



藻類学最前線 ファイロトランスクリプトミクスで描く渦鞭毛藻類の進化

大沼 亮

渦鞭毛藻類とその進化研究

渦鞭毛藻類は水圏に普遍的に生息する単細胞性藻類であり、一次生産者および他の生物を捕食する消費者をどちらも含む生物群として、水圏生態系にとって重要である。また、本生物群には、人体に有害な神経毒を産生する種や養殖魚介類を死滅させる有害赤潮を引き起こす種も存在し、水産学的にも非常に注目されている。渦鞭毛藻類はパーキンサス類、オキシリス類、シンディニウム類と、明瞭な縦鞭毛と横鞭毛をもつ“コア渦鞭毛藻類”から構成される(図 1A)。渦鞭毛藻類は、細胞殻を有する種と持たない種が存在し、細胞形態のバリエーションに富んだ分類群である。その上、明瞭な葉緑体がある光合成種とその葉緑体を失った非光合成種がおよそ半数ずつ混在している。このように、渦鞭毛藻類は細胞形態と葉緑体機能のいずれにおいてもドラマチックな進化を遂げた藻類である。しかしながら、渦鞭毛藻類では、全ゲノム配列が解読されている種や、網羅的な発現遺伝子解析(トランスクリプトーム解析)がされている種に限られているため、複数遺伝子または複数アミノ酸配列を結合させた系統解析を広範な渦鞭毛藻類を用いて行っている研究は少なかった(Bachvaroff *et al.* 2014, Orr *et al.* 2012)。それ故に、コア渦鞭毛藻類において渦鞭毛藻の属や科の間の関係性は長らく解明されておらず、本生物群全体を俯瞰した細胞形態および葉緑体進化の解明は非常に困難であった。次世代シーケンサー(Next Generation Sequencer; NGS)は、生物の持つ情報を塩基配列として短時間にかつ大量に取得できる。この技術を活用することによって、渦鞭毛藻類のゲノム情報またはトランスクリプトーム情報を取得し、細胞内でどのような代謝が行われているかを網羅的に予測することも可能となった(e.g., Hehenberger *et al.* 2016)。また、原則的には、系統解析に使用されるサイトが多ければ多いほど正確な系統解析シグナルをもつサイト数が増えるため、NGSで得られた膨大な配列情報から生物の系統、特により祖先的な分岐順序を推定する研究もされている。トランスクリプトームの情報から系統関係の推定をする手法はファイロトランスクリプトミクス(phylotranscriptomics)と呼ばれ、陸上植物の起源となった緑藻類を推定する研究(Wichett *et al.* 2014)や鱗翅目全体の分岐順序を推定する研究(Bazinet *et al.* 2016)など、系統樹における根元に近い部分の分岐パターンを推定を行うために用いられてきている。University College LondonのJan Janouškovec博士らのグループは、NGSを使い多数の種から取得したトランスクリプトームデータを用いて渦鞭毛藻類の系統推定を行い、渦鞭毛藻類がどのように進化してきたかを多方面から推定した論文を発表した

(Janouškovec *et al.* 2017)。私は渦鞭毛藻類とその葉緑体の進化研究に携わる身として、この論文で胸が熱くなる思いを持ったので、本報をここに紹介したい。なお、本報は渦鞭毛藻類の細胞形態、葉緑体関連代謝、染色体、脂肪酸合成の進化等、盛りだくさんの内容になっているが、紙面の都合上、細胞形態と葉緑体関連代謝の進化に焦点を当てて紹介する。

鎧板の起源はどこか? - 複数アミノ酸配列の系統推定から紐解く形態進化

渦鞭毛藻類は鎧板(よろいばん)と呼ばれる細胞殻の有無によって2つのタイプに分けられる。ここでは鎧板を有する種を有殻渦鞭毛藻類、持たない種を無殻渦鞭毛藻類と呼ぶ。有殻渦鞭毛藻類は、細胞膜直下にあるアンフィエスマ小胞にセルロースを蓄積することで鎧板を作る。この鎧板の配置や枚数は属内や種内で保存されているため、分類の基準として用いられる。一方で、アンフィエスマ小胞中にセルロースが蓄積していない種、または光学顕微鏡では確認できないほどセルロースの板が薄い種があり、これらが無殻渦鞭毛藻類とよばれる(Taylor 1987)。個人的見解としては、渦鞭毛藻類の中には有殻種と無殻種が混在していること、有殻種の鎧板配列には多様なバリエーションがあることは渦鞭毛藻類の形態進化の研究を魅力的なものにしている要因である。その一方、渦鞭毛藻の形態の多様性がどのように進化してきたのかについては不明であった。そこで著者らはまず、進化的に重要であると思われる種8種を選定し、それらのトランスクリプトームデータを取得した。これらと先行研究で得られているトランスクリプトームデータを用いて、最大で43種(アルベオラータ+ストラメノパイル)、101タンパク質を用いて、計29,400アミノ酸サイトのアラインメントデータを構築し、系統樹を作成した。本報で行われた解析の結果から、鎧板獲得の進化に関する以下の4点を抜粋してご紹介する。本報では、

