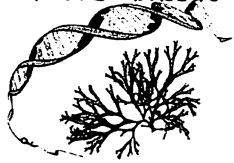


藻類学最前線



丸山真一郎：ラピモナズとビリ藻類 新発見の大系統と二次共生色素体の起源を巡って

知り合いに狩人がいる。よく猟に出かけては獲物を携えて帰ってくる。大抵は生け捕りにして持ち帰り、そして、どんな珍しい獲物が捕れたとか、意外とつまらないものであったりしたとか、楽しそうに話している。そこには、誰も知らないようなことを知りたいという弛まぬ好奇心があり、狩人たちが持つ、純粋な自然への眼差しがある。先日、ちょっと前に捕ってきたものだという獲物を見せてもらった。冷蔵庫から取り出された透明なプラスチックの容器を倒立顕微鏡で覗いてみると、鞭毛をピロピロと動かして泳ぐ藻類のような原生生物のような生き物が見える。既知の種に似ているが、どうやら新種のようなものだと言う。知の地平が開かれていく瞬間に今立ち会っているのだということを微塵も感じさせないカジュアルな話し振りで、その小さな獲物の泳ぎ方について説明してくれる。

同僚の Eunsoo Kim 博士（研究室ではウンスーと呼ばれている）はそんな微生物の狩人だ。さすがの彼女も、先に発表された Rappemonads の解析には色々苦労が絶えなかったらしい (Kim *et al.* 2011)。何しろ、今回の獲物は、大量の海水を濾過したフィルターに集められ、固定され、半分抜け殻のようになった姿しか見ることができない。後はコンピュータの中に蓄積された遺伝子情報だけ。そんな中で、高感度の FISH (fluorescence in situ hybridization) 法などを用いることによって、データベースの中に眠っていた不思議な遺伝子配列が、おそらくハプト藻に近縁な未知の真核生物から成る一大系統群に由来することを突き止めたのだ。

ラピモナズとは？

話は, Rappé *et al.* (1998) で報告された由来不明の色素体型 DNA 配列に始まる。Rappé らは、メタゲノム的手法を用いた海水由来の環境 16S rDNA ライブラリを作成し、それにより得られた様々な由来不明の色素体型遺伝子様配列を報告した (Rappé *et al.* 1998)。そして 10 年以上の時を経て、そのうちの一つが、未だ実態がよくつかめていないものの、明らかに独立した新規系統群に由来することが示された。その系統群は、最初に遺伝子配列を報告した Rappé らの功績を踏まえ、Rappemonads と名付けられた (Kim *et al.* 2011)。

ここで、我々日本人としてはこの新系統を何と呼んだら良いのかについて少し触れておくのも悪くないだろう。原著者の Rappé 氏本人がどう呼ばれたいと思っているかは分からないが、Rappemonads は、筆者が所属する研究室では、敢えてカタカナで書くと「ラピモナズ」という感じで発音されている。形態的特徴に関するデータに乏しく、遺伝子配列の

登録者の名を冠しているだけあって、例えば「渦鞭毛藻」のような感じの和訳のしようも無い。わざわざ和名にする意味はあまりないから、英語のままでよからう、と言う人もいるかもしれない。確かにそうだ。日本人だけ、英名和名両方覚えなければならぬなんて、無駄が多すぎる。しかし、たとえがんばって和訳を与えなかったにしても、多くの科学英単語は結局勝手にカタカナで表記し直されることになり、「ラピモナズ」か「ラピモナド類」か、はたまた「ラピモナヅ」にすべきか、などというどうでも良い茶飲み話のような議論が起ってしまうかもしれない。「ゲノム」か「ジノーム」か？「クロマルベオラータ」か「クロムアルベオラータ」か？などの区別は、科学としてはかなりどうでも良いのだが、心情的には理解できなくもない。根っからの日本人である自分としては、アルファベット表記そのままの用語では、何となく身に馴染まないというか、どうしても本質をしっかりと把握したような気になれないことが時としてあるからだ。だからカタカナ和名がどうでも良いこだわりだと分かっているけど、その表記に心を砕きたくなくなる気持ちは分かる。同時に、陳腐なハリウッド映画の邦題の様に、何でもかんでも原語を読んだそのままのカタカナ名にするのもどうかと思う。かといって昔のフランス映画のようにイメージ先行の勝手な和訳を付けるのも憚られるし、「進化」とか「生態」とかいう言葉を発明した明治の人たちのように、漢語化してはじめて体得できたといえるというような時代でもなかろうと思う。で、どうしたものか。所詮、こんなことは大した問題ではないのだろう。なのでとりあえず、ジョン万次郎的な現実主義路線の方針を採って、ここでは「ラピモナズ」と呼ぶことにする。

