



緑藻ボルボックスの生理学 —走光性機構から見る多細胞化進化

植木紀子

単細胞生物から多細胞生物への進化は、様々な系統で独立に起きている。多細胞化の最大のメリットは捕食されることの回避であり、生物進化の過程では基本的には大型化へと進む多細胞化への淘汰圧があると考えられる。しかし光合成生物の場合は、光合成に必要な光反応行動能力が損なわれてはならないという制約もある。本稿では、緑藻綱ボルボックス目の多細胞化進化において、ボルボックスが「大型化」と「光反応行動能力」という一見相容れない二つの優れた性質をいかに手に入れたのかについて考察したい。

1. ボルボックス目緑藻の体のつくりと光反応行動

緑藻綱ボルボックス目には様々な細胞数と大きさの種が属するが、それらの共通祖先は、現存する直径約 10 μm の単細胞生物クラミドモナスのような生物であったと考えられている (図 1A)。すなわち、細胞の先端から生える二本の鞭毛を操り、光合成に最適な環境を求めて水中を移動する生物で

ある。それが約 2 億年前、段階的に多細胞化し、最終的に数千もの細胞から成る多細胞生物ボルボックス (図 1E) を作り上げた (Herron *et al.* 2009)。大型化により、他の生物からの捕食を免れるという大きな利益を得たことだろう。ところが、光合成生物としての行動という観点から見るとどうか。単純にクラミドモナスのような細胞が集まって群体になるだけでは、優れた光反応行動能力は発揮できない。

通常、クラミドモナスは二本の鞭毛を織毛打と呼ばれる波形で互いから遠ざかる方向に動かして水中を平泳ぎのように前進する (図 1B)。二本の鞭毛の打面がわずかにずれているため、後方から見て反時計回りに自転する。ボルボックスに関しては、クラミドモナスのような細胞が集まったものという言い方をされることがあるが、仮にクラミドモナス細胞が球の表面に並び「群体性クラミドモナス」を形成しても、全体の移動は叶わない (図 1D)。実際は、ボルボックスの各細胞から生える二本の鞭毛は、クラミドモナスと異なり、同

