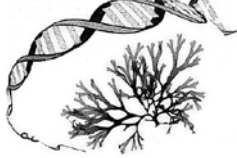


## 藻類学最前線



## 従属栄養性クリプト藻 *Goniomonas avonlea* のゲノム解析から明らかになる紅藻由来の二次共生の進化

白鳥峻志

藻類とは陸上植物を除いた酸素発生型光合成を行う生物と、それらに近縁な生物の総称であり、真核生物ではオピストコンタやアメーボゾアを除いたほぼ全ての主要な系統に存在している。このような真核藻類の系統的多様性は、真核生物の様々な系統で葉緑体が獲得されることによって生じたと考えられている。緑藻、紅藻、灰色藻が含まれるアーケプラスチダの藻類は、シアノバクテリアとの細胞内共生によって葉緑体を獲得した。核や葉緑体遺伝子による分子系統解析によると、アーケプラスチダの葉緑体の起源は、共通祖先における一回の共生にさかのぼることができる。真核生物とシアノバクテリアの細胞内共生は他にも知られており、リザリアに属する *Paulinella chromatophora* のシアネレは、アーケプラスチダの葉緑体とは異なる起源のシアノバクテリア由来のオルガネラである (Marin *et al.* 2005)。リザリアからは、*Paulinella* 以外にもシアノバクテリア様のオルガネラをもつ生物が報告されている (Chantangsi *et al.* 2008)。さらに珪藻やハプト藻の一部は、窒素固定を行うシアノバクテリア由来のオルガネラをもつ (Nakayama *et al.* 2011, Hagino *et al.* 2013)。

真核生物には、アーケプラスチダや *Paulinella* 以外にも、多くの藻類の系統が存在している。それらの生物がもつ葉緑体は、シアノバクテリアではなく、紅藻または緑藻由来であることがわかっている。つまり、真核生物同士の細胞内共生によって、緑藻や紅藻の葉緑体が、真核生物の様々な系統に伝播したことが示唆されている。緑藻由来の葉緑体をもつ藻類は、ユーグレナ藻とクロララクニオン藻が知られており、紅藻由来の葉緑体をもつ藻類は、クリプト藻、ハプト藻や、珪藻や褐藻などに代表されるオクロ藻、渦鞭毛藻などが知られている。緑藻由来の葉緑体をもつ藻類については、その葉緑体の由来がある程度わかっており、クロララクニオン藻がハネモ目に近縁な緑藻、ユーグレナ藻がピラミモナス目に近縁な緑藻とそれぞれ細胞内共生することで獲得されたと考えられている (Jackson *et al.* 2018)。一方で、紅藻由来の葉緑体の進化的起源ははっきりしておらず、共生の時期や回数については様々な説が提唱されている。クロムアルベオラータ仮説は、すべての紅藻由来の葉緑体をもつ藻類が一回の共生によって成立したとする仮説である (Cavalier-Smith 1999)。この仮説は、紅藻由来の葉緑体をもつ藻類が、光合成色素としてクロロフィル c をもつことや、葉緑体遺伝子や核にコードされている光合成関連遺伝子であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)、フルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼ (FBA) を用いた分子

系統解析の結果などから支持されてきた (Harper & Keeling 2003, Patron *et al.* 2004, Bachvaroff *et al.* 2005)。一方で、核ゲノムを用いた分子系統解析では、紅藻由来の葉緑体をもつ藻類は単系統にならず、周辺に多くの葉緑体をもたない原生物の系統が存在することが指摘されてきた。そのため、それぞれの系統で独立に紅藻との共生が起こったという考えや、紅藻の葉緑体を取り込んだ藻類が、さらに他の原生物に取り込まれることで、様々な系統で紅藻由来の葉緑体をもつ藻類が誕生したという説も提唱されている (Burki *et al.* 2007, Sanchez-Puerta & Delwiche 2008, Petersen *et al.* 2014)。

