

論文の内容の要旨

論文題目 Evolutionary biological studies on the initial stage of multicellularity based on comparative analyses of volvocine green algae
(緑藻ボルボックス系列を用いた多細胞化初期段階の進化生物学的研究)

氏名 新垣 陽子

1. 研究背景

動物や陸上植物に代表される複雑な細胞分化をもつ生物は、単細胞性祖先が多細胞性を進化させること(多細胞化)で生じた。このような多細胞化は、真核生物の様々な系統で独立に25回以上起きたとされている[1]。しかし、動物や陸上植物での多細胞化は約6-10億年前に起きたとされ[2]、単細胞性から多細胞性への進化的中間段階の種が現存していないために、生物学的な解析が困難である。一方、緑藻綱ボルボックス目内のボルボックス系列と呼ばれる系統は、単細胞性祖先から約2億年前に多細胞化したと考えられており[3]、単細胞性のクラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)から細胞分化のみられる500細胞性以上のボルボックス(*Volvox carteri*)にかけて、細胞の数や分化レベルで進化的中間段階と考えられる複数の種を含むため、多細胞化のモデル生物群である[4](図1)。最近、細胞分化のみられない8または16細胞性のゴニウム(*Gonium pectorale*)の比較ゲノム解析より、細胞周期関連遺伝子群の進化が本系列の多細胞化初期に寄与した可能性が示唆された[5]。一方、本系列には4細胞性で、より祖先的な系統的位置のテトラバエナ(*Tetrabaena socialis*)が存在する[3, 6]。しかしこれまで、テトラバエナでは細胞形態学的・分子生物学的な研究がほとんど行われていなかったために、本系列の多細胞化初期の進化については不明な点が多かった[3]。

ボルボックス系列藻類はmultiple fissionと呼ばれる連続した複数回の細胞分裂により個体を増やすが、単細胞性の種と多細胞性の種では細胞質分裂の様式が異なると考えられる[3](図2)。しかし、本系列および本系列以外の生物に関しても細胞質分裂関連遺伝子に着目した、多細胞化に関する研究はこれまで行われていない。

本研究でははじめに、4細胞性ボルボックス系列緑藻テトラバエナの細胞形態学的解析を実施し、多細胞性に重要な形質[4]を持つことを明らかにした。その上で新たに構築した本

種のゲノム情報を利用し、先行研究 [5]で指摘された細胞周期関連遺伝子群の比較解析を行った。また、細胞質分裂と多細胞化との関連を調べるため、陸上植物において細胞質分裂に関与するダイナミン様タンパク質 (dynamamin related protein: DRP) DRP1 [7]について、単細胞性のクラミドモナスと多細胞性のテトラバエナ、ゴニウムでの比較解析を実施した。

2.4 細胞性ボルボックス系列緑藻 *Tetrabaena socialis* の細胞形態学的解析

多細胞性のボルボックス系列緑藻は複数の細胞が 1 個体として遊泳するため、単細胞性のクラミドモナスとは鞭毛根の配置が異なることが知られている [4,8]。また、多細胞性の種では multiple fission 時に不完全な細胞質分裂が生じ、娘細胞間に原形質の架橋 (cytoplasmic bridges: CBs) が形成されることで、多細胞体を形成する [4,9]。4 細胞性のテトラバエナにおいて、より細胞数の多い種で重要とされるこれら 2 形質の有無を明らかにするため、テトラバエナの同調培養系を確立して形態観察を行った。免疫蛍光染色法による鞭毛根の観察より、テトラバエナの鞭毛根はクラミドモナスの回転対称な配置 [10] と異なり、多細胞性のゴニウム [11] と同様に各細胞が非回転対称な鞭毛根をもつことが明らかとなった (図 3)。次にテトラバエナの細胞質分裂時の 4 細胞期の細胞を透過型電子顕微鏡により観察したところ、4 個の隣り合う娘細胞どうしが CBs で接続されていることが明らかになった (図 4)。これは、テトラバエナの multiple fission においてゴニウムやボルボックスと同様に不完全な細胞質分裂が行われていることを意味する (図 4)。したがって、4 細胞のテトラバエナは多細胞生物としての細胞形態学的特徴を備えており、最も細胞数の少ない統合された多細胞生物であると結論した。また、ボルボックス系列ではテトラバエナ、ゴニウム、ボルボックスの共通祖先 (TGV-clade)で非回転対称な鞭毛根と不完全な細胞質分裂が獲得されていたと推測される。

