

中山卓郎:新たなる一次葉緑体の獲得 -Paulinella chromatophora に見られる共生関係 -

現在認識されている全ての葉緑体が、たった一度の一次共生に由来するとする説は既に広く受け入れられている。しかし、その重要性にもかかわらず一次共生の進化的機構の詳細については不明な点が数多く残されたままである。このような状況において、その謎を解き明かす鍵となるかもしれない原生生物が、近年にわかに脚光を浴びている。本稿では、その生物 Paulinella chromatophoraに関する研究の変遷と、最近の進展について紹介する。

"シアネレ"と Paulinella chromatophora

一次植物である灰色植物の葉緑体は、色調や形態が他の葉緑体と比べてシアノバクテリアによく似ている。その特徴から、かつては細胞内共生シアノバクテリアであると考えられ、Pascher (1929) はこれを葉緑体と区別して"シアネレ (cyanelle)"と名づけた。その後、灰色植物のシアネレは、宿主細胞外では生育できないことや、ゲノムが他の葉緑体と変わらない大きさに縮小していること (Herdman & Stanier 1977)、また、他の葉緑体と同じ起源を持つこと (Helmchen et al. 1995) などが解明され、灰色植物のシアネレは細胞内共生シアノバクテリアではなく、"葉緑体"であることが明らかとなった(中山 1999)。

Pascher (1929) によってシアネレと名づけられた構造を 持つ生物は灰色植物以外にも存在し、その一つが Paulinella chromatophora (Lauterborn 1895, 図1) である。Paulinella chromatophora はリザリア下界,ケルコゾア門に分類される体 長15~30 μ m程の単細胞生物で、主に淡水に生息する。本種 は、珪酸質の鱗片で構成された卵型の殻を持つアメーバ状の生 物であり、殻の小さな開口部から糸状仮足を伸ばして移動や壁着 を行う。そして本種の最大の特徴は、細胞の中にシアノバクテリ ア様の構造を2つ持つことである。Pascherは、この青緑色の構 造を細胞内共生シアノバクテリアであると考え、灰色植物と同様 にシアネレの名を与えた。その後、Kies (1974) による透過型 電子顕微鏡観察で明らかとなった P. chromatophora の微細構造 の情報は、問題の有色構造が細胞内共生シアノバクテリアである とした Pascher の考えを肯定するようなものであった。まず、第 一に P. chromatophora のシアネレと宿主細胞との間に、ペプチ ドグリカン層と思われる壁様構造が見られることである。灰色植 物の葉緑体も薄いペプチドグリカン層を有することで知られてい るが、本種のシアネレは自由生活性のシアノバクテリアに見られ る細胞壁に近い、さらにはっきりとした構造をもっていた。次に、 シアネレ内部に見られるチラコイド膜の配置の様子、また分裂の 様式は、それまでに知られていた葉緑体のものとは異なり、むし ろ現存するシアノバクテリア、Synechococcus 属によく似ている ことが示唆された。これらのデータを基に、Kies (1974) はP. *chromatophora* のシアネレは細胞内共生した *Synechococcus* であると結論付けている。

しかしながら、P. chromatophora のシアネレは、上述のようなシアノバクテリア的な特徴を色濃く持つ反面、興味深いことに、下記に挙げるような葉緑体的な特徴も持ち合わせることが知られている。1)宿主細胞外では生存できない(Kies & Kremer 1979)、2)宿主細胞内の2つのシアネレは、宿主の分裂に伴って娘細胞に1つずつ分配され、その後それぞれの娘細胞内で2つに分裂する(Hoogenraad & de Groot 1927)。これらは、シアネレが宿主に依存し、制御を受けていることを示唆しており、他の細胞内共生シアノバクテリアにはみられない特徴である。加えてP. chromatophora の摂食行動、および細胞内の食胞は確認されたことがなく(Kies 1974)、宿主がシアネレの光合成に完全依存している可能性も挙げられていた。

このように過去の研究によって、本種のシアネレは共生シアノバクテリア的、葉緑体的特徴を両方併せ持つことが明らかとなった。この状況は灰色植物の葉緑体を思わせるものであるが、しかし、灰色植物において行われたような分子生物学的な研究は長年行われず、P. chromatophora のシアネレに関する研究は近年まで足踏みをすることとなる。その主な原因は、本種の培養が困難であり、利用可能な培養株が全く存在しないことであった。

