

藻類学最前線

*Nitzschia*, 光合成やめるってよ

神川龍馬

真核生物の系統樹上において、光合成生物はパッチ状に分布している。これは複数回にわたる独立した細胞内共生による葉緑体の獲得結果として議論することが可能である。事実、緑藻類由来葉緑体はクロララクニオン藻類とユーグレナ藻類、渦鞭毛藻類の1種で独立して獲得された (Rogers *et al.* 2007; Kamikawa *et al.* 2015a)。その一方で、細胞内共生による葉緑体獲得は少数回であり、光合成生物がパッチ状に分布しているのは葉緑体の喪失や光合成能の喪失が主な理由である、という説もある。その代表格が Thomas Cavalier-Smith (1999; 2002) によるクロムアルベオラータ仮説であろう。本仮説では、クロロフィル *c* を有する藻類は単系統群を形成し、その共通祖先はクロロフィル *c* を有する葉緑体をすでに獲得していたとしている。この前提に基づくと、クロロフィル *c* を有する藻類に近縁な非光合成性種は、すべからず葉緑体や光合成能を喪失させた種であるということになる。現在では、ゲノムレベルでの大規模分子系統学的解析により真核生物の系統関係が徐々に明らかになるにつれ、クロムアルベオラータ仮説はおそらく正しくないという意見（もしくは感触）が大勢を占めてきている (e.g., Burki *et al.* 2012)。しかし、ここで注意が必要なのは、「クロムアルベオラータ仮説の成否」と「過去における葉緑体や光合成能の喪失」は分けて考えるべきであるということである。現在でも葉緑体の喪失や光合成能の喪失を経験したことがほぼ確実である真核生物は観察されるのであるから、葉緑体の喪失や光合成能の喪失は、系統樹上における光合成性真核生物の分布の一部を形作っていることに疑いの余地はない。事実、渦鞭毛藻類に近縁なパーキンサス類やマラリア原虫は4重膜に囲まれた葉緑体の痕跡を有する上、渦鞭毛藻類の系統樹において根元付近で分岐する非光合成性種のゲノム中には過去に葉緑体を有していた証拠が残っている (Gornik *et al.* 2015)。しかし、その一方、そのような光合成能を喪失した葉緑体内で何が行われているのか明らかにした例は多いとは言えない。非光合成性葉緑体における残存機能は、光合成能を喪失させた後の進化過程を明らかにするとともに非光合成性葉緑体を保持し続ける理由をも明らかにする可能性を秘める。

珪藻類は水圏の炭素循環に非常に重要な役割を果たしている単細胞真核生物のグループである。珪藻類はこれまでにおよそ 20,000 種が知られており、その種数からだけでも本グループがいかに多様性に富み、生態学的にも進化的にも重要であるかをうかがい知ることができる。この 20,000 種のうち、*Nitzschia* 属の 6 種および *Hantzschia*

