



盗葉緑体生物ラパザはどのように進化してきたか

柏山 祐一郎^{1*}¹ 福井工業大学環境学部環境食品応用化学科 (〒 910-8505 福井県福井市学園 3-6-1)Yuichiro Kashiya^{1*}: How the kleptoplasmic organism *Rapaza viridis* has evolved? Jpn. J. Phycol. (Sôru) 72: 19–27, March 10, 2024

In eukaryotic organisms, autotrophy is enabled through photosynthesis, which fundamentally relies on chloroplasts derived from cyanobacteria. Some non-photosynthetic cells have evolved photosynthetic abilities via symbiotic relationships. Kleptoplasty, where aplastidal eukaryotes temporarily utilize chloroplasts from ingested photosynthetic cells, exemplifies such adaptability; yet, its diversity and evolutionary aspects remain underexplored. *Rapaza viridis*, a flagellate related to Euglenophyceae, demonstrates a distinct instance of kleptoplasty. Its nuclear genome encodes chloroplast-specific proteins, which are presumably expressed into its *Tetraselmis*-derived kleptoplasts. This organism represents a distinctive eukaryotic cell-chloroplast interaction, offering valuable insights into the evolution and integration of chloroplasts in eukaryotic cells.

Key Index Words: *Rapaza viridis*, *Euglenophyceae*, *kleptoplasty*, *secondary plastid*, *horizontal gene transfer*

¹Department of Applied Chemistry and Food Science, Fukui University of Technology, 3-6-1 Gakuen, Fukui 910-8505, Japan

*Author for correspondence: chiro@fukui-ut.ac.jp

真核生物にとっての光合成とは、基本的に、シアノバクテリアに起源をもつオルガネラである葉緑体 (chloroplast/ photosynthetic plastid) という光エネルギー変換装置が独占する代謝である。これにより葉緑体を持つ光合成細胞 (藻類/植物) は独立栄養的な増殖が可能である。葉緑体を持たない細胞は、藻類や植物に由来する産物を間接的に利用する従属栄養細胞であるが、中には光合成細胞を細胞内部に共生させることで、サンゴのようにあたかも独立栄養的に振舞う場合も知られている。つまり、葉緑体との「関係性」こそが真核細胞の生理生態を決定づけるものであり、細胞内に恒常的な葉緑体を獲得することができれば光合成細胞に進化する。一方、従属栄養性の真核細胞の中には、光合成細胞を収奪的に細胞内に取り込み、その葉緑体機能を一過的に利用する盗葉緑体現象をおこなうものが知られてきた。捕食した海藻から葉緑体を細胞内に取り込んで保持するウミウシの例は有名である (Kawaguti 1965, Pierce & Curtis, 2012)。盗葉緑体現象は単細胞性の真核生物 (原生動物) の中にも散見されるが (渦鞭毛藻, 繊毛虫, 有孔虫など), その自然界における実際の多様性の研究の歴史は未だ十分ではなく、実際には、盗葉緑体現象は真核細胞と葉緑体との「関係性」の代表的な例かもしれない。

昨年、従来知られてきた事例とは一線を画す、鞭毛虫 *Rapaza viridis* A.Yamaguchi, Yubuki & B.S.Leander (以下「ラパザ」) の盗葉緑体現象が報告された (図 1) (Karnkowska *et al.* 2023)。ラパザは、その発見当初、同所的に分離されたテ

トラセルミス属の緑藻 (以下「テトラセルミス」) を特異的に捕食する「藻類」とされた。ユーグレナ藻類の外側基部で分岐する姉妹系統だが、ユーグレナ藻類では既に失われている食作用の能力 (葉緑体の獲得進化に不可欠と考えられてきた) を維持しているため、ユーグレナ藻類の進化を考える上で鍵となる生物だと期待された (Yamaguchi *et al.* 2012)。しかし、その後の研究から、ラパザが「真の葉緑体」を有する藻類ではないこと、すなわち、ラパザの細胞内部に恒常的に存在が確認される葉緑体様の構造は、全て、餌として捕食しているテトラセルミスから奪った「盗葉緑体」だということが明らかになった (Karnkowska *et al.* 2023)。しかしここで最も驚くべき発見は、ラパザの核ゲノムに様々な葉緑体関連のタンパク質遺伝子がコードされていたことである。輸送シグナルと考えられる配列の存在から、少なくとも 276 もの遺伝子翻訳物が、逐次的に獲得される盗葉緑体に対して輸送されて発現していることも示唆された。このような核ゲノムコードのタンパク質は、光合成細胞それぞれに固有な「真の葉緑体」を構成する必須因子である。さらに、独立栄養に必須である窒素同化代謝に関しても、海洋の主要な栄養塩である硝酸を同化できることが盗葉緑体生物としては初めて確認された。これらの点でラパザの盗葉緑体現象は従来知られてきた例と比較して、進化的により光合成細胞に近い中間状態にあるようにも捉え得る。しかし、ラパザにとっての葉緑体はあくまでも一過的にのみ維持可能な外来の構造体であり、その消耗を補うために定期的に新しい盗葉緑体をテトラセルミスから奪い

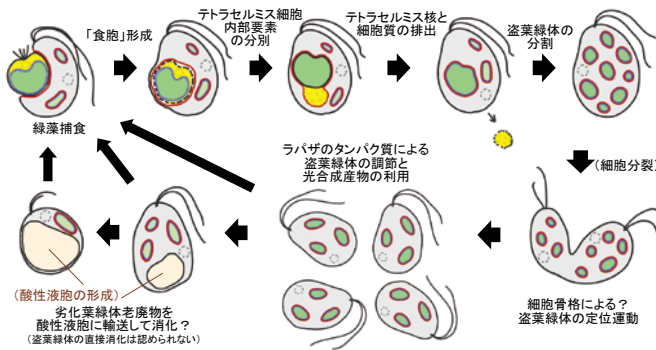


図1. ラバザの盗葉緑体現象の概略。ラバザは食作用によりテトラセルミス細胞全体を取り込むが、取り込み後1時間以内にはテトラセルミスの葉緑体を除く細胞質と核を細胞外に排泄してしまう。こうして形成された「盗」葉緑体は食胞膜起源の第三の包膜（赤線で表示）ごと細分化され、ラバザの細胞分裂時に娘細胞に分配されていく。その後、2週間程度は高い光合成活性を維持してあたかも独立栄養性の藻類のように振る舞うが、いずれ新しい盗葉緑体を獲得できなければ4～5週間程度で死滅してしまう。

