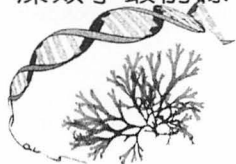


藻類学最前線



松崎素道：貝類寄生虫パーキンサスの生物学

パーキンサス (Genus *Perkinsus*) はカキに大量斃死を引き起こす病原体として 1950 年に記載され、これまで主として水産学上の要請から研究されてきた生物である。カキに寄生する *Perkinsus marinus*, アワビやアサリに寄生する *P. olseni* など 7 種が記載されているほか、世界各地の様々な二枚貝から未同定の種が報告されている。発見当初は原始的な真菌だと考えられていたが、現在では渦鞭毛藻に近縁な原生生物とされている。そこで本稿では渦鞭毛藻との近縁性に着目し、最新の知見を交え基礎生物学の観点からパーキンサス類を紹介したい。なお貝類病原体としてのパーキンサスについては良永 (2007) を参照いただきたい。

生態

パーキンサスの生活環は栄養体 (trophozoite) と遊走子 (zoospore) から構成されている (図 1)。栄養体はほぼ球形で直径 10 μm に達し、その大部分を大きな液胞が占めている。貝の体内では栄養体として分裂増殖しており、細胞壁の内側で数

回の分裂を繰り返して房状の細胞集団が形成されるが、いずれは分離して個々の栄養体に戻る。血リンパ球の貪食作用に対して抵抗性があり、逆にこれを利用して様々な組織へと感染を拡大する。一方、宿主の死亡などの理由で嫌気的狀態に置かれると、栄養体は休眠孢子 (hypnospore) と呼ばれる直径 50 μm ほどの巨大な細胞へと分化する。休眠孢子は海水にさらされると放出管 (discharge tube) を伸ばした遊走子嚢 (zoosporangia) となり、非対称な 2 本の鞭毛を持った遊走子を内部に多数形成する。遊走子は 5 μm 程度で放出管より海水中に放出され、これが新たな宿主へ感染すると考えられている。核相や有性生殖に関する知見は得られていない。

系統的位置

パーキンサスはアピコンプレクサ類と渦鞭毛藻との分岐点近傍に位置づけられており、なかでも渦鞭毛藻との近縁性が指摘されてきた (図 2)。パーキンサスと近縁な生物として、渦鞭毛藻に寄生する *Parvilucifera* が記載されており、これらを含めてパーキンサス綱 (Class Perkinsea) またはパーキンソゾア門 (Phylum Perkinsozoa) に所属させる。さらには海水や淡水のプランクトンを対象とした環境 DNA から、パーキンサス綱に所属する生物由来と思われる配列断片が数多くシーケンスされている (Bråte *et al.* 2010)。これまで記載された生物がすべて寄生性であったことから、こうした配列断片も寄生性生物に由来すると考えられている。熱水活動域の環境 DNA 中からも見出されており、その生物としての実体や熱水生態系における位置づけを明らかにすることは極めて興味深い課題といえるだろう。

パーキンサス綱に次いで祖先的とされるのがハダカフタヒゲムシ *Oxyrrhis marina* で、これは汽水域に生息する従属栄養性のプランクトンである。次いで寄生性のシンディニウム類が位置しており、これに近縁な生物由来と思われる環境 DNA 配列も海洋を中心に非常に多く報告されている。したがってハダカフタヒゲムシを除けば、渦鞭毛藻の系統の基部には寄生性の生物群が豊かな多様性をもって存在していることが想定される。

色素体

渦鞭毛藻の色素体は紅藻の二次共生に由来し、アピコンプレクサ類や不等毛藻類が持つ色素体と起源を同じくすると考えられている。Cavalier-Smith が 1980 年に提唱して以来、継続的に修正を受けながらも支持を集めている仮説である。最近になってアピコンプレクサ類に近縁で光合成性のクロメラ *Chromera velia* が見出されたことから注目を集めているが、藻類学最前線でも神川 (2008) および石川・松本 (2010) によって紹介され