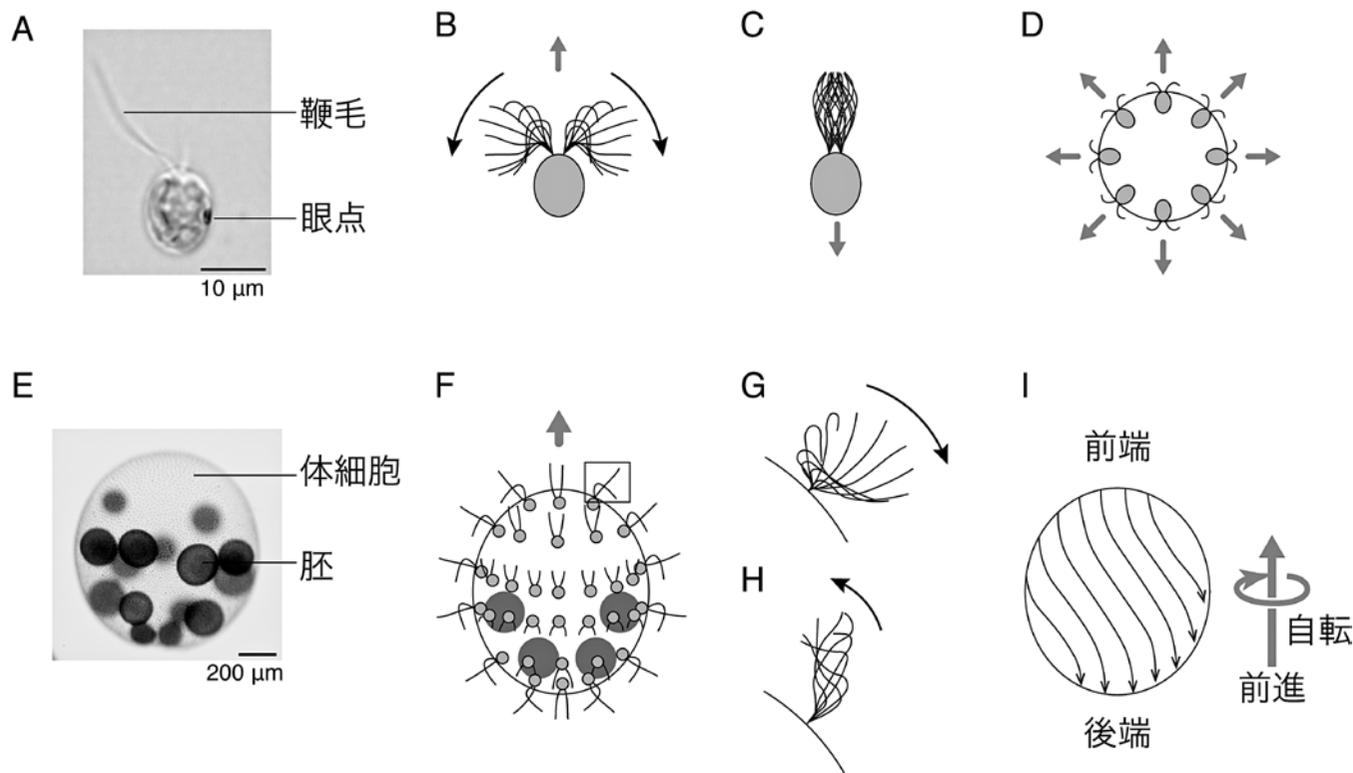


図 1. A. *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard の光学顕微鏡写真。B. クラミドモナスの織毛打による前進遊泳。C. クラミドモナスの鞭毛打による後方遊泳。D. 「群体性クラミドモナス」を仮定したもの。E. *Volvox rousseletii* G.S. West (NIES-4029) の光学顕微鏡写真。F. ボルボックスの模式図。B, D, F は Hoops (1997) を元に作図。G, H, F の囲みの細胞の鞭毛運動。G. 織毛打。H. 織毛打の方向変化。前端付近の細胞では 180° 近く変化する。G, H は Ueki *et al.* (2010) から引用して改変。I. ボルボックス球体近傍の水流の方向。前後軸に対して傾く。Mast (1926) を元に作図。灰色の矢印：進行方向，黒矢印：織毛打の打つ方向を示す。