続けなければならないという点では、従来知られてきた盗葉緑体現象と同様である。

興味深いことに、これらラバザ独自の葉緑体タンパク質遺伝子群は、アミノ酸配列の進化系統解析から、緑藻だけでなく、紅藻由来の二次葉緑体を有する様々な藻類からの遺伝子水平転移 (horizontal gene transfer; HGT) によって獲得されたと推定された (Karnkowska *et al.* 2023)。一般論として、HGTのメカニズム自体は、ほぼ全く不明な状況にあると言うべきである。すなわち、どのようなプロセスで塩基情報が移動し、ゲノムに組み込まれ、妥当なプロモーターやターミネーター領域が形成され、あるいは妥当な輸送シグナルが形成されるのかなど、どれをとっても未だ「不思議」の域を出ていない。もちろん、研究が進んでいないわけではなく、以前よりはHGTに関連する可能性のあるメカニズムの見解も得られ始めている (e.g., Kudo *et al.* 2021)。ともかく、ラバザがどのようなメカニズムで様々な藻類から遺伝子を集めたのかについては、現状、議論は不可能である。許されるとすれば、HGTのメカニズムの部分をつくりブラックボックスの中に仕舞って、大規模なHGTが起こった細胞生物学的な『状況』を考えることぐらいであろう。では、ラバザの盗葉緑体現象、あるいはユーグレナ藻類の葉緑体獲得に繋がった大規模なHGTが起きた『状況』とは、どのようなものだろうか。

本論では、これら『状況』を探ることを通して、ラバザとユーグレナ藻類の進化について私見を整理してみる。未だ非常に粗い思索段階のものではあるが、議論の契機になれば幸いである。なお、ラバザの盗葉緑体現象の細胞生物学的な側面の紹介や窒素代謝については、原著論文2報 (Karnkowska *et al.* 2023, Maruyama *et al.* 2023) に加えて別稿 (丸山・柏山 2023) を参照されたい。

葉緑体関連遺伝子が大規模に水平転移する『状況』

ミトコンドリアや葉緑体の成立においては、HGTが極めて重要な進化的要素であった。これらオルガネラが過去の細胞内共生という『状況』に起源するという細胞内共生仮説が受容されて久しいが、その決定的な証拠は、これらの縮退的・痕跡的なバクテリア型のオルガネラゲノムが、それぞれ、アルファプロテオバクテリアとシアノバクテリアのゲノムに由来するという堅牢な推定である (Gray 1993, Ponce-Toledo *et al.* 2017)。葉緑体ゲノムに限って言えば、痕跡的とはいえ光合成のメカニズムで中核的な役割を果たす光化学系の多くの因子や炭酸固定複合体ルビスコの酵素触媒因子などを保持している。ともあれ、これらオルガネラの構造と機能に関わるその他すべてのタンパク質因子は、それぞれの生物の核ゲノムにコードされている。従って、細胞内共生という『状況』下で共生体ゲノムから宿主細胞核ゲノムへと徐々にHGTが進行したとする細胞内共生遺伝子転移 (endosymbiotic gene transfer; EGT) という考え方が主流になっていったのは当然であろう。クリプト藻やクロララクニオン藻で見いだされたかつての共生藻の核に相当するヌクレオモルフとその痕跡的なゲノムの発見は、このgradualism的な仮説と親和性が高かった。また、動物と細菌の共生現象などでも知られている共生体ゲノムの縮退現象など (McCutcheon & Moran 2012) も、真核共生細胞がゲノムを徐々に縮退・消失させてオルガネラに進化するというアイデアに整合的に思われた。実際、光合成細胞との共生ではないが、アメーバの一種であるネオパラメーバとパーキンシエラの共生系では、絶対的な共生真核細胞パーキンシエラの核ゲノムが縮退傾向にあることが報告されている (Tanifuji *et al.* 2017)。

しかし、双利共生的な光合成細胞内共生という『状況』から、大規模なHGTを伴うオルガネラ進化が本当に進行するのだろうか。本稿でいう双利共生的な光合成細胞内共生とは、サンゴ細胞内で認められるシンビオソームに包まれた褐虫藻のように、宿主細胞が光合成細胞を能動的に取り込んで保有するような系を指す。重大なことは、HGT (EGTを含む) のメカニズムが未解明であり、かつ、現在進行形的双利共生的な光合成細胞内共生の系においてEGTの証拠が見つからないことである。前者についてはこれ以上触れない。後者について言えば、宿主細胞と共生体の両方のゲノムが解読されたサンゴと褐虫藻の共生系をはじめ (Shinzato *et al.* 2011)、緑藻を共生させるミドリゾウリムシやアメーバ、ヒドラなど双利共生的な光合成細胞内共生 (photoendosymbiosis) の系では、共生藻から宿主核ゲノムへの大規模なHGTの積極的な証拠は報告されていない。つまり、この『状況』からオルガネラ化進化が進行する根拠は、未だ何もないのだ。

では、「共生体」が自由生活能を完全に喪失して「宿主細胞」により垂直伝播されるような『状況』ではどうだろうか。例えば、dinotomは珪藻を起源とする非常に複雑な細胞内構造を持つ渦鞭毛藻であるが、この構造には珪藻の葉緑体に加え、珪藻の核やミトコンドリアをはじめとするほとんど

の珪藻細胞質が存在しており (e.g., Jeffery & Vesik 1976), 自律性を喪失し渦鞭毛藻により垂直伝播されるようになった珪藻細胞由来の「共生体」だと考えられる。ここで重要なことは, *dinotom* においては珪藻核から渦鞭毛藻核への HGT が僅かながら認められることである (Burki *et al.* 2014, Imanian & Keeling 2014)。また, 最近になり, ヌクレオモルフ様の縮退的な核が存在する緑藻起源の「共生体」を持つ複数系統の渦鞭毛藻が報告された。これらの系では, 緑藻核ゲノム (あるいはヌクレオモルフゲノム) から渦鞭毛藻核ゲノムへ明確な HGT が認められるだけでなく, 一部の光合成タンパク質について, 緑藻核からの発現と渦鞭毛藻核からの HGT 遺伝子の発現が重複しているものが認められ, 現在進行形の HGT も示唆された (Sarai *et al.* 2020)。以上のように, 自律性を喪失した「共生体」が「宿主細胞」内で恒久的に垂直伝播される『状況』では, 前者の核ゲノム (ヌクレオモルフゲノム) から後者の核ゲノムへの HGT が進行しようと思われる。