シアネレの起源とゲノム配列の解読

P. chromatophora のシアネレに関する研究の膠着状態を破っ

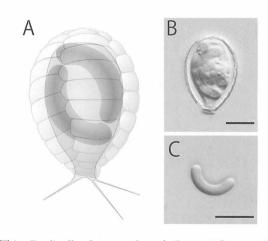


図 1 Paulinella chromatophora とそのシアネレ A: Paulinella chromatophora の模式図。細胞の中に 2 つあるソーセージ型の構造がシアネレ。B: P. chromatophora の光学顕微鏡写真(scale bar: $10~\mu$ m)。C: 宿主細胞から単離したシアネレ(scale bar: $10~\mu$ m)。シアネレは宿主細胞外では生存できない。

たのは、Marin et al. (2005) による報告であった。この研究において、世界初となる P. chromatophora の培養株の存在とともに、そのシアネレの 16S rDNA 配列が明かされた。Marin et al. (2005) は、この配列を用いた系統解析を行い、その結果本種のシアネレは既知の葉緑体とはまったく異なる、シアノバクテリアの Synechococcus 属および Prochlorococcus 属によって構成される系統に属することが強く示唆された。つまり、P. chromatophora のシアネレは既知の葉緑体とは異なる起源を持ち、上述のようなシアネレの葉緑体的特徴は、P. chromatophora が独立に獲得したものであることを意味している。この結果は、これまで報告のなかった"新たなる一次共生"の証拠になり得るとして注目を集めた。

果たして、P. chromatophora のシアネレは、どの程度オルガ ネラ化しているのだろうか。Marin et al. (2005) によって公開さ れた P. chromatophora の培養株は、その後の研究に拍車をかけ、 翌年にはシアネレゲノムの一部 (Yoon et al. 2006), そしてその 一年半後にはシアネレの完全ゲノム配列が解読された (Nowack et al. 2008)。既知の葉緑体のゲノムは一般的な自由生活性シアノ バクテリアのゲノムと比較すると10分の1程度まで縮小してお り、またその遺伝子の大半を失っていることが知られている。そ れに対して、明らかとなった P. chromatophora のシアネレのゲ ノムサイズはおよそ 1 Mbp であった。シアネレにごく近縁なシア ノバクテリア Synechococcus sp. WH5701 のゲノムサイズが約3 Mbp であることを踏まえると、シアネレのゲノムは大きく縮小し ていることがうかがえる。事実、タンパク質コード遺伝子の数を WH5701 のゲノムと比較すると、WH5701 が 3346 個保有する のに対し、シアネレは867個のみを持つことが予想された。では、 どのような遺伝子が失われたのであろうか。WH5701 との比較の 結果、失われた遺伝子の多くは機能不明の遺伝子であることが判 明した。Nowack et al. (2008) は、これらの遺伝子が環境の変 動に応答するものであると推測し、細胞の中という安定した環境 下では不要となった可能性を論じている。さらに興味深いのは必 須の遺伝子の消失である。シアネレゲノムの中には5つのアミノ 酸の合成経路、および TCA 回路のすべての酵素の遺伝子が欠失 していた。さらに、他の複数のアミノ酸合成経路、およびプリン ヌクレオチド合成経路が不完全であり、シアネレ単体ではこれら の合成が不可能であることが示唆された。以上のような遺伝子の 欠失は、P. chromatophora のシアネレが代謝的に宿主に依存し ており、自由生活を営むことが不可能であることを表している。

遺伝子の消失、それに伴うゲノムの縮小と代謝経路の欠如は、既知の葉緑体と共通している特徴といえる。しかしながら、その程度には大きな隔たりがあるようだ。一般的な葉緑体のゲノムは 100~200 kbp 程度まで縮小しているが、これと比較すると 1 Mbp という P. chromatophora のシアネレのゲノムサイズはかなり大きい。また、既知の葉緑体においては多くが宿主核にコードされている光合成関連の遺伝子も、少数の例外を除いてほぼ全てがシアネレゲノムにコードされていた。これらの特徴はシアネレの宿主への統合が既知の葉緑体ほどは進んでいないことを示している。また、P. chromatophora のシアネレゲノム上には、消えゆく遺伝子の名残であると思われる偽遺伝子がいくつか確認されたが、その存在はシアネレゲノムの縮小が今現在も進行中であることを示しているのだろう。総じて、シアネレゲノムの情報からPaulinella chromatophora のシアネレはオルガネラ化の比較的初期の段階にあることが推察される。