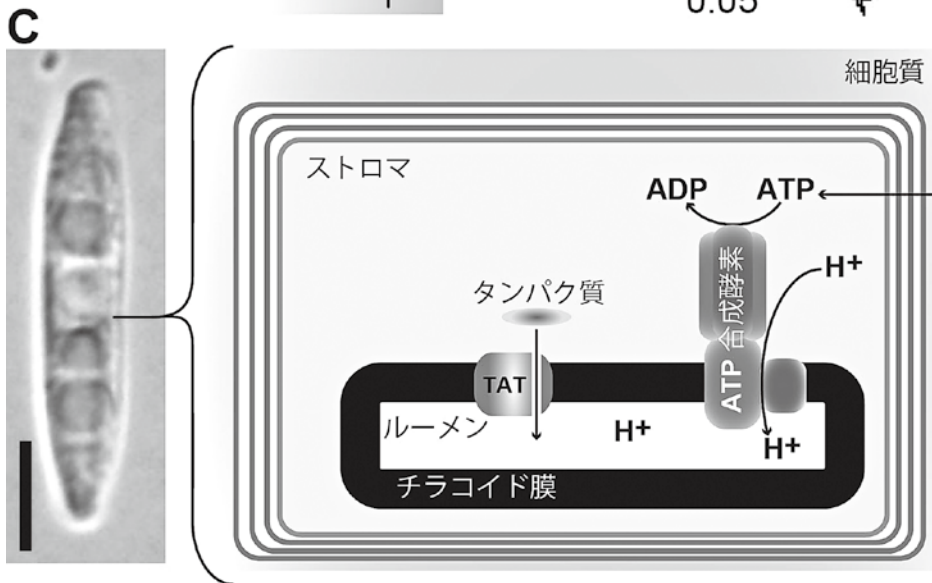
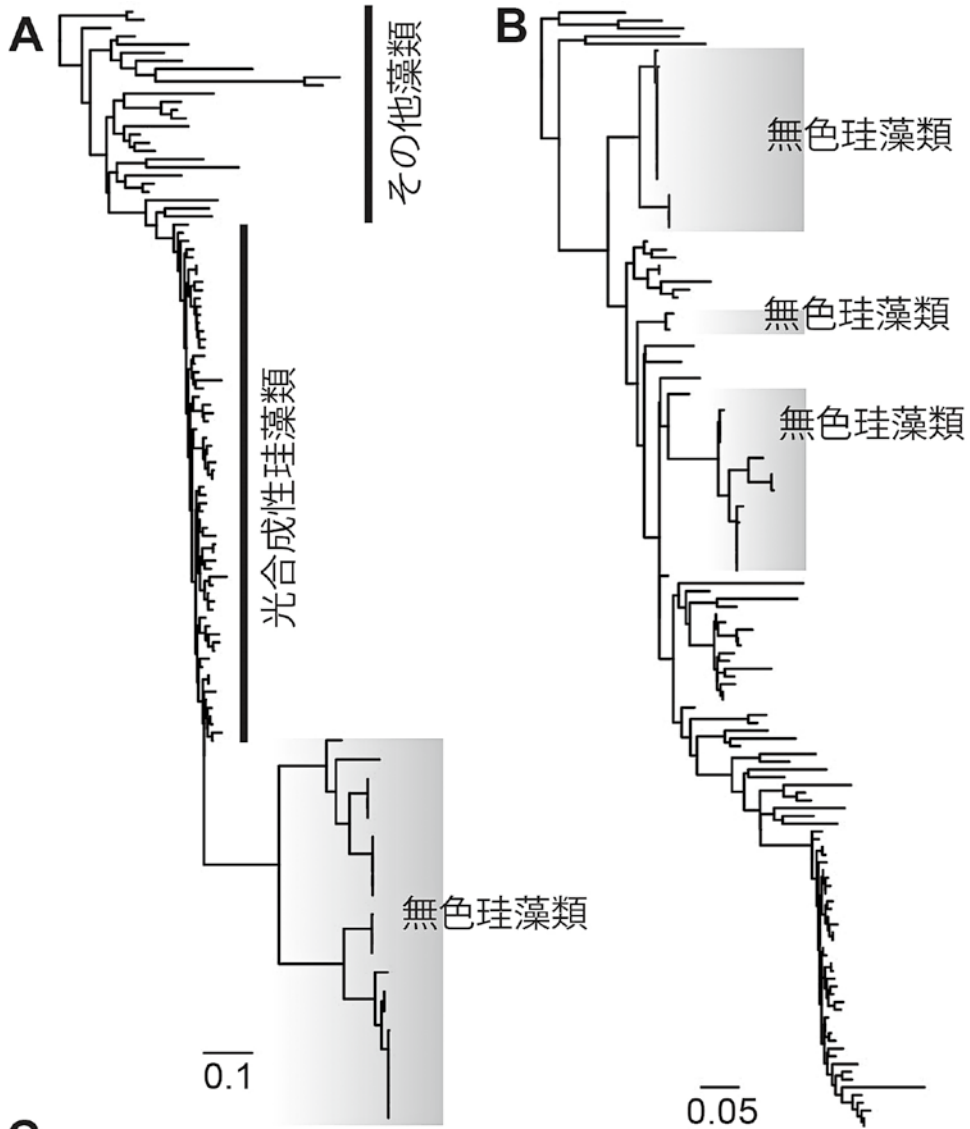
属の 1 種のみが無色の種として正式に報告されている。これまでに記載された無色種は細胞外の有機炭素源を利用することが可能であり、光合成を行わないことが培養実験から示唆されていた。珪藻類のような光合成性真核生物として成功を取めている系統において何故光合成能を捨てる進化が起きたのか、その進化を促進する細胞内因子や細胞外（環境）因子は非常に興味深い。