ところで以上の例では, 「共生体」は「宿主細胞」内部で分裂や生殖などの自律性を喪失しているだけでなく, 「宿主細胞」外での自由生活能も喪失していると考えられる。つまりこれら藻類細胞由来の構造は, 厳密には「共生体」と呼べるものではなく, 「宿主細胞」の一部としてのオルガネラ, すなわち「(ヌクレオモルフを有する) 葉緑体」と看做し得る。これは, *dinotom* に認められるような「共生体」の細胞質オルガネラの存在の有無や, ヌクレオモルフ化した「共生体」核ゲノムの縮退の程度に関わらず, また, 「宿主細胞」による制御の程度やメカニズムの違いに関わらず, 一律にそう定義されるべきものであろう。ここで重要なことは, これら「共生体」様のオルガネラの成立が, 前述した「双利的」な光合成細胞内共生という『状況』の進化的延長線上にあると考える根拠は, 実はあまり無いということである。たとえば, これら「共生体」様オルガネラの複雑な包膜のうちにかつての藻類細胞の細胞膜由来のものが存在していたとしても, その成立プロセスを共生現象と進化的に直結して「双利的に共生していた共生体全体が漸移的に細胞膜内の要素を縮退させることでオルガネラになった」と論じることは, 「細胞共生仮説」ドグマに毒された認識ではなからうか。したがって, ここまで使ってきた「共生体」や「宿主細胞」という表現も, 実際このドグマの下にあって不適切かもしれないが, とはいえ, オルガネラ進化の起点を論じるに適した現象が, 双利的な光合成細胞内共生以外にあまり議論されてきていない現状, 他に適切な表現も見当たらない。

もっとも, 維持培養が困難で詳細な研究が進んでいないものの, 収奪的な共生現象とも捉え得る *Hatena arenicola* N. Okamoto & Inouye と *Nephroselmis* 属緑藻との関係 (Okamoto & Inouye 2006, Yamaguchi *et al.* 2014) が「共生体」様オルガネラの進化的起点を代表しているかもしれない。また, 渦鞭毛藻 *dinotom* の「共生体」は多様な系統の珪藻に由来するが, 代表的な *dinotom* を含む *Durinskia* 属には, *Nitzschia* 属の珪藻を一過的にしか保持しない盗葉緑体現象が認められており

(Yamada *et al.* 2019), *dinotom* の「共生体」は盗葉緑体現象に由来する可能性がある。

さて, ここではもう一つ, 大規模な HGT が起こりうる『状況』として, 盗葉緑体現象の中でも, 「(盗) 葉緑体ドナー」藻類の核も同時に保持されるケースを考えたい。例として, クリプト藻を取り込む渦鞭毛藻ヌスットディニウム属 (*Nusuttodinium*) が挙げられる (Onuma & Horiguchi 2013, 2015, Takano *et al.* 2014, Onuma *et al.* 2020)。この場合は光合成細胞内共生と異なり, ホスト細胞内部に保持されるのは「盗葉緑体ドナー」となる藻類細胞の一部のみであるため, 後者の生命体としての自律性は取り込みの段階で必然的に失われる。ヌスットディニウム属の盗葉緑体現象では, ホスト細胞の細胞周期に応じて盗葉緑体の分裂が進行するが, 「盗葉緑体ドナー」の核の分裂は起こらないため, この外来の核はホストの分裂に伴い, 片方の娘細胞にのみ引き継がれていく。したがって, ホスト細胞核と「盗葉緑体ドナー」核が共存する『状況』は, ホスト細胞の個体群全体としては限定的にはなるものの, 少数ながら確実に存在していると看做されよう。もっとも, 今のところ, このような系において HGT の明確な証拠は得られていない。しかし, 前述のヌクレオモルフを有する葉緑体と似た細胞生物学的トポロジーを有するため, このタイプの盗葉緑体現象が大規模な HGT を起こしうる『状況』の候補であると考えられるのに無理があるとはまでは言えないだろう。

最後に, ラバザのような「盗葉緑体ドナー」の葉緑体のみが維持されてドナー核は維持されないタイプの盗葉緑体現象について考えてみよう。前述の通り, ラバザの核ゲノムには, 進化系統の異なる多様な葉緑体関連の遺伝子が存在しており, 過去に様々な藻類の核ゲノムから HGT があったことが示唆される。現在実験室で研究がなされているラバザ培養株 (NIES-4477) については, 特定のテトラセルミス株 (NIES-4478) のみを盗葉緑体のドナーとして捕食している。しかし, Karnkowska *et al.* (2023) で推定された盗葉緑体へ輸送発現されるタンパク質群には, テトラセルミス属の配列に系統的に近縁な遺伝子がある程度含むものの, NIES-4478 株と同一性の高い配列は認められず, 盗葉緑体ドナー細胞からの現在進行形の HGT の積極的な証拠は得られていない。従って, ラバザ核ゲノムへの大規模な HGT イベントは, ラバザの祖先細胞が置かれていた, 現在とは異なる『状況』に起因するものだったと推測できる。このことは, 現在のラバザの『状況』では, 「盗葉緑体ドナー」の核が, ラバザの食作用によるテトラセルミス細胞の取り込み後の最初期の段階で排除されることで HGT の機会が失われていると考えると整合的にも思われる。

もっとも, 以上に議論したような「藻類細胞との密接な関係」ではなくとも HGT 自体は起こりうるだろう。例えば, 多細胞動物のワムシ (*Gladyshev et al.* 2008) やクマムシ (*Hashimoto et al.* 2016) ですらバクテリアや菌類からの HGT 起源遺伝子が数多く見いだされる。ただし, それら HGT 遺伝子の機能

