

## 論文内容の要旨

論文題目 Identification and molecular evolutionary analysis of the mating type locus  
in the colonial volvoclean alga *Gonium pectorale*.

(群体性ボルボックス目 *Gonium pectorale* における性決定遺伝子領域の探索と分子進化的解析)

氏名 濱地 貴志

### 1. 研究背景

卵生殖の生物は、同型配偶の生物を祖先として複数の系統群で独立に進化したと考えられる。そのうち特に後生動物と陸上植物はそれぞれ高度に多様化しており、卵生殖の代表的な系統群でありながら、いずれも近縁な同型配偶の生物が知られておらず、同型配偶から卵生殖に到る「雌雄の二極化」という進化過程を辿るのは困難である。

卵生殖が出現した系統群の中でも、単細胞・同型配偶緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (以下、*Chlamydomonas*) に近縁な群体性ボルボックス目の緑藻類には、雌雄の二極化の「モデル系統群」として3個の利点がある。1) *Chlamydomonas* と卵生殖 *Volvox carteri* (以下、*Volvox*) の分岐から2億年前 (Herron *et al.* 2009) で、同型配偶から異型配偶を経て卵生殖に到る各段階の生物が現存し、培養株が確立されている (図1)。2) *Chlamydomonas* (Merchant *et al.* 2007) と *Volvox* (Prochnik *et al.* 2010) でゲノム配列が公開されている。3) *Chlamydomonas* では1980年代から性決定・性分化に関与する遺伝子群が明らかになってきていて、性決定遺伝子領域 (mating-type locus [MT]) の構造が決定された (Ferris & Goodenough 1994; Goodenough *et al.* 2007)。MT は両性 (交配型) で配列が異なって組換えが抑制されており、両交配型の MT に存在する「交配型非特異的」遺伝子群の他に、片方の MT にしかコードされていない「交配型特異的」遺伝子が複数存在している。これら交配型特異的遺伝子のうち、MID (minus-dominance) 遺伝子が性を決定する鍵因子で、*Chlamydomonas* ではマイナス交配型にコードされていて、優性に機能する。また、*Chlamydomonas* のプラス交配型特異的な FUS1 は、プラス配偶子細胞の接合突起上に局在して相手になる細胞の性を認証しているタンパク質をコードしている。

従って、雌雄の二極化の分子生物学的基盤を解明するために、群体性ボルボックス目の同型配偶～卵生殖の生物で MT の遺伝子群を比較する必要がある。しかし、MT は組換えが抑制されているために進化が速く、長年に亘って MT の交配型特異的遺伝子ホモログのクローニングは不成功だった

(Ferris *et al.* 1997)。近年になって、群体性ボルボックス目の異型配偶 *Pleodorina starrii* で雄株から MID オーソログが同定された (Nozaki *et al.* 2006)。続いて *Volvox* でも、同じく MID オーソログが同定され、更にその周辺ゲノム領域も BAC ライブラリを用いたクロモソーマルウォーキング法によって決定され、MT の全貌が明らかになった (Ferris *et al.* 2010)。

*Volvox* の雌雄の MT は *Chlamydomonas* MT の約 5 倍の大きさであり、交配型特異的遺伝子の数は増大し、交配型非特異的な遺伝子群も雌雄で両極化していることが明らかになった (Ferris *et al.* 2010)。しかし、これら MT の差異が直接的に雌雄の二極化に影響したかを検証するには、*Chlamydomonas* よりも *Volvox* に近縁な同型配偶の群体性ボルボックス目の知見が必須である (Charlesworth & Charlesworth 2010)。

従って、本研究では群体性ボルボックス目の同型配偶 *Gonium pectorale* (以下、*Gonium*) を研究対象とし、方針は以下 1)~3) の通りである。1) 両性の配偶子から mRNA を抽出し、縮重プライマーを用いた RT-PCR 法によって MID オーソログを同定する。2) 両性の株の BAC ライブラリを構築し、得られている MID 配列をプローブとしてスクリーニングを行い、クロモソーマルウォーキング法によって周辺領域の配列を順次決定する。3) 見出された交配型非特異的な遺伝子を利用して、対になる交配型 MT の塩基配列を決定する。