- (1) 有殻種は単系統となること
 - (2) 無殻渦鞭毛藻類は有殻種に対して側系統になること
 - (3) 無殻渦鞭毛藻類 Akashiwo 属が有殻種の姉妹群となること
 - (4) シンビオディニウム科は有殻種の中から派生した系統であること
- が推定された(図 1A)。(1)及び(2)については以前の系統解析によって示唆されていた点であったが、統計学的な支持が低く、解析に使う遺伝子によってトポロジーが変わってしまうという問題があった(Orr *et al.* 2012)。本報ではこれらの分岐順序に高い統計学的支持が得られている。(3)については統計学的支持が低いものの、Approximately Unbiased (AU) 検定

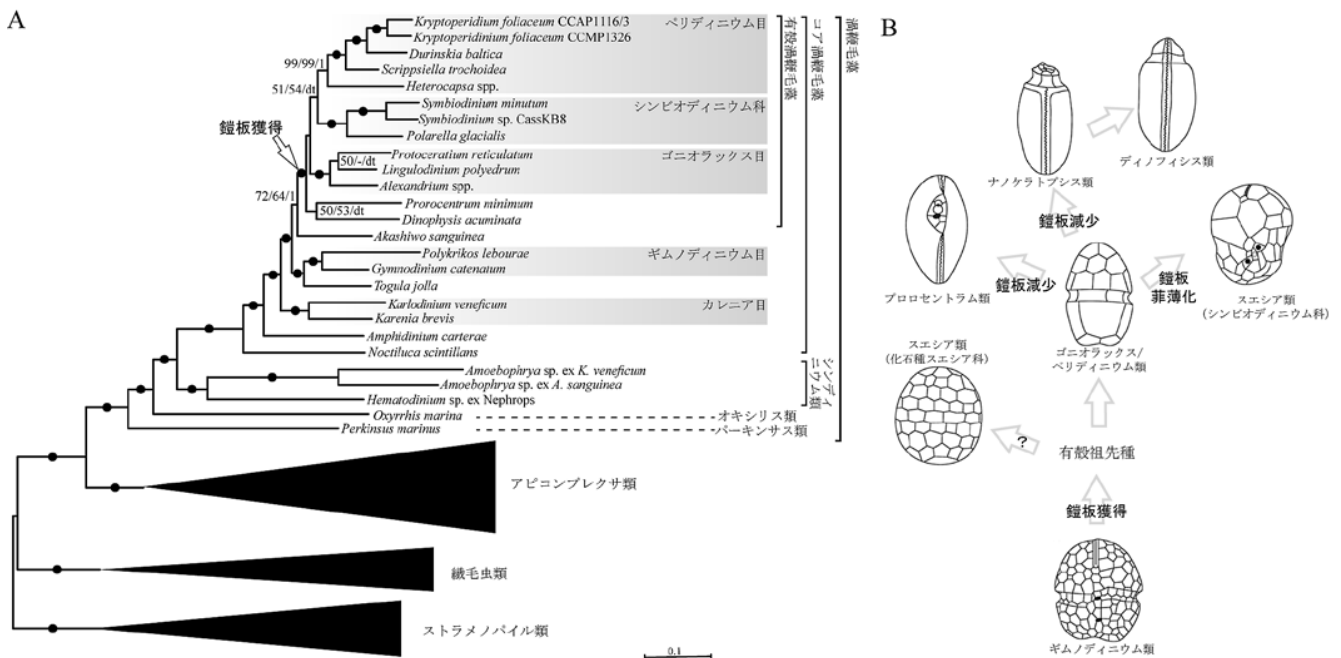


図1 渦鞭毛藻類系統関係とそこから類推される細胞形態進化。(A) 101 タンパク質の 29,400 アミノ酸サイトを用いた最尤系統樹 (原著論文 Fig. 1A を改訂)。系統樹は LG + GAMMA4 + F モデルを用い、IQ-Tree で得られた。枝上の数値は ultrafast bootstraps (IQ-Tree)/nonparametric bootstraps (RAxML)/posterior probabilities (PhyloBayes) を示し、黒丸はこれらの値のすべてが最大であることを示す。(B) 系統解析と化石記録から類推される有殻渦鞭毛藻類の進化仮説 (原著論文 Fig. 2A を改訂)。