が生化学的に検証されているわけではない点は留意すべきである。一方、紅葉時など植物のクロロフィル分解で必須な酵素マグネシウムデキラターゼをコードする遺伝子 stay green は、その変異型がメンデルの遺伝の法則発見に寄与した「緑色マメ」の原因遺伝子であるが (Shimoda *et al.* 2016)、これは枯草菌からの HGT によって獲得されたもので (Obata *et al.* 2019)、明確に HGT 後に機能を獲得して固定された例であろう。従って、藻食性の細胞が餌である藻類細胞から HGT 遺伝子を獲得すること自体はあり得べきことかもしれない。ただし、葉緑体関連の遺伝子セットを単純な食作用のプロセスのみを通して蓄積し、これらが進化的な時間機能しうる状態で維持される (偽遺伝子化が選択的に排除され続ける) というのは考えにくい。従って、ラパザにごく近縁な藻食性の鞭毛虫ペラネマ (*Peranema trichophorum* (Ehrenberg) F.Stein, Euglenida) が葉緑体遺伝子を持たない (Y. Kashiyama, unpublished data) ことの原因は、厳密には HGT が起きていないからではなく、単純に藻類細胞を貪食して消化する『状況』だけでは HGT 遺伝子の保存・蓄積に至らないためかもしれない。

ところで、「盗葉緑体ドナー」の核はごく短期間ながら一旦はラパザ細胞内に取り込まれている。これは実際、盗葉緑体獲得のたびに起こる極めて頻繁な『状況』である。そしてペラネマと異なり、ラパザの『状況』では、HGT で獲得した葉緑体遺伝子を発現させる標的としての盗葉緑体が常時存在している。それでもラパザでは「盗葉緑体ドナー」テトラセルミスからの HGT 遺伝子が見つからない。ただし、繰り返すが、HGT と HGT 遺伝子の機能発現に至るメカニズム自体が不明である以上は、現在のラパザの『状況』が「大規模な HGT と親和性が低かろう」という以上の議論は難しい。

ラパザ盗葉緑体現象とユーグレナ藻類二次葉緑体の進化

次に、上述の議論を踏まえて、HGT の観点からラパザの盗葉緑体現象がどのように進化してきたかについて論じたい。ここでは、ラパザの直近の姉妹系統であるユーグレナ藻綱 (Euglenophyceae) の二次葉緑体とこれを構成する核ゲノムコードの葉緑体関連遺伝子について同時に論じることが重要になる。なぜなら、ラパザとユーグレナ藻類には進化系統的に近縁な葉緑体タンパク質を共有しており、かつ、盗葉緑体ないし二次葉緑体に対する輸送シグナルにも共通性が認められるからだ (Karnkowska *et al.* 2023)。つまり、ラパザ盗葉緑体現象とユーグレナ藻類の二次葉緑体の成立過程には、過去に共通する進化的なプロセスが存在していたと思われる。

ユーグレナ藻類の核ゲノムコード葉緑体遺伝子群は、その進化的起源がかなり多様であることが従来から議論されてきた (e.g., Maruyama *et al.* 2011)。単系統群であるユーグレナ藻類の葉緑体は、その葉緑体ゲノムの系統解析から緑色植物門プラシノ藻綱ピラミモナス属 (*Pyramimonas*) の葉緑体を起源とする二次葉緑体であることが示されている (Turmel *et al.* 2008)。しかし一方で、ユーグレナ藻類の核ゲノムに

は、ピラミモナス属に明確な近縁性を示す葉緑体遺伝子はむしろ例外的であり (Morden *et al.* 1992, Takahashi *et al.* 2007, Maruyama *et al.* 2011, Markunas & Triemer 2016, Harada *et al.* 2000, Karnkowska *et al.* 2023, Y. Kashiyama, unpublished data)、葉緑体のドナーとなったピラミモナス核ゲノムからユーグレナ藻類の共通祖先の核ゲノムへの HGT が限定的であったことが示唆される。これは、従来広く受け入れられている「共生体の核ゲノムから宿主核ゲノムへの漸進的な遺伝子水平転移、宿主から共生体葉緑体へのタンパク質の輸送、および共生藻ゲノムの縮退が葉緑体を成立させた」とする EGT のプロセスに、見かけ上真っ向から対立する (e.g., Timmis *et al.* 2004, Kleine *et al.* 2009)。実際、ユーグレナ藻類の核ゲノムコード葉緑体遺伝子は、紅色植物やストラメパイル-アルベオラータ-リザリア系統群 (SAR) の藻類、ハプト藻、クリプト藻、および緑色植物の中でもコア緑藻やストレプト植物に類縁性を示すものが多い (e.g., Karnkowska *et al.* 2023)。

ラパザの核ゲノムから発現している葉緑体関連タンパク質も、ユーグレナ藻類と同様に多様な起源が示唆されているが、Karnkowska *et al.* (2023) では盗葉緑体への輸送が予測されたペプチドの 2 割近く (55/276) について、ユーグレナ藻類の相同タンパク質との単系統性が示された。この結果については、ユーグレナ藻類と同様な「二段階葉緑体標的配列 (bipartite plastid-targeting signal)」の有無を盗葉緑体への輸送発現の根拠と看做して遺伝子を選別したことによるバイアスの存在は否定できない。すなわち、Karnkowska *et al.* (2023) では、輸送配列の類似性が低い遺伝子については、葉緑体関連のタンパク質遺伝子との相同性があっても議論からは排除されている。それでもかなりの程度の葉緑体タンパク質遺伝子が、ラパザとユーグレナ藻類の共通祖先以前における HGT に起源したことは確からしい。

ここで、ラパザやユーグレナ藻類の最終共通祖先について少し考えてみよう (図 2A, 2B)。最終共通祖先の細胞の核ゲノムには、すでに数多くの葉緑体タンパク質遺伝子が存在したと考えられる。つまり、最終共通祖先以前の細胞において様々な藻類細胞と関係を持ち大規模な HGT が繰り返し起こっていたことを示唆する。さらに、この時点での HGT 起源葉緑体遺伝子群の存在が進化的に有利であったことを意味するため、ラパザとユーグレナ藻類の最終共通祖先には、これらを発現させるべき何らかの「標的」オルガネラ/オルガネロイドが細胞内に連続的ないし断続的に存在し続けていたことを意味する。これは、もし HGT 起源葉緑体遺伝子群が発現すべき標的としての葉緑体が存在して、表現型に何らかの有利な影響を及ぼさない『状況』が「進化的に有意な長期間」連続していたならば、これらの遺伝子は中立的な塩基配列変化に対して選択圧がかかり得ず、偽遺伝子化して失われていくと考えられるからである (cf., Pombert *et al.* 2012, Lo *et al.* 2015)。もっとも、その塩基配列の存在に、翻訳産物による葉緑体関連の機能以外の何らかの潜在的な生物学的効果があっ

