

藻類学最前線



緑色渦鞭毛藻にみられる新たな痕跡核と 宿主・葉緑体系統の対立

高橋 和也

はじめに

渦鞭毛藻は単細胞性または群体性の原生生物で、約2,000種が記載される巨大な藻群である。約半数が光合成性、約半数が従属栄養性の種であり、光合成性種は水圏の一次生産者として重要な役割を担う。典型的な光合成性の渦鞭毛藻は、他の藻類にはみられない光合成色素ペリディニンを含む葉緑体（ペリディニン型葉緑体）をもつ。一方、種によってはこの葉緑体を失い、別の藻類を細胞内共生させることで葉緑体を獲得した（葉緑体を置換した）ものもある。渦鞭毛藻の葉緑体はペリディニン型以外に8つのタイプが知られている（Moestrup & Daugbjerg 2007, Daugbjerg *et al.* 2013）。葉緑体置換は渦鞭毛藻特有の現象であり、例えば渦鞭毛藻に近縁な従属栄養性のアルベオラータ群は、過去にペリディニン型の祖先型となる葉緑体を保有していたと考えられているが、別系統の葉緑体を再獲得した例は報告されていない。共生と葉緑体置換を頻りに繰り返す渦鞭毛藻は、葉緑体がどのように獲得されるのかを知る有用な参考材料として、これまで微細構造観察や分子系統解析、ゲノム比較などの研究が多方面で行われてきた（Schnepf & Elbrächter 1999, Hackett *et al.* 2004 など）。本稿ではその中でも緑藻型の葉緑体をもつ渦鞭毛藻（以下緑色渦鞭毛藻）について、最新の知見を紹介する。

Lepidodinium 属藻類と未記載 2 株

変わり者だらけの渦鞭毛藻であるが、その中でも *Lepidodinium* 属藻類は文字通り異彩を放っている。同藻は緑藻の取込に由来する葉緑体を持ち、緑藻に特徴的な光合成色素であるクロロフィル *b* を含み、ペリディニンを欠く（Zapata *et al.* 2012, Waller & Koreny 2017）。渦鞭毛藻の中には、捕

食した藻類の葉緑体を一時的に維持する盗葉緑体を行うものもあるが、*Lepidodinium* 属藻類では宿主核の安定した支配下で葉緑体の成長や分裂が起こり、共生藻の細胞小器官は葉緑体を除いてほぼ縮退・喪失しており、宿主との統合段階は極めて高い（恒久葉緑体；Waller & Koreny 2017）。渦鞭毛藻のペリディニン型葉緑体は紅藻（または紅藻を取込んだ藻類）の取込みに起源すると考えられているが、この紅藻由来葉緑体から緑藻由来葉緑体への置換に成功したのは、これまで *Lepidodinium* 属渦鞭毛藻のみと考えられてきた（Minge *et al.* 2010）。葉緑体を置換した他の渦鞭毛藻をみると、ハプト藻を取込んだカレニア科藻類や、クリプト藻を取込んだ *Dinophysis* spp., 珪藻を取込んだクリプトペリディニウム科藻類（= Dinotoms）などもあるが、これらの共生体をもつ葉緑体はいずれも紅藻由来である（Moestrup & Daugbjerg 2007, Waller & Koreny 2017）。

Lepidodinium 属藻類の細胞形態は無殻渦鞭毛藻 *Gymnodinium* 属に似ており、実際に *Lepidodinium chlorophorum* は当初 *Gymnodinium* 属の一員として扱われていた（Elbrächter & Schnepf 1996）。*Gymnodinium* 属は古典的に横溝が細胞の中央付近にある無殻のグループとして記載されたが、近年の分子系統解析から、同属に所属されてきた種は複数の系統にまたがって分布することが指摘されていた。Daugbjerg *et al.* (2000) は、核コード 28S rDNA 部分配列に基づく無殻渦鞭毛藻の分子系統解析から、*Gymnodinium* 属のタイプ種 *Gymnodinium fuscum* を含む狭義の *Gymnodinium* 属系統群を報告した。この系統群は *Gymnodinium* 属以外にも *Nematodinium* 属や *Polykrikos* 属など数属を含むが、科や目などの上位分類群は未だ適用されていない。一部例外もあるが、この系統群には走査型電子顕微鏡観察（SEM）下で馬蹄形の溝状の細胞上端構造（apical structure complex）が、透過型電子顕微鏡観察（TEM）下で核膜の膜間隙に小胞（nuclear chamber）が、鞭毛装置と核を繋ぐ繊維構造（nuclear connective）がみられるなどの共通点がある（Daugbjerg *et al.* 2000）。*Lepidodinium* 属には *L. viride* と *L. chlorophorum* が所属するが、両種の電子顕微鏡観察で狭義の *Gymnodinium* 属系統群がもつ上記3つの特徴が確認され、さらに 28S rDNA の分子系統解析もこの系統群への類縁を支持した（Hansen & Moestrup 2005, Hansen *et al.* 2007）。狭義の *Gymnodinium* 属系統群はペリディニン型葉緑体をもつ光合成性種（*G. aureolum*, *G. catenatum*, *Wangodinium sinense* など）を多数含んでいるため、ペリディニン型葉緑体から緑藻型葉緑体への置換は、この系統群の内部で起こった

