

次世代シークエンス×藻類学=次世代藻類学

中山卓郎

東北大学生命科学研究科

〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

Takuro Nakayama

Next generation phycology

Keywords: algae, genome, photosynthesis, plastid, transcriptome

Graduate School of Life Sciences, Tohoku University,

6-3 Aza-Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8578, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.8c1.00120

1. 藻類とその多様性

「植物」という言葉には様々な定義があり、この言葉を使う人または状況によってその意味は大きく変わりうる。世間一般で使われる植物という言葉は根・茎・葉をもつ、いわゆる維管束植物を指すように思う。あるいはそこにコケ植物を合わせた陸上植物が当てはまるかもしれない。一方で、一般に受け入れられる「植物の働き」とは、酸素を放出して二酸化炭素を消費するという光合成の働きのイメージではないだろうか。この働きはすなわち酸素発生型光合成であり、この「植物の働き」を担う生物が「植物」であるとするなら、「植物」には陸上植物以外にも多種多様な生物が含まれることとなる。我々はこの広い意味での植物の中の、陸上植物以外の生物のことをひっくるめて藻類と呼んでいる。

酸素発生型光合成生物から陸上植物を除いたもの、という定義からもわかる通り藻類は雑多な生物の集まりである。雑多と一言で表せば非常に簡単であるが、藻類の雑多さは中途半端なものではない。現在の知見では真核生物の系統は8つ程度の大きなグループに分けられる (Burki et al. 2016)。陸上植物が、一つの大グループの中のサブグループのさらに内部の系統であると考えられているのに対して、藻類は上記の8つの大グループのうち、5つにまたがって存在している。さらに、酸素発生型光合成生物という枠組みで考えれば、真正細菌ドメインであるシアノバクテリア(藍藻)も藻類に含まれる。藻類はこの系統的多様性に加え、生態的、形態的、生理的にも非常に多様である。クラミドモナスやシゾンのような単細胞性のものからコンブやワカメの様な多細胞性のものもあれば、細胞内の構造や代謝なども陸上植物や動物とかけ離れた特徴を持つものも珍しくない。藻類の多くは水中に生息し、かつその多くが単細胞レベルの微細な生物であるため、普段目にすることは多くないかもしれない。しかし、藻類は陸上植物出現以前、地球の大気を現在のような好気的環境に作り変えた立役者

T. Nakayama-1

BSJ-review 8:130 (2017)

であり（井上 2007），現在の地球においても陸上の植物に匹敵する一次生産量を担うとされる（Field et al. 1998）。地球全体の「植物」の働きや進化を考えるうえで，藻類も陸上植物と同様に重要な生物群であると言えるだろう。

多様性と言うキーワードは藻類という生物群の大きな魅力であり，それぞれの藻類のユニークさに魅せられて藻類研究を行っている人も少なくないと察する。その一方で，ユニークな生物はしばしば研究材料としては扱いにくい面を持ち合わせる。藻類の系統的多様性を鑑みれば必然かも知れないが，動物や陸上植物の実験系で確立された技術も藻類では適用できないことは少なくない。また，いずれかの藻類で確立された実験手法であっても，他の系統の藻類にも通用するとは限らない。そもそも培養すら困難で，DNA の抽出もままならない種も多く存在する。生物の研究を開拓に例えるとするならば，藻類という研究対象はさながら広大無辺な未踏の大地である。

2. 藻類学と次世代シークエンシング

昨今のゲノム生物学を推し進めた大きな要素の一つが，次世代シークエンス技術の台頭であるのは間違いないであろう。従来のサンガー法によるシークエンサーと比較して 100 万倍以上のスピードで塩基配列決定が行えるようになった今，ゲノムレベルの塩基配列解読も身近なものである。ジェームズ・ワトソン博士の個人ゲノム DNA が，次世代シークエンサーにより従来の 3000 分の 1 の費用で解読され（Wheeler et al. 2008），一躍次世代シークエンサーが注目を浴びたのが 2007 年。それから 10 年経った今，次世代シークエンシングは，もはやサンガー法シークエンシングとは異なる「従来型」シークエンシングとして定着した感がある。

藻類研究においても近年次世代シークエンシングは盛んに取り入れられ，大規模塩基配列データを基盤とした研究が大きく盛り上がりを見せている。単細胞の藻類のゲノムと聞くと，シンプルなゲノムを想像する人が多いかもしれないが，必ずしもそうではない。シロイヌナズナの核ゲノムにコードされる遺伝子はおよそ 27,000 (The Arabidopsis Information Resource, TAIR) であるのに対し，灰色藻: 27,921 (Price et al. 2012)，クリプト藻: 24,840 (Curtis et al. 2012)，クロララクニオン藻: 21,708 (Curtis et al. 2012)，ハプト藻: 30,569 (Read et al. 2013) のように単細胞性藻類であっても，陸上植物に匹敵する遺伝子数を有するものも多い。さらには，ゲノムサイズも多様であり，シゾンやオストレオコッカスの 20 Mbp 以下のものから (Matsuzaki et al. 2004; Palenik et al. 2007)，赤潮を形成することで有名な渦鞭毛藻類は，最大で 180 Gbp にも達する巨大なゲノムを持つことが知られている (Wisecaver and Hackett 2011)。ゲノム解読に加え，トランスクリプトーム解析も盛んに進められており，Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP)では 650 を超える海産单細胞藻類のトランスクリプトームデータが公開されている (Keeling et al. 2014)。また本総説集にも出てくるが，近年の次世代シークエンシングの技術向上やコスト削減により，複数の近縁種間でのゲノム配列比較解析，同一種内での異なる生殖ステージや異なる細胞周期での発現遺伝子比較解析が行われるようになったのに加え，培養困難な藻類

においても核酸増幅技術の発展などにより、ごく少量の DNA や RNA からゲノム/トランスクリプトーム解析を行なうことも可能となってきた。

3. シンポジウム：次世代シークエンス×藻類学＝次世代藻類学

2016 年 9 月、台風一過の沖縄で行われた日本植物学会第 80 回大会シンポジウムの場において、藻類学分野の第一線で活躍される若手研究者をお招きし、それぞれの研究における最新の知見をお話頂いた。本総説集は当該シンポジウムの内容を再編成したものである。シンポジウムのキーワードは藻類学と次世代シークエンシング。敢えて研究テーマにはこだわらず多種多様な藻類研究の話題を集めることで、次世代シークエンシングというファインダーから次世代の藻類学を覗き見ることを試みた。シンポジウムの狙い上、総花的な話題の組み合わせとなつたが、「次世代藻類学」の幅の広さを感じられるものであったと考える。結果、シンポジウムには大勢の方にお越しいただき、盛況のうちに幕を閉じることができた。本総説集の読者の方々にも、次世代シークエンスという新たな道具を携え、藻類学の地平を開拓する若手研究者の取り組みを知って頂ければ幸いである。

4. 謝辞

本稿の作成にあたっては、平川泰久博士（筑波大学生命環境科学研究科）に多大なご協力を頂きました。またオーガナイザーの一人として、日本植物学会第 80 回大会シンポジウム「次世代シークエンス×藻類学＝次世代藻類学」に足をお運び頂いた全ての皆様にこの場をお借りして御礼申し上げます。

参考文献

- Burki, F., Kaplan, M., Tikhonenkov, D.V., Zlatogursky, V., Minh, B.Q., Radaykina, L.V., Smirnov, A., Mylnikov, A.P., & Keeling, P.J. 2016. Untangling the early diversification of eukaryotes: a phylogenomic study of the evolutionary origins of Centrohelida, Haptophyta and Cryptista. *Proc. R. Soc. B.* 283: 20152802.
- Curtis, B.A., Tanifuji, G., Burki, F., Gruber, A., Irimia, M., Maruyama, S., Arias, M.C., Ball, S.G., Gile, G.H., Hirakawa, Y., Hopkins, J.F., Kuo, A., Rensing, S.A., Schmutz, J., Symeonidi, A., Elias, M., Eveleigh, R.J., Herman, E.K., Klute, M.J., Nakayama, T., Oborník, M., Reyes-Prieto, A., Armbrust, E.V., Aves, S.J., Beiko, R.G., Coutinho, P., Dacks, J.B., Durnford, D.G., Fast, N.M., Green, B.R., Grisdale, C.J., Hempel, F., Henrissat, B., Höppner, M.P., Ishida, K., Kim, E., Kořený, L., Kroth, P.G., Liu, Y., Malik, S.B., Maier, U.G., McRose, D., Mock, T., Neilson, J.A., Onodera, N.T., Poole, A.M., Pritham, E.J., Richards, T.A., Rocap, G., Roy, S.W., Sarai, C., Schaack, S., Shirato, S., Slamovits, C.H., Spencer, D.F., Suzuki, S., Worden, A.Z., Zauner, S., Barry, K., Bell, C., Bharti, A.K., Crow, J.A., Grimwood, J., Kramer, R., Lindquist, E., Lucas, S., Salamov, A., McFadden, G.I., Lane, C.E., Keeling, P.J., Gray, M.W., Grigoriev, I.V., & Archibald, J.M. 2012. Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. *Nature* 492: 59–65.

Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., & Falkowski, P. 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281: 237–240.

井上勲 2007. 藻類 30 億年の自然史—藻類からみる生物進化・地球・環境—. 東海大学出版会. 神奈川.

Keeling, P.J., Burki, F., Wilcox, H.M., Allam, B., Allen, E.E., Amaral-Zettler, L.A., Armbrust, E.V., Archibald, J.M., Bharti, A.K., Bell, C.J., Beszteri, B., Bidle, K.D., Cameron, C.T., Campbell, L., Caron, D.A., Cattolico, R.A., Collier, J.L., Coyne, K., Davy, S.K., Deschamps, P., Dyhrman, S.T., Edvardsen, B., Gates, R.D., Gobler, C.J., Greenwood, S.J., Guida, S.M., Jacobi, J.L., Jakobsen, K.S., James, E.R., Jenkins, B., John, U., Johnson, M.D., Juhl, A.R., Kamp, A., Katz, L.A., Kiene, R., Kudryavtsev, A., Leander, B.S., Lin, S., Lovejoy, C., Lynn, D., Marchetti, A., McManus, G., Nedelcu, A.M., Menden-Deuer, S., Miceli, C., Mock, T., Montresor, M., Moran, M.A., Murray, S., Nadathur, G., Nagai, S., Ngam, P.B., Palenik, B., Pawlowski, J., Petroni, G., Piganeau, G., Posewitz, M.C., Rengefors, K., Romano, G., Rumpho, M.E., Rynearson, T., Schilling, K.B., Schroeder, D.C., Simpson, A.G., Slamovits, C.H., Smith, D.R., Smith, G.J., Smith, S.R., Sosik, H.M., Stief, P., Theriot, E., Twary, S.N., Umale, P.E., Vaulot, D., Wawrik, B., Wheeler, G.L., Wilson, W.H., Xu, Y., Zingone, A., & Worden, A.Z. 2014. The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP): illuminating the functional diversity of eukaryotic life in the oceans through transcriptome sequencing. *PLoS Biol.* 12: e1001889.

Matsuzaki, M., Misumi, O., Shin-I, T., Maruyama, S., Takahara M., Miyagishima, S., Mori, T., Nishida, K., Yagisawa, F., Nishida, K., Yoshida, Y., Nishimura, Y., Nakao, S., Kobayashi, T., Momoyama, Y., Higashiyama, T., Minoda, A., Sano, M., Nomoto, H., Oishi, K., Hayashi, H., Ohta, F., Nishizaka, S., Haga, S., Miura, S., Morishita, T., Kabeya, Y., Terasawa, K., Suzuki, Y., Ishii, Y., Asakawa, S., Takano, H., Ohta, N., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Shimizu, N., Sugano, S., Sato, N., Nozaki, H., Ogasawara, N., Kohara, Y., & Kuroiwa, T. 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428:653–657.

Palenik, B., Grimwood, J., Aerts, A., Rouzé, P., Salamov, A., Putnam, N., Dupont, C., Jorgensen, R., Derelle, E., Rombauts, S., Zhou, K., Otillar, R., Merchant, S.S., Podell, S., Gaasterland, T., Napoli, C., Gendler, K., Manuell, A., Tai, V., Vallon, O., Piganeau, G., Jancek, S., Heijde, M., Jabbari, K., Bowler, C., Lohr, M., Robbens, S., Werner, G., Dubchak, I., Pazour, G.J., Ren, Q., Paulsen, I., Delwiche, C., Schmutz, J., Rokhsar, D., Van de Peer, Y., Moreau, H., & Grigoriev, IV. 2007. The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104:7705–7710.

Price, D.C., Chan, C.X., Yoon, H.S., Yang, E.C., Qiu, H., Weber, A.P., Schwacke, R., Gross, J., Blouin, N.A., Lane, C., Reyes-Prieto, A., Durnford, D.G., Neilson, J.A., Lang, B.F., Burger, G., Steiner, J.M., Löffelhardt, W., Meuser, J.E., Posewitz, M.C., Ball, S., Arias, M.C., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Rensing, S.A., Symeonidi, A., Doddapaneni, H., Green, B.R., Rajah, V.D., Boore, J., & Bhattacharya, D. 2012. *Cyanophora paradoxa* genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants. *Science* 335: 843–847.

- Read, B.A., Kegel, J., Klute, M.J., Kuo, A., Lefebvre, S.C., Maumus, F., Mayer, C., Miller, J., Monier, A., Salamov, A., Young, J., Aguilar, M., Claverie, J.M., Frickenhaus, S., Gonzalez, K., Herman, E.K., Lin, Y.C., Napier, J., Ogata, H., Sarno, A.F., Shmutz, J., Schroeder, D., de Vargas, C., Verret, F., von Dassow, P., Valentin, K., Van de Peer, Y., Wheeler, G., *Emiliania huxleyi* Annotation Consortium, Dacks, J.B., Delwiche, C.F., Dyhrman, S.T., Glöckner, G., John, U., Richards, T., Worden, A.Z., Zhang, X., & Grigoriev, IV. 2013. Pan genome of the phytoplankton *Emiliania* underpins its global distribution. *Nature* 499: 209–213.
- Wheeler, D.A., Srinivasan, M., Egholm, M., Shen, Y., Chen, L., McGuire, A., He, W., Chen, Y.J., Makhijani, V., Roth, G.T., Gomes, X., Tartaro, K., Niazi, F., Turcotte, C.L., Irzyk, G.P., Lupski, J.R., Chinault, C., Song, X.Z., Liu, Y., Yuan, Y., Nazareth, L., Qin, X., Muzny, D.M., Margulies, M., Weinstock, G.M., Gibbs, R.A., & Rothberg, J.M. 2008. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 452: 872–876.
- Wisecaver, J.H. & Hackett, J.D. (2011) Dinoflagellate genome evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* 65: 369–387.

単細胞紅藻シアニジウム類の多様性と重金属耐性

兼崎 友

東京農業大学生物資源ゲノム解析センター

〒156-8502 東京都世田谷区桜ヶ丘 1-1-1

Yu Kanesaki

Isolation and characterization of heavy metal-tolerant Cyanidiales

Key words: *Primitive red algae, Cyanidiales, Heavy metal stress*

NODAI Genome Research Center, Tokyo University of Agriculture,

1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya, Tokyo, 156-8502, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.8c2.00121

1. はじめに

紅藻とは紅色植物門に属する真核藻類であり、特に我々の生活と馴染み深いのはアサクサノリやテングサなどの海水性の多細胞紅藻である。これら海水性の多細胞紅藻は、光合成色素としてクロロフィルa やフィコシアンチンの他に赤色色素であるフィコエリスリンを含んでいるため、紅色を呈する。一方、世界中の火山性の温泉地帯など、高温、硫酸酸性、高重金属イオンの複合的な環境ストレス下には、淡水性の单細胞紅藻が棲息している。これらの单細胞紅藻は極限環境紅藻とも呼ばれ、イデユコゴメ綱 (*Cyanidiophyceae*) という分類群に属する。イデユコゴメ綱には、*Cyanidioschyzon*(以下シゾン), *Cyanidium*(以下シアニジウム), *Galdieria*(以下ガルデリア) の3属が知られており、紅藻と言いながらフィコエリスリンを持たないため緑色を示す。真核藻類の中で最も高温環境で棲息可能で、かつ強酸、重金属耐性を持つイデユコゴメ綱は、環境ストレス耐性機構の研究材料として大きな可能性が期待されるが、その詳細な分子機構は未だによくわかつていない。今のところ、遺伝子破壊などの分子生物学的ツールが整備されているモデル生物はシゾンのみであり、シアニジウムやガルデリアのような非モデル極限環境紅藻についての生理学的情報、分子生物学的情報は極めて限られている。しかし生態分布からはシゾンよりもシアニジウムやガルデリアのほうが世界中の火山帶の高温酸性環境から広く見つかっており、このような非モデル極限環境紅藻についてもさらに研究がおこなわれるべきと考える。本稿では、我々が新規単離したシアニジウムの特徴やその有用形質について紹介したい。

2. シアニジウム類の重金属耐性

シアニジウムの重金属耐性についてはいくつか詳細な報告例があり、特にアルミニウムに対する耐性が非常に高く、生育速度は半減するものの 200 mM のアルミニウム条件下でも棲息できるという報告がある (Yoshimura et al. 1999)。同様に、亜鉛や銅、ニッケル、マンガン、

Kanesaki Y.-1

クロムについても 10 mM 程度までは生育可能と報告されている。またこのような特定の重金属ストレス条件下では、重金属を細胞内に多量に蓄積することも知られている (Nagasaka et al. 2004)。これについて、シアニジウムの細胞内で重金属を蓄積している場所として Electron-dense body という構造体があるということが報告されている (Nagasaka et al. 2002)。重金属の種類によるが、植物は mM オーダーの重金属ストレスを受けると深刻な生育阻害を起こす。例えば、酸性土壌では μM オーダーのアルミニウムイオンにより植物の根の伸長は速やかに阻害される。また緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* でも 100 μM の銅やクロムは生育を大きく阻害することが知られる (Nowtka et al. 2016)。これらと比べると、シアニジウムの重金属耐性の高さは異常とも言え、この機構を解明できればバイオレメディエーションやバイオマス物質生産の分野への貢献が期待できる。しかし、これまでに世界中の硫酸酸性温泉からシアニジウムが見つかっているものの、より高濃度の重金属に耐性を持つような種の探索や、重金属耐性や重金属応答に関わる遺伝子レベルでの研究はおこなわれてこなかった。

表 1 単細胞紅藻シアニジウム類の 3 属の特徴

属名	<i>Cyanidioschyzon</i> (シゾン)	<i>Cyanidium</i> (シアニジウム)	<i>Galdieria</i> (ガルデリア)
棲息環境	高温(40 – 55°C)、強酸性(pH 0.5 – 5.0)、高濃度金属イオン		
細胞壁	なし	あり	あり
分裂様式	等分裂	内生胞子(4)	内生胞子(4–32)
栄養的分類	完全光独立栄養性	完全光独立栄養性	光独立栄養性 従属栄養性
ゲノム情報、 遺伝子組換え	完全ゲノム情報 組換え可能	ドラフトゲノム情報 組換え不可	ドラフトゲノム情報 組換え不可
細胞の模式図			