3. ゲノム情報を用いた細胞周期関連遺伝子群の多細胞化初期進化における比較解析

第 2 章で最も細胞数の少ない多細胞生物であることが明らかになったテトラバエナを用いて、多細胞化の初期段階を分子レベルで明らかにする目的で、テトラバエナの核ドラフトゲノムデータおよびトランスクリプトームデータを新たに構築した (南アフリカのウィットウォーターズランド大学との共同研究)。ボルボックス系列の多細胞化に寄与したと報告されている [5] サイクリン遺伝子 (*CYCD1*) とその制御を受ける細胞周期チェックポイント機能をもつ RB タンパク質 [5] について、多細胞化初期段階での進化を明らかにするため、テトラバエナドラフトゲノムおよびトランスクリプトームデータから BLAST 検索により両遺伝子の部分配列を取得し、RACE 法でコーディング領域全長を決定した。その結果、テトラバエナの *CYCD1* 遺伝子は、多細胞性のゴニウムとボルボックスと同様に [5] ゲノム上の近傍で重複しており (図 5)、RB タンパク質は多細胞性の種の特徴とされる短い L1 領域を持っていた。したがって、ゴニウムやボルボックスなどの多細胞性の種で共通するこれら分子の特性は TGV-clade の共通祖先で単細胞性の種から進化し、多細胞化に寄与した可能性が示された。

4. 細胞質分裂関連ダイナミン様タンパク質 DRP1 の比較生物学的解析

ボルボックス系列緑藻では、細胞質分裂に直接関与する遺伝子の知見が乏しい。そこで本研究では、真核生物の細胞質分裂に関わる DRP のうち、陸上植物で細胞質分裂に関与する DRP1 [12] の本系列における比較解析を実施した。第 3 章で新たに構築したテトラバエナドラフトゲノム・トランスクリプトームアセンブリから *DRP1* (*TsDRP1*) の部分配列を取

得、RACE 法でコーディング領域全長を決定し、新たに抗 TsDRP1 抗体を作成した。陸上植物は *DRP1* を複数コピー、ボルボックス系列を含む緑藻植物ではシングルコピーでもっており (図 6)、ドメイン構造は基本的によく保存されていた。本系列における *DRP1* の細胞質分裂時の動態から多細胞化初期進化への寄与を探索するため、単細胞性のクラミドモナスと、多細胞性のテトラバエナ、ゴニウムの計 3 種の同調培養系を用い、抗 TsDRP1 抗体による免疫蛍光染色法で細胞質分裂期前後の局在解析を行った。*DRP1* はクラミドモナス、テトラバエナ、ゴニウムの栄養細胞では細胞質中に散在するような局在パターンであったが、分裂期の細胞においては分裂面への顕著な局在が観察されたため、細胞質分裂への関与が予測される。特に multiple fission の 4 細胞期における *DRP1* 局在を比較すると、クラミドモナスでは主に第二分裂面で観察されたが、テトラバエナとゴニウムでは第一・第二分裂面の両方で明らかな局在が観察された (図 7)。このようなクラミドモナスと多細胞性の種で異なる *DRP1* の局在パターンは、単細胞性と多細胞性の multiple fission 中の分裂面における差をタンパク質の局在レベルで示す結果であると考えている。

5. 総合考察

4 細胞性のテトラバエナの細胞形態学的解析より、本種がボルボックス系列で最も細胞数の少ない多細胞生物であることが示された。また、細胞周期関連 *CYCD1* 遺伝子の重複や、細胞質分裂関連 *DRP1* の局在変化が、多細胞性ボルボックス系列藻類の共通祖先で獲得され、多細胞化に寄与した可能性が示唆された。本研究は、ボルボックス系列で多細胞体の形成に重要な multiple fission の際に、多細胞性の種は細胞形態学的レベル (不完全な細胞質分裂による CBs の形成) と、タンパク質の局在レベル (*DRP1* の局在) の両面で、単細胞性と異なっていることを明らかにした。また、これは *DRP1* のような細胞質分裂関連遺伝子の変化が多細胞化初期に貢献した可能性を初めて示すものである。今後、免疫電子顕微鏡を用いた *DRP1* のより詳細な局在と CBs との関連の観察や、ボルボックス系列における *DRP1* の機能の解明、他の細胞質分裂関連遺伝子の解析から、本系列の細胞質分裂と多細胞化との関連がさらに解明されることが期待される。

