



## 藻類進化における“空白の歴史”の解明を目指して ~ 157 遺伝子解析によって明らかにされた *Palpitomonas* の系統的位置とクリプト藻の進化

矢吹彬憲

2006年7月、私はパラオ共和国にいた。山形大学の半澤直人教授、原慶明教授（現・同大名誉教授）のご厚意により、ロックアイランドでのサンプリングに同行させていただいていたのである。私は筑波大学大学院の学生（当時）として、新規原生生物の発見を目的に海藻や砂など、周りにあるものを気の向くままに採集していた。時折、海に潜り海底に沈んだ倒木の欠片を採集したり、陸上で蠍や巻貝を見つけてはしゃいだりもしていた。“何か大発見”したい、というかなり漠然とした欲望に支配されていた若い私の目は、パラオのキラキラ光る水面とは裏腹に、ガラガラした光を放っていたことと思う。その甲斐あってか、私はこのサンプリングで、既知の主要な生物群が誕生する以前に誕生・分岐したと考えられる原生生物（後に科以上の分類学的所属が不明な新属新種 *Palpitomonas bilix* として記載）に出会うことができた。本稿では *P. bilix* の発見によって明らかになったクリプト藻の進化について、*P. bilix* の記載論文（Yabuki *et al.* 2010）に加え、筆者らが最近報告した大規模分子系統解析の結果（Yabuki *et al.* 2014）を踏まえつつ紹介させていただく。

*Palpitomonas bilix* は、パラオ共和国メケルカル島の船着き場側の海底より得られた沈木片の培養サンプルから単離された従属栄養性の原生生物である。細胞長は約 5  $\mu\text{m}$  で 2 本のほぼ等長な鞭毛（長さは約 20  $\mu\text{m}$ ）を有し、細胞が常にフルフルと震えるという特徴を持つ（図 1）。電子顕微鏡観察によって、一部の緑色植物と類似した鞭毛装置と、クリプト藻や *Telonema*（系統的位置が不明瞭な従属栄養性の原生生物）と類似した鞭毛小毛、これまでに報告のない L 字型に湾曲したマイクロボディなどの特徴を持つことが示されている（Yabuki *et al.* 2010）。また Yabuki *et al.* (2010) 内で行われた保存性の高い核コードの 6 遺伝子配列を用いた分

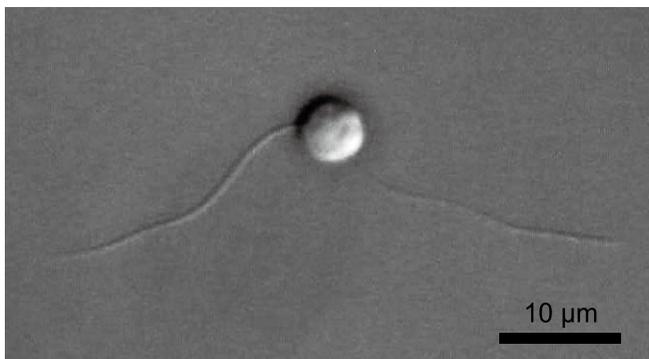


図 1. *Palpitomonas bilix* の光学顕微鏡像。

子系統解析からは、“一次植物”と“クリプト藻（クリプト藻やカタブレファリス類を含む生物群）”のいずれかに近縁である可能性が示されており、これらの結果から、*P. bilix* は高次分類群レベルで新規な原生生物で、一次植物あるいはクリプト藻の誕生や初期進化を理解するためのカギを握る生物であると期待された。

藻類を含む様々な光合成生物が有する葉緑体は、もとを辿れば太古の昔に真核生物によって細胞内に取り込まれたシアノバクテリアであり、現在の多様な光合成生物を生み出すもとなつたシアノバクテリアの細胞内共生、すなわち一次共生は、真核生物進化の中でたった 1 度だけ起こったイベントだと考えられている（*Paulinella chromatophora* の例を除く）。しかしながら、始原植物細胞のホストに関する理解、すなわち、一次共生を引き起こした真核生物の形態、生活環、ゲノム情報を含めた性質に関する知見は乏しい。また、一次共生によって誕生した植物群（緑色植物、紅色植物、灰色植物）が他の系統に属する真核生物に取り込まれ葉緑体へと進化した二次共生は、真核生物進化の中で複数回起こったことは周知の事実である一方で、二次共生が何回どの系統で起こったのかに関しても、未だに明瞭な答えが得られていない。

