



## 単細胞紅藻の有性生殖過程の発見が促進する 植物進化研究と微細藻類の産業利用

廣岡 俊亮<sup>1\*</sup>・宮城島 進也<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> 国立遺伝学研究所遺伝形質研究系 (〒 411-8540 静岡県三島市谷田 1111)

<sup>2</sup> 総合研究大学院大学遺伝学コース (〒 411-8540 静岡県三島市谷田 1111)

Shunsuke Hirooka<sup>1\*</sup> and Shin-ya Miyagishima<sup>1,2\*</sup>: Sexual life cycle of the unicellular red alga *Galdieria* for elucidating algal and plant evolution and industrial use of microalgae. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 71: 93–102, July 10, 2023

Sexual reproduction has not been observed in unicellular red algae including Cyanidiophyceae, an early branching group in Archaeplastida. *Galdieria*, which belongs to Cyanidiophyceae, is expected to be an emerging model system for basic and applied research, because of its evolutionary position and high biomass productivity. However, the cells of *Galdieria* are surrounded by a rigid cell wall, which prevents the introduction of foreign DNA and thus genetic modification. The difficulty in developing genetic tools in *Galdieria* and the lack of information on the sexual life cycle of Cyanidiophyceae have limited the use of these microalgae for basic and applied research. We have discovered that the known cell-walled form of *Galdieria* is a diploid that generates a cell wall-less haploid. In addition, the newly found haploids undergo isogamous mating and endoreduplication, generating heterozygous and homozygous diploids, respectively. The use of cell wall-less haploids has enabled the acquisition of chromosome-level assembly information and development of genetic modification tools in *Galdieria*. These toolkits facilitate the elucidation of the algal and plant evolution and the industrial use of microalgae. Here, we introduce the importance of Cyanidiophyceae in basic research and their potential for industrial applications, in line with our recent paper (Hirooka *et al.* 2022).

**Key Index Words:** *actin*, *Galdieria*, *homeotic genes*, *industrial applications*, *sexual reproduction*

<sup>1</sup>Department of Gene Function and Phenomics, National Institute of Genetics, Shizuoka 411-8540, Japan

<sup>2</sup>Department of Genetics, Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI), Shizuoka 411-8540, Japan

\* Authors for correspondence: shirooka@nig.ac.jp (Shunsuke Hirooka), smiyagis@nig.ac.jp (Shin-ya Miyagishima)

### はじめに

藻類は地球上の様々な環境に適応し、一次生産者として生態系の構築と維持に重要な役割を果たしている。約 27 億年前に酸素発生型光合成を行う最初の藻類であるシアノバクテリアが出現し、地球の酸素濃度を上昇させ、その環境を大きく変えた。その後、約 17 億年前にはシアノバクテリアが真核生物に細胞内共生することで、アーケプラスチダの祖先にあたる真核藻類が誕生し、現在までに紅藻、灰色藻、緑色植物（緑藻、陸上植物）の 3 つのグループを擁する巨大系統群となっている（図 1A）。諸説はあるものの、紅藻は細胞内共生成立後の比較的初期に他の藻類と分岐し、真核生物の歴史において早い段階で多細胞化し、有性生殖を伴う生活環を発展させたことが化石研究から明らかになっている（Butterfield 2000）。有性生殖は減数分裂を介して遺伝的に多様な配偶子を形成し、それらが融合することで新たな遺伝子組成の個体を作る仕組みで、真核生物の多様化に貢献したと考えられている。この仕組みは、古くから生物の育種に利用され、有用

な形質を集積した生物を作出することで人類の生活を支えてきた。しかしながら、紅藻の基部で分岐したイデユコゴメ類を含む単細胞紅藻、灰色藻、緑色植物の基部で分岐したプラシノデルマ藻といった起源の古い藻類では、未だに有性生殖過程が見つかっておらず（図 1A, Umen & Coelho 2019, Li *et al.* 2020）、アーケプラスチダにおける有性生殖を伴う生活環の理解は不十分である。

また、藻類は陸上植物に比べて高い CO<sub>2</sub> 固定能を有し、増殖が速いため、新たなグリーン産業の素材としての利用が検討されている（Chisti 2007）。しかしながら、藻類の大量培養は捕食者や競合者のコンタミネーションが問題となり、スピルリナ、クロレラなどの特殊な環境（アルカリ、高塩濃度など）で優占増殖することのできる限られた種でしか成功していない。これらの藻類では安定的な遺伝的改変や、掛け合わせ育種による品種改良も行えない。大量培養が可能な藻類であっても光合成のみに頼った培養では到達細胞密度が低く、藻体の回収コストが高くなることなどの問題により、そ



の生産コストは高く、利用形態は高価な機能性食品、化粧品原料などに限られている (Ullmann & Grimm 2021)。今後の藻類産業の発展はこれらの諸問題を解決できる新たな藻類の開発にかかっていると言える。

我々はイデユコゴメ類に属するガルデリアの研究開発を行う過程で、これまで単細胞紅藻では見つかっていなかった有性生殖過程を発見した。さらに、この発見が基となり、ガルデリアの高精度ゲノム解読、トランスクリプトーム情報の整備、遺伝的改変技術の開発が進み、ガルデリアをモデル研究系として利用するための基盤が整った。本稿では著者らが最近発表した論文 (Hirooka *et al.* 2022) の内容に沿って、イデユコゴメ類の基礎研究における重要性と今後の産業利用への可能性を紹介する。

### 温泉藻イデユコゴメ (出湯小米) 類とは

イデユコゴメ類 (綱, Cyanidiphyceae) は世界各地の高温強酸性 (pH 0.05–5.0, <56°C) の温泉で優占増殖する単細胞紅藻の一群で、他の紅藻が有するフィコエリスリン (赤色の光合成色素) を進化の過程で失ったため、青緑色をしている (図 1A, B)。イデユコゴメ類は紅藻の中でも、進化の初期 (約 14 億年前) に分岐したと考えられており (Yoon *et al.* 2004)、現存の各種は、細胞壁が無く 2 分裂で増えるシゾン (*Cyanidioschyzon*)、強固な細胞壁を持ち 4 つの内生子形成により増えるシアニディオコッカス (*Cyanidiococcus*) とシアニジウム (*Cyanidium*)、強固な細胞壁を持ち 4–32 個の内生子形成により増えるガルデリア (*Galdieria*) の 4 属に分類されている (Miyagishima & Tanaka 2021)。これらの種は全て無性生殖によってのみ増殖するとされ、有性生殖過程は見つかっていなかった。イデユコゴメ類の中でも、シゾンはその細胞構造の単純さ、明暗周期によって細胞周期を同調させられることなどから、オルガネラ分裂や細胞増殖機構の研究に使われてきた (Kuroiwa 2010)。その進化的および生態学的な特徴から、真核藻類として初めて全ゲノム情報が解読され (Matsuzaki *et al.* 2004)、その後他のイデユコゴメ類のゲノム解析も進み、真核生物の中では比較的小さいゲノム (8.8 ~ 17.8 Mb)、少数の遺伝子 (約 4,800 ~ 7,800 個) を持つ系統群であることが明らかになっている (Matsuzaki *et al.* 2004, Schönknecht *et al.* 2013, Rossoni *et al.* 2019, Liu *et al.* 2020, Hirooka *et al.* 2022, Cho *et al.* 2023)。また、これらのゲノムには細菌、古細菌から水平伝播によって獲得されたと考えられる環境適応に関わる遺伝子が多数見つかっており (Schönknecht *et al.* 2013, Rossoni *et al.* 2019)、真核生物の環境適応進化に水平伝播による新規遺伝子の獲得が大きな役割を果たしていることが明らかになった。さらに興味深いことに、イデユコゴメ類のゲノムには減数分裂や配偶子融合に関わる遺伝子がコードされていることが明らかになり、有性生殖の存在が予期された (Umen & Coelho 2019)。