データベースに眠っていた新規色素体系統

話を戻そう。Kim *et al.* (2011) で報告されたラピモナズに関しては、特異的プライマーを用いた PCR により、大西洋、太平洋の海水サンプル、さらに英国の淡水サンプルからも産物が検出され、Rappé らにより最初に報告されたものに酷似した複数の色素体 16S rDNA 配列が得られた。これらの配列を用いて分子系統解析を行ったところ、ハプト藻やクリプト藻に近縁であり、しかもそれらとは独立した系統群を構成していることが分かり、ラピモナズはこれまで知られていない藻類とも異なる新規の一大系統を成すと考えられた (図 1A)。ほぼ全長の色素体 rDNA オペロン配列でも同様の樹形が示され、クリプト藻よりもハプト藻の色素体により近縁であろうと推測された。また、大西洋の観測地からは、冬場に比較的浅い（といってもデータでは水深 50 m 付近の）海域においてブルーム（といっても密度はそれほど高くないよう

だ)を形成すること,さらに色素体 rDNA プローブを用いた FISH 解析により,おそらくラピモナズは 2 個から 4 個の二次共生色素体を持つであろうことが示された。

こうした解析が,現在盛んに行われているメタゲノムの解析と一線を画する理由としては,種々の異なる環境中から単一系統を構成する多数の配列が得られたこと,それらの配列が色素体様構造という細胞レベルでの特徴と共に示されたことなどが挙げられるだろう。特に,二つのラピモナズクレードのうち片方に属するものだけだが,色素体 rDNA が淡水と海水両方のサンプルから得られたことは,この系統が比較的長きに渡り独立して進化し,様々な環境に適応してきたことを示唆している。また,この研究では,まず遺伝子配列情報ありきで,そこから環境サンプリングや FISH などの細胞学的解析へと展開していった。手法的な面から言えば,興味のある細胞や個体から出発し,形態的・ゲノム科学的解析へと進んで行くような伝統的研究法と比較しても,時流を捉えた先端的研究であると言えるのではないだろうか。

では,これまでこうした汎存種とも呼べるような系統が発見されず,単離培養もされてこなかったのはなぜだろうか。ウンスー本人は「単純に,数が少ないから」というのが大きな原因の一つだろうと考える。先にも述べた様に,冬場にブルームを形成すると言ってもせいぜい 4000 rDNA コピー/mL 程度,多くの植物種において多コピーで存在することが知られる色素体ゲノムが,もしラピモナズの細胞あたり 100 コピー程度で維持されているとしたら,海水 1 mL 中に 40 細胞程度しかないと予想される。この「ブルーム」が確認されたのはクロロフィル検出量の多い深度でもあることから,これらを他の優勢な植物プランクトンから選り分けることは容易ではないだろう。また,もし増殖速度が遅いとか,条件変化に弱いとかいった性質が重なれば,単離培養が行われてこなかったことも想像に難くない,と言う。もちろん「最初に水サンプルを採取する際のフィルタリングの条件など,工夫できることもある」とも言っている。いつか,生きたラピモナズを見られる日が来ることを期待したい。