著者らは、*P. bilix* の系統的位置を明らかにすることによって、藻類進化をより詳細に理解するための新知見（具体的には、一次植物の共通祖先である捕食性原生生物の細胞像、あるいはクリプト藻を含む巨大生物群であるクリプト藻の祖先生物の細胞像）が得られると期待し、大規模アライメントを用いた分子系統解析を行った（Yabuki *et al.* 2014）。解析を行うにあたり、次世代シーケンサー Roche 454 GS-FLX を用いた *P. bilix* の RNA シーケンスを行い、多数の遺伝子配列を得た。*Palpitomonas bilix* はクリプト藻との近縁性も示唆されていることから、クリプト藻周辺の生物に関する分子情報も充実していることが、解析を行う上で望ましい。そこで、著者らは *P. bilix* に加え、クリプト藻綱の姉妹生物群であるゴニオモナス綱に属する *Goniomonas* sp. についても同様に RNA シーケンスを行い、得られた配列を解析に加えた。解析は、一般的な手法に則って、単一遺伝子の解析（パラログや水平伝播による遺伝子でないかの確認）、連結アライメントの作成、モデル選定、最尤法・ベイズ法による系統樹の作成、及び統計的支持の計算を行った。その結果、*P. bilix* は、*Guillardia theta*, *Rhodomonas salina*（ともにクリプト藻綱）、*Goniomonas* sp.（ゴニオモナス綱）、*Roombia truncata* [リューコクリプトス上綱（カタブレファ

