

藻類学最前線

石川奏太・松本拓也： *Chromera velia* 及び CCMP3155 株
葉緑体ゲノム解析から推測するアルベオラータ葉緑体の進化

寄生性真核生物アピコンプレクサ類は渦鞭毛藻類の姉妹群であり、従属栄養性である繊毛虫類とともにアルベオラータと呼ばれる生物群を形成する。アピコンプレクサ類は一部の例外を除き、その細胞内に二次共生由来葉緑体が退化し光合成能を失ったアピコプラストを持つ (McFadden *et al.* 1996)。アピコプラストの起源に関しては緑藻起源説と紅藻起源説が提唱され、どちらの仮説が尤もらしいかはごく最近まで決着がつかなかった (Funes *et al.* 2004)。しかし、Moore らはアピコンプレクサ類に近縁かつ紅藻類に由来する二次共生葉緑体をもつ *Chromera velia* を発見し、*C. velia* 葉緑体遺伝子 (*psbA* および小サブユニットリボソーム RNA) に関する一連の解析から、アピコプラストは紅藻起源であることを決定的にした (Moore *et al.* 2008, 神川 2008)。Nature 誌に掲載された *C. velia* の記載論文に引き続き、Janouškovec らは *C. velia* とその近縁種である光合成性未記載種 CCMP3155 株の葉緑体ゲノムを解析し、その配列データの解析結果を元にアルベオラータにおける葉緑体進化に関する議論を行った (Janouškovec *et al.* 2010)。本稿では、アメリカ科学アカデミー紀要に掲載された Janouškovec らの論文の議論を、我々の解釈とともに解説する。

アルベオラータ内でアピコンプレクサ類と渦鞭毛藻類は姉妹群を形成する。渦鞭毛藻類には光合成性・従属栄養性種が存在するが、光合成性渦鞭毛藻類の大多数は紅藻由来の二次葉緑体をもつ。従って、宿主細胞の系統で姉妹群となるアピコンプレクサ類と渦鞭毛藻類はともに紅藻由来の二次葉緑体をもつことが推察されるわけだが、アピコプラストと渦鞭毛藻類葉緑体がどんな系統関係にあるのかははっきりしない。困ったことに、光合成能力のないアピコプラストのゲノムには、リボソームタンパク質や RNA ポリメラーゼなどの転写および翻訳に関与する遺伝子はコードされているが光合成関連遺伝子が欠失している (Wilson *et al.* 1996, Cai *et al.* 2003)。その一方、渦鞭毛藻類葉緑体では光合成関連遺伝子はミニサークルゲノム上にコードされ、それ以外の遺伝子は核ゲノムに移行していると考えられている (Hackett *et al.* 2004)。従って、アピコプラストゲノムと渦鞭毛藻類葉緑体ゲノムに共通してコードされる遺伝子はほぼ皆無であり、分子系統解析により 2 種類の葉緑体の関係を直接比較することは困難である。ただしアピコンプレクサ類 (あるいは渦鞭毛藻類) の祖先的位置から分岐する *C. velia* や、本種に近縁な光合成生物の葉緑体関連情報 (例えばゲノム情報) はアピコプラストと渦鞭毛藻類葉緑体の進化関係を推測する上でカギを握ると考えられてきた。そこで Janouškovec らは *C. velia* に加え CCMP3155 株葉緑体全ゲノムと核ゲノムの一

部を解説し、アルベオラータにおける葉緑体進化に迫った。CCMP3155 株は、*C. velia* 同様四重膜で包まれ、三重チラコイド葉緑体を持つが、その葉緑体色素組成は明らかではない。解読された核ゲノムの一部から得られた 8 遺伝子 7,137 座位を用いた分子系統解析では、*C. velia*、CCMP3155 株の順でアピコンプレクサ類の基部から分岐すると推測された (図 1)。*C. velia*、CCMP3155 株、アピコンプレクサ類から構成されるクレードの単系統性は高いサポート値で支持されたが、このクレード内部の解像度が不足しているため分岐順について核コード遺伝子解析から結論を出すことは難しい (図 1)。

