

緑藻クラミドモナスのゲノムから植物と動物の機能を探る

Genome of a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, lights up key functions of plant and animal cells

福澤秀哉・久保雄昭・山野隆志

2007年秋、日米欧の研究者の協力によって、緑藻クラミドモナスのゲノム配列が公開された。光合成を行ない鞭毛によって泳ぎ回るこのユニークな単細胞性の緑藻には、太古の原始細胞が植物細胞や動物細胞に分岐した進化のヒントが秘められている。ここでは、クラミドモナスのゲノムについて概説するとともに、高等植物やヒトのゲノムと比較することによってみえてきた動物や植物に特有の機能進化、とくに、光合成の環境適応と順化、鞭毛の構造と機能、性決定の機構について述べる。

Key words ● 緑藻クラミドモナス ● 比較ゲノム ● 動物・植物の進化 ● 生殖 ● 環境応答

はじめに

真核細胞の成立には、太古の原核細菌による食作用が不可欠であったと考えられている。この食作用によってミトコンドリア型の細菌を取り込んだ細胞では、環状DNAから染色体の形成、さらには、核膜や小胞体膜の形成など多くの変化が進み、核が形成された¹⁾。細菌の分裂リングであったFtsZ蛋白質は微小管の構成蛋白質である α チューブリンおよび β チューブリンに、さらには、中心体で微小管形成にかかわる γ チューブリンに変化したと考えられ、中心体は細胞において鞭毛や繊毛の形成に重要である²⁾。こうして鞭毛をもつ原始の真核細胞が形成される一方で、酸素発生型の光合成細菌であるシアノバクテリアがこの真核細胞に取り込まれることで葉緑体が生まれ、単細胞真核緑藻が成立した。これを一次共生^{*1}とよぶ。葉緑体を取り込まなかった真核細胞は菌類や動物に進化する一方で、葉緑体を取り込んだ緑藻類は多細胞化や二次共生をともなって多様化したのち、一部の種は陸上化し、現在の陸上植物の

繁栄にいたったとされる³⁾。

進化的に離れてしまった動物と植物の機能の進化と多様性を理解するためには、いわばその中間に位置する生物種についての知見を得ることが有用である。一次共生によって葉緑体をもつようになった原始の単細胞性緑藻は、現在、地球上に繁栄している植物のプロトタイプであるとともに、動物の機能をもあわせもっていたと考えられる。現存している生物種でこのプロトタイプの姿をもっとも残しているものとして、クラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* (和名は、コナミドリムシ) が知られている。クラミドモナスは光合成を行なう真核生物なので緑藻類として植物界に分類されたり、鞭毛によって泳ぎ回るので鞭毛虫類として動物界に分類されたりしてきたが、現在では、原生生物(プロチスタ)として分類されている。本稿では、この単細胞性の緑藻について紹介し、また、そのゲノム解析によって得られた知見や、高等植物やヒトのゲノムと比較することによってみえてきた動物や植物に特有の機能進化について解説する。

I クラミドモナスとは

モデル実験生物のひとつであるクラミドモナスは、湿潤な土壌表面や淡水の池などに生息するが、その標準株は1945年、Smithによって米国Boston郊外のジャガイモ畑

Hideya Fukuzawa, Takeaki Kubo, Takashi Yamano

京都大学大学院生命科学研究科 統合生命科学専攻遺伝子特性学分野

E-mail : fukuzawa@lif.kyoto-u.ac.jp

URL : <http://chlamy.pmb.lif.kyoto-u.ac.jp/>

から単離された一対の接合型株に由来する⁴⁾。

この単細胞性の藻類は、雌雄同形異株で有性生殖と無性生殖を生活環にもち、その一対の接合型^{*2} (mating-type; mt) をプラス型 (mt^+) とマイナス型 (mt^-) として区別する (図1)。それぞれの接合型の細胞は、通常は単相ゲノム

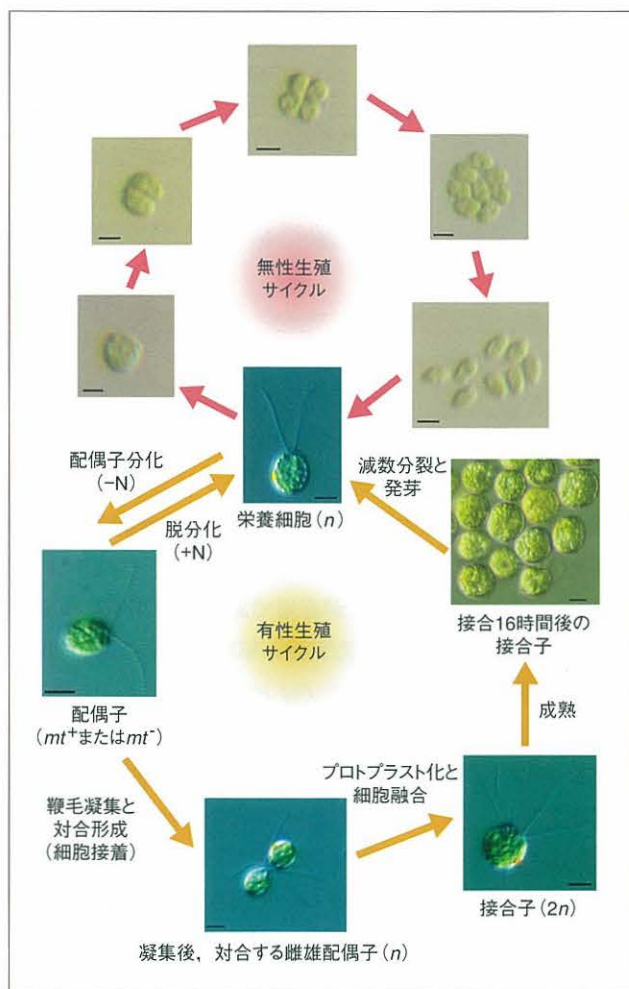


図1 クラミドモナスの生活環

クラミドモナスは、2種の接合型(プラス型 mt^+ とマイナス型 mt^-) をもつ栄養細胞がそれぞれ独立して無性分裂をくり返す無性生殖サイクルと、配偶子分化、鞭毛凝集、接合子を経て2セットの雌雄娘細胞を形成する有性生殖サイクルをもつ。スケールバーは5 μ m。

をもつ栄養細胞で無性的細胞分裂をくり返し増殖する(無性生殖サイクル)。一方で、培養液中の窒素源が枯渇するとその欠乏状態をシグナルとして感知し、約8時間かけて配偶子に分化する。プラス型とマイナス型の配偶子を混合すると鞭毛の凝集が起こり、この凝集がシグナルとなってそれぞれの配偶子が細胞壁を脱ぎ捨てプロトプラスト化する。この凝集と並行して、プラス型の配偶子からは接合管が伸長してマイナス型の配偶子の接合構造と接着が起こり、原形質連絡橋が形成される。そのうち、一対の両配偶子が融合し、数分後に接合子となる。接合の約16時間後には、接合子は固くて厚い細胞壁に覆われ、乾燥など外部の環境変化に耐えることができる。8~10日間の成熟期間ののち、減数分裂を経て、雌雄2組、計4個体のプラス型とマイナス型の接合型の栄養細胞が放出される。