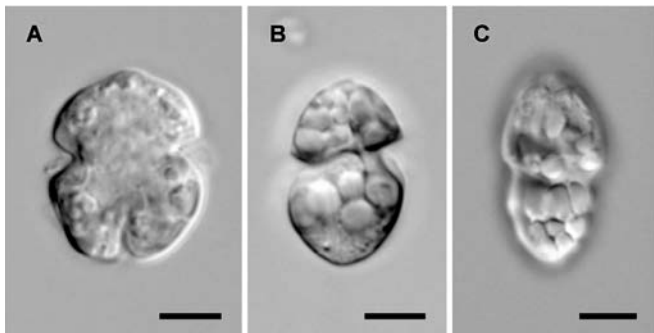


図1. 緑色渦鞭毛藻の光学顕微鏡写真。スケールバーは5 μm。A, *Lepidodinium chlorophorum*。B, TGD 株。C, MGD 株。

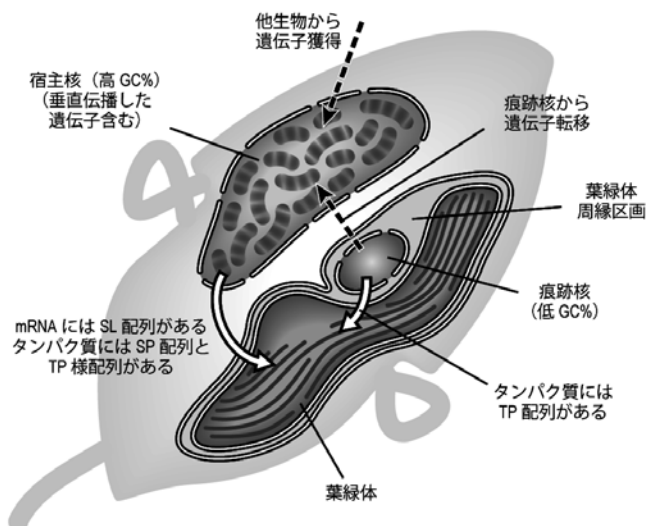


図2. 緑色渦鞭毛藻の宿主核と葉緑体、痕跡核の関係。葉緑体関連タンパク質は、宿主核を含む細胞質区画からは4枚包膜を通過し、痕跡核を含む葉緑体周縁区画からは2枚包膜を通過して輸送される。宿主核は祖先から垂直伝播した遺伝子を含むほか、共生体または他生物からの水平伝播に起因する遺伝子をもつ。SL, spliced leader; SP, signal peptide; TP, transit peptide。

ことになる (Hansen *et al.* 2000, Zapata *et al.* 2012, Luo *et al.* 2018)。

我々は最近、緑色葉緑体をもつ未記載の無殻渦鞭毛藻の培養株 TGD 株と MGD 株の確立に成功した (Sarai *et al.* 2020)。 *Lepidodinium chlorophorum* と TGD 株、MGD 株は細胞形態が異なる (図 1A–C)。 *L. chlorophorum* (図 1A) の細胞は丸く、葉緑体はよく分枝している。 TGD 株 (図 1B) の細胞は楕円形で、横溝は中央よりやや上方に位置し、葉緑体は葉状であった。 MGD 株 (図 1C) の細胞は紡錘形で、横溝は中央またはやや下方に位置し、葉緑体はリボン状であった。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の結果、TGD 株と MGD 株はクロロフィル *b* を主要な光合成色素としペリディニン欠いていた。両株とも 90 ヶ月以上独立栄養的に増殖していることから、葉緑体は恒久的に維持されることが分かる。宿主核コード 18S rDNA や 28S rDNA の塩基配列、および複数のタンパク質のアミノ酸配列に基づく宿主渦鞭毛藻の系統をみると、TGD 株と MGD 株の間に明確な類縁関係はみられず、 *Lepidodinium* 属藻類を含む狭義の *Gymnodinium* 属系統群とも類縁を示さなかった。葉緑体コード 16S rDNA の解析では、両株の葉緑体が緑藻由来であることが確かめられた。このような結果がどのような進化イベントを意味するかは後に考察するが、TGD 株と MGD 株、 *Lepidodinium* 属藻類のばらばらな系統関係から、渦鞭毛藻の中で 1 度だけ緑藻型葉緑体の獲得が起こったという従来の考え方は再考を迫られることとなった。