著者らは *Nitzschia* 属に属する複数の無色単離株の確立に成功し、これらから葉緑体型 16S rRNA 遺伝子の配列を決定することに成功した (Kamikawa *et al.* 2015b)。しかし、得られた配列がミトコンドリア DNA 由来である可能性はホモロジーからも否定できたものの、これまでに知られている葉緑体 16S rRNA 遺伝子とのホモロジーは非常に低く、葉緑体 rRNA 遺伝子配列であることに確信が持てなかった。そこでシアノバクテリア、一次植物（灰色藻類、緑藻類/陸上植物、紅藻類）およびハプト藻類、クリプト藻類、不等毛藻類を含めた葉緑体 16S rRNA 遺伝子の分子系統解析を行った (図 1 A)。仮に得られた配列がコンタミネーションを原因とするバクテリア由来配列であった場合、無色珪藻類の配列は光合成性珪藻類ではなく、シアノバクテリアとグルーピングするはずである。得られた樹形では、ホモロジーの低さを反映し、無色珪藻類配列は極めて枝長が長く、進化速度が上昇していることを示唆していた。しかし、興味深いことに無色珪藻類は、そのみで単系統群を形成し、さらに、他の光合成性珪藻類の配列とグルーピングした。そして珪藻類からなる単系統群は近縁系統であるペラゴ藻類、褐藻類、ラフィド藻類とグルーピングしていた。この樹形は、無色珪藻類由来配列が確かに珪藻類葉緑体 16S rRNA 遺伝子配列であることを示している。さらに、これまでに知られている限り、葉緑体 rRNA 遺伝子が核ゲノムにコードされている例は無く、すべからず葉緑体内に存在するゲノム（葉緑体ゲノム）にコードされている。本遺伝子配列の存在は無色珪藻類に葉緑体および葉緑体ゲノムがまだ保持されていることを強く示唆していた。これを裏付けるように、透過型電子顕微鏡観察の結果、4重膜に囲まれた構造体が無色珪藻類細胞内に観察された。光合成性珪藻類の葉緑体も4重膜に囲まれていることから、観察された構造体は縮退した葉緑体であると考えられた。しかし本構造体には明瞭なチラコイド構造は観察されず、縮退したチラコイド様構造が観察された。上述した実験および解析の結果は、無色珪藻類は光合成能を喪失させているが葉緑体は保持していることを示している。