によって *Akashiwo* 属がギムノディニウム目よりも先に分岐するトポロジーが棄却されるため、本報の解析では有殻種に最も近い無殻種が *Akashiwo* 属であると推定された。これらの解析によって、コア渦鞭毛藻類の祖先系統は無殻渦鞭毛藻類であり、*Akashiwo* 属との共通祖先から有殻渦鞭毛藻類の祖先が分岐し、その有殻種共通祖先において鎧板の獲得が一度だけ起こったという進化のシナリオが描けることになる。著者らは有殻種の複数アミノ酸配列の系統解析の他に、セルラーゼ遺伝子の系統解析も行っている。このセルラーゼ遺伝子は有殻渦鞭毛藻 *Cryptocodinium cohnii* において細胞周期依存的な発現を示し、そのタンパク質は渦鞭毛藻の鎧板に局在することから、細胞分裂時に鎧板の分解に寄与していると示唆されている。本報で行われた解析によると渦鞭毛藻セルラーゼ遺伝子は単系統になるため、著者らは、この解析結果も鎧板獲得が一回起源であることを支持していると考えている。

図 1A の系統樹では有殻渦鞭毛藻類内における目レベルでの関係性が不明瞭であったため、著者らはさらに、解析に問題があると思われる 2 種の配列を除いて解析を行っている。それによるとゴニオラックス目が始めに分岐し、次にシンビオディニウム科とペリディニウム目がクレードを組むという樹形の尤度が最も高く、それぞれの枝は高い統計学的支持が得られている。本報で得られた系統樹と共に、著者らは有殻種の化石記録から得られる情報を用いて渦鞭毛藻類の進化史を

考察している。シンビオディニウム科と化石種 *Suessia* 属を含むスエシア科は共にその他の有殻種と比べて枚数が多い多列の鎧板をもつことからスエシア目に分類されている。スエシア科の化石記録が *Gonyaulax* 属や *Peridinium* 属に見られるような殻をもつ種類の化石記録よりも古いことから、スエシア目は無殻種から有殻種への進化の中間の段階であるとされてきた (Fensome *et al.* 1999)。しかしながら、本報の解析結果を鑑みると、シンビオディニウム科はゴニオラックス目の分岐よりも後に出現したと考えられることから、少なくともシンビオディニウム科は有殻種の祖先から鎧板の菲薄化と枚数の増加を伴って派生した系統で、スエシア科とは独立に進化した系統であろうと考察している。ディノフィシス目では鎧板の枚数が他の有殻種よりも極端に減っており、現存している渦鞭毛藻の形態のみからではその進化を復元することは難しく、更にこれまでの系統解析でも他の属との類縁性は不明であった (e.g., Handy *et al.* 2009)。残念な事に本解析においても、*Dinophysis* 属の系統的位置は依然として不明瞭なままであった。*Dinophysis* 属については化石種 *Nannoceratopsis* 属を挙げて議論しており、この属は *Gonyaulax-Peridinium* 様鎧板をもった種と *Dinophysis* 類の中間的な鎧板をもっていることから、*Dinophysis* 属は有殻の祖先種から、鎧板枚数の減少を経て進化したと考察している (図 1B)。プロロセントラム目は二枚貝のような大きな 2 枚の鎧板と前端部の 5-14 枚

