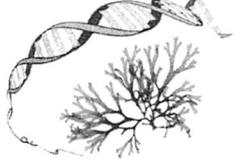


## 藻類学最前線



# 大田修平：クロララクニオン藻における核コードタンパク質のヌクレオモルフへの輸送機構

真核生物が光合成を行う別の真核生物を細胞内に取り込み、一体となって生活する、いわゆる「葉緑体の細胞内二次共生 (secondary endosymbiosis)」はそれほど珍しい現象ではなく、多様な真核生物が光合成能を獲得するための原動力となっている。葉緑体の細胞内二次共生現象を電子顕微鏡レベルで垣間見せてくれる生物として、クロララクニオン藻類とクリプト藻類とが知られている。それぞれ系統的には大きく異なるが、どちらも「ヌクレオモルフ」と呼ばれる共生体の痕跡核を持ち、真核生物由来の共生体が完全にオルガネラ化する一步手前の生物群と認識されている。このため、ここ十数年の間に、クロララクニオン藻類およびクリプト藻類を用いたゲノム進化・細胞進化学的研究が急速に進められてきた。本稿では、クロララクニオン藻類に着目して、そのヌクレオモルフを細胞内で維持する機構に関する研究を紹介したい。

### クロララクニオン藻類とは？

クロララクニオン藻類は、単細胞性藻類の一群で、2012年現在までに8属14種（内、*Lotharella globosa*には2つの種内分類群を含む）が記載されている。これまで報告されたものはすべて海産種で、淡水産の種は見つかっていない。クロララクニオン藻類の半数以上の種が、生活環の中でアメーバ状ステージを持つ（図1A）。しかし、細胞壁をもつ球状の種（図1B）や、遊泳細胞を主とするプランクトン性の種（図1C）、あるいは細胞直径が3 μm以下の微小プランクトンの種（ピコプランクトン）なども報告されており、生活環や栄養細胞の形態は多様である（Ishida *et al.* 2007）。これはおそらく、クロララクニオン藻類が海岸・サンゴ礁域の

底生的な環境から、外洋域の表層水環境まで、ハビタットが多岐に渡っていることが原因の一つではないかと考えられている。

クロララクニオン藻は1930年、Geitlerによって *Chlorarachnion reptans* として初めて記載されたが、当時は黄緑藻綱の藻として扱われた（Geitler 1930）。1980年代に入り、*C. reptans* の単藻培養株化に成功し、色素分析や透過型電子顕微鏡技術による解析が可能になった。Hibberd & Norris（1984）は、*C. reptans* の培養株を詳細に再検討したところ、これまでの藻類群では知られていない形質が見つかった。その中でも、1) 主要色素のクロロフィル *a*, *b*, 2) 4枚の葉緑体包膜, 3) 葉緑体包膜の2枚目と3枚目の間の共生者細胞質区画（葉緑体周縁区画 (periplastidal compartment) ; 以下 PPC) に存在するヌクレオモルフと呼ばれる核に似た構造体に注目した。このため、Hibberd & Norris（1984）は、新たにクロララクニオン植物門を設立して、*C. reptans* を独立した門に移した。また彼らは、クロララクニオン藻類の葉緑体が二次共生由来であることを示唆した。実際、最近の分子系統学的データによって、クロララクニオン藻は無色真核細胞が光合成真核細胞を共生体として細胞内に取り込み成立した生物であり、宿主に相当する細胞はケルコゾア生物（リザリア生物）、共生体に相当する生物は緑藻をそれぞれ起源としていることが明らかとなった（Ishida *et al.* 1999, Takahashi *et al.* 2007, Burki *et al.* 2010 など）。