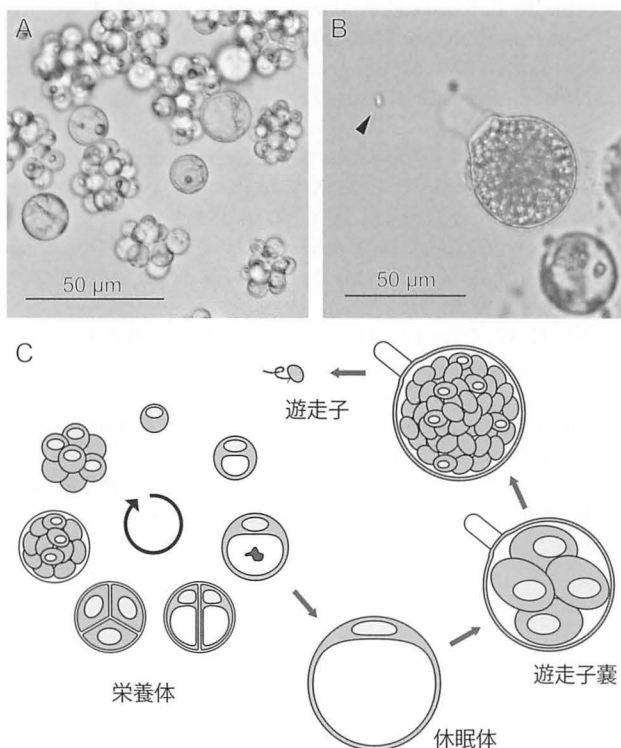


図1 パーキンサスの生活環。 A. 単独培養した *P. marinus* の栄養体。 B. *P. olseni* 培養株から誘導した遊走子嚢と遊走子 (矢尻) C. 生活環の模式図。宿主内および培養系では栄養体として増殖 (黒矢印) しているが、嫌気条件で休眠体が誘導され、そのうち遊走子嚢中に遊走子を多数生じる (灰矢印)。