クラミドモナスがこれまでさかんに研究されてきた背景には、半数体であることから変異株の表現型が容易に観察でき、くわえて、掛け合わせによる遺伝学的解析が可能な点がある。また、その体制に動物および植物に特有な構造をもつというユニークな特徴がある。クラミドモナスは植物細胞特有のオルガネラである葉緑体をもっている。葉緑体におけるDNAの発見⁵⁾、そして、その葉緑体ゲノムの形質転換に最初に成功したのはクラミドモナスである⁶⁾。光合成が異常な変異株は酢酸を含む培地で生存可能なので、光合成の遺伝学的研究にも用いられてきた。また、細胞は2本の鞭毛をもち培地中を遊泳するが、鞭毛運動に必須な鞭毛構造の基部に存在する基底小体(basal body)は動物細胞の中心子の構造と相同である。この基底小体は動物の繊毛形成にも必須である(図2)。遊泳行動が異常な変異株を用いて、鞭毛運動や鞭毛形成などの研究も進められている。クラミドモナスでは性決定や配偶子分化にかかわる変異株が単離されており、それらの変異原因遺伝子の多くが性決定遺伝子座(mating-type locus)にマップされている。そのほかにも、生殖、環境応答など、多くの生物機能において多くの変異株がクラミドモナスから単離され、その変異原因遺伝子がつぎつぎに特定されてきた⁷⁾。最近では、レボ

*1 一次共生・二次共生：葉緑体がある種のシアノバクテリアに起源をもつことは広く受け入れられているが、その共生が起こった回数については多くの説がある。非光合成真核生物がシアノバクテリア様の原核光合成生物を取り込んだ一次共生は1回の事象であり、一次共生起源の葉緑体をもつ緑色植物・紅色植物・灰色植物は単系統であるとする説が有力である。一方で、ケイ藻のように非光合成真核生物が一次共生藻を取り込んだイベントを二次共生とよぶ。二次共生藻はきわめて多種多様であるため、二次共生は複数回起こったとする説が有力である。二次共生藻には一次共生藻の核のなごりであるスクレオモルフが観察される。

*2 接合型：有性生殖の際に互いの性を区別するため名づけられる型のこと。クラミドモナスでは、動物の雄と雌に相当する性の区別を、マイナス型(mt^-)とプラス型(mt^+)とよぶ。栄養増殖した細胞を窒素欠乏条件に移すと窒素源飢餓応答性遺伝子および配偶子分化遺伝子が誘導され、それぞれの性をもつ配偶子に分化し、マイナス型とプラス型による同形配偶子接合を行なう。

ーターを用いた変異株のスクリーニング法により、CO₂環境に順化する際にはたらく転写因子⁸⁾や時計遺伝子が同定されている⁹⁾。

II 緑藻クラミドモナスゲノムの特徴

クラミドモナスのゲノムサイズ約120 Mbpの13倍をカバーするショットガン配列データから、1,557 スキャフォールド(未確定配列を含む連続配列)の配列が公開された¹⁰⁾。GC含量は64%と比較的高いことがわかった(表1)。既知の遺伝マーカーの連鎖解析から染色体数も17本とされていたが、実際に、全配列のうち74 スキャフォールドが17の連鎖群を形成し、ゲノムの78%に相当する95 Mbpの領域をカバーしていた。たとえば、性決定遺伝子座を含む第6染色体(連鎖群6)は5つのスキャフォールド(3-38-26-69-12)で構成され、相対的な位置関係は既知の遺伝マーカーで推定された(図3a)。

EST (expressed sequence tag) 情報と遺伝子構造予測プログラムを用いて、15,143種の蛋白質コード領域が推定され、そのうち56%の8,631種の発現がEST情報より確認された。さらに、259種のtRNA、およそ100種のトランスポーズブルエレメントがみついている。蛋白質コード領域は平均長190 bp、平均数8.3個のエキソンから構成されていた。イントロンの平均長は373 bpで、1個の遺伝子あたり7.3個のイントロンをもっていた。このイントロン挿入

表1 クラミドモナス、シロイヌナズナ、ヒトにおけるゲノムの特徴

性質	クラミドモナス	シロイヌナズナ	ヒト
概要配列の長さ (Mb)	120	140	2,851
染色体数	17	5	23
GC 含量 (%)	64	36	41
遺伝子数	~15,143	~26,341	~23,000
配列中の蛋白質コード領域 (%)	17	33	~1
平均エキソン長 (bp)	190	251	282
平均エキソン数	8.3	5.2	8.8
平均イントロン長 (bp)	373	164	3,365
平均イントロン数	7.3	4.5	7.8
rDNA ユニット数	3	12	5
tRNA 数	259	589	497

数は、菌類やケイ藻などの単細胞性真核生物や陸上植物と比べると多く、むしろ、線虫やヒトなどの動物に近かった(表1)。また、総イントロン長の30%はくり返し配列からなり、クラミドモナスのイントロンのなかにはトランスポゾンの侵入によって形成されたものが多数存在することが示唆された。また、コドンの使用頻度を調べてみると、同一のアミノ酸を指定するコドンのある場合には、3番目の塩基にアデニン、チミンを使用することは少なく(14%)、グアニンやシトシンを多用する(86%)ことが確かめられた。

ゲノムに見いだされた15,143種の遺伝子構造のうち、遺伝子ファミリーを形成しているものが1,226種存在し、そのうちの26種については10個以上の遺伝子から形成されてい

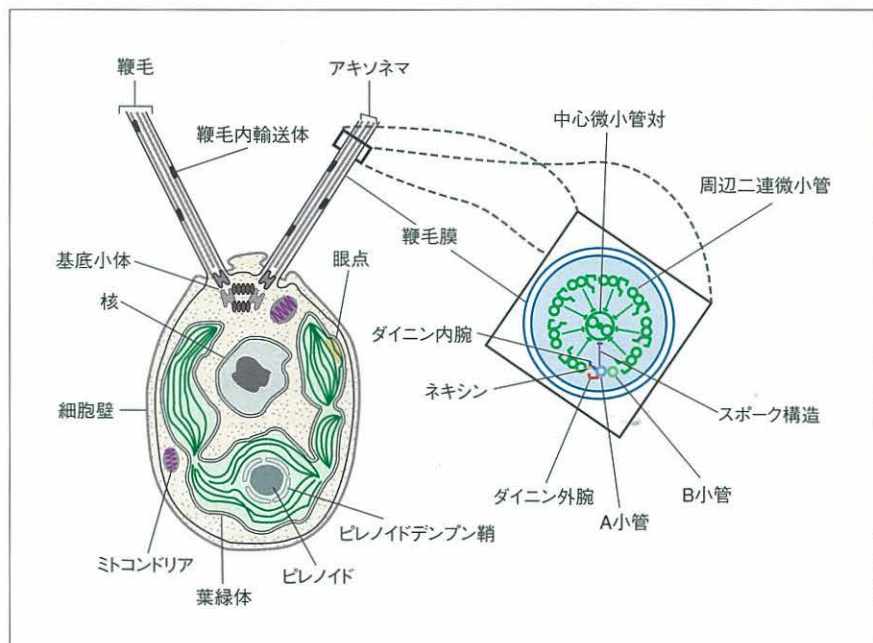


図2 クラミドモナス細胞の構造⁶⁾

細胞は蛋白質の細胞壁で囲まれ、細胞内部にはカップ型の単一の葉緑体、核、ミトコンドリア、ピレノイド、眼点などの細胞小器官が存在する。基底小体で細胞内部と連結した2本の鞭毛が細胞外部に伸び、鞭毛膜と鞭毛内アキソネマのあいだには鞭毛内輸送体が存在する。鞭毛内部構造は9本の周辺二連微小管および中心微小管対(9+2構造)からなり、それらはダイニン外腕とダイニン内腕、ネキシンやスポーク構造などによって支えられている。この構造は、藻類や動物に広く存在する普遍的な構造である。