3. 新規単離したシアニジウムの重金属耐性試験

山口大学の三角修己博士により箱根温泉大涌谷から採取されたバイオマットを元に、我々は重金属や pH などの強いストレス条件を付与した状態で培養をおこなうことで、コンタミした微生物群を排除し单細胞紅藻のシングルコロニーを得ることができた。顕微鏡による形態観察と 18S rRNA と *rbcL* 遺伝子の配列を元にした分子系統解析の結果、これらの株を *Cyanidium* sp. N3110 株、*Galdieria sulphuraria* SG 株と名付けた。これらの株について、液体静 Kanesaki Y.-2

置培養による様々な重金属イオン存在下での培養試験をおこなったところ、100 mM アルミニウムや 500 mM マグネシウム存在下でも生育可能であった。また 3 属間の比較から、*Cyanidium* sp. N3110 株はマンガン、*Galdieria sulphuraria* SG 株は鉄に対して特に強い耐性を示すという特徴を見出した。マンガンについては、シゾンは 10 mM、*G. sulphuraria* SG 株は 1 mM まで生育可能であったのに対し、N3110 株は 100 mM のマンガン存在下でも生育可能であった。液体通気培養系でも同様の結果が得られたことから、極めて高いマンガン耐性を持つシアニジウムの新規単離株の取得に成功した。箱根大涌谷の温泉は低濃度のマンガニイオンも含む鉱泉であるが、同じバイオマットから単離された单細胞紅藻でも大きく異なる重金属ストレス耐性を示すことは、将来的な有用藻類の探索を考える上でも興味深い。このシアニジウム新規単離株について、次世代シーケンサー PacBio RSII 及び MiSeq を用いて全ゲノム解析を実施し、ミトコンドリアゲノムと葉緑体ゲノムの完全配列、及び、核ゲノムのドラフト配列を得た。この塩基配列情報とデータベースを参考に、遺伝子領域の推定と機能アナリーションをおこない、トランスクリプトーム解析用の遺伝子配列リストを整備し、100 mM のマンガン添加した際の遺伝子発現変動プロファイルを取得したところ、複数の重金属トランスポーターの発現変動を観測できた。これらのうち、マンガン添加により転写産物量が最も抑制された putative zinc transporter の遺伝子は、通常時の亜鉛イオンやマンガニイオンの取り込みに関わることが予想されたので、酵母のオーソログ遺伝子破壊株を用いた機能相補実験をおこなった。その結果、このトランスポーターは亜鉛イオンとマンガニイオンの両方の取り込みが可能であることがわかった。また、このトランスポーターを单細胞紅藻シゾンで強制発現させた株でもマンガニイオンの細胞内取り込み量が顕著に増加した。これらの結果と過去の知見から、シアニジウムは高マンガニストレス下で細胞質への過剰なマンガンの流入を防ぐことと、Electron-dense body のような細胞内の局所に金属を貯めこむことの、少なくとも 2 つのメカニズムで耐性を獲得している可能性が示唆された。以上のように、新規単離した非モデル生物であっても次世代シーケンサーの使用により容易に有用遺伝子の絞込みまで進めるようになったことは極めて重要な進歩である。

4. イデュコゴメ綱の单細胞紅藻のゲノム解読状況

シゾンについては、1998 年にミトコンドリアゲノム、2003 年に葉緑体ゲノムが解読された(Ohta et al. 1998; 2003)。2004 年には核ゲノムが 99.98% 解読され(Matsuzaki et al. 2004)，2007 年には 1 つもギャップの無い 100% 完全ゲノム解読が達成されている(Nozaki et al. 2007)。これは全真核生物で初の快挙であった。ガルデリアについても、ミトコンドリアと葉緑体の完全ゲノム配列、及び、核のドラフトゲノム配列が報告されている(Barbier et al. 2005; Schönknecht et al. 2013)。ガルデリアのゲノムからは、水平伝搬により獲得された古細菌由来の遺伝子が見つかったと報告されており、非常に興味深い。シアニジウムについては *Cyanidium caldarium* RK-1 株の葉緑体ゲノムのみが解読されていた。我々が新たに *Cyanidium* sp. N3110 株のミトコンドリアと葉緑体の完全ゲノム、及び、核のドラフトゲノム情報を解読したことで、イデュコゴメ綱 3 属のゲノム情報が揃うことになる。しかし、次のイデュコゴメ綱の分子系統の項でも述べるが、イデュコゴメ綱は従来考えられていた以上に多様性を持つ生物群である

Kanesaki Y.-3

ことが複数の研究グループから指摘されてきており (Alberto et al. 2000; Ciniglia et al. 2004; Yoon et al. 2006; Toplin et al. 2008; Skorupa et al. 2013), その進化系統の理解にはさらなるゲノム情報の蓄積が必要だと考えられる。

5. イデュコゴメ綱の系統分類に関する問題

シゾンは光独立栄養で強固な細胞壁を持たず、等分裂で増殖する。シアニジウムは光独立栄養であるが強固な細胞壁を持ち、4個の内生胞子を作り増殖する。シゾンとシアニジウムの葉緑体は橢円形である。ガルデリアは外来炭素源による従属栄養増殖も可能で、強固な細胞壁を持ち、4-32個の内生胞子を作り増殖する。葉緑体は湾曲した不定形である。

初期のイデュコゴメ綱の系統分類は、細胞形態や葉緑体形態、分裂様式の違いなどを元に分類されたため、近年の分子系統解析の結果との間で一部混乱が生じている。分子系統樹についてはいくつもの報告例があるが、共通しているのはガルデリアには熱水の周辺でよく見られる種(Type-A; *G. sulphuraria*, *G. daedala*, *G. partita*)と岩石の割れ目などの光が当たらず比較的乾燥した環境を好む種(Type-B; *G. phlegrea*)の主要な2群、それに加えて *G. maxima* という分子系統樹の上ではシゾンに近い例外的な種がいるという点である (Ciniglia et al. 2004; Yoon et al. 2006; Toplin et al. 2008; Skorupa et al. 2013)。このシゾンに近い系統群の混乱については、単離・無菌化された株が限られていることもあり、未だによく分かっていない。またシアニジウムにも高温環境型と中温環境型の2群が知られており、分子系統樹においてもこの2群の分岐はかなり早くに生じていることから、シアニジウムもかなり広い多様性をもつ属であると考えられている。今回我々が単離した *Cyanidium* sp. N3110 株は、橢円形の葉緑体と4つの内生胞子というシアニジウムの形態的特徴を満たしていたが、分子系統解析の結果からは他のシアニジウムよりも、シゾンや *G. maxima* に近いクレードに含まれた。このことからもイデュコゴメ綱内の多様性は、分類体系や進化も含めて再考する必要があると思われる。

6. 今後の展開

4万種以上いると言われる真核藻類の中で、バイオマス物質生産に適した可能性を持つ藻類は無数にいるはずと思われるが、それらの探索や有用物質生産能の調査はまだまだ不十分である。特にシアニジウム類のような極限環境藻類については、農作物や飲料水と競合しない水資源に棲息することから大きな可能性が期待できる。一方で次世代シーケンサーの技術的進歩により、新規単離した非モデル生物系のゲノム解析、トランスクリプトーム解析などはかくも容易になった。そしてオミクス解析の結果と生理学的実験を組み合わせれば、非モデル生物からの新規有用遺伝子の探索も非常に高速化できる時代になった。非モデル系の実験材料の場合、遺伝子組換えなどの実験系が確立していないことが唯一のネックであり、組換え可能な近縁モデル生物種での機能証明などが必要となる。単細胞紅藻の場合は、真核藻類の中で最も分子生物学的実験ツールが整備されているシゾンがモデル生物となっているため、比較検証がおこないやすい。今後、多数の紅藻のゲノム情報整備が進むと考えられるが、これにより比較ゲノムや生理機能の進化的な考察もさらに進むものと考えられる。

謝辞

本稿で紹介した研究内容について、東京農業大学細胞ゲノム生物学研究室の重信直人氏、小田しおり氏、斎藤夏穂氏、渡辺智先生、吉川博文先生、及び、東京農業大学植物生産化学研究室の斎藤彰宏先生、樋口恭子先生による支援に感謝いたします。本研究は科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業(CREST)「藻類・水圈微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」の助成を受けておこなわれました。また本研究について貴重なコメントを頂戴しました山口大学の三角修己先生、国立遺伝学研究所の宮城島進也先生、藤原崇之先生、廣岡俊亮博士、日本女子大の黒岩常祥先生に心より感謝申し上げます。

引用文献

- Alberto, P., Ciniglia, C., Pinto, G. & Pollio, A. 2000. The taxonomic position of *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* and *Galdieria*: an update. *Hydrobiologia*. 43: 137–143.
- Barbier, G., Oesterhelt, C., Larson, M.D., Halgren, R.G., Wilkerson, C., Garavito, R.M., Benning, C., & Weber, A.P. 2005. Comparative genomics of two closely related unicellular thermo-acidophilic red algae, *Galdieria sulphuraria* and *Cyanidioschyzon merolae*, reveals the molecular basis of the metabolic flexibility of *Galdieria sulphuraria* and significant differences in carbohydrate metabolism of both algae. *Plant Physiol.* 137: 460–474.
- Ciniglia, C., Yoon, H.S., Pollio, A., Pinto, G., & Bhattacharya, D. 2004. Hidden biodiversity of the extremophilic Cyanidiales red algae. *Mol. Ecol.* 13: 1827–1838.
- Matsuzaki, M., Misumi, O., Shin-I, T., Maruyama, S., Takahara, M., Miyagishima, S.Y., Mori, T., Nishida, K., Yagisawa, F., Nishida, K., Yoshida, Y., Nishimura, Y., Nakao, S., Kobayashi, T., Momoyama, Y., Higashiyama, T., Minoda, A., Sano, M., Nomoto, H., Oishi, K., Hayashi, H., Ohta, F., Nishizaka, S., Haga, S., Miura, S., Morishita, T., Kabeya, Y., Terasawa, K., Suzuki, Y., Ishii, Y., Asakawa, S., Takano, H., Ohta, N., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Shimizu, N., Sugano, S., Sato, N., Nozaki, H., Ogasawara, N., Kohara, Y., & Kuroiwa, T. 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature*. 428: 653–657.
- Nagasaka, S., Nishizawa, N.K., Mori, S., & Yoshimura, E.Y. 2004. Metal metabolism in the red alga *Cyanidium caldarium* and its relationship to metal tolerance. *Biometals*. 17: 177–181.
- Nagasaka, S., Nishizawa, N.K., Negishi, T., Satake, K., Mori, S., & Yoshimura, E. 2002. Novel iron-storage particles may play a role in aluminum tolerance of *Cyanidium caldarium*. *Planta*. 215: 399–404.
- Nowicka, B., Pluciński, B., Kuczyńska, P., & Kruk, J. 2016. Physiological characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* acclimated to chronic stress induced by Ag, Cd, Cr, Cu and Hg ions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 130: 133–145.
- Nozaki, H., Takano, H., Misumi, O., Terasawa, K., Matsuzaki, M., Maruyama, S., Nishida, K., Yagisawa, F., Yoshida, Y., Fujiwara, T., Takio, S., Tamura, K., Chung, S.J., Nakamura, S., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Sato, N., & Kuroiwa, T. 2007. A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic
Kanesaki Y.-5

- features in the hot-spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *BMC Biol.* 5: 28.
- Ohta, N., Matsuzaki, M., Misumi, O., Miyagishima, S.Y., Nozaki, H., Tanaka, K., Shin-I, T., Kohara, Y., & Kuroiwa, T. 2003. Complete sequence and analysis of the plastid genome of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *DNA Res.* 10: 67–77.
- Ohta, N., Sato, N., & Kuroiwa T. 1998. Structure and organization of the mitochondrial genome of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* deduced from the complete nucleotide sequence. *Nucleic Acids Res.* 26: 5190–5198.
- Schönknecht, G., Chen, W.H., Ternes, C.M., Barbier, G.G., Shrestha, R.P., Stanke, M., Bräutigam, A., Baker, B.J., Banfield, J.F., Garavito, R.M., Carr, K., Wilkerson, C., Rensing, S.A., Gagneul, D., Dickenson, N.E., Oesterhelt, C., Lercher, M.J., & Weber, A.P. 2013. Gene transfer from bacteria and archaea facilitated evolution of an extremophilic eukaryote. *Science* 339: 1207–1210.
- Skorupa, D.J., Reeb, V., Castenholz, R.W., Bhattacharya, D., & McDermott, T.R. 2013. Cyanidiales diversity in Yellowstone National Park. *Lett. Appl. Microbiol.* 57: 459–466.
- Toplin, J.A., Norris, T.B., Lehr, C.R., McDermott, T.R., & Castenholz, R.W. 2008. Biogeographic and phylogenetic diversity of thermoacidophilic cyanidiales in Yellowstone National Park, Japan, and New Zealand. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2822–2833.
- Yoon, H.S., Ciniglia, C., Wu, M., Comeron, J.M., Pinto, G., Pollio, A., & Bhattacharya, D. 2006. Establishment of endolithic populations of extremophilic Cyanidiales (Rhodophyta). *BMC Evol. Biol.* 6: 78.
- Yoshimura, E., Nagasaka, S., Sato, Y., Satake, K. & Mori, S. 1999. Extraordinary high aluminium tolerance of the acidophilic thermophilic alga, *Cyanidium caldarium*. *Soil. Sci. Plant Nutr.* 45: 721–724.

アポミクシスはスジアオノリの適応戦略に影響するか？

市原健介^{1, 2*}・河野重行²

¹ 日本学術振興会特別研究員（PD）

² 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻

〒277-8562 千葉県柏市柏の葉 5-1-5

(* 現所属: 北海道大学北方生物圏フィールド科学センター水圏ステーション室蘭臨海実験所 〒051-0013 室蘭市舟見町 1 丁目 133-31)

Apomixis influence adaptaiton strategy of green seaweed *Ulva prolifera*.

Key words: Apomixis, asexual reproduction, sex determination, sexual reproduction, *Ulva*
Kensuke Ichihara^{1,2} and Shigeyuki Kawano²

¹ Research Fellow of Japan Society for the Promotion of Science

² Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences,
The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8562, Japan

(* Current address: Hokkaido University, Field Sciencee Center for Northern Biosphere,
Muroran Marine Station, 1-133-31, Funami-cho, Muroran, Hokkaido, 051-0013, JAPAN)

DOI: 10.24480/bsj-review.8c3.00122

1. 植物の有性生殖と無性生殖

多くの生物は異なる個体同士の間で遺伝子交換をおこない、子孫を残す有性生殖をおこなう。一方で単独で自分と同じ遺伝子セットを持った子孫を残す無性生殖をおこなう生物も存在する。両生殖方法にはメリットとデメリットがあり、有性生殖ではさまざまな環境要因を乗り越えて交配相手を探す必要がある一方で、遺伝的な多様性を保つことができるので環境の変動に強いと考えられている。無性生殖では単独での繁殖が可能なので高い繁殖力をもつが、遺伝的多様性を保つことができず、環境の変動には弱いと考えられている。しかし、有性生殖と無性生殖の実際の自然環境での適応的意義を議論するためには、近縁種、できれば同種内で有性生殖個体と無性生殖個体が存在していることが必要である。

陸上植物ではアポミクシスと呼ばれる無性生殖の様式があり、これは種子形成を介した無性生殖として知られ、40 属 400 種以上がそれをおこなう (Schmidt et al. 2015)。陸上植物の雌性配偶体である胚囊は、通常の有性生殖過程では、胚のう母細胞が減数分裂し、胚囊細胞となり、核分裂を経て卵細胞、中心細胞、助細胞を含む胚囊が形成され、卵細胞と中心細胞へ重複受精が成立することで胚発生が進む。一方でアポミクシスでは珠心の細胞が単為発生をするアポスポリーと、胚のう母細胞で減数を伴わない減数分裂不全（アポマイオシス）がおこり、2N の雌性配偶体が単為発生するディプロスポリーがあることが知られている (Bicknell and Koltunow 2004; Sharbel et al. 2010; Schmidt et al. 2015)。

2. 緑色海藻アオサ属の生活史

私たちが研究材料としているアオサ属は大型海藻類の仲間で、アオサ藻綱に含まれている (van den Hoek et al. 1995)。主な生育域はもちろん沿岸域であるが、中には汽水域や淡水域にまで生育範囲を広げている種も含まれており、様々な水環境に適応したグループであると考えられる (Shimada et al. 2008; Ichihara et al. 2009; Mareš et al. 2011)。またこの環境への適応能力の高さからか、しばしば大量に繁茂し、沿岸域や海岸に堆積してしまう「緑潮 (グリーンタイド)」を引き起こす原因種としても知られている (Hernández et al. 1997; Shimada et al. 2003; Hiraoka et al. 2004)。2008年の北京オリンピックの際にはボートレース会場となった中国の青島で大量発生し、沿岸域一面が緑に染まった写真が報道されたのを覚えている人もいるだろう (Leliaert et al. 2009; Hiraoka et al. 2011)。アオサ属には細胞が二層膜状に並んだタイプと一層チューブ状のタイプが含まれており (Hayden et al. 2003)、日本語では前者を総称してアオサ、後者をアオノリと呼んでいる (吉田 1998)。アオサ属は同型世代交代をおこなう生物の代表として生物学の教科書にも取り上げられることもあり、お好み焼や焼きそばにふりかける食品として目にする機会も多いため、比較的馴染みのある海藻類といえるだろう。

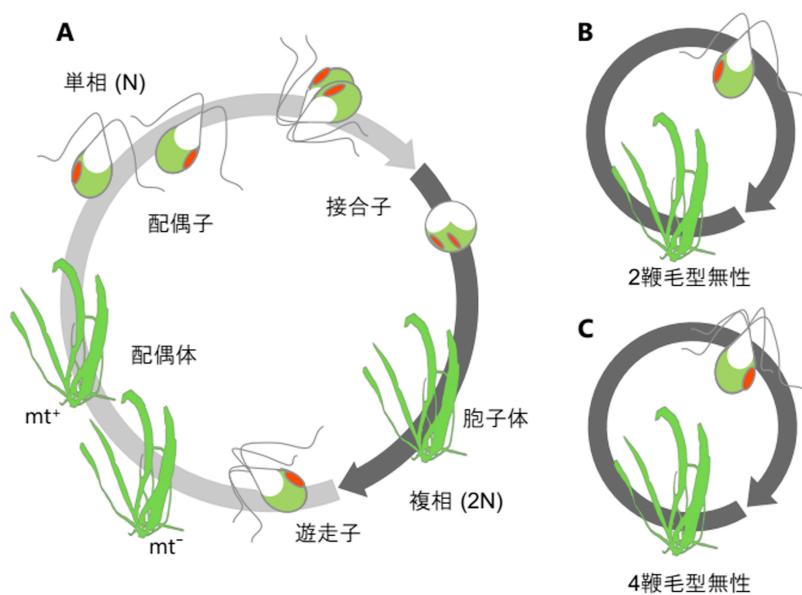


図1.アオノリの一般的な生活史
(A) 有性生殖型、
(B) 2本鞭毛の無性生殖型、
(C) 4本鞭毛の無性生殖型を示す。

アオサ属の生活史を図1にまとめた。 mt^+ 型、 mt^- 型の配偶体は2本鞭毛で正の走光性をもつ配偶子を放出し、これが接合し、発生することで胞子体となる。胞子体からは減数分裂により4本鞭毛性の遊走子が放出され、これが発生することで両接合型の配偶体となる。このように有性生殖をおこなう個体では同形の配偶体と胞子体が生殖細胞を介して繰り返される生活史をもつ。また配偶体から放出された配偶子は接合に失敗した場合には単為発生することが可能である。この有性型生活史に加えて、生活史の中で有性生殖をおこなわず、無性の遊走細胞を介して世代交代をおこなう無性型生活史の個体群も存在する。特にアオサ属では同種内に有性生殖株と無性生殖株がともに存在しているケースが多く、それぞれの種内で独立に複数回の無性生殖化が起きたと考えられる (Hiraoka et al. 2003a; Hiraoka et al. 2003b)。この無性型生活史をおこなう個体群には2鞭毛性の遊走子をつくるタイプと4鞭毛性の遊走子