次の疑問は *Nitzschia* 属珪藻における光合成能の喪失は一回だけなのか、それとも複数回起きたのか、であった。著者らが行った核コード大サブユニット rRNA 遺伝子の系統解析では、用いた 20 株の無色珪藻類は単系統にならず、少なくとも 3 つの系統が見られた (図 1 B)。このことは、おそらく光合成能の喪失という進化イベントが比較的最近になって独立して複数回起きたことを示唆する。その一方、この核コード LSU rRNA 遺伝子系統樹における非単系統性は、葉緑体 16S rRNA 遺伝子系統樹で見られた無色珪藻類が単系統にまとまった樹形と明確に異なる。この 2 つの系統樹における決定的な違いについて注意しなければならない点は以下の 2 点であろう。1 つ目はタクソンサンプリングについてである。葉緑体 16S rRNA 遺伝子解析では、光合成性真核生物およびシアノバクテリアからデータセットを作成していた。そして残念ながら、無色珪藻類の近縁種と考えられる光合成性 *Nitzschia* 属由来配列が、ほとんど含まれていない。その一方で、核 LSU rRNA 遺伝子解析では、現状利用可能な *Nitzschia* 属および *Nitzschia* 属に近縁な珪藻類の配列をほぼ網羅したデータセットが構成されている。近縁種が十分に含まれていない場合、実際はそこまで近縁でなくとも単系統となってしまうアーティファクトが生じることは十分に考えられる。例えば、ヒトはチンパンジーなどと近縁であるが、系統解析を行う際にチンパンジーなどを含まず、動物がヒトとネズミのみであれば、これら 2 種が単系統となるであろう。しかし、このヒト+ネズミの単系統を元に「ヒトはネズミの最近縁種であり、ヒトはネズミから直接進化した」などと議論を展開することは不可能である。同様に、近縁種配列が十分に含まれていない葉緑体 16S rRNA 遺伝子配列で得られた無色 *Nitzschia* 属珪藻類の単系統性から、これらの近縁性を直接議論することはできない。2 つ目の注意点は進化速度の違いである。分子系統解析では、進化速度が極めて大きい配列同士が「真実と異なる」単系統群を形成してしまうアーティファクトが生じることがある。これはロングブランチアトラクションアーティファクトと呼ばれる。葉緑体 16S rRNA 遺伝子の配列解析では、無色珪藻類だけ極めて長い枝長が推定された。その一方で、核 LSU rRNA 遺伝子配列では光合成性珪藻類との進化速度 (枝長) の違いは見られなかった。以上の 2 つの議論から、おそらく核 LSU rRNA 遺伝子配列の樹形の方が比較的眞実に近い樹形であることが示唆される。その一方で、核 LSU rRNA 遺伝子配列の樹形は解像度が低く、それぞれの無色系統に近縁な光合成性 *Nitzschia* 属珪藻類は不明のままである。今後、他の分子マーカーで核 LSU rRNA 遺伝子の結果を再現するとともに、各無色系統の最近縁種の同定を行う必要がある。

さて上述したように、葉緑体 16S rRNA 遺伝子配列と縮退した葉緑体様構造が無色珪藻類に存在する以上、葉緑体ゲノムも存在するはずである。光合成性種の葉緑体ゲノムには、光合成に必要な様々なタンパク質をコードした遺

伝子などが存在する。そしてその他多数の葉緑体タンパク質は、核ゲノムにコードされ、細胞質で翻訳された後、葉緑体へと運ばれる。「細胞質から葉緑体タンパク質を輸送できるのであれば葉緑体ゲノムなど必要なく、全部核ゲノムにコードされていてもいいのでは？」と考えた読者の方もおられると思われる。これは Colocation for Redox Regulation (CoRR 仮説: Allen 2003) という説で説明されている。この仮説では、電子の受け渡しを頻繁に行うミトコンドリアや葉緑体といった環境下では、酸化還元バランスを保つことが非常に重要な要素となっている。酸化還元のバランスが崩れた場合、ラジカル酸素などの大量発生など、致命的な事象を引き起こされる。そのため、酸化還元のバランスを保つには、電子伝達を行う主要タンパク質はミトコンドリアゲノムや葉緑体ゲノムにコードされ、その発現が精密に制御されていなくてはならない。そのためにミトコンドリアゲノムや葉緑体ゲノムに遺伝子が残っている、と CoRR 仮説では説明している。無色珪藻類の葉緑体ゲノムでは電子伝達は頻繁には行われないため、この制約はすでに存在しないはずである。もし著者らの想像通りに無色珪藻類に葉緑体および葉緑体ゲノムが存在するのであれば、それはどのようなゲノム構造を有しているのだろうか。そこで著者らは次世代シーケンサーで無色珪藻類 *Nitzschia* sp. NIES3581 株 DNA 配列を解析し、アセンブルされたコンティグ配列から葉緑体ゲノム由来データを抽出後、PCR やサンガーシーケンス法で葉緑体ゲノムを完全決定した。NIES3581 株の葉緑体ゲノムは光合成性珪藻類の葉緑体ゲノムと同様に rRNA オペロンを含んだ逆向き反復配列を有し、シングルコピー領域が 2 つ見られる環状ゲノムであった (Kamikawa *et al.* 2015c)。しかしそのゲノムサイズは約 70 kb 程度と、光合成性種の 50 ~ 60% 以下であり、ゲノム縮退が進んでいることが示された。事実、26 個のトランスファー RNA 遺伝子、3 つの rRNA 遺伝子に加え、わずか 62 個のタンパク質遺伝子しかコードしていなかった。光合成性珪藻類葉緑体ゲノムは 120 以上のタンパク質遺伝子をコードしていることを考えるとタンパク質遺伝子は半減していることになる。葉緑体ゲノムの縮退進化、特に遺伝子喪失を反映し、本ゲノムには光化学系 I および II、シトクロム *b6/f* 複合体関連遺伝子は全く見つからなかった。このことは本葉緑体ではエネルギー源である ATP を光合成から生成することができないことを示している。さらにルビスコ大サブユニットおよび小サブユニット遺伝子なども欠いていたことから、光合成のもう一つの重要な機能である炭素固定も行うことができないことが示された。またクロロフィル合成の鍵遺伝子である *chlI* も同定されなかった。これらの結果から、無色珪藻類 NIES3581 株は光合成をすることが不可能であることがゲノムレベルで示されたことになる。以下、無色珪藻類 NIES3581 株を非光合成性珪藻類 NIES3581 株と呼ぶことにする。非光合成性珪藻類 NIES3581 株の葉緑体ゲノムに光合成関連遺伝