緑藻の痕跡核

TGD 株と MGD 株を TEM で観察すると、両者は共に 4 枚の葉緑体包膜をもっており、外側 2 枚と内側 2 枚の間には葉緑体周縁区画が観察された (図 2; Sarai *et al.* 2020)。この区画には 2 枚の膜で囲まれる核様構造と無数のリボソームが観察され、ミトコンドリアは含まれない。これらの特徴は、先行研究で観察された *Lepidodinium* 属藻類の微細構造と一致する (Watanabe *et al.* 1987, Elbrächter & Schnepf 1996)。我々は、TGD 株と MGD 株にみられた核様構造が取込まれた緑藻の痕跡核である複数の証拠を得ることができた (Sarai *et al.* 2020)。渦鞭毛藻の核はヒトゲノムのおよそ 1 ~ 80 倍もの巨大なゲノムをもつため (Lin 2011)、DNA 蛍光観察を行うと強い宿主核のシグナルが他の細胞小器官の像をかき消してしまう。これを防ぐために渦鞭毛藻細胞から葉緑体を分離し、SYBR Green 法を用いて DNA 局在を観察した。その結果、TEM で核様構造が観察された葉緑体側部に球状の緑色蛍光が観察された。一般に葉緑体やミトコンドリアを含む細胞内共生由来のゲノムは、宿主核に比べてゲノム中のグアニン (G) とシトシン (C) の含有量が低いことが知られている (Smith 2009, McCutcheon & Moran 2011, Tanifuji & Archibald 2014, Tanifuji & Onodera 2017)。TGD 株と MGD 株のトランスクリプトーム解析を行い、各転写産物の第一と第三コドンの GC% の割合を調べて二次元上にプロットすると、GC% が高い産物と低い産物の 2 群が得られた (Sarai *et al.* 2020)。これらのうち GC% が低い群の配列を相同性検索すると、ほとんどの転写産物が緑藻由来の遺伝子であることが示唆された。緑藻を含む一次植物では、核コードの葉緑体関連タンパク質の N 末端側には、輸送シグナルとして機能する transit peptide (TP) 配列があり、細胞質から葉緑体へタンパク質が輸送されている (Bolte *et al.* 2009)。一方、渦鞭毛藻では、葉緑体関連タンパク質は N 末端側に signal peptide (SP) 配列と TP 様配列の二部からなる配列をもち、小胞体またはゴルジ体輸送を介して葉緑体へタンパク質が輸送される (Bolte *et al.* 2009)。TGD 株と MGD 株の葉緑体関連タンパク質を見ると、GC% が低い群の N 末端配列長は GC% が高い群に比べて有意に短く、SP 配列を欠くことが示唆された (Sarai *et al.* 2020)。これらの結果から、TGD 株と MGD 株の GC% が低い緑藻由来の遺伝子は痕跡核のゲノムにあり、一部の葉緑体関連タンパク質は葉緑体周辺区画で翻訳され、小胞体やゴルジ体を介することなく葉緑体内へ輸送されることが示唆された (図 2)。

TGD 株と MGD 株で見つかった緑藻由来の光合成関連タンパク質の中には、GC% が異なる 2 つの遺伝子にコードされているものもみつかった (Sarai *et al.* 2020)。SP 配列の有無に加え、渦鞭毛藻の核からの転写産物に特徴的な 5'-末端の spliced leader (SL) 配列の有無を確認することで、転写産物が宿主核と痕跡核のどちらに由来するかを調べた。その結果、TGD 株で PetC は宿主核と痕跡核の両方にコードされており、MGD 株では PsbO と RbcS が宿主核と痕跡核の両