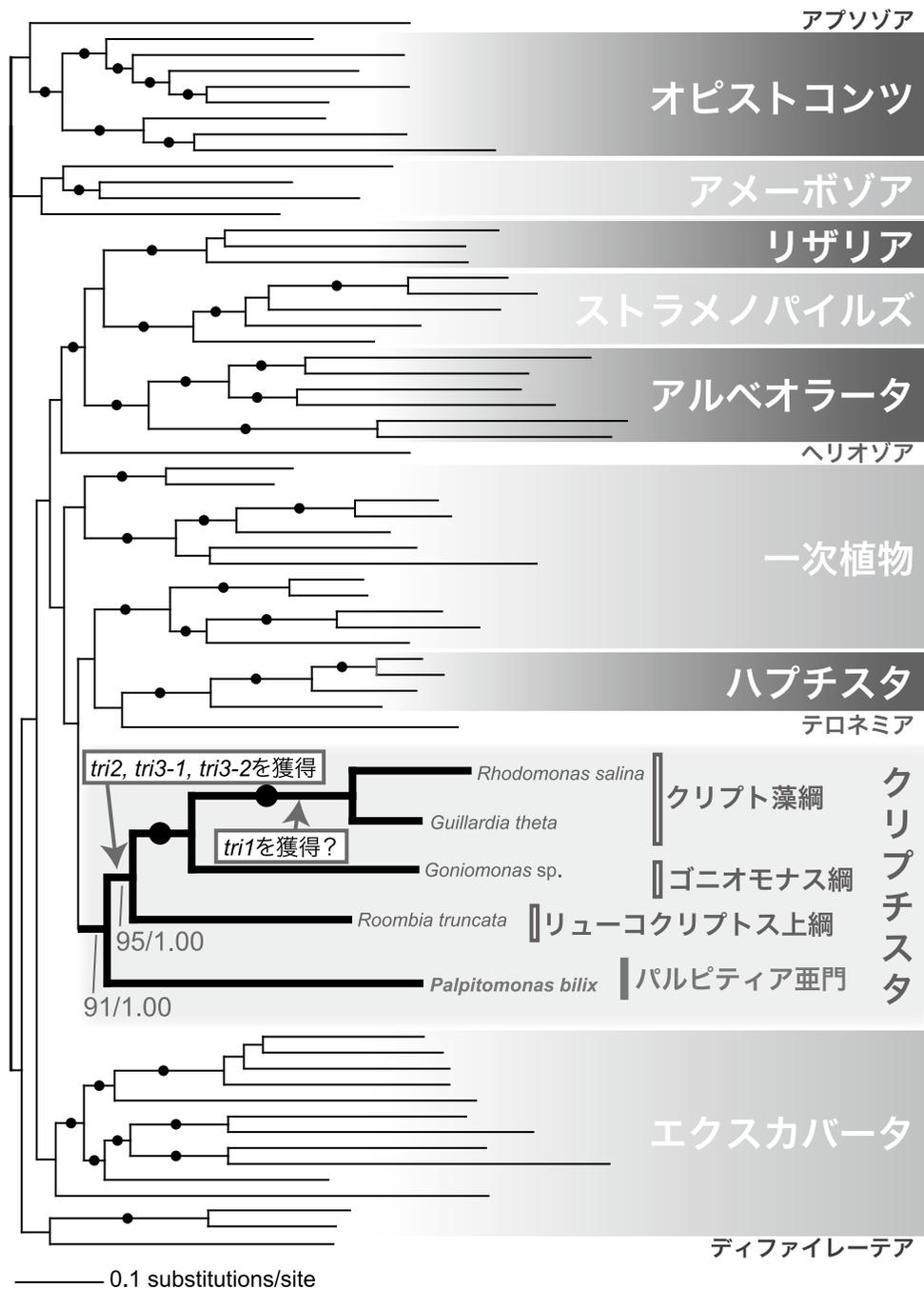


図2. 157 遺伝子 (41,372 アミノ酸残基) の連結解析により復元された主要な真核生物の系統関係。黒丸は、最尤法によるブートストラップ値 100%, ペイズ法による事後確率 1.00 で支持された部分を示している。Yabuki *et al.* (2014) をもとに作図。

リス類) ] からなる系統群の根元から分岐することが高い統計的支持とともに示された(図2)。今回示された系統関係は、Yabuki *et al.* (2010) で一部の形態形質と部分的な分子系統解析の結果から示唆されたクリプト藻との近縁性を支持するものであると同時に、Cavalier-Smith (2013) によって示された分類体系、すなわち *P. bilix* をクリプチスタ門内に設立されたパルピティア亜門へ分類し、他のクリプチスタのメンバーとは亜門のレベルで区別する分類体系を支持するもので

あった(表1)。これらの結果は、*P. bilix* はクリプチスタ門内の祖先的な系統であり、クリプチスタの初期進化を議論する上で極めて重要な生物であることを示している。

著者らの解析によって示された *P. bilix* を含むクリプチスタのメンバー間の系統分岐関係をもとに、クリプチスタ門内における各形態形質の獲得・消失を最節約的に考察すると、祖先的なクリプチスタ生物は *P. bilix* によく似た生物であり、クリプトモナス類(クリプト藻 + *Goniomonas*) で見られる

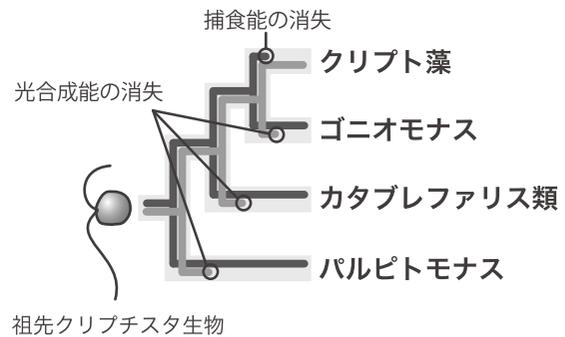
表 1. Cavalier-Smith (2013) によって提案されたクリプチスタ門の分類体系。

門	亜門	上綱	綱	代表種
クリプチスタ門 (Cryptista)	ローロモナディア亜門 (Rollomonadia)	クリプトモナス上綱 (Cryptomonada)	クリプト藻綱 (Cryptophyceae)	<i>Guillardia theta</i> , <i>Cryptomonas paramecium</i>
			ゴニオモナス綱 (Goniomonadea)	<i>Goniomonas truncata</i>
		リュウコクリプトス上綱 (Leucocrypta)	リュウコクリプトス綱 (Leucocryptea)	<i>Leucocryptos marina</i> , <i>Roombia truncata</i>
	バルピティア亜門 (Palpitia)		バルピテア綱 (Palpitea)	<i>Palpitomonas bilix</i>

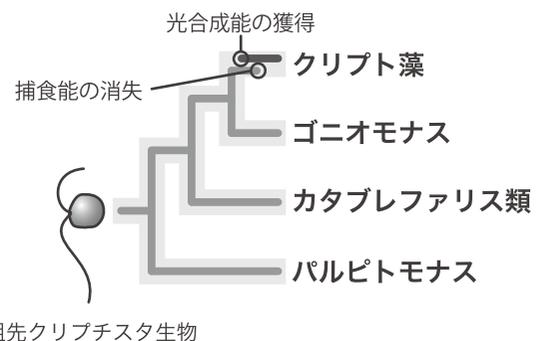
ペリプラストやカタブレファリス類で見られる細胞を覆う鞘状構造は、各系統でそれぞれ独立に獲得されたものであることが示唆された。推定された各形態形質の進化に関する詳細は、原著論文をご参照いただきたい。本稿では、*P. bilix* 以外のクリプチスタ生物で確認される射出装置であるエジェクティソーム *ejectosome* と栄養様式の進化について、もう少し紙面を割いて紹介させていただく。