クリプト藻は紅藻由来の葉緑体をもつ、淡水及び海水中に普遍的に見られる鞭毛虫のグループである。クリプト藻の葉緑体は4枚の包膜に包まれ、最外膜は小胞体とつながっているほか、内側二枚目と外側二枚目の包膜の間の領域 (色素体周縁区画: PPC) に紅藻の核が縮退した構造であるヌクレオモルフをもつ。葉緑体は茶、赤、緑、青緑など様々な色を呈するが、それは葉緑体の補助色素であるフィコピリタンパク質によるものである (Novarino 2003)。クリプト藻にはクリプトモナス類とゴニオモナス類が含まれる。クリプトモナス類は *Cryptomonas paramecium* などの一部を除いてすべての種が光合成能をもつ。*C. paramecium* も葉緑体の痕跡的な器官である白色体をもっていることから (Sepsenwol 1973)、クリプトモナス類の共通祖先は葉緑体を有していたと考えられる。一方でゴニオモナス類には従属栄養性の *Goniomonas* 一属のみが含まれている (Kim & Archibald 2013)。*Goniomonas* は扁平なバクテリア捕食性の鞭毛虫であり、これまでに葉緑体やその痕跡的な器官はみつかっていない。さらにクリプト藻の周辺には環境 DNA のみで構成されているクレードである Cry1 と Cry3 も知られている (Shalchian-Tabrizi *et al.* 2008, Kim & Archibald 2013)。Cry1 については 2016 年にその実態が明らかとなり、ゴニオモナス類に近縁なバクテリア食性の鞭毛虫であることが示され、*Hemiarma marina* として記載された (Shiratori & Ishida 2016)。クリプト藻に近縁な分類群として、主に真核藻類を捕食するカタプレファリス類やバクテリア食性の *Palpitomonas bilix* など知られており、これらはクリプト藻とともにクリプチスタと呼ばれる単系統群を形成する (Okamoto *et al.* 2009; Yabuki *et al.* 2014)。

クリプト藻の葉緑体の起源については、複数のタンパク質コード遺伝子のアミノ酸配列を用いた分子系統解析において、しばしばハプト藻と単系統群を形成することや、クリ

プト藻とハプト藻では葉緑体ゲノム上のリボソームタンパク質 rpl36 遺伝子がバクテリアから水平伝播してきたものに置き換わっていることなどから、その進化的起源はハプト藻と共有していると考えられていた (Rice & Palmer 2006, Hackett *et al.* 2007)。しかし、分子データの充実や新規系統が明らかになるにつれて、クリプト藻やハプト藻の周辺にも、有中心粒太陽虫やテロネマ類といった様々な従属栄養性の原生物の系統が存在することが明らかとなり、これらをまとめてハクロビアという分類群が提唱された (Okamoto *et al.* 2009)。さらに、近年の大規模なデータセットを用いた分子系統解析では、ハクロビアの単系統性は支持されず、クリプト藻はアーケプラスチダと、ハプト藻は太陽虫と単系統群を形成するケースも報告されている (Burki *et al.* 2012, 2016)。

クリプト藻の葉緑体の成り立ちを理解するためには、その系統的位置を明らかにすることに加え、周辺の従属栄養性の原生物が紅藻との細胞内共生を経た後で二次的に葉緑体を失ったのか、紅藻との共生を経験していないのかを明らかにすることが重要である。渦鞭毛藻では、葉緑体やその痕跡的な器官が見つからない生物のゲノム上に、葉緑体への輸送シグナルをもつ遺伝子が存在している例も報告されていることから、微細構造観察だけではなく、ゲノム情報も用いた研究が不可欠である (Slamovits & Keeling 2008)。しかし、クリプト藻周辺でゲノム解読が行われているのは、光合成性の *Guillardia theta* のみであり、従属栄養性のクリプチスタのゲノム解析は行われていなかった。本稿では Cenci *et al.* (2018) らによって行われた、従属栄養性クリプト藻 *Goniomonas avonlea* のゲノム解析について紹介する。