遺伝子伝播の証拠

細胞内共生者とオルガネラとの境界線はどこか、という疑問に 関しては様々な意見があり,近年 Paulinella chromatophora の シアネレを巡ってもいくつか議論が行われているが(Theissen & Martin 2006, Bhattacharya & Archibald 2006), そこにおいて多 く取り上げられるのは共生者遺伝子の宿主核への伝播である。周 知の通り、既知の葉緑体では大半の遺伝子が宿主核に移動し、葉 緑体は細胞質からのタンパク質供給に依存している。この遺伝子 伝播によって共生者と宿主細胞は代謝のみならず遺伝的にも統 合されるため、上述の境界線の議論を別にしても、このイベント がオルガネラ化における重要な里程標となることは明らかである。 ゲノムの縮小、遺伝子の欠失が確認された P. chromatophora の シアネレにおいても宿主核への遺伝子の転移があるか否かは、世 界的な関心を集めていた。そのような状況において、著者らの研 究により P. chromatophora において核へ伝播したシアネレ遺伝 子の存在が明らかとなった (Nakayama & Ishida 2009)。この研 究において著者らは P. chromatophora の EST 解析を行い、核 からの転写産物の中からシアノバクテリアの遺伝子に類似する配 列を網羅的に探索した。その結果、シアノバクテリアの psaE(光 化学系 I サブユニット IV 遺伝子)に非常に類似した配列が発見 された (図2)。興味深いことに、この psaE はシアネレゲノムに おいて失われていた数少ない光合成関連遺伝子の一つである。残 念ながら、この遺伝子がコードするサブユニットの詳細な役割は

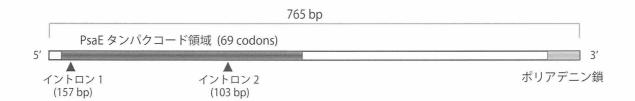


図 2 Paulinella chromatophora において発見された psaE mRNA の概略図 矢頭はゲノム上の配列におけるイントロンの位置を示す。Nakayama & Ishida(2009)をもとに作図。

未だ明らかではないが、psaE がこれまで調べられたすべてのシ アノバクテリア,およびほとんどの光合成真核生物において保持 されていることを考慮すると、未知の重要な機能を担っている可 能性もある。P. chromatophora において発見された psaE の配列 は,成熟な PsaE タンパク質の全長をコードしており,そのタン パク質配列にはシアネレに近縁なシアノバクテリアに見られる特 異的な挿入配列が確認できた。このことから、この psaE はシア ネレから伝播したものであると考えられる。このpsaEをさらに調 査するため、この転写産物に対応するゲノム配列の取得を行った ところ、驚くべきことにその配列には2つのイントロンが含まれて いた (図 2)。 さらにこれらのイントロンは、末端に GT-AG のモ チーフ配列を持つスプライセオソーマルイントロンであったこと から、この配列は真核生物である宿主核ゲノムに間違いなく存在 していると考えられる。これらの結果は、少なくとも1つの光化学 系遺伝子がシアネレから核へ伝播し発現していることを強く示す ものであり、シアネレが遺伝的にも宿主細胞に統合していること を示す重要なものと言えるだろう。

psaE はシアネレゲノムには見られず核ゲノムのみに存在し、イントロンの挿入のような改編を受けた後でも、コードされるアミノ酸配列はシアノバクテリアの PsaE タンパク質のものと高い相同性を保っていた。このことを踏まえると、この遺伝子の産物である PsaE タンパク質は依然機能的であり、シアネレに輸送されている可能性は高いと著者らは考えている。今回予測された P. chromatophora の PsaE タンパク質には、一次植物の核コード葉緑体タンパク質に見られるような輸送配列は確認できず、残念ながらその輸送系を推定するには至らなかった。本種のシアネレが既知の葉緑体とは全く独立に獲得されたことを考慮すると、独特の輸送機構を確立していることも考えられる。

Paulinella chromatophora の進化

P. chromatophora はどのようにシアネレを獲得したのであろ うか。この疑問にヒントを与えてくれるのが、本種と同属として 記載されている Paulinella ovalis の存在である。P. ovalis は海 産の有殻アメーバで、体長 4.5 µm 程度と P. chromatophora の 約5分の1程度の大きさしかない。しかし、その殻における鱗片 の配置は P. chromatophora とほぼ同様であり、更にその微細構 造もシアネレの有無を除けば極めて類似している(Johnson et al. 1988)。P. ovalis の DNA 配列は全く報告されておらず、分子系 統解析は行うことができないが、P. chromatophora とごく近縁な 生物であることは間違いないと考えられる。この種は従属栄養性 であり、細胞内にシアネレの存在は確認されていない。過去に天 然の P. ovalis を用いた透過型電子顕微鏡観察が行われているが、 その観察写真では食胞にシアノバクテリアが餌として含まれてい る像が確認できる (Johnson et al. 1988)。このことを踏まえると、 P. ovalis は、P. chromatophora において現在見られるシアネレ が確立される以前の祖先的な姿を体現しているとも考えられる。P. ovalis が、かつてシアネレを保持しており、二次的に失った可能 性も拭えないが、いずれにしても P. ovalis は P. chromatophora における共生関係を考察するにあたって良い対象となるだろう。