ガルデリアは、シゾンを含むその他の属とは 10 億年以上も前に分岐したと考えられており、イデユコゴメ類の中でも

低 pH、高 CO<sub>2</sub>、高金属、高塩濃度などのストレスに対する耐性が最も高いことが知られている (Seckbach 2010)。また、ガルデリアは光合成による独立栄養培養での増殖に加え、イデユコゴメ類の中で唯一、細胞外の多種多様な糖・糖アルコール類を取り込み、光合成に頼ることなく暗所下での従属栄養培養による増殖が可能である (Barbier *et al.* 2005)。これらの特徴から、環境ストレスへの適応機構、光合成の進化、栄養様式の切り換え機構 (独立栄養と従属栄養など) などの研究に用いられてきた。さらに、ファーマンターを使った従属栄養培養によって細胞を高密度 (100 g 乾燥重量/L) に増やすことができることや (Schmidt *et al.* 2005)、他生物の混入リスクの低い酸性条件での培養が可能であり、開放培養による生産が期待できることから (Hirooka *et al.* 2020)、タンパク質原料、色素原料、汚水処理、レアメタルの回収といった様々な用途での産業利用に向けた研究が世界中で行われている (Čížková *et al.* 2019, Lang *et al.* 2020)。しかしながら、ガルデリアは厚く強固な細胞壁を持ち、細胞内容物の抽出には物理的な破碎が必要になること、遺伝的改変ができないなどの技術的制約があり、基礎研究、産業利用に向けた研究の双方において、そのポテンシャルを最大限に活かしてきていない。

### 単細胞紅藻ガルデリアの有性生殖過程の発見

ガルデリアは 1899 年にイタリアの研究者によって初めて記載されて以来、強固な細胞壁を持ち、4–32 個の内生子を形成し増殖する無性生殖のみが知られていた (図 1B–D)。我々はガルデリアの培養条件を検討する過程で、通常よりも低い pH1.0 での培養時に (通常は pH2.0)、これまで報告されていないオタマジャクシ様の細胞が生じることを偶然にも発見した (図 1B)。そこで、オタマジャクシ様細胞を顕微鏡下で単離したところ (大沼亮博士による)、無性的に増殖し、クローン株 (N1, N2, N3, N4 と N5) を得ることができた。新たに得られた細胞は電子顕微鏡による観察から細胞壁を持たず (図 1C)、乾燥後再膨潤することで、細胞内容物が容易に抽出されることが明らかになった (Hirooka *et al.* 2022)。また興味深いことに、オタマジャクシ様細胞は運動能を有しており、進行方向とは逆側に突起を伸ばし、底面を這うように動き回る。その後、突起を引っ込めて動きを止めると、細胞が徐々に大きくなり、分裂を数回繰り返した後にオタマジャクシ様細胞が細胞の周りを取り囲む細胞外マトリクスから出てくること明らかになった (図 1D)。真核藻類においては、生活環世代 (2 倍体と 1 倍体) の違いで、別種として記載されるほど異なる形態を示す種も存在する。そこで我々はそれぞれの細胞の核 DNA を核酸染色剤 (SYTOX Green) で染色し、フローサイトメーターによって蛍光輝度の定量を行うことで、細胞壁を持つ細胞が 2 倍体で、新たに発見された細胞壁を持たない細胞が 1 倍体であることを明らかにした (Hirooka *et al.* 2022)。さらに、後述の高精度ゲノム情報を基に、SNPs/indels (一塩基多型/挿入欠失) 解析を行うことで、元株がヘテロ 2 倍体であること、減数分裂時に組換えが起こっている

ことをゲノムレベルで確認した (Hirooka *et al.* 2022)。これにより、単細胞紅藻において初めて有性生殖過程 (減数分裂による 2 倍体から 1 倍体の発生) の存在を示すことができた。

## ガルデリアのモデル生物化に向けて

### —高精度ゲノム情報の整備と遺伝的改変技術の開発—

これまでに、数株のガルデリアにおいてゲノム情報が解読されているものの、2 倍体を用いての解析のため、T2T (telomere-to-telomere) の高精度ゲノム情報は得られていなかった。我々はガルデリアの分子遺伝学的解析を行うための基盤整備として、1 倍体の高精度ゲノム解読を目指した。細胞壁を持たない 1 倍体 (N1 株) から抽出した DNA を用いて、ロングリード配列 (Pacbio sequel II) を取得し、Canu v2.0 (Koren *et al.* 2017) でのアセンブルを行った。ガルデリアのゲノムサイズは小さく、新たに単離した 1 倍体を使った解析のため、T2T のゲノム情報が容易に得られると考えていたが、実際はゲノムの反復配列 (segmental duplication) に起因したコンティグの分断が所々で起きていた。そこで、分断された領域をマニュアルでつなぎ合わせ、ロングリードとショートリードでのポリッシュ (エラーの修正) を行い、最終的に T2T のゲノム配列 (17.8 Mb, 80 コンティグ) を得ることができた。予測された遺伝子数 (タンパク質コード) は 7,832 個で、シゾン (16.5 Mb, 4,775 タンパク質コード遺伝子) と比較して遺伝子密度が高いことが明らかになった。

遺伝的改変技術は遺伝子の機能解析や、生物に新たな形質を付与させることができる有用な手法であるが、真核藻類ではその開発が遅れている。近年、ゲノム編集技術の発展により、真核藻類においても遺伝子破壊株の作製が可能なが増えつつあるが (Faktorová *et al.* 2020)、外来遺伝子の安定的な発現は未だに限られた種でしか上手くいっていない。イデコゴメ類の一種であるシゾンは細胞壁を持たないため、簡便かつ安価な PEG 法による遺伝子導入が可能で (Ohnuma *et al.* 2008, Fujiwara & Ohnuma 2017)、相同組換えによる染色体任意箇所での編集、外来遺伝子の安定的発現などを容易に行うことができる (Miyagishima & Tanaka 2021)。我々は細胞壁を持たないガルデリア 1 倍体を用いることで、シゾンと同様の遺伝的改変法を確立することに成功した (図 2A-E)。しかしながら、現状使用できる薬剤マーカー (プラストサイジン耐性遺伝子) は 1 つしかなく、ゲノム上の複数箇所の編集が行えないため、自殺遺伝子 *HSVtk* (単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ) を利用した薬剤マーカーのリサイクル系を開発した (Hirooka *et al.* 2022)。この系では、一度ゲノムに組み込んだ配列を後から除去できることから、ゲノム上の複数箇所の編集に加え、カルタヘナ法の対象とならないセルフクロニング (外来配列を一切組み込まない遺伝的改変) が可能である。さらに、ガルデリアは従属栄養培養によって細胞を高密度に増やすことが可能なため、組換えタンパク質の生産、代謝系の導入または強化による有用物質の生産などといった高度な産業利用への展開も見えてきた。

