisogamy. *J. Theor. Biol.* 73: 347–357. doi.org/10.1016/0022-5193(78)90195-9
- Charlesworth, D. & Charlesworth, B. 2010. Evolutionary biology: the origins of two sexes. *Curr. Biol.* 20: R519–R521. doi.org/10.1016/0022-5193(78)90195-9.1016/j.cub.2010.05.015
- Coleman, A. W. 1959. Sexual isolation in *Pandorina morum*. *J. Protozool.* 6: 249–264.
- Coleman, A. W. 1977. Sexual and genetic isolation in the cosmopolitan algal species *Pandorina morum*. *Am. J. Bot.* 64: 361–368.
- Coleman, A. W. 1999. Phylogenetic analysis of “Volvocaceae” for comparative genetic studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 13892–13897.
- De Hoff, P. L., Ferris, P., Olson, B. J. S. C., Miyagi, A., Geng, S. & Umen, J. G. 2013. Species and population level molecular profiling reveals cryptic recombination and emergent asymmetry in the dimorphic mating locus of *C. reinhardtii*. *PLoS Genet.* 9:e1003724. doi.org/10.1371/journal.pgen.1003724
- Ferris, P. J., Armbrust, E. V. & Goodenough, U. W. 2002. Genetic structure of the mating-type locus of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 160: 181–200. doi.org/10.1093/genetics/160.1.181
- Ferris, P. J. & Goodenough, U. W. 1994. The mating-type locus of *Chlamydomonas reinhardtii* contains highly rearranged DNA sequences. *Cell* 76: 1135–1145. doi.org/10.1016/0092-8674(94)90389-1
- Ferris, P. J. & Goodenough, U. W. 1997. Mating type in *Chlamydomonas* is specified by *mid*, the minus-dominance gene. *Genetics* 146: 859–869. doi.org/10.1093/genetics/146.3.859
- Ferris, P., Olson, B. J., De Hoff, P. L. *et al.* 2010. Evolution of an expanded sex-determining locus in *Volvox*. *Science* 351–354. doi.org/10.1126/science.1186222
- Geng, S., De Hoff, P. & Umen, J. G. 2014. Evolution of sexes from an ancestral mating-type specification pathway. *PLoS Biol.* 12: e1001904. doi.org/10.1371/journal.pbio.1001904
- Hamaji, T., Kawai-Toyooka, H., Uchimura, H. *et al.* 2018. Anisogamy evolved with a reduced sex-determining region in volvocine green algae. *Commun. Biol.* 1: 17. doi.org/10.1038/s42003-018-0019-5
- Hamaji, T., Mogi, Y., Ferris, P. J. *et al.* 2016. Sequence of the *Gonium pectorale* mating locus reveals a complex and dynamic history of changes in volvocine algal mating haplotypes. *G3 (Bethesda)* 6: 1179–1189. doi.org/10.1534/g3.115.026229
- Hanschen, E. R., Herron, M. D., Wiens, J. J., Nozaki, H. & Michod, R. E. 2018. Repeated evolution and reversibility of self-fertilization in the volvocine green algae. *Evolution* 72: 386–398. doi.org/10.1111/evo.13394
- Huxley, J. 1912. The individual in the animal kingdom. Cambridge University Press, Cambridge.
- 市村輝宣 1971. 微細藻類の培養に関するあれこれ (1). *遺伝* 25(12): 69–72.
- 市村輝宣 1973. 微細藻類の培養に関するあれこれ (4). *遺伝* 27(2): 62–66.
- Kimbara, R., Isaka, N., Matsuzaki, R., Kawai-Toyooka, H., Kawachi, M. & Nozaki, H. 2019. Morphological and molecular identification of the dioecious “African species *Volvox rousselletii* (Chlorophyceae) in the water column of a Japanese lake based on field-collected and cultured materials. *PLoS One* 14: e0221632. doi.org/10.1371/journal.pone.0221632
- Kirk, D. L. 1998. *Volvox*. Molecular-genetic origins of multicellularity and cellular differentiation. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kirk, D. L. 2006. Oogamy: inventing the sexes. *Curr. Biol.* 16: R1028–R1030. doi.org/10.1016/j.cub.2006.11.015
- Lindsey, C. R., Rosenzweig, E. & Herron, M. D. 2021. Phylotranscriptomics points to multiple independent origins of multicellularity and cellular differentiation in the volvocine algae. *BMC Biol.* 19: 182. doi.org/10.1186/s12915-021-01087-0
- Matsuzaki, M., Misumi, O., Shin-i, T. *et al.* 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428: 653–657. doi.org/10.1038/nature02398
- 西野麻知子 2018. 7-2 固有種. 内藤正明 (監修) 琵琶湖ハンドブック三訂版. pp. 152–153. 滋賀県琵琶湖環境部琵琶湖保全再生課, 大津市, 滋賀県.
