



有殻アメーバ *Paulinella* のオルガネラ進化の話と被殻構築の話

野村真末¹・中山卓郎²

最近、藻類の仲間入りをした生物に *Paulinella chromatophora* という有殻アメーバがいる。*P. chromatophora* は、藻類・陸上植物を生み出した一次共生とは独立に、シアノバクテリアと細胞内共生関係を築いた生物であり、この共生体（本稿では有色体と呼ぶ）が既にオルガネラとして細胞に統合されていることが近年の研究から明らかとなった。「酸素発生型光合成を行う生物のうち、陸上植物を除いたもの」という藻類の定義に当てはまる生物であることが最近証明されたわけである。*Paulinella* とシアノバクテリアとの細胞内共生は1億年前に起きたと推定され（Nowack 2014）、10億年以上前に成立した葉緑体と比べると極めて新しい。この意味でも *P. chromatophora* が藻類に仲間入りしたのは比較的最近と言える。この藻類の新入りが、ここ10年ほど何かと話題になっている（中山 2009, 2012）。本稿の前半では、新たな発見が相次いでいる *P. chromatophora* に見られるオルガネラ進化研究の進捗を紹介したい。また、*Paulinella* と言えどもつばら光合成オルガネラ進化のモデルとして扱われるが、細胞を覆う被殻をもつことで特徴づけられる有殻アメーバ類の一員でもある。一般に原生生物や藻類の細胞外被構造は細胞体を鋳型や土台として形成されるのに対し、有殻アメーバは細胞分裂に先立ち、娘細胞のための新しい被殻を細胞外の鋳型のない空間に構築する。この被殻構築過程に関する研究はほとんどなく、どのようにして有殻アメーバ類がこの現象を実現しているのかはベールに包まれている。本稿の後半では、*Paulinella* を有殻アメーバのモデルとして捉えた被殻構築機構の研究を紹介する。

光合成オルガネラ進化のモデルとしてのポーリネラ

葉緑体の起源は、かつて細胞内に共生したシアノバクテリアだと考えられている（一次共生）。この10億年以上前のイベントに多くの進化学者たちが惹きつけられ、進化の過程を類推してきた。これまでの研究から、共生体から宿主核への遺伝子転移（Endosymbiotic gene transfer: EGT）が起こったであろうこと、共生体内へのタンパク質輸送装置の獲得が起きたことなど、大まかな進化の道筋が明らかとなってきた（Gould *et al.* 2008, Archibald 2015）。しかし、シアノバクテリアが葉緑体へと変化していく過程をさらに詳しく知ろうとしても、すでに共生進化がほぼ完結してしまっている現在の光合成真核生物に残る進化の手がかりはそう多くない。その葉緑体進化の初期段階に全く新しいヒントをもたらす生物として脚光を浴びているのがポーリネラだ。*P. chromatophora* を含む *Paulinella* 属の一部の種は有色体（chromatophore, または cyanelle）と呼ばれるシアノバクテリア由来の光合成オルガネラを持つ（本稿で単にポーリネラ

と記述する場合は光合成性 *Paulinella* を指す）。有色体は葉緑体と比較してシアノバクテリアの特徴を色濃く残している一方で、EGTにより少なくとも一部の遺伝子が核ゲノムへと移行しており、それらのタンパク質が宿主から有色体内へと輸送されていることが近年確認された（Nowack *et al.* 2011, Nowack & Grossman 2012）。現在までに明らかとなった事実を総合的に考えると、有色体が葉緑体と比べて「若い」オルガネラであると見なすことができ、シアノバクテリアのオルガネラ化がどのように起こるのかを考える上では希少かつ重要なモデルである。