### 実験室環境で有性生殖を伴う生活環を再現する

上述のように細胞壁を持つ 2 倍体から、減数分裂を介して細胞壁を持たない 1 倍体が生じることが明らかになった。続いて、接合を介して 1 倍体から 2 倍体を生じさせることができれば、ガルデリアの有性生殖を伴う生活環を実験室環境で再現できたことになる。そこで、他生物における有性生殖の誘導条件を参考にし、様々な条件での接合実験を試したものの、接合による 2 倍体は全く得られなかった。しかしながら、その過程で核内倍加によって自己 2 倍体化したホモ 2 倍体を得ることができた。ホモ 2 倍体はアリル間の塩基配列の違いが無い場合、元の 1 倍体との比較解析が行いやすいという利点がある。そのため、1 倍体を効率よく自己 2 倍体化させる方法を模索し、1 mM の酢酸を含むプレート培地に細胞を撒くことで、一定の割合でホモ 2 倍体を得られるようになった。この方法を使うことで、後述のように遺伝的改変株の 2 倍体化効率を調べることや、2 倍体の作製が可能になった (Hirooka *et al.* 2022)。

我々は接合による 2 倍体を得られない理由が接合効率の低さに起因するものだと考え、遺伝的改変に使用できる薬剤マーカーが 1 つしかないガルデリアでも利用可能な、薬剤耐性と栄養要求性を組み合わせた選抜系を考案した (図 2F)。まず、1 倍体 (N1 株) の *URAI* locus (ウラシル合成に関与する遺伝子) を緑色蛍光タンパク質 *mVenus* とプラストサイジン耐性遺伝子 (*BSD*) の発現カセットに置き換えた *URAI* 破壊株 ( $\Delta$ *URAI*) を作製した (図 2F)。野生株はウラシル非要求性かつ、プラストサイジン感受性である一方で、 $\Delta$ *URAI* はウラシル要求性かつ、プラストサイジン耐性を示す (図 2G)。野生株と  $\Delta$ *URAI* が接合した場合にのみ、ウラシル非要求性かつ、プラストサイジン耐性を示すヘテロ 2 倍体が生じ、プラストサイジン含有培地 (ウラシルは含まない) で選抜することができるはずである。この手法を使うことで、ついに接合によって生じたヘテロ 2 倍体を得ることができた (図 2H-I)。これにより、ガルデリアは 2 つの異なる接合型 (タイプ 1: N1, N3; タイプ 2: N2, N4, N5) を有し、異なる接合型間でのみ接合することが明らかになった (図 2H, I)。

以上のように、実験室環境でガルデリアの生活環を回すことができるようになったが、これらの効率はまだ低いため、減数分裂誘導条件、接合条件の最適化を進める必要がある。さらに、N1 株とは異なる接合型 (N2, N4 または N5 株) の高精度ゲノム情報を整備し比較することで、性決定領域・メカニズムなどの解析が可能になると考えられる。また、我々が行った各季節および各時間帯のフィールド調査ではどの条件でもガルデリアの 2 倍体は観察されたが 1 倍体は観察されなかったことから、ガルデリアは生活環の大半を 2 倍体で過ごし、ある特殊な時にだけ 1 倍体が出てきて接合を行うと考えられる。今後のフィールド研究によって自然環境中におけるガルデリアの生活環の理解が進むことを期待したい。