## 2. マイナス交配型特異的遺伝子 *GpMID* と *GpMTD1* の同定

*Chlamydomonas* のマイナス交配型決定遺伝子 MID (*CrMID*) は、DNA 結合のためのロイシンジッパー構造をとる「RWP-RKドメイン」を有する転写因子と考えられている (Ferris & Goodenough 1997)。既に決定されていた MID ホモログの RWP-RK ドメインのアミノ酸配列の保存性に着目して設計した縮重プライマーによって、*Gonium* の MID 部分配列を探索した。*Gonium* のマイナス交配型から得られた MID 類似配列を基に全長 cDNA 配列とゲノム領域の配列を決定し、*GpMID* とした。*GpMID* はマイナス株のみにコードされ、窒素飢餓によって転写産物量が増加した。系統解析の結果、MID ホモログは単系統となり、相互にオーソログであることが示された (図2)。

得られた *GpMID* ゲノム DNA 配列を起点とした inverse PCR を行い、*GpMID* の 5' 上流に *Chlamydomonas* のマイナス交配型特異的遺伝子 *MTD1* (*CrMTD1*) に相同性の高い配列 *GpMTD1* を見出し、全長 cDNA 配列とゲノム DNA 領域の配列を決定した。*GpMTD1* は *GpMID* と互いに逆の方向へとコードされていて、5'上流のプロモータ領域を共有していた。*GpMTD1* はマイナス交配型株のゲノム上にシングルコピーで特異的にコードされており、転写産物量は窒素飢餓によって上昇していた。

## 3. 交配型別BACライブラリの構築とクロモソーマルウォーキングによる性決定遺伝子領域配列の決定

*Gonium* プラス株・マイナス株それぞれの BAC ライブラリを構築し、*GpMTD1* 部分配列をターゲットとするプローブを最初に用いてマイナス交配型 MT を含む BAC クローンのスクリーニングを端として、ショットガンシーケンスによる配列決定を用いたクロモソーマルウォーキング法によって隣接する領域を有するクローンを順次決定した。この作業の中で見出された *Chlamydomonas* の交配型非特異的遺伝子に類似の配列から、プラス交配型 MT を探索するプローブを作成するためのプライマーを設計し、同様にクロモソーマルウォーキングを遂行した。BAC スクリーニングが困難な場合は、TAIL-PCR または inverse PCR によって隣接領域の配列を決定した。また、*Chlamydomonas* と *Volvox* の MT に共通する交配型特異的遺伝子配列をを基に相同配列を探索し、これをプローブとした BAC スクリーニングを行った。その結果、*Gonium* の両性で構造が大きく異なる MT 領域が *Gonium* では少なくとも 400 kb に亘り、*Chlamydomonas* MT (200~300 kb) よりも明らかに拡大しており、*MAT3* (後述) を含む 12 個の交配型非特異的遺伝子の存在が判明した (図3)。また、*Volvox* でも *Chlamydomonas* でも MT に連鎖した遺伝子のうち *Gonium* では少なくとも 4 個が MT とは連鎖していないことが示唆されていた (表1)。

今回のクロモソーマルウォーキングによって決定されたプラス交配型 *MT* の配列中に *Chlamydomonas* のプラス型特異的遺伝子 *FUS1* (*CrFUS1*) 類似配列が見出された。全長 cDNA 配列を決定して、この遺伝子を *GpFUS1* とした。*GpFUS1* と *CrFUS1* のアミノ酸配列の間的一致は 31.2% であり、急速な進化が推察される。ただし、疎水性プロットの比較では、N 末と C 末に疎水性の高い領域が見出され、N 末はシグナルペプチド、C 末は膜結合領域として機能していると推測され、*GpFUS1* も *CrFUS1* と同様にプラス交配型配偶子の細胞膜に局在し、両性の配偶子の認識に寄与することが示唆された (図4)。