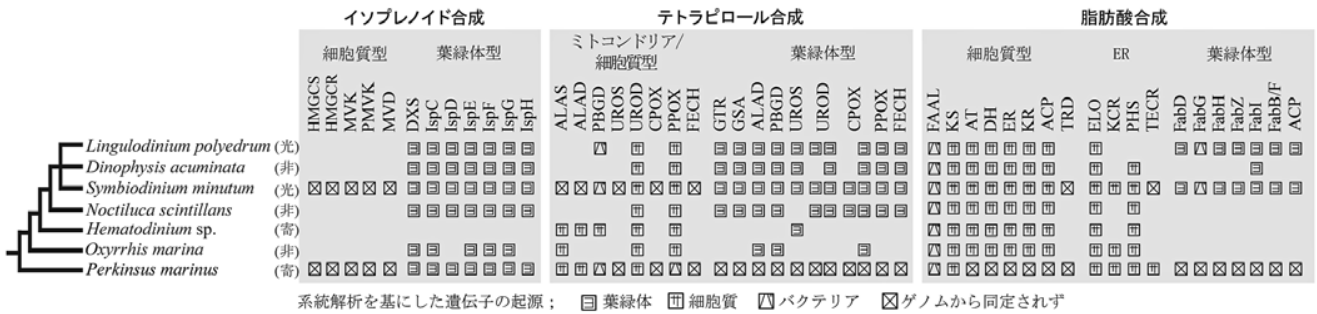


図2 葉緑体型または非葉緑体型の各種代謝に関わる遺伝子群の有無 (原著論文 Fig. 3A を改訂)。*Perkinsus marinus* と *Symbiodinium minutum* はゲノムから、その他はトランスクリプトームから取得された配列を基にしている。空欄は当該遺伝子がトランスクリプトームから見つからなかったことを示す。種名の後ろの (光), (非), (寄) はそれぞれ光合成性, 非光合成性, 寄生性を示す。

の小さな鎧板をもつ渦鞭毛藻類で (Hoppenrath *et al.* 2013), *Gonyaulax-Peridinium* 様の種とは似ても似つかない形態をしている (図 1B)。*Prorocentrum* 属もまた、これまでの研究 (e.g., Zhang *et al.* 2007) と同様に本解析でも確固たる分岐順序の推定はできず、現時点において、この属が果たして *Gonyaulax-Peridinium* 様祖先種から進化したものなのか、それとも全く別の形態をした祖先種から進化したものなのかという点について考察することは難しいと思われる。この属がその他の有殻種のクレードと姉妹群になるようなトポロジーは AU 検定で棄却されたため、少なくとも *Prorocentrum* 属は有殻渦鞭毛藻類から最も先に分岐したのではないらしい (原著論文参照)。しかし、著者らの主張するように *Prorocentrum* 属が *Gonyaulax-Peridinium* 様のより複雑な鎧板をもった祖先種から派生した系統なのかについては今後のさらなる検証が必要であろう (図 1B)。本報でも述べられているが、解析に用いられた種はまだ多いとは言えない。渦鞭毛藻類には、他の属との類縁性が不明であるものがまだまだ残されている。これらのような種の配列情報を蓄積させることによって、更に渦鞭毛藻類の進化史が解明されることが期待される。

葉緑体は何処へ？ - 葉緑体関連遺伝子群の進化

渦鞭毛藻類は葉緑体の進化の観点から見てもとても興味深い。大多数の光合成性渦鞭毛藻類の葉緑体 (ペリディニン型葉緑体) は、渦鞭毛藻類とその姉妹群であるアピコンプレクサ類 (例えばマラリア原虫) の共通祖先が持っていた紅藻由来葉緑体が起源であると考えられている (Janouškovec *et al.* 2010)。コア渦鞭毛藻類以外の渦鞭毛藻類であるパーキンサス類, オキシリス類, シンディニウム類は、コア渦鞭毛藻類に対して側系統となる光合成能を喪失した系統群である (Bachvaroff *et al.* 2014)。コア渦鞭毛藻類も約半数の種が同様に非光合成性種であり、すべての非光合成種が単系統群を形成しないため、以前は独立した複数回の“葉緑体喪失”が起こったと考えられていた (Saldarriaga *et al.* 2001)。従属栄養性への進化がこうも頻繁に起こると、渦鞭毛藻類にとって葉

緑体は重要ではないオルガネラであると錯覚してしまいそうだが、実はそうではないらしい。*Perkinsus marinus* (Mackin, Owen & Collier) Levine, *Oxyrris marina* F. Dujardin, *Cryptecodinium cohnii* (Seligo) Javornicky の発現遺伝子解析から葉緑体に由来すると思われる遺伝子が複数見つかっており、光合成能は失っていても葉緑体関連遺伝子を保持し続けているという報告がある (Sanchez-Puerta *et al.* 2007, Matsuzaki *et al.* 2008, Slamovits & Keeling 2008)。このように、葉緑体関連遺伝子から探る渦鞭毛藻の進化も魅力的な知見を内包しているようである。