をつくるタイプが知られているが、体細胞を用いた顕微測光による DNA 量の推定により、有性生殖型個体の胞子体と同じ DNA 量をもつことがわかつており、それぞれ複相と考えられている (Hiraoka et al. 2003b)。また野外で採集したアオノリで、ゲノム中に 1 コピーしかない *Hsp90* 遺伝子の第 6 エキソンの一部の領域のジェノタイピングをおこなったところ、無性個体にも個体内多型を持つ個体が含まれていたことからアオノリの無性生殖個体はアポミクシス由来である可能性が指摘されている (Ogawa et al. 2015)。しかしながら、アオノリでは遺伝学的な研究やゲノム解析が不足しており、これまでに性に連鎖した遺伝子座が知られておらず、無性個体のゲノム構造はわからないままであった。

3. アオサ属のゲノム解析と接合型特異的な染色体領域の発見

2010 年代になって海藻類においても全ゲノム解析が盛んにおこなわれるようになっており、褐藻ではシオミドロ (Cock et al. 2010), コンブ (Ye et al. 2015), オキナワモズク (Nishitsuji et al. 2016), 紅藻でもスサビノリ (Nakamura et al. 2013), ツノマタの一種 (Collen et al. 2013) で論文が報告されている。アオサ藻綱でもこれまでにミトコンドリアや葉緑体ゲノムの配列は報告されていたが (Leliaert and Lopez-Bautista 2015; Melton et al. 2015), 全ゲノム解析について報告例がなく遅れている状態であった。そこで、私たちの研究グループは、アオノリの一種である *Ulva partita* とスジアオノリのゲノムの解析を進め、長鎖の DNA 断片を読むことができる一分子シーケンサー PacBio や Illumina HiSeq といった次世代シーケンサーを利用することで、表 1 にまとめたようにアオサ属藻類でも緑藻クラミドモナスや緑藻ボルボックと同程度の精度のゲノムデータを得ることに成功した。このゲノムデータから両接合型間で配列分化や染色体構造の再構成が認められる、接合型特異的な染色体領域を発見できている (図 2A)。

表 1. *Ulva partita*, 緑藻クラミドモナス, 緑藻ボルボックスの核ゲノムデータの比較

種名	染色体数	総塩基数 (Mbp)	スカフォールド		
			数	最長(Mbp)	N50 (Mbp)
<i>U. partita</i> (mt ⁻)	n.d.	110	851	10.6	2.6
<i>U. partita</i> (mt ⁺)	12*	116	1,385	7.3	1.7
<i>C. reinhardtii</i>	17	121	1,557	n.d.	1.6
<i>V. carteri</i>	14	141	1,327	n.d.	1.5

Merchant et al. (2010), Prochnik et al. (2010) を参照

この接合型特異的な領域にはそれぞれの接合型に特異的な遺伝子の他に、両接合型で共有された配列が分化した遺伝子（ガメトログ）も存在する。この領域の遺伝子をクラミドモナスやボルボックスの性染色体領域と比較したところ、緑藻の性決定因子と考えられている *MID* 遺伝子 (Ferris and Goodenough 1997; Umen 2014) にわずかながら相同性を示す遺伝子 (*UpRWPI*) が見つかった。そこで *UpRWPI* と *MID* が含まれる RWP-RK 遺伝子ファミリーの遺伝子で分子系統樹を構築したところ、*UpRWPI* は *MID* と同一のクレードに含まれず、クラミドモナスやボルボックスとは性決定の機構が異なることが示唆された。この接合型特異

的な領域がアオサ属で保存されているものかを確かめるために、ガメトログの一つ *PRA1* (*Proliferation-associated protein 1*) 遺伝子とこの領域のすぐ外側に存在する *GTB1* (*G-strand telomere binding protein 1*) 遺伝子を他のアオサ属の 7 種の両接合型の株から単離し、分子系統解析をおこなった。その結果、*GTB1* 遺伝子では当然、同種内の両接合型株で配列の分化はほとんど見られなかつたが、*PRA1* 遺伝子では種内の両接合型の株間で明確な配列の分化が示され、接合型ごとにまとまつたクレードを形成した（図 2B, C）。

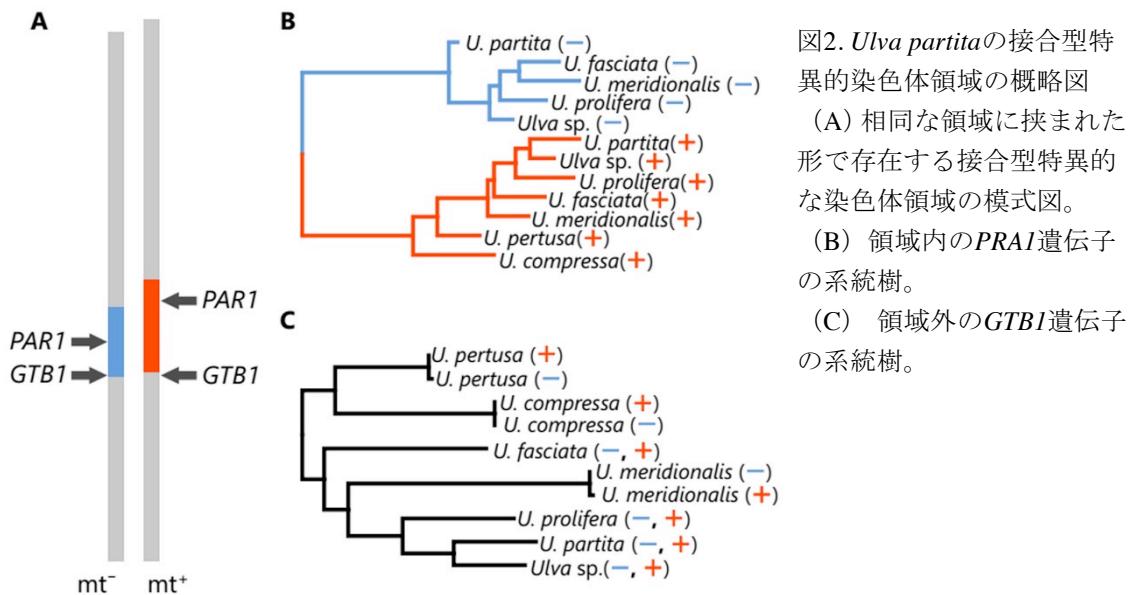


図2. *Ulva partita*の接合型特異的染色体領域の概略図

(A) 相同な領域に挟まれた形で存在する接合型特異的な染色体領域の模式図。

(B) 領域内の*PRA1*遺伝子の系統樹。

(C) 領域外の*GTB1*遺伝子の系統樹。

この接合型特異的な領域はアオサ属が出現した時には存在し、両接合型間で組換えを経験せず、異なる進化過程を辿ったと考えられる。この接合型特異的な染色体領域の発見によって、アオノリでも性決定や無性化といった性の起源と進化についての研究をおこなう基盤ができつつある。遺伝子導入法は 2000 年以降も研究が続けられていたが (Kakinuma et al. 2009), 最近になり PEG 法を用いて安定した形質転換体の作出も可能になっており (Oertel et al. 2015; Suzuki et al. 2016), 逆遺伝学的な解析も今後可能になるだろう。上述のゲノム情報の整備と遺伝子導入技術の確立によって、アオノリも新たなモデル海藻となるだろう。

4. 四万十川のスジアオノリの奇妙な分布

「日本最後の清流」と呼ばれる四万十川にはテナガエビや鮎を始めとしてさまざまな生き物が生育しているが、アオノリの仲間、スジアオノリも構成種の一つである。スジアオノリの生殖型に着目し、上流域から下流域までの分布を調べると、低塩濃度である上流域ではほぼ 100% の割合で有性生殖個体が生育しているのに対して、塩濃度の高い河口域に近づいていくに連れて、2 本鞭毛性の無性株（本稿では便宜的に「無性配偶体」と呼ぶことにする）や 4 本鞭毛性の無性株（同様に「無性胞子体」と呼ぶ）の割合が高くなり、さらに塩濃度が高くなる河口域では有性個体はほとんど姿を消し、ほぼ無性型個体のみが生育していた (Hiraoka and Higa 2016)。この分布の偏りは調査がおこなわれていた 2004~2007 年の間維持されており、また最近おこなつた調査でも同様に維持されていた（図 3）。

塩濃度の低い上流に有性個体群、中程度の下流域に有性と無性、塩濃度が高く海水と同程度の河口域には無性個体が優占しているが、この分布の偏りはどのように形成されたのだろうか。例えば、生殖型によって遺伝子発現に変化が生じ、その結果低塩濃度耐性に差が生じて、生育地に偏りが出ているのか、それとも分布域の塩濃度の差、環境の差がストレスとなってスジアオノリの生殖型に影響を及ぼし、このような生殖型による生育地の偏りを生み出しているのだろうか。同種内の生殖型の違いによって低塩濃度に対する適応度に差があるよう見えるスジアオノリは、生殖型による環境への適応度の問題を議論するのに適した植物であるといえるのではないだろうか。私たちのグループは、現在、スジアオノリにみられるこの生殖型と環境への適応度の関係性について研究を進めているところである。

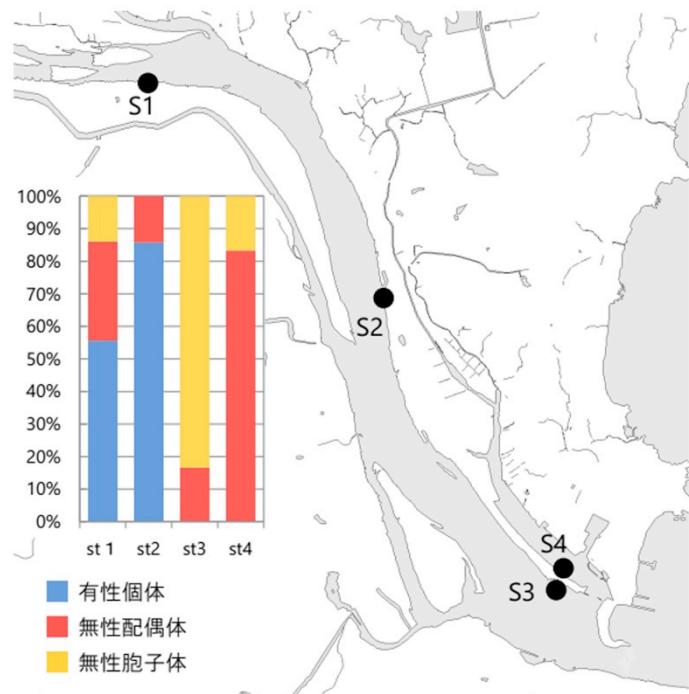


図3. 2015年4月と2016年4月の四万十川でのスジアオノリの分布

棒グラフは各生殖型の個体の存在比を示す。採集地点は Hiraoka and Higa (2016) に準拠した。地図は、国土地理院発行の5万分1地形図を使用した。

5. アオノリの無性生殖個体はどのように生じるのか

スジアオノリの無性生殖個体群はどのように出現しているのだろうか。もちろん有性生殖個体からなんらかの過程を経て出現しているのだろうが、その出現経路の詳細はわかつていなかった。現在、私たちのグループでは上述のゲノム情報と生殖細胞や減数分裂過程の観察を組み合わせることで、この無性個体の出現経路があきらかにできつつある。まず各生殖細胞のDNA量を測定してみたところ、両接合型の配偶子に対して、無性配偶子および無性胞子は2倍量の値を示し、複相であることが明らかとなった。次に、上述の性染色体領域の発見によって得られた性に連鎖した遺伝子をマーカーとしたジェノタイピングをおこなった。その結果、全国各地で採集されたスジアオノリでもマーカーは完全に接合型に連鎖していることが明らかとなった。一方で、無性配偶体と無性胞子体は単純な生殖細胞の形態からのイメージでは、無性配偶体は有性配偶体が倍数化したもの、無性胞子体は有性胞子体が無性化したものであると想像されたが、実際には両無性個体とともに複数の株の全てで両接合型のマーカーが検出されるという結果であった。無性配偶体も無性胞子体も共に両接合型のゲノムを有していることから、両無性個体は有性胞子体から出現していると考えられる。

有糸分裂期および減数分裂期の染色体動態を観察した。まず有糸分裂期の細胞を観察したところ、有性配偶体 (N) では7本、有性胞子体、無性配偶体、無性胞子体では14本の染色

体が観察できた。このことから両無性個体はやはり、両接合型のゲノムを持った複相世代であることがわかる。減数分裂前期では配偶体は7本、有性胞子体、無性配偶体、無性胞子体では14本の染色体が観察でき、中期になると各生殖型の細胞で、赤道面に染色体が並ぶのが観察された。有性配偶体では7本、有性胞子体、無性配偶体、無性胞子体でも同様に染色体は7本で、複相の細胞では二価染色体を形成していることが示唆された。第一減数分裂終了時には有性胞子体で7本の染色体が観察されるのに対して、無性配偶体、無性胞子体では減数していなかった。また有性胞子体での観察を続けたところ、一部の細胞では無性配偶体や無性胞子体と同様の染色体数の減数を伴わない分裂を観察することができた。

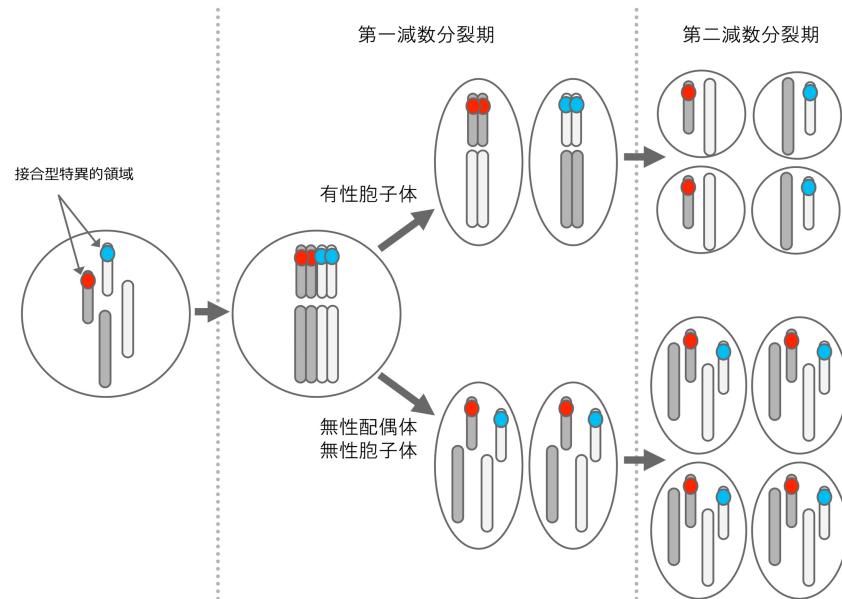
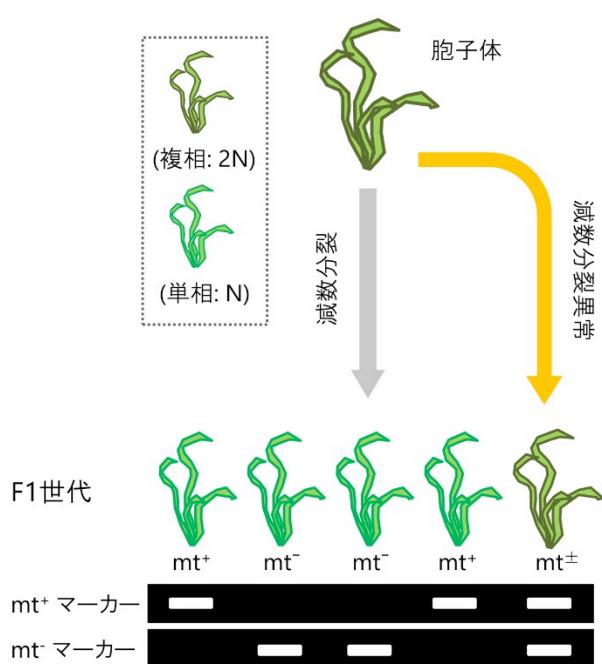


図4. スジアオノリで観察された減数分裂の模式図

(N=2だった場合)

有性胞子体の多くの細胞では上側の通常の減数分裂を行なう。しかし、有性胞子体の一部の細胞、無性型個体では下側の第一減数分裂終了後に染色体が減数しない分裂をおこなっていた。

減数分裂過程の結果をまとめると 有性胞子体の一部の細胞や無性配偶体、無性胞子体では二価染色体の形成までは通常の減数分裂過程と同様に進むようだが、その後、姉妹染色分体が分離し、両極へ移動することで染色体数の減数を回避した分裂がおこなわれていると推定され、陸上植物のアポマイオシスと同様の過程であると思われた（図4）。この現象は野外で採集された無性胞子体や無性配偶体の全てにおいて両接合型ゲノムが検出されたことからも支持される。また実際に有性胞子体から得られた F1 配偶体のジェノタイピングをおこなったところ、10%程度の個体で両接合型ゲノムを有する個体 (mt^{\pm} 株) が検出された（図5）。得られた mt^{\pm} 株

図5. 有性胞子体からの mt^{\pm} 型個体の出現

有性胞子体から得た F1 配偶体世代を接合型特異的領域の遺伝子をマーカーとして PCR によるジェノタイピングをしたところ mt^+ 型、 mt^- 型個体に加えて、両マーカーが検出される mt^{\pm} 個体が含まれていた。図4で示した減数分裂異常によって出現したと考えられる。

を成熟させ、生殖細胞を観察したところ、2本鞭毛を持つ遊走子で、DNA量は無性配偶子や無性胞子と同様に2Nであった。以上のことから、有性胞子体で減数分裂が正常に進行しない細胞が一定数あり、ここから無性個体が出現すると推定された。つまりスジアオノリでも陸上植物のアポミクシス、特にディプロスボリーに似た経路によって無性株が出現しているということになる。

6. アポミクシスの分子メカニズム

アポマイオシスの分子メカニズムについてはシロイヌナズナで変異体解析がおこなわれ、減数分裂期の染色体の配向を調整している DYAD/SWITCH (SW1) 遺伝子の変異体 (Ravi et al. 2008) や、*Atspo11-1/Atrec8/osd1* の三重変異体 (d'Erfurth et al. 2009) では二価染色は形成されるが、第一分裂で姉妹染色分体が両極に引き離され、染色体数が減数しない分裂過程をおこなうことが報告されている。さらに近年発達した次世代シーケンス技術とマイクロダイセクション法等の技術をあわせて用いることで生殖細胞系列でのトランск립トーム解析もおこなわれ、アポスボリーをおこなう *Hieracium praealtum* では減数分裂関連の遺伝子が発現していないのに対して (Okada et al. 2013)，ディプロスボリーをおこなうアブラナ科の *Boechera gunnisoniana* では主要な減数分裂関連遺伝子が発現していることも明らかになってきた (Schmidt et al. 2014)。陸上植物では遺伝的な基盤を明らかにするためのアポミクシス研究が進められている。