今後, これら2種の比較研究の進展が期待される

これまでの研究において、Paulinella chromatophora が既知の葉緑体とは全く独立に一次共生を起こしている特異な生物であることが示された。この知見は、一次共生が過去に一度きり起きたとする説の唯一の例外として注目されるが、同時に一次共生機構を研究する上で格好の材料が出現したことを意味する。一次共生に関する先行研究は、現在知られている一次植物の分子的および形態的情報から、過去にどのようなことが起きたかを推測するという間接的なアプローチのものしかなかった。それに対してP. chromatophora はリアルタイムで一次共生を起しつつある生物である。この生物をさらに研究することによって得られる情報は、一次共生を通じた葉緑体獲得機構の推察をするうえで、初めての直接的で重要なものになると考えられる。

引用文献

- Bhattacharya, D. & Archibald, J. M. 2006. Response to Theissen and Martin. Curr. Biol. 16: R1017-R1018.
- Helmchen, T. A., Bhattacharya, D. & Melkonian, M. 1995. Analyses of ribosomal RNA sequences from glaucocystophyte cyanelles provide new insights into the evolutionary relationships of plastids. J. Mol. Evol. 41: 203-210.
- Hoogenraad, H. R. & de Groot, A. A. 1927. Rhizopoden en Heliozoë uit het zoetwater van Nederland. Tijdschr. Nederl. Dierkund. Vereen. (2) 20: 1-18.
- Herdman, M. & Stanier, R. 1977. The cyanelle: Chloroplast or endosymbiotic prokaryote? FEMS Letters 1:7-12.
- Johnson, P. W., Hargraves, P. E. & McN. Sieburth, J. 1988. Ultrastructure and Ecology of *Calycomonas ovalis* Wulff, 1919, (Chrysophyceae) and Its Redescription as a Testate Rhizopod, *Paulinella ovalis* N. Comb. (Filosea: Euglyphina). J. Protozool. 35:618-626.
- Kies, L. 1974. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an *Paulinella chromatophora* Lauterborn, einer Thekamöbe mit blaugrünen Endosymbionten (Cyanellen). Protoplasma 80: 69-89.
- Kies, L. & Kremer, B. P. 1979. Function of cyanelles in the Tecamoeba *Paulinella chromatophora*. Naturwissenschaften 66: 578-579.
- Lauterborn, R. 1895. Protozoenstudien II. *Paulinella chromatophora* nov. gen., nov. spec., ein beschalter Rhizopode des Süßwassers mit blaugrünen chromatophorenartigen Einschlüssen. Z. Wiss. Zool. 59: 537-544.
- Marin, B., Nowack, E. C. & Melkonian, M. 2005. A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis. Protist. 156: 425-432.
- 中山剛 1999. チアネルと葉緑体の起源 . バイオディバーシティ・シリーズ 藻類の 多様性と系統 . pp.175-176. 裳華房 . 東京 .
- Nakayama, T. & Ishida, K. 2009. Another acquisition of a primary photosynthetic organelle is underway in *Paulinella chromatophora*. Curr. Biol. 19: R284-R285.
- Nowack, E. C., Melkonian, M. & Glockner, G. 2008. Chromatophore genome sequence of *Paulinella* sheds light on acquisition of photosynthesis by eukaryotes. Curr. Biol. 18: 410–418.
- Pascher, A. 1929. Studien über Symniosen. I. Ueber einige Symbiosen von Blaualgen in Einzellern. Pringsh. Jahrb. wiss. Bot. 71: 386-462.
- Theissen, U. & Martin, W. 2006. The difference between organelles and endosymbionts. Curr. Biol. 16: R1016-R1017.
- Yoon, H. S., Reyes-Prieto, A., Melkonian, M. & Bhattacharya, D. 2006. Minimal plastid genome evolution in the *Paulinella* endosymbiont. Curr. Biol. 16: R670-672.

(筑波大学)