た。また、798種は2つの遺伝子からなり、そのうちの317種がタンデムに重複していることがわかった。興味深いことに、高等植物では知られていないクラスⅢのアデニル酸/グアニル酸シクラーゼ遺伝子が51種もみつき、比較的大きな遺伝子ファミリーを形成していることがわかった。これらのシクラーゼ遺伝子は、動物において環状ヌクレオチドを介したシグナル伝達機構に関与することが知られている。クラミドモナスでは、接合型配偶子の鞭毛凝集時に鞭毛内部のcAMP濃度が上昇し、これが接合シグナルとして細胞内部に伝達され、細胞壁溶解酵素の活性化や雌雄配偶子の接合構造の構築が起こることが知られているが¹¹⁾、今回の知見によって、環状ヌクレオチドを介したシグナル伝達系が関与する現象は接合以外にも存在することが示唆さ

れた。

また、ゲノムには、動物、植物にそれぞれ存在するトランスポーターのオーソログも多数見いだされた。461個のトランスポーターのうち、マルトーストランスポーターやATP:ADPアンチポーター、葉緑体の内膜へのトランスロケーターなどに代表される植物に特有のトランスポーターファミリーをもつ一方で、動物細胞における感覚受容で機能する電位依存性のトランスポーターファミリーも多数存在した。これらの例をみてもわかるように、クラミドモナスは動物および植物でそれぞれ特異的に機能する遺伝子をあわせもつことが明らかになった。

新たな生物種のゲノムを決定し、ほかの生物種のゲノムと比較することにより有用な情報を得ることができる。た

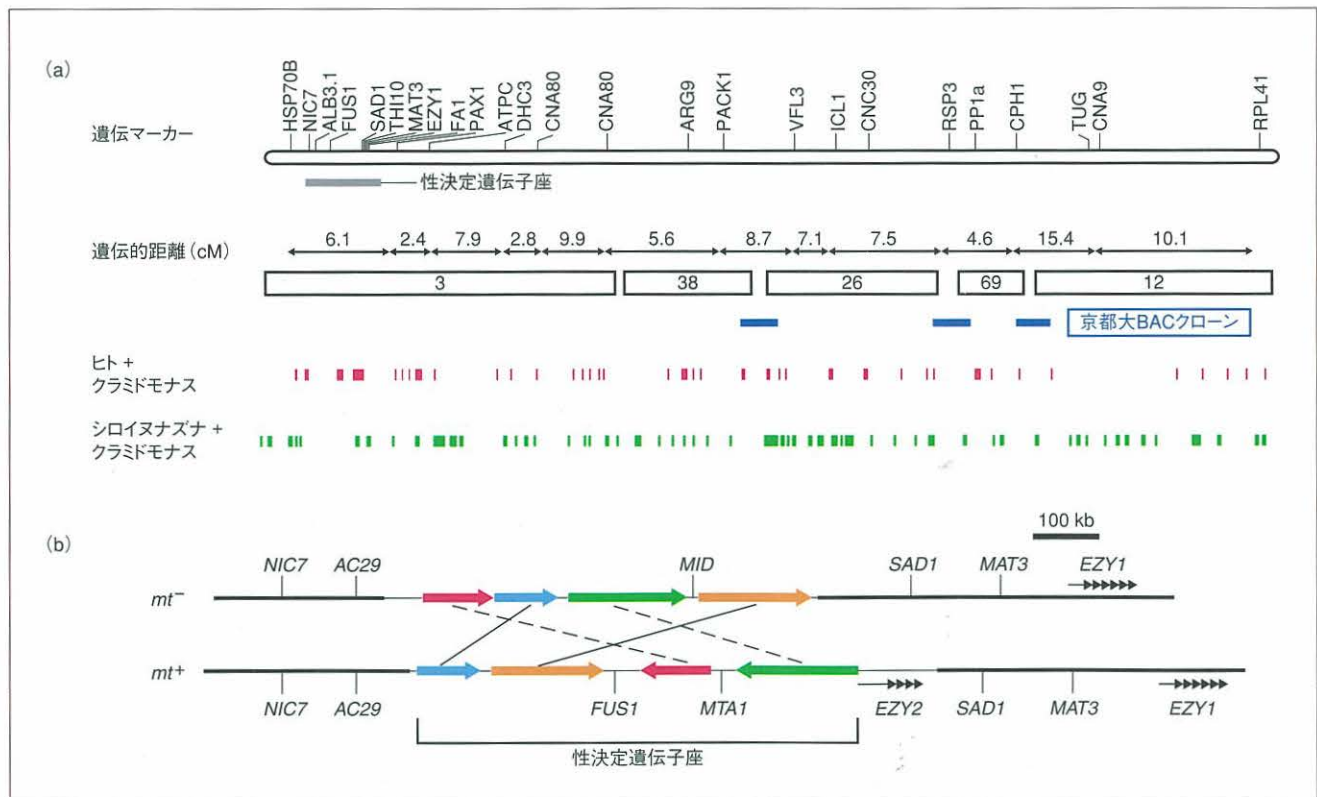


図3 第6染色体(連鎖群6)の構造および遺伝マーカーと雌雄の性決定遺伝子座の構造

(a) 連鎖群6における解析状況を、マッピングされたスケファールド、連鎖群6にマップされた遺伝マーカーの位置とともに示す。第6染色体には *mt+* の性決定遺伝子座が存在する。ヒトとクラミドモナスに共通な遺伝子(ヒト+クラミドモナス)を赤色の縦線で、シロイヌナズナとクラミドモナスに共通な遺伝子(シロイヌナズナ+クラミドモナス)を緑色の縦線で示す。スケファールド38-26、26-69、69-12のあいだを連結する京都大BACクローン(ブリッジクローン)を青色の横線で示す(図8参照)。ドラフトゲノム配列が決定された株はCC-503でプラス型の株である。

(b) 性決定遺伝子座は雌雄間で相同性の高いセグメント(色つきの矢印)が逆位や転座によってモザイク上に並んでいる。マイナス型の性決定遺伝子座内部には性決定のマスター遺伝子である *MID* 遺伝子が存在し、また、プラス型の内部には雌雄配偶子間の細胞認識に機能する *FUS1* 遺伝子が存在する。プラス型配偶子に特異的に発現する *MTA1* 遺伝子については、機能はよくわかっていない。性決定遺伝子座の近傍には *NIC7* 遺伝子、*AC29* 遺伝子などのハウスキーピング遺伝子も存在しているが、鞭毛凝集時に鞭毛上で提示されるアグレルチンをコードする *SAD1* 遺伝子や、細胞サイズの調節を行なう *MAT3* 遺伝子、接合子形成時に葉緑体ゲノムの母性遺伝に関与する *EY1* 遺伝子や *EY2* 遺伝子のタンデムリピートが存在している。