次世代シーケンサーである Illumina HiSeq 2000 を用いたゲノムシーケンス及びアセンブリの結果、31,852 コンティグという非常に断片化したゲノムが 92 Mbp 得られた。アノテーションの結果、このゲノムは 33,470 遺伝子をコードしていることが明らかになった。得られゲノムについて、ゲノムの品質評価ツールである BUSCO を用いることで、多くの真核生物が共通してもつコア遺伝子がゲノム上にどれだけコードされているかを調べたところ、復元されたゲノム配列は極めて断片化した状態であるにもかかわらず、89% のコア遺伝子が検出された。これは過去にゲノム解析が行われた光合成性のクリプト藻 *Guillardia* と同程度であったため、Cenci *et al.* (2018) では *Goniomonas* のゲノムの品質は今後の解析に影響はないと結論づけている。

*Goniomonas* を含む従属栄養性のクリプチスタでは、白色体をもつことが確認されている *C. paramecium* を除いて、葉緑体やその痕跡的なオルガネラは見つかっていないが、ゲノム上にそれらの存在を示唆する情報が存在する可能性がある。そこで Cenci *et al.* (2018) は *Goniomonas* のゲノムについて、葉緑体特異的な代謝経路であるカルビン回路や、光合成の電子伝達体であるメナキノン、光合成色素のクロロフィルやカロテノイドの合成系の探索を行ったが、それらを

発見することはできなかった。また葉緑体膜状に存在し、タンパク質の膜間の輸送を介するトランスロコンである TOC-TIC 遺伝子も発見することができなかった。さらに複数のシグナル配列予測ソフトによって、葉緑体または PPC に局在が推定されるシグナル配列をもつ遺伝子を抽出し、既知の一次または二次葉緑体の代謝経路と比較したがほとんど一致せず、*Goniomonas* が葉緑体やその痕跡的なオルガネラを保持している証拠は見つからなかった。

*Goniomonas* が現在葉緑体を保持していなかったとしても、その祖先で二次共生が起きていた場合、ゲノム中に紅藻由来の EGT (Endosymbiotic Gene Transfer: 共生体ゲノムから宿主ゲノムへの遺伝子の水平転移) の痕跡が存在する可能性がある。そこで *Goniomonas* のゲノムから EGT とされる遺伝子を探索した。まず Curtis *et al.* (2012) によって推定された、*Guillardia* の核ゲノムにコードされている藻類由来と思われる 508 遺伝子について、それと相同な遺伝子を *Goniomonas* のゲノムから探索した。その結果、212 遺伝子について合計 285 の相同なタンパク質が見つかった。これら 285 のタンパク質について系統樹を作成したところ、*Goniomonas* と光合成性のクリプト藻が紅藻と単系統