引用文献

1. Grosberg RK. and Strathmann RR. 2007. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 38: 621-654.
2. Sharpe SC. et al. 2015. In: *Evolutionary transitions to multicellular life.* pp. 3-29.
3. Herron et al. 2009. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106: 3254-3258.
4. Kirk DL. 2005. *BioEssays.* 27: 299-310.
5. Hanschen ER. et al. 2016. *Nat Commun.* 7: 11370.
6. Nozaki H. et al. 2000. *Mol Phylogenet Evol.* 17: 256-268.
7. Konopka CA. et al. 2006. *Traffic.* 7: 239-247.
8. Hoops HJ. 1997. *Protoplasma.* 199: 99-112
9. Green KJ. et al. 1981. *J Cell Biol.* 91: 756-769.
10. Ringo DL. 1967. *J Cell Biol.* 33: 543-571.
11. Greuel BT and Floyd GL. 1985. *J Phycol.* 21: 358-371.
12. Hong et al. 2003. *Plant Mol Biol.* 53: 297-312.

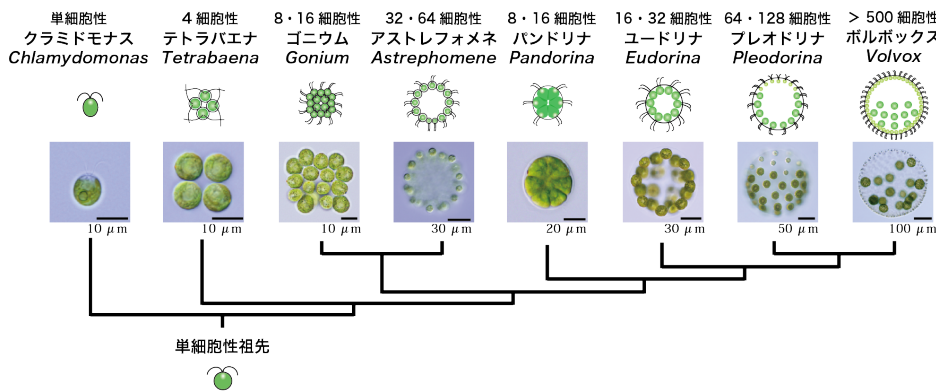


図 1. ボルボックス系列の模式図
単細胞性のクラミドモナスと細胞分化あるボルボックスを含む多細胞化のモデル生物群である。テトラバエナは最も細胞数が少なく、祖先的な系統である。[3, 4] にもとづく。

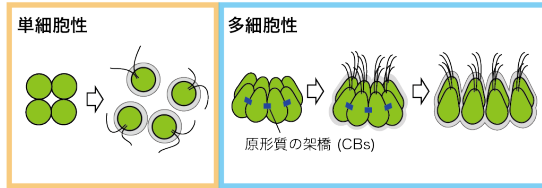


図 2. ボルボックス系列の単細胞性と多細胞性での細胞質分裂様式の違い
単細胞性の種では分裂後の娘細胞がそれぞれ 1 個体となるが、多細胞性の種では娘細胞どうしが原形質の架橋 (CBs) で接続されることで複数の細胞で特定のかたちの多細胞体を 1 個体を形成する。[3] にもとづく。

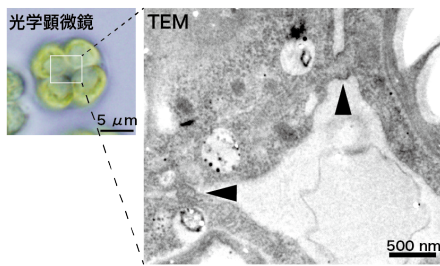


図 4. テトラバエナ娘群体の光学顕微鏡像と透過型電子顕微鏡 (TEM) 像
光学顕微鏡像の白枠内に相当する部分の TEM 像を示す。娘細胞どうしが原形質の架橋 (CBs) で接続している (矢尻)。