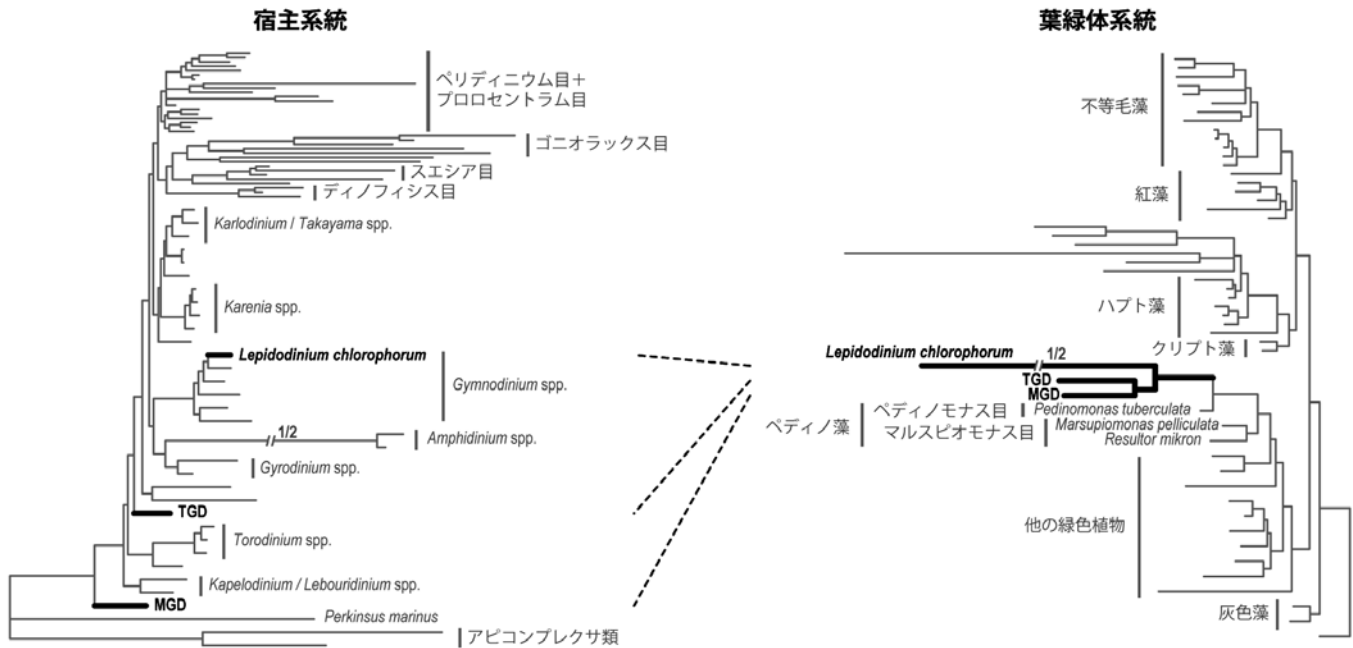


図3. 緑色渦鞭毛藻(*Lepidodinium chlorophorum*, TGD株, MGD株)の系統. (左)宿主核コード18Sと5.8S, 28S rDNAの連結系統樹. (右)葉緑体コード16S rDNAに基づく系統樹.

方にコードされていることが分かった。分子系統解析により、GC%の異なる2遺伝子が同一起源であることが示されたことから、これらの遺伝子は緑色渦鞭毛藻の痕跡核から宿主核へと転移している途中段階を示していると考えられる。

藻類を広くみると、紅藻由来葉緑体をもつクリプト藻と、緑藻由来葉緑体をもつクロララクニオン藻の2藻のみで、それぞれの共生藻に由来する痕跡核が見つかった。クリプト藻の葉緑体周縁区画にある痕跡核が初めてTEM観察されたのは1974年であり (Greenwood 1974; ヌクレオモルフという言葉はGreenwood *et al.* 1977で用いられた)、この痕跡核にDNAが含まれるとされたのは1985年である (Ludwig & Gibbs 1985)。クロララクニオン藻でも同様の証拠が得られたのはその4年後である (Ludwig & Gibbs 1989)。しかしそれ以降、類似の痕跡核をもつ新たな真核藻類は過去30年間発見されてこなかった。TGD株とMGD株がもつ痕跡核は、渦鞭毛藻が緑藻型葉緑体を獲得することにより生じた、第三、第四の痕跡核となる。

なぜペディノ藻？

*Lepidodinium chlorophorum*では葉緑体全ゲノムが決定されており、その遺伝子は緑藻の一部であるペディノ藻に近縁であることが示されている (Kamikawa *et al.* 2015)。奇妙なことに、葉緑体コード16S rDNA及び痕跡核コード18S rDNAの分子系統解析では、TGD株とMGD株、*L. chlorophorum*はペディノ藻の中で高い支持で単系統群を形成し、葉緑体は互いに近縁であることが示された (Sarai *et al.*

2020)。3藻の宿主と葉緑体の系統関係を図3に示す。この関係を最も単純に説明するには、宿主系統の異なる緑色渦鞭毛藻にごく近縁なペディノ藻が別個に取込まれることで、緑藻型葉緑体が3度生じたと考えれば良い (Sarai *et al.* 2020)。ある特定の藻類が様々な宿主生物と共生関係をもつことはあり、例えば緑藻の*Chlorella*属藻類やクリプト藻の*Teleaulax/Geminigera*属藻類などは、系統的に多様な宿主生物から報告されている (Reisser 1992, Yih *et al.* 2004, Minnhagen & Janson 2006, Park *et al.* 2013)。しかし、共生特化のペディノ藻が存在したとしても、そう何度も緑藻型葉緑体が確立されるだろうか。

渦鞭毛藻とペディノ藻の共生関係として、*Protoeuglena noctilucae* (= *Pedinomonas noctilucae*)を共生させる夜光虫*Noctiluca scintillans*の例がある (Furuya *et al.* 2006)。最大2 mmほどの大きさにもなる夜光虫の液胞内には、何千細胞もの*P. noctilucae*が鞭毛で遊泳しながら生活している。当然のことながら、最大細胞長が50 μm 程度の*Lepidodinium*属藻類や16, 17 μm 程度のTGD株とMGD株に、そのような巨大な液胞は物理的に存在できないため、緑色渦鞭毛藻とペディノ藻との共生初期段階が同様の状態であったとは考えにくい。近年、夜光虫に共生する*P. noctilucae*の系統的位置が決定された (Wang *et al.* 2016)。ペディノ藻綱はペディノモナス目とマルスピオモナス目の2目からなり、*L. chlorophorum*やTGD株とMGD株の葉緑体は前者に、*P. noctilucae*は後者に含まれるため、夜光虫のペディノ藻共生は緑色渦鞭毛藻の進化とは独立に起こったと考えられる。しかし、ペディノ藻