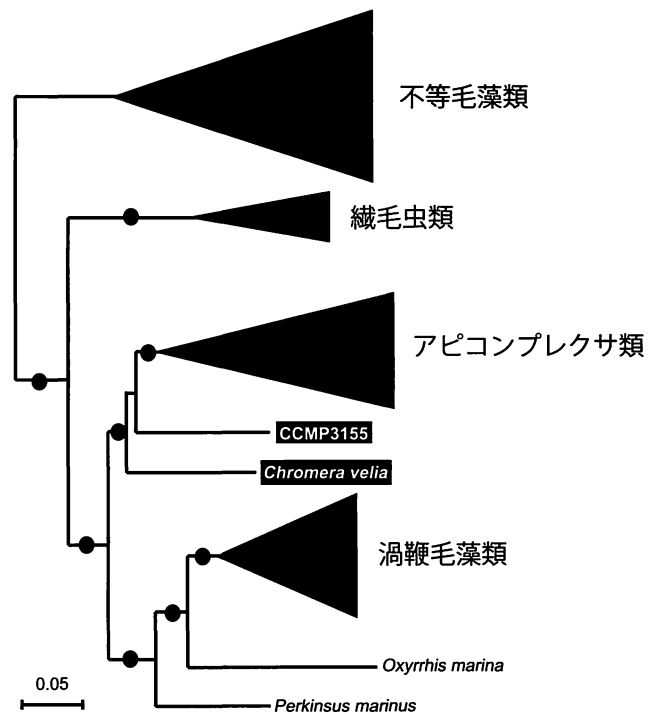


図 1 核コード 8 遺伝子アライメントに基づく *C. velia* 及び CCMP3155 株の系統的位置。19 真核生物種から HSP90, HSP70, α -tubulin, β -tubulin, biP, EF2, SSU rRNA 及び LSU rRNA をサンプリングし、最尤法とベイズ法を用いて系統解析を行った (核酸残基とアミノ酸残基を合計して 7,137 アライメント座位)。RAxML を用いた最尤法解析において、アミノ酸配列部分には LG + Γ + F モデルを、塩基配列部分には GTR + Γ モデルを用いた。ベイズ法には MrBayes を用い、アミノ酸配列部分には WAG + Γ + F モデルを、塩基配列部分には GTR + Γ モデルを用いた。*C. velia*、CCMP3155 株及びアピコンプレクサ類の単系統性は、ブートストラップ値 100%、事後確率 1.00 の支持を受けた。黒丸は、ブートストラップ値 100% および事後確率 1.00 でともに支持されたノードを示している。Janouškovec ら (2010) Fig. 1 を改訂。

さらに Janouškovec らは複数葉緑体遺伝子配列に基づいた分子系統解析も行った。*C. velia*/CCMP3155 株葉緑体と渦鞭毛藻類葉緑体の系統関係を調べる場合には、11 個の光合成関連葉緑体遺伝子から構成されるアライメント (合計 4,212 アミノ酸座位) を用意した。一方, *C. velia*/CCMP3155 株葉緑体とアピコプラストの系統関係を調べる場合には、主に翻訳・転写に関連する葉緑体遺伝子 23 個から構成されるアライメントを用意した (合計 4,438 アミノ酸座位)。2つのアライメントを解析した結果, *C. velia*/CCMP3155 株と渦鞭毛藻類との近縁性, *C. velia*/CCMP3155 株とアピコンプレクサ類との近縁性が、共に高いサポート値により支持された (図 2A & B)。Janouškovec らは自身の葉緑体遺伝子解析に対して総合的解釈を加えていないが、図 2 に示した 2つの系統樹を統合すると、渦鞭毛藻類葉緑体を外群として CCMP3155 株葉緑体が分岐したの

ち, *C. velia* 葉緑体とアピコプラストが枝分かれしたという関係が導き出せる (図 2C)。また, 2 種類のアライメントからの解析結果は、共通してアルベオラータ葉緑体 (アピコプラストあるいは渦鞭毛藻類葉緑体と *C. velia* + CCMP3155 株葉緑体) と不等毛植物類葉緑体との強い近縁性を示した。このアルベオラータ葉緑体と不等毛植物類葉緑体の近縁性は、Janouškovec らが行ったアルベオラータ葉緑体として CCMP3155 株葉緑体のみを使用した 34 遺伝子 (合計 7,599 アミノ酸座位) の解析でも強い支持を受けた (原論文 Fig. 5 参照)。この 34 遺伝子系統樹では、アルベオラータ (厳密には CCMP3155 株) + 不等毛植物類葉緑体クレードがハプト藻類、クリプト藻類および紅藻類葉緑体とグループ化し、その単系統性は高いサポート値で支持された。

