

論文の内容の要旨

Studies on parallel evolution of multicellular traits by comparative embryology and genomics of the volvocine green algae

(ボルボックス系列緑藻の比較発生学的解析と比較ゲノム解析による
多細胞形質の平行進化に関する研究)

山下 翔大

1. 総合序論

単細胞生物から多細胞生物への進化は生物の複雑性や多様性をもたらした事象であり、生命の歴史の中で 25 回以上独立に起こっている[1]。その多細胞系統の多くで三次元的なボディプランや細胞分化などの多細胞形質も独立に獲得されてきたが、主要な多細胞系統では単細胞祖先と複雑な多細胞体の中間段階が現存せず、これら形質の進化に関する研究は困難であった。

多細胞性の中間的形質をもつ属や種を幅広く含む系統であるボルボックス系列緑藻は多細胞性進化のモデル生物群とされ、多細胞形質の進化的研究が活発に進められている。このグループ内においては細胞数の増加に伴う形質の平行進化がみられ、球状群体の進化が独立に 2 回起こっており、これら 2 系統では非生殖細胞の進化も認められる[2-4](図 1)。このうちボルボックス科は、モデル生物であるボルボックスを中心に胚発生過程における球状群体形成機構の細胞生物学的解析や細胞分化の分子基盤が研究されており、全ゲノム情報も複数種で解読されている。しかし、もう一方の系統であるアストレフォメネにおいては同様の研究がなされておらず、ボルボックス系列緑藻の多細胞形質の平行進化に共通性や普遍性があるかどうか不明であった。本研究では、多細胞形質の平行進化を比較発生学的研究と比較ゲノム生物学的研究から明らかにすることを目的とし、特にアストレフォメネに着目した研究を行なった。

2. アストレフォメネの胚発生における球状群体形成の細胞レベルのメカニズムの解析

球状群体に関して、ボルボックス科は胚発生において連続する細胞分裂ののち、基底小体が内側を向いた杯状／壺状の細胞層を裏返して各細胞の基底小体が外側を向いた球状とする「反転」という形態形成運動を行ない球状群体を形成する。一方、アストレフォメネは反転を行わずに球状群体を形成することが知られていたが[5]、発生に関する知見は乏しく、球状群体形成のメカニズムも未知であった。

そこで、光学顕微鏡タイムラプス撮影による連続観察と間接蛍光抗体法による細胞構造の染色観察を行ない、アストレフォメネの胚発生を解析し、細胞数が同程度であるボルボックス科のユードリナと比較した（図 2a, b）。アストレフォメネの胚発生では各細胞質分裂後に娘原形質体の回転が起こることで細胞分裂面の角度が変化し、細胞層が徐々に球状となっていく様子が観察された（図 2a）。基底小体と核の位置からも娘原形質体の回転が支持され、ステージの進行とともに各原形質体の基底小体が胚の後方へと移動していた（図 2a）。一方、ボルボックス科ユードリナの胚発生では細胞数の多いボルボックスの胚発生[6,7]と同様に娘原形質体の回転、基底小体の移動が起こらず、細胞分裂終了後に細胞の葉緑体端の突起形成を伴う反転によって基底小体を外側に向けた球状群体となった（図 2b）。すなわち、アストレフォメネとボルボックス科は細胞レベルで異なる球状群体形成メカニズムを有することが明らかとなった。

3. ゴニウムとテトラバエナの胚発生における平面状群体形成の解析

第 2 章よりアストレフォメネとボルボックス科における異なる球状群体形成メカニズムが明らかとなったが、より祖先的な平面状群体を形成する種について、これまでの胚発生の観察研究[8–10]からは球状群体を形成する種との細胞レベルの違いが不明瞭であり、これら球状群体形成メカニズムがどのように進化したかは不明であった。

そこで、平面状群体を形成する種であるゴニウムとテトラバエナについて、光学顕微鏡タイムラプス撮影による連続観察と間接蛍光抗体法による細胞構造の染色観察を行ない、胚発生を詳細に解析した（図 2c, d）。ゴニウムの胚発生では細胞分裂終了後にカップ状の細胞層が徐々に広がり平面となる様子が（図 2c）、テトラバエナの胚発生では細胞分裂終了時点で親群体と同様の細胞の並びとなる様子が（図 2d）それぞれ観察された。ゴニウムやテトラバエナの胚発生ではアストレフォメネの細胞分裂期のような娘原形質体の回転やボルボックス科の反転時のような葉緑体端の突起形成はみられなかった。すなわち、アストレフォメネの細胞分裂期の娘原形質体の回転と、ボルボックス科の細胞分裂期終了後、反転時の葉緑体端の突起形成は、それぞれ共通祖先からの分岐後に独立に獲得されたことが示唆された（図 3）。

