

藻類学最前線

中山卓郎：*Paulinella chromatophora* に見る
一次共生のスナップショット

真核生物はその初期進化において、シアノバクテリアを細胞の中に取り込みオルガネラ化させることで葉緑体を獲得した。この一次共生によって成立した光合成真核生物は、生物多様性や生態系および地球環境に大きな変化を与えたと考えられている（井上 2006）。しかしながら、現在知られている葉緑体においてシアノバクテリアであった頃の面影はほとんど失われており、葉緑体形成過程を類推する手掛かりは限られている。以前の藻類学最前線（中山 2009）において著者は、この問題を打開しうる生物として *Paulinella chromatophora* を紹介した。*P. chromatophora* は、ケルコゾア門に分類される有殻アメーバであり、細胞内に青緑色のシアノバクテリア由来の光合成器官を持つ（この器官に固有の名称は与えられていないが、本稿では葉緑体と区別して便宜的に“有色体”と称する。“シアネレ”とも呼ばれる）。この有色体は他の生物に見られる葉緑体とは異なる起源を持ち、最初に光合成真核生物を生み出した一次共生と比べると、ごく最近獲得された構造であることが示されている（Marin *et al.* 2005）。*P. chromatophora* の有色体は、葉緑体とは対照的にシアノバクテリアの特徴を未だに色濃く残していることから、細胞内共生を通じたオルガネラ進化の中間段階にある非常に稀有な例と考えられており、一次共生の進化過程を知る上で重要なモデルになりうるとして注目されている（中山 2009）。前稿以降も、*P. chromatophora* に見られる細胞内共生関係の研究は着々と続けられ、その実態が徐々に明らかになりつつある。本稿では近年発表された 2 つの大きな研究結果を軸に、最新の *Paulinella* 研究の状況を紹介する。

***Paulinella chromatophora* における EGT 遺伝子群**

葉緑体の初期進化において、もともと共生者が持っていた遺伝子は宿主核ゲノムに転移し（Endosymbiotic Gene Transfer: EGT）、それらの遺伝子がコードするタンパク質は宿主側から供給されるようになったとされる。EGT はミトコンドリアや二次共生葉緑体の進化の上でも起こっており、共生者から宿主核への遺伝子転移は細胞内共生を通じたオルガネラ進化の重要な要素であると言える。前稿において、有色体由来の光化学系 I サブユニット遺伝子 *psaE* が *P. chromatophora* の宿主核から発現していることを紹介した（中山 2009, Nakayama & Ishida 2009）。これにより、有色体は遺伝的にも宿主細胞に統合されていることが明らかとなったが、報告されたのは 1 遺伝子のみであり、*P. chromatophora* における核コード有色体遺伝子群の全体像、そして共生関係においてそれらの遺伝子が担う役割は不明な状況であった。

Nowack *et al.* (2011) は、複数の次世代シーケンス技術を用いて *P. chromatophora* の大規模トランスクリプトーム解析を行い、核コード有色体遺伝子（EGT 遺伝子）の網羅的な把握を試みた。この研究において Nowack *et al.* (2011) は、*P. chromatophora* の標準化 cDNA ライブラリを解析し、約 32,000 のコンティグ配列（総塩基数：12 Mb）を得た。これらの配列の中から、相同性検索と分子系統解析を用いた慎重な選定の結果、32 の核コード有色体遺伝子が予測された。これらの遺伝子において特筆すべきことは、コードされるタンパク質の機能の偏りである。32 の有色体由来遺伝子にコードされるタンパク質のうち、22 のタンパク質の機能が予測されたが、そのほぼすべて（21 配列）が光合成に直接的・間接的に関連するタンパク質であった。これらの中には、既に別の培養株を用いた研究で報告されていた *PsaE* に加え、別の光化学系 I サブユニットである *PsaK* および光化学系 II 関連タンパク質 *PsbN* が含まれており、さらにカルビン回路や電子伝達系効率に関わるタンパク質も見られた。なお、予測された EGT 遺伝子配列の平均 GC 含有率（52.5%）は有色体ゲノムコード遺伝子の平均 GC 含有率（40.4%）よりも宿主核コード遺伝子の平均値（49.6%）に近いことや、いくつかの EGT 遺伝子に関してはイントロンの挿入が確認されていることから、これらの有色体由来遺伝子は宿主核ゲノムに“順化”していることが窺える。