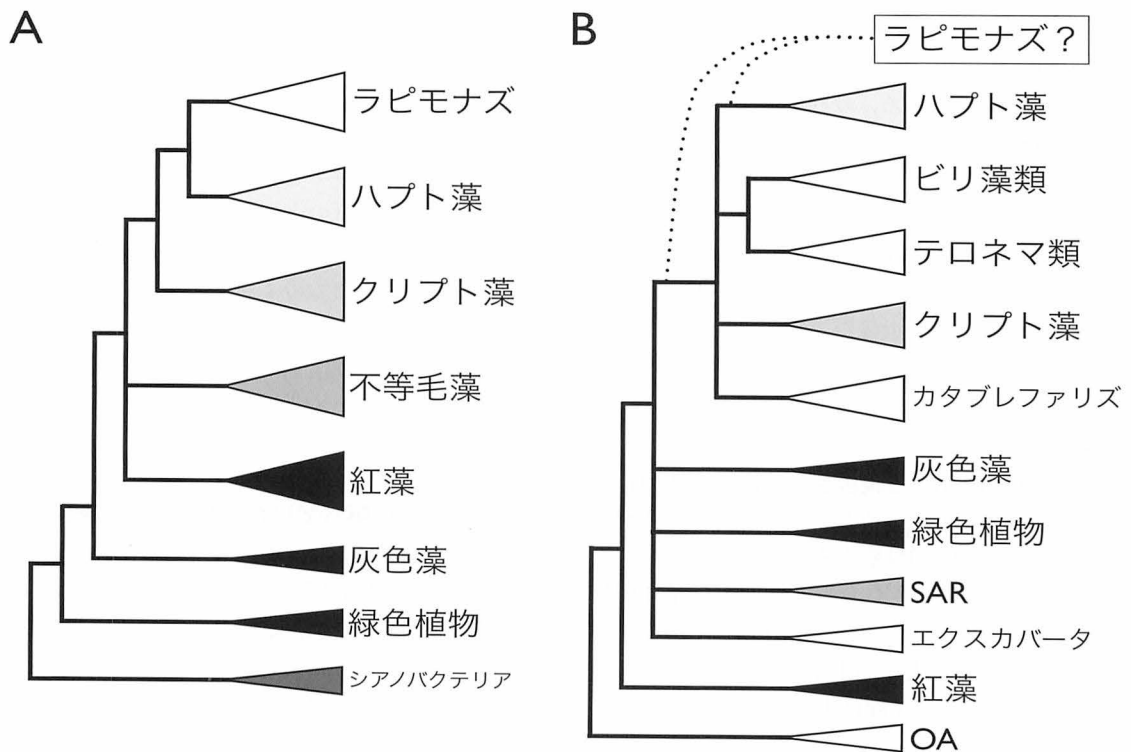


図1 新たに発見された系統群を含めた色素体および真核生物核ゲノムの系統仮説。A 紅藻および紅藻系二次共生藻類の持つ色素体ゲノム系統のモデル図。Kim *et al.* (2011) 中の図 2 の色素体 rDNA 遺伝子系統樹を基に, ラピモナズと他の藻類の色素体の系統関係を, 簡略化し模式的に示した。論文中で多系統的に分散していた紅藻類は便宜的に単一系統として表してある。B ビリ藻類を含めた真核生物の核ゲノムについて予想される系統モデル図。Yoon *et al.* (2011) 中の図 2B の複数タンパク質配列結合系統樹を基に, 主な真核生物の分類群に関する系統関係を模式的に示した。ラピモナズの核ゲノムが Kim *et al.* (2011) の色素体遺伝子系統樹から推定される系統関係に近い挙動を示すと仮定した場合に予想されるラピモナズの系統的位置を点線で示す(筆者による)。SAR は stramenopiles + alveolates + rhizarians, OA は opisthokonts + amoebozoans の分類群を示す。