細胞内共生系確立における Horizontal Gene Transfer の貢献

これまでに有色体ゲノム解読およびトランスクリプトーム解析が行われ、遺伝子レベルから細胞統合の仕組みが明らかにされてきた。しかし、ポーリネラの培養株には無菌株が存在せず、得られるデータには他生物由来の塩基配列が常に混入していた。そのため「明らかに」ポーリネラ由来（有色体由来も含む）とわかる遺伝子のみを基に共生関係を論じざるを得ず、未だ包括的な結論が得られていない。これを受けて、Nowack *et al.* (2016) は *P. chromatophora* の無菌培養株を確立し塩基配列解析を行うことで、ピュアな核ゲノム配列（推定 9.6 Gbp）の取得に成功した。

P. chromatophora の核ゲノムにコードされる遺伝子の系統解析の結果、EGTによって有色体から核ゲノムへと移動したと予想される遺伝子は意外にも58遺伝子のみであった。その一方で、それを大きく上回る171遺伝子が他のバクテリアからの水平遺伝子転移（Horizontal Gene Transfer: HGT）によって獲得されたことが明らかとなった（図1, Nowack *et al.* 2016）。興味深いことにHGTによって獲得された遺伝子には、有色体が失った遺伝子機能を補完できるものが含まれ、そのいくつかについては有色体で機能することが予想された。このことからNowack *et al.* (2016) は、ゲノム縮小に伴って有色体が失った遺伝子の補完には、EGT遺伝子のみでなくHGT遺伝子が大きく貢献したとしている。

それでは、有色体タンパク質であると予測された核ゲノムコードタンパク質は本当に有色体へ輸送されているのだろうか？この疑問に答えるため、Singer *et al.* (2017) は単離有色体のプロテオーム解析を行っている。その結果、単離有色体画分から422の有色体ゲノムコードタンパク質、219の核ゲノムコードタンパク質がそれぞれ検出され、既に生化学的実験（Nowack & Grossman 2012）により証明されたPsaE, PsaKだけではなく、多くの核コードタンパク質が実際に有色体へ輸送されていること

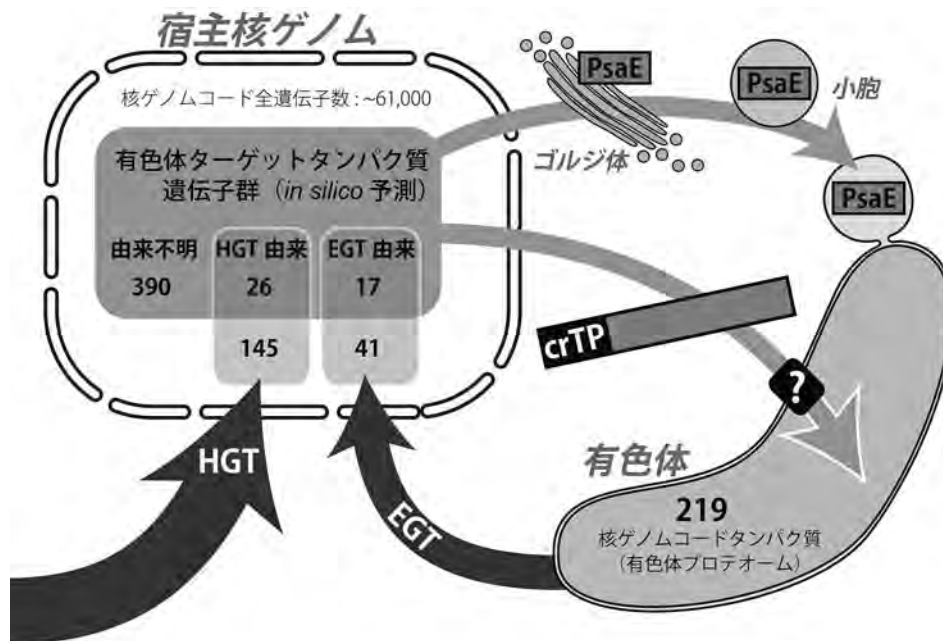


図1. ゲノム・プロテオーム解析から予想される、核コード有色体ターゲットタンパク質遺伝子の数および有色体へのタンパク質輸送経路の概略図
crTPをもつタンパク質は何らかの輸送装置(図中に?で示される)を介して有色体へ輸送されると考えられる。一方、図中 PsaE のように crTP を持たず、ゴルジ体を経由して有色体へ輸送されるタンパク質も知られる (Nowack & Grossman 2012)。