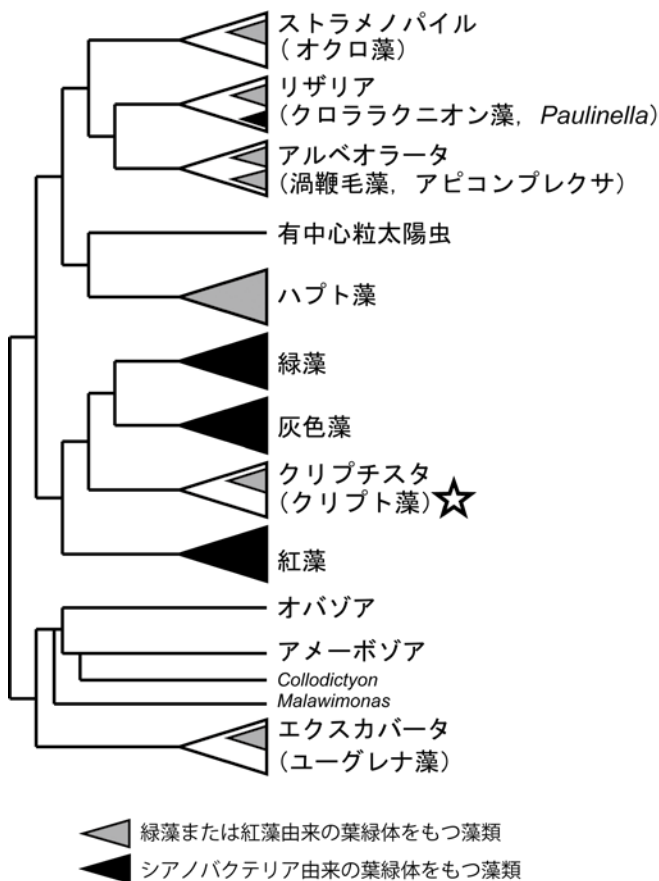


図1. Cenci *et al.* (2018) による 250 遺伝子を用いた最尤系統樹の模式図。黒色の三角形は一次共生による葉緑体をもつ藻類の系統を示す。灰色の三角形は緑藻または紅藻由来の葉緑体をもつ藻類の系統を示す。星印は *Goniomonas* が含まれる系統を示す。

となった系統樹は6個見つかった。それらはいずれも葉緑体への輸送シグナルをもたず、葉緑体内の代謝も関わっていなかった。一方で24の系統樹において、*Goniomonas*は系統的に無関係なアミーボゾアと単系統となった。この解析から、*Goniomonas*のゲノムに存在する紅藻由来と思われる遺伝子は非常に少ないことが明らかとなり、*Goniomonas*の祖先が葉緑体を保持していた可能性を支持する結果はここでも得られなかった。

*Goniomonas*はクリプト藻における二次葉緑体の獲得よりも前に分岐したことが示唆されたため、*Goniomonas*と*Guillardia*の代謝経路の比較は、葉緑体獲得に伴う代謝経路の変化を明らかにするはずである。Cenci *et al.* (2018)は*Guillardia*のゲノムから*Goniomonas*では見られない、光合成、非メバロン酸経路を経由したイソプレノイド生合成、カロテノイド生合成、ポルフィリン及びクロロフィル代謝経路を発見した。これらの経路・プロセスは葉緑体に局在することが推定されたため、二次共生に伴って獲得されたと考えられる。また、葉緑体に局在するかははっきりしないものの、ユビキノン及びテルペノイド-キノン生合成経路とチアミン生合成経路が見つかった。これらは光合成における電子伝達系に関わっているため、二次共生によって獲得されたと考えられる。一方で*Goniomonas*に特異的なものとして、ペルオキシソームでの胆汁酸の生合成経路が見つかった。また、*Goniomonas*において脂肪酸の生合成は、ミトコンドリア及び細胞質で行われることが示唆されたが、*Guillardia*では葉緑体で働いていることが予測された。面白いことに、*Goniomonas*は細胞質で働くメバロン酸経路のみをもつが、*Guillardia*はメバロン酸経路に加えて、二次共生由来と思われる非メバロン酸経路ももっており、共生によって生合成経路の冗長性が生じたと考えられる。さらにCenci *et al.* (2018)では*Goniomonas*と*Guillardia*のCAZyme(糖質関連酵素)について比較を行っている。グリコシドヒドロラーゼ glycoside hydrolase (GH) 及びグリコシルトランスフェラーゼ glycosyl transferase (GT) のレパートリーから、*Goniomonas*ではグリコーゲン、 $\alpha$ グルカン、 $\beta$ グルカンの代謝を行うことができることが推定された。また藻類の細胞壁の主要な構成要素であるセルロースを分解できるセルラーゼ及びヘミセルラーゼや、紅藻が分泌するアガロースを分解できるアガラゼをもつ。これらの酵素はバクテリア食性として知られている*Goniomonas*が、紅藻を含む真核藻類を捕食できることを示唆している。

さらにCenci *et al.* (2018)では、クリプト藻の系統的位置を明らかにするために、*Goniomonas*のゲノムシーケンスを用いて、Burki *et al.* (2016)のデータセットに基づいた250タンパク質コード遺伝子のアミノ酸配列による分子系統解析を行っている(図1)。この解析では、最近の大規模分子系統解析で支持されているものと同様系統樹が支持された。すなわち、エクスカバータとアーケプラスチダ以外の真核生物の主要なスーパーグループの単系統性が確認され、さ