前述のように、以前は渦鞭毛藻類の約半数が葉緑体を喪失したと考えられていた (Saldarriaga *et al.* 2001) が、これは見かけ上、“光合成色素を含んでいてチラコイド膜やピレノイドなどの明瞭な構造をもつ葉緑体がない”という形態観察に基づくもので、核には葉緑体に関連する遺伝子が残っている。それでは、光合成能の喪失を繰り返してきた渦鞭毛藻類において葉緑体関連遺伝子はどのように進化してきたのだろうか。著者らは、他の光合成性生物の葉緑体関連遺伝子と単系統を形成する“葉緑体型”のイソプレノイド、テトラピロール (クロロフィルとヘムの前駆体)、脂肪酸合成遺伝子群を探索した。ミゾゾア (渦鞭毛藻+アピコンプレクサ) 内においてそれらの遺伝子が残っているか喪失しているかを系統樹上にマップすることで、葉緑体関連遺伝子の進化を類推した。ここでは煩雑になるのを避けるため、コア渦鞭毛藻類を中心として紹介する。コア渦鞭毛藻類内を見ると、光合成性か非光合成性かに関わらず、イソプレノイド合成遺伝子群は非メバロン酸経路 (葉緑体型) のみで、細胞質型のメバロン酸経路はもっていないらしい (図 2)。また、テトラピロール合成においてはミトコンドリア型の 2~3 遺伝子を保持しているが完全ではなく、葉緑体型遺伝子群の欠失は (ほぼ) ないので、テトラピロール合成も葉緑体型の経路に依存していると推察されている (図 2)。ゲノム情報を用いた訳ではないので確証は得られないが、葉緑体型の脂肪酸合成遺伝子群は非光合成性渦鞭毛藻で発見されず (図 2)、これは光合成能の喪失と関連して起きた消失であると著者らは論じている。こ

のようなことから、ペリディニン型葉緑体の光合成能の有無に関わらず、少なくともイソプレノイドとテトラピロールの合成には葉緑体型の遺伝子群が関わっていることが示唆される。次に、本報で得られた非光合成性渦鞭毛藻類 *Noctiluca* 属, *Oxyrrhis* 属, *Dinophysis* 属の葉緑体関連遺伝子のうち、N末端まで配列が取得できたものを対象として葉緑体標的ペプチド配列の予測を行った。二次植物の核コード葉緑体タンパク質には葉緑体への輸送に関わる配列(シグナルペプチドとトランジットペプチド)がN末端に付加されており、アミノ酸配列から *in silico* で予測される。この予測を3種の計35の遺伝子で行ったところ、3種すべて計17遺伝子からシグナルペプチドとトランジットペプチドと思われる配列が予測された。これらの解析から、著者らは、非光合成性渦鞭毛藻類が(1)葉緑体関連タンパク質の遺伝子群を多数保持していること、(2)それらが葉緑体標的ペプチド配列を持つこと、(3)葉緑体型の経路をもつのみで、それらを代替する細胞質型やミトコンドリア型の経路を持たないこと等の理由から、非光合成性になっても葉緑体関連の代謝に未だ依存していると考えている。著者らは、光合成能を失った渦鞭毛藻類の葉緑体関連遺伝子に葉緑体標的ペプチド配列があることから、それらの細胞内には葉緑体の名残が残っているという考えのようである。特に *Dinophysis* 属渦鞭毛藻類は他の藻類から盗んだ葉緑体(盗葉緑体)を細胞内に保持することが知られているが、*Dinophysis* 属から検出された葉緑体関連遺伝子がコードするタンパク質は、盗葉緑体ではなく、まだ報告の無いペリディニン型葉緑体の痕跡オルガネラに局在されているのではないかと論じている。非光合成性渦鞭毛藻類で見つかった葉緑体遺伝子が本当に機能しているのか、葉緑体(痕跡オルガネラ)に相当する構造が非光合成性渦鞭毛藻類にあるのか、*Dinophysis* 属から検出された葉緑体関連遺伝子がコードするタンパク質が葉緑体の痕跡オルガネラに局在するか等については、今後の研究で慎重かつ詳細に調べる必要があるだろう。もし非光合成性種の葉緑体痕跡オルガネラの存在が真実であれば、渦鞭毛藻類の葉緑体の進化をより一層神秘的にするに違いない。

