

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2017

課題番号：25304012

研究課題名(和文) ボルボックス属の全世界的種分類体系の確立と卵生殖への進化過程の解明

研究課題名(英文) Establishment of worldwide taxonomic system of the genus Volvox and unveiling the evolution of oogamy

研究代表者

野崎 久義 (Nozaki, Hisayoshi)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：40250104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では世界各地から卵生殖のボルボックスの様々な種を採集し新規培養株を確立し、無性・有性生殖の形質と分子系統を結合した全世界的なボルボックス属の客観的自然種分類体系を構築すること及びを目的として開始した。その結果、ボルボックス属は4個の単系統の属以下分類群に再編成された。ボルボックスの直接の祖先と推測されていた種をタイ王国から採集することに成功し、その系統的な位置を明らかにした。更に卵生殖への進化の鍵となる体外受精タイプの異型配偶の新属 *Colemanosphaera* を発見・記載した。

研究成果の概要(英文)：The present study was undertaken to establish a worldwide, objective and natural taxonomic system of the oogamous genus Volvox and unveiling the evolution of oogamy, based on the molecular and asexual and sexual spheroid morphology of Volvox species collected in various localities of the world. Our field and laboratory studies in this research project resulted in the reconstruction of four, monophyletic infrageneric taxa of the genus Volvox. We re-discovered the ancestral Volvox species from Thailand and resolved its phylogenetic position. We identified a novel colonial volvocine genus, *Colemanosphaera*, in obligately anisogamous conjugation between male and female motile gametes occurred outside the female colony (external fertilization during anisogamy). Considering the external obligate anisogamy, oogamy evolution may have been preceded by the transition from external to internal fertilization during anisogamy within the volvocine green algae.

研究分野：多様性進化学

キーワード：ボルボックス 分類体系 卵生殖 進化 多様性

#### 1. 研究開始当初の背景

群体性ボルボックス目は単細胞のモデル生物クラミドモナスにごく近縁でありさまざまな進化段階の生物が現存し、最新の生物学的手法を用いた比較研究が可能であり、近年、性進化や多細胞化のモデル系統群として世界的に注目されつつある。本群の最も進化段階の高いボルボックス (*Volvox*) 属は分子系統的に多系統であるため細胞数の増加とともに多起源的に卵生殖が誕生したと推測されている。しかし、多くの種の卵生殖に関する形態学的情報は希薄である。また、殆どの種が特定の地域だけから報告された固有種であり、種分類学的研究は立ち後れており、過去に確立された培養株は現在絶滅しているか、長い継代培養で有性生殖能力が衰退したものが殆どである。

#### 2. 研究の目的

従って、本研究では世界各地からボルボックスの様々な種を採集し新規培養株を確立し、種分類上重要な形質である有性生殖の誘導条件を検討し、無性・有性生殖の形質と分子系統を結合した全世界的なボルボックス属の客観的自然種分類体系を構築する。更に、新規培養株の有性生殖の詳細な観察とこれらを加えた群体性ボルボックス目の詳細かつ信頼度の高い系統関係を葉緑体と核コードの多遺伝子情報を用いて推測し、多細胞化と卵生殖に関する形態進化の道筋を明らかにする。

#### 3. 研究の方法

本研究では世界的に見て生息地域が限定されている多くの種のボルボックスを海外数カ所の拠点からそれぞれ試料を採集し、培養株を確立する。次に培養株の種分類上重要な形質である有性生殖の誘導条件を検討し、有性生殖の形質（雌雄群体と受精卵の形態）を得る。得られた有性・無性生殖の形態形質と分子系統を照らし合わせ種同定を実施し、ボルボックス属の広範囲な種レベルの客観的な自然分類体系を構築する。有性生殖が誘導された新規株に関しては光学顕微鏡のみならず、免疫抗体蛍光染色や電子顕微鏡で卵と精子に関する細胞学的情報を得る。

#### 4. 研究成果

ボルボックス (*Volvox*) 属の多くの種または種以下分類群は産地が限定されており、例えばモデル分類群 *V. carteri* f. *nagariensis* はインド～日本にかけて分布しているが、ヨーロッパやアメリカ大陸からの報告はない (Nozaki 1988, *Phycologia*)。従って、世界各地でのボルボックスの調査が望まれます。*Volvox capensis* はボルボックス節 (*Volvox* sect. *Volvox*) に分類され、本節は群体の細胞間に太い原形質連絡をもつことを特徴としており、他のボルボックスの節およびユードリナ・プレオドリナとは系統的に分離します。

*V. capensis* は1933年の原記載以来、南アフリカからの報告しかない種であり、Starr et al. (1980, *PNAS*) は南アフリカ産の培養株を観察している。本研究ではアメリカ合衆国モンタナ州より採取したサンプルから確立した培養株の無性群体と雌雄同体の有性群体の形態から、本株は *V. capensis* と同定された。しかし、今回の米国産の株の雌雄同体の有性群体の精子束の数が少ないことと配偶子の接合様式がこれまでの南アフリカ産の *V. capensis* の報告と異なった。今回の株の ITS-2 核 rDNA の配列は南アフリカ産の *V. capensis* と1塩基が異なるだけであり、生殖様式の速い進化が推測された (Nozaki et al. 2015, *Phycologia* 54: 316-320)。