スジアオノリではどのような遺伝子群がアポミクシスに関わっているのだろうか。次に、スジアオノリのそれぞれの栄養細胞と生殖細胞を用いておこなった RNA-seq 実験の結果を紹介する。減数分裂関連遺伝子に着目して見たところ、SYN3 や SCC3 といった姉妹染色分体の対合の維持に働いているコヒーシン関連遺伝子 (Carlile and Amon 2008; Yuan et al. 2012; Grelon 2014) の発現量が無性配偶子や無性胞子で低くなっていることが明らかとなった。これは無性配偶体や無性胞子体における生殖細胞形成時の減数分裂過程で姉妹染色分体が最初に両極側に分離してしまうという推定を裏付けるものとも考えられる。今後はゲノム情報の整備を進めるとともに、生殖細胞形成時の減数分裂関連遺伝子の発現量の推移を調べることで、スジアオノリのアポマイオシスの原因遺伝子の特定を目指したいと考えている。

7. おわりに

スジアオノリの無性生殖株の出現経路はこれまでの研究でおおよそ明らかになってきた。それでは実際にスジアオノリでは生殖型によって低塩濃度への適応度に差があるのだろうか。著者のグループでは有性配偶体、無性配偶体、無性胞子体を淡水条件と海水条件で培養した際の遺伝子発現変動の差異を明らかにするために、RNA-seq 解析も並行して進めている。遺伝子発現変動を比べてみると、生育地点の異なる有性配偶体、無性配偶体、無性胞子体では、淡水条件への応答性がはっきりと異なることが明らかになった。一方で、淡水条件と海水条件で培養し、生長率を比較しても、株間にはほとんど差がみられなかった。さらに、細胞内のイオン濃度やアミノ酸組成等も調べることで、より詳細に遺伝的、生理的な違いを明らかにしたいと考えている。

今後は四万十川で採集した個体群や他地域の有性株、無性株を用い RAD-seq による集団構造の解析を行なうことで無性株の出現の頻度や各地の有性株と無性株の系統関係等を明らかにする実験も計画中である。このような様々なアプローチからの研究を重ねることで、最終的にスジアオノリの生殖型の進化が、環境適応にどのように結びついているのかを明らかにすることができればと考えている。

引用文献

- Carlile, T.M. & Amon, A. 2008. Meiosis I is established through division-specific translational control of a cyclin. *Cell* 133:280–291.
- Cock, J.M., Sterck, L., Rouzé, P., Scornet, D., Allen, A.E., Amoutzias, G., Anthouard, V., Artiguenave, F., Aury, J.M., Badger, J.H., Beszteri, B., Billiau, K., Bonnet, E., Bothwell, J.H., Bowler, C., Boyen, C., Brownlee, C., Carrano, C.J., Charrier, B., Cho, G.Y., Coelho, S.M., Collén, J., Corre, E., Da Silva, C., Delage, L., Delaroque, N., Dittami, S.M., Doulbeau, S., Elias, M., Farnham, G., Gachon, C.M., Gschloessl, B., Heesch, S., Jabbari, K., Jubin, C., Kawai, H., Kimura, K., Kloareg, B., Küpper, F.C., Lang, D., Le Bail, A., Leblanc, C., Lerouge, P., Lohr, M., Lopez, P.J., Martens, C., Maumus, F., Michel, G., Miranda-Saavedra, D., Morales, J., Moreau, H., Motomura, T., Nagasato, C., Napoli, C.A., Nelson, D.R., Nyvall-Collén, P., Peters, A.F., Pommier, C., Potin, P., Poulain, J., Quesneville, H., Read, B., Rensing, S.A., Ritter, A., Rousvoal, S., Samanta, M., Samson, G., Schroeder, D.C., Ségurens, B., Strittmatter, M., Tonon, T., Tregebar, J.W., Valentin, K., von Dassow, P., Yamagishi, T., Van de Peer, Y., & Wincker, P. 2010. The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature* 465:617–621.
- Collén, J., Porcel, B., Carré, W., Ball, S.G., Chaparro, C., Tonon, T., Barbeyron, T., Michel, G., Noel, B., Valentin, K., Elias, M., Artiguenave, F., Arun, A., Aury, J.M., Barbosa-Neto, J.F., Bothwell, J.H., Bouget, F.Y., Brillet, L., Cabello-Hurtado, F., Capella-Gutiérrez, S., Charrier, B., Cladière, L., Cock, J.M., Coelho, S.M., Colleoni, C., Czjzek, M., Da Silva, C., Delage, L., Denoeud, F., Deschamps, P., Dittami, S.M., Gabaldón, T., Gachon, C.M., Groisillier, A., Hervé, C., Jabbari, K., Katinka, M., Kloareg, B., Kowalczyk, N., Labadie, K., Leblanc, C., Lopez, P.J., McLachlan, D.H., Meslet-Cladiere, L., Moustafa, A., Nehr, Z., Nyvall Collén, P., Panaud, O., Partensky, F., Poulain, J., Rensing, S.A., Rousvoal, S., Samson, G., Symeonidi, A., Weissenbach, J., Zambounis, A., Wincker, P., & Boyen, C. 2013. Genome structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 110:5247–5252.
- d'Erfurth, I., Jolivet, S., Froger, N., Catrice, O., Novatchkova, M., & Mercier, R. 2009. Turning meiosis into mitosis. *PLoS Biol.* 7(6): e1000124.
- Ferris, P.J. & Goodenough, U.W. 1997. Mating type in *Chlamydomonas* is specified by mid, the minus-dominance gene. *Genetics* 146:859–869.
- Geng, S., De Hoff, P. & Umen, J.G. 2014. Evolution of sexes from an ancestral mating-type specification pathway. *PLoS Biol.* 12(7):e1001904.
- Grelon, M. 2014. The Molecular Biology of Meiosis in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66:1–16.
- Hayden, H.S., Blomster, J., Maggs, C.A., Silva P.C., Stanhope, M.J., & Waaland, J.R. 2003. Linnaeus K. Ichihara & S. Kawano- 8

- was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. *Eur. J. Phycol.* 38:277–294.
- Hernández, I., Peralta, G., Pérez-Lloréns, L., Vergara, J.J., & Niell, F.X. 1997. Biomass and dynamics of growth of *Ulva* species in Palmones River estuary. *J. Phycol.* 33:764–772.
- Hiraoka, M., Dan, A., Shimada, S., Hagiwara, M., Migita, M. & Ohno, M. 2003a. Different life histories of *Enteromorpha prolifera* (Ulvales, Chlorophyta) from four rivers on Shikoku Island, Japan. *Phycologia* 42:275–284.
- Hiraoka, M., & Higa, M. 2016. Novel distribution pattern between coexisting sexual and obligate asexual variants of the true estuarine macroalga *Ulva prolifera*. *Ecol. Evol.* 6:3658–3671.
- Hiraoka, M., Ichihara, K., Zhu, W., Ma, J., & Shimada, S. 2011. Culture and hybridization experiments on an *Ulva* clade including the qingdao strain blooming in the yellow sea. *PLoS One* 6(5): e19371.
- Hiraoka, M., Shimada, S., Serisawa, Y., Ohno, M., & Ebata, H. 2003b. Two different genetic strains of stalked-*Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) grow on intertidal rocky shores in Ebisujima, central Japan. *Phycol. Res.* 51:161–167.
- Hiraoka, M., Shimada, S., Uenosono, M. & Masuda, M. 2004. A new green-tide-forming alga, *Ulva ohnoi* Hiraoka et Shimada sp. nov. (Ulvales, Ulvophyceae) from Japan. *Phycol. Res.* 52:17–29.
- van den Hoek, C., Mann, D.G. & Jahns, H.M. 1995. Algae. An Introduction to Phycology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ichihara, K., Arai, S., Uchimura, M., Fay, e.J., Ebata, H., Hiraoka, M., & Shimada, S. 2009. New species of freshwater *Ulva*, *Ulva limnetica* (Ulvales, Ulvophyceae) from the Ryukyu Islands, Japan. *Phycol. Res.* 57:94–103.
- Kakinuma, M., Ikeda, M., Coury, D., Tominaga, F., Kobayashi, I., & Amano, H. 2009. Isolation and characterization of the *rbcS* genes from a sterile mutant of *Ulva pertusa* (Ulvales, Chlorophyta) and transient gene expression using the *rbcS* gene promoter. *Fish. Sci.* 75:1015–1028.
- Leliaert, F. & Lopez-Bautista, J.M. 2015. The chloroplast genomes of *Bryopsis plumosa* and *Tydemania expeditiones* (Bryopsidales, Chlorophyta): compact genomes and genes of bacterial origin. *BMC Genomics* 16:204.
- Leliaert, F., Zhang, X., Ye, N., Malta, E., Engelen, A.H., Mineur, H.V., & De Clerck, O. 2009. Identity of the Qingdao algal bloom. *Phycol. Res.* 57:147–151.
- Mareš, J., Leskinen, E., Sitkowska, M., Skácelová, O., & Blomster, J. 2011 True identity of the european freshwater *Ulva* (Chlorophyta, Ulvophyceae) revealed by a combined molecular and morphological approach. *J. Phycol.* 47:1177–1192.
- Melton, J.T., Leliaert, F., Tronholm, A. & Lopez-Bautista, J.M. 2015. The complete chloroplast and mitochondrial genomes of the green macroalga *Ulva* sp. UNA00071828 (Ulvophyceae, Chlorophyta). *PLoS One*. 10(4): e0121020.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W.F., Qu, L.H., Nelson, D.R., Sanderfoot, A.A., Spalding, M.H., Kapitonov, V.V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S.M., Grimwood, J., Schmutz, J., Cardol, P., Cerutti, H., Chanfreau, G., Chen, C.L., Cognat, K. Ichihara & S. Kawano- 9

- V., Croft, M.T., Dent, R., Dutcher, S., Fernández, E., Fukuzawa, H., González-Ballester, D., González-Halphen, D., Hallmann, A., Hanikenne, M., Hippler, M., Inwood, W., Jabbari, K., Kalanon, M., Kuras, R., Lefebvre, P.A., Lemaire, S.D., Lobanov, A.V., Lohr, M., Manuell, A., Meier, I., Mets, L., Mittag, M., Mittelmeier, T., Moroney, J.V., Moseley, J., Napoli, C., Nedelcu, A.M., Niyogi, K., Novoselov, S.V., Paulsen, I.T., Pazour, G., Purton, S., Ral, J.P., Riaño-Pachón, D.M., Riekhof, W., Rymarquis, L., Schröder, M., Stern, D., Umen, J., Willows, R., Wilson, N., Zimmer, S.L., Allmer, J., Balk, J., Bisova, K., Chen, C.J., Elias, M., Gendler, K., Hauser, C., Lamb, M.R., Ledford, H., Long, J.C., Minagawa, J., Page, M.D., Pan, J., Pootakham, W., Roje, S., Rose, A., Stahlberg, E., Terauchi, A.M., Yang, P., Ball, S., Bowler, C., Dieckmann, C.L., Gladyshev, V.N., Green, P., Jorgensen, R., Mayfield, S., Mueller-Roeber, B., Rajamani, S., Sayre, R.T., Brokstein, P., Dubchak, I., Goodstein, D., Hornick, L., Huang, Y.W., Jhaveri, J., Luo, Y., Martínez, D., Ngau, W.C., Otillar, B., Poliakov, A., Porter, A., Szajkowski, L., Werner, G., Zhou, K., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S., & Grossman, A.R. 2010. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318:245–250.
- Nakamura, Y., Sasaki, N., Kobayashi, M., Ojima, N., Yasuike, M., Shigenobu, Y., Satomi, M., Fukuma, Y., Shiwaku, K., Tsujimoto, A., Kobayashi, T., Nakayama, I., Ito, F., Nakajima, K., Sano, M., Wada, T., Kuhara, S., Inouye, K., Gojobori, T., & Ikeo, K. 2013. The first symbiont-free genome sequence of marine red alga, Susabi-nori (*Pyropia yezoensis*). *PLoS One* 8(3): e57122.
- Nishitsuji, K., Arimoto, A., Iwai, K., Sudo, Y., Hisata, K., Fujie, M., Arakaki, N., Kushiro, T., Konishi, T., Shinzato, C., Satoh, N., & Shoguchi, E. 2016. A draft genome of the brown alga, *Cladosiphon okamuranus*, S-strain: a platform for future studies of “mozuku” biology. *DNA Res.* 23 (6): 561-570.
- Oertel, W., Wichard, T. & Weissgerber, A. 2015. Transformation of *Ulva mutabilis* (Chlorophyta) by vector plasmids integrating into the genome. *J. Phycol.* 51:963–979.
- Ogawa, T., Ohki, K. & Kamiya, M. 2015. High heterozygosity and phenotypic variation of zoids in apomictic *Ulva prolifera* (Ulvophyceae) from brackish environments. *Aquat. Bot.* 120:185–192.
- Okada, T., Hu, Y., Tucker, M.R., Taylor, J.M., Johnson, S.D., Spriggs, A., Tsuchiya, T., Oelkers, K., Rodrigues, J.C., & Koltunow, A.M. 2013. Enlarging cells initiating apomixis in *Hieracium praealtum* transition to an embryo sac program prior to entering mitosis. *Plant Physiol.* 163:216–31.
- Prochnik, S.E., Umen, J., Nedelcu, A.M., Hallmann, A., Miller, S.M., Nishii, I., Ferris, P., Kuo, A., Mitros, T., Fritz-Laylin, L.K., Hellsten, U., Chapman, J., Simakov, O., Rensing, S.A., Terry, A., Pangilinan, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Salamov, A., Shapiro, H., Schmutz, J., Grimwood, J., Lindquist, E., Lucas, S., Grigoriev, I.V., Schmitt, R., Kirk, D., & Rokhsar, D.S. 2010. Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green alga *Volvox carteri*. *Science* 329:223–226.
- Ravi, M., Marimuthu, M.P. & Siddiqi, I. 2008. Gamete formation without meiosis in *Arabidopsis*. *Nature* 451:1121–1124.
- Schmidt, A., Schmid, M.W. & Grossniklaus, U. 2015. Plant germline formation: common concepts and developmental flexibility in sexual and asexual reproduction. *Development* 142:229–241.

- Schmidt, A., Schmid, M.W., Klostermeier, U.C., Qi, W., Guthörl, D., Sailer, C., Waller, M., Rosenstiel, P., & Grossniklaus, U. 2014. Apomictic and sexual germline development differ with respect to cell cycle, transcriptional, hormonal and epigenetic regulation. *PLoS Genet.* 10(7): e1004476.
- Sharbel, T.F., Voigt, M.L., Corral, J.M., Galla, G., Kumlehn, J., Klukas, C., Schreiber, F., Vogel, H., & Rotter, B. 2010. Apomictic and sexual ovules of *Boechera* display heterochronic global gene expression patterns. *Plant Cell* 22:655–671.
- Shimada, S., Hiraoka, M., Nabata, S., Iima, M., & Masuda, M. 2003. Molecular phylogenetic analyses of the Japanese *Ulva* and *Enteromorpha* (Ulvales, Ulvophyceae), with special reference to the free-floating *Ulva*. *Phycol. Res.* 51:99–108.
- Shimada, S., Yokoyama, N., Arai, S. & Hiraoka, M. 2008. Phylogeography of the genus *Ulva* (Ulvophyceae, Chlorophyta), with special reference to the Japanese freshwater and brackish taxa. *J. Appl. Phycol.* 20:979–989.
- Suzuki, R., Ota, S., Yamazaki, T., Toyoda, A., Nonaka, S., Matsukura, C., Kuwano, K. & Kawano, S. 2016. Morphological changes of giant mitochondria in the unicellular to multicellular phase during parthenogenesis of *Ulva partita* (Ulvophyceae) revealed by expression of mitochondrial targeting GFP and PEG transformation. *Phycol. Res.* 64:176–184.
- Ye, N., Zhang, X., Miao, M., Fan, X., Zheng, Y., Xu, D., Wang, J., Zhou, L., Wang, D., Gao, Y., Wang, Y., Shi, W., Ji, P., Li, D., Guan, Z., Shao, C., Zhuang, Z., Gao, Z., Qi, J., & Zhao, F. 2015. *Saccharina* genomes provide novel insight into kelp biology. *Nat. Commun.* 6:6986.
- Yuan, L., Yang, X., Ellis, J.L., Fisher, N.M., & Makaroff, C.A. 2012. The *Arabidopsis* SYN3 cohesin protein is important for early meiotic events. *Plant J.* 71:147–160.
- 吉田忠生 1998. 新日本海藻誌. pp. 1222. 内田老鶴園, 東京.