Nowack *et al.* (2011) の研究によって発見された EGT 遺伝子は 1-2 コピーのものがほとんどであったが、その中で HLIP (High Light-Inducible Protein) をコードする遺伝子は 12 コピーが発見された。これは発見された全 EGT 配列の実に 37% を占める。HLIP はシアノバクテリアに見られる 60 アミノ酸残基程度の小さなタンパク質で、強光をはじめとする種々のストレスに応答して発現する（Heddad *et al.* 2012）。HLIP の詳細な機能は未だに明らかにされていないが、強光環境下などで発生する過剰な光エネルギーの消去に関連すると考えられている。面白いことに発見された EGT タンパク質のうち、さらに 2 つのタンパク質（Glutathione S-transferase, Carotenoid desaturase）も過剰光エネルギー対応に関連すると予想される。これに関連して、Dorrell & Howe (2012) は光合成生物を細胞内に共生させることのリスクについて取り上げている。宿主細胞は光合成生物を細胞内に取り込むことで光合成産物を享受できるが、その反面細胞内で光合成を行わせることは活性酸素の発生という危険性を孕んでいる。光合成のキャパシティを超えた強光や光合成不全によって、行き場を失った余剰エネルギーが発生した場合、最終的に活性酸素が作られる。細胞に内在する共生者

が活性酸素を発生させてしまった場合、宿主細胞もこの活性酸素によるダメージを避ける事はできないだろう (Dorrell & Howe 2012)。つまり宿主細胞からすれば、共生した光合成生物はエネルギーを生産してくれる協力者であると同時に、扱いを誤れば自身に害を及ぼす“諸刃の剣”であるという見方もできる。これを踏まえると、共生者の光合成の過程で発生しうる過剰エネルギーの処理は、永続的な細胞内共生関係を築くにあたって非常に重要であると考えられる。*P. chromatophora* においても、HLIP 遺伝子など余剰エネルギー除去に関わる遺伝子を宿主がコントロールすることによって、有色体の安全な制御・運用を実現しているのかもしれない。また HLIP は、様々な光合成真核生物において主要光合成アンテナとして働いている LHC ファミリータンパク質 (すべての生物において核ゲノムにコードされる) の起源とも考えられており (Heddad *et al.* 2012), HLIP 遺伝子の EGT は既知の一次共生においても同様に起きたものと考えられる。

Nowack *et al.* (2011) は EGT 遺伝子の総転写産物に占める割合から、*P. chromatophora* の全核コード遺伝子のうち、0.3-0.8% が有色体ゲノム由来であるだろうと予想している。対して、*Arabidopsis* や *Cyanidioschyzon* では 14% 以上が

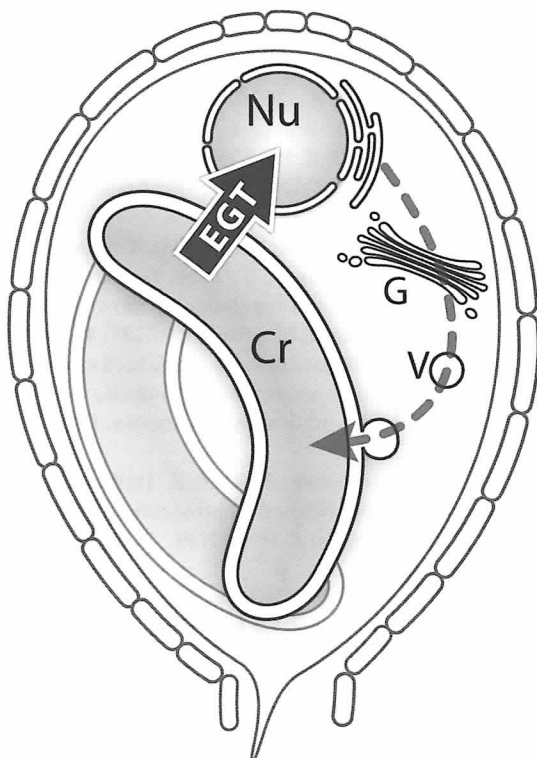


図1 *Paulinella chromatophora* における PsaE の輸送経路。破線矢印: 予想される PsaE の輸送経路, EGT: Endosymbiotic Gene Transfer, Cr: 有色体, Nu: 宿主核, G: ゴルジ体, V: ゴルジ体由来の小胞。