たとえば、近縁の種のゲノムと比較することで種の分化を決定づけたゲノムの変化を推定することができる。また、遠縁の種間でゲノムを比較することにより、種固有な遺伝子や複数の種に共通に保存されている遺伝子、種に固有な機能がどのように獲得されたのかを知ることができる。クラミドモナスの蛋白質をコードする遺伝子15,143種についてシロイヌナズナとヒトにおけるオーソログの存在を調べたところ、2,489種が三者で共通であったのに対し、シロイヌナズナにはなくヒトと共通なものが774種、ヒトにはなくシロイヌナズナと共通なものが1,968種、クラミドモナスに特有な遺伝子は10,282種であった(図4)。この結果からも、クラミドモナスは動物(ヒト)祖先型の遺伝子と、植物(シロイヌナズナ)祖先型の遺伝子をあわせもち、進化的、特異な位置にあることが示された。

それでは具体的に、クラミドモナスのゲノムに存在する植物やヒト、あるいは、そのほかの生物にそれぞれに共通な遺伝子とはどのようなものなのであろうか。クラミドモナスのゲノム情報をもとに比較解析して得られた知見を紹介する。

Ⅲ 植物に共通する光合成遺伝子とCO₂環境応答

1. 光合成生物に共通する遺伝子

クラミドモナスをはじめとする緑藻類は色素体(葉緑体)をもち、シロイヌナズナなどの高等植物と同じように光合成を行なう。上記のクラミドモナスとシロイヌナズナに共通して存在する遺伝子1,968種のなかで、同じ緑藻類のオストレオコッカスや蘚類のヒメツリガネゴケに共通して存在するものは349種が存在する¹⁰⁾。これらのなかには、光化学系などに代表される光合成装置や、葉緑体やチラコイド膜の生合成、光合成の電子伝達、炭素固定、ならびに、脂質、アミノ酸、核酸などの生合成に関与する蛋白質をコードする遺伝子が135種含まれていた。残りの機能が未知な遺伝子214種のうち、101種には既知の蛋白質との相同性や機能的モチーフが存在しなかったが、葉緑体での代謝制御にかかわる新規の因子が多く含まれるものと予想され、なかでも、新たに85種の遺伝子産物が葉緑体に局在すると予想された。

“はじめに”で述べたように、クラミドモナスをはじめとする葉緑体をもつ単細胞真核緑藻は、地球上ではじめて水を分解する酸素発生型光合成を行なうようになったシアノ

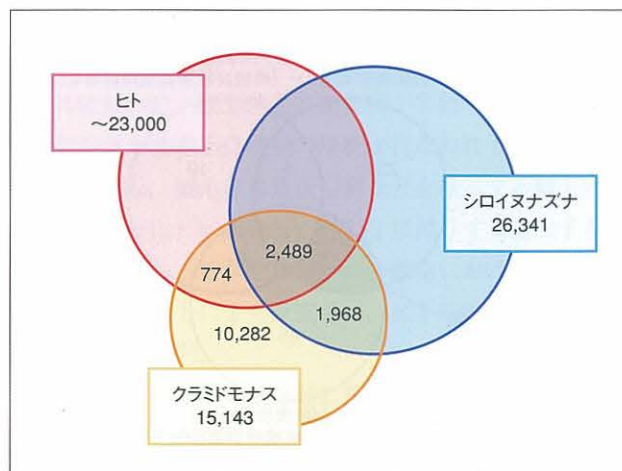


図4 比較ゲノムの手法を用いたクラミドモナスの蛋白質をコードする遺伝子のうちわけ⁶⁾

緑藻クラミドモナスゲノムから予測された15,143種の遺伝子の産物である蛋白質のうち、2,489種が哺乳類ヒト、高等植物シロイヌナズナと共通の蛋白質であった。また、ヒトとクラミドモナスには存在するがシロイヌナズナではみつかからない蛋白質は774種、シロイヌナズナとクラミドモナスには存在するがヒトではみつかからない蛋白質は1,968種であった。

バクテリアが、真核生物に葉緑体として共生することで成立したと考えられている。比較ゲノム解析で得られたこれら光合成生物に共通する遺伝子の多くは、酸素発生型の光合成細菌で成立し、クラミドモナスなどの緑藻類や初期に陸上化したコケ植物、そして、シロイヌナズナなどの高等植物にまで、進化の過程で保存されてきたと考えられる。また、このような光合成生物に共通な遺伝子とは別に、シアノバクテリア、緑藻、高等植物では、進化の途上、光合成を維持するための遺伝子が地球環境の変化に応じて独自に獲得されてきたものと考えられる。たとえば、多細胞化後に陸上化するには、水不足の環境に適応するために体制を整える必要があり、維管束系や乾燥耐性が獲得されていたとされる。

光合成生物は光合成能を維持するために、ゲノム上に存在する特定の遺伝子セットを発現させることで環境変化に順化する。この順化機構を解き明かすためには、静的なゲノム情報のほか、環境変化に応じた遺伝子の発現情報(トランスクリプトーム^{*)})を得ることが重要である。これまでに筆者らは、明暗、CO₂濃度変化、高温、低温、栄養源欠乏(N, P, K, Fe, Ca, Cu)、配偶子誘導、接合などの各種ストレス条件で培養した細胞からcDNAライブラリーを構築し、クラミドモナスのEST情報を取得している¹²⁾。得られたEST情報に基づいて10,368種類のESTクローン

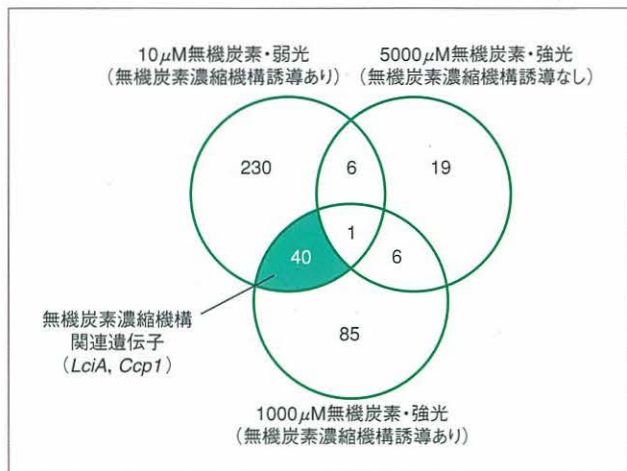


図5 無機炭素濃縮機構の関連遺伝子を同定するための発現誘導プロファイル比較

クラミドモナス培養液中の無機炭素濃度と照射した光強度がそれぞれ、10 μM・弱光、1000 μM・強光、5000 μM・強光のときの発現プロファイルと比較した。数字は、発現誘導された遺伝子数を示す。10 μM・弱光、1000 μM・強光の条件で無機炭素濃縮機構が誘導されることから、ここに含まれる40種類の遺伝子が無機炭素濃縮機構の誘導および機能に密接に関与していると考えられる。

を搭載したcDNAアレイを作製し、光合成反応基質のCO₂欠乏ストレス¹³⁾、強光ストレス¹⁴⁾、窒素源欠乏による配偶子分化¹⁵⁾、接合子形成³⁷⁾、概日リズム¹⁶⁾、といった細胞内外の環境変化の際に発現の変動する遺伝子を報告している。ここではとくに、植物の光合成に必須なCO₂の濃度変化に応答するトランスクリプトーム解析について紹介する。