が明らかとなった(図1)。さらに Singer *et al.* (2017) は、プロテオミクスデータを基に機械学習を行い、約 61,000 の核コードタンパク質のうち計 433 タンパク質が有色体に輸送されると予測した(図1)。それら核ゲノムコード有色体タンパク質には光合成に関連するタンパク質だけでなく、遺伝子転写に関わるハウスキーピング遺伝子など幅広い機能を担うタンパク質が含まれており、代謝的に見て有色体の宿主による制御が広く働いていることが示唆された。

有色体タンパク質輸送配列の発見

細胞内共生を通じたオルガネラ進化の中で、タンパク質輸送機構の獲得は重要な里程碑であるとされる。この点において、核ゲノムコード有色体局在タンパク質がどのような機構で輸送されているのかは興味深い。Singer *et al.* (2017) は核コード有色体局在タンパク質配列のうち、268 アミノ酸残基以上の長いタンパク質 (Long import candidate) の N 末端に輸送配列と考えられる保存的な配列があることを発見し、crTP (chromatophore transit peptide) と名付けた。この crTP は、既知の葉緑体やミトコンドリアへのタンパク質輸送配列とは類似性が見られない配列であったが、驚くことに crTP と YFP を融合させた人工タンパク質をタバコ細胞で発現させると YFP タンパク質はタバコ葉緑体に輸送された。Singer *et al.* (2017) は、異なる生物を用いたタンパク質局在解析についてアーティファクトの危険性を認める一方で、この事実が陸上植物の葉緑体と有色体のタンパク質輸送システムにはなんらかの共通点があることを示唆しているとしている。しかしながら、1) crTP に既知の葉緑体タンパク質輸送配列と共通する特徴が見られないこと、2) 既知の

葉緑体タンパク質輸送装置のうち、共生シアノバクテリアに由来するとされる重要なコンポーネントの少なくとも一つは、有色体の祖先シアノバクテリアも保持していたと予想されるが、*P. chromatophora* から完全に失われていること (Singer *et al.* 2017)、などを踏まえると有色体が葉緑体と全く同じ輸送装置を用いているとは考えづらい。現時点ではどのようなタンパク質輸送装置が有色体上で機能しているか類推するのは困難であるが、今後、生化学的実験による有色体タンパク質輸送装置の同定などを通じて輸送メカニズムが明らかにされることが期待される。

有殻アメーバ類のモデルとしてのポーリネラ

Paulinella が属する有殻アメーバ類は、仮足以外の細胞質を常に被殻内に隠しているとてもシャイな生き物たちだ。分裂するときでさえも、有殻アメーバは被殻から出ることはなく、仮足を使って細胞外に自らのものと同じ大きさ・形の被殻を一つ構築してから分裂する。興味深いのは、新しい被殻が何の鋳型も存在しない場所に形成されるという点である。この現象がどのように実現されているのかはほとんど研究が進んでおらず、ポーリネラを含む有殻アメーバは真核生物における形態形成の多様性を理解する上で非常に重要な生物群と言える。しかし、有殻アメーバの培養は比較的難しく、カルチャーコレクションから入手できる株はポーリネラを含め 4 株しかない(ケルコゾアとアメーボゾアの有殻アメーバに限る)。その中でポーリネラは最も分子基盤が整っていることから、有殻アメーバに見られる被殻構築過程を解明する上でもモデルとして扱うのに適した生物であるといえる。本稿後半では、著者らを含む研究グループがポーリネラを用いてこれまで行ってきた、細胞分裂に伴う被殻構築機構の解明に向けた