### ヌクレオモルフとは？

葉緑体二次共生によって成立した藻類の大部分は、共生体の核がすでに消失しており、共生体が完全にオルガネラ化し

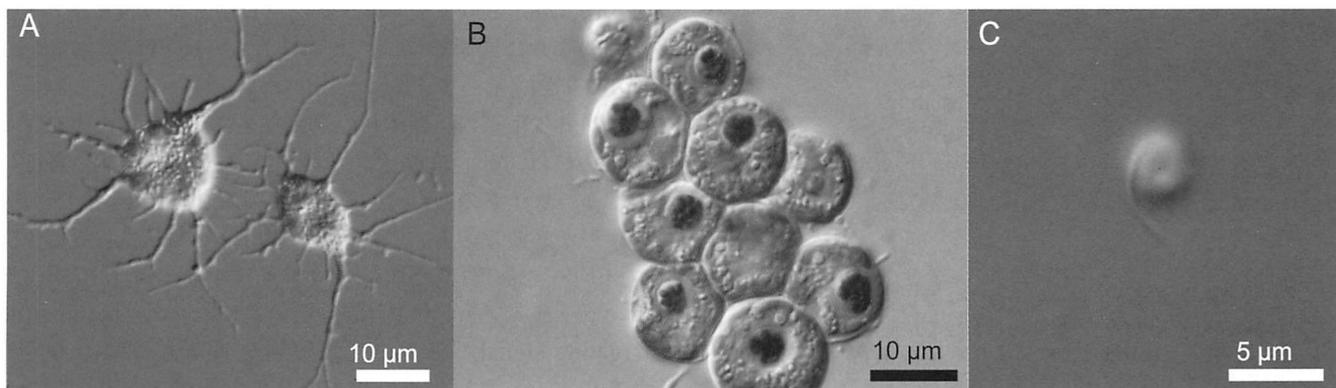


図1 クロララクニオン藻の顕微鏡写真（微分干渉像）。A *Amorphochlora* 属の1種, B *Lotharella reticulosa*, C *Bigelowiella longifila*.

ているが、前述のとおり、クロララクニオン藻類とクリプト藻類は、葉緑体周縁区画 (PPC) に共生体の痕跡核、つまりヌクレオモルフを現在も保持している (図2)。これまで報告されたヌクレオモルフには、クロララクニオン藻類、クリプト藻類ともに、例外なく3本の染色体が含まれている (Silver *et al.* 2007, Tanifuji *et al.* 2010 など)。現在までに、クリプト藻では3種でヌクレオモルフ染色体のゲノム配列が解読されており (Tanifuji *et al.* 2011 など)、クロララクニオン藻では1種 *Bigelowiella natans* で配列決定されている (Gilson *et al.* 2006)。*B. natans* のヌクレオモルフゲノムサイズは373 kbpで、真核生物の核ゲノムと比較すると極度に縮小している。コードされているタンパク質遺伝子数は331個、遺伝子密度は1.10 kbp/geneで遺伝子がゲノム中に非常に密に詰め込まれた構造をしている。コード遺伝子の大部分はハウスキープ遺伝子であるが、17個の葉緑体関

連遺伝子もコードされており、このことからヌクレオモルフは葉緑体の機能を維持するために重要な役割を担っていると考えられている。一方で、ヌクレオモルフゲノムにはDNAポリメラーゼなどをコードする遺伝子が存在しないことから、葉緑体機能維持のため宿主核ゲノムにコードされるタンパク質の関与 (供給) が示唆されている。