らにハプト藻と有中心粒太陽虫が単系統群を形成し(ハプチスタ)、クリプト藻、カタブレファリス、*Palpitomonas*からなるクリプチスタがアーケプラスチダの内部に位置した。クリプチスタはアーケプラスチダ内部で緑藻と灰色藻ともにブートストラップ値82%で単系統群を形成した。クリプチスタの系統的位置が葉緑体由来の遺伝子によるアーティファクトである可能性を考慮して、1) 光合成性のクリプト藻を除いたデータセット、2) 一部の異なるシグナルをもつ遺伝子を除いたデータセットを用いて系統樹を作成したが、いずれの場合でもクリプチスタはアーケプラスチダの内部に位置した。また、250遺伝子中クリプト藻が含まれる183遺伝子から、46~47遺伝子をランダムにサンプリングしてデータセットを生成し、100の系統樹を作成したところ、93系統樹でクリプト藻はアーケプラスチダと単系統となった。またその中の30%の系統樹でクリプチスタは緑藻と灰色藻からなるクレードと単系統となり、24%で灰色藻と単系統群を形成した。紅藻または緑藻と単系統となった系統樹はそれぞれ全体の13%と3%だった。クリプチスタがアーケプラスチダの姉妹群となった系統樹は20%存在した。このように、分子系統解析では一貫してクリプチスタとアーケプラスチダの単系統性が支持され、特に灰色藻との近縁性が示唆された。一方でこれらの解析では、過去の研究で示唆されていたクリプチスタとハプチスタの近縁性は示されなかった。

クリプチスタがアーケプラスチダ内部に位置するという系統関係は、紅藻由来の二次葉緑体だけではなく、一次葉緑体の進化を考える上でも興味深い。この系統関係の下では、紅藻由来の二次葉緑体の共生が、一次共生よりも以前に起きたことになってしまうため、クロムアルベオラータ仮説は完全に否定される。またアーケプラスチダ内部での系統的位置によっては、クリプチスタが過去にシアノバクテリアとの共生を経験した可能性がある。クリプチスタは紅藻由来の葉緑体の進化だけではなく、アーケプラスチダの葉緑体の起源を明らかにする上でも重要な系統群である可能性があり、今後のゲノムデータの拡充が期待される。

## 引用文献

- Bachvaroff, T. R., Sanchez Puerta M. V. & Delwiche, C. F. 2005. Chlorophyll *c*-containing plastid relationships based on analyses of a multigene data set with all four chromalveolate lineages. *Mol. Biol. Evol.* 22: 1772–1782.
- Burki, F., Kaplan, M., Tikhonenkov, D. V. *et al.* 2016. Untangling the early diversification of eukaryotes: A phylogenomic study of the evolutionary origins of Centrohelida, Haptophyta and Cryptista. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283: 20152802.
- Burki, F., Okamoto, N., Pombert, J. F. & Keeling, P. J. 2012. The evolutionary history of haptophytes and cryptophytes: phylogenomic evidence for separate origins. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 279: 2246–2254.
- Burki, F., Shalchian-Tabrizi, K., Minge, M., Skjæveland, Å., Nikolaev, S. I., Jakobsen, K. S. & Pawlowski, J. 2007. Phylogenomics reshuffles the eukaryotic supergroups. *PLoS One* 2: e790.
- 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.