ラピモナズとビリ藻類の微妙な関係

この論文でもう一つの大きな論点となっているのが、ラピモナズは、過去に報告された (pico) biliphytes (Not *et al.* 2007) (ここではビリ藻類と呼ばせて頂く) と同一の生物なのかどうか? ということだ。ビリ藻類も元々環境シーケンス中で見つかった由来不明配列を基に同定された新規系統群で、配列の類似性からクリプト藻などに近縁なのではないかと目されていた。これまで知られているのは、ラピモナズからは色素体 16S rDNA 配列、ビリ藻類からは核コードの 18S rDNA 配列だけなので、現状でそれらの同一性を議論するのは難しい。しかし Kim *et al.* (2011) ではいくつかの理由から、それらが異なる生物に由来するのではないかと推測されている。

- 1) ビリ藻類はラピモナズに比べてサイズが小さい。
- 2) サンプル数は不十分だが、ビリ藻類特異的核 DNA プロブで FISH を行った結果、ビリ藻類からはオレンジ色のフィコビルリン様蛍光が観察されず、先行研究の結果は再現されなかった。
- 3) ラピモナズ配列が得られた淡水サンプルからは、PCR によりビリ藻類の配列を得ることができなかった。
- 4) ラピモナズとビリ藻類の両方の配列が得られた海水サンプルの場合でも、それらは異なるサイズ画分の細胞集団に由来するものだった。
- 5) ビリ藻類の核コード rDNA オペロンの大部分を含む配列を新たに解読して分子系統解析を行った結果では、各枝のサポート値や樹形比較検定などから、ラピモナズとビリ藻類が系統樹上で同一の枝に位置するとは考えにくい。

もちろん、上記の理由のうち (5) に関しては、元々異なる遺伝子座を対象にした系統解析の結果を比較している以上、結論は難しいかもしれない。仮に、ラピモナズが核ゲノムとしてはビリ藻類に非常に近縁で、ハプト藻型三次共生体 (またはその葉緑体) を細胞内に維持しているような生き物だったとしたら、その系統的位置関係の解釈は非常に複雑なものになるだろう。だが、他の結果は概ね、両者が異なる実体に由来することを示唆しているようだ。特に (2) の結果を踏まえ、Kim *et al.* (2011) では、過去に報告されたビリ藻類の (ヌクレオモルフを持つかもしれないという推測もあった) 葉緑体様構造 (Not *et al.* 2007) は、餌として捕食されたシアノバクテリアのような生物がオルガネラと誤認されたものではないかと論じられている。しかし、論文中でも触れられているような他の論点、技術的な検出力の限界やアーティファクトなども無視できないだろう。ラピモナズが色素体を持つといっても、盗葉緑体やアピコプラストのような縮退型色素体である可能性を否定するようなデータも未だ報告されていない。生物群の名を Rappephytes としなかったのは賢明な判断だったと言えるかもしれない。また、ラピモナズに使えるプロブは今のところ色素体遺伝子のみなの

で、当然検出される細胞は全て色素体を持っている。もし近縁種や生活環の一時期において「色素体を持たないラピモナズ」がいたとしても、これらがどのようなサイズで、どのフィルター画分で検出されるのかは不明である。また、当然ながら 18S rDNA 配列が得られていないのも問題で、ずばり結論に至るという訳にはいかないのがもどかしいところだ。かといって、これらの点が謎のままだからといって本研究の価値が過小評価されるということにはならないだろう。広範な生息域を持つ希少な真核生物の新規大系統を発見するという偉業は、それほど頻繁に成し遂げられるものでもないからだ。

