

西井独立主幹研究ユニット

Nishii Initiative Research Unit

独立主幹研究員 西井一郎

NISHII, Ichiro

当研究ユニットは、形態形成運動という多数の細胞がその運動活性を時空間的に協調させて引き起こす重要な発生現象を、そのまま解析するだけでなく、どのようにして起源となった単細胞生物から進化してきたかという観点を含めて分子レベルで解析し理解することを目指している。材料として選んだボルボックスは、多細胞生物の中では非常に最近になって多細胞化したグループに属しており、近縁種には起源となった単細胞生物クラミドモナスが知られている。ボルボックスの胚発生では、動物の原腸陥入に似た inversion と呼ばれる胚の裏表が逆転する形態形成運動が起こる。我々は、inversion できない突然変異体 (Inv 変異体) を単離し、その原因遺伝子を解析するとともに、その遺伝子が起源となった単細胞生物クラミドモナスでどのような役割をしているのかを明らかにし、多細胞生物の発生と進化の分子過程を解明する端緒を得ようとしている。

当研究ユニットは平成 16 年 4 月に発足し、7 月末より研究ユニットの立上げを開始した。

1. トランスポゾンタギング法を用いた、ボルボックスの inversion-less mutants のスクリーニング (西井, 中澤)

近年になってボルボックス (*Volvox carteri*) は、分子生物学レベルでの研究対象となった。このことは 90 年代にボルボックスでマーカー遺伝子、遺伝子導入法、Jordan トランスポゾンを用いたタギングによる変異遺伝子のクローニング法が開発されたことによる。我々はこれまでの研究で、inversion 突然変異体 (Inv⁻) の効率よいスクリーニング方法を開発し、ボルボックスの形態形成に必須の InvA 遺伝子の発見に至った。同様の手法により、InvA 以外の Inv 変異体を複数単離して、inv 遺伝子群を同定・解析することにより、inversion の分子的基盤を網羅的に解明しようと試みている。

ボルボックスのトランスポゾンタギング法に使われる Jordan と呼ばれるトランスポゾンは 1.6 kb の DNA 断片であり、ゲノム中に約 50 コピーある。このトランスポゾンは温度ストレスによって、ゲノム内での転移を誘導できることが分かっている。我々は、ボルボックスを低温 (24°C) で 10~14 日間培養することによりトランスポゾンの転移を誘導している。1 回の誘導後の個体数は約 10⁶ になるが、これらは Inv⁻ 変異体でないものを多く含んでいるため、効率よく Inv⁻ 変異体を集める方法が必要である。ボルボックスの持つ走光性はこのスクリーニングに利用できる。なぜなら、Inv⁻ 変異体は一般に走光性を示さないからだ。ボルボックスの走光性は、個々の細胞から個体表面に伸長する鞭毛に依存しており、その鞭毛の生える側は inversion によって個体の内側から表側に移動する。そのため、Inv⁻ 変異体では個々の細胞の鞭毛は個体内向きに伸長して泳動異常となり、その結果、走光性を示さなくなる。実際のスクリーニングでは、転移誘導後のボルボックスを暗室に設置した細長いガラス管 (70 × 2.6 cm) の一方の端に集め、もう一方の端を照射することにより正常な個体をそこへ集めてから取り除き、Inv⁻ 変異体の個体数を濃縮している。そして、実体顕微鏡下で観察して Inv⁻ 変異体を単離後、数

世代培養を続け、遺伝的に形質が安定しているかを確認する。これまでに、45 株の Inv⁻ 変異体を得ることができた。現在、スクリーニングを継続するとともに、トランスポゾンタギングを行うため各々の Inv⁻ 変異体からの復帰突然変異体の単離を行っている。

2. クラミドモナス Iar1 遺伝子の解析 (西井)

これまでに解析したボルボックスの InvA 変異体は、inversion が初期に停止する表現型を示す。ビデオ顕微鏡や走査電顕による解析の結果、inversion に必須と考えられた「個々の細胞の変形」と「細胞を繋ぐ構造 (原形質連絡) の移動」のうち後者のみが阻害されていることが明らかとなっている。遺伝子 *invA* は微小管モータータンパク質のキネシンをコードしている。この InvA タンパク質は inversion の時期を通して常に原形質連絡に局在していることから、原形質連絡の移動を駆動するモーターであると考えられている。さらに、我々はボルボックスの起源となったクラミドモナスから、高い相同性を持つ *invA* ホモログ (*Iar1: invA* related gene 1) を同定した (アミノ酸配列で 82% 一致)。*Iar1* 遺伝子は InvA 変異体をレスキューできたことから、機能においては InvA と交換可能であることが分かっている。当然のことながら、単細胞生物であるクラミドモナスは inversion しない。inversion に必須とされる「細胞の変形」も見られないし、単細胞性ゆえ原形質連絡は存在せず、inversion で起こる原形質連絡の移動に関連する細胞の過程は未知であった。クラミドモナスにおける IAR1 タンパク質の働きを明らかにすることにより、inversion の元となった単細胞生物での祖先過程を探ることができると考えられる。