共生性渦鞭毛藻 *Symbiodinium* と寄生性アピコンプレクサのゲノム進化

将口栄一

沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミックスユニット

〒904-0495 沖縄県国頭郡恩納村字谷茶 1919-1

Eiichi Shoguchi

Genome evolutions in symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium* and parasitic apicomplexans

Key words: alveolates, Apicomplexa, comparative genomics, gene duplication, *Symbiodinium*

Marine Genomics Unit, Okinawa Institute of Science and Technology

1919-1 Tancha, Onna-son, Okinawa, 904-0495 Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.8c4.00123

1. はじめに

アルベオラータという真核生物の大きなグループには、渦鞭毛藻類、アピコンプレクサ類、纖毛虫類が主要グループとして含まれる。渦鞭毛藻類には、およそ 2,500 種が知られており、共生や寄生といった様々な生活様式が観察される (Horiguchi 2015)。その約半数は葉緑体（光合成能力）を持っている。一方で、知られているアピコンプレクサは細胞内絶対寄生性であり、纖毛虫はその多くが従属栄養性である (高野義人 2010)。本総説では、次世代シーケンサーの登場後に初めて全ゲノム解析が行われた、共生性渦鞭毛藻 *Symbiodinium* のゲノム解読について紹介する。またアピコンプレクサ類の姉妹群クロメラ類のゲノムとの比較により見えてきた、寄生性アピコンプレクサのゲノム進化の概要を説明する。マラリア原虫を含むアピコンプレクサゲノムでは、多くの遺伝子ロスがおこっており、遺伝子重複などによる遺伝子の獲得は少ない。それでは、サンゴ内胚葉細胞内に共生する *Symbiodinium* のゲノムではどのようなことが起こってきたのであろうか？

2. *Symbiodinium* とはどんな生き物か？

渦鞭毛藻の *Symbiodinium* 属 (*Symbion* 共に生きる + *dinos* ぐるぐる回す)

(Freudenthal et al. 1962) は海水域に生息し、葉緑体を持っている (図 1)。共生性である *Symbiodinium* は、様々な動物から見つかってきており (Pochon et al. 2014, 図 2), サンゴの共生藻として最近よく研究されてきている (Yamashita & Koike 2015)。

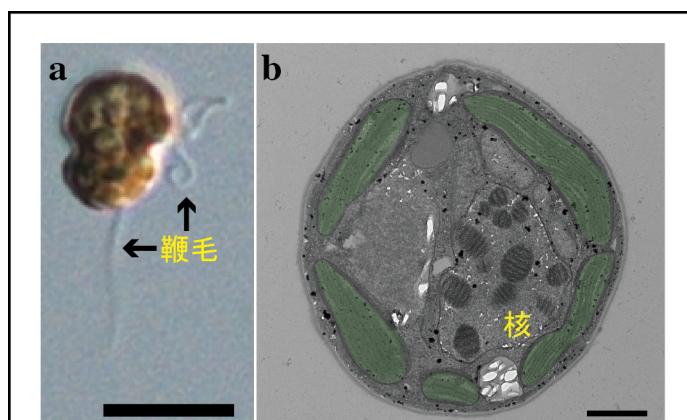


図 1. 共生性渦鞭毛藻 *Symbiodinium*。a. 遊走細胞 (スケールバーは 10 μm)。b. *Symbiodinium* の電顕写真 (スケールバーは 1 μm)。緑に色付けしている部分は葉緑体を示す。

例えば最近になって、バクテリアなどを捕食する種を含んでおり混合栄養性であることかが確認されている (Jeong et al. 2014)。さらにバクテリアと培養すると石灰化するという報告などもなされてきているが (Frommlet et al. 2015), 有性生殖の観察は報告されていない (Thornhill et al. 2017)。*Symbiodinium* 属は、現生の渦鞭毛藻の中では進化的には、比較的最近に分岐したグループである (Janouškovec et al. 2017)。以前は 1

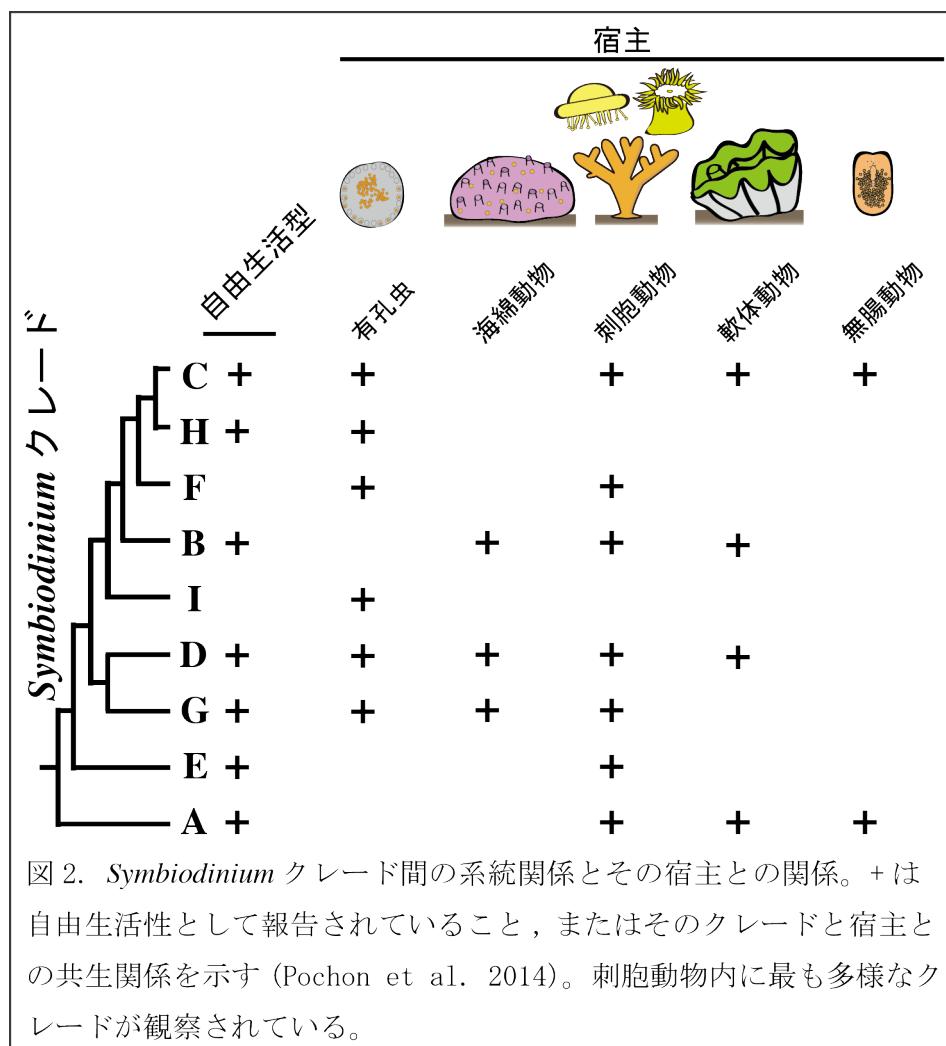


図 2. *Symbiodinium* クレード間の系統関係とその宿主との関係。+は自由生活性として報告されていること、またはそのクレードと宿主との共生関係を示す (Pochon et al. 2014)。刺胞動物内に最も多様なクレードが観察されている。

種類と考えられていたが (Kevin et al. 1969), 分子系統学的解析により主要クレード A から I (図 2) に分類されている (Pochon & Gates 2010)。しかしながら、そのクレード内の多様性については議論が続いている (Yamashita & Koike 2015)。この *Symbiodinium* のゲノムは、渦鞭毛藻の中では比較的小さな核ゲノムを持つことが報告されている (LaJeunesse et al. 2005)。その中でも特に小さなクレード B の *Symbiodinium minutum* (LaJeunesse et al. 2012) のゲノムが、最初に解読された。

3. クレード B の *Symbiodinium minutum* のゲノム

渦鞭毛藻の核ゲノムが他の真核生物ゲノムにみられないユニークな核ゲノム構造をもつことは、以前から報告されていた (Dodge, 1965; Lin, 2011; Wisecaver and Hackett 2011)。しかしながら、ゲノムサイズがその姉妹群として知られていたアピコンプレクサなどに比べ非常に大きい (1.5-250 Gbp) ということなどもあり、ショットガンシークエンシング法によるゲノム解読は、他のアルベオラータに比べ遅れていた (Eisen et al. 2006; Gardner et al. 2002)。2013 年に我々のグループは次世代シークエンサーと *S. minutum* (分株: NIES-3808) を用いて、渦鞭毛藻類で最初の核ゲノム概要配列を決定した (表 1; Shoguchi et al. 2013)。多くの予想外の結果の中の一つは、隣接し合う遺伝子が同じ向きに並んでいるというものであった (図 3, Koyanagi et al. 2013)。また、イントロンリッチな遺伝子が非常に多い上、半分以上のスプライスサイトがいわゆる GT-AG ルールに

従わぬないこと、核タンパクの遺伝子ファミリーでは原核生物と真核生物の両方のタイプのものがコードされ、それらの遺伝子数は増加していることが明らかになった (Shoguchi et al. 2013)。このようなユニークなゲノム構造が渦鞭毛藻の進化過程においてどのタイミングで獲得されたのかを調べていくことは、真核生物の核ゲノム進化を考える上で重要であるように思われる。

表1 涡鞭毛藻類、クロメラ類、アピコンプレクサ類の核ゲノムの概要

	決定した ゲノムの 総塩基数 (Mb)	GC 含量	タンパ ク質を コード する遺 伝子数	遺伝子あたり の平均イント ロン数 (イン トロンレス%)	イントロ ンの 5'部	遺伝子 間領域	隣接遺 伝子の 性
渦鞭毛藻類							
<i>S. kawagutii</i>	935	44	36,850	3 (36)	GT/GC	17,888	あり
<i>S. minutum</i>	616	44	41,925	19 (5)	GT/GC/GA	2,064	あり
<i>S. microadriaticum</i>	808	51	49,109	21 (2)	GC/GT/GA	3,633	あり
クロメラ類							
<i>Chromera velia</i>	194	49	26,112	2 (24)	n/a	989	n/a
<i>Vitrella brassicaformis</i>	73	58	22,817	6 (5)	n/a	92	n/a
アピコンプレクサ類							
<i>Plasmodium falciparum</i>	23	19	5,268	2 (46)	GT	1694	なし

Aranda et al. (2016), Gardner et al. (2002), Lin et al. (2015), Shoguchi et al. (2013), Woo et al. (2015)を引用。

また渦鞭毛藻では葉緑体ゲノムの構造も風変わりである。*S. minutum* の葉緑体は、14 タイプのミニサークル DNA (1.8-3.3 kbp) を持つており、それぞれに1つの遺伝子がコードされている。その転写産物は9 タイプの RNA 編集を受けることにより、機能を持つタンパク質へと翻訳されている (Mungpakdee et al. 2014)。その他の葉緑体タンパク質はすべて核にコードされており、その中で最も数の増えている光受容タンパク質の遺伝子は145 個あり、クレード B の *Symbiodinium* の系統で多様化してきている (Maruyama et al. 2015)。これらのこととは、*Symbiodinium* の葉緑体は最も多様化しているオルガネラの一つで、その発現調節は環境適応に特に重要なのは？ということを想像させる (Xiang et al. 2015)。

一方でミトコンドリアのゲノムは、コードされている遺伝子とい

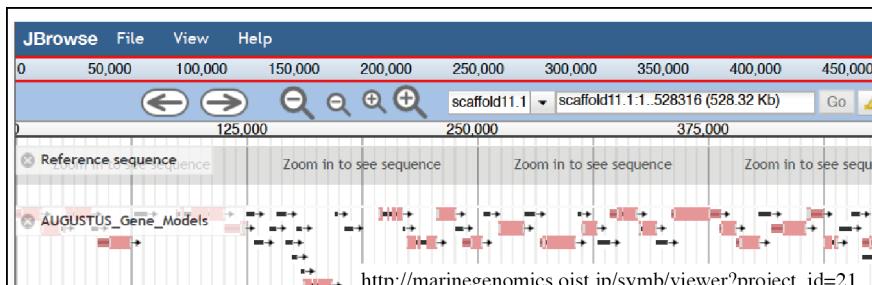


図3. *S. minutum* のゲノムブラウザのスクリーンショット。矢印は scaffold11 上の遺伝子の向きを示す。この領域ではすべての遺伝子が片方の DNA 鎖上にだけコードされていることが分かる。

う点においてマラリア原虫 *Plasmodium falciparum* と *S. minutum*との間で保存されている。その中には機能未知の small RNA 遺伝子が含まれる (Shoguchi et al. 2015)。我々のグループでは、*Symbiodinium* の宿主の一つであるサンゴ *Acropora digitifera* のゲノムを解読しており (Shinzato et al. 2011), ゲノム情報を基盤として、渦鞭毛藻とサンゴの共生関係を明らかにする研究を進めている (Shinzato et al. 2014)。

4. *Symbiodinium* ゲノムの多様性

クレード B の *S. minutum* のゲノムに続いて、クレード F の *S. kawagutii* のゲノムが解読され (表 1; Lin et al. 2015), *S. minutum* にはみられなかった *S. kawagutii* ゲノムの特徴がいくつか報告されている。例えば *S. kawagutii* ゲノムでは、逆転写酵素の遺伝子の数が最も増大し、インtron のない遺伝子の割合が比較的多い (表 1)。このことは、遺伝子の獲得のかなりの部分が、mRNA から逆転写酵素によってつくられた cDNA がゲノム内に新たに組み込まれることにより起こっていることを示唆させる (Slamovits and Keeling, 2008)。また Lin ら (2015) は、*S. kawagutii* の microRNA (miRNA) の存在について詳しく調べており、miRNA による調節を受けていそうな遺伝子群に着目している。サンゴ遺伝子との配列比較により、*Symbiodinium* の miRNA がサンゴ *A. digitifera* のトランスポーター遺伝子などの発現調節に関わる可能性を述べている (Lin et al. 2015)。今後、*Symbiodinium* の miRNA がサンゴ細胞内にどのように輸送されているのか、またはその反対方向への輸送もあるのかを調べていく必要があると思われる。 続いて 2016 年には、初期に分岐したと考えられるクレード A の *S. microadriaticum* ゲノムが解読された (Aranda et al. 2016)。クレード A は他のクレードからみると原始的グループと考えられ、他とはおよそ 5000 万年前に分岐したと推定されている (Pochon et al. 2006)。このゲノム及びクレード B と F のゲノムを含め、他の真核生物ゲノムとの比較がなされている。その比較解析の中でも、*Symbiodinium* ゲノムの特徴の一つは遺伝子重複であるということが強調される。さらに Aranda ら (2016) は、種特異的に多様化した *Symbiodinium* のトランスポーター遺伝子群こそが、宿主との共生関係には重要なのではないかということを示唆させる結果を報告している。重複した遺伝子が多いという結果と共に、隣あう遺伝子が同じ向きに並んでいるという特徴は、3 種の *Symbiodinium* ゲノムにおいて確認される。ではさらに巨大なゲノムをもつ自由生活性の渦鞭毛藻では、この特徴はどの程度みられるのであるか? このゲノム構造と生活様式にはどのような関係があるのだろうか? 新規のゲノム配列情報の蓄積により渦鞭毛藻ゲノムの多様性と進化の詳細がますます明らかになってくるだろう (Janouškovec et al. 2017)。

5. 寄生性アピコンプレクサのゲノムの進化

渦鞭毛藻類の主要な姉妹群であるアピコンプレクサは、寄生性であり光合成能力を持っていない。5000 種以上が知られ、100 万種以上いると推測されている (Adl et al. 2007; Pawłowski et al. 2012)。このアピコンプレクサに近縁なグループで光合成能力を持つクロメラ類 2 種のゲノムが解読された (Woo et al. 2015)。このクロメラ類のゲノムをアウトグループ (祖先型) として比較解析を行うことにより、アピコンプレクサの共通祖先は、非常に多くの遺伝子 (およそ 3800) を損失したという可能性が示唆されている。それらは光合成やステロール合成系といった代謝系のロスに始

まり、アピコンプレクサでは自由生活に必要な代謝系の酵素遺伝子や細胞内膜輸送系の遺伝子をそれぞれの系統で失っている。しかしながら、一部のタンパク質の遺伝子の数は、ある進化のタイミングごとに増えたようである。Woo ら (2015) は、RNA 結合タンパク質(寄生能力を獲得する前のステージ 1)、細胞骨格系タンパク質(クロメラ類と分岐後の寄生能力を獲得する間のステージ 2)、細胞外タンパク質と *ApiAP2* 転写因子(寄生能力を獲得した後のステージ 3) の順に多様化が起こった可能性を示している(図 4)。

特に細胞骨格系の鞭毛タンパク質遺伝子の進化が、細胞内に入っていく能力を獲得するまでのキーポイントだったのではないかと推測している。

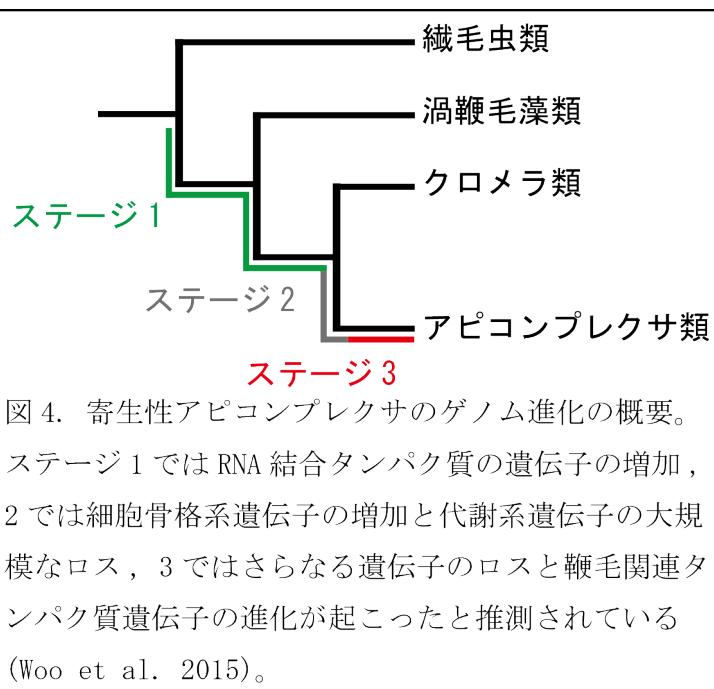


図 4. 寄生性アピコンプレクサのゲノム進化の概要。

ステージ 1 では RNA 結合タンパク質の遺伝子の増加、2 では細胞骨格系遺伝子の増加と代謝系遺伝子の大規模なロス、3 ではさらなる遺伝子のロスと鞭毛関連タンパク質遺伝子の進化が起こったと推測されている(Woo et al. 2015)。

6. おわりに

比較ゲノム解析により、寄生性アピコンプレクサ類が動物細胞に寄生する能力を獲得する進化過程では、光合成能力や代謝系遺伝子群の大規模なロスに続き、寄生能力を獲得するタイミングにおける鞭毛構造関連遺伝子の進化が鍵となったのではないかと議論される。ゲノムサイズの縮小も起こってきたようである。一方で *Symbiodinium* 属のゲノムでは遺伝子ファミリーのロスよりも、むしろ遺伝子重複が頻繁に起こっているようで、ゲノムサイズはまだかなり大きい。重複した遺伝子が多いことと生活様式にはどんな関係があるのだろうか? 解読されてきた *Symbiodinium* は比較的培養しやすい種であるが、培養の難しい種のゲノムは果たしてどうなっているのであろうか? 有性生殖に関わる可能性のある遺伝子群が *Symbiodinium* ゲノムにコードされていることは報告されているが、有性生殖時には真核生物らしい染色体構造を持つのであろうかなど、興味は尽きない。渦鞭毛藻はゲノム進化だけでなく細胞生物学的にも謎の多い生き物であり、アピコンプレクサのようにゲノムからのアプローチと組み合わせることが、その謎に迫る過程で、よい回り道となるように思えるのである。

謝辞

渦鞭毛藻ゲノムの研究を行う上で、マリングノミックスユニットの佐藤矩行教授をはじめスタッフの皆様にお礼申し上げます。この執筆の機会を与えて下さった、平川泰久先生及びオーガナイザーの皆様に感謝申し上げます。

引用文献

Adl, S.M., Leander, B.S., Simpson, A.G., Archibald, J.M., Anderson, O.R., Bass, D., Bowser, S.S.,

- Brugerolle, G., Farmer, M.A., Karpov, S., Kolisko, M., Lane, C.E., Lodge, D.J., Mann, D.G., Meisterfeld, R., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S.E., Smirnov, A.V., & Spiegel, F. 2007. Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Syst. Biol.* 56: 684-689.
- Aranda, M., Li, Y., Liew, Y.J., Baumgarten, S., Simakov, O., Wilson MC, Piel, J., Ashoor, H., Bougouffa, S., Bajic, V.B., Ryu, T., Ravasi, T., Bayer, T., Micklem, G., Kim, H., Bhak, J., LaJeunesse, T.C., & Voolstra, CR. 2016. Genomes of coral dinoflagellate symbionts highlight evolutionary adaptations conducive to a symbiotic lifestyle. *Sci. Rep.* 6: 39734.
- Dodge, J.D. 1965. Chromosome structure in the dinoflagellates and the problem of the mesocaryotic cell. *Excerpta Med. Int. Congr. Ser.* 91: 339-345.
- Eisen, J.A., Coyne, R.S., Wu, M., Wu, D., Thiagarajan, M., Wortman, J.R., Badger, J.H., Ren, Q., Amedeo, P., Jones, K.M., Tallon, L.J., Delcher, A.L., Salzberg, S.L., Silva, J.C., Haas, B.J., Majoros, W.H., Farzad, M., Carlton, J.M., Smith, R.K.Jr., Garg, J., Pearlman, R.E., Karrer, K.M., Sun, L., Manning, G., Elde, N.C., Turkewitz, A.P., Asai, D.J., Wilkes, D.E., Wang, Y., Cai, H., Collins, K., Stewart, B.A., Lee, S.R., Wilamowska, K., Weinberg, Z., Ruzzo, W.L., Wloga, D., Gaertig, J., Frankel, J., Tsao, C.C., Gorovsky, M.A., Keeling, P.J., Waller, R.F., Patron, N.J., Cherry, J.M., Stover, N.A., Krieger, C.J., del Toro, C., Ryder, H.F., Williamson, S.C., Barbeau, R.A., Hamilton, E.P., & Orias, E. 2006. Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS Biol.* 4: e286.
- Freudenthal, H.D. 1962. *Symbiodinium* gen. nov. and *Symbiodinium microadriaticum* sp. nov., a Zooxanthella : Taxonomy, life cycle, and morphology. *J. Protozool.* 9: 45-52.
- Frommlet, J.C., Sousa, M.L., Alves, A., Vieira, S.I., Suggett, D.J., & Serodio, J. 2015. Coral symbiotic algae calcify ex hospite in partnership with bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 112: 6158-6163.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M., & Barrell, B. 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419: 498-511.
- Horiguchi, T. 2015. Diversity and phylogeny of marine parasitic dinoflagellates. In: Ohtsuka, S., Suzuki, T., Horiguchi, T., Suzuki, N., & Not, F. (eds.) Marine Protists. pp. 397-419. Springer, Japan.
- Janouškovec, J., Gavelis, G.S., Burki, F., Dinh, D., Bachvaroff, T.R., Gornik, S.G., Bright, K.J., Imanian, B., Strom, S.L., Delwiche, C.F., Waller, R.F., Fensome, R.A., Leander, B.S., Rohwer, F.L., & Saldarriaga, J.F. 2017. Major transitions in dinoflagellate evolution unveiled by phylogenomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 114: E171-E180.
- Jeong, H.J., Lee, S.Y., Kang, N.S., Yoo, Y.D., Lim, A.S., Lee, M.J., Kim, H.S., Yih, W., Yamashita, H., & LaJeunesse, T.C. 2014. Genetics and morphology characterize the dinoflagellate *Symbiodinium voratum*, n. sp., (Dinophyceae) as the sole representative of *Symbiodinium* clade E. *J. Eukaryot. Microbiol.* 61: 75-94.