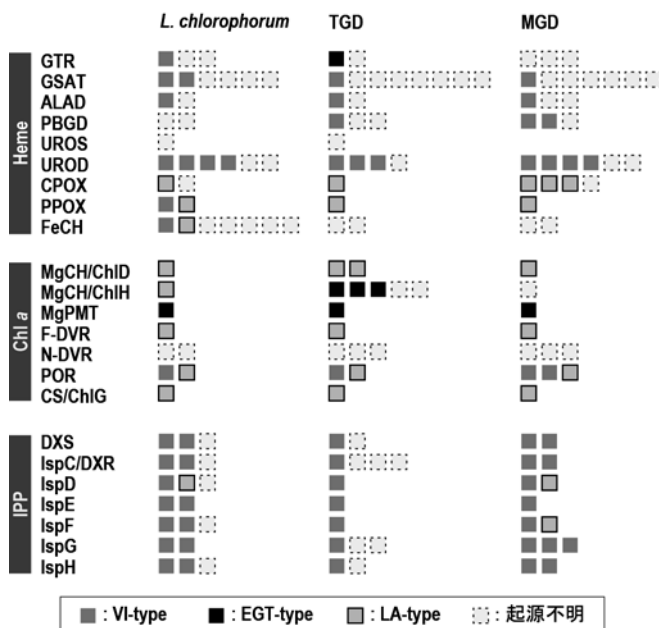


図4. 緑色渦鞭毛藻における、渦鞭毛藻核コード葉緑体関連酵素遺伝子の起源。Sarai *et al.* (2020) の Supplementary Figure 7をもとに作図。四角形の数は見つかった遺伝子数を示す。酵素の略称は Sarai *et al.* (2020) を参照。EGT, endosymbiotic gene transfer; LA, laterally acquired; VI, vertically inherited.

が渦鞭毛藻に与えるメリットを考察する上で、夜光虫は参考になるかもしれない。

進化の不可逆則という伝統的な考え方がある (Dollo 1893, Gould 1970 など)。簡潔に言えば、ある形質について、それが複雑であるほど進化的に2度以上獲得されることはなく、1度獲得されれば完全に元に戻ることもないというものである。仮にそのような進化が起こってしまうと、進化という概念に基づいて生物多様性を理解することすら難しいだろう。この法則は、例えばある塩基配列のアデニンの部分が複数回チミンに置換されることや、アデニンからチミンへの置換後再びアデニンに置換されることがあるように、比較的単純な形質の進化には当てはまらない。しかし、葉緑体が系統的に異なる生物に制御されるようになるには、共生体の細胞小器官の縮退や喪失、葉緑体包膜数の追加、共生体や他生物から宿主核への遺伝子水平伝播、複数の代謝経路の獲得や置き換えなど、劇的な細胞の変化が必要である。これまでの常識で考えるならば、その過程は気が遠くなるほど複雑だろう。

Lepidodinium chlorophorum の核には、祖先種がもっていたペリディニン型葉緑体に関連する遺伝子 (vertically inherited [VI]-type) のほか、緑藻から転移した遺伝子 (endosymbiotic gene transfer [EGT]-type) と、渦鞭毛藻でも緑藻でもない生物から獲得された遺伝子 (laterally acquired [LA]-type) の3つのタイプがあり、これらの発現を組み合わせると緑藻型葉緑体を維持していると考えられる (図2; Minge *et al.* 2010, Matsuo & Inagaki 2018)。このよ

うなキメラ核は葉緑体を置換した渦鞭毛藻特有のもので、ほぼ VI-type のみで構成されるペリディニン型渦鞭毛藻とは明確に区別される。TGD 株と MGD 株のヘム (Heme) とクロロフィル *a* (Chl *a*)、イソペンテニルニリン酸 (IPP) 代謝関連酵素の発現解析の結果、両株共に上述3タイプの遺伝子が検出されたが、その混成パターンはここでも *L. chlorophorum* によく類似していた (Sarai *et al.* 2020)。緑色渦鞭毛藻の核コード葉緑体関連遺伝子の起源を図4に示す。Heme 合成系では、EGT-type 遺伝子は TGD 株で1系統検出されたのみで、半数は VI-type、もう半数は LA-type または起源不明であった。IPP 合成系では LA-type または起源不明の遺伝子が見つかるが、調べられた酵素関連遺伝子は全て VI-type を含む点は3つの緑色渦鞭毛藻で共通していた。Chl *a* 合成系では、Mg-protoporphyrin O-methyltransferase (MgPMT) 遺伝子が EGT-type で共通していたが、その他の代謝酵素遺伝子は LA-type が主要であった。また、これら LA-type 遺伝子の分子系統解析を行うと、ある遺伝子ではユーグレナ藻の中で、ある遺伝子ではクロララクニオン藻の中で3つの緑色渦鞭毛藻が単系統群となるなど、ホモログごとに単一起源を示す場合がほとんどであった (未発表)。詳細は割愛させて頂くが、もし3藻の宿主系統がばらばらでなければ、葉緑体は3藻の共通祖先でただ1度獲得されたと考えたくなるほど、3藻の葉緑体関連遺伝子の組成は類似していた。