#### 4. 性決定遺伝子領域上にコードされた交配型非特異的遺伝子の分子進化

*Volvox* の雌雄の両 *MT* の交配型非特異的遺伝子群は、*Chlamydomonas MT* のものに比べて、同義・非同義置換率が共に高くなっている。特に、哺乳類網膜芽細胞腫の原因遺伝子で細胞周期の調節を行う *Retinoblastoma* 遺伝子の *Volvox* ホモログ *MAT3* は、雌雄双方の *MT* にコードされているものの、雄の有性生殖ステージにおいて正常なスプライシングが阻害されるため、配偶子の雌雄分化における役割が推察されている (Ferris *et al.* 2010)。今回の *Gonium MT* における *MAT3* をはじめとする交配型非特異的遺伝子群の同義・非同義置換率は *Chlamydomonas* と同様に *Volvox* のものより著しく低い値を示した。*MAT3* 部分配列を用いた系統解析の結果、同型配偶の *Gonium* との分岐以降、雌雄性を獲得した卵生殖の *Volvox* の系統で *MAT3* の交配型 (雌雄) 特異性が高まったことが示唆された (図5)。

#### 5. 総合考察

本研究では卵生殖 *Volvox* に近縁である同型配偶の群体性ボルボックス目 *Gonium* の *MT* を探索・解読し、交配型特異的遺伝子ホモログ 3 個 (*GpMID*, *GpMTD1* & *GpFUS1*) を同定することができた。同型配偶の *Chlamydomonas* と *Gonium* マイナス交配型および *Volvox* の雄は *MID* オーソログに加えて、*MTD1* ホモログをもつため、両遺伝子の性分化に関する重要性を示唆する。一方、両性の配偶子認証に重要な *FUS1* ホモログは同型配偶の *Chlamydomonas* と *Gonium* プラス交配型 *MT* に存在するのに対して、卵生殖 *Volvox* にはゲノム中に存在が確認されていない (Ferris *et al.* 2010)。このことは卵生殖への進化過程で配偶子の接合様式が著しく変化した (Nozaki & Itoh 1994) のに伴って *FUS1* は機能を喪失し欠落したと考えられる。また、群体性ボルボックス目において *MT* が拡大する傾向が見られ、特に *Gonium MAT3* が *MT* の中に編入されていることが判明し、雌雄二極化に伴う *MAT3* の *MT* での交配型 (雌雄) 分岐の前段階を反映していると考えられる。*Gonium* は *Chlamydomonas* よりも *Volvox* に近縁であるにもかかわらず (Nozaki *et al.* 2000)、*Chlamydomonas* と同様に *MT* 上の交配型非特異的遺伝子の両性ハプロタイプ間の同義・非同義置換率が低く抑えられていることが明らかになった。従って、*Volvox* の卵生殖の進化に直接影響していると考えられる両性の *MT* の交配型特異的遺伝子群の新規参入と、交配型非特異的遺伝子群の両極化 (Ferris *et al.* 2010) は単細胞から群体になった後、*Gonium* のように拡大された *MT* で起きたことが推測される (図6)。

Charlesworth, D. & Charlesworth, B. 2010 *Curr. Biol.* 20, R519.  
Ferris, P.J. & Goodenough, U.W. 1994 *Cell* 76, 1135.  
Ferris, P.J. & Goodenough, U.W. 1997 *Genetics* 146, 859.  
Ferris, P. *et al.* 1996 *Mol. Biol. Cell* 7, 1235.  
Ferris, P.J. *et al.* 1997 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94, 8634.  
Ferris, P.J. *et al.* 2002 *Genetics* 160, 181.  
Ferris, P. *et al.* 2010 *Science* 328, 351 (12th co-author Hamaji, T.).

Goodenough, U. *et al.* 2007 *Semin. Cell Dev. Biol.* 18, 350.  
Herron, M.D. *et al.* 2009 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 106, 3254.  
Merchant, S.S. *et al.* 2007 *Science* 318, 245.  
Nozaki, H. & Itoh, M. 1994 *J. Phycol.* 30, 353.  
Nozaki, H. *et al.* 2000 *Mol. Phylogenet. Evol.* 17, 256.  
Nozaki, H. *et al.* 2006 *Curr. Biol.* 16, R1018.  
Prochnik, S.E. *et al.* 2010 *Science* 329, 223.