- 野崎久義 1986. 群体性オオヒゲマワリ目 (緑藻植物) の有性生殖. *藻類* 34: 232–247.
- 野崎久義 1995. 群体性ボルボックス目 (緑藻植物) の系統—形態学と塩基配列からの両アプローチ. *Plant Morphol.* 7: 19–27.
- Nozaki, H. 2003. Origin and evolution of the genera *Pleodorina* and *Volvox* (Volvocales). *Biologia* 58: 425–431.
- Nozaki, H. 2008. A new male-specific gene “*OTOKOGI*” in *Pleodorina starrii* (Volvocaceae, Chlorophyta) unveils the origin of male and female. *Biologia* 63: 772–777. doi.org/10.2478/s11756-008-0097-9
- 野崎久義 2008. はじめて明らかになった雌雄の起源—群体性ボルボックス目のオス特異的遺伝子 “*OTOKOGI*”. *Plant Morphol.* 19: 55–64.
- 野崎久義 2010. 淡水藻類の一分類学者の軌跡 “時の流れに身をまかせて”. *分類* 10: 97–115.
- 野崎久義 2019. ライフサイクルと微細なかたちに魅せられて. *Plant Morphol.* 31: 37–45.
- Nozaki, H., Matsuzaki, R., Yamamoto, K., Kawachi, M. & Takahashi, F. 2015. Delineating a new heterothallic species of *Volvox* (Volvocaceae, Chlorophyceae) using new strains of “*Volvox africanus*”. *PLoS One* 10: e0142632. doi.org/10.1371/journal.pone.0142632
- 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. doi.org/10.1006/mpev.2000.0831

- Nozaki, H., Mori, T., Misumi, O., Matsunaga, S. & Kuroiwa, T. 2006a. Males evolved from the dominant isogametic mating type. *Curr. Biol.* 16: R1018–R1020. doi.org/10.1016/j.cub.2006.11.019
- Nozaki, H., Ott, F. D. & Coleman, A. W. 2006b. Morphology, molecular phylogeny and taxonomy of two new species of *Pleodorina* (Volvoceae, Chlorophyceae). *J. Phycol.* 42: 1072–1080.
- Nozaki, H., Takano, H., Misumi, O. *et al.* 2007. A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the hot-spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *BMC Biol.* 5: 28. doi.org/10.1186/1741-7007-5-28
- Nozaki, H., Ueki, N., Isaka, N. *et al.* 2016. A new morphological type of *Volvox* from Japanese large lakes and recent divergence of this type and *V. ferrisii* in two different freshwater habitats. *PLoS One* 11: e0167148. doi.org/10.1371/journal.pone.0167148
- 玉基英・竹門康弘 2008. 河川地形が微粒状有機物の流下距離に及ぼす影響. 京都大学防災研究所年報 51B: 815–828.
- Roy, S. W. 2021. Digest: Three sexes from two loci in one genome: A haploid alga expands the diversity of trioecious species. *Evolution* 75: 3002–3003. doi.org/10.1111/evo.14345
- Starr, R. C. 1971. Sexual reproduction in *Volvox africanus*. In: Parker, B. C. & Brown R. M. Jr. (eds.) *Contribution in phycology*, pp. 59–66. Allen Press, Kansas.
- Starr, R. C. & Zeikus, J. A. 1993. UTEX—The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin. *J. Phycol.* 29(S2): 1–106.
- Takahashi, K., Kawai-Toyooka, H., Ootsuki, R. *et al.* 2021. Three sex phenotypes in a haploid algal species give insights into the evolutionary transition to a self-compatible mating system. *Evolution* 75: 2984–2993. doi.org/10.1111/evo.14306
- Weismann, A. 1892. *Essays upon heredity and kindred biological problems*. Clarendon Press, Oxford.
- Yamada, T. K., Miyaji, K. & Nozaki, H. 2008. A taxonomic study of *Eudorina unicocca* (Volvocaceae, Chlorophyceae) and related species, based on morphology and molecular phylogeny. *Eur. J. Phycol.* 43: 317–326.
- Yamamoto, K., Hamaji, T., Kawai-Toyooka, H. *et al.* 2021. Three genomes in the algal genus *Volvox* reveal the fate of a haploid sex-determining region after a transition to homothallism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 118: e2100712118. doi.org/10.1073/pnas.2100712118
- Yamamoto, K., Kawai-Toyooka, H., Hamaji, T. *et al.* 2017. Molecular evolutionary analysis of a gender-limited *MID* ortholog from the homothallic species *Volvox africanus* with male and monoecious spheroids. *PLoS One* 12: e0180313. doi.org/10.1371/journal.pone.0180313

(2021年10月21日受付, 2021年11月30日受理)  
通信担当編集委員: 芹澤(松山) 和世