### 共生体由来遺伝子の宿主核ゲノムへの移動とその発現タンパク質の共生体への輸送

真核生物において細胞内共生現象は光合成能を獲得する原動力であるが、一口に細胞内共生といっても共生の程度は様々で、ミドリゾウリムシとクロレラのように、それぞれ独立に分離培養可能である段階から、珪藻類、褐藻類やユーグレナ類のように共生藻核が消失し、共生体が完全に葉緑体化している段階のものまで知られている。クロララクニオン藻類やクリプト藻類は、共生体の痕跡核がまだ保持されている「進化的中間」段階に位置付けられている。Keeling & Archibald (2008) は、共生体からオルガネラに至る過程のどの時点からオルガネラと呼んでよいのか、といった線引きは困難であるとしながらも、共生体の遺伝子が宿主核ゲノムへ移動し、その発現タンパク質が共生体へ輸送されている状態は、オルガネラの特徴の一つであるとしている。共生藻から葉緑体へ至る進化の過程では、細胞内において二つの重要な変化が起こると考えられている。その一つは、共生体の核ゲノムの大規模な縮小・消失であり (谷藤 2011)、もう一つは共生体から宿主核へ移行した遺伝子の翻訳産物を葉緑体へ輸送する機構の確立である。葉緑体で機能するタンパク質の多くは宿主核ゲノムにコードされているが、紅藻類や緑藻類等のシアノバクテリアの細胞内共生によって成立した一次植物の場合、細胞質のリボソームで翻訳された前駆体タンパク質は葉緑体の二重膜を通過してストロマまで輸送される。二次共生葉緑体を持つ二次植物では、一次植物に比べて葉緑体の包膜の枚数が増え、例えばクロララクニオン藻類やクリプト藻類、褐藻類などの葉緑体包膜は4枚である。また、多くの渦鞭毛藻類やユーグレナ類などのように3重包膜を持つ葉緑体もある。いずれにしても、葉緑体包膜の枚数が増えることから、輸送される前駆体タンパク質がそれらの葉緑体包膜をどのように通過して、ストロマあるいはPPCに局在するのか問題となってくる。

二次共生由来の葉緑体へのタンパク質輸送機構を成立させるためには、一つは輸送タンパク質のN末端側への移行シグナルペプチドの獲得、もう一つは葉緑体包膜上の輸送装置の獲得が必要である。二次植物の葉緑体へ輸送される宿主核コードタンパク質は、SP (シグナルペプチド配列) とTPL (トランジットペプチド (TP) 様配列) の二つのシグナル (bipartite targeting signal) を含む拡張配列をN末端側にもち、それらのタンパク質は小胞体を介して葉緑体へと輸送される (Patron & Waller 2007)。一方、葉緑体包膜にはトランスロコン (タンパク質輸送装置) が存在しており、内側2枚

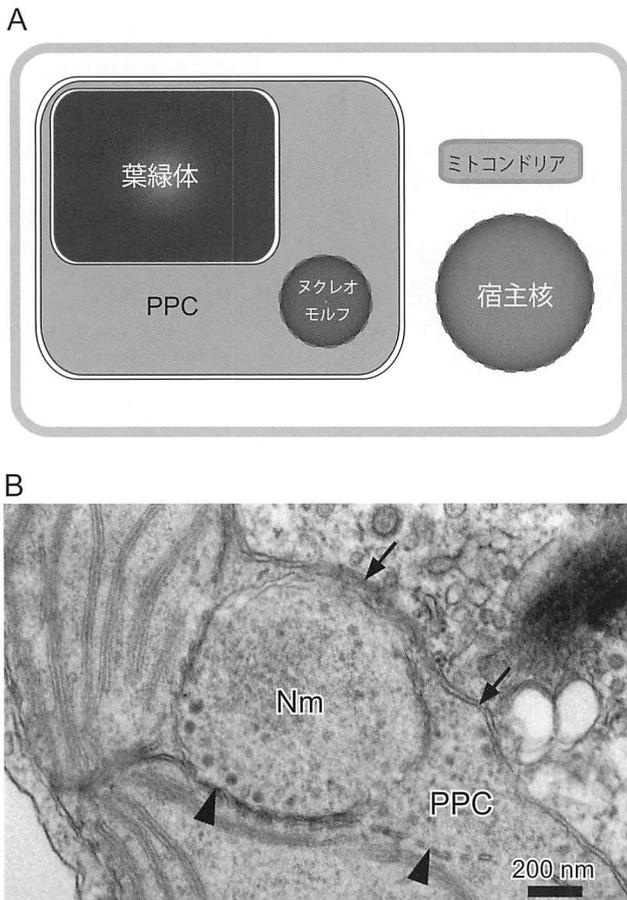


図2 クロララクニオン藻のヌクレオモルフの位置関係と電子顕微鏡写真。A 宿主核、ヌクレオモルフ、葉緑体周縁区画 (PPC) の細胞内における位置関係を示す模式図。B クロララクニオン藻1種 *Lotharella oceanica* のヌクレオモルフの透過型電子顕微鏡写真。Nmはヌクレオモルフ、PPCは葉緑体周縁区画、矢印は葉緑体包膜の外側の2枚、矢頭は葉緑体包膜の内側の2枚をそれぞれ示す。