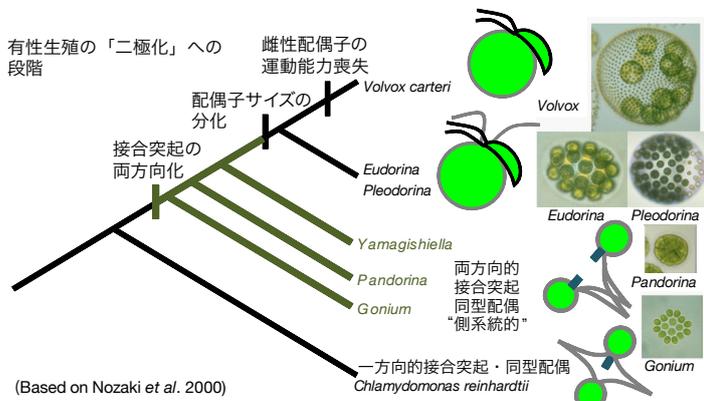


図1. 群体性ボルボックス目・雌雄二極化のモデル系統群

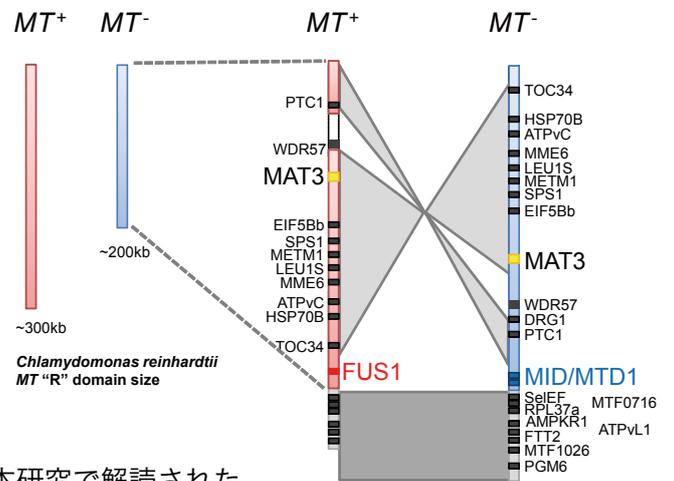


図3. 本研究で解読された *G. pectorale* MTの模式図と *Gonium pectorale* MT *C. reinhardtii* "R"ドメインのサイズ比較

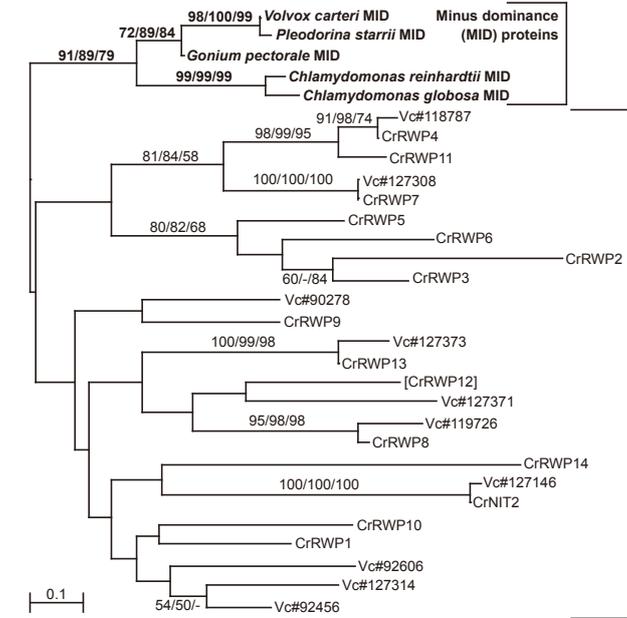


図2. MID ホモログを含む RWP-RK 遺伝子群の アミノ酸配列系統樹 (ML/NJ/NP)