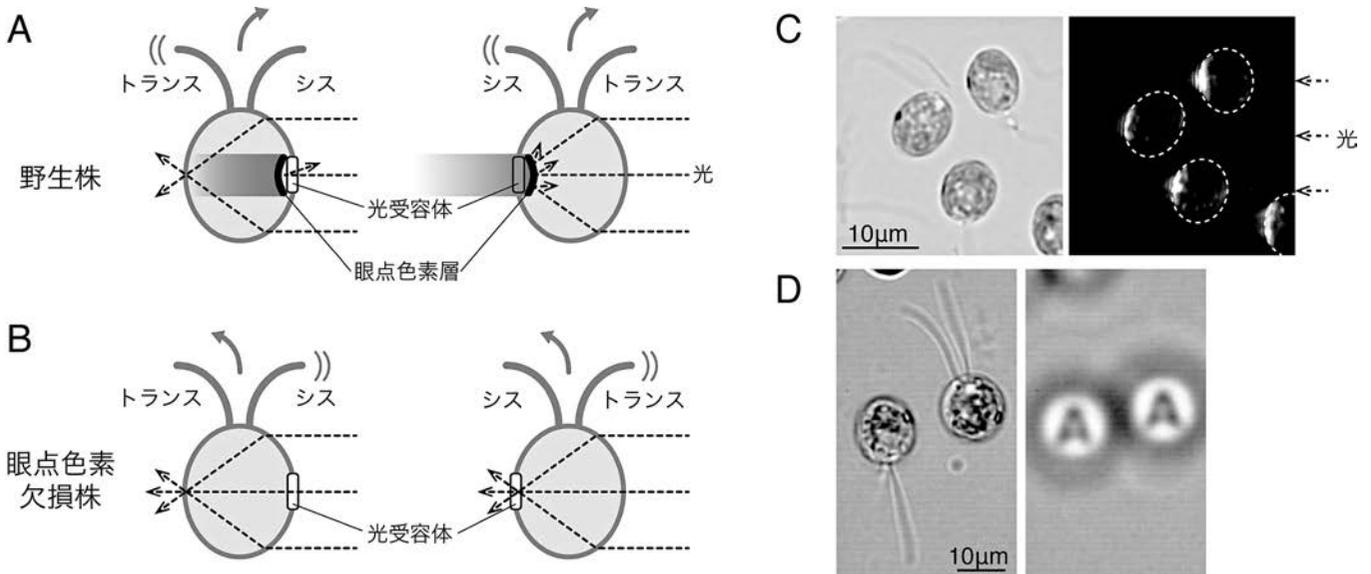


図2. 細胞レンズ効果。A. クラミドモナス細胞が光源側を向くと眼点色素層の反射により光受容体は光の増加を感知する（左）。その後半回転すると、遮光されて光の減少を感知する（右）。B. 眼点色素欠損株では、遮光されないだけでなく細胞がレンズとして働き集光するため、光受容体が感知する光の増減のタイミングは野生型と逆になる。光の増加を感知した時にトランス鞭毛を強く打つ場合、野生型は正の走光性、眼点色素変異体は負の走光性を示すことになる。C. 集光による検証。クラミドモナス野生型細胞の明視野像（左）。同じ視野で、細胞に横方向から光を照射すると光源と逆側に集光した（右）。黒い破線矢印は光の方向、白い破線は細胞の輪郭を表す。D. 結像による検証。OHPシートにAlgaの頭文字"A"を印刷し、正立顕微鏡の視野絞り環の上に置いた。コンデンサーを外して、スライドガラス上に接着させた細胞を観察した。細胞に焦点を当てた像（左）。同じ視野で、焦点面を上によらずと、文字"A"が現れた（右）。

じ方向に向かって打つ。これを球全体で見ると全ての鞭毛が球の後端へ向かって打つため、前から後ろへ大きな水流が生じ、一個体として前進することができる（図1F, G）（Hoops 1997）。また、鞭毛の打つ方向が個体の前後軸と平行ではなく角度を持つため、やはり後方から見て反時計回りに自転する（図1I）（Mast 1926）。

周囲の光強度が急に変化すると、クラミドモナスは鞭毛の波形を繊毛打から鞭毛打と呼ばれる波形へと変換させ、一時的に後退する（図1C）。この行動は光驚動反応と呼ばれる。「群体性クラミドモナス」はこの行動は起こせない。ボルボックスでは、急な光強度の変化を与えると、波形変換するのではなく、一時的に繊毛打の打つ方向をぐるりと変えることが判明している（図1H）（Ueki *et al.* 2010）。この反応は、個体前方ほど変化が大きくほぼ180°逆転するが、後端付近はほとんど変化しない（Ueki *et al.* 2010）。光に対する感受性が前端から後端にかけて徐々に弱くなっていると言えるが、実際、前端に近い細胞ほど光受容装置である眼点（後述）が大きくなっている（Ryder 1889）。この反応により前進していた個体に急ブレーキがかかることになり、大きな多細胞生物でありながら、光驚動反応を行うことができる。

また、方向性のある光に対して進行方向を変える行動を走光性と言い、光源方向へ向かう場合を正、光源から逃げる場合を負の走光性として区別する。クラミドモナスは二本の鞭毛の打つ強さのバランスを変化させて進行方向を変え、走光性を示す。しかし「群体性クラミドモナス」（図1D）の細胞

が同じことをしても全体のバランスは変化しない。多細胞が球状に集まった形態では、異なる場所の細胞が異なる動きをする必要がある。このしくみは後述する。

2. ボルボックス目緑藻の光受容

ボルボックス目の生物は、細胞の側面に眼点を持つ（図1A）。光反応行動のための光受容体は、眼点の細胞膜に存在するチャンネルロドプシンである。光刺激に応じてこのチャンネルが開き、細胞内に陽イオンが流れ込む（Nagel *et al.* 2002, 2003, Kianianmomeni *et al.* 2009）。このチャンネルロドプシン領域を裏打ちする形でカロテノイド顆粒が層状に配置し、光を反射・遮蔽する。そのため、同じ強さの照射光でも、細胞の向きによって光受容体に届く光量には最大で約10倍の差が生じる（Foster & Smyth 1980）。個体は常に自転しているので、例えば前後軸に垂直な方向から光照射されると、各細胞は自転のタイミングに合わせて約10倍の光量差を繰り返し感知する。従って、最も光量が高いときに眼点が光源側を向いているときというかたちで、各細胞は光源方向を正しく認識できる。