の包膜では一次植物と同様に TOC/TIC (translocons at the outer/inner envelope membrane of chloroplasts) が機能していることが示唆されている (Agrawal & Striepen 2011)。また、紅藻起源の葉緑体を持つ二次植物 (珪藻やクリプト藻, アピコンプレクサ類など) では外側から数えて 2 枚目の包膜に, SELMA [symbiont-specific ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation)-like machinery] と呼ばれる小胞体膜トランスロコンと類似した装置が存在する (Spork *et al.* 2009, Hempel *et al.* 2009 など)。一方, 緑藻起源の葉緑体をもつクロララクニオン藻類では, TOC/TIC は存在するが, SELMA を欠いていることがゲノム情報を基にした解析により明らかになっている (Hirakawa *et al.* 2012)。こうした研究から, 二次植物の場合, その葉緑体の起源が異なると, 葉緑体輸送シグナルの機能領域や葉緑体包膜上で輸送装置を構成するタンパク質も異なることが明らかとなった。

### ヌクレオモルフへ輸送されるヒストンタンパク質

これまで, クロララクニオン藻の葉緑体ストロマおよびチラコイドへ輸送されるタンパク質の輸送シグナル, 輸送経路, 輸送装置などは報告されているが, PPC に輸送されるタンパク質はほとんど見つかっていない。クロララクニオン藻類では, PPC に痕跡的ながらも核 (ヌクレオモルフ) があり, 宿主によるそのコントロールが必要であることから, 比較的多くの宿主核コード PPC 輸送タンパク質が存在すると考えられている。しかしこれまでに 1 つのタンパク質, EFL (elongation factor-like) protein が PPC 輸送タンパク質として同定されているのみであった (Gile & Keeling 2008)。ごく最近, Hirakawa らはクロララクニオン藻の核ゲノム情報を基に, ヌクレオモルフのヌクレオソームを構成するタンパク質であるヒストン H2A, H2B を新たに同定して, 宿主による共生体核制御機構を解明した (Hirakawa *et al.* 2011)。

ヒストンは, H2A, H2B, H3, H4 および H1 から構成され, 染色体の高次構造を維持するうえで重要なタンパク質である。まず, Hirakawa らはヒストン H1, H2A, H2B 遺伝子はヌクレオモルフゲノムにはコードされておらず, 宿主核ゲノムのみでコードされていることを明らかにした (表 1)。さらにヒストンのアミノ酸配列に基づき系統解析を行い, 宿主核ゲノム上には, 宿主タイプ H2A, H2B と共生体タイプ H2A, H2B の両方が存在することを明らかにした。Hirakawa らの系統解析の結果では, 共生体タイプのヒストン H2A はハプト藻のものとクレードを形成したが, これは, 共生体タイプのヒストン遺伝子の塩基置換速度が大きいことに起因するアーティファクトである可能性が高い。少なくとも, 今回の系統解析から, 共生体由来ヒストン H2A, H2B は明らかに宿主タイプのものとは起源が異なり, したがって, 共生体由来の H2A と H2B 遺伝子はヌクレオモルフゲノムから宿主核ゲノムへ移行していることが強く示唆された。また興味深いことに, ヒストン H1 に関しては共生体由来の遺

表 1 *Bigelowiella natans* におけるヒストンタンパク質遺伝子のホモログの数とその有無

ヒストン・ファミリー	H1	H2A	H2B	H3	H4
宿主核ゲノム上のホモログ数	2	5	4	6	3
宿主核ゲノム	○	○	○*	○*	○
ヌクレオモルフゲノム	×	×	×	○	○