葉緑体由来であると予想されており、これらと比較すると *P. chromatophora* の EGT 遺伝子は非常に少ない。しかしながら、有色体が他の一次葉緑体と比べてごく最近獲得されたこと (Marin *et al.* 2005), 有色体ゲノムはいまだ縮小を続けていること (Nowack *et al.* 2008) を踏まえると、核への遺伝子の移動はこれからも継続して起きていくことが予想される。加えて、細胞内共生における宿主と共生者の統合を考える上では、EGT 以外にも他の生物からの遺伝子水平転移 (Horizontal Gene Transfer: HGT) によって獲得された遺伝子や、もともと宿主が持っていた遺伝子の関与も無視できない。近年の研究ではミトコンドリアや葉緑体でも、EGT 以外の由来をもつタンパク質が多く働いていることが示されている (Suzuki & Miyagishima 2010, Gross & Bhattacharya 2011)。しかし、後述のように *P. chromatophora* から発見された EGT 遺伝子/タンパク質の一次配列には輸送配列などの共通性が見られないため、共生体以外の由来を持つ核コード有色体タンパク質を、ゲノム配列解読やトランスクリプトーム解析だけから探索するのは困難である。これらを解明するには、プロテオーム解析などで実際に有色体に局在するタンパク質を網羅的に解析する必要があるだろう。

タンパク質輸送の証明

核ゲノムにコードされたミトコンドリアタンパク質や葉緑体タンパク質は、宿主の細胞質で翻訳されたのち、高度に発達したタンパク質輸送装置 (Tim/Tom および Tic/Toc; Schmidt *et al.* 2010, Gould *et al.* 2008) によって選択的にオルガネラ内へと輸送される。その過程において荷札として働くのが、一般的に前駆体タンパク質の N 末端に存在する輸送配列である。

P. chromatophora から見つかった EGT タンパク質のほとんどが光合成に関連したものであるという事実は、これらのタンパク質が有色体内で機能していることを強く示唆している。しかし、奇妙なことにこれまでに発見された EGT タンパク質配列の N 末端には付加的な配列は確認されず、また EGT タンパク質の一次配列に共通するようなパターンも見つからなかった (Nowack *et al.* 2011)。このためトランスクリプトーム解析によって *P. chromatophora* の EGT に関する知見が蓄積された一方で、これらのタンパク質が実際に有色体へ運ばれていることへの確証は得られない状況であった。そのような中、Nowack & Grossman (2012) は *P. chromatophora* の EGT タンパク質が実際に有色体内で機能していることを、生化学的手法を用いて証明することに成功した。

Nowack & Grossman (2012) は有色体のチラコイド膜から光化学系 I を単離し、ウェスタンブロッティングおよび構成タンパク質の N 末端アミノ酸配列分析によって、単離された光化学系 I の中に宿主核ゲノムにコードされる PsaE および PsaK が組み込まれていることを確認した。さらに、これら核コード光化学系サブユニットタンパク質の存在量が 80S

リボソーム（真核生物型リボソーム）の活性阻害によって減少することから、これらのタンパク質は有色体ではなく宿主側のリボソームによって翻訳されていることも明らかになった。これらのことは、宿主核ゲノムにコードされた EGT タンパク質が細胞質から有色体に供給されていることを示す頑健な証拠である。また Nowack & Grossman (2012) は免疫電子顕微鏡法によって PsaE タンパク質が有色体に特異的に局在することを示し、PsaE が選択的に有色体内へと運ばれていることを示した。

興味深いことに、免疫電子顕微鏡法において標識されたのは有色体だけではなく、PsaE 抗体を標識した金粒子は有色体チラコイドの他に、ゴルジ体上にも有意に蓄積し、PsaE タンパク質がゴルジ体にも一定量存在することが示された。これは *P. chromatophora* が、一般的な葉緑体に見られるタンパク質輸送法とは異なる、ゴルジ体を介した経路で PsaE を有色体に運んでいることを示唆している。*P. chromatophora* の宿主細胞で翻訳された PsaE はゴルジ体に運ばれ、そこからさらに小胞で有色体へと運ばれると考えられる（図 1）。陸上植物の葉緑体タンパク質においても、ゴルジ体を通じて輸送される例が報告されており、また同様のシステムは渦鞭毛藻やユーグレナ藻が持つ二次葉緑体へのタンパク質輸送にも利用されている (Bhattacharya *et al.* 2007, Gould *et al.* 2008)。このようにゴルジ体を介した葉緑体へのタンパク質輸送系の確立は、真核生物の進化の中で複数回起きたと考えられる。葉緑体の獲得時、新たに加わった細胞内区画にタンパク質を供給する上で、すでに存在するゴルジ体を介した輸送経路を流用するのは合理的であるのかもしれない。