- Kevin, M.J., Hall, W.T., McLaughlin, J.J.A., & Zahl, P. A. 1969. *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal, a revised taxonomic description, ultrastructure. *J. Phycol.* 5: 341-350.
- Koyanagi, R., Takeuchi, T., Hisata, K., Gyoja, F., Shoguchi, E., Satoh, N., & Kawashima, T. 2013. MarinegenomicsDB: an integrated genome viewer for community-based annotation of genomes. *Zoolog. Sci.* 30: 797-800.
- Lajeunesse, T.C., Parkinson, J.E., & Reimer, J.D. 2012. A genetics-based description of *Symbiodinium minutum* sp. nov. and *S. psygmaeum* sp. nov. (Dinophyceae), two dinoflagellates symbiotic with cnidaria. *J. Phycol.* 48: 1380-1391.
- Lajeunesse, T.C., Lambert, G., Andersen, R.A., Coffroth, M.A., & Galbraith, D.W. 2005. *Symbiodinium* (Pyrrhophyta) genome sizes (DNA content) are smallest among dinoflagellates. *J. Phycol.* 41: 880-886.
- Lin, S. 2011. Genomic understanding of dinoflagellates. *Res. Microbiol.* 162: 551-569.
- Lin, S., Cheng, S., Song, B., Zhong, X., Lin, X., Li, W., Li, L., Zhang, Y., Zhang, H., Ji, Z., Cai, M., Zhuang, Y., Shi, X., Lin, L., Wang, L., Wang, Z., Liu, X., Yu, S., Zeng, P., Hao, H., Zou, Q., Chen, C., Li, Y., Wang, Y., Xu, C., Meng, S., Xu, X., Wang, J., Yang, H., Campbell, D.A., Sturm, N.R., Dagenais-Bellefeuille, S., & Morse, D. 2015. The *Symbiodinium kawagutii* genome illuminates dinoflagellate gene expression and coral symbiosis. *Science* 350: 691-694.
- Maruyama, S., Shoguchi, E., Satoh, N., & Minagawa, J. 2015. Diversification of the light-harvesting complex gene family via intra- and intergenic duplications in the coral symbiotic alga *Symbiodinium*. *PLoS One* 10: e0119406.
- Mungpakdee, S., Shinzato, C., Takeuchi, T., Kawashima, T., Koyanagi, R., Hisata, K., Tanaka, M., Goto, H., Fujie, M., Lin, S., Satoh, N., & Shoguchi, E. 2014. Massive gene transfer and extensive RNA editing of a symbiotic dinoflagellate plastid genome. *Genome Biol. Evol.* 6: 1408-1422.
- Pawlowski, J., Audic, S., Adl, S., Bass, D., Belbahri, L., Berney, C., Bowser, S.S., Cepicka, I., Decelle, J., Dunthorn, M., Fiore-Donno, A.M., Gile, G.H., Holzmann, M., Jahn, R., Jirků, M., Keeling, P.J., Kostka, M., Kudryavtsev, A., Lara, E., Lukeš, J., Mann, D.G., Mitchell, E.A., Nitsche, F., Romeralo, M., Saunders, G.W., Simpson, A.G., Smirnov, A.V., Spouge, J.L., Stern, R.F., Stoeck, T., Zimmermann, J., Schindel, D., & de Vargas, C. 2012. CBOL protist working group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. *PLoS Biol.* 10: e1001419.
- Pochon, X., & Gates, R.D. 2010. A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawai'i. *Mol. Phylogenet. Evol.* 56: 492-497.
- Pochon, X., Montoya-Burgos, J.I., Stadelmann, B., & Pawlowski, J. 2006. Molecular phylogeny, evolutionary rates, and divergence timing of the symbiotic dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 38: 20-30.
- Pochon, X., Putnam, H.M., & Gates, R.D. 2014. Multi-gene analysis of *Symbiodinium* dinoflagellates: a perspective on rarity, symbiosis, and evolution. *PeerJ* 2: e394.
- Shinzato, C., Mungpakdee, S., Satoh, N., & Shoguchi, E. 2014. A genomic approach to coral-dinoflagellate symbiosis: studies of *Acropora digitifera* and *Symbiodinium minutum*. *Front Microbiol.* 5: 336.
- Shinzato, C., Shoguchi, E., Kawashima, T., Hamada, M., Hisata, K., Tanaka, M., Fujie, M., Fujiwara, M.,

- Koyanagi, R., Ikuta, T., Fujiyama, A., Miller, D.J., & Satoh, N. 2011. Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change. *Nature* 476: 320-323.
- Shoguchi, E., Shinzato, C., Hisata, K., Satoh, N., & Mungpakdee, S. 2015. The large mitochondrial genome of *Symbiodinium minutum* reveals conserved noncoding sequences between dinoflagellates and apicomplexans. *Genome Biol. Evol.* 7: 2237-2244.
- Shoguchi, E., Shinzato, C., Kawashima, T., Gyoja, F., Mungpakdee, S., Koyanagi, R., Takeuchi, T., Hisata, K., Tanaka, M., Fujiwara, M., Hamada, M., Seidi, A., Fujie, M., Usami, T., Goto, H., Yamasaki, S., Arakaki, N., Suzuki, Y., Sugano, S., Toyoda, A., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Medina, M., Coffroth, M.A., Bhattacharya, D., & Satoh, N. 2013. Draft assembly of the *Symbiodinium minutum* nuclear genome reveals dinoflagellate gene structure. *Curr. Biol.* 23: 1399-1408.
- Slamovits, C.H., & Keeling, P.J. 2008. Widespread recycling of processed cDNAs in dinoflagellates. *Curr. Biol.* 18: R550-552.
- 高野義人 2010. アルベオラータに見られる多様な生き方~特に渦鞭毛藻類について~. 植物科学の最前線 第1巻 pp. 11-15.
- Thornhill, D.J., Howells, E.J., Wham, D.C., Steury, T.D., & Santos, S.R. 2017. Population genetics of reef coral endosymbionts (*Symbiodinium*, Dinophyceae). *Mol. Ecol.* : doi: 10.1111/mec.14055.
- Wisecaver, J.H., & Hackett, J.D. 2011. Dinoflagellate genome evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* 65: 369-387.
- Woo, Y.H., Ansari, H., Otto, T.D., Klinger, C.M., Kolisko, M., Michalek, J., Saxena, A., Shanmugam, D., Tayyrov, A., Veluchamy, A., Ali, S., Bernal, A., del Campo, J., Cihlář, J., Flegontov, P., Gornik, S.G., Hajdušková, E., Horák, A., Janouškovec, J., Katris, N.J., Mast, F.D., Miranda-Saavedra, D., Mourier, T., Naeem, R., Nair, M., Panigrahi, A.K., Rawlings, N.D., Padron-Regalado, E., Ramaprasad, A., Samad, N., Tomčala, A., Wilkes, J., Neafsey, D.E., Doerig, C., Bowler, C., Keeling, P.J., Roos, D.S., Dacks, J.B., Templeton, T.J., Waller, R.F., Lukeš, J., Oborník, M., & Pain, A. 2015. Chromerid genomes reveal the evolutionary path from photosynthetic algae to obligate intracellular parasites. *Elife* 4: e06974.
- Xiang, T., Nelson, W., Rodriguez, J., Tolleter, D., & Grossman, A.R. 2015. *Symbiodinium* transcriptome and global responses of cells to immediate changes in light intensity when grown under autotrophic or mixotrophic conditions. *Plant J.* 82: 67-80.
- Yamashita, H., & Koike, K. 2015. Biology of symbiotic dinoflagellates. In: Ohtsuka, S., Suzuki, T., Horiguchi, T., Suzuki, N., & Not, F. (eds.) *Marine Protists*. pp. 421-439. Springer, Japan.

サンゴ共生藻における形質転換技術開発の現状と展望

石井悠, 丸山真一朗

東北大学大学院生命科学研究科

〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

Yuu Ishii, Shinichiro Maruyama

Methods for genetic transformation of coral symbiont algae:

Current status and future directions

Keywords: algae, cnidarian animals, endosymbiosis, *Symbiodinium*, transformation

Graduate School of Life Sciences, Tohoku University

6-3, Aramaki Aza-Aoba, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 980-8578, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.8c5.00124

1. 褐虫藻：動物と共生する藻類

1-1. 褐虫藻とは

単細胞藻類の中には海産無脊椎動物と共生関係にある種が存在し、中でも刺胞動物（クラゲ・サンゴ・イソギンチャクなど）に細胞内共生する渦鞭毛藻類 (*Symbiodinium* spp.) は褐虫藻と呼ばれ（図）、貧栄養の熱帯・亜熱帯海域の生態系を支える一次生産者として大きな役割を担っている。サンゴ礁において、共生藻である褐虫藻の光合成で作られたエネルギーの90%は宿主であるサンゴに受け渡されているとも言われている（井上 2007）。なお広義には、褐虫藻 (zooxanthella) とは海産無脊椎動物に共生する黄色ないし茶褐色の単細胞藻類の総称であるが、本稿では刺胞動物に共生する *Symbiodinium* spp. を狭義の褐虫藻として扱う。

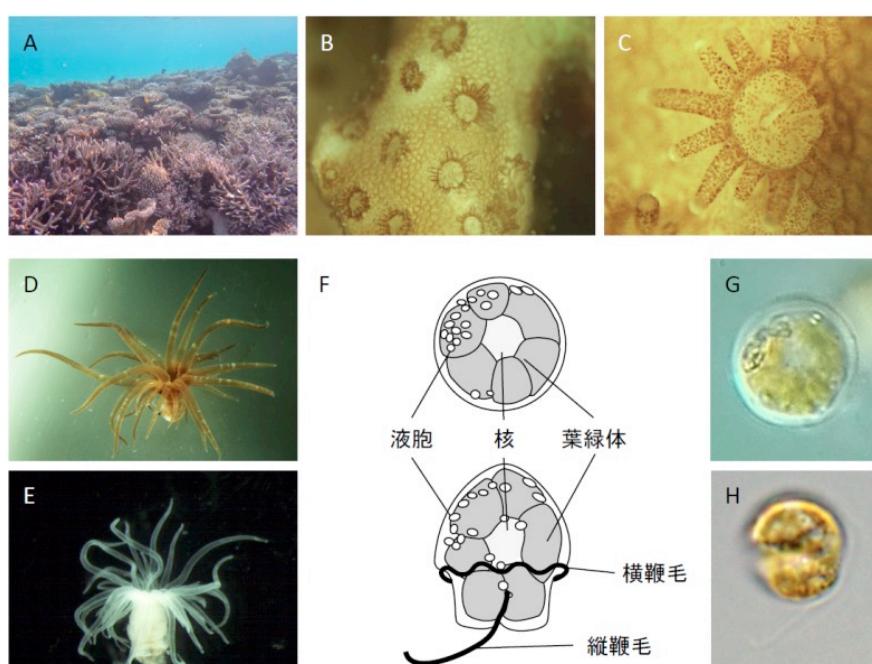


図 刺胞動物と共生する褐虫藻
(A) 热帯海域のサンゴ礁 (B,C)
褐虫藻を共生させる造礁サンゴ
(刺胞動物門花虫綱イシサンゴ
目ハナヤサイサンゴ科) (D) 褐
虫藻を共生させたセイタカイソ
ギンチャク (*Exaiptasia pallida*)
(E) 「白化処理」により非共生
状態にしたセイタカイソギンチ
ャク (F) 褐虫藻模式図 (上: 球形
細胞、下: 遊泳細胞) (G) 褐虫藻
(*Symbiodinium* sp. clade B) 球形細
胞 (H) 褐虫藻 (*Symbiodinium* sp.
clade B) 遊泳細胞

1-2. サンゴと褐虫藻の共生研究

造礁サンゴにおいては、共生の崩壊により褐虫藻がサンゴから抜け落ち、最終的にサンゴ自体が死滅へと向かう「白化現象」が起こることが知られ、数多くの研究が行われてきた。サンゴの白化現象には「色素の喪失」と「藻体の喪失」という二段階の過程があること、様々な外的因子（温度、日照、活性酸素、pHなど）が関与していることなどが報告されている (Brown 1997, Takahashi et al. 2008)。

また、サンゴと褐虫藻の種レベルの相互関係を明らかとするため、褐虫藻の分子系統学及び群集地理学的アプローチによる研究も行われている。サンゴに共生している褐虫藻は形態的には同一に見えても、実際には複数の種（分子系統により識別される「クレード」として扱われることも多い）が存在し (Rowan & Powers 1991)、サンゴの生息する海域によって異なるクレードの褐虫藻が共生している（諏訪、井口 2009）。さらに刺胞動物の中でも、サンゴでは発生段階が進むに従って共生させる褐虫藻の種類が減少する（特異性が高くなる）が、褐虫藻を共生させるイソギンチャクの一種では幼生と成体で同様の取り込み傾向を持つことが明らかになっている (Hambleton et al. 2014)。

1-3. 宿主刺胞動物からの共生メカニズム解明へのアプローチ

近年、褐虫藻の宿主であるサンゴのゲノム情報が解読され (Shinzato et al. 2011)、次世代シーケンサーを利用した遺伝子発現量解析では、褐虫藻と共生していない幼生のサンゴがはじめて褐虫藻と共生する際には、サンゴの細胞内で代謝機能や食胞に関連する遺伝子の発現制御がごく初期にのみ変化する可能性が示唆され (Mohamed et al. 2016)、今後より詳細な解析が進むことが期待される。一方、実験的な取り扱いの難しいサンゴ種に代わり、褐虫藻を細胞内に共生させる刺胞動物のモデル生物として、褐虫藻を共生させない状態でも生存できるセイタカイソギンチャクが注目されており、ゲノム解読も完了している (Baumgarten et al. 2015)。セイタカイソギンチャクの共生状態と非共生状態におけるプロテオーム解析が行われ、共生状態では脂質や窒素代謝に関するタンパク質の発現が高くなることが示される (Oakley et al. 2016) など、宿主側の共生状態の分子メカニズムを明らかにするためのツールが徐々に整備されつつある。

1-4. 褐虫藻からの共生メカニズム解明へのアプローチ

宿主側からのみならず、近年褐虫藻2種のゲノムが解読された (Lin et al. 2015, Shoguchi et al. 2013) ことから、褐虫藻側からの共生に関わる遺伝子発現の解析、さらには遺伝子の機能に関する研究が進展することが期待される。その一方でコピー数の極端に増加した遺伝子ファミリーや、他の生物種には見られない特殊なゲノム構造を持つことも示され (Maruyama et al. 2015, Shoguchi et al. 2013)、褐虫藻に特化した遺伝子・ゲノムの機能解析ツールの開発を行うことが急務となっている。

2. 様々な光合成生物における形質転換法

2-1. 形質転換法が必要とされる理由

順遺伝学的手法で変異個体を解析することができれば、ゲノム機能解析を行う上で非常に強力なツールとなるが、微細な褐虫藻の形態変異や、刺胞動物との共生の可否などの表現型を元に変異体のスクリーニングや単離を行うのは非常に困難である。このような場合、ゲノム機能解析には逆遺伝学的手法が利用できるかどうかが研究を進展させていく上で大きな鍵となるが、それには遺伝子導入法の開発が

不可欠である。

2-2. 他の植物における形質転換（真核微細藻類を中心に）

遺伝子導入法は全ての生物で共通の方法が確立されている訳ではなく、個別の種に対応した導入法の開発が求められる。これまでに多くの光合成生物で遺伝子導入法が確立されており、導入方法の開発は直接的に様々な生物における遺伝子機能解析の進展に貢献してきた（表）。

遺伝子の導入方法は大きく分けて、（1）直接外来遺伝子を物理的・化学的に導入する方法と、（2）アグロバクテリウムやウイルスを介した外来遺伝子への生物学的応答機構を利用して導入する方法がある。（1）の方法としては、現在ではPEG（ポリエチレングリコール）法やエレクトロポレーション法（電気穿孔法）、パーティクルガン法が主に用いられている。紅藻の*Cyanidioschyzon merolae* にはPEG法による遺伝子導入が有効であることが報告されている（Minoda et al. 2004, Ohnuma et al. 2008）。一倍体である原糸体を形成するヒメツリガネコケ（*Physcomitrella patens*）などでは、酵素により細胞壁などを溶かしプロトプラストの状態にしてからエレクトロポレーション法やPEGにより遺伝子導入をする方法がよく用いられている（Schaefer et al. 1991, Schaefer & Zryd 1997）。エレクトロポレーション法自体にも開発が進んでおり、NEPA21システムを用いた珪藻（*Phaeodactylum tricornutum*）の遺伝子導入では、細胞への電気パルスを段階的にかけることでより細胞へのダメージを低減し、導入効率を上げることに成功している（Miyahara et al. 2013）。また、金やタンゲステン粒子に遺伝子DNAを付着させて打ち込むパーティクルガン法は多くの真核微細藻類で用いられ、珪藻（*Phaeodactylum tricornutum*）（Apt et al. 1996）やクロラクニオン藻（*Amorphochlora amoebiformis*）（Hirakawa et al. 2008）などで使用されている。（2）の方法としては、植物に感染してDNAを送り込む性質を持つアグロバクテリウムを用いて外来遺伝子配列を挿入する形質転換法が挙げられる。モデル陸上植物であるシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）やイネ（*Oryza sativa*）では、特別な機器を必要とせず、導入効率が高いことからこの方法がよく用いられている（Clough & Bent 1998, Hiei et al. 1994）。