た場合は、この限りではないかもしれない。

ともかく、この最終共通祖先は、盗葉緑体現象を示す細胞であったか（図 2A）、恒久的な葉緑体を保持する光合成細胞であったか（図 2B）のいずれかであったと考えるのが妥当であろう。なお本稿では、ラバザとユーグレナ藻類、およびこれらの直近の姉妹系統だと考えられる藻食性細胞ペラネマの最終共通祖先については、ペラネマが葉緑体関連遺伝子を全く保有していないことから（Y. Kashiya, unpublished data）、ペラネマと同様な藻食性細胞であったと想定して議論を進める（図 2A, 2B）。もちろん「ペラネマの系統において葉緑体ない盗葉緑体現象の喪失が起きたことで、祖先細胞が有していた葉緑体関連遺伝子をすべて喪失した」という推論も可能であるが、以下のラバザとユーグレナ藻類の進化に関する議論に大きな影響はない。一方、ペラネマやラバザで藻類細胞のような大型の粒子を食食するための捕食装置が、すべてのユーグレナ藻類において縮退していることから（Leander 2004）、ユーグレナ藻類の最終共通祖先は盗葉緑体現象や新たな共生藻を獲得しうるような食作用の能力を喪失した光合成細胞であったと考えられる（図 2A, 2B）。

ここで一般論として、ある細胞とその内部に存在する葉緑体との「関係性」について整理してみよう。これまでに知られている「関係性」としては、まず、自由生活が可能な光合成細胞が細胞内に共生している状態、すなわち、双利的な光合成細胞内共生が挙げられる。次に、二次葉緑体の代表的形態として、まず、自律性と自由生活能を完全に喪失した「共生体」の核（ヌクレオモルフ）と葉緑体が恒久的に維持されるものが挙げられる。これはクリプト藻やクロララクニオン藻の二次葉緑体のトポロジーであり、また、上記で論じた渦鞭毛藻内部の緑藻や珪藻起源の「共生体」を含む。このタイプの葉緑体を、ここでは便宜的に「I 型二次葉緑体」と呼ぶこととする。これに対して、クリプト藻やクロララクニオン藻以外の二次葉緑体のように、「共生体」由来の葉緑体のみが恒久的に維持される状態を「II 型二次葉緑体」と呼ぶこととする。

一方、盗葉緑体現象の代表的な形態としては、まず、クリプト藻を取り込む渦鞭毛藻ヌストディニウムや（Onuma & Horiguchi 2015, Onuma *et al.* 2020）、珪藻を一過的に取り込む渦鞭毛藻 *Durinskia capensis* Pienaar, H. Sakai & T. Horiguchi (Yamada *et al.* 2019)、クリプト藻を取り込む繊毛虫メソディニウム (*Mesodinium rubrum* Lohmann) (Hansen *et al.* 2013) などに認められる、藻類細胞の葉緑体と核が食胞膜内に維持されるタイプの盗葉緑体現象が挙げられる。この場合には、葉緑体と共に藻類核が維持され、藻類核ゲノムから葉緑体関連タンパク質が発現することで（盗）葉緑体の機能が維持、あるいは拡張され得る。このタイプの盗葉緑体を、ここでは「I 型盗葉緑体」と呼ぶこととする。これに対して、ラバザのテトラセルミス起源の盗葉緑体現象では、藻類細胞の葉緑体のみが食胞膜内に維持されるが、このタイプの盗葉緑体現象を「II 型盗葉緑体」と呼ぶこととする。上述のメソディニウ

ムの I 型盗葉緑体から二段階目の盗葉緑体現象を示すディオフシス属 (*Dinophysis*) 渦鞭毛藻や、珪藻を取り込む有孔虫 *Planoglabratella opercularis* d'Orbigny (ただしミトコンドリアやペルオキシソームなどの細胞質も観察される) (Tsuchiya *et al.* 2020)、原生生物ではないが大型緑藻からの盗葉緑体を行うウミウシの仲間 (*e.g.*, Maeda *et al.* 2021) も II 型盗葉緑体に該当する。

さて、これら便宜的カテゴリーを用いて、ラバザとユーグレナ藻類の進化を整理してみよう。まず、本稿の前段の議論を踏まえて、大規模な HGT は「共生体」核が恒常的に細胞内に存在する I 型二次葉緑体と I 型盗葉緑体で進行し、双利的な光合成細胞内共生や、「共生体」核が排除される II 型盗葉緑体では進行しないと仮定する。II 型二次葉緑体で「共生体」からの HGT が起こりえないのは自明である。また、藻食性ペラネマに HGT の証拠が存在していないことから、少なくともこのユーグレニダ (*Euglenida*) の系統では、単純な食作用の過程では大規模な HGT 遺伝子の蓄積は起こらないと仮定する。

図 2A は、ラバザとユーグレナ藻類の最終共通祖先が盗葉緑体現象を示す生物であった場合を示す。ラバザもユーグレナ藻類も、それぞれ、最終共通祖先以降に獲得されたであろう HGT 起源葉緑体遺伝子を有しているため、この最終共通祖先には I 型盗葉緑体現象が想定される。ここでは、盗葉緑体生物の中から「真の葉緑体」を有するユーグレナ藻類が進化したと考えるため、これを盗葉緑体現象先行仮説と呼ぶ。この場合、まず、藻類食者であったペラネマ-ラバザ-ユーグレナ藻類の最終共通祖先以降に I 型盗葉緑体現象を示す系統が現れ、この系統でこれと前後して、ラバザとユーグレナ藻類の共有派生形質である眼点が獲得された。ラバザは、この I 型盗葉緑体現象を示す祖先状態から II 型盗葉緑体現象を示すようになった系統を代表する細胞ということになる。一方ユーグレナ藻類は、ピラミナスを盗葉緑体ドナーとする一群が盗葉緑体を恒常的に維持するようになった後に捕食能（すなわち盗葉緑体現象を遂行する能力）を喪失し、ピラミナス起源葉緑体を II 型二次葉緑体の形で維持するようになった細胞を最終共通祖先とする藻類だと看做される。