3藻の宿主核にみられるこのような遺伝子混成パターンの類似と、LA-type 遺伝子の系統関係はどう捉えたら良いだろうか。少なくとも、単に近縁なペディノ藻を3度取り込むのみではこうはならない。葉緑体を置換した渦鞭毛藻にみられる核ゲノムのキメラ化は、葉緑体が完全に固定される以前に、適した共生体を選別する過程で生じたとする shopping bag 仮説がある (Larkum *et al.* 2007)。様々な共生体を細胞内に取り込み、遺伝子を核へ水平伝播させ、共生体の維持に効果的な遺伝子が核に固定されていった結果、得られた葉緑体は複数の系統的起源をもつタンパク質で構成されるようになる。この葉緑体を、複数の店から得られた商品が混ざり合うひとつの買い物袋になぞらえたことが名称の由来である。3つの緑色渦鞭毛藻の共通祖先で既に共生体の選別が始まっていたとは考えにくい。もしそうなら、共生体の選別は3藻がペリディニン型葉緑体をもっていた時代に行われたことになるが、自前の葉緑体がありながら複数の藻類を共生させるほど、あるいはペリディニン型葉緑体と緑藻型葉緑体を同時にもつほど器用な渦鞭毛藻は報告されたことがない (Matsuo & Inagaki 2018, Takahashi *et al.* 2019)。しかしもし3藻が別個に共生体の選別を始めたなら、その時点から最終的なペディノ藻由来の葉緑体の確立に至るまで、かなりの程度の平行進化を辿ったことになる。これら3藻の進化過程で、どのような制約が何種類あれば、この奇妙な葉緑体形質の一致がもたらされるだろうか。3藻がもつ外来遺伝子がいつ (3藻が分岐する前か、分岐した後か)、どこから (緑藻か、緑藻以外の藻類か)、何回 (1~3回のどれか) 獲得されたかについて、結

論を出すのは難しい。

これまで紹介してきた、3つの緑色渦鞭毛藻がもつ形質情報を押し並べて評価すると、宿主形質は渦鞭毛藻の中で3度別個に進化したことを示す一方で、葉緑体形質は渦鞭毛藻の中で1度のみ進化したことを示す。これは明らかな矛盾であり、緑色渦鞭毛藻の進化過程解明を困難にする主因となっている。このような緑色渦鞭毛藻の形質状態を説明する新たな進化の仕組みの解明が待たれる。

今後の展望

クリプト藻とクロララクニオン藻はいずれも、痕跡核に3本の染色体を含み、これらはほとんどが細胞の基本的な機能維持に必要な遺伝子（ハウスキーピング遺伝子）で構成されるなどの共通点がある（Archibald 2007）。しかしこれら2藻では、宿主核へ転移した遺伝子は痕跡核からみつかることもなく、痕跡核の起源も漠然と紅藻、緑藻ということが分かるのみで、現在に至る中間段階を現存種から見出すことはできない。それに対し緑色渦鞭毛藻の痕跡核はペディノ藻に由来することが分かっており、起源が比較的新しいのは利点である。緑色渦鞭毛藻の痕跡核は、クリプト藻とクロララクニオン藻の痕跡核、およびペディノ藻核と比較することで、取込まれた真核藻類の核がどのように縮退・喪失し宿主細胞に統合されるのかを理解するための有用な研究材料となるだろう。

緑色渦鞭毛藻と緑藻型葉緑体の系統関係は、二次植物5群（クリプト藻、不等毛藻、ハプト藻、アピコンプレクサ類とペリディニン型の渦鞭毛藻）と紅藻由来の二次葉緑体の系統関係を想起させる。原生生物の系統に関する過去の研究は5群のばらばらな宿主関係を示し続けており、例えば近年ではハプト藻は有中心粒太陽虫に近縁であること、クリプト藻はアーケプラスチダに近縁であることなどが示されている（Burki *et al.* 2016）。一方、複数の葉緑体遺伝子に基づく分子系統解析では、5群の二次葉緑体は共通の紅藻系統に起源することが示されており（Yoon *et al.* 2002）、さらにこれらの葉緑体には紅藻含む他のどの藻類にもみられない共通の特徴もある。すなわち、光合成色素クロロフィル *c* を含むことや、葉緑体機能の酵素グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）は藍藻型のものから真核細胞質型に置き換わっていることなどが挙げられる（Harper & Keeling 2003）。これらの事実については解釈が分かれており、5群の葉緑体がいづつ（5群が分岐する前か、分岐した後か）、どこから（紅藻か、紅藻を取込んだ藻類か）、何回（1～5回のうちどれか）獲得されたかについて、長年の論争が生じている（Cavalier-Smith 1999, 2018, Bodył 2005, 2018, Burki *et al.* 2016, Obornik 2019 など）。現在も多様な原生生物の形質情報が着実に蓄積しているが、この論争が決着しない大きな理由は、情報の不足よりむしろ、「宿主形質は複数起源を示すが、葉緑体形質は単一起源を示す」という情報の対立にある。もちろん、二次植物5群と紅藻由来葉緑体の関係と、3つの緑色渦鞭毛藻と緑藻型葉緑体の関係は、同様の考え方で説明できるとは限ら