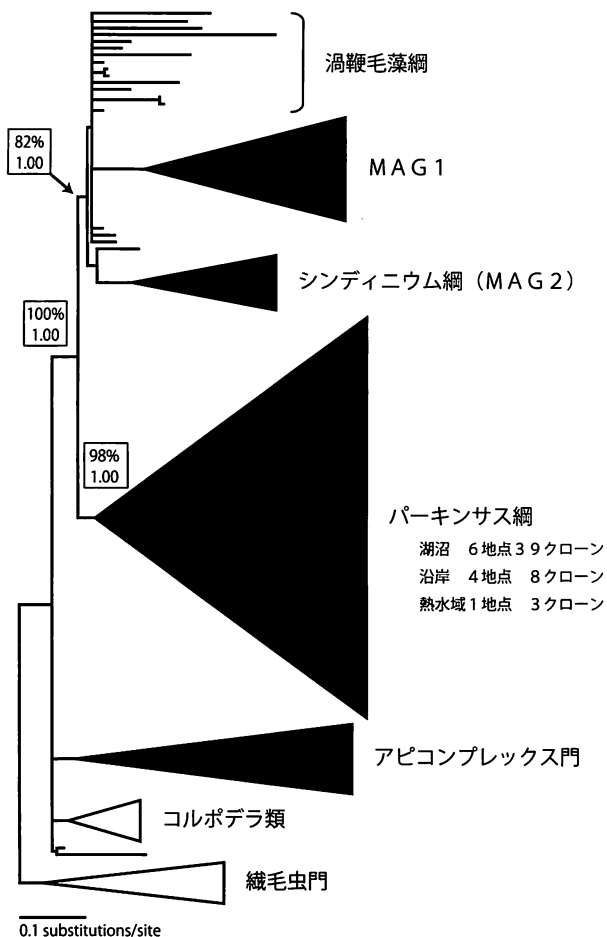


図2 パーキンサス網の系統的位位置と環境DNA由来配列の多様性。核18S rRNA遺伝子を用いたベイズ法(GTR+G+I+COVモデル)による系統樹(130 taxa, 1,442 sites, Bråte *et al.* 2010)に基づき作図。枠内の数字は最尤法によるブートストラップ値(上段)とベイズ法による事後確率(下段)を示す。主として寄生性の生物から構成されると推定される系統群を灰色で示し、パーキンサス網については環境DNAの採取された場所とクローン数を付記した。MAG1, MAG2はそれぞれ Marine Alveolate Group 1 および 2 の略。

ているので詳しくはそちらを参照していただきたい。

さて渦鞭毛藻とアピコンプレクサ類の持つ色素体が同起源だと考えるならば、当然パーキンサスにも起源を同じくする色素体が存在する可能性がある。近年になって、フェレドキシン還元系、脂肪酸合成系、イソプレノイド合成系のうちそれぞれ色素体に特異的な遺伝子群がパーキンサスに存在することが確かめられ、それらが渦鞭毛藻の色素体輸送シグナルに似たN末端配列を持っていることが示された(Stelter *et al.* 2007; Grauvogel *et al.* 2007; Matsuzaki *et al.* 2008)。さらに近縁種 *P. olseni* の遊走子に4枚の生体膜に囲まれた構造が観察された(Teles-Grilo *et al.* 2007)ことから、パーキンサスにも二次共生色素体が存在すると考えられるようになってきている。ただしこれらのタンパク質が実際に色素体へ局在していることの証明がなされておらず、逆に色素体輸送シグナルを伴うと予想されるスーパーオキシド不均化酵素(PmSOD2)が輸送小胞を介して液胞に蓄積する

という報告があり(Fernández-Robledo *et al.* 2008b)、色素体の有無は厳密には未決着の問題である。

パーキンサスに色素体が存在するとして、その機能は何であろうか?これまでゲノム情報から見出された中では、フェレドキシン還元系とそれを利用したイソプレノイド合成系が注目される。イソプレノイドから生合成される化合物としてまずステロールが挙げられるが、パーキンサスは細胞外のステロールに依存していることが示されている(Lund *et al.* 2007)ので除外できる。他に需要が大きいと思われるのは好気呼吸に用いられるキノンで、側鎖がイソプレノイドに由来している。しかし現時点ではパーキンサスのイソプレノイド合成系が機能しているかどうかすら知見がなく、今後取り組むべき課題といえるだろう。

また当然ながら渦鞭毛藻の色素体との進化的な関係に興味を持たれる。パーキンサスに次いで祖先的とされるハダカフタヒゲムシでは、ESTプロジェクトで二次共生色素体への輸送シグナルを伴った遺伝子が見出されており、パーキンサス同様の色素体を持っている可能性が考えられる(Slamovits & Keeling 2008)。しかしより派生的とされるシンディニウム類やヤコウチュウ類についてはほとんど知見がない。色素体包膜の数、色素体DNAの形状や遺伝子組成、補助色素の合成系など、渦鞭毛藻の色素体には注目すべき点が多くあるため、もし中間的な生物群から色素体が見出されるとすれば非常に興味深い成果を期待できるだろう。

ミトコンドリア

パーキンサスのミトコンドリアは単一で管状のクリステを持ち、分岐しながら液胞を取り囲むように存在している。ミトコンドリアの機能に着目した研究はほとんど行われていないが、ゲノム情報からは好気呼吸に関わる遺伝子群が一通り存在していることが知られている(Mogi & Kita 2010)。ミトコンドリアDNAは蛍光顕微鏡下で観察可能であるものの、ゲノムプロジェクトの配列情報中にはミトコンドリアDNAであることが自明な配列は見出されない。我々は徹底的な相同性検索によって、一般的にミトコンドリアDNAにコードされている *cox1* 遺伝子に似たごく短い領域を2ヶ所見出したが、これらは核ゲノム上に存在していた。しかしこの2ヶ所の配列に基づきプライマーを設計してPCRを行い、全長にわたって *cox1* 遺伝子とよく似た配列 *Pmcox1* を得ることができた。この配列は長さが不均一で10 kb以下のDNA分子上に存在しており、これがパーキンサスのミトコンドリアDNAであると推定される(Masuda *et al.* 2010)。