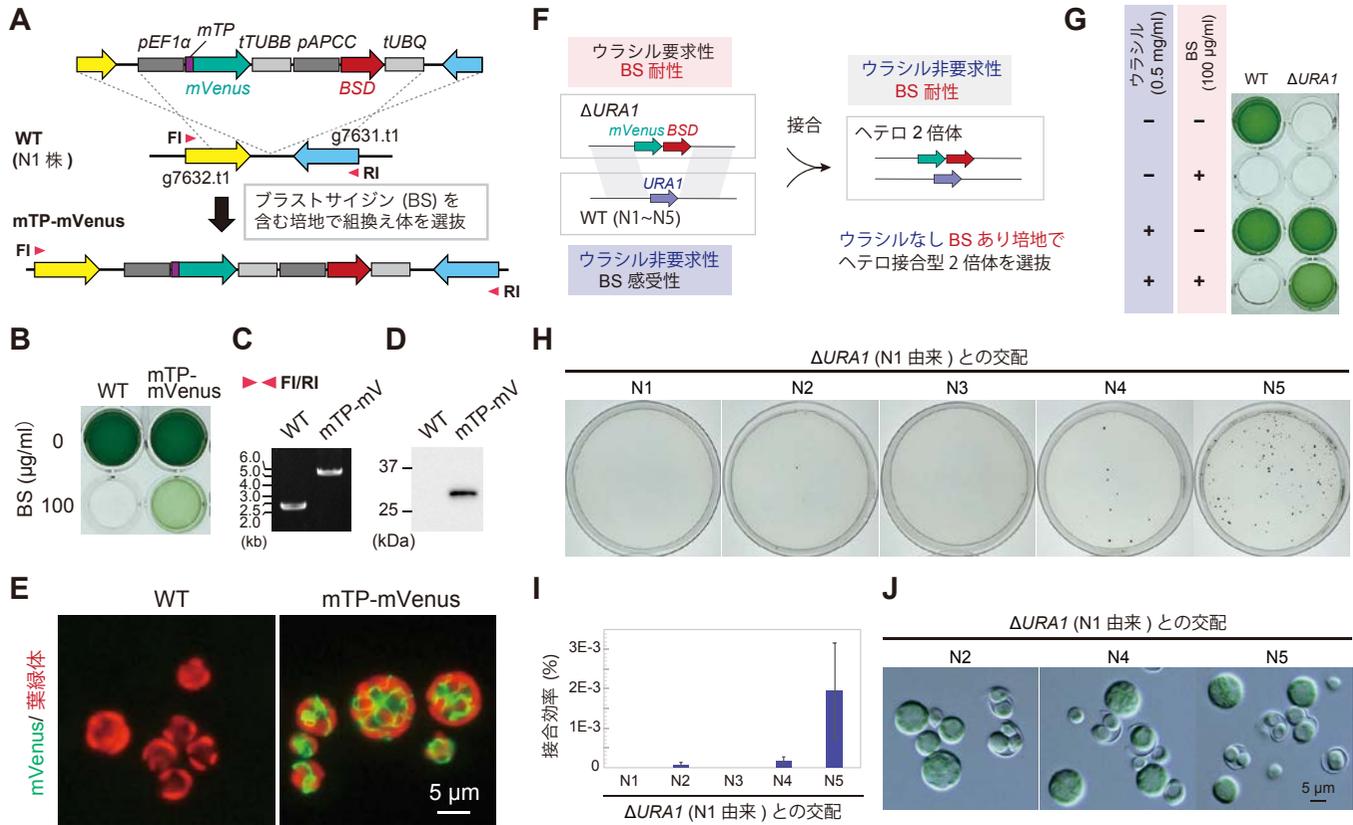


図2. ガルデリア 1 倍体を用いた遺伝的改変と、それを利用した接合実験。(A) ミトコンドリア移行シグナルを N 末に付加した緑色蛍光タンパク質 mVenus (mTP-mVenus) とプラストサイジン耐性遺伝子 (BSD) の発現カセットを遺伝子間領域 (IG1; g7632 と g7631 の間) と相同な配列 (それぞれ 1kb) で挟んだ直鎖 DNA を構築し、PEG 法により 1 倍体 (N1 株) に導入した。(B) 遺伝的改変株 (mTP-mVenus) をプラストサイジン (BS) 含有培地で選抜し、最終的に限界希釈によりクローン株を取得した。(C) 遺伝的改変株において、DNA 断片が目的の位置に挿入されていることを PCR で確認した。野生株 (WT) はコントロールとして使用した。(D) および (E) 抗 GFP 抗体を用いたイムノブロッティング (D)、および蛍光顕微鏡観察 (E) により mTP-mVenus タンパク質の発現とミトコンドリアへの局在を確認した。緑は mVenus の蛍光、赤は葉緑体の自家蛍光。WT はコントロールとして使用した。(F) 薬剤耐性と栄養要求性を組み合わせた接合によって生じる 2 倍体の選抜系。ΔURA1 (BS 耐性) と WT (1 倍体クローン; N1, N2, N3, N4 と N5) を交配し、BSD 遺伝子 (ΔURA1 由来) と URA1 遺伝子 (WT 由来) の両方を持つヘテロ 2 倍体をウラシルなし、BS あり培地で選抜する。(G) WT と ΔURA1 をウラシルおよび BS の存在下または非存在下のそれぞれの条件で培養した。(H) ΔURA1 (N1 由来) と WT (1 倍体クローン; N1, N2, N3, N4 と N5) を交配し、BS 含有プレート培地に播種し、ヘテロ 2 倍体を選抜した。(I) ΔURA1 と WT のそれぞれの組み合わせの接合効率。データは 3 回の独立した実験結果の平均値、エラーバーは標準偏差を示す。(J) 掛け合わせによって生じたコロニー由来の細胞の光学顕微鏡像。Hirooka *et al.* (2022) より引用・改変した。

## 2 倍体と 1 倍体の異なる形質を生じさせる遺伝子群

ガルデリアは、比較的少数の遺伝子群 (7,832 個) により、細胞壁を持つ 2 倍体と細胞壁を持たず運動能を有する 1 倍体を行き来する生活環を呈している。生活環世代の切替えや、世代間で異なる細胞形態、運動能はどのような遺伝子のはたらきによるものなのかを明らかにするために、ゲノム・トランスクリプトーム情報の整備を行った。まず、ガルデリアの遺伝子に対して Blast2GO (Götz *et al.* 2008) を用いて機能的アノテーションを付加し、これに加えて転写因子 (161 個)、分泌タンパク質 (357 個)、糖転移酵素 (103 個) を、それぞれ PlantTFDB v5.0 (Tian *et al.* 2019)、SignalP 5.0 (Almagro Armenteros *et al.* 2019)、dbCAN2 (Zhang *et al.* 2018) によって推定した。また、2 倍体 (N1 と N2 それぞれのホモ 2 倍体株) と 1 倍体 (N1 と N2 株) のトランスクリプトーム解析を行い、

各遺伝子の発現量 (TPM) の算出、2 倍体と 1 倍体間での発現変動遺伝子の検出を行った (図 3A)。

転写因子はゲノム上の特定の塩基配列に結合し、遺伝子の発現を誘導、または抑制することで、様々な生命現象を制御している。興味深いことに、ガルデリアの世代間で発現量が大きく異なる転写因子の中には、植物などにおいて形態形成、器官形成、細胞分化に重要な役割を果たすホメオティック遺伝子の *BELL/KNOX* や *MADS-box* が含まれていた (図 3B)。ガルデリアのゲノムには *BELL* 遺伝子が 1 個、*KNOX* 遺伝子が 2 個 (*KNOX-Red1* と *KNOX-Red2* 遺伝子)、MEF2 型 *MADS-box* 遺伝子が 1 個コードされており (Sharma *et al.* 2013, Ioo *et al.* 2018)、そのうち、*BELL* と *KNOX-Red1* は 1 倍体特異的に、*MADS-box* は 2 倍体特異的に発現していることが明らかになった (図 3B)。*BELL/KNOX* 遺伝子はアーケ