分子系統解析とは独立に、Janouškovec らは渦鞭毛藻類葉緑体あるいはアピコプラスト特異的な「分子キャラクター」

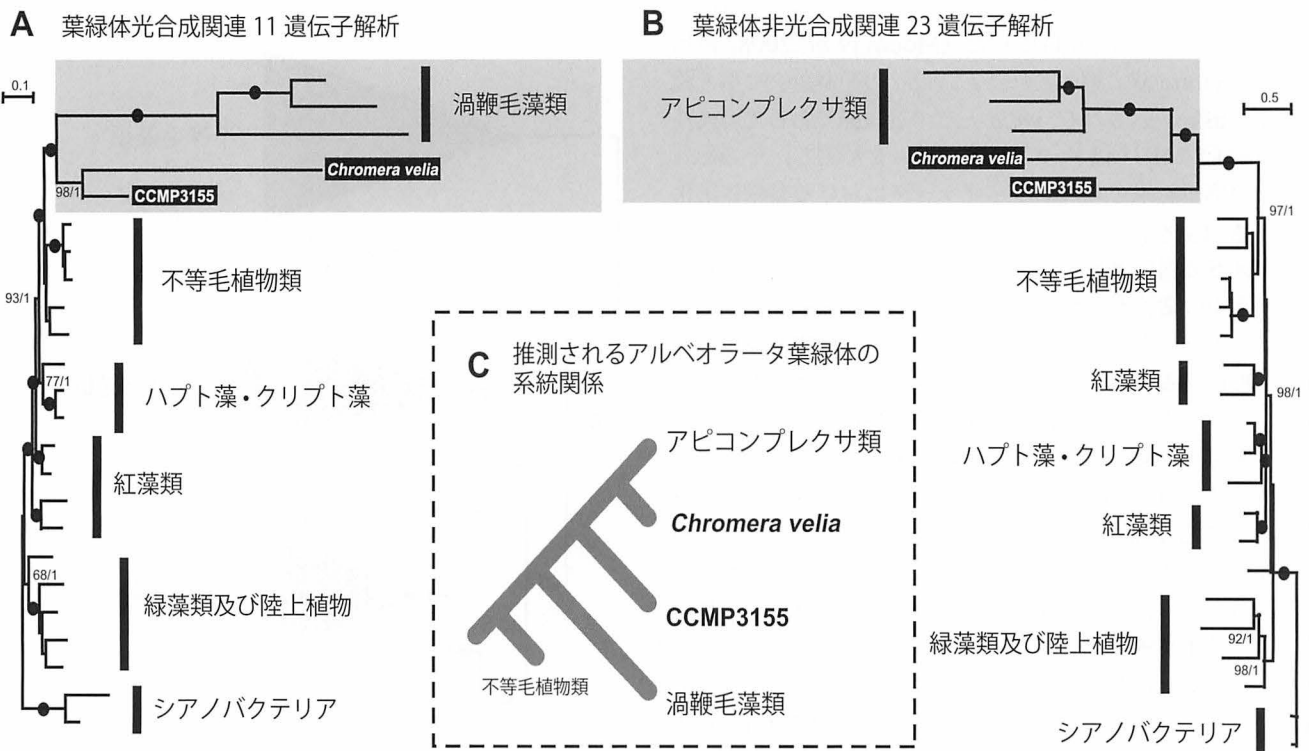


図 2 複数の葉緑体遺伝子に基づく連結解析によるアルベオラータ葉緑体の系統関係。(A) 渦鞭毛藻類を含む葉緑体光合成関連 11 遺伝子アライメントの解析。この解析に使用されたアライメントは、*atpA*, *atpB*, *petB*, *petD*, *psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbB*, *psbC*, *psbD* 及び *psbE* から構成された (合計 4,212 アミノ酸座位)。(B) アピコプラストを含む非光合成関連 23 遺伝子アライメントの解析。この解析に使用されたアライメントは、*clpC*, *rpl2*, *rpl4*, *rpl6*, *rpl11*, *rpl14*, *rpl16*, *rpl23*, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2*, *rps2*, *rps3*, *rps4*, *rps5*, *rps7*, *rps8*, *rps11*, *rps12*, *rps17*, *rps19*, *sufB* 及び *tufA* から構成された (合計 4,438 アミノ酸座位)。原論文では、ブートストラップ値は PhyML (CAT モデル使用) と RAxML (cpREV + Γ + F モデル使用) による最尤法で求めた。また、事後確率は MrBayes (cpREV + Γ + F モデル使用) と PhyloBayes (CAT モデル使用) によるベイズ法で求めた。ただし本図では RAxML によるブートストラップ値、MrBayes による事後確率のみを示した。黒丸は、ブートストラップ値 100% および事後確率 1.00 で支持されたノードを示している。(A) と (B) は Janouškovec ら (2010) Fig. S7A & B を改訂。(C) 推測されるアルベオラータ葉緑体の系統関係 (模式図)。渦鞭毛藻類葉緑体を含む 11 遺伝子解析の結果 (A) と、アピコプラストを含む 23 遺伝子解析の結果 (B) を統合し、アルベオラータ葉緑体の関係を推測した。この仮想的系統樹からアピコプラストを取り除くと、*C. velia* 及び CCMP3155 株葉緑体は姉妹群となる (図 1A に示した 11 遺伝子系統樹に対応)。一方、渦鞭毛藻類葉緑体を取り除くと、*C. velia* 及び CCMP3155 株葉緑体はアピコプラストの側系統となる (図 1B に示した 23 遺伝子系統樹に対応)。