一方図 2B は、ラバザとユーグレナ藻類の最終共通祖先が恒久的な葉緑体を保持する光合成細胞であった場合を示す。現在のラバザが食作用による II 型盗葉緑体現象をおこなう細胞である以上、この共通祖先はユーグレナ藻類とは異なり、光合成細胞でありながら食作用も同時に行っていたと想定される。また、それぞれの系統で最終共通祖先以降に獲得されたであろう多系統の HGT 起源葉緑体遺伝子を有しているため、この葉緑体は「進化的に交換」されるべき（おそらく不完全な）I 型二次葉緑体であったと考えるのが最節約的であろう。この I 型二次葉緑体の成立過程については、現状では無難な説明として、細胞内での双利的な光合成細胞内共生を想定する。ただし、以下に論じるように、I 型二次葉緑体を「進化的に交換」する過程では、二次葉緑体を有した細胞に別

系統の藻類が細胞内共生する必要があると考える。ともかく、この場合、光合成細胞の中からラバザに繋がる盗葉緑体現象を示す系統が現れると考えるため、盗葉緑体現象後行仮説と呼ぶ。ユーグレナ藻類の祖先では、この最終共通祖先以降に別な様々な藻類と共生してI型二次葉緑体化を繰り返し、これによりラバザとは異なるHGT遺伝子群を獲得し、その後は盗葉緑体現象先行仮説と同様な過程を経てII型葉緑体を持つユーグレナ藻類の最終共通祖先が現れたと考えられる。一方、ラバザの祖先でも独立に様々な藻類からのHGTが繰り返されたが、このHGTはI型二次葉緑体においてだけではなく、この系統で新たにI型盗葉緑体現象を進化させたことによるものであった可能性も考慮される。いずれにせよ、ラバザの系統では最終的にII型盗葉緑体現象を示すに至った。

いずれの場合にも、ラバザとユーグレナ藻類のそれぞれの系統、およびその共通祖先では、多様な藻類からのHGTを繰り返すことで葉緑体関連遺伝子を核ゲノム中に蓄積させていったと考えられるが、翻ってこのことは、それら葉緑体遺伝子を発現させるための『状況』が進化的に継続し続けたことを示唆する。食作用の能力を維持し続けた状態では、「葉緑体」を細胞内に維持することをやめてペラネマのような完全な捕食性従属栄養生物に戻ることも想定しうるが、この状態で葉緑体遺伝子を維持し続けたり、輸送メカニズムを別な用途に転用して保存したりできるとは考えにくい。したがって、HGTで獲得された遺伝子を発現されるための何らかの「葉緑体」が常に存在していた『状況』を想定するのが妥当であろう。

盗葉緑体現象先行仮説をとる場合、葉緑体関連遺伝子のHGTはI型盗葉緑体現象で進行し、盗葉緑体ドナー藻類が変化することで、様々な藻類からのHGTが可能であったと考える（図2C）。ただし、盗葉緑体現象におけるドナー藻類は、一般に、それぞれの生物で特異性が高く、知られているすべての盗葉緑体現象で、複数の全く異なる系統の藻類から盗葉緑体を獲得できるような例は知られていない。実際、ラバザの盗葉緑体現象では、盗葉緑体ドナーであるテトラセルミスは培養株レベルでの特異性があると考えられている（Yamaguchi *et al.* 2012）。それでも、盗葉緑体は常時入れ替えが起こる細胞内構造であるため、二次葉緑体の置き換えと比較すれば、盗葉緑体ドナーの変更は格段に起こり得るであろう。

一方、盗葉緑体現象後行仮説をとり、かつ、I型二次葉緑体が双利的な光合成細胞内共生から進化すると考える場合には、I型二次葉緑体が「進化的に交換」される過程で、一旦、二次葉緑体を有した藻類細胞に別な藻類が安定的に細胞内共生するという奇妙な『状況』を経由する必要がある（図2D）。藻類細胞を食作用で取り込んで消化する藻類は渦鞭毛藻やオクロ藻などで知られているが、真核藻類を共生させた真核藻類は聞かない（ただし痕跡的なシアノバクテリア起源の細胞内共生体の例はある；Hagino *et al.* 2013, Nakayama *et al.* 2014）。あるいは、双利的な共生現象ではなく、dinotomの研究から想定しうるような（Yamada *et al.* 2019）、I型盗葉緑体からI型二次葉緑体が成立するプロセスを考慮すべきなのか

もしれない。

このように、いずれの仮説をとるにせよ、決定的な証拠となりうる『状況』の例を欠いている。すなわち、盗葉緑体現象先行仮説を受け入れるには、I型盗葉緑体現象における大規模なHGTの証拠が必要である。また、盗葉緑体現象先行仮説を受け入れるには、奇妙すぎるI型二次葉緑体が「進化的に交換」される遷移プロセスについて、物証とともに理解される必要がある。また、今回もこれまであまり想定・議論されてこなかったプロセス、例えば有性生殖の寄与なども考慮すべきかもしれない。すなわち、「宿主細胞」個体群の中に全く異なる「共生体」を保有する細胞が存在して、それぞれ異なる起源の遺伝子をHGTさせつつ、「宿主細胞」同士が有性生殖により遺伝情報を交換・共有できるような場合には、「共生体」の入れ替えという進化的プロセスは必ずしも必要でないかもしれない。ただし、ラバザやユーグレナ藻類を含むユーグレノゾア生物には、いまだに有性生殖の報告はない。

おわりに

ラバザの発見により、従来ユーグレナ藻類で議論されてきたshopping bag hypothesis (Larkum *et al.* 2007) のような概念を具体的に検証する契機が生じたことは確かであろう。「現存する生命の情報」から進化を考える際には、常に、過去の絶滅による情報の欠落とそれによるバイアスを意識しなければならない。一方、ラバザの発見は、未知の「現存する生命の情報」がまだまだ埋もれていることを教えてくれた。Yamaguchi *et al.* (2012) によりラバザとテトラセルミスの共培養系の確立は、当時まだ盗葉緑体現象が認識できていない段階にあって、極めて重要な研究のステップであったといえよう。しかし、現在は実験細胞的に維持されているラバザ NIES-4477 株は、ユーグレニダの盗葉緑体現象を代表していると結論するのは明らかに早計である。重要なことは、ラバザ以外のユーグレニダ盗葉緑体現象を（すべて絶滅してしまっただけでなく）探し出していくことである。例えば、図2Aと2Bに示したように、ラバザを含むユーグレニダの盗葉緑体生物がユーグレナ藻類に対して側系統群になるか、姉妹関係にある単系統群になるかという知見だけでも、進化プロセスを考えるうえでの重要な判断材料になる。ましてや、ラバザやユーグレナ藻類などゲノムの改変を含む分子生物学的な実証研究が可能なユーグレニダの系（Maruyama *et al.* 2023, Nakazawa *et al.* 2023）における今後の新たな発見は、真核細胞と葉緑体との進化的関わりについて、現状よりはるかに優れた立体的知見をもたらしてくれるはずである。