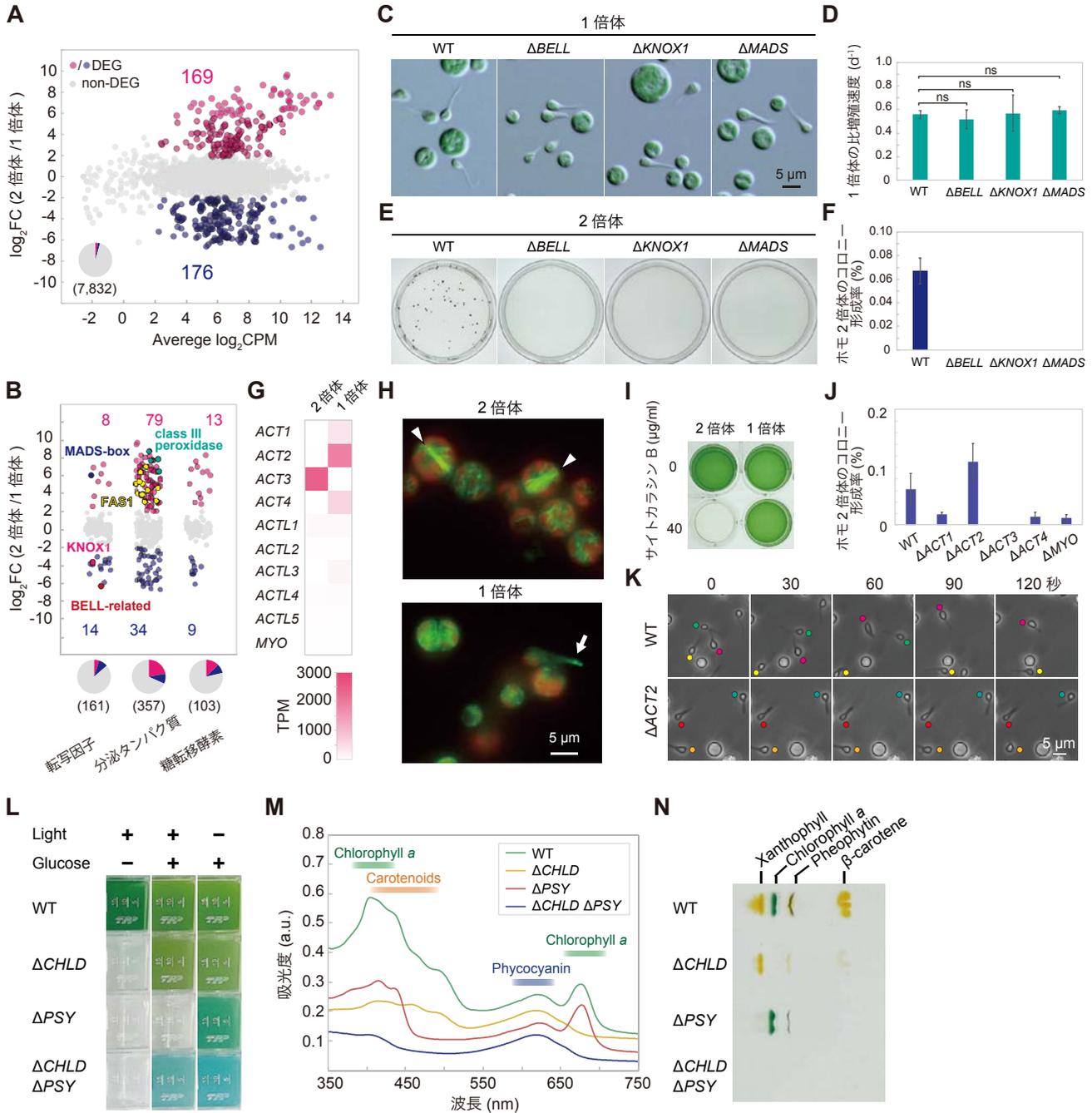


図3. 遺伝的改変を用いたガルデリアの表現型解析。(A) ガルデリアの2倍体(N1のホモ2倍体株)と1倍体(N1)間の比較トランスクリプトーム解析(edgeR)のMAプロット。7,832個の核コード遺伝子のうち、169遺伝子が2倍体特異的に、176遺伝子が1倍体特異的に発現上昇していた。発現変動遺伝子(DEGs)はFDR < 0.01, log CPM > 2, |log FC| > 2の条件を満たすものとした。(B) (A)のグラフから転写因子, 分泌タンパク質, および糖転移酵素をコードする遺伝子群をそれぞれ抽出し示した。(C) WT,  $\Delta BELL$ ,  $\Delta KNOX1$ , および  $\Delta MADS$ -boxの1倍体細胞の光学顕微鏡像。(D) WT,  $\Delta BELL$ ,  $\Delta KNOX1$ , および  $\Delta MADS$ -boxの1倍体細胞の独立栄養培養での比増殖速度。データは3回の独立した実験結果の平均値, エラーバーは標準偏差を示す。(E および F) WT,  $\Delta BELL$ ,  $\Delta KNOX1$ , および  $\Delta MADS$ -boxの1倍体細胞を1 mM 酢酸含有プレート培地に播種し, ホモ2倍体のコロニー形成率を算出。(G) アクチン (ACT), アクチン様 (ACTL), ミオシン (MYO) 遺伝子の発現量 (TPM) を2倍体と1倍体と比較した。(H) 2倍体と1倍体の細胞におけるアクチンフィラメントの蛍光顕微鏡像; 緑はLifeact-mVenusにより可視化されたアクチン; 赤は葉緑体自家蛍光。矢尻は分裂面に局在するアクチン, 矢印はオタマジャクシ様細胞の突起の先端に局在するアクチンを示している。(I) 2倍体および1倍体のサイトカラシンB (アクチン重合阻害剤) 存在下での培養。(J) WT, ACT, および MYO 欠損株の1倍体細胞を1 mM 酢酸含有プレート培地に播種し, ホモ2倍体のコロニー形成率を算出。データは3回の独立した実験結果の平均値, エラーバーは標準偏差を示す。(K) 液体静置培養におけるWTと $\Delta ACT2$ の1倍体細胞のタイムラプス観察。同一のオタマジャクシ様細胞がそれぞれ異なる色の丸で示されている。(L) 遺伝的改変によって作出した光合成欠損株。WT,  $\Delta CHLD$ ,  $\Delta PSY$ , および  $\Delta CHLD \Delta PSY$ の1倍体細胞を, 光およびグルコースの存在下または非存在下で培養した。(M および N) 従属栄養培養したWT,  $\Delta CHLD$ ,  $\Delta PSY$  および  $\Delta CHLD \Delta PSY$ の吸収スペクトル (M) および薄層クロマトグラフィー (N) の結果。Hirooka *et al.* (2022) より引用・改変した。

プラスチダの共通祖先で TALE 型ホメオボックス遺伝子の重複により生じたと考えられており、被子植物においては分裂組織の維持や形態形成に関わる遺伝子として古くから研究されてきた (Bowman *et al.* 2016)。興味深いことに、単細胞緑藻クラミドモナスでは窒素欠乏条件で配偶子 (mt+ と mt- の接合型を示す) が形成された際に、mt+ で BELL (GSP1) が、mt- で KNOX (GSM1) がそれぞれ発現し、接合を介して細胞融合が起こると、それらがヘテロ二量体を形成し核へ移行することで、2 倍体化に関わる遺伝子の発現が誘導されることが明らかになった (Lee *et al.* 2008)。この知見を基に、ヒメツリガネゴケでは BELL が孢子体 (2 倍体) の発生に関わる遺伝子の発現を誘導し (Horst *et al.* 2016)、KNOX2 が茎葉体 (1 倍体) の発生に関わる遺伝子を抑制することで (Sakakibara *et al.* 2013)、生活環世代の切り換えを制御することが明らかになった。近年、陸上植物のモデル生物として日本のグループを中心に基盤開発が進んでいるゼニゴケにおいては、精子で BELL が、卵細胞で KNOX1 がそれぞれ発現し、受精後に BELL と KNOX1 がヘテロ二量体を形成し核へ移行することで、受精卵の発生を開始することが明らかになった (Hisanaga *et al.* 2021)。これらによって、緑色植物における BELL/KNOX の祖先的な機能が見えてきた一方で、緑色植物以外での知見は乏しく、最近になって多細胞紅藻ササビノリにおいて生活環世代の切り換えにおける KNOX 遺伝子 (*KNOXRed1*) の関与が示唆されたのみであった (Mikami *et al.* 2019)。MADS-box 遺伝子は真核生物に広く保存されており、アーケプラスチダにおいては MEF2 型 MADS-box 遺伝子が紅藻、灰色藻、緑藻に、その C 末端に新たなドメインが付加されて生じた MIKC 型 MADS-box 遺伝子がストレプト植物 (陸上植物 + 車軸藻綱) に保存されている。MIKC 型 MADS-box 遺伝子は被子植物において花の発生などに関わる遺伝子として古くから研究されてきた (Thangavel & Nayar 2018)。最近になって、花を生じることのないヒメツリガネゴケで MIKC 型 MADS-box が茎葉体の細胞分裂と伸長、精子の鞭毛の動きの制御に関わることが示され (Koshimizu *et al.* 2018)、その機能的な進化が明らかになりつつある。しかしながら、ストレプト植物以外の緑藻、灰色藻、紅藻での MADS-box の機能に関する知見は乏しく、アーケプラスチダにおける MADS-box の祖先的な機能に関しては理解が進んでいない。そこで、これらの遺伝子のガルデリアにおける機能を明らかにするために、BELL、KNOXRed1 と MADS-box それぞれの遺伝子破壊株を作製した。野生株と比較して、それぞれの遺伝子破壊株は 1 倍体での生育、細胞形態に違いは見られなかったが (図 3C, D)、自己 2 倍体化処理を行っても 2 倍体化しないことが明らかになった (図 3E, F)。これにより、BELL、KNOXRed1 と MADS-box 遺伝子が 1 倍体から 2 倍体への移行に関わることが示され、これらの転写因子のアーケプラスチダにおける祖先的な機能である可能性が示唆された。しかしながら、クラミドモナスやゼニゴケとは異なり、接合型 (N1 と N2) に依らず、BELL、KNOXRed1 の両方が 1 倍体特異的に