が、*C. velia*, CCMP3155 株葉緑体でも共有されていることを明らかにした。一般の光合成真核生物葉緑体では葉緑体ゲノムにコードされた I 型ルビスコが使用されているが、渦鞭毛藻類葉緑体では I 型ルビスコを欠き、その代わりにプロテオバクテリアから水平伝播したと考えられる核ゲノムコードの II 型ルビスコが使用されている (Morse *et al.* 1995)。興味深いことに、核ゲノムコードの II 型ルビスコが *C. velia* 及び CCMP3155 株からも検出された (*C. velia* の II 型ルビスコタンパクについては、その N 末端に葉緑体への移行シグナルも確認された)。II 型ルビスコ配列に基づく分子系統解析では *C. velia*, CCMP3155 株は姉妹群となり、このクレードはさらに渦鞭毛藻類と互いに強い近縁性を示した。また、渦鞭毛藻類の葉緑体遺伝子では mRNA の 3' 末端にポリ U 付加が起こるが (Wang & Morse 2006)、同様のポリ U 付加は *C. velia* 葉緑体ゲノムにコードされる複数の光合成関連遺伝子の mRNA にも確認された。ただし、CCMP3155 株葉緑体遺伝子転写産物に対するポリ U の有無は今のところ不明である。

我々は、Janouškovec らが行った *C. velia* と CCMP3155 株葉緑体ゲノム構造の比較から得られた新たな知見は、3 つに絞られると考えている。第 1 点目は、CCMP3155 株葉緑体ゲノム上の遺伝子数は *C. velia* 葉緑体ゲノム上の遺伝子数より大きい、互いの遺伝子構成が比較的似ていることである。第 2 点目は、アピコプラストゲノムの遺伝子構成、渦鞭毛藻類ミニサークル (葉緑体) DNA の遺伝子構成は、どちらも *C. velia*/CCMP3155 株葉緑体ゲノムの遺伝子構成のサブセットであることである (注: 原論文 Fig. 2 を見ると、厳密にはアピコプラストコードの *rpl23*, *sufB*, *rps7* 遺伝子と渦鞭毛藻類ミニサークルコードの *psbI* 遺伝子は、*C. velia* 葉緑体ゲノム上には存在しないことが分かる。但し本文中には該当する記述なし)。第 3 点目は、リボソームタンパク遺伝子スーパーオペロンがアピコプラストと CCMP3155 株の葉緑体ゲノム、さらには紅藻由来二次葉緑体ゲノムの間で保存されていることである (注: Janouškovec らは *C. velia* 葉緑体ゲノム上にも該当するオペロン構造の痕跡があると議論しているが、その解釈は慎重に行うべきである)。Janouškovec らは葉緑体ゲノム構造の比較データと宿主系統の単系統性 (図 1) から、CCMP3155 株葉緑体に似た遺伝子リッチな祖先型葉緑体ゲノムから、光合成関連遺伝子の欠失を経て現在のアピコプラストゲノムに到達したと推測している。原論文では渦鞭毛藻類葉緑体遺伝子構成の進化についてはほとんど議論がないが、Janouškovec らはアルベオラータ葉緑体と不等毛植物類葉緑体が単一祖先から派生したと仮定している。従って、祖先渦鞭毛藻細胞の葉緑体ゲノムも、少なくとも CCMP3155 株の葉緑体と同程度に遺伝子リッチであったと予想できる。

