

論文内容の要旨

論文題目 Evolutionary history of the green secondary eukaryotes chlorarachniophytes

based on phylogenetic analyses of nuclear-encoded genes

(核コード遺伝子の系統解析に基づく緑色二次植物クロララクニオン藻類の進化的系譜)

氏名 楊 億

1. 研究背景

光合成をする真核生物の殆どの色素体は10から20億年前のシアノバクテリアの祖先が取り込まれた細胞内共生である「一次共生」に由来する。一次共生の結果できた「一次植物」はさらに別の真核生物に取り込まれ（「二次共生」）、新たな光合成生物である「二次植物」が誕生した。従って、二次植物の色素体は一次植物の真核生物が細胞内で共生進化したものと考えられる（図1）。

現生の一次植物には灰色藻、緑色植物（緑藻類と陸上植物）、紅藻の3つのグループがある。一方、二次植物は緑藻を取り込んだものと紅藻を取り込んだものがある。ミドリムシ藻と本研究のクロララクニオン藻は共に緑色の色素体をもち、緑藻が二次共生したものと考えられている。一方、紅藻を取り込んだ二次共生植物は最近クロムアルベオラータ(CR)と呼ばれ褐藻・珪藻や渦鞭毛藻等様々なものを含む（図2）。

遺伝子水平伝達(lateral gene transfer[LGT])は異なる種間の遺伝子の移動であり、特に細胞内共生の時にホストの核に複数の遺伝子が移動するLGTを endosymbiotic gene transfer (EGT) という。色素体は一次または二次共生によって成立したものなので、EGT 由来と考えられる核コードの色素体関連の光合成遺伝子等を解析することで過去の色素体獲得の歴史を探ることができる。

クロララクニオン藻は糸状仮足をもつスーパーグループ「リザリア」の1系統で緑藻由来の二次色素体をもつので、核ゲノム中には EGT 由来の緑藻起源の遺伝子が存在することが考えられる（図3）。しかし、最近のゲノム情報の解析から紅色系（紅藻・CR由来）の核コード遺伝子が検出された (Archibald et al. 2003; Curtis et al. 2012)。しかし、これらの解析で用いたクロララクニオン藻は核ゲノムが公開されている *Bigelowiella natans* 1種だけである。また、Curtis et al.(2012) は自動系統樹作成のパイプラインを使用しているが、このようなパイプラインは使用するデータベースの由来生物の組成に偏りがあるので、結果が偏ることがあると指摘されている(Deschamps & Moreira 2012)。従って、本研究で私はクロララクニオン藻で *B. natans* とは離れた系統の種を加え、新たに独自に local database を構築し、自動系統樹作成のパイプラインを確立した。その結果、なるべく多くの紅色系の遺伝子を検出し、クロララクニオン藻の核ゲノムがもつ紅色系の遺伝子の進化的起源を明らかにする目的で研究を実施した。

2. 広範囲な分子系統解析は緑藻由来の二次共生葉綠体をもつ2つの系統ミドリムシ藻綱とクロララクニオン藻綱の光合成PRK 遺伝子が緑色ではない藻類からの起源を示す

多くの系統解析単位(OTU)を用いたシアノバクテリア型の核コード光合成遺伝子PRKの系統

私は縮重プライマー法でクロララクニオン藻を含む合計5種の新規PRK(Phosphoribokinase)の配列を決定し、多くのOTUで系統解析を実施した。その結果、紅藻からのPRKのLGT(Petersen et al. 2006)はクロララクニオン藻の祖先段階であったことが推測された（図4）。

縮重プライマーでNested-PCRを行って、TAクロンニーグして部分配列を決定し、Walkingで灰色藻の *Glaucocystis nostochinearum* (927bp)と *Gloeochaete wittrockian*(942bp)およびミドリムシの *Eutreptiella gymnastica* (969bp)のPRK cDNA配列を決定した。平均333アミノ酸の多くの系統解析単位(OTU)を用いたシアノバクテリア型の核コード光合成遺伝子PRKの系統樹は図4に示している。その結果、紅藻からのPRKのLGT(Petersen et al. 2006)はクロララクニオン藻の祖先段階であったことが推測された（図4）。

3. クロララクニオン藻の新規トランスクリプトームを用いた紅色系遺伝子の網羅的解析

前章で PRK の紅色系からの LGT がクロララクニオン藻の祖先段階と推測されたが、この原因を推測するには、ゲノム全体を対象とした網羅的な解析と核ゲノム配列が公開されている *B. natans* に加えてもう 1 種のクロララクニオン藻の大量の配列データが必要である。このため *B. natans* とは系統的に最も離れた *Amorphochlora amoebiformis* の RNA を配列をロシュ/454 次世代シーケンサーで網羅的に決定した。次に *A. amoebiformis* のデータを含む local database を構築し、自作スクリプトも作成し、東京大学医学研究所ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピュータを用いてシアノバクテリア型の紅色系遺伝子の網羅的探索をするためのパイプラインを構築した。