子がコードされていなかった事実は、すなわち CoRR 仮説では非光合成性珪藻類 NIES3581 株の葉緑体ゲノムの存在を説明しきれないことを意味している。非光合成性葉緑体ゲノムの役割が、「光合成に重要な遺伝子をコードし酸化還元バランスを保つこと」でないとしたら葉緑体内にゲノムを保持する制約とは何だろうか。本ゲノムにコードされたタンパク質は、リボソーマルタンパク質に加え、タンパク質分解を行うサブユニット *clpC* や鉄-硫黄クラスター形成に関わるサブユニット *sufB* および *sufC*、チラコイドルーメンへのタンパク質輸送装置 *tatC* などであった。2000 年に Choquet and Vallon は葉緑体ゲノム上に遺伝子が残る理由の一つとして、正確な複合体形成のための制御という観点から別の仮説 (“control by epistasy of synthesis” と呼ばれる) を提案している。これは、コアとなるサブユニットが葉緑体ゲノム上にコードされ、葉緑体内で翻訳されることが、複数のサブユニットが適切なタイミングで適切に相互作用し複合体を形成するのに重要である、とする説である。非光合成性珪藻類 NIES3581 株の葉緑体ゲノム上に残るタンパク質遺伝子は、そのすべてが複合体のサブユニットであることから、おそらく “control by epistasy of synthesis” が非光合成性珪藻類葉緑体ゲノム進化における制約の一つとなっていると考えられる。

もう一つ、非光合成性珪藻類葉緑体ゲノムにおいて無視できない点があった。それはほぼすべての ATP 合成酵素のサブユニットがゲノム上に存在していた点である。さらに著者らは葉緑体ゲノムに加え、トランスクリプトーム解析を行い、核コードの葉緑体局在 ATP 合成酵素サブユニット γ を検出している。ここで結果を示さないが、サブユニット γ の N 末端配列を付加した GFP を光合成性珪藻類 *Phaeodactylum tricornutum* で発現させると葉緑体に局在することから、NIES3581 株の ATP 合成酵素複合体は非光合成性葉緑体内に局在していると考えられる (Kamikawa *et al.* in preparation)。葉緑体ゲノムとトランスクリプトームをあわせて考えると、ATP 合成酵素は現在も非光合成性葉緑体内で機能している (もしくはごく最近まで機能していた) と考えるのが妥当である。その一方で、光化学系 I および II、シトクロム *b6/f* 複合体は非光合成性珪藻類葉緑体内に存在しないと考えられるため、光合成とは独立して、ATP 合成酵素の機能のみが非光合成性葉緑体に必要である事を示唆している。ATP 合成酵素は通常、光化学系 I, 光