3. 褐虫藻及び近縁種における形質転換

3-1. これまでに報告のある遺伝子導入法の詳細

過去に褐虫藻への遺伝子導入は2つのグループから報告されている。初めて報告した ten Lohuis and Miller は刺胞動物と共生関係にある *Symbiodinium microadriaticum* に、silicon carbide（SiC） ウィスカ（針状結晶）と外来遺伝子を混合することで、遺伝子導入を行っている（ten Lohuis & Miller 1998）。本報告では、薬剤耐性遺伝子を発現するプラスミドを基本構造とし、カリフラワーモザイクウイルスの35S RNA 転写プロモーターまたはアグロバクテリウムの p1'2'プロモーターの下流にレポータータンパク質であるβ-グルクロニダーゼ（GUS）の配列をつなぎ、酵素反応により蛍光分子を放出する基質を用いたGUS蛍光解析及び、褐虫藻に発色基質であるX-Glucを反応させ検出するGUS染色解析により導入を確認している。形質転換効率は $5\text{--}24/10^7$ (cells/cells) であった。

ten Lohuis and Miller の報告後、褐虫藻の遺伝子導入の報告はしばらく行われず、新たな遺伝子導入法が発表されたのは17年後の2015年、Ortiz-Matamorosらによるものであった（Ortiz-Matamoros et al. 2015a, b）。Ortiz-Matamorosらの報告では、近年ゲノムが解読された *Symbiodinium kawagutii* (Lin et al. 2015) と、*Symbiodinium* sp. Mf11.5b.1 (Mf11), *Symbiodinium microadriaticum* subsp. *microadriaticum* (S.KB8) に対し

てグラスビースとPEGを併用した方法(Ortiz-Matamoros et al. 2015a)と土壤細菌のアグロバクテリウム(*Agrobacterium tumefaciens*)を用いた方法(Ortiz-Matamoros et al. 2015b)で遺伝子導入を行っている。形質転換効率を向上させることに成功した後者の方法では、植物で恒常発現を誘導するアグロバクテリウムのnosプロモーターを用いて、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のmicrotubule binding domain(MBD), actin-binding domain 2 of fimbrin(FABD2), Receptor for activated C kinase 1C(AtRACK1C)のタンパク質の下流にGFPを融合して発現するプラスミドを使用している。導入の成功はRT-PCRによる発現量解析と顕微鏡観察による観察により確認している。形質転換効率は*S. kawagutii*で839/10⁶, Mf11で640/10⁶, SKB8で460/10⁶(cells/cells)であった。

ten Lohuis and Millerらの報告では導入遺伝子を安定的に発現する株が樹立されたとの報告があるが、その後検証されていない。また、Ortiz-Matamorosらの2つの報告では一過性の遺伝子導入が可能であることは示されたが、導入された遺伝子が安定的に発現する株を得ることはできていない。このように、褐虫藻に対する遺伝子導入法の開発は未だに発展途上であり、更なる手法の改良が期待される。

3-2. 褐虫藻の近縁種における遺伝子導入

ここでは褐虫藻におけるゲノム機能解析の発展を牽引するような先行研究を紹介したい。渦鞭毛藻の近縁種でカキの寄生虫であるパーキンサス(*Perkinsus marinus*)では、ゲノム機能解析技術について多くの研究がなされている。Fernández-Robledoらの報告では、*P. marinus*の細胞膜タンパク質MOEのプロモーターの下流に蛍光タンパク質(GFP)をつなぎDNAコンストラクトをCell Line Optimization Nucleofector Kit(LONZA社)という細胞株最適化に特化したエレクトロポレーション法で導入しており、この時の導入効率は38%と非常に高い(Fernández-Robledo et al. 2008)。本報告では、蛍光顕微鏡観察により、遺伝子導入された細胞を分離し、RT-PCR法及びサザンブロット法にて遺伝子導入を確認している。さらにSakamotoらの報告では、ブレオマイシン耐性遺伝子の配列をコンストラクトに組み込むことで、遺伝子導入個体の薬剤スクリーニングが可能となり、遺伝子導入に成功した個体の単離を容易に行うことができるようになった(Sakamoto et al. 2016)。

3-3. 褐虫藻の遺伝子導入をより改良するために必要なこと

先に述べたように、褐虫藻の遺伝子導入に関しては過去に2つの報告があるものの、他の研究グループによる再現性は未だ確認されておらず、ゲノム機能解析への応用までは至っていない。褐虫藻の近縁種である*P. marinus*における遺伝子導入の成功により期待は高まっているものの、いつ、どの研究施設で行っても同様の結果が得られるような、簡便で高効率な遺伝子導入のプロトコルの確立・実用化のためには更なる方法論の検討が必要である。褐虫藻以外の植物細胞で遺伝子導入が汎用されている例を見ると、汎用性の高い遺伝子導入法の開発には大きく分けて3つの項目の検討が必要であると考えられる。

1. 遺伝子導入方法や条件の検討、試薬や機械の改良による導入効率の改善
2. プロモーター配列など発現ベクターの改良によるマーカー遺伝子の発現効率の改善
3. 薬剤スクリーニングなどの適切な選択マーカーの調査による選択効率の改善

1に関しては、これまでの褐虫藻の遺伝子導入に関する検討では、物理的にSiC ウィスカーで穴を開

けて導入する方法と、アグロバクテリウムを介した導入方法が報告されているが、他のPEG法、エレクトロポレーション法などを検討する事で、より改善される可能性が考えられる。

2については個々の生物が持つゲノムの性状を最大限に考慮する必要がある。渦鞭毛藻類はコアヒストンを含むスクレオソーム構造を持たない、ゲノム中に真核生物に共通のTATAboxプロモーター配列が見つからない(将口 2014)といった特殊な核ゲノムを持つ。また、mRNAのトランススプライシングが起きている(Zhang et al. 2007)など、転写後調節において特徴的なメカニズムを持つことも知られている。これらのことから、褐虫藻の生物学的特徴に合わせた外来遺伝子発現ベクターを作成するため、導入する外来遺伝子の配列を褐虫藻のコドン使用頻度に最適化する、実際に高発現している遺伝子のプロモーター領域を使用するなどの工夫が必要となる可能性も高い。近年褐虫藻2種(*Symbiodinium kawagutii*, *Symbiodinium minutum*)の全ゲノム配列が報告されたことにより(Lin et al. 2015, Shoguchi et al. 2013)，発現コンストラクトを個々の褐虫藻株に最適化することが可能となり、より実用性の高い遺伝子導入法の開発に大きく貢献するものと考えられる。

3に関して、実際に遺伝子導入を用いた実験を行う場合、簡単に遺伝子導入された細胞のみを抗生物質により選抜できる事は大きな強みとなるが、抗生物質の効果は種によって異なる事から、適切に薬剤を選定しスクリーニングする系を確立する事が重要である。ただし、大量の遺伝子導入個体を使用しないような実験や、選択効率が非常に高くスクリーニングが簡便である場合などは、遺伝子導入効率自体は必ずしも高い必要はない。Hirakawa and Ishidaの研究では、クロララクニオン藻に最適化した発現ベクターと、薬剤選抜を経ることなく单一細胞内でのタンパク局在を解明することに特化した実験系を構築し、葉緑体へのタンパク質輸送のメカニズムを明らかにした(Hirakawa & Ishida 2010)。このように、他のモデル生物で確立されている条件を満たすことにこだわらず、研究の目的や材料に合わせた遺伝子導入法を選択することが重要である。

4. 今後の展望

近年TALENやCRISPR/Cas9といったゲノム編集技術の開発が進んでおり、実験に必要とされる条件の制限が少ないとから、非モデル生物においても応用されつつある(Reid & O'Brochta 2016)。植物においては、モデル生物であるシロイスナズナやタバコ、コムギで成功例が報告されており(Li et al. 2013, Nekrasov et al. 2013, Shan et al. 2013)，緑藻クラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)や真正眼点藻*Nannochloropsis*でもCRISPR/Cas9システムによるゲノム編集が報告されている(Baek et al. 2016, Shin et al. 2016, Wang et al. 2016)。

遺伝子導入法開発に王道なしと言われるように、それを志す当事者はひたすら可能性のありそうなパラメータを試し続けるという文字通り暗中模索、五里霧中の日々を過ごさざるを得ないといふことも少なくない。しかし、ひとたび褐虫藻の安定的な遺伝子導入法が確立されれば、遺伝子機能喪失(ノックアウト)個体を得ることができる遺伝子ターゲッティングがなどの解析方法も応用可能となり、ますますゲノム機能解析が進むものと予想される。こうした遺伝子機能解析法が拡充していくことで、これまでの知見や近年明らかとなったゲノム情報などが活用され、サンゴと褐虫藻の共生関係の成立と崩壊の分子メカニズムがより詳細に明らかになることを期待したい。

謝辞

本稿を上梓するにあたり、東北大学・河田雅圭教授、中山卓郎博士、基礎生物学研究所・鎌田このみ博士に多大なるご協力を頂きました。心より御礼申し上げます。

引用文献

- Apt, K.E., Kroth, P.G., & Grossman A.R. 1996. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mol. Gen. Genet.* 252:572–579.
- Baek, K., Kim, D.H., Jeong, J., Sim, S.J., Melis, A., et al. 2016. DNA-free two-gene knockout in *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Sci. Rep.* 6:30620.
- Baumgarten, S., Simakov, O., Eshierick, L.Y., Liew, Y.J., Lehnert, E.M., et al. 2015. The genome of *Aiptasia*, a sea anemone model for coral symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112:11893–11898.
- Brown, B.E. 1997. Coral bleaching: causes and consequences. *Coral Reefs.* 16:S129–138.
- Chen, H.L., Li, S.S., Huang, R., & Tsai, H. 2008. Conditional production of a functional fish growth hormone in the transgenic line of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). *J. Phycol.* 44:768–776.
- Chen, Y., Wang, Y., Sun, Y., Zhang, L., & Li, W. 2001. Highly efficient expression of rabbit neutrophil peptide-1 gene in *Chlorella ellipsoidea* cells. *Curr. Genet.* 39:365–370.
- Chow, K.C., & Tung, W.L. 1999. Electroporation of *Chlorella vulgaris*. *Plant Cell Rep.* 18:778–780.
- Clough, S.J., & Bent, A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16:735–743.
- Dawson, H.N., Burlingame, R., & Cannons, A.C. 1997. Stable transformation of *Chlorella*: rescue of nitrate reductase-deficient mutants with the nitrate reductase gene. *Curr. Microbiol.* 35:356–362.
- Debuchy, R., Purton, S., & Rochaix, J.D. 1989. The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *EMBO J.* 8:2803–2809.
- Doetsch, N.A., Favreau, M.R., Kuscuoglu, N., & Thompson, M.D. 2001. Chloroplast transformation in *Euglena gracilis*: splicing of a group III twintron transcribed from a transgenic *psbK* operon. *Curr. Genet.* 39:49–60.
- Dunahay, T.G., Jarvis, E.E., & Roessler, P.G. 1995. Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila*. *J. Phycol.* 31:1004–1012.
- Fernández-Robledo, J.A., Lin, Z., & Vasta, G.R. 2008. Transfection of the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 157:44–53.
- Hambleton, E.A., Guse, A., & Pringle, J.R. 2014. Similar specificities of symbiont uptake by adults and larvae in an anemone model system for coral biology. *J. Exp. Biol.* 217:1613–1619.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., & Kumashiro, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6:271–282.
- Hirakawa, Y., & Ishida, K. 2010. Internal plastid-targeting signal found in a RubisCO small subunit protein of a chlorarachniophyte alga. *Plant J.* 64:402–410.
- Hirakawa, Y., Kofuji, R., & Ishida, K. 2008. Transient transformation of a chlorarachniophyte alga, *Lotharella amoebiformis* (Chlorarachniophyceae), with uidA and egfp reporter genes. *J. Phycol.* 44:814–820

- 井上 功 2007. 藻類30億年の自然史 –藻類から見る生物進化・地球・環境–. 東海大学出版会. 神奈川.
- Kindle, K.L. 1990. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:1228–1232.
- Lapidot, M., Raveh, D., Sivan, A., Arad, S.M., & Shapira, M. 2002. Stable chloroplast transformation of the unicellular red alga *Porphyridium* species. *Plant Physiol.* 129:7–12.
- Li, J.F., Norville, J.E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., et al. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat. Biotechnol.* 31:688–691.
- Lin, S., Cheng, S., Song, B., Zhong, X., Lin, X., et al. 2015. The *Symbiodinium kawagutii* genome illuminates dinoflagellate gene expression and coral symbiosis. *Science*. 350:691–694.
- Maruyama, S., Shoguchi, E., Satoh, N., & Minagawa, J. 2015. Diversification of the light-harvesting complex gene family via intra- and intergenic duplications in the coral symbiotic alga *Symbiodinium*. *PLoS ONE*. 10:e0119406.
- Minoda, A., Sakagami, R., Yagisawa, F., Kuroiwa, T., & Tanaka, K. 2004. Improvement of culture conditions and evidence for nuclear transformation by homologous recombination in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Plant Cell Physiol.* 45:667–671.
- Miyahara, M., Aoi, M., Inoue-Kashino, N., Kashino, Y., & Ifuku, K. 2013. Highly efficient transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by multi-pulse electroporation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77:874–876.
- Mohamed, A.R., Cumbo, V., Harii, S., Shinzato, C., Chan, C.X., et al. 2016. The transcriptomic response of the coral *Acropora digitifera* to a competent *Symbiodinium* strain: the symbiosome as an arrested early phagosome. *Mol. Ecol.* 25:3127–3141.
- Muto, M., Fukuda, Y., Nemoto, M., Yoshino, T., Matsunaga, T., & Tanaka, T. 2013. Establishment of a genetic transformation system for the marine pennate diatom *Fistulifera* sp. strain JPCC DA0580—a high triglyceride producer. *Mar. Biotechnol.* 15:48–55.
- Nekrasov, V., Staskawicz, B., Weigel, D., Jones, J.D.G., & Kamoun, S. 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol.* 31:691–693.
- Oakley, C.A., Ameismeier, M.F., Peng, L., Weis, V.M., Grossman, A.R., & Davy, S.K. 2016. Symbiosis induces widespread changes in the proteome of the model cnidarian *Aiptasia*. *Cell Microbiol.* 18:1009–1023.
- Ohnuma, M., Yokoyama, T., Inouye, T., Sekine, Y., & Tanaka, K. 2008. Polyethylene glycol (PEG)-mediated transient gene expression in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Plant Cell Physiol.* 49:117–120.
- Ortiz-Matamoros, M.F., Villanueva, M.A., & Islas-Flores, T. 2015a. Transient transformation of cultured photosynthetic dinoflagellates (*Symbiodinium* spp.) with plant-targeted vectors. *Cien. Mar.* 41:21–32.
- Ortiz-Matamoros, M.F., Islas-Flores, T., Voigt, B., Menzel, D., Baluška, F., & Villanueva, M.A. 2015b. Heterologous DNA uptake in cultured *Symbiodinium* spp. aided by *Agrobacterium tumefaciens*. *PLoS ONE*. 10:e0132693
- Poulsen, N., Chesley, P.M., & Kröger, N. 2006. Molecular genetic manipulation of the diatom *Thalassiosira pseudonana* (bacillariophyceae). *J. Phycol.* 42:1059–1065
- Poulsen, N., & Kröger, N. 2005. A new molecular tool for transgenic diatoms: control of mRNA and protein biosynthesis by an inducible promoter-terminator cassette. *FEBS J.* 272:3413–3423
- Reid, W., & O'Brochta, D.A. 2016. Applications of genome editing in insects. *Curr. Opin. Insect Sci.* 13:43–54.