この *Pmcox1* が転写・翻訳されていることは、シトクロムc酸化酵素の活性を検出できることと、近縁種 *P. olseni* から得た配列と比較して非同義置換が全くないことから示唆されている。しかし驚いたことに、*Pmcox1* の配列は読み枠が細かく断断されており、普遍的な機構のみでは単一のポリペプチドに翻訳することができない。ゲノムDNAおよびcDNA由来の配列が全く同一であることからRNA編集の可能性は除外されており、我々はAGGおよびCCCの2種類のコドン特異的にフレーム

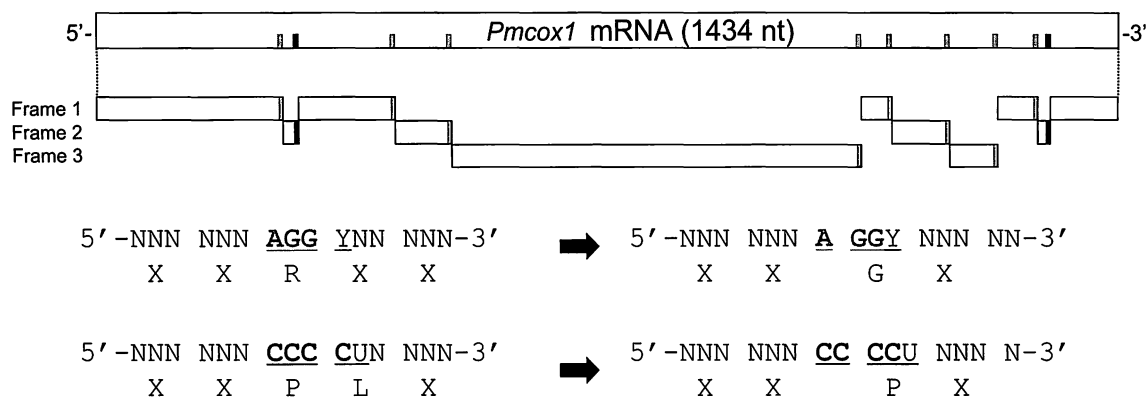


図3 パーキンサスのミトコンドリア遺伝子におけるフレームシフト。 上段は *Pmcox1* 遺伝子の構造を模式的に示したものの見かけ上 11 の読み枠に分断されているが、その境界部にのみ AGG コドン (灰色) または CCC コドン (黒色) が出現する。下段は 2 種のコードンによって起きると想定されるフレームシフトを図解したものの AGG コドンにより 1 塩基下流に、CCC コドンの場合は 2 塩基下流に読み枠がずれると考えられる。Masuda *et al.* (2010) をもとに作図。

シフトが起きるものと考えている (図3)。フレームシフトは翻訳中に読み枠がずれる現象で、核・ミトコンドリアを問わず幅広い生物種で報告されているが、頻度は低くあくまで例外的な現象である。しかし *Pmcox1* では 1 遺伝子中に 10 ケ所と異常なほど高頻度であり、極めて効率の良いフレームシフト機構が備わっていなければ翻訳を正常に完遂できない (Masuda *et al.* 2010)。まずはフレームシフトが起きていることを実証する必要があるが、どのような機構が備わっているのか、そして何がこれほど劇的な翻訳機構の変化をもたらしたのかは、極めて興味深い分子生物学・進生物学上の課題だと考えられる。