ビリ藻類のジレンマ

しかし、「今後は更なるメタゲノム解析により新たな核コード遺伝子配列が獲得され、色素体と核の両プロブを用いた FISH 解析が行われることが望まれる」などという誰もが思いつきそうな簡単な結論で話を締めくくることが許さないほどのスピードで、科学が進歩してしまった。ビリ藻類の単一細胞ゲノム解読の論文が出版されたのだ (Yoon *et al.* 2011)。Yoon *et al.* (2011) では、18S rDNA 配列を基にした系統解析において独立のクレードに属することが示されていた三つのビリ藻類の系統において、セルソーターにより分離した単一細胞からゲノム DNA 増幅と配列解読を行った。その結果、部分的ではあるが、これまで謎だったビリ藻類のゲノム構成が明らかになり、さらにタンパク質配列を用いた複数遺伝子分子系統解析も可能になった。Yoon *et al.* (2011) の複数遺伝子系統解析では、18S rDNA の樹形と異なり、ビリ藻類はクリプト藻ではなくテロネマ類と姉妹群を形成することが示されたが、そのすぐ外側に来る直近の姉妹系統であるハプト藻との単系統性は低いサポート値しか得られていない (図 1 B)。

Yoon らの論文中には注目すべき二箇所の記述がある。一つは、ビリ藻類の部分ゲノム配列中には色素体コードおよび核コード色素体移行型タンパク質は見いだされなかった、というものだ。これは、先のラピモナズ論文における「ビリ藻類は色素体を持たない捕食性の原生物ではないか」という主張に一致する。残念ながら、Yoon *et al.* (2011) 中ではラピモナズ論文が「ビリ藻類がクリプト藻に由来する色素体を持つことを示していると思われる」文献として引用されているように見受けられるが、これはウンスーも言うように「誤引用ではないか」と疑わざるを得ない。もう一箇所は、ビリ藻類やハプト藻、クリプト藻が、他の非光合成生物を含めて姉妹群の関係にあることは、ビリ藻類の祖先がかつて光合成生物だったことを示しているのかもしれない、というものである。実のところ、この件の論拠を本文中に見いだすことはできなかった。一般的に言って、ある形質状態 (この場合は色素体の有無) について、異なる系統間で一致が見られたからといって、その形質状態が共通の原因により生じたと結論することは簡単には出来ないのではないだろうか。そこで引用されている文献を見る限り、Yoon らの推論はいわゆる「ク

ロマルベオラータ仮説（紅藻由来の二次共生色素体が単一起源であるという説）」(Reyes-Prieto *et al.* 2008)あるいはそのスピノフとも呼べるかもしれない「ハクロビア説（ハプト藻やクリプト藻と単系統群にある生物は単一起源の光合成生物に由来するという説）」(Okamoto *et al.* 2009)を強く意識しているように思われる。これらの仮説に関してここでは議論しないが、もし別の背景仮説（例えばハプト藻はクリプト藻から色素体を三次共生により獲得したという説）(Bodyl *et al.* 2009)を想定するならば、そしてNot *et al.* (2007)において示された蛍光が葉緑体でなく餌生物に由来すると考えるならば、Yoonらのデータはむしろ非光合成性の祖先生物の存在を支持しているとも言えるのではないだろうか。もっといえば、こうした姉妹関係を祖先共有の根拠にしまったら、どのような系統樹が得られたとしても、間に来る生物を全て含めてしまえば、共通祖先は想定可能だろう。しかしこれでは循環論になってしまう。

ちなみに本稿ではピリ藻類という呼び方をしたが、オリジナルのpicobiliphytesという呼称(Not *et al.* 2007)に対しては、「ピコスケールというには細胞が大きすぎて、紛らわしい」という理由から、むしろbiliphytesと呼ぶ方がいいのではないか、という提案がなされた(Cuvelier *et al.* 2008)。しかしその名称の統一には至っていない。かつて紅色植物と灰色植物をまとめた系統群として提唱されたBiliphyta (Cavalier-Smith, 1981)と似ているので余計紛らわしいという人すらいるかもしれない。さらに言えば、もしbiliphytesが、Kim *et al.* (2011)において提言されているように色素体を持たない非光合成生物だとしたら、「pico」でもなく「bili」を持たず「phytes」でもない生物群を、何と呼んだらいいのだろうか？