発現しており、緑色植物とは異なるメカニズムの存在が示唆された。今後、これらの遺伝子の詳細な解析が待たれる。

細胞壁は植物、真菌類などに見られ、細胞膜を守り、細胞構造を維持するために重要な役割を果たしている。細胞壁の構成成分は生物によって大きく異なっており、ガルデリアの細胞壁に関しての知見は乏しい。トランスクリプトーム解析の結果から、細胞壁合成に関わる候補遺伝子として、2 倍体特異的に発現する 11 個の FAS1 (ファシクリン) ドメインを持つ遺伝子と 4 個の植物ペルオキシダーゼ (class III peroxidase) 遺伝子が見つかった (図 3B)。FAS1 ドメインは植物のプロテオグリカンである糖タンパク質、アラビノガラクタンタンパク質 (AGPs) に含まれており、AGPs は植物細胞において細胞壁構造の構築に関わっている (Silva *et al.* 2020)。植物ペルオキシダーゼは陸上植物では細胞壁の硬化または軟化に関わっており、細胞壁合成において重要な役割を果たす。ガルデリアにおいても細胞壁を構成するタンパク質の一つとして植物ペルオキシダーゼが同定されており、同様の機能があると予想される (Oesterhelt *et al.* 2008)。上記以外にも 2 倍体、または 1 倍体特異的に発現する分泌タンパク質、糖転移酵素をコードする遺伝子が数多く見つかった (図 3B)。これらの分泌タンパク質が糖転移酵素により糖鎖修飾を受け、その糖鎖が複雑に絡みあうことで、酸性環境へ対応した 2 倍体の細胞壁と 1 倍体の細胞外マトリクスを構築していると考えられる。今後、これらの遺伝子の詳細な解析が待たれる。

多くの真核生物では、細胞運動や細胞質分裂においてアクチンとミオシンが重要な役割を担うことが知られている (Kollmar & Mühlhausen 2017)。ガルデリアのゲノムには 4 個のアクチン遺伝子 (*ACT1*, *ACT2*, *ACT3* と *ACT4*) と 1 個のミオシン遺伝子 (*MYO*) がコードされており、トランスクリプトーム解析の結果から、*ACT1*, *ACT2* と *ACT4* は 1 倍体特異的に、*ACT3* は 2 倍体特異的に、*MYO* は 2 倍体、1 倍体で同程度発現していることが明らかになった (図 3G)。また、2 倍体では繊維状のアクチンリングが分裂面に観察されることと (図 3H)、アクチン重合阻害剤で増殖 (分裂) が阻害されることから (図 3I)、アクチンは細胞質分裂に関与することが示唆された。一方で、1 倍体では分裂面でアクチンリングは観察されず、オタマジャクシ様細胞の突起の先端にアクチンが観察された (図 3H)。また、アクチン重合阻害剤は分裂 (増殖) を阻害しなかった (図 3I)。さらに詳細な解析を行うために、*ACT1*, *ACT2*, *ACT3*, *ACT4* と *MYO* それぞれの遺伝子破壊株を作製した。続いて、それぞれの遺伝子破壊株で自己 2 倍体化処理を行ったところ、*ACT3* 破壊株のみが 2 倍体化できなかった (図 3J)。また、それぞれの 1 倍体細胞の運動性をライブイメージングにより解析したところ、*ACT2* 破壊株においてのみ、明確に運動性が失われることが明らかになった (図 3K)。これらの結果は、ガルデリアにおいて *ACT2* が 1 倍体の運動能に、*ACT3* が 2 倍体の細胞質分裂で機能することを示唆している。興味深いことに、ミオシン遺伝子の欠損は

1 倍体の運動能, 2 倍体の細胞質分裂ともに影響を与えなかった (図 3J)。アクチンリングは細胞壁のある 2 倍体細胞でのみ形成されるので, アークプラスチダにおける祖先的なアクチンリングの役割は, 分裂面での細胞壁の合成に関与している可能性がある。このように, ミオシン非依存的なアクチンの機能とその使い分けが単細胞生物の世代間で行われるという興味深い現象が発見され, 今後の詳細な解析が待たれる。

### 遺伝的改変で作出する青色細胞

葉緑体はシアノバクテリアの細胞内共生で誕生した後に, 徐々にその姿を変えてきた。紅藻の光化学系はシアノバクテリアと緑色植物の中間的な組成を示すことから, 紅藻における光合成研究は進化的側面からの重要性も高い (Allen *et al.* 2011)。光合成研究におけるモデル生物の一つであるクラミドモナスは, 酢酸を含む培地で従属栄養培養によって増殖することができるため, 光合成関連遺伝子の欠損変異体の解析が可能である (Li *et al.* 2019)。従属栄養培養での増殖が可能なガルデリアにおいても光合成欠損株を作製することができれば, 紅藻の光合成研究にとって有用なツールとなるはずである。また, 光化学系の集光装置に含まれるフィコシアニン (青色の光合成色素) はシアノバクテリアの一種であるスピルリナ由来のものが青色天然色素として産業利用されている (Eriksen 2008)。近年の研究から, ガルデリアのフィコシアニンはスピルリナのものとは比べて, 耐熱・耐酸性が高いことが示され, より広い用途への利用が期待されている (Moon *et al.* 2014)。しかしながら, ガルデリアの 2 倍体は強固な細胞壁を持つため, フィコシアニンの抽出には物理的な破壊が必要なうえ, 純度の高いフィコシアニンを精製するには抽出過程で混入する他の色素 (クロロフィル, カロテノイド) の除去工程が必要になる。細胞壁を持たず細胞内容物の抽出が容易なガルデリア 1 倍体で, クロロフィル (緑), カロテノイド (黄) を含まない細胞を作ることができれば, これらの問題を克服できると考えられる。

これらの可能性を検証するために, 従属栄養培養した 1 倍体 (N1 株) を用いて, クロロフィル合成に関与するマグネシウムキラーゼ D 遺伝子 (*CHLD*) とカロテノイド合成に関与するフィトエン合成酵素遺伝子 (*PSY*), それぞれの単独破壊株 ( $\Delta CHLD$  と  $\Delta PSY$ ) と二重破壊株 ( $\Delta CHLD \Delta PSY$ ) を作製した (図 3L-N)。野生株と比較して,  $\Delta CHLD$  は若干薄緑色になる程度であったが,  $\Delta PSY$  はより青緑色に,  $\Delta CHLD \Delta PSY$  は青色になった (図 3L)。これらの遺伝子破壊株は, 従属栄養培養 (グルコースの資化のみ) では野生株と同等の生育を示したが, 独立栄養培養 (光合成のみ) では増殖できなかった (図 3L)。一方, 混合栄養培養 (光合成+グルコースの資化) では  $\Delta PSY$  のみが増殖できなかった (図 3L)。この結果は, クラミドモナスの *PSY* 変異体の解析結果と一致し (Santabarbara *et al.* 2013), 光合成装置の構造は緑藻と紅藻で異なるが, 光照射下でカロテノイドがなく, クロロフィルが存在すると紅藻でも細胞死を起こすことが明らかになった。

このように, 紅藻において光合成欠損株の作出と維持が可能となることが示された。今後, これらの技術が光合成研究や産業利用に役立つことを期待したい。

### おわりに

植物の研究を行う上で, 単細胞藻類のはたしうる役割は大きい。植物では組織分化, 成熟が起こることに加え, 細胞ごとにさらされる環境が不均一であることなどの複雑性が, 実験とその結果の解釈を難しくする要因になっている。一方, イデユコゴメ類を含む単細胞藻類は, 均一な集団, 環境, 単純なゲノム組成と細胞構造など, 実験を行う上で有用な特徴を持つため, 藻類と植物に広く保存される現象の解明に適した実験材料だと考えられる。また, イデユコゴメ類は, その進化的, 生態学的特徴から, 基礎研究と産業利用に向けた研究の双方を発展させるポテンシャルを持っている。