最後に

雑多な内容になってしまったが、パーキンサスという寄生虫が渦鞭毛藻の近縁生物として非常に興味深いという点を紹介してきたつもりである。パーキンサスを実験生物として見た場合、単なる恒温器があれば化学合成培地による単独培養が可能で、また人間を含む哺乳動物等への感染性を持たないことから、いわゆる寄生虫の中では取り扱いが易しい部類に入る (しかし水産業に対して経済的被害を及ぼす危険があるため、万一にも環境中へ漏洩しないよう注意する必要がある)。EST 解析が行われ (Joseph *et al.* 2010) 暫定的ではあるがゲノム配列も公開されていることに加えて形質転換法が確立しており (Fernández-Robledo *et al.* 2008a)、今後さらなる研究の進展を期待できるのではないかと考えられる。

引用文献

Bråte, J., Logares, R., Berney, C., Ree, D. K., Klaveness, D., Jakobsen, K. S. & Shalchian-Tabrizi, K. 2010. Freshwater Perkinsea and marine-freshwater colonizations revealed by pyrosequencing and phylogeny of environmental rDNA. *ISME J.* 4: 1144-1153.

Fernández-Robledo, J. A., Lin, Z. & Vasta, G. R. 2008a. Transfection of the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 157: 44-53.

Fernández-Robledo, J. A., Schott, E. J. & Vasta, G. R. 2008b. *Perkinsus marinus* superoxide dismutase 2 (PmSOD2) localizes to single-

membrane subcellular compartments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375: 215-219.

Grauvogel, C., Reece, K. S., Brinkmann, H. & Petersen, J. 2007. Plastid isoprenoid metabolism in the oyster parasite *Perkinsus marinus* connects dinoflagellates and malaria pathogens—new impetus for studying alveolates. *J. Mol. Evol.* 65: 725-729.

石川奏太・松本拓也 2010. *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. *藻類* 58: 129-132.

Joseph, S. J., Fernández-Robledo, J. A., Gardner, M. J., El-Sayed, N. M., Kuo, C. H., Schott, E. J., Wang, H., Kissinger, J. C. & Vasta, G. R. 2010. The Alveolate *Perkinsus marinus*: biological insights from EST gene discovery. *BMC Genomics* 11: 228.

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グー色を継った寄生虫の親戚— . *藻類* 56: 119-121.

Lund, E. D., Chu, F. L., Soudant, P., Harvey, E. 2007. *Perkinsus marinus*, a protozoan parasite of the eastern oyster, has a requirement for dietary sterols. *Comp. Biochem. Physiol. A* 146: 141-147.

Masuda, I., Matsuzaki, M. & Kita, K. 2010. Extensive frameshift at all AGG and CCC codons in the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene of *Perkinsus marinus* (Alveolata; Dinoflagellata). *Nucleic Acids Res.* 38: 6186-6194.

Matsuzaki, M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., Kita, K. & Nozaki, H. 2008. A cryptic algal group unveiled: a plastid biosynthesis pathway in the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1167-1179.

Mogi, T. & Kita, K. 2010. Diversity in mitochondrial metabolic pathways in parasitic protists *Plasmodium* and *Cryptosporidium*. *Parasitol. Int.* 59: 305-312.

Stelter, K., El-Sayed, N. M. & Seeber, F. 2007. The expression of a plant-type ferredoxin redox system provides molecular evidence for a plastid in the early dinoflagellate *Perkinsus marinus*. *Protist.* 158: 119-130.

Slamovits, C. H. & Keeling, P. J. 2008. Plastid-derived genes in the nonphotosynthetic alveolate *Oxyrrhis marina*. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1297-1306.

Teles-Grilo, M. L., Tato-Costa, J., Duarte, S. M., Maia, A., Casal, G. & Azevedo, C. 2007. Is there a plastid in *Perkinsus atlanticus* (Phylum Perkinsozoa)? *Eur. J. Protistol.* 43: 163-167.

良永知義 2007. 貝類のパーキンサス原虫症. *海洋と生物* 29: 321-327.

(東京大学)