エジェクティソーム（トリコシスト *trichocyst* と呼ばれる場合もある）は、コイル状に丸められたリボン様の構造をもった射出装置であり、これまでにクリプト藻、*Goniomonas*、カタブレファリス類、プラシノ藻 *Pyramimonas* 属の数種から報告されている。また繊毛虫の *kappa particle* と呼ばれる共生バクテリアが有する R-body もエジェクティソームに類似していることが指摘されていた。最近になってクリプト藻の一種 *Pyrenomonas helgolandii* よりエジェクティソームが単離・精製され、その構成遺伝子 (*tri1*, *tri2*, *tri3-1*, *tri3-2*) が同定された結果、それらの遺伝子は R-body を構成する遺伝子である *rebB* のホモログであることが報告された (Yamagishi *et al.* 2012)。そこで著者らは、これらの遺伝子がクリプチスタに属す生物の中で保存されているのか、エジェクティソームを持たない *P. bilix* には存在しないのかを検証すべく、著者らが構築した *P. bilix*, *Goniomonas* sp. の RNA シーケンスのデータを含め、現在公開されているクリプチスタ生物のゲノム/トランスクリプトームデータから *tri* 遺伝子の探索を行った。その結果、*tri2*, *tri3-1*, *tri3-2* 遺伝子はエジェクティソームを有する全てのクリプチスタ生物（クリプト藻、*Goniomonas*、カタブレファリス類）から検出された一方で、*tri1* はクリプト藻である *Guillardia theta*（及び *Pyrenomonas helgolandii*）からのみ検出された。形態観察からエジェクティソームが確認されていなかった *P. bilix* からは、予想通りいかなる *tri* 遺伝子も検出されなかった。この結果から、これまでクリプチスタの主要な特徴の一つと考えられてきたエジェクティソームは、*P. bilix* が共通祖先より分岐した後にクリプトモナス類とカタブレファリス類の共通祖先で獲得されたものであると示唆された（図 2）。*tri1* が、*Goniomonas* /カタブレファリス類から検出されなかったことについては、遺伝子配列が大きく変化しており検出で

きなかっただけである可能性も否定できないものの、クリプト藻のエジェクティソームにのみ関与する遺伝子である可能性が示唆された。シーケンス技術の向上とともに、様々な非モデル生物においても分子情報の充実が進んでいる。藻類の様々な形態形質も、今後は構造の有無に加え、その構造をつかさどる遺伝子の存在も含めて議論されるようになるであろう。今回、クリプチスタ内におけるエジェクティソームの



A. 祖先クリプチスタ生物が光合成性と仮定した場合



B. 祖先クリプチスタ生物が従属栄養性と仮定した場合

図 3. 157 遺伝子 (41,372 アミノ酸残基) の連結解析により復元された系統関係をもとに推定したクリプチスタ生物の栄養様式に関する 2 つの進化モデル。A. 祖先クリプチスタ生物が光合成性と仮定した場合 (クロムアルベオラータ仮説) に推定される栄養様式の進化。B. 祖先クリプチスタ生物が従属栄養性と仮定した場合に推定される栄養様式の進化。Yabuki *et al.* (2014) をもとに作図。