表1. *Gonium* に見出された遺伝子の *Volvox* および *Chlamydomonas* の MT における構成の比較

Volvox MT-linked genes	Gonium	Volvox	Chlamydomonas
<i>pr46a</i>	連鎖せず (Ferris, pers. comm.)	セントロメア側 隣接領域	MT
<i>ALB3.1</i>	連鎖せず (Ferris, pers. comm.)	MT	テロメア側 隣接領域
<i>L7Ae</i>	連鎖せず	MT	テロメア側
<i>PRX1</i>	連鎖せず	MT	セントロメア側
<i>ATPvC1</i>	MT	MT	テロメア側
<i>EIF5Bb</i>	MT	MT	テロメア側
<i>HSP70b</i>	MT	MT	テロメア側
<i>METM1</i>	MT	MT	テロメア側
<i>MME6</i>	MT	MT	テロメア側
<i>PTC1</i>	MT	MT	テロメア側
<i>SPS1</i>	MT	MT	テロメア側
<i>TOC34</i>	MT	MT	テロメア側
<i>DRG1</i>	MT	MT	MT
<i>LEU1S</i>	MT	MT	MT
<i>MAT3</i>	MT	MT	セントロメア側
<i>WDR57</i>	MT	MT	セントロメア側
<i>AMPKR1</i>	隣接領域	MT	テロメア側
<i>MTF0716</i>	隣接領域	MT	テロメア側
<i>ATPvL1</i>	隣接領域	MT	セントロメア側
<i>FTT2</i>	隣接領域	MT	セントロメア側
<i>MTF1026</i>	隣接領域	MT	セントロメア側
<i>SelEF</i>	隣接領域	MT	セントロメア側
<i>RPL37a</i>	隣接領域	セントロメア側	セントロメア側

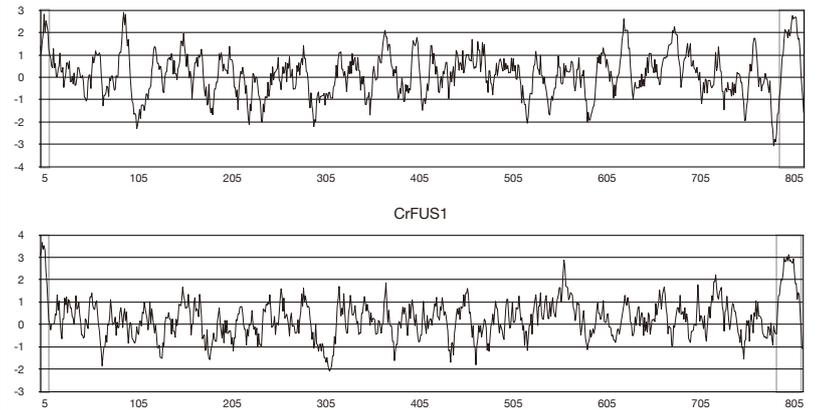


図4. FUS1 アミノ酸配列の疎水性比較 (Kyte & Doolittle法)

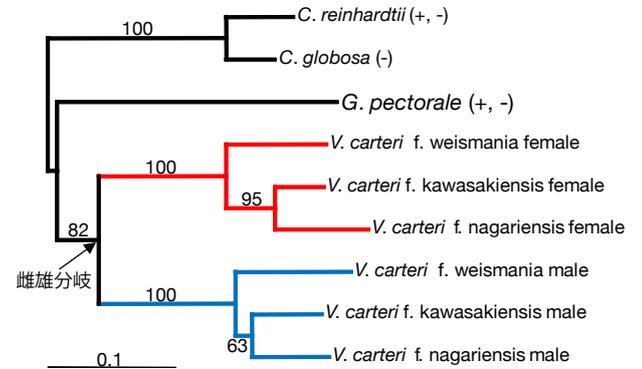


図5. MAT3アミノ酸部分配列の近隣結合法系統樹

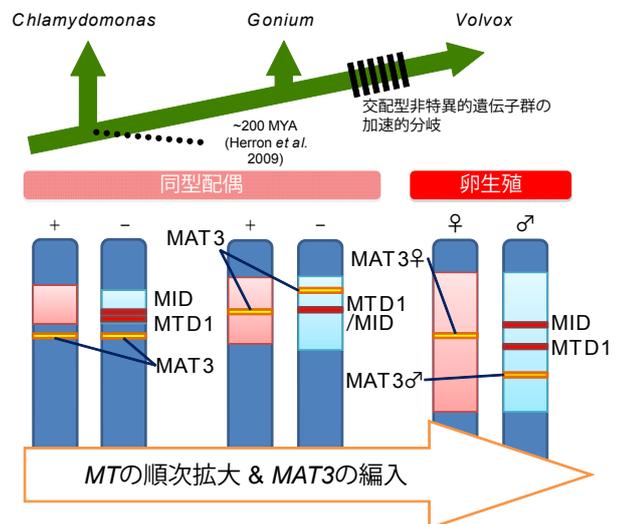


図6. 本研究で示唆された雌雄二極化の分子進化的過程