*Volvox* 属は形態的に4節に分類され (Smith 1944, *Trans. Am. Microsc. Soc.*)、細胞間の原形質連絡を欠く *Merrillosphaera* 節の *V. carteri* が最も良く研究されていた。Starr (1971, *Cont. Phycol.*) は *Merrillosphaera* 節の "*V. africanus*" を世界各地から収集し、有性生殖の4タイプを報告し、Coleman (1999, *PNAS*) は ITS2 配列の解析からヘテロタリック雌雄異体の "HeD タイプ" がホモタリックの3タイプと姉妹群を形成することを明らかにした。しかし、現在ホモタリック株は入手できず、入手可能な HeD タイプの株も古いので、更なる研究は停止していた。本研究で我々は琵琶湖から無性群体の形態から *V. africanus* と同定される複数の培養株を確立した。有性生殖は Starr (1971) のホモタリックで同一の株で雌雄同体群体と雄群体を作る "HoM+m タイプ" と HeD タイプの2タイプであった。今回、両タイプは分子情報ならびに接合子と群体の細胞外基質の形態で識別された。Starr (1971) は接合子と群体の細胞外基質の形態を観察していないが、Smith (1944) 以前の原記載を含む世界各地からの *V. africanus* の報告を基にすると、今回の HoM+m タイプは *V. africanus* で、HeD タイプは新種 *V. reticuliferus* であると結論された。また、この論文では従来 *Merrillosphaera* 節が系統解析すると多系統になるので、節レベルではそれぞれが単系統になるように分類学的に再編成した (Nozaki et al. 2015, *PLoS One* 10: e014263)。

2鞭毛型の遊泳細胞が集合し、多細胞化したボルボックス系列の最も進化段階の高いものがボルボックス (*Volvox*) 属で、その直前がプレオドリナ (*Pleodorina*) 属と伝統的に考えられていた。ボルボックスは500以上の細胞をもち、非生殖細胞が球体の前端から後端までほぼ均一に分布しているが、プレオドリナは細胞数が200以下で非生殖細胞は球体の前半だけに通常分布する。しかし、*Pleodorina sphaerica* は通常のボルボックスと同様に球体の前端から後端まで非生殖細胞が均等に分布しますが、細胞数は200未満であるという両属の中間的な形態をもち、

ボルボックスの祖先的な種であると議論されていた (Iyengar 1933, J. Linn. Soc. London Bot. 49: 323-375.)。これまでに本種はインドから 2 回報告されただけであり、1951 年以來採集記録もなかった (Iyengar & Ramanathan 1951, Phytomorphology 1: 215-224.)。本研究では 65 年ぶりにタイ王国から *P. sphaerica* が採集され、培養株を用いて分子系統学的解析を実施した。その結果、本種は非生殖細胞が群体の前半だけに分布する他の種のプレオドリナ (*P. californica*, *P. japonica*) の姉妹種であることが明らかになった。これら 3 種のプレオドリナはボルボックス 8 種と大きな単系統群を形成し、その末端の系統に位置した。従って、*P. sphaerica* はボルボックスの祖先種というより、プレオドリナの祖先種である可能性が議論された (Nozaki et al. 2017, Phycologia 56: 469-475)。

群体性ボルボックス目は多細胞化と有性生殖の進化のモデル生物群とされているが、多くの研究は *Volvox carteri* f. *nagariensis* と同定されている日本産の Eve 株、Adam 株等を使用している (Starr 1969, Arch. Protistenk.; Kirk et al. 1999, Development; Ferris et al. 2010, Science) 。本品種はインドの Nagari を原産地としており (Iyengar 1933, J. Linn. Soc. Bot.) 。日本以外の株に関してはインドの Poona 産の株を用いた研究がある (Adams et al. 1990, Curr. Genet.) 。形態分類学的には *Volvox carteri* は 6 個の品種に分類されており、有性生殖の雄群体の形態が重要な識別基準である (Nozaki 1988, Phycologia) 。しかし、f. *nagariensis* に関しては日本産の有性生殖の情報しかなく (Starr 1969) 雄群体を構成する非生殖細胞と分裂して精子束となる生殖細胞 (androgonia) の比 (S/A 比) に変動がなく 1:1 であることを特徴としている (Nozaki 1988) 。本研究では、核 ITS 領域の情報から *V. carteri* f. *nagariensis* と同定されうる台湾産の 33 株を用いた研究を実施した。その結果、雄群体の S/A 比は 1:1->50:1 であることが明らかになった。また、性特異的遺伝子 (Ferris et al. 2010) に着目したゲノム PCR を実施した結果、メス特異的 *HMG1f* を欠損している可能性のあるメス 1 株が明らかとなった (Nozaki et al. 2018, Botanical Studies 59: 10)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Nozaki, H., Ueki, N., Takusagawa, M., Yamashita, S. Misumi, O., Matsuzaki, R., Kawachi, M., Chiang, Y.-R. and Wu, J.-T. 2018. Morphology, taxonomy and mating-type loci in natural populations of