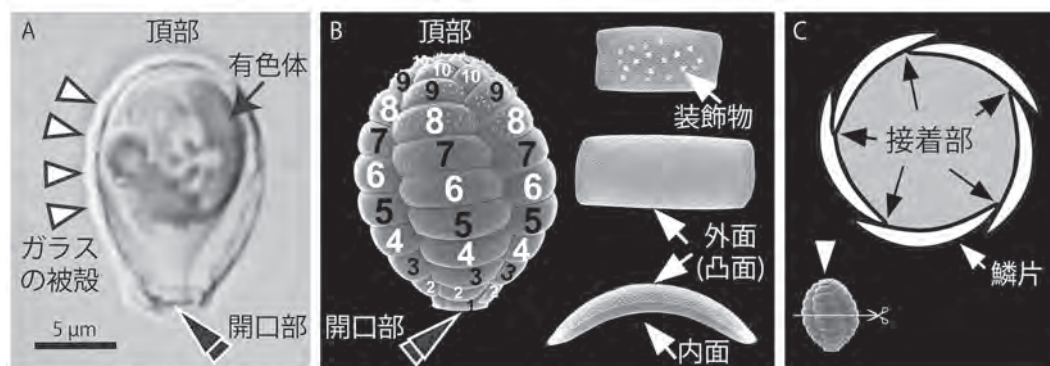


図 2. ポーリネラの被殻とその構造

A: ガラスの被殻 (光学顕微鏡写真), B: 鱗片の配置とその形態 (走査型電子顕微鏡写真), C: 被殻横断面を頂部方向 (矢頭) から見た模式図

研究 (Nomura *et al.* 2014, Nomura & Ishida 2016) について紹介したい。

とっても複雑、かつ規則正しいポーリネラの被殻

ポーリネラは、50~70 枚程度の様々な形の珪酸質鱗片が複雑かつ規則正しく配置された卵型の被殻をもつ (図 2)。個々の鱗片は基本的に長方形で、中央を頂点に湾曲している (図 2B 右)。仮足の出る開口部の逆側、被殻の頂部方向から見た横断面を図 2C に示す。被殻において、鱗片は必ず凸面を外側に向けて配置されている。同じ大きさの鱗片が 5 枚、部分的に重なり合い、接着されることで輪状構造をとる (図 2)。被殻はこのような輪が縦に 10~14 段積み重なった構造をしている。縦に並ぶ 10~14 枚の鱗片はそれぞれ大きさや装飾物の有無ですべて区別できる。被殻の開口部と頂部に配置された鱗片は小さく、中間層の鱗片は大きいため、壺型の形態をとる (図 2)。このことからポーリネラの被殻は立体的なパズルの様に、それぞれの鱗片の配置されるべき場所が決まっていると考えられる。はたしてポーリネラはどのように、鋳型もない空間に形の異なる鱗片を正しい位置に配置し、壺型の被殻を形成するのだろうか。

P. micropora の被殻構築の全体像

ポーリネラの被殻構築過程についての報告は、著者らが知る限り現在から約 90 年前、Hoogenraad (1927) によるものだけである。Hoogenraad (1927) は被殻構築過程の一部を観察したものの、他の仕事か、あるいは眠かったのかは不明だが、夜に観察をやめなければならなかったとしている。そして翌早朝サンプルの観察を再開すると娘細胞がほぼできあがっていたと記述しており、Hoogenraad (1927) は被殻構築の一部始終を見るには至らなかった。しかし、我々が生きるこの 21 世紀にはタイムラプスビデオ撮影が可能な非常に便利なカメラが販売されており、どんなロングスリーパーでも寝ている間に見逃すことはない。さらに著者らは *P. micropora* (*P. chromatophora* の近縁種) の、分裂周期が短い培養株の確立に成功し、被殻構築過程を観察するのに適した材料を得ることができた。