一方で輸送配列に関する謎は残されたままだ。一般的にゴルジ体を通るタンパク質は N 末端にシグナルペプチドを持つが、現在までに得られている EGT 遺伝子の塩基配列および EGT タンパク質の N 末端配列のデータからは、PsaE および他の EGT タンパク質の前駆体がシグナルペプチドを持つ証拠は得られていない。しかし、様々なタンパク質の輸送を仕分けるゴルジ体を通り特定の場所へ輸送されるためには、何かしらの識別要素が必要なのは確かである。加えて、今回輸送経路が示唆された PsaE 以外の EGT タンパク質が、PsaE とは異なる方法で輸送されている可能性も否定できない。生まれて間もないオルガネラである有色体へのタンパク質輸送には、ある一定の輸送経路が画一的に使われるのではなく、複数の経路が存在する可能性もあるだろう。植物の葉緑体に見られる Tic/Toc のような洗練されたシステムも、進化の中の“実験”とも言えるような試行錯誤の末に生まれ、後に主流の経路として様々なタンパク質の輸送に流用されるようになったとする見方もある (Bhattacharya *et al.* 2007)。

近年、主に分子生物学的な手法で研究されてきた *P.*

chromatophora だが、Nowack & Grossman (2012) による生化学的なアプローチにより、塩基配列からは得られなかった重要な知見がもたらされた。*P. chromatophora* は培養が難しく、モデル生物などと比較すると取り扱いが容易でないが、今後も様々な手法・視点で研究が進むことが期待される。

引用文献

- Bhattacharya, D., Archibald, J. M., Weber, A. P. M. & Reyes-Prieto, A. 2007. How do endosymbionts become organelles? Understanding early events in plastid evolution. *BioEssays* 29: 1239-1246.
- Dorrell, R. G. & Howe, C. J. 2012. What makes a chloroplast? Reconstructing the establishment of photosynthetic symbioses. *J. Cell Sci.* 125: 1865-1875.
- Gould, S. B., Waller, R. F. & McFadden, G. I. 2008. Plastid evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 491-517.
- Gross, J. & Bhattacharya, D. 2009. Mitochondrial and plastid evolution in eukaryotes: an outsiders' perspective. *Nat. Rev. Genet.* 10: 495-505.
- Heddad, M., Engelken, J. & Adamska, I. 2012. Light stress proteins in viruses, cyanobacteria and photosynthetic eukaryota. In: Eaton-Rye, J. J., Tripathy, B.C. & Sharkey, T.D. (eds.) *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Vol. 34, *Photosynthesis: Plastid Biology, Energy Conversion and Carbon Assimilation*. pp. 299-317. Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht.
- 井上 勲 2007. 藻類 30 億年の自然史 藻類から見る生物進化・地球・環境. 東海大学出版会. 神奈川.
- Marin, B., Nowack, E. C. M. & Melkonian, M. 2005. A plastid in the making: Evidence for a second primary endosymbiosis. *Protist* 156: 425-432.
- Nakayama, T. & Ishida, K. 2009. Another acquisition of a primary photosynthetic organelle is underway in *Paulinella chromatophora*. *Curr. Biol.* 19: R284-R285.
- 中山卓郎 2009. 新たな一次葉緑体の獲得 -*Paulinella chromatophora* に見られる共生関係-. *藻類* 57: 98-100.
- Nowack, E. C. M., Vogel, H., Groth, M., Grossman, A. R., Melkonian, M. & Glockner, G. 2011. Endosymbiotic gene transfer and transcriptional regulation of transferred genes in *Paulinella chromatophora*. *Mol. Biol. Evol.* 28: 407-422.
- Nowack, E. C. M., Melkonian, M. & Glockner, G. 2008. Chromatophore genome sequence of *Paulinella* sheds light on acquisition of photosynthesis by eukaryotes. *Curr. Biol.* 18: 410-418.
- Nowack, E. C. M. & Grossman, A. R. 2012. Trafficking of protein into the recently established photosynthetic organelles of *Paulinella chromatophora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* in press.
- Schmidt, O., Pfanner, N. & Meisinger, C. 2010. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 655-667.
- Suzuki, K. & Miyagishima, S. Y. 2010. Eukaryotic and eubacterial contributions to the establishment of plastid proteome estimated by large-scale phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 27:581-590.

(ダルハウジー大学)