*Volvox carteri* in Taiwan. Botanical Studies 59: 10. DOI: 10.1186/s40529-018-0227-9. 査読有

Nozaki, H., Mahakham, W., Athibai, S., Yamamoto, K., Takusagawa, M., Misumi, O., Herron, M. D., Rosenzweig, F. and Kawachi, M. 2017. Rediscovery of the 'ancestral *Volvox*' species: morphology and phylogenetic position of *Pleodorina sphaerica* (Volvocales, Chlorophyceae) from Thailand. Phycologia 56: 469-475. DOI: 10.2216/17-3.1. 査読有

Yamamoto, K., Kawai-Toyooka, H., Hamaji, T., Tsuchikane, Y., Mori, T., Takahashi, F., Sekimoto, H., Ferris, J. P. and Nozaki, H. 2017. Molecular evolutionary analysis of a gender-limited *MID* ortholog from the homothallic species *Volvox africanus* with male and monoecious spheroids. PLoS ONE 12(6): e0180313. DOI: 10.1371/journal.pone.0180313. 査読有

Nozaki, H., Ueki, N., Misumi, O., Yamamoto, K., Yamashita, S., Herron, M. D. and Rosenzweig, F. 2015. Morphology and reproduction of *Volvox capensis* (Volvocales, Chlorophyceae) from Montana, USA. Phycologia 54: 316-320. DOI: 10.2216/15-14.1. 査読有

Nozaki, H., Matsuzaki, R., Yamamoto, K., Kawachi, M. and Takahashi, F. 2015. Delineating a new heterothallic species of *Volvox* (Volvocaceae, Chlorophyceae) using new strains of "*Volvox africanus*". PLoS ONE 10: e0142632. DOI: 10.1371/journal.pone.0142632. 査読有

Nozaki, H., Yamada, T. K., Takahashi, F., Matsuzaki, R. and Nakada, T. 2014. New "missing link" genus of the colonial volvocine green algae gives insights into the evolution of oogamy. BMC Evol. Biol. 14: 37. DOI: 10.1186/1471-2148-14-37. 査読有

[学会発表](計 9 件)

Nozaki, H. "Volvocine green algae inviting you to 200 MYA time travel for evolution of female-male and multicellularity", Biology Colloquium hosted by Graduate Students' Society, Department of Biological Sciences, Faculty of Science, National University of Singapore (DBS Conference Room 1, NUS, Singapore, 15 February 2018). 招待講演

Misumi, O. "Introduction of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* and our recent studies." (Special Seminar, Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 17 November 2017). 招待講演

Nozaki, H. “Systematics and evolution of freshwater algae” (Special Seminar, Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 17 November 2017). 招待講演

野崎久義、植木紀子、田草川真里、三角修己、Chiang Yin-Ru、Wu Jiunn-Tzong “台湾産の *Volvox carteri*” (2017年9月8日～10日、日本植物学会第81回大会、東京理科大学野田キャンパス、野田市)

Nozaki, H. Ueki, N., Takusagawa, M., Yamashita, S., Misumi, O., Yin-Ru Chiang, Y.-R. and Wu, J.-T. “*Volvox carteri* from Taiwan”, The Fourth International *Volvox* Conference (The Donald Danforth Plant Science Center in St. Louis, Missouri, USA, 16-19 August 2017)

野崎久義、Wuttipong Mahakham、Sujeephon Athibai、田草川真理、三角修己、河地正伸 “タイ王国産最大級ボルボックスと最小ボルボックス?” (2017年3月24日～25日、日本藻類学会第41回大会、高知大学朝倉キャンパス、高知市)

野崎久義、Wuttipong Mahakham、Sujeephon Athibai、田草川真理、三角修己、河地正伸 “タイ王国産ボルボックス類2種” (2017年3月10日～11日、日本植物分類学会第16回大会、京都大学吉田キャンパス、京都市)

Nozaki, H., Mahakham, W., Athibai, S., Takusagawa, M. and Misumi, O. “Establishing new strains of *Volvox* for future studies of biodiversity and evolution”, The 69<sup>th</sup> Yamada Conference 17<sup>th</sup> International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas* (Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan, 26 June-1 July 2016)

野崎久義、松崎令、山本荷葉子、高橋文雄 “日本新産と思われる琵琶湖産ボルボックス2種の形態と有性生殖の観察と種分類”(2015年9月6～8日、日本植物学会第79回大会、朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター、新潟市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~tayousei/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野崎久義 (NOZAKI, Hisayoshi)  
東京大学・大学院理学系研究科・准教授  
研究者番号：40250104

### (2) 研究分担者

関本 弘之 (SEKIMOTO, Hiroyuki)  
日本女子大学・理学部・教授  
研究者番号：20281652

三角修己 (OSAMI, Misumi)

山口大学・大学院創成科学研究科・准教授  
研究者番号：90583625

### (3) 連携研究者

土金 勇樹 (TSUCHIKANE, Yuki)  
日本女子大学・理学部・助教  
研究者番号：20434152