2. CO₂環境応答

クラミドモナスを含む多くの微細藻類は、環境中のCO₂濃度が低下すると無機炭素への親和性を上昇させCO₂欠乏環境に順化する。この際に能動的な無機炭素輸送をとともなうことから、この順化機構は無機炭素濃縮機構(carbon-concentrating mechanism; CCM)とよばれる。クラミドモナスの場合、亜鉛結合型の調節因子CCM1によって制御

されていることが知られており^{7,17)}、このCCM1によって調節されるCO₂応答性遺伝子のなかには重炭酸イオン輸送体やデンブリン合成酵素、炭酸脱水素酵素をコードする遺伝子が含まれている¹³⁾。また、細胞表層炭酸脱水素酵素の遺伝子はCCM1の下流ではたらくMYB転写因子によって制御を受けることが示されている^{8,18)}。

筆者らは、クラミドモナスの無機炭素濃縮機構が誘導される条件を詳細に検討するために、細胞に通気するCO₂濃度と、照射する光強度を変化させたときの無機炭素濃縮機構誘導の有無を調べた¹⁴⁾。大気条件に相当する0.038% (v/v)のCO₂を含む空気を、細胞を含まない液体培地に通気すると、溶存無機炭素濃度は約50 μMとなる。この条件で細胞を培養すると、培養液中の溶存無機炭素濃度は約10 μMにまで減少することから、細胞は溶液中の無機炭素濃度を“低い”と感知し、無機炭素濃縮機構を誘導する。こうして、クラミドモナスは培地中の溶存無機炭素を輸送体により積極的に細胞内に取り込み固定するようになる。一方で、5% (v/v)のCO₂を含む空気を通気すると培地中の溶存無機炭素濃度は約5000 μMとなり、細胞はその濃度を“高い”と感知し、無機炭素濃縮機構を抑制する。この高濃度CO₂環境では、1000 μmol photons m⁻² s⁻¹の強光を照射しても無機炭素濃縮機構は誘導されなかった。また、1.2% (v/v)のCO₂を含む空気を通気して120 μmol photons m⁻² s⁻¹の弱光で培養すると溶存無機炭素濃度は約1000 μMとなり、この条件では無機炭素濃縮機構は誘導されなかったが、強光の照射によりクラミドモナスは無機炭素への親和性を上昇させ、無機炭素濃縮機構が誘導されることがわかった。強光を照射したあとの培地中の溶存無機炭素濃度は約1000 μMと変化しなかったことから、クラミドモナスは細胞外の溶存無機炭素濃度の低下を細胞表面で直接感知して無機炭素濃縮機構を誘導するというのではなく、より複雑なCO₂センシング機構^{*4}をもっていることが示唆される。

クラミドモナスが無機炭素濃縮機構を誘導する条件で発

*3 トランスクリプトーム：ある生物の遺伝情報全体のセットを“ゲノム”とよぶのに対して、細胞の特定の環境下におけるその時点での転写産物(transcript)のセットを“トランスクリプトーム”とよぶ。1つの個体であっても組織や細胞ごとに(すなわち、遺伝的多様性とは異なる原因により)ある決まった構成になっている。つまり、トランスクリプトームはその細胞が発生の過程で受けた細胞外からの影響の積み重ねによって変化する。

*4 CO₂のセンシング機構：CO₂は植物の光合成反応に必須の成分であるため、その濃度変化に順化していくことは不可欠である。とくに、水圏環境では水中の溶存炭酸濃度は5~30 mg/lと幅広く、また、pHに依存して存在様式が変化する。したがって、水生光合成生物は時々刻々と変化する無機炭素(CO₂, HCO₃⁻)濃度を感知し、そのシグナルを伝達するシステムを備えているものと考えられている。無機炭素濃縮機構はCO₂濃度が欠乏すると迅速に誘導されるため、CO₂センシング機構を解明するうえで非常によいモデルとなる。たとえばヒトでは、HCO₃⁻の濃度の上昇は精子の運動能力の活性化を促し、受精能獲得を介することで受精に関与していることが知られている。アデニル酸シクラーゼの活性がこのHCO₃⁻濃度に依存することが示され、アデニル酸シクラーゼ自体がHCO₃⁻センサーである可能性が示唆されている。また、微生物では、炭疽菌*Bacillus anthracis*の毒素蛋白質をコードする遺伝子の転写レベルが、CO₂濃度を大気条件(0.038%)からヒト体内レベルの5%に移すことで5~20倍に増大することから、これを制御するCO₂センシング機構の存在が示唆されている。

現される40種類の遺伝子に、無機炭素濃縮機構の成分やその制御にかかわる遺伝子が含まれているものと考えられる(図5)。これらのなかには、葉緑体包膜に局在する無機炭素輸送体の候補であるLCIA¹⁹⁾、CCP1²⁰⁾、CO₂とHCO₃⁻の交換反応を触媒する炭酸脱水酵素などの遺伝子が含まれており、これらの蛋白質の局在や機能欠損株について解析が進められている。

無機炭素濃縮機構はシアノバクテリアやクラミドモナスを用いて集中的に研究されてきたが、藻類がもつ無機炭素濃縮機構の多様性を理解するためには、さまざまな生物を用いた分子遺伝学的研究を進める必要がある。筆者らは、オーストリアのLöffelhardt博士と共同で、灰色藻^{*5}のシアノフォラ *Cyanophora paradoxa* が無機炭素濃縮機構をもつことを見だし、それにともなって誘導される遺伝子をマイクロアレイにより解析した²¹⁾。灰色藻類は緑藻や紅藻と同じく酸素発生の色素体をもつ単細胞真核藻類で、その葉緑体はとくにシアネラとよばれ一般的な葉緑体と区別されている。シアネラは集光性色素としてフィコビルン蛋白質をもつこと、その細胞膜にペプチドグリカン層をもつことから、一次共生したシアノバクテリアの姿を色濃く残した体制をもつ。このことから、灰色藻類は一次共生のモデル生物として注目を集めている生物である。

一方で、水生光合成生物の無機炭素濃縮機構が多様なのは、陸上植物の繁茂によって引き起こされた大気中のCO₂濃度の低下によって、無機炭素濃縮機構が進化上、独立に獲得されたためであるとする説がある²²⁾。無機炭素濃縮機構の起源が単系統であるのか多系統であるのかはいまだに議論が分かれているが²³⁾、今後は、微細藻類がもつ無機炭素濃縮にかかわる因子を比較・同定することで、藻類の多様なCO₂適応・順化機構が明らかにされるであろう。

IV 鞭毛 クラミドモナス遺伝子からヒト疾患の原因 遺伝子へ

クラミドモナスは2本の等長な鞭毛を使って遊泳し、また、環境の変化を感知する。鞭毛の基部は基底小体に連結されている。鞭毛の内部に存在するアキソネマには、2本の微小管を中心にして9本の微小管が環状に配置した構造

(9+2構造)が存在し、これは、多くの真核生物にみられる繊毛の構造と同一である(図2)。これまで、クラミドモナスにおいて、鞭毛構造の変異株が多数単離され、鞭毛の形態形成や基底小体機能の解析が行われてきた²⁴⁾。とくに近年では、鞭毛の構造蛋白質などを輸送する鞭毛内輸送(intraflagellar transport; IFT)に関与する遺伝子の機能が明らかになってきており、動物細胞における鞭毛内輸送体の機能とともによく研究され、ヒトの疾病との関連が注目されている²⁵⁾。