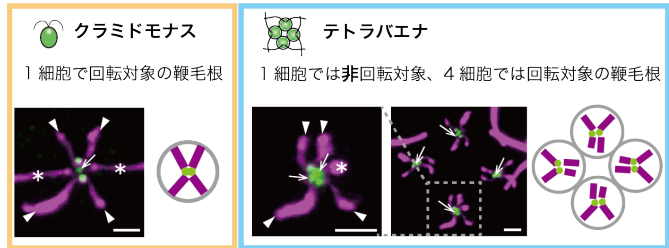


図 3. 抗アセチル化チューブリン抗体で標識したクラミドモナスとテトラバエナの鞭毛根 (矢尻) と抗 CrSAS-6 抗体 (法政大 廣野雅文 博士より供与) で標識した鞭毛基底小体 (矢印) の免疫蛍光像
クラミドモナスと異なり、テトラバエナは非回転対称な鞭毛根 (矢尻) をもつ。
*: 鞭毛、スケール: 2 μm

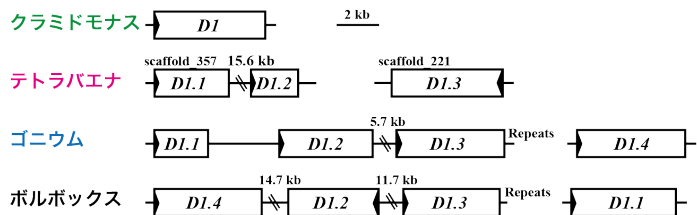


図 5. ボルボックス系列の *CYCD1* 遺伝子のシンテニー
CYCD1 遺伝子は単細胞性のクラミドモナスでシングルコピーだが、多細胞性のテトラバエナ、ゴニウム、ボルボックスではゲノム上の近傍に複数コピー存在する。
クラミドモナス、ゴニウム、ボルボックス: [5] にもとづく。

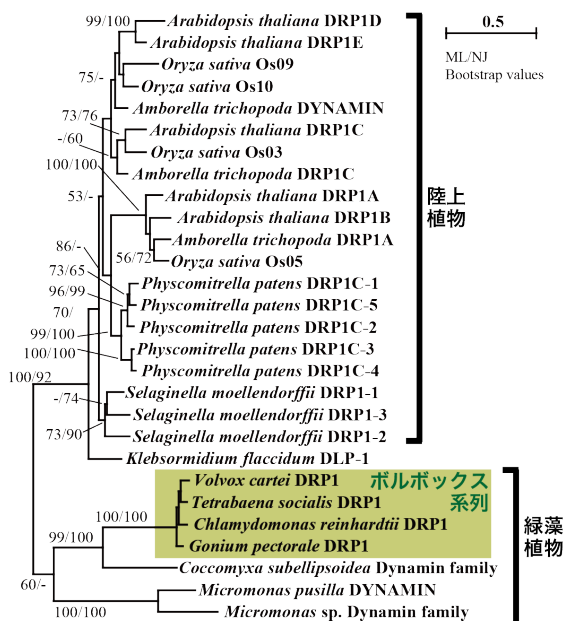


図 6. DRP1 の最尤法系統樹
ブートストラップ値は 50% 以上を表示 (ML/NJ)。陸上植物はゲノム中に複数、緑藻植物は 1 コピーずつ *DRP1* 遺伝子をもつ。

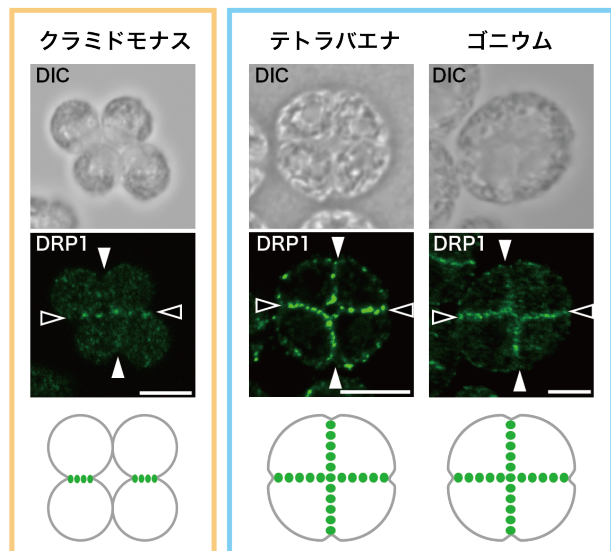


図 7. クラミドモナス、テトラバエナ、ゴニウムの 4 細胞期の DRP1 局在
クラミドモナスでは主に第二分裂面 (黒矢尻) に、テトラバエナとゴニウムでは第一 (白矢尻)・第二 (黒矢尻) 分裂面の両方に DRP1 局在が観察された。