4. アストレフォメネの全ゲノム解析

ボルボックスでは非生殖細胞の分化を担う遺伝子群が同定されている。特に、*regA* は非生殖細胞で発現する転写因子であり非生殖細胞の分化を制御する鍵遺伝子である[11]が、これは祖先的な遺伝子である *rlsD/RLS1* ホモログのボルボックス科でのタンデム重複と、その

後の機能分化により獲得されたと考えられている[12–13]。また、ボルボックスの非生殖細胞では光合成関連遺伝子群が、運動性をもたない生殖細胞では鞭毛関連遺伝子が、それぞれ発現抑制されており、細胞分化に寄与している[14–15]。

そこで、アストレフォメネの全ゲノムデータを Illumina Hiseq および PacBio Sequel を用いて構築し、RNA-seq データに基づきアノテーションを行なったのち、細胞分化に関わる分子基盤を探索した。アストレフォメネの *RLS1* ホモログの探索と近傍領域の解析を行なったところ、ボルボックス科にみられるような *RLS1* ホモログの重複はなく（図 4）、アストレフォメネが異なる分子基盤の進化によって細胞分化を獲得したことが示唆された。

また、アストレフォメネの同調培養系より群体を破碎し、密度勾配遠心により非生殖細胞と生殖細胞を分離する手法を開発し（図 5a）、細胞別 RNA-seq を行ない遺伝子発現を比較した。その結果、鞭毛関連遺伝子の多くが非生殖細胞で、光合成関連遺伝子の多くが生殖細胞で、それぞれ発現が高く（図 5b）、アストレフォメネにおいてもボルボックスと同様の細胞分化パターンがみられた。また、非生殖細胞特異的に発現する MYB 転写因子、RWP-RK 転写因子様遺伝子など、アストレフォメネにおいて非生殖細胞分化を担う遺伝子の候補も見出された。すなわち、ボルボックスとアストレフォメネでは、細胞分化の制御因子について異なる分子基盤の進化が寄与したことが示唆されたが、制御される遺伝子発現パターンは共通していることが示された。

5. 総合考察

本研究より、ボルボックス系列緑藻における異なる細胞レベルのメカニズムの獲得による形態的に類似した球状群体の平行進化、異なる制御因子の獲得による類似した遺伝子発現をもつ非生殖細胞の平行進化が明らかとなった。すなわち、普遍的な多細胞形質である三次元的なボディプランや細胞分化について、共通の多細胞祖先をもつ近縁な系統においても平行進化が起こったことが示唆された。本研究で確立されたアストレフォメネの新規培養株や細胞分離法、ゲノムデータ等を活用し、娘原形質体の回転の分子基盤の探索や、発見された細胞分化制御因子候補の解析等を進めていくことで、ボルボックス系列緑藻における多細胞形質の平行進化が分子レベルで解明され、多細胞生物初期進化における形質進化の多様性や共通性、法則性への理解が深まることが期待される。

引用文献

1. Grosberg & Strathmann (2007) *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38: 621–654
2. Nozaki & Ito (1994) *J. Phycol.* 30: 353–365
3. Nozaki *et al.* (2000) *Mol. Phylogenet. Evol.* 17: 256–268
4. Herron *et al.* (2009) *PNAS* 106: 3254–3258
5. Pocock (1954) *Trans. R. Soc. S. Afr.* 34: 103–127
6. Viamontes & Kirk (1977) *J. Cell Biol.* 75 719–730
7. Green & Kirk (1981) *J. Cell Biol.* 91 743–755
8. Hallmann (2006) *Protist* 157: 445–461
9. Iida *et al.* (2013) *J. Plant Res.* 126: 699–707
10. Arakaki *et al.* (2013) *PLOS ONE* 8: e81641
11. Kirk *et al.* (1999) *Development* 126: 639–647
12. Duncan *et al.* (2007) *J. Mol. Evol.* 65 1–11
13. Grochau-Wright *et al.* (2017) *J. Evol. Biol.* 30: 1205–1218
14. Meissner *et al.* (1999) *Curr. Genet.* 36: 363–370
15. Matt & Umen (2018) *G3* 8, 531–550