つまり、ラバザにまつわる研究では、二匹目のドジョウこそが、最大のインパクトをもたらしてくれることになるに違いあるまい。

謝辞

匿名の査読者2名には有意義なコメントをいただき、ここに厚くお礼申し上げます。

引用文献

- Burki, F., Imanian, B., Hehenberger, E., Hirakawa, Y., Maruyama, S. & Keeling, P. J. 2014. Endosymbiotic gene transfer in tertiary plastid-containing dinoflagellates. *Eukaryot. Cell* 13: 246–255. doi: 10.1128/EC.00299-13
- Gladyshev, E. A., Meselson, M. & Arhipova, I. R. 2008. Massive horizontal gene transfer in bdelloid rotifers. *Science* 320: 1210–1213. doi.org/10.1126/science.1156407
- Gray, M. W. 1993. Origin and evolution of organelle genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 884–890. doi.org/10.1016/0959-437X(93)90009-E
- Hagino, K., Onuma, R., Kawachi, M. & Horiguchi, T. 2013. Discovery of an endosymbiotic nitrogen-fixing cyanobacterium UCYN-A in *Braarudosphaera bigelowii* (Prymnesiophyceae). *PLoS One* 8: e81749. doi.org/10.1371/journal.pone.0081749
- Hansen, P. J., Nielsen, L. T., Johnson, M., Berge, T. & Flynn, K. J. 2013. Acquired phototrophy in *Mesodinium* and *Dinophysis*—A review of cellular organization, prey selectivity, nutrient uptake and bioenergetics. *Harmful Algae* 28: 126–139. doi.org/10.1016/j.hal.2013.06.004
- Harada, R., Hirakawa, Y., Yabuki, A. *et al.* 2020. Inventory and evolution of mitochondrion-localized family A DNA polymerases in Euglenozoa. *Pathogens* 9: 257. doi.org/10.3390/pathogens9040257
- Hashimoto, T., Horikawa, D., Saito, Y. *et al.* 2016. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. *Nat. Commun.* 7: 12808. doi.org/10.1038/ncomms12808
- Imanian, B. & Keeling, P. J. 2014. Horizontal gene transfer and redundancy of tryptophan biosynthetic enzymes in dinotoms. *Genome Biol. Evol.* 6: 333–343. doi.org/10.1093/gbe/evu014
- Jeffery, S. W. & Vesik, M. 1976. Further evidence for a membrane-bound endosymbiont within the dinoflagellate *Peridinium foliaceum*. *J. Phycol.* 12: 450–455. doi.org/10.1111/j.1529-8817.1976.tb02872.x
- Karnkowska, A., Yubuki, N., Maruyama, M. *et al.* 2023. Euglenozoan kleptoplasty illuminates the early evolution of photoendosymbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 120: e2220100120. doi.org/10.1073/pnas.2220100120
- Kawaguti, S. 1965. Electron microscopy on the symbiosis between an elysoid gastropod and chloroplasts of a green alga. *Biol. J. Okuyama Univ.* 11: 57–65.
- Kleine, T., Maier, U. G. & Leister, D. 2009. DNA transfer from organelles to the nucleus: the idiosyncratic genetics of endosymbiosis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 115–138. doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092119
- Kudo, H., Matsuo, M., Satoh, S. *et al.* 2021. Cryptic promoter activation occurs by at least two different mechanisms in the Arabidopsis genome. *Plant J.* 108: 29–39. doi.org/10.1111/tpj.15420
- Larkum, A. W., Lockhart, P. J. & Howe, C. J. 2007. Shopping for plastids. *Trends Plant Sci.* 12: 189–195. doi.org/10.1016/j.tplants.2007.03.011
- Leander, B. S. 2004. Did trypanosomatid parasites have photosynthetic ancestors? *Trends Microbiol.* 12: 251–258. doi.org/10.1016/j.tim.2004.04.001
- Lo, W.-S., Gasparich, G. E. & Kuo, C.-H. 2015. Found and lost: the fates of horizontally acquired genes in arthropod-symbiotic *Spiroplasma*. *Genome Biol. Evol.* 7: 2458–2472. doi.org/10.1093/gbe/evv160
- Maeda, T., Takahashi, S., Yoshida, T. *et al.* 2021. Chloroplast acquisition without the gene transfer in kleptoplastic sea slugs, *Plakobranchus ocellatus*. *eLife* 10: e60176. doi.org/10.7554/eLife.60176
- Markunas, C. M. & Triemer, R. E. 2016. Evolutionary history of the enzymes involved in the Calvin–Benson cycle in euglenids. *J. Eukaryot. Microbiol.* 63: 326–339. doi.org/10.1111/jeu.12282
- Maruyama, M., Kagamoto, T., Matsumoto, Y. *et al.* 2023. Horizontally acquired nitrate reductase realized kleptoplastic photoautotrophy of *Rapaza viridis*. *Plant Cell Physiol.* 64: 1082–1090. doi.org/10.1093/pcp/pcad044
- 丸山萌・柏山祐一郎 2023. ユーグレノイド鞭毛虫 *Rapaza viridis* による盗葉緑体現象. *月刊細胞* 55: 375–378.
- Maruyama, S., Suzaki, T., Weber, A. P., Archibald, J. M. & Nozaki, H. 2011. Eukaryote-to-eukaryote gene transfer gives rise to genome mosaicism in euglenids. *BMC Evol. Biol.* 11: 105. doi.org/10.1186/1471-2148-11-105
- McCutcheon, J. & Moran, N. 2012. Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 13–26. doi.org/10.1038/nrmicro2670
- Morden, C. W., Delwiche, C. E., Kuhse, M. & Palmer, J. D. 1992. Gene phylogenies and the endosymbiotic origin of plastids. *Biosystems* 28: 75–90. doi.org/10.1016/0303-2647(92)90010-V
- Nakayama, T., Kamikawa, R., Tanifuji, G. *et al.* 2014. Complete genome of a nonphotosynthetic cyanobacterium in a diatom reveals recent adaptations to an intracellular lifestyle. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 11407–11412. doi.org/10.1073/pnas.1405222111
- Nakazawa, M., Andoh, H., Tsujii, H. *et al.* 2023. Stable nuclear transformation methods for *Euglena gracilis* and its application to a related Euglenida. *Algal Res.* 75: 103292. doi.org/10.1016/j.algal.2023.103292
- Obata, D., Takabayashi, A., Tanaka, R., Tanaka, A. & Ito, H. 2019. Horizontal transfer of promiscuous activity from nonphotosynthetic bacteria contributed to evolution of chlorophyll degradation pathway. *Mol. Biol. Evol.* 36: 2830–2841. doi.org/10.1093/molbev/msz193
- Okamoto, N. & Inouye, I. 2006. *Hatena arenicola* gen. et sp. nov., a katablepharid undergoing probable plastid acquisition. *Protist* 157: 401–419. doi.org/10.1016/j.protis.2006.05.011
- Onuma, R., Hirooka, S., Kanesaki, Y., Fujiwara, T., Yoshikawa, H. & Miyagishima, S. 2020. Changes in the transcriptome, ploidy, and optimal light intensity of a cryptomonad upon integration into a kleptoplastic dinoflagellate. *ISME J.* 14: 2407–2423. doi.org/10.1038/s41396-020-0693-4
- Onuma, R. & Horiguchi, T. 2013. Morphological transition in kleptochloroplasts after ingestion in the dinoflagellates *Amphidinium poecilochroum* and *Gymnodinium aeruginosum* (Dinophyceae). *Protist* 164: 622–642. doi.org/10.1016/j.protis.2013.06.003
- Onuma, R. & Horiguchi, T. 2015. Kleptochloroplast enlargement, karyoklept and the distribution of the cryptomonad nucleus in *Nusuttodinium* (= *Gymnodinium*) *aeruginosum* (Dinophyceae). *Protist* 166: 177–195. doi.org/10.1016/j.protis.2015.01.004
- Pierce, S. K. & Curtis, N. E. 2012. Cell biology of the chloroplast symbiosis in sacoglossan sea slugs. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 293: 123–148. doi.org/10.1016/B978-0-12-394304-0.00009-9
- Pombert, J.-F., Selman, M., Burki, F. *et al.* 2012. Gain and loss of multiple functionally related, horizontally transferred genes in the reduced genomes of two microsporidian parasites. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 12638–12643. doi.org/10.1073/pnas.1205020109
- Ponce-Toledo, R. I., Deschamps, P., López-García, P., Zivanovic, Y., Benzerara, K. & Moreira, D. 2017. An early-branching freshwater cyanobacterium at the origin of plastids. *Curr. Biol.* 27: 386–391. doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.056