○: ヒストン遺伝子がコードされている, ×: ヒストン遺伝子がコードされていない。

(注) \* は共生体由来のヒストン遺伝子が核ゲノムにコードされていることを示す。

伝子が見つからなかった。これは, 共生体タイプ H1 遺伝子の塩基配列の変異が大きいため (進化速度が大きいため), 宿主核ゲノム中から検出できなかった可能性もあるが, 他のタンパク質で代用されている可能性やヌクレオモルフが H1 タンパク質を用いず真核生物に典型的な染色体構造をとらない可能性も否定できない (Hirakawa *et al.* 2011)。

宿主由来ヒストンタンパク質のアミノ配列との比較によって, 共生体由来のヒストン H2A と H2B には, それぞれ葉緑体への輸送シグナルと予測される配列が N 末端領域に存在することが明らかとなった。そこで Hirakawa らは, 各ヒストン遺伝子配列に GFP (green fluorescent protein) 遺伝子を付加したコンストラクトをクロララクニオン藻の 1 種 *Amorphochlora amoebiformis* に遺伝子導入し, ヒストンタンパク質の局在解析を行った。その結果, 予想通り宿主タイプのヒストン H2A, H2B は宿主核に, 共生体タイプのヒストン H2A, H2B はヌクレオモルフにそれぞれ局在した。これにより, N 末端輸送シグナルの働きにより, 共生体タイプのヒストン H2A, H2B は PPC に (今回の場合は, ヌクレオモルフに) 輸送されることが明らかとなった。

### ヒストンタンパク質遺伝子の発現調節機構

一般にヒストンタンパク質の発現は細胞周期と密接に関連しており, DNA の複製が起こる S 期で高い発現量を示す。Hirakawa らは, 細胞周期を通してクロララクニオン藻のヒストンタンパク質遺伝子の発現パターンを調べるため, 明暗周期を用いてクロララクニオン藻の 1 種 *Bigelowiella natans* の同調培養系を確立し, 定量 PCR により明暗周期を通してのヒストン H2A/H2B の発現解析を行った (Hirakawa *et al.* 2011)。その結果, 明暗周期に同調してヒストンタンパク質の発現が制御されていることが示された。つまり, 宿主タイプのヒストン H2A, H2B は, 明期に発現がほとんど見られず, 暗期開始直後に発現のピークがあり, その発現量は明期の始まりまで徐々に減少する発現サイクルを持つのに対し, 共生体タイプのヒストン H2A, H2B は, 明期の半ばから発現し, その後, 暗期開始直後から暗期半ばまで発現のピークが見られ, 明期の開始まで発現が徐々に減少するという発現サイクルを持っていた。この結果より, 宿主タイプおよび共生体タイプのヒストンタンパク質は, 共に細胞周期を

通して厳密に発現が制御されていることが明らかとなった。宿主タイプヒストンと共生体タイプヒストンは、共に暗期直後（S期と推定される時期）に発現量がピークに達することは共通しているが、共生体タイプヒストンの発現増加時期が、宿主タイプヒストンの発現時期より早いなど、その発現のズレがみられた。ヌクレオモルフの分裂が宿主核の分裂に先立って起こることは電子顕微鏡観察の結果から示唆されている（Moestrup & Sengco 2001）。今回の定量PCRで確認された発現のズレは、ヌクレオモルフの分裂を宿主が制御していることを強く示唆しており、電子顕微鏡の観察結果をうまく説明している。

葉緑体の二次共生において、宿主が共生体をオルガネラ化する過程でどのようなことが起こったのか、徐々に全体像が明らかになりつつある。今回、Hirakawaらは分子系統解析、葉緑体（PPC）輸送タンパク質のGFPを用いた局在解析、定量PCRによるその発現解析を行い、ヌクレオモルフが宿主核によって制御されていることを初めて直接的に示した。本研究は、細胞内共生進化研究に大きな一歩をもたらしたといえる。