著者らはタイムラプスビデオ撮影や電子顕微鏡観察により、被殻構築過程を詳細に観察した。その結果、ポーリネラが細胞

外に分泌した鱗片を使い、20 分余りで壺型の被殻を完成させる過程を捉えることに成功した (Nomura *et al.* 2014, Nomura & Ishida 2016, 図 3)。これらの研究によりポーリネラの細胞分裂に伴う被殻構築は次のように進むことが明らかとなった。1) 細胞内で形成された鱗片が、被殻構築に先立って全て細胞外へと分泌され、開口部付近に糸状仮足によって保持される (鱗片の分泌には 6 時間以上と被殻構築と比較して長い時間がかかる)。また、細胞外で保持された鱗片は糸状仮足によって位置や向きが大きく動かされる。2) 鱗片が通常見られる糸状仮足とは異なる特殊な太い仮足の先端によって動かされ、被殻構築が始まる。鱗片は開口部側から螺旋を描くように配置・固定されてゆく。3) 被殻が完成すると、鱗片を積み上げていた特殊な太い仮足は母細胞側へ取り込まれる。細胞質分裂に先立って核分裂が起き、片方の娘核や有色体などを含めた細胞質の半分が細い開口部を通して新規殻へ移動し、その後細胞質分裂が起きる。やがてそれぞれの娘細胞は通常の糸状仮足を出し運動を始め、離れ離れになる (図 3)。

ポーリネラにおける被殻構築の作業仮説

被殻構築過程の詳細な観察により、様々な形状の鱗片が特殊な太い仮足の先端において動かされ、開口部の側から螺旋状に積み上げられることが明らかになった。ポーリネラはどのようにこの現象を実現しているのだろうか? 特定の鱗片を特定の位置に配置する現象の鍵を握るのは被殻構築のどのステップなのか、考えてみたい。

それぞれの鱗片は母細胞の中で形成されるが、その順番は決まっており、被殻構築過程で最初に積み上げられる開口部側の鱗片から順に形成される (Nomura *et al.* 2014)。しかし、複雑なことに母細胞からの鱗片分泌は、被殻の中間層にあたる大きな鱗片から始まる。その後に被殻の両端に対応する鱗片が分泌されることが示唆されており、鱗片形成や被殻構築の順番と分泌の順番は対応していないようだ (Nomura *et al.* 2014)。また、配置される直前の鱗片は、特殊な太い仮足の先端によってつまれ、鱗片が接着した部分の細胞質内にはアクチンが蓄積していることが分かっている (Nomura & Ishida 2016, 2017)。こ