以上のデータから、Janouškovec らはアルベオラータにおける葉緑体進化について以下の 3 つの結論を下した。

- 1) *C. velia* と CCMP3155 株はアピコンプレクサ類共通祖先に近縁な生物種であり、全くキャラクターの異なる葉緑体をもつアピコンプレクサ類と渦鞭毛藻類を繋ぐ生物種である。
- 2) *C. velia*, CCMP3155 株、渦鞭毛藻類の葉緑体およびアピコプラストは単一の紅藻由来二次葉緑体から進化してきた。この祖先アルベオラータ葉緑体は (少なくとも) 不等毛植物類葉緑体とも同一起源である。
- 3) アルベオラータ・不等毛植物類に含まれる従属栄養性メンバー (たとえば繊毛虫類) は二次的に葉緑体を喪失した。

我々は、結論 1 に関し大局的に同意するが、原論文 Fig. 4 に示されたアルベオラータクレード内の仮想的系統関係に関して、異なる仮説もあり得ると考えている。Janouškovec らは核コード遺伝子に基づく系統樹 (図 1: 渦鞭毛藻類の次に *C. velia* が分岐する) を基に、形態および分子キャラクターをマップしている。しかし、実際の核コード遺伝子解析の結果には、CCMP3155 株、*C. velia*、アピコンプレクサ類の分岐パターンについて解像度がなく明快な結論が出せない (図 1)。しかし、Janouškovec らはアルベオラータ内では葉緑体が垂直伝播していると考えているので、葉緑体遺伝子から推測した系統関係は宿主系統と同じはずである。CCMP3155 株、*C. velia* およびアピコンプレクサ類間の系統関係を葉緑体遺伝子に基づき推測すると、CCMP3155 株がもっとも祖先的位置を占めることになり、そのサポート値も高い (図 2B)。従って、原論文 Fig. 4 (本稿では図 1 に対応) で仮定されたアルベオラータ葉緑体の系統樹中の CCMP3155 株と *C. velia* の位置は入れ替わる可能性がある (図 2C)。ただし、原論文で提案されたキャラクター進化に関する仮説は、CCMP3155 株葉緑体におけるポリ U 付加の有無、*C. velia* 葉緑体ゲノムにスーパーオペロン構造の痕跡があると考えるのが妥当なのか、など曖昧さが残る。今のところ Janouškovec らが提案したアルベオラータにおけるキャラクター進化は一つの仮説に過ぎず、今後も幅広い仮説の検討が必要であろう。

結論 2 および 3 は、Janouškovec らが行った分子系統解析では頑健に裏付けされている。特に原論文では、結論 2 (単一起源説) と、対立する「連続三次共生」仮説—アピコンプレクサ類の祖先細胞と渦鞭毛藻類の祖先細胞が、独立に異なる不等毛植物類を細胞内共生藻として獲得し葉緑体化したとする仮説—との比較検討が行われた。今回の葉緑体遺伝子解析は不等毛植物類葉緑体を排除しアルベオラータ葉緑体の単系統性を強く支持しており (図 2A & 2B)、連続三次共生仮説に対して否定的な議論が行われている。しかし我々は、Janouškovec らが行った系統解析には、アピコプラストと渦鞭毛藻類葉緑体の起源に関する 2 つの対立仮説を検証する上で改善すべき点があると考えている。図 2A と 2B に示した系統解析では、不等毛植物類として珪藻類 3 種、ラフィド藻 1 種および黄緑藻 1 種しか含まれておらず、不等毛藻類の

多様性を十分にカバーしているとはいえない。逆に、原論文の Fig. 5 で用いられた 34 葉緑体遺伝子アライメントには比較的多様な不等毛植物類葉緑体が含まれているが、アルベオラータ葉緑体として CCMP3155 株葉緑体しか含まれていない。従ってアルベオラータ葉緑体の単系統性は、アルベオラータ葉緑体の多様性を保ちつつ、より多くの不等毛植物類の葉緑体ゲノムを含むアライメントを解析することで再検証されるべきである。