本報によって、渦鞭毛藻の葉緑体関連遺伝子がどのように進化してきたかの進化的シナリオが描かれた。本報で対象としたコア渦鞭毛藻内の非光合成性種は *Noctiluca* 属(コア渦鞭毛藻の根本の種)と *Dinophysis* 属(盗葉緑体性種)のみであるため、対象種に偏りがあり、コア渦鞭毛藻内の非光合成性種の情報がまだ不足しているように思われる。しかしながら、本報はトランスクリプトームデータを用いて渦鞭毛藻類の進化を多面的に解き明かそうとするパイオニア的論文であり、今後このような研究が進んでいくことによって渦鞭毛藻類の進化が紐解かれていくことが期待される。ファイロ

トランスクリプトミクスは渦鞭毛藻類に限らず、他の系統群でも進化を解き明かす為の有用な方法になるであろう。

引用文献

- Bachvaroff, T. R., Gornik, S. G., Concepcion, G. T., Waller, R. F., Mendez, G. S., Lippmeier, J. C. & Delwiche, C. F. 2014. Dinoflagellate phylogeny revisited: Using ribosomal proteins to resolve deep branching dinoflagellate clades. *Mol. Phylogenet. Evol.* 70: 314-322.
- Bazin, A. L., Mitter, K. T., Davis, D. R., Nieukerken, E. J., Cummings, M. P. & Mitter, C. 2017. Phylotranscriptomics resolves ancient divergences in the Lepidoptera. *Syst. Entomol.* 42: 305-316.
- Fensome, R. A., Saldarriaga, J. F. & Taylor, "Max" F. J. R. 1999. Dinoflagellate phylogeny revisited: reconciling morphological and molecular based phylogenies. *Grana.* 38: 66-80.
- Handy, S. M., Bachvaroff, T. R., Timme, R. E., Wayne Coats, D., Kim, S. & Delwiche, C. F. 2009. Phylogeny of four dinophysiacean genera (Dinophyceae, Dinophysiales) based on rDNA sequences from single cells and environmental samples. *J. Phycol.* 45: 1163-1174.
- Hehenberger, E., Burki, F., Kolisko, M. & Keeling, P. J. 2016. Functional relationship between a dinoflagellate host and its diatom endosymbiont. *Mol. Biol. Evol.* 33: 2376-2390.
- Hoppenrath, M., Chomérat, N., Horiguchi, T. et al. 2013. Taxonomy and phylogeny of the benthic *Prorocentrum* species (Dinophyceae)—A proposal and review. *Harmful algae.* 27: 1-28.
- Janouškovec, J., Gavelis, G. S., Burki, F. et al. 2017. Major transitions in dinoflagellate evolution unveiled by phylotranscriptomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114: E171-E180.
- Janouškovec, J., Horák, A., Oborník, M., Lukeš, J. & Keeling, P. J. 2010. A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 10949-10954.
- 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.
- Orr, R. J., Murray, S. A., Stüken, A., Rhodes, L. & Jakobsen, K. S. 2012. When naked became armored: an eight-gene phylogeny reveals monophyletic origin of theca in dinoflagellates. *PLoS ONE.* 7: e50004.
- Saldarriaga, J. F., Taylor, F. J. R., Keeling, P. J. & Cavalier-Smith, T. 2001. Dinoflagellate nuclear SSU rRNA phylogeny suggests multiple plastid losses and replacements. *J. Mol. Evol.* 53: 204-213.
- Sanchez-Puerta, M. V., Lippmeier, J. C., Apt, K. E. & Delwiche, C. F. 2007. Plastid genes in a non-photosynthetic dinoflagellate. *Protist.* 158: 105-117.
- Slamovits, C. H. & Keeling, P. J. 2008. Plastid-derived genes in the nonphotosynthetic alveolate *Oxyrrhis marina*. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1297-1306.
- Taylor, F. J. R. 1987. *The biology of dinoflagellates.* Blackwell Scientific Publications.
- Wickett, N. J., Mirarab, S., Nguyen, N. et al. 2014. Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111: E4859-E4868.
- Zhang, H., Bhattacharya, D. & Lin, S. 2007. A three-gene dinoflagellate phylogeny suggests monophyly of prorocentrales and a basal position for *Amphidinium* and *Heterocapsa*. *J. Mol. Evol.* 65: 463-474.