クラミドモナスの場合、自転によって眼点が光源側を向くと眼点から離れた方のトランス鞭毛を強く、逆側を向くと眼点に近い方のシス鞭毛を強く打ち、その結果、正の走光性を示すというモデルが受け入れられている（図2A）。

我々は、眼点のカロテノイド色素顆粒層を欠損したクラミドモナス変異体から、眼点構造の意義を再発見した。この変

異体では色素層がないため光が反射・遮蔽されず、自転による光の増減が生じず走光性を示せないと思われた。ところが予想に反し、この変異体は走光性を示した。ただし、正か負という走光性符号が完全に野生型と逆であった。我々は、細胞が凸レンズとして光を集光するため、色素層を失うと走光性符号が逆転すると仮説を立てた (図 2A, B)。それを実証するため視野の横方向から細胞に光を照射したところ、確かに光源の逆側に集光した (図 2C)。さらに、凸レンズであれば虫眼鏡のように結像するはずである。実際、顕微鏡の光路に透明なシート上に印刷した文字を入れると、文字が細胞の上に結像することを確認できた (図 2D)。つまり、変異体では色素層がないため、集光した側を光源側だと誤認してしまう。野生型では、集光される光を眼点のカロテノイド層がきっちり遮蔽しているので正確に光源方向を認識している (Ueki *et al.* 2016)。

自転によって光の方向を認識するしくみは、多細胞化を果したボルボックスでも変わらない。細胞の軸ではなく個体の前後軸の周りを自転し、個々の細胞が光の増減を感知する。我々は、その光の変動を模してスライドガラス上にトラップしたボルボックスに照射することで、自転遊泳中のボルボックスが光を感受する状況を再現した。その結果、光強度の変動に同調して、強度が最大の時に繊毛打の方向変化 (図 1G, H) を繰り返した (Ueki *et al.* 2010)。これは、自転する球体では常に光側に来た細胞で繊毛打の方向変化が起こることを示し、走光性の方向転換をよく説明する (図 3)。注目すべきことは、一つ一つの細胞はシンプルに「受容光強度が増加したら繊毛打を方向変化させる」だけということである。これは、細胞という構成要素が適切に配置され、単純なルールに従うことで全体が調整の取れた動きを行う自律分散システムだと言える。そこに、全体を指揮する司令塔は必要ない。

3. ボルボックス目緑藻の鞭毛運動制御機構

光受容のしくみがボルボックス目で共通しているのに対し、その反応としての鞭毛運動変化は大きく異なる。クラミドモナスでは、光驚動反応は繊毛打から鞭毛打への波形変換、走光性は二本の鞭毛のバランス変化によるのに対し、ボルボックスではいずれの行動も繊毛打の方向変化によって実現する (図 3)。

これらの反応が Ca^{2+} で調節されることが、除膜細胞モデル法により示されている。この手法は次の二つの手順で行われる。(1) 界面活性剤処理で細胞膜を溶解する。この時点で細胞は死ぬが、鞭毛の骨格構造や運動のためのモータータンパク質は活性を保った状態で残る。(2) そこに生体エネルギー源である ATP を加えると、鞭毛が再び動き出す。この時、溶液中の Ca^{2+} 濃度を調整することで、その効果を直接確かめることができる。クラミドモナスでは、外液の Ca^{2+} 濃度が 10^{-4}M よりも高い時は鞭毛打波形で打つ (Bessen *et al.* 1980) (図 3)。これは光驚動反応を示す時の波形である。 10^{-6}M よりも低いときは繊毛打波形で打つが、 10^{-8}M 程

度を境に、それより高い濃度ではトランス鞭毛が、低い濃度ではシス鞭毛の方が他方よりも強く打つ (図 3) (Kamiya & Witman 1984)。このシス・トランスの性質の差が走光性を生み出すと考えられる。この Ca^{2+} 調節機構を完全に失った突然変異体が弱い走光性を示すことから他の機構の存在も示唆されているが、 Ca^{2+} が第一のファクターであることは確実である (Okita *et al.* 2005)。