ない。しかし、宿主系統の異なる緑色渦鞭毛藻が類似の緑藻型葉緑体をどのように獲得したかが明らかとなれば、二次植物5群がもつ紅藻由来葉緑体の成立過程を知る上でも重要な参考材料となるだろう。

引用文献

- Archibald, J. M. 2007. Nucleomorph genomes: structure, function, origin and evolution. *Bioessays* 29: 392–402.
- Bodył, A. 2005. Do plastid-related characters support the chromalveolate hypothesis? *J. Phycol.* 41: 712–719.
- Bodył, A. 2018. Did some red alga-derived plastids evolve via kleptoplastidy? A hypothesis. *Biol. Rev.* 93: 201–222.
- Bolte, K., Bullmann, L., Hempel, F., Bozarth, A., Zauner, S. & Maier, U. G. 2009. Protein targeting into secondary plastids. *J. Eukaryot. Microbiol.* 56: 9–15.
- 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.
- 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. 2018. Kingdom Chromista and its eight phyla: a new synthesis emphasising periplastid protein targeting, cytoskeletal and periplastid evolution, and ancient divergences. *Protoplasma* 255: 297–357.
- Daugbjerg, N., Hansen, G., Larsen, J. & Moestrup, Ø. 2000. Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmoured dinoflagellates. *Phycologia* 39: 301–317.
- Daugbjerg, N., Jensen, M. H. & Hansen, P. J. 2013. Using nuclear-encoded LSU and SSU rDNA sequences to identify the eukaryotic endosymbiont in *Amphisolenia bidentata* (Dinophyceae). *Protist* 164: 411–422.
- Dollo, L. 1893. Les lois de l'évolution. *Bull. Soc. Belge Geol. Pal. Hydr.* 7: 164–166.
- Elbrächter, M. & Schnepf, E. 1996. *Gymnodinium chlorophorum*, a new, green, bloom-forming dinoflagellate (Gymnodiniales, Dinophyceae) with a vestigial prasinophyte endosymbiont. *Phycologia* 35: 381–393.
- Furuya, K., Saito, H., Sriwoon, R. *et al.* 2006. Vegetative growth of *Noctiluca scintillans* containing the endosymbiont *Pedinomonas noctilucae*. *Afr. J. Mar. Sci.* 28: 305–308.
- Gould, S. J. 1970. Dollo on Dollo's law: irreversibility and the status of evolutionary laws. *J. Hist. Biol.* 3: 189–212.
- Greenwood, A. D. 1974. The Cryptophyta in relation to phylogeny and photosynthesis. In: Sanders, J. V. & Goodchi, D. J. (eds.) 8th International Congress of Electron Microscopy, pp. 566–567. Australian Academy of Science, Canberra.
- Greenwood, A. D., Griffiths, H. B. & Santore, U. J. 1977. Chloroplasts and cell compartments in Cryptophyceae. *Br. Phycol. J.* 12: 119.
- Hackett, J. D., Anderson, D. M., Erdner, D. L. & Bhattacharya, D. 2004. Dinoflagellates: a remarkable evolutionary experiment. *Am. J. Bot.* 91: 1523–1534.
- Hansen, G., Botes, L. & de Salas, M. 2007. Ultrastructure and large subunit rDNA sequences of *Lepidodinium viride* reveal a close relationship to *Lepidodinium chlorophorum* comb. nov. (= *Gymnodinium chlorophorum*). *Phycol. Res.* 55: 5–41