我々はイデユコゴメ類に属するガルデリアの研究開発を通して, (1) 有性生殖過程の発見 (細胞壁を持つ 2 倍体と細胞壁を持たない 1 倍体を行き来する生活環), (2) 実験室環境での生活環の再現 (減数分裂による 1 倍体化, 接合または核内倍加による 2 倍体化), (3) 高精度ゲノム・トランスクリプトーム情報の整備, (4) 安定的な遺伝的改変技術の確立, (5) 従属栄養培養による光合成欠損株の作出技術の開発といった基盤整備を行った。これにより, アークプラスチダに広く保存されている BELL/KNOX 遺伝子, MADS-box 遺伝子, ミオシン非依存的なアクチンの祖先的な機能の推定に至った。今後, これらの詳細な解析に加え, アークプラスチダにおける有性生殖, 光合成の進化, 栄養様式の切り換え機構 (独立栄養と従属栄養など), 環境ストレスへの適応機構などの研究においてもガルデリアがモデル研究系として役立つと考えられる。さらに, 産業利用に向けては, (1) 細胞内容物の抽出が容易な 1 倍体の利用 (タンパク質, 色素, ビタミン, 抗酸化物質などの生産系), (2) セルフクローニングを含む遺伝的改変技術の利用, (3) 掛け合わせ育種による, 有用形質を集積した藻類株の作出の可能性, (4) 1 倍体と 2 倍体の相互変換が可能 (目的に応じて 1 倍体, 2 倍体のどちらの細胞を使うかの選択が可能), (5) 増殖効率の優れた従属栄養培養, または混合栄養培養で, 酸性条件下でのコンタミネーションを抑えた高密度培養が可能といった, 既に産業利用されている藻類にはない有用な特徴を持つ。したがって, ガルデリアの産業利用へ向けた研究も, 今後より一層加速し, 藻類産業の発展に寄与すると考えられる。

日本は, 火山活動に起因した硫酸酸性温泉を多数有しており, イデユコゴメ類の研究には適した環境である。草津や別府温泉は観光地として開発されておりアクセスし易いため, サンプルングなどのフィールド研究が行いやすい。日本各地で単離されたイデユコゴメ類は国立環境研究所 (NIES) や製品評価技術基盤機構 (NITE) のストックセンターに保存され, 世界中の研究者に提供されている。これまで, イデユコゴメ類の中でいち早くモデル生物となったシゾンの研究は, 黒岩

常祥先生（東京大名誉教授）のグループを中心に研究系の開発が進み、真核藻類として初めての全ゲノム情報の解読が行われ、その後、田中寛先生（東工大教授）のグループを中心に遺伝的改変法が確立され、オルガネラ分裂、細胞増殖、環境応答などの分野において世界をリードする研究が数多く行われてきた。今後は、我々によって基盤開発が行われたガルデリアを含めた日本発のモデル生物系統群イデユコゴメ類が、基礎研究、そして産業利用への二刀流の活躍をすることを期待したい。

## 謝辞

本研究は板橋岳志博士、一ノ瀬孝子氏、大沼亮博士、藤原崇之博士、山下翔大博士、Jong Lin Wei 博士、富田麗子氏、岩根敦子博士らとの共同研究によって行われました。本稿をご校閲いただいた藤原崇之博士、山下翔大博士に御礼申し上げます。また、本稿執筆の機会をくださった本誌編集委員の皆様に御礼申し上げます。

## 引用文献

- Allen, J. F., de Paula, W. B. M., Puthiyaveetil, S. & Nield, J. 2011. A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 16: 645–655.
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K. *et al.* 2019. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat. Biotechnol.* 37: 420–423.
- Barbier, G., Oesterhelt, C., Larson, M. D. *et al.* 2005. Comparative genomics of two closely related unicellular thermo-acidophilic red algae, *Galdieria sulphuraria* and *Cyanidioschyzon merolae*, reveals the molecular basis of the metabolic flexibility of *Galdieria sulphuraria* and significant differences in carbohydrate metabolism of both algae. *Plant Physiol.* 137: 460–474.
- Bowman, J. L., Sakakibara, K., Furumizu, C. & Dierschke, T. 2016. Evolution in the cycles of life. *Annu. Rev. Genet.* 50: 133–154.
- Butterfield, N. J. 2000. *Bangiomorpha pubescens* n. gen., n. sp.: implications for the evolution of sex, multicellularity, and the Mesoproterozoic/Neoproterozoic radiation of eukaryotes. *Paleobiology* 26: 386–404.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294–306.
- Cho, C. H., Park, S. I., Huang, T.-Y. *et al.* 2023. Genome-wide signatures of adaptation to extreme environments in red algae. *Nat. Commun.* 14: 10.
- Čížková, M., Vitová, M. & Zachleder, V. 2019. The red microalga *Galdieria* as a promising organism for applications in biotechnology. In: Vitová, M. (ed) *Microalgae—from physiology to application*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.89810
- Eriksen, N. T. 2008. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 1–14.
- Faktorová, D., Nisbet, R. E. R., Fernández Robledo, J. A. *et al.* 2020. Genetic tool development in marine protists: emerging model organisms for experimental cell biology. *Nat. Methods* 17: 481–494.
- Fujiwara, T. & Ohnuma, M. 2017. Procedures for transformation and their applications in *Cyanidioschyzon merolae*. In: Kuroiwa, T., Miyagishima, S., Matsunaga, S. *et al.* (eds.) *Cyanidioschyzon merolae: A new model eukaryote for cell and organelle biology*. pp. 87–103. Springer, Singapore.
- Götz S., Garcia-Gomez, J. M., Terol, J. *et al.* 2008. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.* 36: 3420–3435.
- Hirooka, S., Itabashi, T., Ichinose, T. M. *et al.* 2022. Life cycle and functional genomics of the unicellular red alga *Galdieria* for elucidating algal and plant evolution and industrial use. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 119: e2210665119.
- Hirooka, S., Tomita, R., Fujiwara, T. *et al.* 2020. Efficient open cultivation of cyanidiallean red algae in acidified seawater. *Sci. Rep.* 10: 13794.
- Hisanaga, T., Fujimoto, S., Cui, Y. *et al.* 2021. Deep evolutionary origin of gamete-directed zygote activation by KNOX/BELL transcription factors in green plants. *eLife* 10: e57090.
- Horst, N. A., Katz, A., Pereman, I., Decker, E. L., Ohad, N. & Reski, R. 2016. A single homeobox gene triggers phase transition, embryogenesis and asexual reproduction. *Nat. Plants* 2: 15209.
- Joo, S., Wang, M. H., Lui, G. *et al.* 2018. Common ancestry of heterodimerizing TALE homeobox transcription factors across Metazoa and Archaeplastida. *BMC Biol.* 16: 136.
- Kollmar, M. & Mühlhausen, S. 2017. Myosin repertoire expansion coincides with eukaryotic diversification in the Mesoproterozoic era. *BMC Evol. Biol.* 17: 211.
- Koren, S., Walenz, B. P., Berlin, K., Miller, J. R. & Phillippy, A. M. 2017. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Res.* 27: 722–736.
- Koshimizu, S., Kofuji, R., Sasaki-Sekimoto, Y. *et al.* 2018. *Physcomitrella* MADS-box genes regulate water supply and sperm movement for fertilization. *Nat. Plants* 4: 36–45.
- Kuroiwa, T. 2010. Mechanisms of organelle division and inheritance and their implications regarding the origin of eukaryotic cells. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 86: 455–471.
- Lang, I., Bashir, S., Lorenz, M., Rader, S. & Weber, G. 2020. Exploiting the potential of Cyanidiales as a valuable resource for biotechnological applications. *Appl. Phycol.* 3: 199–210.
- Lee, J.-H., Lin, H., Joo, S. & Goodenough, U. 2008. Early sexual origins of homeoprotein heterodimerization and evolution of the plant KNOX/BELL family. *Cell* 133: 829–840.
- Li, X., Patena, W., Fauser, F. *et al.* 2019. A genome-wide algal mutant library and functional screen identifies genes required for eukaryotic photosynthesis. *Nat. Genet.* 51: 627–635.
- Li, L., Wang, S., Wang, H. *et al.* 2020. The genome of *Prasinoderma coloniale* unveils the existence of a third phylum within green plants. *Nat. Ecol. Evol.* 4: 1220–1231.
- Liu, S.-L., Chiang, Y.-R., Yoon, H. S. & Fu, H.-Y. 2020. Comparative genome analysis reveals *Cyanidiococcus* gen. nov., a new extremophilic red algal genus sister to *Cyanidioschyzon* (Cyanidioschyzonaceae, Rhodophyta). *J. Phycol.* 56: 1428–1442.
- Matsuzaki, M., Misumi, O., Shin-i, T. *et al.* 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428: 653–657.
- Mikami, K., Li, C., Irie, R. & Hama, Y. 2019. A unique life cycle transition in the red seaweed *Pyropia yezoensis* depends on apospory. *Commun. Biol.* 2: 299.
- Miyagishima, S. Y. & Tanaka, K. 2021. The unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* - the simplest model of a photosynthetic eukaryote. *Plant Cell Physiol.* 62: 926–941.
- Moon, M., Mishra, S. K., Kim, C. W., Suh, W. I., Park, M. S. & Yang, J.-W. 2014. Isolation and characterization of thermostable phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. *Korean J. Chem. Eng.* 31: 490–495.