動物には、精子の遊泳時に機能する鞭毛のほかに、運動性のない繊毛が存在し、おもに視覚、嗅覚、触覚などの感覚受容にはたっている。興味深いことに、高等植物や多くの菌類、粘菌類には鞭毛や繊毛が存在しない(図6)。したがって、クラミドモナスやヒトなど鞭毛や繊毛構造をもつ生物種と、もたない生物種のゲノム情報を相互比較することによって、鞭毛や繊毛に関連する遺伝子の網羅的な同定が可能となる。クラミドモナスとヒトに共通な遺伝子774種の多くは鞭毛や繊毛の構造と機能に関連する遺伝子であり、一見、進化上は非常に遠縁であるクラミドモナスのゲノムから、ヒトやマウスで機能している鞭毛や繊毛に関する遺伝子のオーソログがづぎづぎに同定されている。

とくに興味深いのは、ヒトやマウスでそれらの遺伝子に変異があると深刻な遺伝病をひき起こす場合があることである。クラミドモナスの鞭毛内輸送に関与するIFT88蛋白質は、マウスにおけるTg737蛋白質と高い相同性をもつ。マウスにおいてTg737遺伝子に変異が生じると、腎臓内部に無数の嚢胞が生じて腎機能を低下させる多発性嚢胞腎をひき起こすことが知られている。一方、クラミドモナスにおいてはIFT88遺伝子に変異が生じると鞭毛形成が行われなくなることから、マウスにおいてもTg737遺伝子は腎臓細胞における繊毛の形成に関与するものと予想されている²⁶⁾。また、比較ゲノムの手法によって、網膜色素変性症や知能発育不全をひき起こすバルデー・ビーデル症候群の原因遺伝子のひとつであるBBS5のホモログも、ヒトゲノムとの比較からクラミドモナスの鞭毛遺伝子としてみつかった²⁷⁾。BBS5ホモログ遺伝子のRNAi法による発現抑制により、クラミドモナスでは鞭毛の数が減ったり失われたりする表現型が観察されたことから、この症候群もヒトにおける鞭毛や繊毛形成の不全が原因とされている。

*5 灰色藻：灰色藻と名づけられてはいるが、色素体はシアノバクテリアと同様に藍色である。シアノフォラが属する灰色植物門のGlaucophytaはギリシア語 glaucous に由来し、地中海の色(sea-green)を意味する。これが英語のglaucous(青みがかった灰白色)になり、和訳された際に灰色とされた³⁾。

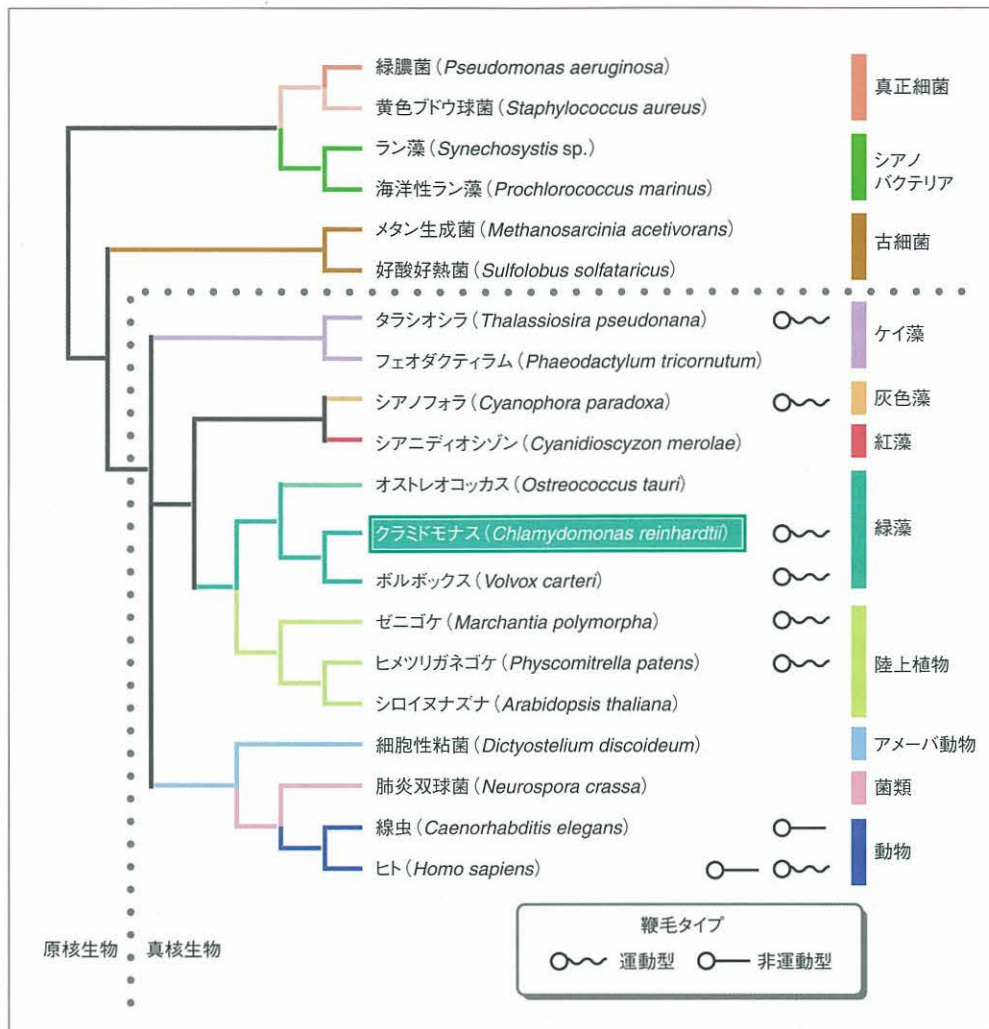


図6 ゲノム解読が完了または進行中の20生物種の分子系統樹⁶⁾

真正細菌、シアノバクテリア、古細菌、および、ケイ藻、紅藻、灰色藻、緑藻、陸上植物、アメーバ動物、菌類、動物などの真核生物の進化系統関係を示す。クラミドモナスは枠で囲ってある。運動型および非運動型の鞭毛が存在する生物種については、右横に鞭毛(運動型・非運動型)を示している。

今後も、ヒトの遺伝性疾患の原因遺伝子とその機能が、細胞レベルで変異体の解析が可能なクラミドモナスを研究することで同定され、さらに、ヒトにおける疾患のメカニズムが解明されることが期待されている。

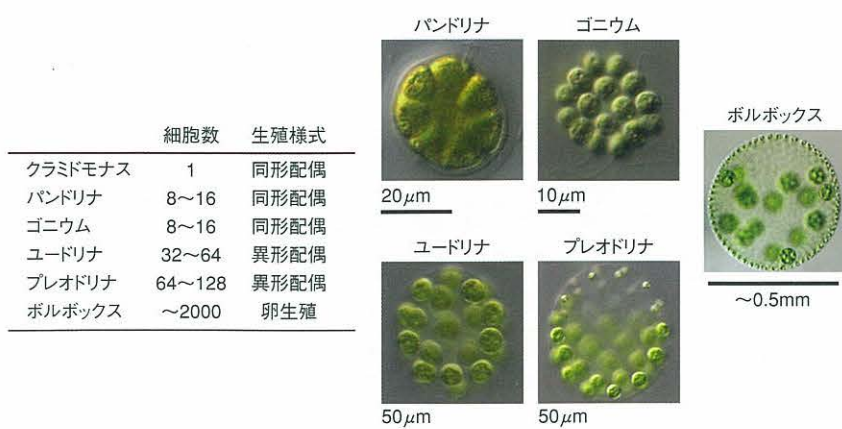
V 生殖 生殖様式の進化を探る

クラミドモナスの生殖はプラス型 (mt^+) とマイナス型 (mt^-) の配偶子の直接的な相互作用によってはじまる。それぞれの配偶子の鞭毛上には、細胞内から輸送されてきたプラス型 (SAG1) とマイナス型 (SAD1) のアグルチニンとよばれる蛋白質が蓄積し、相手方のアグルチニンと相互作用を起こすことで、配偶子は相手方と鞭毛による凝集を行なう²⁸⁾ (図1)。2つのアグルチニン遺伝子 SAG1 と SAD1 の