IAR1 タンパク質と InvA タンパク質の C 末側保存領域を抗原として作製した抗体を用いて、クラミドモナスの IAR1 タンパク質の発現と局在を解析した。同調培養したクラミドモナスの細胞抽出液をウェスタンブロットによって解析したところ、IAR1 タンパク質は細胞周期を通じて検出され、間期と比較して細胞分裂期では発現量が 2~3 倍増加する

ことが分かった。間接蛍光抗体法を用いた観察では、IAR1タンパク質は間期において鞭毛基部 (basal body: 基底小体) の近傍に小さな2つの点状に局在しており、核分裂期になるとそれらが紡錘体の2つの極へと分かれ、細胞質分裂期になると、紡錘体の極のシグナルが新しい基底小体へと移行するように見えた。細胞質分裂期には基底小体の局在に加えて、分裂面にIAR1タンパク質が観察された。以上の結果は、IAR1タンパク質が分裂期に何らかの働きを持っていることを示唆している。現在、機能阻害が起こるようにデザインした改変 *Iar1* 遺伝子を作成して、どのような影響がでるかを探ろうとしている。

クラミドモナスの細胞質分裂面に見られたIAR1タンパク質の局在には、特に注目し研究を進めていくつもりである。ボルボックスの原形質連絡は、細胞質分裂が不完全に起こり、一部の細胞膜が娘細胞間で繋がった構造として元の分裂面上に形成される。クラミドモナスでは原形質連絡は形成されないが、IAR1タンパク質の局在部位である分裂面は、InvAの局在部位である原形質連絡ができる部位と似ており、原形質連絡の祖先となった構造や過程と関連しているかもしれない。

The long-term goal of our research is to provide information about the way in which an important morphogenetic process that requires the coordinated activities of many neighboring cells came into being as multicellular organisms evolved from a unicellular ancestor. The *Volvox* and *Chlamydomonas* provide an unrivaled evolutionary model system for exploring such questions. A hallmark of *Volvox* is the morphogenetic process called “inversion”, by which their embryos turn inside out at the end of embryogenesis. Inversion involves a sequence of coordinated changes in cellular shapes reminiscent of those involved in many metazoan process such as gastrulation. We are isolating inversion-less mutants (*Inv*⁻) and characterizing *Inv* genes by taking advantage of the *Jordan* transposon-tagging system. Further, we are investigating the role of homologues of the *Inv* genes in the unicellular *Chlamydomonas* to find out the origin of multicellularity.

In *Volvox invA*⁻ mutants that fail to complete inversion, cells change shape as in wild type, but they fail to move relative to the bridges. When we found that *invA* encodes a novel kinesin (*InvA*) localized in the bridge region throughout inversion, we postulated that *InvA* constitutes the motor that drives the movement of cells (with their abundant cortical microtubules) past the bridge system. We used a *C. reinhardtii* EST clone to recover an *invA* homologue, *IAR1* (*invA* related), from the BAC library and found that it encodes a kinesin that is 82% identical in amino acid sequence to *InvA*. Most importantly, we found that *IAR1* is able to rescue the *InvA* mutant by transformation. This indicates that the *IAR1* kinesin — which obviously must have some other function in *C. reinhardtii* — was co-opted without significant modification for use as the motor to drive inversion. An antibody to a conserved

C-terminal region of *IAR1/InvA* detects a protein of identical in size to *InvA/IAR1*. The *IAR1* protein can be detected at all stages in synchronized *C. reinhardtii* cultures, but is upregulated during mitosis. Immunofluorescence indicates that *IAR1* is located near the basal bodies in both interphase and dividing cells, but that in dividing cells it is also found near the division apparatus. This suggests that it might have some role in cytokinesis.

Research Subjects

1. Analysis of inversion-less mutants (*Inv*⁻) in *Volvox carteri*
2. Analysis of an *InvA* homolog (*Iar1*) in *Chlamydomonas reinhardtii*

Staff

Head

Dr. Ichiro NISHII

Members

Mr. Atsushi NAKAZAWA *¹

Ms. Maki NAKANO *²

Ms. Nami KUBO *²

*¹ Technical staff

*² Contract Technical Assistant

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(総 説)

西井一郎: “ボルボックス胚の形態形成運動と細胞分化の仕組み”, 蛋白質 核酸 酵素 **49**, 1253–1264 (2004).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Nishii I. and Kirk D. L.: “The *Chlamydomonas reinhardtii* *IAR1* gene encodes a novel kinesin that was co-opted by *Volvox carteri* for use as the motor that drives inversion of the embryo”, 11th Int. Conf. on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas* (Chlamy2004), Kobe, May (2004).

(国内会議)

西井一郎: “ボルボックス胚の形態形成運動を駆動する遺伝子 *InvA*”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月 (2004).