化学系 II, シトクロム *b6/f* 複合体から作られたプロトン勾配を利用して、ADP から ATP を合成する。その一方で、ATP 合成酵素は可逆酵素であり、プロトン勾配を利用した ATP 合成のみならずプロトン勾配形成を伴う ATP 分解を行うことが知られている。ATP 合成酵素の機能を考えるうえで、著者らは葉緑体ゲノム上に残る遺伝子のうち、*tatC* に注目した。*tatC* は Twin-Arginine Translocator のサブユニット TatC をコードする。トランスクリプトーム解析データ中には葉緑体 Twin-Arginine Translocator の核コードサブユニットである葉緑体局在 Hcf106/Tha4 タンパク質コード配列も検出され、Twin-Arginine Translocator が葉緑体内で機能している可能性は極めて高かった。Twin-Arginine Translocator とは、チラコイドルーメンにストロマからタンパク質を輸送する装置であるが、非常に興味深いことに、タンパク質輸送の際にプロトン勾配を利用する。すなわち、Twin-Arginine Translocator が機能している限り、何等かのタンパク質がチラコイドルーメンへと輸送されており、したがって非光合成葉緑体であってもプロトン勾配を形成する必要があるということになる。しかし非光合成性珪藻類葉緑体には光化学系 I, 光化学系 II, シトクロム *b6/f* 複合体は存在しないため、通常のプロトン勾配形成は不可能だと考えられる。おそらく、ATP 合成酵素は非光合成性珪藻類の葉緑体において、プロトン勾配を利用した ATP 合成ではなく、プロトン勾配を形成するための ATP 分解を行っていることが示唆される (図 1 C)。分解される ATP はおそらくヌクレオチドトランスポーターを通じて細胞質から運ばれてくると考えられた (Kamikawa *et al.* 2015c)。

上述の議論は非光合成性珪藻類にのみ当てはまるというわけではない。クリプト藻類は、ゴニオモナス類やカタブレファリス類、パルピトモナス類という従属栄養性種と近縁であることが知られている (Yabuki *et al.* 2014)。このクリプト藻類の中にも非光合成種 (*Cryptomonas paramecium*) が存在し、その葉緑体ゲノムデータが報告されている (Donaher *et al.* 2009)。*C. paramecium* 葉緑体ゲノムにも光合成に関わるタンパク質をコードする遺伝子はほとんど検出されず、にもかかわらず TatC や ATP 合成酵素はコードされていた。また寄生性陸上植物の葉緑体ゲノムにも同様の傾向が見られることから、これらの非光合成性 “藻類” や非光合成性陸上植物でも、葉緑体内で

図 1. 無色珪藻類の系統関係と推定される非光合成性葉緑体内の機能。A. 葉緑体小サブユニット rRNA 遺伝子最尤系統樹。無色珪藻類 *Nitzschia* spp. に加え、光合成性珪藻類およびシアノバクテリアを初めとした様々な藻類を用いて解析した。無色珪藻類のみハイライトした。無色珪藻類は単系統群を形成している。B. 核大サブユニット rRNA 遺伝子最尤系統樹。無色珪藻類 *Nitzschia* spp. に加えて、光合成性 *Nitzschia* spp. および近縁な珪藻類を用いて解析した。無色珪藻類のみハイライトした。無色珪藻類は 3 つのグループに分かれている。C. 無色珪藻類 *Nitzschia* sp. NIES3581 株光学顕微鏡写真および非光合成性 4 重膜葉緑体。スケールバー: 5 μ m。本来の機能である「H⁺ 勾配を利用した ATP 合成」の逆反応である「ATP 分解による H⁺ 勾配の形成」を ATP 合成酵素複合体は行っていると推定される。ATP は細胞質から輸送されると推定された。さらに H⁺ 勾配を利用した Twin Arginine Translocator (TAT) によるチラコイドルーメンへのタンパク質輸送が起こると推定される。

ATP分解に伴うプロトン勾配形成を行い、Twin-Arginine Translocatorを機能させていることが考えられる。さらに議論を発展させるのであれば、光合成能喪失後にも（少なくともしばらくの間は）チラコイドルーメン内にタンパク質を輸送する必要がある、そのためにはATP合成酵素遺伝子が葉緑体ゲノム上に保持され続けることが条件となっているのではないだろうか。現在のところ、どのようなタンパク質がTwin-Arginine Translocatorシステムを通じて輸送されているのかは不明である。どのようなタンパク質がチラコイドルーメンで機能しているにせよ、光合成関連遺伝子が喪失した後もATP合成酵素遺伝子が非光合成性葉緑体ゲノムに残存する現象は、真核生物全体においても光合成能喪失進化の必須共通パターンであるとも考えられる。