- Muñoz-Gómez, S. A., Mejía-Franco, F. G., Durnin, K. *et al.* 2017. The new red algal subphylum Proteorhodophytina comprises the largest and most divergent plastid genomes known. *Curr. Biol.* 27: 1677–1684.
- Oesterhelt, C., Vogelbein, S., Shrestha, R. P., Stanke, M. & Weber, A. P. M. 2008. The genome of the thermoacidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* encodes a small family of secreted class III peroxidases that might be involved in cell wall modification. *Planta* 227: 353–362.
- Ohnuma, M., Yokoyama, T., Inouye, T., Sekine, Y. & Tanaka, K. 2008. Polyethylene glycol (PEG)-mediated transient gene expression in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Plant Cell Physiol.* 49: 117–120.
- One Thousand Plant Transcriptomes Initiative 2019. One thousand plant transcriptomes and the phylogenomics of green plants. *Nature* 574: 679–685.
- Rossoni, A. W., Price, D. C., Seger, M. *et al.* 2019. The genomes of polyextremophilic cyanidiales contain 1% horizontally transferred genes with diverse adaptive functions. *eLife* 8: e45017.
- Sakakibara, K., Ando, S., Yip, H. K. *et al.* 2013. KNOX2 genes regulate the haploid-to-diploid morphological transition in land plants. *Science* 339: 1067–1070.
- Santabarbara, S., Casazza, A. P., Ali, K. *et al.* 2013. The requirement for carotenoids in the assembly and function of the photosynthetic complexes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 161: 535–546.
- Schmidt, R. A., Wiebe, M. G. & Eriksen, N. T. 2005. Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin-producing red alga *Galdieria sulphuraria*. *Biotechnol. Bioeng.* 90: 77–84.
- Schönknecht, G., Chen, W.-H., Ternes, C. M. *et al.* 2013. Gene transfer from bacteria and archaea facilitated evolution of an extremophilic eukaryote. *Science* 339: 1207–1210.
- Seckbach, J. 2010. Overview on cyanidial biology. In: Seckbach, J. & Chapman, D. (eds) *Red algae in the genomic age*. pp. 345–356. Springer, Dordrecht.
- Sharma, N., Bhalla, P. L. & Singh, M. B. 2013. Transcriptome-wide profiling and expression analysis of transcription factor families in a liverwort, *Marchantia polymorpha*. *BMC Genomics* 14: 915.
- Silva, J., Ferraz, R., Dupree, P., Showalter, A. M. & Coimbra, S. 2020. Three decades of advances in arabinogalactan-protein biosynthesis. *Front Plant Sci.* 11: 610377.
- Thangavel, G. & Nayar, S. 2018. A survey of MIKC type MADS-box genes in non-seed plants: Algae, bryophytes, lycophytes and ferns. *Front Plant Sci.* 9: 510.
- Tian, F., Yang, D.-C., Meng, Y.-Q., Jin, J., P., & Gao, G. 2019. PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants. *Nucleic Acids Res.* 48: D1104–D1113.
- Ullmann, J. & Grimm, D. 2021. Algae and their potential for a future bioeconomy, landless food production, and the socio-economic impact of an algae industry. *Org. Agr.* 11: 261–267.
- Umen, J. & Coelho, S. 2019. Algal sex determination and the evolution of anisogamy. *Annu. Rev. Microbiol.* 73: 267–291.
- Yoon, H. S., Hackett, J. D., Ciniglia, C., Pinto, G. & Bhattacharya, D. 2004. A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 21: 809–818.
- Yoon, H. S., Müller, K. M., Sheath, R. G., Ott, F. D. & Bhattacharya, D. 2006. Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta). *J. Phycol.* 42: 482–492.
- Zhang, H., Yohe, T., Huang, L. *et al.* 2018. dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res.* 46: W95–W101.

(2023年4月27日受付, 2023年5月30日受理)

通信担当編集委員: 大沼 亮

## 第9回アジア太平洋藻類学フォーラムのお知らせ

アジア太平洋藻類学フォーラム (APPF) は, アジア太平洋藻類学連合が主催となり, 3年に一度行われている国際学会です。第9回 APPF 2020を北海道大学(札幌市)で開催する準備をしておりましたが, 新型コロナウイルス感染症のパンデミックの影響で度重なる延期となっていました。多くの皆さまにご迷惑をおかけしておりますこと, 深くお詫び申し上げます。この度, 来年の4月開催に向けて準備を進めております。多くの方々のご参加をお待ちしております。

APPF 2024 実行委員会 小亀一弘

### 1. 会議名称

第9回アジア太平洋藻類学フォーラム

The 9th Asian Pacific Phycological Forum (APPF 2024)

主催: アジア太平洋藻類学連合

(The Asian Pacific Phycological Association)

共催: 日本藻類学会

### 2. 会期および会場

2024年4月14日(日)～18日(木)

北海道大学 学術交流会館(札幌市北区北8条西5丁目)

### 3. ホームページ URL

<https://ec-mice.com/APPF2024/>