- Sarai, C., Tanifuji, G., Nakayama, T. *et al.* 2020. Dinoflagellates with relic endosymbiont nuclei as models for elucidating organellogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117: 5364–5375. doi.org/10.1073/pnas.1911884117
- Shimoda, Y., Ito, H. & Tanaka, A. 2016. Arabidopsis STAY-GREEN, Mendel's green cotyledon gene, encodes magnesium-dechelatase. *The Plant Cell* 28: 2147–2160. doi.org/10.1105/tpc.16.00428
- Shinzato, C., Shoguchi, E., Kawashima, T. *et al.* 2011. Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change. *Nature* 476: 320–323. doi.org/10.1038/nature10249
- Takahashi, F., Okabe, Y., Nakada, T. *et al.* 2007. Origins of the secondary plastids of Euglenophyta and Chlorarachniophyta as revealed by an analysis of the plastid-targeting, nuclear-encoded gene *psbO*. *J. Phycol.* 43: 1302–1309. doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00411.x
- Takano, Y., Yamaguchi, H., Inouye, I., Moestrup, Ø. & Horiguchi, T. 2014. Phylogeny of five species of *Nusuttodinium* gen. nov. (Dinophyceae), a genus of unarmoured kleptoplastidic dinoflagellates. *Protist* 165: 759–778. doi.org/10.1016/j.protis.2014.09.001
- Tanifuji, G., Cenci, U., Moog, D. *et al.* 2017. Genome sequencing reveals metabolic and cellular interdependence in an amoeba-kinetoplastid symbiosis. *Sci. Rep.* 7: 11688. doi.org/10.1038/s41598-017-11866-x
- Timmis, J., Ayliffe, M., Huang, C. & Martin, W. 2004. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat. Rev. Genet.* 5: 123–135. doi.org/10.1038/nrg1271
- Tsuchiya, M., Miyawaki, S., Oguri, K. *et al.* 2020. Acquisition, maintenance, and ecological roles of kleptoplasts in *Planoglabratella opercularis* (Foraminifera, Rhizaria). *Front. Mar. Sci.* 7: 585. doi.org/10.3389/fmars.2020.00585
- Turmel, M., Gagnon, M. C., O'Kelly, C. J., Otis, C. & Lemieux, C. 2009. The chloroplast genomes of the green algae *Pyramimonas*, *Monomastix*, and *Pycnococcus* shed new light on the evolutionary history of prasinophytes and the origin of the secondary chloroplasts of euglenids. *Mol. Biol. Evol.* 26: 631–648. doi.org/10.1093/molbev/msn285
- Yamada, N., Bolton, J. J., Trobajo, R. *et al.* 2019. Discovery of a kleptoplastic 'dinotom' dinoflagellate and the unique nuclear dynamics of converting kleptoplasts to permanent plastids. *Sci. Rep.* 9: 10474. doi.org/10.1038/s41598-019-46852-y
- Yamaguchi, A., Yubuki, N. & Leander, B. S. 2012. Morphostasis in a novel eukaryote illuminates the evolutionary transition from phagotrophy to phototrophy: description of *Rapaza viridis* n. gen. et sp. (Euglenozoa, Euglenida). *BMC Evol. Biol.* 12: 29. doi.org/10.1186/1471-2148-12-29
- Yamaguchi, H., Nakayama, T., Hongoh, Y., Kawachi, M., & Inouye, I. 2014. Molecular diversity of endosymbiotic *Nephroselmis* (Nephroselmidophyceae) in *Hatena arenicola* (Katablepharidophycota). *J. Plant Res.* 127: 241–247. doi.org/10.1007/s10265-013-0591-1

(2024年1月10日受付, 2024年1月23日受理)

通信担当編集委員: 大沼 亮