B. natans 21,708 遺伝子の推定アミノ酸配列をクエリとした解析で検出された遺伝子のアライメントに関して、マニュアルチェック後、最尤法とベイス法で系統解析を実行し、Curtis et al. (2012) で検出された遺伝子も参考にし、最終的に 11 個のクロララクニオン藻遺伝子がシアノバクテリア型で紅色系に位置することを明らかにした(図 5)。このうちクロララクニオン藻の 2 種が単系統を形成していて、本藻の系統の祖先段階で紅色系からの LGT があったと推測されたのは 9 個であった。従って、祖先段階で紅色系からの EGT で多くの遺伝子が伝搬された可能性が示唆される。11 遺伝子におけるクロララクニオン藻の紅色系内での系統的位置は 5 個が CR 型であり(図 6)、PRK だけが紅藻型であった(残り 5 個は不明)。また、11 個の多くの遺伝子は機能的に光合成・色素体に関連したもので、系統樹に含まれた殆どの真核生物の OTU が色素体をもつ。従って、これら紅色系遺伝子はクロララクニオン藻の現在の緑色の二次色素体を獲得する直前に機能していた紅色系二次植物(CR)の色素体由来の EGT 遺伝子の可能性がある。このことは、現在の緑色の二次色素体はその前に存在していた紅色系二次植物の色素体と入れ替った(replacement)ことを示唆している(図 7)。また PRK は CR が紅藻から離れていることもあり、今回のほかの遺伝子とは異なる可能性が考えられる。

4. 総合考察

今回、核ゲノム配列が公開されている *B. natans* とは最も系統的に離れたクロララクニオ藻 *A. amoebiformis* の網羅的 RNA 配列と独自の網羅的に遺伝子を探索し系統樹を作成するパイプラインを確立・使用することで、本藻類群の祖先段階で隠れた紅色系の色素体共生が推測され、紅色系色素体は現在の緑色系二次色素体と入れ替わった可能性が示唆された。最近ではミドリムシ藻(Maruyama et al. 2011)と CR の珪藻(Moustafa et al. 2009)でも現在の二次色素体とは異なる起源の EGT 遺伝子が核ゲノムから多数解析されている。従って、全く色素体を持たない真核生物(ホスト)に新たに二次共生が起きて二次色素体として定着する可能性は低いものと考えられる。即ち、二次共生は一般的にはホストが以前に持っていた色素体と入れ替わることで成立するという仮説である。現在私はこの仮説を更に検証するために、紅色系二次植物の異なる系統であるハブト植物のシアノバクテリア型の緑色系 EGT 遺伝子探索を今回と同様なパイプラインで実施している。

引用文献

- Archibald JM et al. Lateral gene transfer and the evolution of plastid-targeted proteins in the second plastid-containing alga *Bigelovia natans*. *PNAS* 2003, 100:7678-7683.
- Archibald JM The puzzle of plastid evolution. *Curr Biol* 2009, 19:R81-88.
- Curtis BA et al. Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. *Nature* 2012, 492(7427):59-65.
- Deschamps P & Moreira D Reevaluating the green contribution to diatom genomes. *Genome Biol Evol* 2012, 4: 795–800.
- Petersen J et al. A “green” phosphoribulokinase in complex algae with red plastids: evidence for a single secondary endosymbiosis leading to haptophytes, cryptophytes, heterokonts, and dinoflagellates. *J Mol Evol* 2006, 62:143-157.
- Maruyama S et al. Eukaryote-to-eukaryote gene transfer gives rise to genome mosaicism in euglenids. *BMC Evol Biol* 2011, 11:105.
- Moustafa A et al. Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms. *Science* 2009, 324:1724-1726.

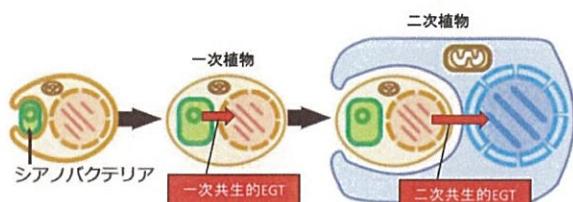


図 1. 色素体の一次共生と二次共生模式図

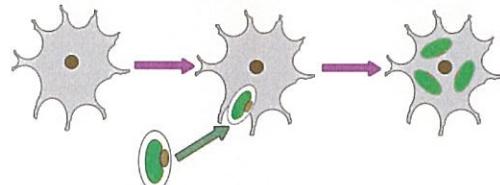


図 3. 二次共生によるクロララクニオン藻の成立

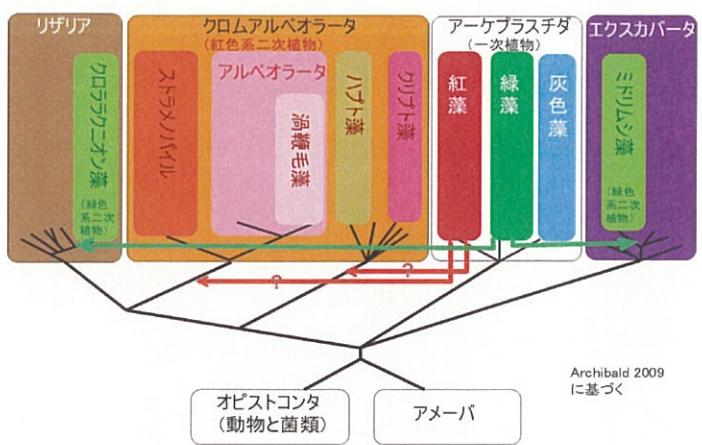


図 2. 真核生物大系統と色素体二次共生(矢印)