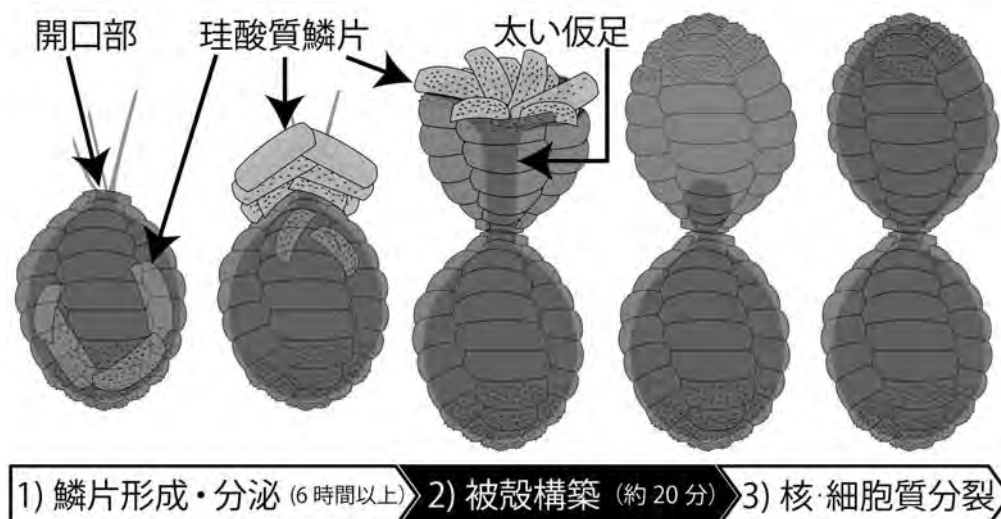


図3. 被殻構築過程の全体像

濃い灰色で描かれた鱗片はすでに配置されたものを示し、薄い灰色で描かれた鱗片はこれから配置されるものを示す。図中の1)から3)は、文中の1)から3)に対応する。

れらを踏まえ、著者らは正確な鱗片配置の主体は特殊な太い仮足の先端であり、何らかの機構によりこの仮足がそれぞれの鱗片を識別していると仮説を立てている。この考えに基づいて被殻構築過程における特殊な太い仮足の役割を整理すると、細胞外鱗片の認識・接着・運搬・配置という4つの機能にわけられ、これらにより正確な位置への鱗片配置を実現していると予想される。

ポーリネラで明らかになったような被殻構築様式が有殻アメーバ類の中でどの程度保存的かは現在のところ不明であるが、前述のように鋳型のない空間に新たな被殻を構築するという現象は有殻アメーバ全体に見られる。この現象に普遍的に関わるのは細胞外の物体を操作（認識・接着・運搬・配置）する機能であると考えられる。人間や動物が行うような動作にも投影できるこの現象を、目や手、神経のない有殻アメーバのような生物がどのようにして実現できるのか、今後その分子メカニズムの解明が待たれる。

おわりに

本稿で紹介したように、ポーリネラはオルガネラ化進化、および有殻アメーバの被殻構築のモデルとして異なる視点・多角的な手法によって研究が進められており、この生物の詳細が着々と明らかとなってきている。その一方、複数の培養株、形態情報、ゲノム情報、プロテオーム情報といった研究基盤は急速に充実してきている。未だにポーリネラに関する疑問や謎は多く残されているが、これらの研究基盤を土台としてポーリネラを用いた多様な研究が今後も展開されることを望む。

引用文献

Archibald, J. M. 2015. Endosymbiosis and eukaryotic cell evolution. *Curr. Biol.* 25: 911–921.

Gould, S. B., Waller, R. F. & McFadden, G. I. 2008. Plastid evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 491–517.

Hoogenraad, V. H. R. 1927. Zur Kenntnis der Fortpflanzung von *Paulinella chromatophora* Lauterb. *Zool. Anz.* 72: 140–150.

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.

中山卓郎 2012. *Paulinella chromatophora*に見る一次共生のスナップショット. *藻類* 60: 142–144.

Nomura, M. & Ishida, K. 2016. Fine-structural observations on siliceous scale production and shell assembly in the testate amoeba *Paulinella chromatophora*. *Protist* 167: 303–318.

Nomura, M. & Ishida, K. 2017. Shell assembly of testate amoebae leads to new insight into eukaryotic cell potential. *Plant Morphology*. 29: 47–51.

Nomura, M., Nakayama, T. & Ishida, K. 2014. Detailed process of shell construction in the photosynthetic testate amoeba *Paulinella chromatophora* (euglyphid, Rhizaria). *J. Eukaryot. Microbiol.* 61: 317–321.

Nowack, E. C. M. 2014. *Paulinella chromatophora*-rethinking the transition from endosymbiont to organelle. *Acta Soc. Bot. Pol.* 83: 387–397.

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.* 109: 5340–5345.

Nowack, E. C. M., Price, D. C., Bhattacharya, D., Singer, A., Melkonian, M. & Grossman, A. R. 2016. Gene transfers from diverse bacteria compensate for reductive genome evolution in the chromatophore of *Paulinella chromatophora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113: 12214–12219.

Nowack, E. C. M., Vogel, H. & Groth, M. 2011. Endosymbiotic gene transfer and transcriptional regulation of transferred genes in *Paulinella chromatophora*. *Mol. Biol. Evol.* 28: 407–422.

Singer, A., Poschmann, G., Mühlich, C. *et al.* 2017. Massive protein import into the early-evolutionary-stage photosynthetic organelle of the amoeba *Paulinella chromatophora*. *Curr. Biol.* 27: 2763–2773.

(¹ 筑波大学・下田臨海実験センター, ² 東北大学・生命科学研究科)