- Hansen, G., Daugbjerg, N. & Henriksen, P. 2000. Comparative study of *Gymnodinium mikimotoi* and *Gymnodinium aureolum*, comb. nov. (= *Gyrodinium aureolum*) based on morphology, pigment composition, and molecular data. *J. Phycol.* 36: 394–410.
- Hansen, G. & Moestrup, Ø. 2005. Flagellar apparatus and nuclear chambers of the green dinoflagellate *Gymnodinium chlorophorum*. *Phycol. Res.* 53: 169–181.
- Harper, J. T. & Keeling P. J. 2003. Nuclear-encoded, plastid-targeted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) indicates a single origin for chromalveolate plastids. *Mol. Biol. Evol.* 20: 1730–1735.
- Kamikawa, R., Tanifuji, G., Kawachi, M., Miyashita, H., Hashimoto, T., & Inagaki, Y. 2015. Plastid genome-based phylogeny pinpointed the origin of the green-colored plastid in the dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Genome Biol. Evol.* 7: 1133–1140.
- Larkum, A. W., Lockhart, P. J. & Howe, C. J. 2007. Shopping for plastids. *Trends Plant Sci.* 12: 189–195.
- Lin, S. 2011. Genomic understanding of dinoflagellates. *Microbiol. Res.* 162: 551–569.
- Ludwig, M. & Gibbs, S. P. 1985. DNA is present in the nucleomorph of cryptomonads: further evidence that the chloroplast evolved from a eukaryotic endosymbiont. *Protoplasma* 127: 9–20.
- Ludwig, M. & Gibbs, S. P. 1989. Evidence that the nucleomorphs of *Chlorarachnion reptans* (Chlorarachniophyceae) are vestigial nuclei: morphology, division and DNA-DAPI fluorescence. *J. Phycol.* 25: 385–394.
- Luo, Z., Hu, Z., Tang, Y. *et al.* 2018. Morphology, ultrastructure, and molecular phylogeny of *Wangodinium sinense* gen. et sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae) and revisiting of *Gymnodinium dorsalisulcum* and *Gymnodinium impudicum*. *J. Phycol.* 54: 744–761.
- Matsuo, E. & Inagaki, Y. 2018. Patterns in evolutionary origins of heme, chlorophyll *a* and isopentenyl diphosphate biosynthetic pathways suggest non-photosynthetic periods prior to plastid replacements in dinoflagellates. *PeerJ* 6: e5345.
- McCutcheon, J. P. & Moran, N. A. 2011. Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 13–26.
- Minge, M. A., Shalchian-Tabrizi, K., Tørresen, O. K. *et al.* 2010. A phylogenetic mosaic plastid proteome and unusual plastid-targeting signals in the green-colored dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *BMC Evol. Biol.* 10: 191.
- Minnhagen, S. & Janson, S. 2006. Genetic analyses of *Dinophysis* spp. support kleptoplastidy. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57: 47–54.
- Moestrup, Ø. & Daugbjerg, N. 2007. On dinoflagellate phylogeny and classification. In: Brodie, J. & Lewis, J. (eds.) *Unravelling the algae: the past, present, and future of algae systematics*. pp. 215–230. Systematics Association Special Volume 75, CRC Press, London.
- Obornik, M. 2019. Endosymbiotic evolution of algae, secondary heterotrophy and parasitism. *Biomolecules* 9: 266.
- Park, M. G., Kim, M. & Kang, M. 2013. A dinoflagellate *Amylax triacantha* with plastids of the cryptophyte origin: phylogeny, feeding mechanism, and growth and grazing responses. *J. Eukaryot. Microbiol.* 60: 363–376.
- Reisser, W. 1992. Endosymbiotic associations of algae with freshwater protozoa and invertebrates. In: Reisser, W. (ed.) *Algae and Symbioses: Plants, Animals, Fungi, Viruses, Interactions Explored*. pp. 1–19. Biopress, Bristol.
- Sarai, C., Tanifuji, G., Nakayama, T. *et al.* 2020. Dinoflagellates with relic endosymbiont nuclei as models for elucidating organellenogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117: 5364–5375.
- Schnepf, E. & Elbrächter, M. 1999. Dinophyte chloroplasts and phylogeny – a review. *Grana* 38: 81–97
- Smith, D. R. 2009. Unparalleled GC content in the plastid DNA of *Selaginella*. *Plant Mol. Biol.* 71: 627–639.
- Takahashi, K., Benico, G., Lum, W. M. & Iwataki, M. 2019. *Gertia stigmatica* gen. et sp. nov. (Kareniaceae, Dinophyceae), a new marine unarmored dinoflagellate possessing the peridinin-type chloroplast with an eyespot. *Protist* 170: 125680.
- Tanifuji, G. & Archibald, J. M. 2014. Nucleomorph comparative genomics. In: Löffelhardt, W. (ed.) *Endosymbiosis*. pp. 197–213. Springer, Vienna.
- Tanifuji, G. & Onodera, N. T. 2017. Cryptomonads: A model organism sheds light on the evolutionary history of genome reorganization in secondary endosymbioses. In: Hirakawa, Y. (ed.) *Advances in Botanical Research*. pp. 263–320. Academic Press. Elsevier.
- Waller, R. F. & Koreny, L. 2017. Plastid complexity in dinoflagellates: A picture of gains, losses, replacements and revisions. In: Hirakawa, Y. (ed.) *Advances in Botanical Research*. pp. 105–143. Academic Press. Elsevier.
- Wang, L., Lin, X., Goes, J. I. & Lin, S. 2016. Phylogenetic analyses of three genes of *Pedinomonas noctilucae*, the green endosymbiont of the marine dinoflagellate *Noctiluca scintillans*, reveal its affiliation to the order Marsupiomonadales (Chlorophyta, Pedinophyceae) under the reinstated name *Protoeuglena noctilucae*. *Protist* 167: 205–216.
- Watanabe, M. M., Takeda, Y., Sasa, T. *et al.* 1987. A green dinoflagellate with chlorophylls *a* and *b*: morphology, fine structure of the chloroplast and chlorophyll composition. *J. Phycol.* 23: 382–389.
- Yih, W., Kim, H. S., Jeong, H. J., Myung, G. & Kim, Y. G. 2004. Ingestion of cryptophyte cells by the marine photosynthetic ciliate *Mesodinium rubrum*. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 36: 165–170.
- Yoon, H. S., Hackett, J. D., Pinto, G. & Bhattacharya, D. 2002. The single, ancient origin of chromist plastids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 15507–15512.
- Zapata, M., Fraga, S., Rodríguez, F. & Garrido, J. L. 2012. Pigment-based chloroplast types in dinoflagellates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 465: 33–52.