- Cenci, U., Sibbald, S. J., Curtis, B. A. *et al.* 2018. Nuclear genome sequence of the plastid-lacking cryptomonad *Goniomonas avonlea* provides insights into the evolution of secondary plastids. *BMC Biol.* 16: 137.
- Chantangsi, C., Esson, H. J. & Leander B. S. 2008. Morphology and molecular phylogeny of a marine interstitial tetraflagellate with putative endosymbionts: *Auranticordis quadriverberis* n. gen. et sp. (Cercozoa). *BMC Microbiol.* 8: 123.
- Curtis, B. A., Tanifuji, G., Burki, F. *et al.* 2012. Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. *Nature* 492: 59–65.
- Hackett, J. D., Yoon, H. S., Li, S., Reyes-Prieto, A., Rümmele, S. E. & Bhattacharya, D. 2007. Phylogenomic analysis supports the monophyly of cryptophytes and haptophytes and the association of rhizaria with chromalveolates. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1702–1713.
- Hagino, K., Onuma R., Kawachi, M. & Horiguchi, T. 2013. Discovery of an endosymbiotic nitrogen-fixing cyanobacterium UCYN-A in *Braarudosphaera bigelowii* (Prymnesiophyceae). *PLoS One* 8: e81749.
- Harper, J. T. & Keeling, P. J. 2003. Nucleus-encoded, plastid-targeted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) indicates a single origin for chromalveolate plastids. *Mol. Biol. Evol.* 20: 1730–1735.
- Jackson, C., Knoll, A. H., Chan, C. X. & Verbruggen, H. 2018. Plastid phylogenomics with broad taxon sampling further elucidates the distinct evolutionary origins and timing of secondary green plastids. *Sci. Rep.* 8: 1523.
- Kim, E. & Archibald, J. M. 2013. Ultrastructure and molecular phylogeny of the cryptomonad *Goniomonas avonlea* sp. nov. *Protist* 164: 160–182.
- 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., Ikegami, Y., Nakayama, T., Ishida, K., Inagaki, Y. & Inouye, I. 2011. Spheroid bodies in rhopalodiacean diatoms were derived from a single endosymbiotic cyanobacterium. *J. Plant Res.* 124: 93–97.
- Novarino, G. 2003. A companion to the identification of cryptomonad flagellates (Cryptophyceae = Cryptomonadea). *Hydrobiologia* 502: 225–270.
- Okamoto, N., Chantangsi, C., Horák, A., Leander, B. S. & Keeling, P. J. 2009. Molecular phylogeny and description of the novel katablepharid *Roombia truncata* gen. et sp. nov., and establishment of the Hacrobia taxon nov. *PLoS One* 4: e7080.
- Patron, N. J., Rogers, M. B. & Keeling, P. J. 2004. Gene replacement of fructose-1,6-bisphosphate aldolase supports the hypothesis of a single photosynthetic ancestor of chromalveolates. *Eukaryot. Cell* 3: 1169–1175.
- Petersen, J., Ludewig, A. K., Michael, V., Bunk, B., Jarek, M., Baurain, D. & Brinkmann, H. 2014. *Chromera velia*, endosymbioses and the rhodoplex hypothesis - Plastid evolution in cryptophytes, alveolates, stramenopiles, and haptophytes (CASH lineages). *Genome Biol. Evol.* 6: 666–684.
- Rice, D. W. & Palmer, J. D. 2006. An exceptional horizontal gene transfer in plastids: gene replacement by a distant bacterial paralog and evidence that haptophyte and cryptophyte plastids are sisters. *BMC Biol.* 4: 31.
- Sanchez-Puerta, M. V. & Delwiche, C. F. 2008. A hypothesis for plastid evolution in chromalveolates. *J. Phycol.* 44: 1097–1107.
- Seppenswol, S. 1973. Leucoplast of the cryptomonad *Chilomonas paramecium*. Evidence for presence of a true plastid in a colorless flagellate. *Exp. Cell Res.* 76: 395–409.
- Shalchian-Tabrizi, K., Brâte, J., Logares, R., Klaveness, D., Berney, C. & Jakobsen, K. S. 2008. Diversification of unicellular eukaryotes: cryptomonad colonizations of marine and fresh waters inferred from revised 18S rRNA phylogeny. *Environ. Microbiol.* 10: 2635–2644.
- Shiratori, T. & Ishida, K. 2016. A new heterotrophic cryptomonad: *Hemiarma marina* n. g., n. sp. *J. Eukaryot. Microbiol.* 63: 804–812.
- Slamovits, C. H. & Keeling, P. J. 2008. Plastid-derived genes in the nonphotosynthetic alveolate *Oxyrrhis marina*. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1297–1306.
- Yabuki, A., Kamikawa, R., Ishikawa, S. A. *et al.* 2014. *Palpitomonas bilix* represents a basal cryptist lineage: insight into the character evolution in Cryptista. *Sci. Rep.* 4: 4641.