発現は性特異的であり、性決定遺伝子座に存在する MID 遺伝子による制御を受けている。それぞれの接合型のアグルチニンはヒドロキシプロリンに富む糖蛋白質であり、クラミドモナス自体がもつ細胞壁を構成する糖蛋白質に高い相同性を示すことから、細胞壁を構成していた糖蛋白質が、性分化の出現とともに生殖に利用されるよう進化したとされる²⁹⁾。鞭毛凝集により鞭毛内の cAMP 濃度が上昇し、これがシグナルとなって細胞に伝達され、マトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) の一種であるガミートライシンにより細胞壁が分解されて、配偶子はプロトプラスト化する³⁰⁾。このガミートライシンは、配偶子だけではなく栄養細胞もプロトプラスト化することから、クラミドモナスの形質転換において重要なツールのひとつになっている。

クラミドモナスの性決定は第6染色体の約200 kbp の領域に存在する性決定遺伝子座によって制御されている (図

図7 緑藻における細胞数と生殖様式との関係



ボルボックス目には細胞の数や分化の程度が中間的な種が存在する。雌雄の配偶子が同じ形状をしている同形配偶型（クラミドモナス、バンドリナ、ゴニウム）から、雌雄の配偶子の形状が異なる異形配偶型（ユードリナ、プレオドリナ）を経て、精子と卵子からなる卵生殖型（ボルボックス）に進化したものと考えられている。

3b). 雌雄の性決定遺伝子座には、それぞれの接合型のあいだで相同性の高いセグメントが逆位や転座によってモザイク状に存在していることから、この構造が減数分裂における対合時の組換えを抑制し、接合型の性遺伝子座が維持されたまま次世代に伝えられている³¹⁾。また、この遺伝子座には、クラミドモナスの性決定遺伝子のひとつ *MID* 遺伝子や、配偶子の融合後に起こる雄由来の葉緑体DNAの消失（母性遺伝）に関与する *EZYL* 遺伝子など、生殖機構にかかわる遺伝子が多数存在している³¹⁾。とくに、マイナス型配偶子の性遺伝子座に特異的に存在する *MID* 遺伝子は RWP-RK ファミリーに属する転写因子をコードしており、*MID* 遺伝子の欠損株ではマイナス型であるにもかかわらず“偽プラス型”として分化しマイナス型と凝集反応を起こす。*MID* 遺伝子は、性特異的に機能する遺伝子の発現を促進または抑制することで、性決定におけるマスター調節遺伝子の役割を担っていると考えられている³⁷⁾。

クラミドモナスに近縁のボルボックス目には、クラミドモナス型の細胞が複数個集まっているゴニウムやプレオドリナ、ユードリナなどの中間的な種が存在し、およそ5000万年前に、クラミドモナス型の祖先種がボルボックスをはじめとする群体性の種に多細胞化していった系統と考えられている（図7）。同時にこの系統は、同形配偶様式から異形配偶様式、そして、卵生殖様式を行なう生物種がそろっている系統でもあり、多細胞化や生殖様式の進化を研究するうえでひとつのモデルとなる系統であるといえる。最近、*MID* 遺伝子のオーソログが群体性藻類のゴニウムやプレオドリナからクローニングされた^{32,33)}。これらの種では雄接合型にのみ *MID* 遺伝子が存在することから、*MID* 遺伝子

自体が雄としての性を決定するものと考えられている。生殖様式は生物種によって大きく異なるが、多細胞化と生殖様式の変化の関係がゲノム比較研究によってさらに明らかにされるであろう。

VI クラミドモナスゲノムの現在の問題点とその解決法

クラミドモナスのゲノム解析と網羅的な発現解析により、クラミドモナスには光合成や生殖など、動物および植物においてそれぞれの性質を特徴づける遺伝子が存在すること、また、環境の変化に応じて発現レベルが変化する遺伝子セットが重要である点について述べてきた。しかしながら、ゲノム配列の精度という観点からみると、現在、公開されているゲノム配列120 Mbのうち、およそ15.3 Mb (12.7%) にわたる領域が未解読であり、染色体を構成するスキファールド間にはギャップも存在する。また、スキファールド内部にはくり返し配列が多数存在するためあやまってアセンブリされたスキファールドも存在することから、現状では完成度の高いゲノム情報にはなっていない。実際、筆者らの蛋白質構造解析の結果から、現在、公開されている遺伝子モデルにはエキソン領域の見落としなどのあやまりが存在することが判明している。

より完成度の高いゲノム情報を確立するためには、多くのcDNA完全配列の決定とスキファールド間のギャップの解消とが必須である。そこで現在、筆者らは、完全長cDNAの内部配列を決定し、新しい遺伝子モデルを作成中である。また同時に、ゲノムの完全解読のために新たな