近年我々はボルボックス除膜細胞モデル実験系を立ち上げ、ATP 添加により鞭毛運動を再活性化することに成功した。 10^{-7}M よりも低い Ca^{2+} 濃度条件では、繊毛打の打つ方向は個体後端に向かっていて、これは生体が通常の前進遊泳を行う動きと一致する。 10^{-6}M 程度の高い Ca^{2+} 濃度条件では、個体前端に近い細胞ほど繊毛打の打つ角度を大きく変え、ほぼ逆転させた。前端から遠ざかるほどその角度は小さくなった。これは生体に光刺激を与えたときの反応と一致する。繊毛打の方向変化が 10^{-6}M 程度の Ca^{2+} 濃度で見られることから、これはクラミドモナスの鞭毛打への波形変換に相当する可能性が高い。それに加えて興味深いことに、ボルボックス除膜細胞モデルにおける繊毛打方向変化の Ca^{2+} 濃度感受性に、個体前後にかけての勾配が見られた。つまり、光反応性の前後勾配は、眼点のサイズだけでなく鞭毛軸系の Ca^{2+} 濃度感受性との二段構えで作られていたのだ (Ueki & Wakabayashi 2018)。

4. 多細胞化進化と光反応行動のしくみの変化

以上より、ボルボックス目における進化過程で、多細胞生物として前進遊泳・光驚動反応・走光性を行うため、次のような変化があったと考えることができる。第一に、各細胞の二本の鞭毛の打つ向きを同じ方向へ、かつ個体の後端に向かって打つよう変化した。これにより個体全体の移動が可能になった。第二に、鞭毛内 Ca^{2+} 濃度が 10^{-6}M 程度以上に上昇した時の反応が変化した。すなわち、繊毛打から鞭毛打へ波形変換をしていたものを、繊毛打波形はそのままでその打つ方向を変えるようになった。第三に、一見同質に見える細胞に、前後軸に沿った構造的および生理的な勾配をつけた。すなわち、眼点のサイズを前方ほど大きく、鞭毛軸系の Ca^{2+} 感受性も前方ほど高くなるようにした (図 3)。

このように祖先種が単細胞の体制で完成させた光反応行動のしくみを多細胞化の過程で巧みに修正することで、多細胞生物としても同じ光反応行動をできるようになった。多細胞化への淘汰圧がある条件下で光合成生物としての光反応行動も実現するという難題を、見事にクリアしている。さらに、ボルボックスのシステムでは光受容というインプットも鞭毛運動変化というアウトプットもそれぞれの細胞が行うため、集中管理的制御にはない柔軟性を持っている。実際、縦に二分した半球の状態となってもボルボックスは正しく走光性の光定位を行うことができる (Mast 1926)。直径約 $10\ \mu\text{m}$ の単細胞体制から徐々に細胞数を増やし巨大化して直径数百 μm の多細胞体制となった時、その球体の一部が欠損しても