これまで、縮退進化を遂げた葉緑体の研究はマラリア原虫におけるアピコプラスト、寄生性陸上植物ハマウツボや寄生性緑藻類*Helicosporidium* sp.を中心に行われてきた。しかし光合成能を喪失させた“藻類”はアルベオラータ類や緑藻類のみならず、様々な系統に存在する。葉緑体が光合成能を喪失した後、どのような進化を辿り、結果としてどのような機能が残るのか、より多様性に富んだ研究対象を基に議論し直すべきである。最終的に、葉緑体における機能やその進化における共通原理を見出すことができれば、藻類が葉緑体を保持し続ける理由を光合成とは異なる視点で議論することもできるかもしれない。

引用文献

Allen, J.F. 2003. The function of genomes in bioenergetics organelles. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 358: 19-38.
 Burki, F., Okamoto, N., Pombert, J.-F., Keeling, P. J. 2012. The evolutionary history of haptophytes and cryptophytes: phylogenomic evidence for separate origins. *Proc. Biol. Sci.* 279: 2246-2254.
 Cavalier-Smith, T. 1999. Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: Euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan

plastid origins and the eukaryotic family tree. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46: 347-366.
 Cavalier-Smith, T. 2002. Chloroplast evolution: secondary symbiogenesis and multiple losses. *Curr. Biol.* 12: R62-64.
 Choquet, Y., Vallon, O. 2000. Synthesis, assembly and degradation of thylakoid membrane proteins. *Biochimie* 82: 615-634.
 Donaher, N., Tanifuji, G., Onodera, N. T., Malfatti, S. A., Chain, P. S., Hara, Y., Archibald, J. M. 2009. The complete plastid genome sequence of the secondarily nonphotosynthetic alga *Cryptomonas paramecium*: reduction, compaction, and accelerated evolutionary rate. *Genome Biol. Evol.* 1: 439-448.
 Gornik, S.G., Febrimarsa, Cassin, A.M., MacRae, J.I., Ramaprasad, A., Rchiad, Z., McConville, M.J., Bacic, A., McFadden, G.I., Pain, A., Waller, R.F. 2015. Endosymbiosis undone by stepwise elimination of the plastid in a parasitic dinoflagellate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112: 5767-5772.
 Kamikawa, R., Tanifuji G, Kawachi M, Miyashita H, Hashimoto T, Inagaki Y. 2015a. Plastid genome-based phylogeny pinpointed the origin of the green-colored plastid in the dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Genome Biol. Evol.* 7: 1133-1140
 Kamikawa, R., Yubuki, N., Yoshida, M., Taira, M., Nakamura, M., Ishida, K., Leander, B. S., Miyashita, H., Hashimoto, T., Mayama, S., Inagaki, Y. 2015b. Multiple losses of photosynthesis in *Nitzschia*. *Phycol. Res.* 63: 19-28.
 Kamikawa, R., Tanifuji, G., Ishikawa, S. A., Onodera, T. N., Ishii, K., Matsuno, Y., Ishida, K., Hashimoto, T., Miyashita, H., Mayama, S., Inagaki, Y. 2015c. Proposal of a Twin-arginine translocator-mediated constraint against loss of ATP synthase genes from nonphotosynthetic plastid genomes. *Mol. Biol. Evol.* 32: 2598-2604.
 Rogers, M. B., Gilson, P. R., Su, V., Mcfadden, G. I., Keeling, P. J. 2007. The complete chloroplast genome of the chlorarachniophyte *Bigeloviella natans*: Evidence for independent origins of chlorarachniophyte and euglenid secondary endosymbionts. *Mol. Biol. Evol.* 24: 54-62.
 Yabuki, A., Kamikawa, R., Ishikawa, S. A., Kolisko, M., Kume, K., Kim, E., Tanabe, A. S., Ishida, K., Inagaki, Y. 2014. *Palpitomonas bilix* represents a basal cryptist lineage: insight into the character evolution in Cryptista. *Sci. Rep.* 4:4614.

(京都大学)