獲得進化について、その構成因子である *tri* 遺伝子の有無に関する情報も含めて議論出来たことは有意義であったと考えている。

真核生物における光合成能の獲得／消失に関する議論は、これまでも様々な研究者によってなされてきた。従属栄養性生物である *P. bilix* がクリプチスタの根元より分岐するという新知見は、何を意味し、光合成能の獲得／消失に関する議論にどのような影響を与えるのだろうか。クリプト藻を含む紅藻由来の二次葉緑体を有する藻類（不等毛藻、ハプト藻、渦鞭毛藻など）は、共通祖先を有し、その祖先生物において紅藻の共生と葉緑体としての確立が起こったという仮説（すなわちクロムアルベオラータ仮説）が提唱されている（Cavalier-Smith 1999）。この仮説の是非については、未だ議論の最中であるが、クロムアルベオラータ仮説を踏襲しつつ、クリプチスタ内での生活様式の進化を推定すると、*P. bilix*、カタブレファリス類、*Goniomonas* の3系統でそれぞれ独立に光合成能を消失したことになる。また現生のクリプト藻では捕食能は確認されないが、これもクリプト藻が *Goniomonas* と分岐した後になってから消失したと推定される（図3A）。その一方で、祖先的クリプチスタ生物が従属栄養性の生物であったと仮定するならば、クリプト藻の葉緑体は独立に獲得したと推定され、クリプチスタ内での生活様式の進化は、クロムアルベオラータ仮説を踏襲して推定する場合よりも、より節約的に説明できることになる（図3B）。また、*P. bilix* / *Goniomonas* sp. のRNAシーケンスのデータからは、光合成関連遺伝子以外の葉緑体関連遺伝子（例えば、非メバロン酸経路関連遺伝子）の存在も確認されず、*P. bilix* / *Goniomonas* sp. が二次的に葉緑体を失ったという仮説を支持する積極的な証拠はみつからなかった（矢吹・未発表データ）。これらのデータに基づけば、クリプト藻の葉緑体は独立に獲得されたようにも考えられる。しかしながら、紅藻系列の葉緑体の獲得回数については、様々な研究者によって様々なアイデアが提唱されており、慎重な議論とともにさらなるデータの蓄積が必要であろう。*Palpitomonas bilix* と同様に光合成生物との近縁性が示唆されている、あるいは既に近縁性が示されている従属栄養性の原生生物たち [例えば、*Dallingeria* や *Macapella* (Patterson & Zöllffel 1991), あるいは *Colponema* (Janouškovec *et al.* 2013)] に着目した研究が進むことによって、今後この問題が解明されることを期待したい。

藻類を含む多様な原生生物たちの関係性は、大海原とそこに点在する島々にしばしば例えられる。海が様々な原生生物を含んだ界全体で、島々が系統的に独立したそれぞれの藻類グループということである。その世界の中で、我々藻類学者は、壮大な海に点在する島々を巡り旅する探検家や海賊なのかもしれない。先の藻類学会では、現・基生研の丸山真一郎博士が、「これからの藻類学は、こうした島々が誕生した進化のプロセスそのものを明らかにする方向へと発展していく必要があるのかもしれない」と賢察されていた。まさに、大海賊時代の幕開けである。私がパラオ共和国で出会った *P. bilix* の生まれ故郷を探す旅は、“クリプチスタ”という島にたどり着いたことで終焉を迎えたことになる。そして、これからはクリプチスタという島がどのようにして出来たのか、それが本当に島なのか、または大きな大陸の一部なのか、を明らかにする旅が本格化すると思われる。その旅には、今回の旅の中で得られた知見が大きな助けとなるであろう。この連続した旅の果てに、多様な藻類を“ひとつなぎ”に理解する大秘宝を得たいと思う。

## 引用文献

- Cavalier-Smith, T. 1999. Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: Euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46: 347-366.
- Cavalier-Smith, T. 2013. Symbiogenesis: Mechanisms, evolutionary consequences, and systematic implications. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 44: 145-172.
- Janouškovec, J., Tikhonenkov, D. V., Mikhailov, K. V., Simdyanov, T. G., Aleoshin, V. V., Mylnikov, A. P. & Keeling, P. J. 2013. Colponemids represent multiple ancient alveolate lineages. *Curr. Biol.* 23: 2546-2552.
- Patterson, D. J. & Zöllffel, M. 1991. Heterotrophic flagellates of uncertain taxonomic position. In: Patterson, D. J. & Larsen, J. (eds.) *The Biology of Free-living Heterotrophic Flagellates*. pp. 427-475. Clarendon press Oxford.
- Yabuki, A., Inagaki, Y. & Ishida, K. 2010. *Palpitomonas bilix* gen. et sp. nov.: a novel deep-branching heterotroph possibly related to Archplastida or Hacrobia. *Protist.* 161: 523-538.
- Yabuki, A., Kamikawa, R., Ishikawa, S. A., Kolisko, M., Kim, E., Tanabe, A. S., Kume, K., Ishida, K. & Inagaki, Y. 2014. *Palpitomonas bilix* represents a basal cryptist lineage: insight into the character evolution in Cryptista. *Sci. Rep.* 4: 4641.
- Yamagishi, T., Kai, A. & Kawai, H. 2012. Trichocyst ribbons of a cryptomonads are constituted of homologs of R-body proteins produced by the intracellular parasitic bacterium of *Paramecium*. *J. Mol. Evol.* 74: 147-157.

(海洋研究開発機構)