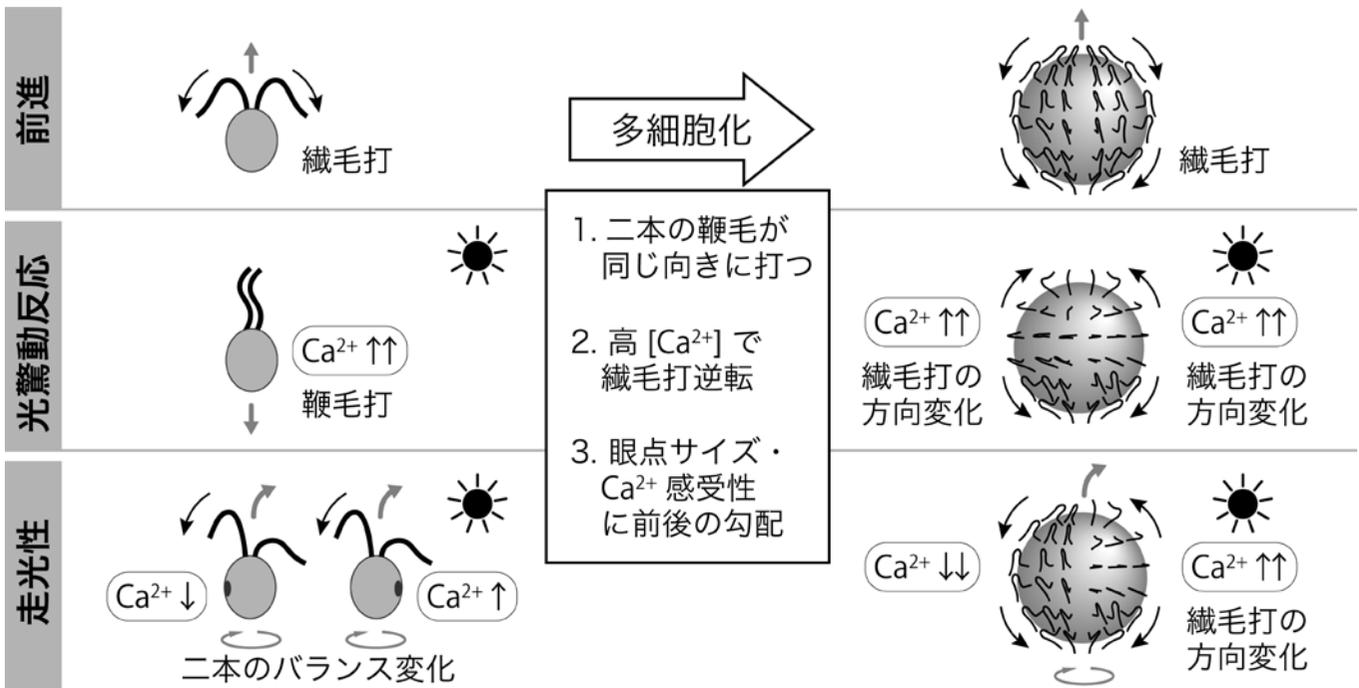


図3. 単細胞祖先から多細胞化する過程で生じたと考えられる三つの変化。

全体の行動機能に影響しないことは生存する上で大いに有利になったに違いない。

謝辞

本稿は、科学研究費補助金(19K23758)および「物質・デバイス領域共同研究拠点」の共同研究プログラムの助成を受けて執筆した。また執筆にあたり東京工業大学の若林憲一博士から有用なコメントを頂きました。心から感謝申し上げます。

引用文献

- Bessen, M., Fay, R. B. & Witman, G. B. 1980. Calcium control of waveform in isolated flagellar axonemes of *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* 86: 446–455.
- Foster, K.W. & Smyth, R.D. 1980. Light antennas in phototactic algae. *Microbiol. Rev.* 44: 572–630.
- Herron, M. D., Hackett, J. D., Aylward, F. O. & Michod, R. E. 2009. Triassic origin and early radiation of multicellular volvocine algae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 3254–3258.
- Hoops, H. J. 1997. Motility in the colonial and multicellular Volvocales: structure, function, and evolution. *Protoplasma* 199: 99–112.
- Kamiya, R. & Witman, G. B. 1984. Submicromolar levels of calcium control the balance of beating between the two flagella in demembrated models of *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* 98: 97–107.
- Kianianmomeni, A., Stehfest, K., Nematollahi, G., Hegemann, P. &

Hallmann, A. 2009. Channelrhodopsins of *Volvox carteri* are photochromic proteins that are specifically expressed in somatic cells under control of light, temperature, and the sex inducer. *Plant Physiol.* 151: 347–366.

- Mast, S. O. 1926. Reactions to light in *Volvox*, with special reference to the process of orientation. *Z. Vgl. Physiol.* 4: 637–658.
- Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A. M., Bamberg, E. & Hegemann, P. 2002. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* 296: 2395–2398.
- Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W. *et al.* 2003. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 13940–13945.
- Okita, N., Isogai, N., Hirono, M., Kamiya, R. & Yoshimura, K. 2005. Phototactic activity in *Chlamydomonas* 'non-phototactic' mutants deficient in Ca^{2+} -dependent control of flagellar dominance or in inner-arm dynein. *J. Cell Sci.*, 118: 529–537.
- Ryder, J. 1889. The polar differentiation of *Volvox*, and the specialization of possible anterior sense-organs. *Am. Nat.* 23: 218–221.
- Ueki, N., Ide, T., Mochiji, S. *et al.* 2016. Eyespot-dependent determination of the phototactic sign in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113: 5299–5304.
- Ueki, N., Matsunaga, S., Inouye, I. & Hallmann, A. 2010. How 5000 independent rowers coordinate their strokes in order to row into the sunlight: phototaxis in the multicellular green alga *Volvox*. *BMC Biol.* 8: 103.
- Ueki, N. & Wakabayashi, K. 2018. Detergent-extracted *Volvox* “model” exhibits an anterior-posterior gradient in flagellar Ca^{2+} sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115: E1061–E1068.

(法政大学・自然科学センター)