## 引用文献

- Agrawal, S. & Striepen, B. 2010. More membranes, more proteins: complex protein import mechanisms into secondary plastids. *Protist* 161: 672-687.
- Burki, F., Kudryavtsev, A., Matz, M. V., Aglyamova, G. V., Bulman, S., Fiers, M., Keeling, P. J. & Pawlowski, J. 2010. Evolution of Rhizaria: new insights from phylogenomic analysis of uncultivated protists. *BMC Evol. Biol.* 10: 377.
- Geitler, L. 1930. Ein grünes Filarplasmodium und andere neue Protisten. *Arch. Protistenkd.* 69: 615-636.
- Gile, G. H. & Keeling, P. J. 2008. Nucleus-encoded periplastid-targeted EFL in chlorarachniophytes. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1967-1977.
- Gilson, P. R., Su, V., Slamovits, C. H., Reith, M. E., Keeling, P. J. & McFadden, G. I. 2006. Complete nucleotide sequence of the chlorarachniophyte nucleomorph: nature's smallest nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 9566-9571.
- Hempel, F., Bullmann, L., Lau, J., Zauner, S. & Maier, U. G. 2009. ERAD-derived preprotein transport across the second outermost plastid membrane of diatoms. *Mol. Biol. Evol.* 26: 1781-1790.
- Hibberd, D. J. & Norris, R. E. 1984. Cytology and ultrastructure of *Chlorarachnion reptans* (Chlorarachniophyta division nova, Chlorarachniophyceae classis nova). *J. Phycol.* 20: 310-330.
- Hirakawa, Y., Burki, F. & Keeling, P. J. 2011. Nucleus- and nucleomorph-targeted histone proteins in a chlorarachniophyte alga. *Mol. Microbiol.* 80: 1439-1449.
- Hirakawa, Y., Burki, F. & Keeling, P. J. 2012. Genome-based reconstruction of the protein import machinery in the secondary plastid of a chlorarachniophyte alga. *Eukaryot. Cell* 11: 324-333.
- Ishida, K., Green, B. R. & Cavalier-Smith, T. 1999. Diversification of a chimaeric algal group, the chlorarachniophytes: phylogeny of nuclear and nucleomorph small-subunit rRNA genes. *Mol. Biol. Evol.* 16: 321-331.
- Ishida, K., Yabuki, A. & Ota, S. 2007. The chlorarachniophytes: evolution and classification. In: Brodie, J. & Lewis, J. (eds.) *Unravelling the Algae: the Past, Present, and Future of Algal Systematics*. pp. 171-182. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- Keeling, P. J. & Archibald, J. M. 2008. Organelle Evolution: what's in a name? *Curr. Biol.* 18: R345-347.
- Moestrup, Ø. & Sengco, M. 2001. Ultrastructural studies on *Bigelowiella natans*, gen. et sp. nov., a chlorarachniophyte flagellate. *J. Phycol.* 37: 624-646.
- Patron, N. J. & Waller, R. F. 2007. Transit peptide diversity and divergence: a global analysis of plastid targeting signals. *BioEssays*. 29: 1048-1058.
- Silver, T. D., Koike, S., Yabuki, A., Kofuji, R., Archibald, J. M. & Ishida, K. 2007. Phylogeny and nucleomorph karyotype diversity of chlorarachniophyte algae. *J. Eukaryot. Microbiol.* 54: 403-410.
- Spork, S., Hiss, J. A., Mandel, K., Sommer, M., Kooij, T. W., Chu, T., Schneider, G., Maier, U. G. & Przyborski, J. M. 2009. An unusual ERAD-like complex is targeted to the apicoplast of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot. Cell* 8: 1134-1145.
- Takahashi, F., Okabe, Y., Nakada, T., Sekimoto, H., Ito, M., Kataoka, H. & Nozaki, H. 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.
- Tanifuji, G., Onodera, N. T. & Hara, Y. 2010. Nucleomorph genome diversity and its phylogenetic implications in cryptomonad algae. *Phycol. Res.* 58: 230-237.
- Tanifuji, G., Onodera, N. T., Wheeler, T. J., Dlutek, M., Donaher, N. & Archibald, J. M. 2011. Complete nucleomorph genome sequence of the nonphotosynthetic alga *Cryptomonas paramecium* reveals a core nucleomorph gene set. *Genome Biol. Evol.* 3: 44-54.
- 谷藤吾朗 2011. ヌクレオモルフの reductive genome evolution. *Jpn. J. Protozool.* 44: 89-102.

(東京大学)