再び、ラピモナズとは？

名称にまつわる本質的ではない問題はともかく、ラピモナズは、藻類ひいては真核生物の進化という大きな論題に今後どのような影響を与え得るだろうか。ハプト藻、クリプト藻に近縁な色素体を持つ藻類という意味では、核ゲノムがどのような系統関係を示すかという点は、とりあえず多くの人の注目するところだろう(図1B)。また色素体の微細構造も含め、紅藻由来の二次共生色素体がどのような多様性を持ち、どのような進化的系譜が想定されるのかという点についても、大きなインパクトをもたらすことは疑いない。個人的には、何よりも単純に、ラピモナズとは一体どんな生き物なのか？というのが一番気になるところだ。もしラピモナズ細胞

の想像図を描くとしたら、どんな姿を思い浮かべるか、とウンスーに聞いてみると、「そう、今一番迷っているのは、ハプトネマを描くべきかどうか、っていうことなんだよね」と笑って答えた。急速な技術革新と膨大な情報の渦の中で、微生物の狩人の眼差しは、常に生き物に寄り添っているのだという気がした。

謝辞

本稿の執筆にご協力頂いた Eunsoo Kim 博士, John M. Archibald 博士に厚く御礼申し上げます。尚、文中の Kim 博士のコメントは全て著者の責任において和訳したものです。

引用文献

- Bodyl, A., Stiller, J. W. & Mackiewicz, P. 2009. Chromalveolate plastids: direct descent or multiple endosymbioses? *Trends Ecol. Evol.* 24: 119-121; author reply 121-112.
- Cavalier-Smith, T. 1981. Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems* 14: 461-481.
- Cuvelier, M. L., Ortiz, A., Kim, E., Moehlig, H., Richardson, D. E., Heidelberg, J. F., Archibald, J. M. & Worden, A. Z. 2008. Widespread distribution of a unique marine protistan lineage. *Environ. Microbiol.* 10: 1621-1634.
- Kim, E., Harrison, J. W., Sudek, S., Jones, M. D. M., Wilcox, H. M., Richards, T. A., Worden, A. Z. & Archibald, J. M. 2011. Newly identified and diverse plastid-bearing branch on the eukaryotic tree of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 1496-1500.
- Not, F., Valentin, K., Romari, K., Lovejoy, C., Massana, R., Töbe, K., Vaultot, D. & Medlin, L. K. 2007. Picobiliphytes: a marine picoplanktonic algal group with unknown affinities to other eukaryotes. *Science* 315: 253-255.
- Okamoto, N., Chantangsi, C., Horák, A., Leander, B. S. & Keeling, P. J. 2009. Molecular phylogeny and description of the novel katablepharid *Roombia truncata* gen. et sp. nov., and establishment of the Hacrobia taxon nov. *PLoS ONE* 4: e7080.
- Rappé, M. S., Suzuki, M. T., Vergin, K. L. & Giovannoni, S. J. 1998. Phylogenetic diversity of ultraplankton plastid small-subunit rRNA genes recovered in environmental nucleic acid samples from the Pacific and Atlantic coasts of the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 294-303.
- Reyes-Prieto, A., Moustafa, A. & Bhattacharya, D. 2008. Multiple genes of apparent algal origin suggest ciliates may once have been photosynthetic. *Curr. Biol.* 18: 956-962.
- Yoon, H. S., Price, D. C., Stepanauskas, R., Rajah, V. D., Sieracki, M. E., Wilson, W. H., Yang, E. C., Duffy, S. & Bhattacharya, D. 2011. Single-cell genomics reveals organismal interactions in uncultivated marine protists. *Science* 332: 714-717.

(ダルハウジー大学)