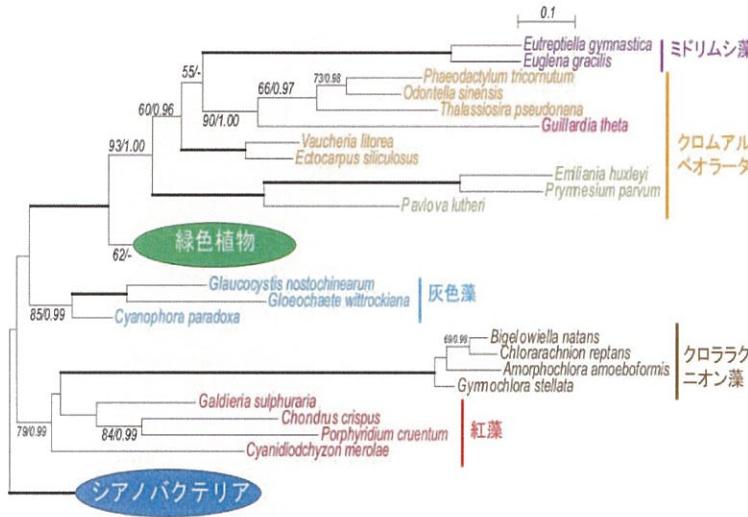


図 4. PRK 遺伝子の系統樹 (RaxML)。値:Bootstrap value(RaxML)/事後確率(PhyloBayes)。太線は 100/1.00、未表記は 50/0.95 以下。

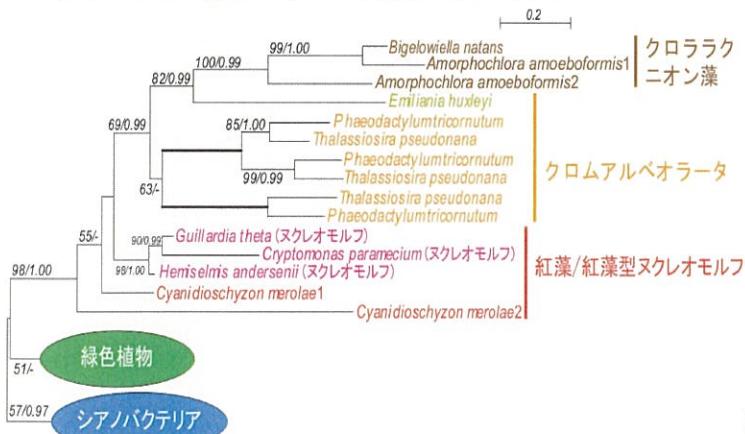


図 6. クロララクニオン藻が紅色系シアノバクテリア型である典型的な遺伝子の系統樹 (RaxML)。PDP の 316 アミノ酸配列を使用。値:Bootstrap value(RaxML)/事後確率(PhyloBayes)。太線は 100/1.00、未表記は 50/0.95 以下。

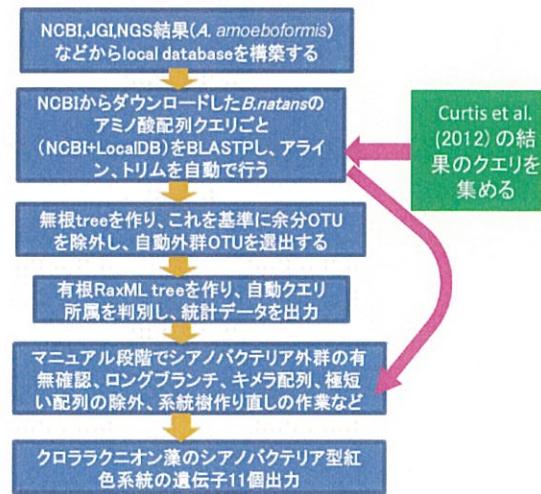


図 5. スパコンに用いた選出バイオラインの流れおよびマニュアル段階の手作業内容

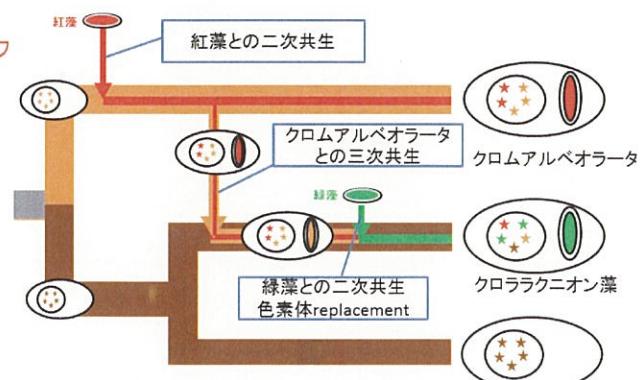


図 7. 本研究で推定された進化的系譜