Janouškovec らが行った葉緑体遺伝子系統解析は、アルベオラータ葉緑体の単系統性の是非とともに、紅藻由来二次葉緑体が単一起源か否か、すなわちクロムアルベオラータ仮説 (Cavalier-Smith 1999) が仮定する葉緑体進化の是非も検証することが可能である。不思議なことに、紅藻葉緑体および紅藻由来二次葉緑体との関係は、原論文中でそれほど議論されていない。今後この問題を厳密に検証するためには、原論文 Fig. 5 で使用された 34 葉緑体遺伝子アライメントに、より多様な緑藻類および紅藻類の葉緑体ゲノムデータを加えて解析する必要がある。このデータセットには、アルベオラータ葉緑体として少なくとも CCMP3155 株葉緑体を含むべきであるが、他の葉緑体遺伝子配列に比べ CCMP3155 株葉緑体遺伝子配列の進化速度は上昇している。Janouškovec らはアルベオラータ葉緑体の初期進化から葉緑体ゲノムの縮小が始まっていたと予想しているが、このゲノム縮小圧とそこにコードされる配列の進化速度の間に何らかの関連があるのかもしれない。どのような原因であれ、今後 CCMP3155 株や *C. velia* を含む大規模な葉緑体遺伝子解析を行う際には、進化速度の極端な上昇に起因するロングブランチャートラクション (Philippe & Germot 2000) などのアーティファクトに対する十分な配慮が必要であろう。

本稿では、Janouškovec らの行った系統解析や結果の解釈などに対し、いくつかの懸念があることを指摘した。しかし、*C. velia* 及び CCMP3155 株からの葉緑体ゲノム及び葉緑体関連データは、アルベオラータ葉緑体の進化、さらには細胞内共生に駆動された真核生物における光合成進化を理解する上で大きな役割を果たしたことは疑いようがない。今後も、真核生物の進化に対し、CCMP3155 株の形態データや 2 種の生物の核ゲノムデータなどがどのような貢献をするか目が離せない。

引用文献

- Cai, X., Fuller, A. L., McDougald, L. R. & Zhu, G. 2003. Apicoplast genome of the coccidian *Eimeria tenella*. *Gene* 321: 39-46.
- Cavalier-Smith, T. 1999. Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: Euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryotic family tree. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46: 347-366.
- Funes, S., Reyes-Prieto, A., Perez-Martinez, X. & Gonzalez-Halphen, D. 2004. On the evolutionary origins of apicoplasts: revisiting the rhodophyte vs. chlorophyte controversy. *Microbes Infect.* 6: 305-311.
- Hackett, J. D., Yoon, H. S., Soares, M. B., Bonaldo, M. F., Casavant, T. L., Scheetz, T. E., Nosenko, T. & Bhattacharya, D. 2004. Migration of the plastid genome to the nucleus in a peridinin dinoflagellate. *Curr. Biol.* 14: 213-218.
- Janouškovec, J., Horak, A., Obornik, M., Lukes, J. & Keeling, P. J. 2010. A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 10949-10954.
- 神川龍馬 2008. アピコンプレクサ類のアピコプラストと渦鞭毛藻類の色素体のミッシングリンク - 色を継いだ寄生虫の親戚 -. *藻類* 56: 119-121.
- McFadden, G. I., Reith, M. E., Munholland, J. & Lang-Unnasch, N. 1996. Plastid in human parasites. *Nature* 381: 482.
- Moore, R. B., Obornik, M., Janouškovec, J., Chrudimsky, T., Vancova, M., Green, D. H., Wright, S. W., Davies, N. W., Bolch, C. J., Heimann, K., Slapeta, J., Hoegh-Guldberg, O., Logsdon, J. M. & Carter, D. A. 2008. A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature* 451: 959-963.
- Morse, D., Salois, P., Markovic, P. & Hastings, J. W. 1995. A nuclear-encoded form II RuBisCO in dinoflagellates. *Science* 268: 1622-1624.
- Philippe, H. & Germot, A. 2000. Phylogeny of eukaryotes based on ribosomal RNA: long-branch attraction and models of sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 17: 830-834.
- Wang, Y. & Morse, D. 2006. Rampant polyuridylation of plastid gene transcripts in the dinoflagellate *Lingulodinium*. *Nucleic Acids Res.* 34: 613-619.
- Wilson, R. J., Denny, P. W., Preiser, P. R., Rangachari, K., Roberts, K., Roy, A., Whyte, A., Strath, M., Moore, D. J., Moore, P. W. & Williamson, D. H. 1996. Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.* 261: 155-172.

(筑波大学大学院・生命環境)