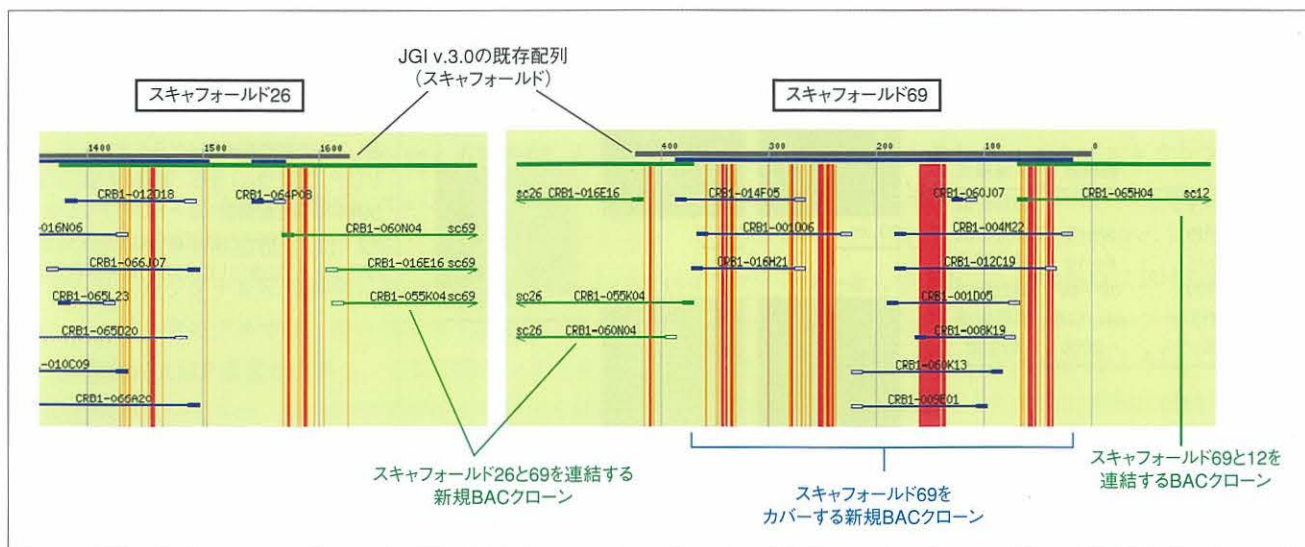


図8 京都大学によるクラミドモナスのゲノム構造解析の例

現在、米国エネルギー省 Joint Genome Institute (JGI) で公表されているクラミドモナスゲノムにおけるスキファフォールドの連結とスキファフォールド内の配列未決定領域を決定するために、クラミドモナス野生株 C-9 (*mt*⁻) からカバー率 20 倍の BAC ゲノムライブラリーを作製した。5 万クローンについて両末端配列を決定し、公表されている概要配列にマッピングを行なった。スキファフォールド 69 の内部配列の未決定領域 (赤色・オレンジ色の領域) をカバーする多数の BAC クローン (青色) が存在していた。また、5' 末端において 3 個の BAC クローン (緑色) がスキファフォールド 26 に、3' 末端において 1 個の BAC クローンがスキファフォールド 12 の末端にヒットしており、スキファフォールド 26、69、12 はこれらブリッジクローンによって連結されることが示唆される (図 3a 参照)。

BAC ライブラリーを構築し、その配列決定を進めている (図 3、ならびに、図 8)。これらの新たに得られたゲノム情報と完全長 cDNA 情報を含めたゲノム情報を公開する予定である。とくに、遺伝子モデルごとに生物種間の比較ができる比較ゲノムデータベースの構築をめざしている。

おわりに

緑藻クラミドモナスのゲノムが解析されたことにより、光合成・環境応答に関与する遺伝子や鞭毛 (繊毛) 機能に関与する遺伝子は、動物・植物へとそれぞれ伝播し、進化の過程で独自の機能を獲得したことがわかってきた。また、動物や植物のゲノムと比較することで、クラミドモナスが動物と植物の分岐を俯瞰する際に重要な位置にある生物種であるということもわかってきた。とくに、非維管束植物においては、紅藻シアニディオシゾン³⁴⁾や蘚類ヒメツリガネゴケの全ゲノム配列³⁵⁾、そして、苔類ゼニゴケの Y 染色体の全配列³⁶⁾も解読されており、シアノバクテリアから緑藻、コケ類を経て、高等植物にいたる、遺伝子の進化と多様性がますます明らかになることが期待される。今後、動物・植物の枠をこえた広い視点でクラミドモナスを用いたユニークな研究が展開されるだろう。

群体性藻類の写真を提供していただいた理化学研究所 西井一郎博士、ならびに、クラミドモナスゲノム解析に協力いただいている国立情報学研究所 藤山秋佐博士をはじめ、共同研究者に感謝します。

文 献

- 1) Cavalier-smith, T.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 7-76 (2002)
- 2) Erikson, H. P.: *BioEssays*, **29**, 668-677 (2007)
- 3) 井上 勲: 藻類からみる 30 億年の自然史, 東海大学出版会 (2006)
- 4) Harris, E.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **52**, 363-406 (2001)
- 5) Sager, R., Ishida, M. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **50**, 725-730 (1963)
- 6) Boynton, J. E. et al.: *Science*, **240**, 1534-1538 (1998)
- 7) Fukuzawa, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 5347-5352 (2001)
- 8) Yoshioka, S. et al.: *Plant Cell*, **16**, 1466-1477 (2004)
- 9) Matsuo, M. et al.: *Genes Dev.*, in press (2008)
- 10) Merchant, S. S. et al.: *Science*, **318**, 245-250 (2007)
- 11) Pasquale, S. M., Goodenough, U. W.: *J. Cell Biol.*, **105**, 2279-2292 (1987)
- 12) Asamizu, E. et al.: *Phycologia*, **43**, 722-726 (2004)
- 13) Miura, K. et al.: *Plant Physiol.*, **135**, 1595-1607 (2004)
- 14) Yamano, T. et al.: *Plant Physiol.*, **147**, 340-354 (2008)
- 15) Abe, J. et al.: *Curr. Genet.*, **46**, 304-315 (2004)
- 16) Kucho, K. et al.: *Plant Mol. Biol.*, **57**, 889-906 (2005)
- 17) Kohinata, T. et al.: *Plant Cell Physiol.*, **49**, 273-283 (2008)

- 18) 福澤秀哉・山野隆志: 蛋白質 核酸 酵素, **50**, 958-965 (2005)
- 19) Mariscal, V. *et al.*: *Protist*, **157**, 421-433 (2006)
- 20) Chen, Z. Y. *et al.*: *Plant Physiol.*, **114**, 265-273 (1997)
- 21) Burey, S. C. *et al.*: *Plant Cell Environ.*, **30**, 1422-1435 (2007)
- 22) Badger, M. R., Price G. D.: *J. Exp. Bot.*, **54**, 609-622 (2003)
- 23) Raven, J. A.: *Eur. J. Phycol.*, **38**, 47-53 (2003)
- 24) Kamiya, R.: *Cell Motil. Cytoskelton*, **32**, 98-102 (1995)
- 25) Rosenbaum, J. L., Witman, G. B.: *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 813-825 (2002)
- 26) Pazour, G. J. *et al.*: *J. Cell Biol.*, **151**, 709-718 (2000)
- 27) Li, J. B. *et al.*: *Cell*, **117**, 541-552 (2004)
- 28) Ferris, P. J. *et al.*: *Plant Cell*, **17**, 597-615 (2005)
- 29) Lee, J. H. *et al.*: *Plant Physiol.*, **144**, 1813-1826 (2007)
- 30) Matsuda, Y., Kubo, T.: *in Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2nd Ed. (Barrett, A., Rawlings, N., Woessner, J. ed.), pp.592-595, Academic Press, London (2004)
- 31) Ferris, P. J. *et al.*: *Genetics*, **160**, 181-200 (2002)
- 32) Hamaji, T. *et al.*: *Genetics*, **178**, 283-294 (2008)
- 33) Nozaki, H. *et al.*: *Curr. Biol.*, **16**, 1018-1020 (2006)
- 34) Mastuzaki, M. *et al.*: *Nature*, **428**, 653-657 (2004)
- 35) Rensing, S. A. *et al.*: *Science*, **319**, 64-69 (2008)
- 36) Yamato, K. T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 6472-6477 (2007)
- 37) Kubo, T. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, *in press* (2008)

福澤秀哉

略歴：1986年 京都大学大学院農学研究科博士課程 修了，農学博士，東京大学応用微生物研究所 助手，京都大学農学部 助手，同 助教授を経て，1999年より京都大学大学院生命科学研究科助教授（現 准教授）。

研究テーマ：光合成生物の環境応答とゲノム進化，CO₂ センシングとCO₂ 濃縮機構の制御。

久保雄昭

略歴：京都大学大学院生命科学研究科 博士研究員，博士（理学）。

研究テーマ：緑藻における性分化と性決定機構。

山野隆志

略歴：京都大学大学院生命科学研究科 博士課程在学。

研究テーマ：緑藻のCO₂ 輸送システムとその制御。