- Rowan, R., & Powers, D.A. 1991. A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal-algal symbioses. *Science*. 251:1348–1351.
- Sakamoto, H., Kita, K., & Matsuzaki, M. 2016. Drug selection using bleomycin for transfection of the oyster-infecting parasite *Perkinsus marinus*. *Parasitol. Int.* 65:563–566
- Sawahel, W., Onde, S., Knight, C., & Cove, D. 1992. Transfer of foreign DNA into *Physcomitrella patens* protonemal tissue by using the gene gun. *Plant Mol. Biol. Rep.* 10:314–315.
- Schaefer, D., Zryd, J.P., Knight, C.D., Cove, D.J. 1991. Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol. Gen. Genet.* 226:418–424.
- Schaefer, D.G., & Zryd, J.P. 1997. Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.* 11:1195–1206
- Schiedlmeier, B., Schmitt, R., Müller, W., Kirk, M.M., Gruber, H., et al. 1994. Nuclear transformation of *Volvox carteri*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:5080–5084.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., et al. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31:686–688.
- Shin, S.E., Lim, J.M., Koh, H.G., Kim, E.K., Kang, N.K., et al. 2016. CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Rep.* 6:27810
- Shinzato, C., Shoguchi, E., Kawashima, T., Hamada, M., Hisata, K., et al. 2011. Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change. *Nature*. 476:320–323.
- 将口 栄一 2014. 涡鞭毛藻類の独特的な核ゲノム. 原生動物学会雑誌 47, 5-12.
- Shoguchi, E., Shinzato, C., Kawashima, T., Gyoja, F., Mungpakdee, S., et al. 2013. Draft assembly of the *Symbiodinium minutum* nuclear genome reveals dinoflagellate gene structure. *Curr. Biol.* 23:1399–1408.
- Sun, Y., Gao, X., Li, Q., Zhang, Q., & Xu, Z. 2006. Functional complementation of a nitrate reductase defective mutant of a green alga *Dunaliella viridis* by introducing the nitrate reductase gene. *Gene*. 377:140–149.
- Sun, Y., Yang, Z., Gao, X., Li, Q., Zhang, Q., & Xu, Z. 2005. Expression of foreign genes in *Dunaliella* by electroporation. *Mol. Biotechnol.* 30:185–192.
- 諏訪 僉太, 井口 亮 2009. 造礁サンゴに共生する褐虫藻の分子系統学的研究に関するレビュー. 日本サンゴ礁学会誌 第10巻, 13-23.
- Takahashi, S., Whitney, S., Itoh, S., Maruyama, T., & Badger, M. 2008. Heat stress causes inhibition of the *de novo* synthesis of antenna proteins and photobleaching in cultured *Symbiodinium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:4203–4208
- Tan, C., Qin, S., Zhang, Q., & Jiang, P. 2005. Establishment of a micro-particle bombardment transformation system for *Dunaliella salina*. *J. Microbiol.* 43:361–365
- ten Lohuis, M.R., & Miller, D.J. 1998. Genetic transformation of dinoflagellates (*Amphidinium* and *Symbiodinium*): expression of GUS in microalgae using heterologous promoter constructs. *Plant J.* 13:427–435.
- Teng, C., Qin, S., Liu, J., Yu, D., Liang, C., & Tseng, C. 2002. Transient expression of *lacZ* in bombarded unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Appl. Phycol.* 14:497–500

表 光合成生物における遺伝子導入法

植物名	学名	導入法	文献
シロイヌナズナ	<i>Arabidopsis thaliana</i>	アグロバクテリウム	Clough & Bent 1998
ヒメツリガネコケ	<i>Physcomitrella patens</i>	PEG ¹ パーティクルガン ²	¹ Schaefer et al. 1991 ² Sawahel et al. 1992
緑藻	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	パーティクルガン ¹ PEG ²	¹ Debuchy et al. 1989 ² Kindle 1990
	<i>Chlorella spp.</i>	グラスピーズ ¹ エレクトロポレーション ²	¹ Dawson et al. 1997 ² Chen et al. 2001 ² Chow & Tung 1999
	<i>Dunaliella spp.</i>	パーティクルガン ¹ エレクトロポレーション ²	¹ Tan et al. 2005 ² Sun et al. 2005, 2006
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	パーティクルガン	Teng et al. 2002
	<i>Volvox carteri</i>	パーティクルガン	Schiedlmeier et al. 1994
	<i>Ostreococcus tauri</i>	エレクトロポレーション	van Ooijen et al. 2012
紅藻	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	PEG	Minoda et al. 2004
	<i>Porphyridium sp.</i>	パーティクルガン	Lapidot et al. 2002
珪藻	<i>Cyclotella cryptica</i>	パーティクルガン	Dunahay et al. 1995
	<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	パーティクルガン	Poulsen & Kröger 2005
	<i>Navicula saprophila</i>	パーティクルガン	Dunahay et al. 1995
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	パーティクルガン ¹ エレクトロポレーション ² (NEPAgene) ²	¹ Apt et al. 1996, ¹ Zaslavskia et al. 2000 ² Miyahara et al. 2013
	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	パーティクルガン	Poulsen et al. 2006
	<i>Fistulifera sp.</i>	パーティクルガン	Muto et al. 2013
真正眼点藻	<i>Nannochloropsis oculata</i>	エレクトロポレーション	Chen et al. 2008
渦鞭毛藻	<i>Amphidinium sp.</i>	silicon carbide whiskers	ten Lohuis & Miller 1998
		silicon carbide whiskers ¹	¹ ten Lohuis & Miller 1998,
	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	グラスピーズ+PEG ² アグロバクテリウム ³	² Ortiz-Matamoros et al. 2015a ³ Ortiz-Matamoros et al. 2015b
	<i>Symbiodinium kawagutii</i>	グラスピーズ+PEG ¹ アグロバクテリウム ²	¹ Ortiz-Matamoros et al. 2015a ² Ortiz-Matamoros et al. 2015b
	<i>Symbiodinium sp.</i>	グラスピーズ+PEG ¹ アグロバクテリウム ²	¹ Ortiz-Matamoros et al. 2015a ² Ortiz-Matamoros et al. 2015b
パーキンサス類	<i>Perkinsus marinus</i>	エレクトロポレーション	Fernández-Robledo et al. 2008 Sakamoto et al. 2016
ユーゲレナ藻	<i>Euglena gracilis</i>	パーティクルガン	Doetsch et al. 2001
クロラクニオン藻	<i>Amorphochlora amoebiformis</i>	パーティクルガン	Hirakawa et al. 2008

クロララクニオン藻の色素体制御機構

平川 泰久

筑波大学生命環境系

〒300-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

Yoshihisa Hirakawa

Nuclear control of secondary plastids in chlorarachniophytes

Key words: algae, chlorarachniophyte, circadian, nucleomorph, secondary plastid

Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

Tennodai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.8c6.00125

1. はじめに

植物や藻類のもつ色素体（葉緑体）が細胞内共生により誕生したことは広く知られている。これは、捕食性の単細胞真核生物が光合成生物を細胞内に取り込む（つまり食べる）ことで始まったと考えられている（図 1）。共生の過程で、取り込まれた光合成生物（共生者）は遺伝子の多くを失い、光合成や代謝、DNA 複製や分裂などに関わる多くの遺伝子は、捕食した真核生物（宿主）の核ゲノムへと移動した。現在、色素体で機能するタンパク質の多く（90% 以上）は核ゲノムの遺伝子にコードされており、色素体は細胞質側からのタンパク質供給に大きく依存している（Bock & Timmis 2008）。これにより、色素体は宿主の外では生きられないオルガネラへと進化した。現存の光合成生物のうち、陸上植物と一部の藻類（緑藻、紅藻、灰色藻）は光合成細菌シアノバクテリアの細胞内共生により誕生したと考えられており、我々はこのイベントを一次共生と呼ぶ（図 1）。さらに、他の捕食性真核生物が緑藻や紅藻を細胞

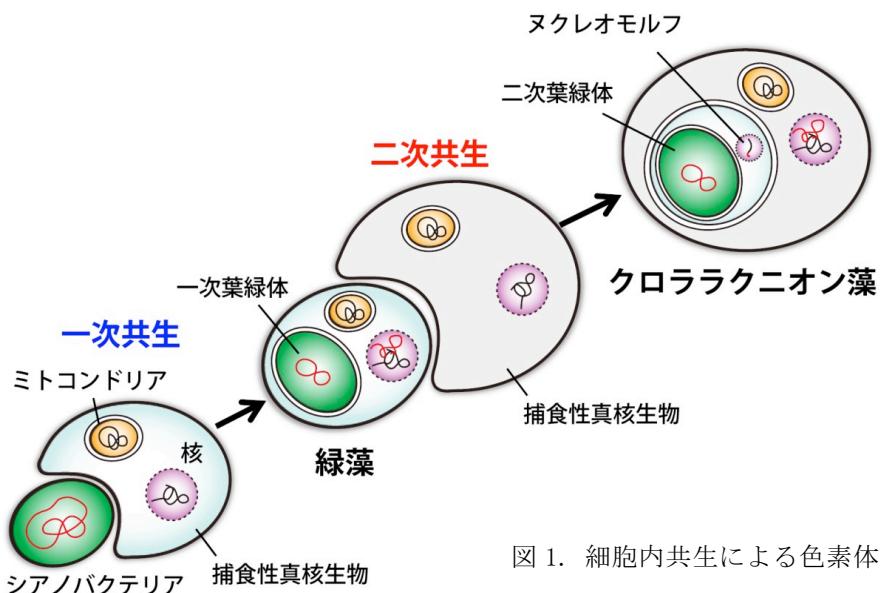


図 1. 細胞内共生による色素体進化。

内に取り込む二度目の共生「二次共生」が起こり、異なる系統の生物で色素体は進化した (Keeling 2013)。真核生物と原核生物の間で起きた一次共生に対して、二次共生は真核生物どうしの共生イベントであり、一次共生が過去に一度きりなのに対して、二次共生は複数回独立に起きている（最低でも 3 回以上）。この様に、複雑な細胞内共生を経て系統的に多様な生物群で色素体は進化してきた。

2. 二次色素体をもつクロララクニオン藻

クロララクニオン藻は海産の单細胞性藻類で、現在までに 8 属 14 種が報告されている (Hirakawa 2014)。細胞形態は多様で、細い仮足を伸ばすアメーバ細胞、細胞壁を持つ球状細胞、鞭毛で泳ぐ遊泳細胞が知られており、熱帯から温帯の沿岸域から外洋と幅広に環境から発見されている（図 2）。



図 2. クロララクニオン藻の顕微鏡写真。(A) *Amorphochlora amoebiformis* (B) *Lotharella globosa* (C) *Bigelowiella natans*。スケールバーは 10 μm

分子系統解析から、クロララクニオン藻は二次共生由来の色素体（二次色素体と呼ばれる）をもつ藻類群の一つで、リザリア界のケルコゾア門に属する原生生物がトレボウクシア綱に近縁な緑藻を細胞内共生することで誕生したと考えられている (Suzuki et al. 2016a)。クロララクニオン藻は、植物や他の藻類とは異なるユニークな構造の二次色素体をもつことが知られている。植物などの一次色素体が 2 枚の包膜に囲まれているのに対して、本藻の二次色素体は 4 枚の包膜をもつ。内側 2 枚の膜は共生した緑藻の色素体膜由来で、外側 2 枚目の膜はそれぞれ緑藻の細胞質膜と宿主の食包膜に由来するとされている (Cavalier-Smith 2000)。さらに興味深い特徴として、内側 2 枚と外側 2 枚の色素体膜間領域（もともと緑藻の細胞質にあたるスペース）に共生藻の痕跡的な核であるヌクレオモルフを保持している（図 2）。他の多くの二次色素体では、共生藻の核はすでに消失しており、ヌクレオモルフが見られる藻類は、クロララクニオン藻と紅藻起源の二次色素体をもつクリプト藻に限られる。このことから、クロララクニオン藻は二次共生の中間段階を示す二次色素体をもつ藻類として注目されている。

それでは、二次共生により取り込まれた共生藻が二次色素体へと進化するオルガネラ化の過程でどのようなことが起きたのか？また現在の二次色素体は細胞内でどのように制御されているのか？本総説では、クロララクニオン藻における最近の研究から明らかになった共生進化のプロセスを説明する。

3. 色素体ゲノムとヌクレオモルフゲノムの進化

我々のグループでは、従来のサンガーシークエンスに加え、次世代シークエンサーを用いて複数種のクロララクニオン藻の色素体およびヌクレオモルフのゲノム配列の解読を進めてきた。これまでに、5種の色素体ゲノム、4種のヌクレオモルフゲノムが解読されている。クロララクニオン藻の色素体ゲノムのサイズは67.4から72.6 Kbで、一般的な緑藻の色素体ゲノム(94から521 Kb)よりも少し小さい。遺伝子構成を比較すると、緑藻で保存されている13個の色素体遺伝子(例えば、光化学系遺伝子やリボソーム遺伝子の一部)がクロララクニオン藻では見られない。さらに、クロララクニオン藻の一種*Bigelowiella natans*で解読された全ゲノムの情報から、失われた色素体遺伝子のいくつかが核ゲノムで発見されている(Curtis et al. 2012)。このことから、二次共生の過程で、共生した緑藻の色素体ゲノムから複数の遺伝子が消失して、核ゲノムへと移動したことが示唆される。興味深いことに、色素体ゲノムの遺伝子構成は、5種のクロララクニオン藻の間でほぼ保存されており、共生に伴う色素体遺伝子の消失や移動は、種分化する以前の二次共生の初期段階で完了したと考えられる(Suzuki et al. 2016a)。

これまでに解読されているクロララクニオン藻のヌクレオモルフゲノムは、374から611 Kbで、緑藻の核ゲノム(クラミドモナスでは約120 Mb)と比較すると劇的に小さい。これは二次共生の過程で、共生した緑藻の核から多くの遺伝子が消失したことを示している。ヌクレオモルフに残っている遺伝子は約300個で、多くは転写や翻訳に関わるハウスキーピング遺伝子である。その中には17個の色素体関連遺伝子(例えば、タンパク輸送に関わるTOC75やTIC20、タンパク質修飾に関わるDnaKやCpn60など)が含まれており、ヌクレオモルフはこれらの色素体遺伝子のために現在も存在し続けていると考えられている(Suzuki et al. 2015)。つまり、約300個のハウスキーピング遺伝子は17個の色素体関連遺伝子を維持するためだけに存在するとされている。では、ヌクレオモルフゲノムから消えた遺伝子はどうなったのだろう? *B. natans*の核ゲノム解析より、数多くの遺伝子がヌクレオモルフから核へと移動したと推定されている。細胞内局在予測から、核コードタンパク質のうち、約700が色素体内へ、約1000のタンパク質がヌクレオモルフのある色素体膜間領域に輸送されていると見積もられている(Curtis et al. 2012)。つまり、ヌクレオモルフを含む二次色素体を維持するためには、核コードのタンパク質の供給が必要不可欠で、二次色素体は核遺伝子に大きく依存していると言える。

ここでヌクレオモルフの運命に関して少し考えてみる。他の多くの藻類ではヌクレオモルフが見られないが、クロララクニオン藻のヌクレオモルフもいずれ消失するのだろうか? 我々の行ったゲノム比較解析から、機能が推定されるヌクレオモルフ遺伝子の多く(80%以上)は4種のクロララクニオン藻で保存されており、17個の色素体関連遺伝子は完全に保存されていた(Suzuki et al. 2015)。つまり、種分化後に重要なヌクレオモルフ遺伝子の消失はさほど起きていないと考えられる。さらに、核ゲノムの解析から、種分化後にヌクレオモルフから核へ移動した遺伝子はこれまで発見されていない。このことから、ヌクレオモルフはゲノム縮小過程の中間段階を示すというより、ある終着点に達していると思われる。17個の

色素体関連遺伝子が核ゲノムへ移動した際、ヌクレオモルフはその役割を終えると考えられているが、今後、ヌクレオモルフが消失する可能性は高くなきだろう。

4. 核コード色素体遺伝子の転写制御

前述したとおり、クロララクニオン藻の二次色素体で機能するタンパク質の多くは核ゲノムにコードされており、二次色素体は核の制御下にあると言える。では、これらの遺伝子の転写制御はどのようにになっているのだろうか？我々は最近、12時間12時間の明暗周期で同調培養したクロララクニオン藻 *B. natans* の細胞を用いて、一日の遺伝子の発現変動を次世代シークエンサーを用いて解析した (Suzuki et al. 2016b)。核ゲノムにある約21,000の遺伝子のうち、約7000が概日周期にあわせて発現変動していることを明らかにした。二次色素体内で機能すると推定される780個のタンパク質遺伝子に関しては、70%以上が発現変動を示し、その多くは暗期の間に発現量を増加させ、夜明け前に発現ピークを迎えるものであった。

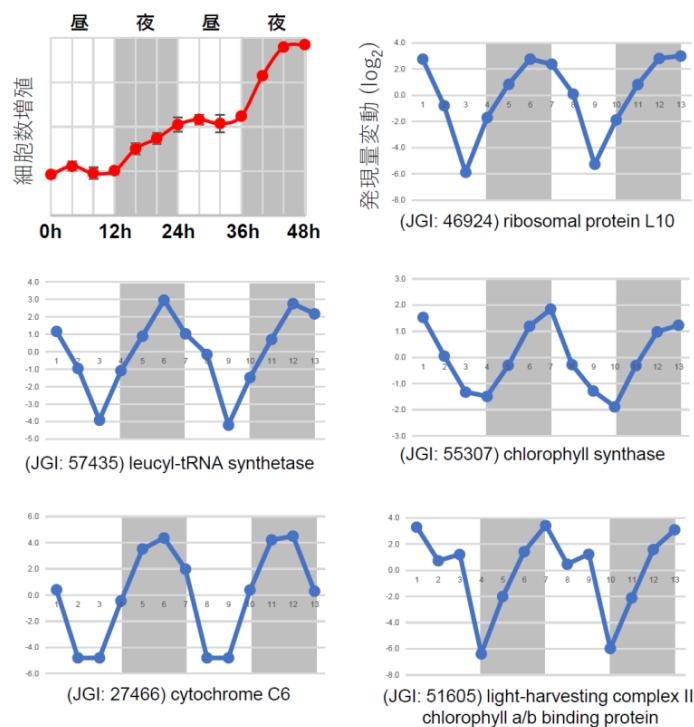


図 3. 概日周期にあわせて発現変動する色素体関連遺伝子。

明暗周期で同調培養したクロララクニオン藻 *B. natans* は、暗期にのみ細胞分裂する。5つの色素体で機能するタンパク質遺伝子の発現量変動を折れ線グラフ（青）で示す。いずれも暗期に発現量が増加している。

緑藻のクラミドモナスやオストレオコッカスでも、色素体関連の核遺伝子が概日周期で発現制御されることが知られており、多くの遺伝子は太陽の昇る明け方に転写開始されている (Monnier et al. 2010, Zones et al. 2015)。同じ光合成生物でも、クロララクニオン藻と緑藻では色素体関連遺伝子の発現時期が大きく異なっており、二次共生により共生緑藻から宿主核へと移動した色素体関連遺伝子は、新たな発現調節機構を獲得したと考えられる。クロララクニオン藻が夜の間に色素体関連遺伝子を発現することの意義は不明であるが、この転写機構はサーカディアンリズム（体内時計）により制御されていると思われる。一方、ヌクレオモルフに残った約300の遺伝子は転写制御されているのだろうか？驚くことに、99%のヌクレオモルフ遺伝子は一日を通して一定の転写量を保っていた (Suzuki et al. 2016b)。一般的に時期特異的な発現変動を見せるDNA複製関連遺伝子さえもヌクレオモルフでは発現変動し

ていなかった。二次共生で極度に縮小したヌクレオモルフゲノムでは、遺伝子と遺伝子の間の領域も小さく約 100 塩基程度しかない。このことが、ヌクレオモルフ遺伝子の転写レベルでの発現調節機構の消失と関係しているのかもしれない。これらのことから、クロララクニオン藻の二次色素体をコントロールするハンドルは核が握っていると言えるだろう。

5. ヌクレオモルフのユニークな DNA 複製タンパク質

最後にヌクレオモルフの DNA 複製に関わる面白いタンパク質を紹介する。共生緑藻の核を起源に持つヌクレオモルフは、真核型の DNA 複製機構をもつと考えられている。実際、ヌクレオモルフゲノムには複数の真核型の DNA 複製関連タンパク質 (PCNA, MCM, ヒストンなど) がコードされている。しかし、最も重要なポリメラーゼ遺伝子がヌクレオモルフゲノムに存在せず、既に核ゲノムに移動していることが示唆されてきた。最近の研究で我々は、クロララクニオン藻のヌクレオモルフに局在する DNA ポリメラーゼを発見した (Suzuki et al. 2016b)。驚くことに、分子系統解析の結果、その DNA ポリメラーゼはウイルスの配列と近縁であることが示された。つまり、二次共生の過程で、ヌクレオモルフ DNA を複製するポリメラーゼは、緑藻由来のものからウイルス由来のものに置き換わったと考えられる。興味深いことに、クロララクニオン藻の色素体関連タンパク質の中には、緑藻以外を起源とするものが複数存在することが知られている (Archibald et al. 2003, Yang et al. 2014)。例えば、色素体分裂関連タンパク質 FtsZ は紅藻系統からの水平伝播に由来するとされている (Hirakawa & Ishida 2015)。これらのことから、二次共生の成立過程は、共生者と宿主の二者間だけの単純なイベントではなく、他の藻類やバクテリア、ウイルスまでも関わる非常にモザイク性の高いイベントであったと考えられる。

引用文献

- Archibald, J.M., Rogers, M.B., Toop, M., Ishida, K., & Keeling, P.J. 2003. Lateral gene transfer and the evolution of plastid-targeted proteins in the secondary plastid-containing alga *Bigelowiella natans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:7678–7683.
- Bock, R. & Timmis, J.N. 2008. Reconstructing evolution: Gene transfer from plastids to the nucleus. *BioEssays* 30:556–566.
- Cavalier-Smith T. 2000. Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.* 5:174–182.
- Curtis, B.A., Tanifugi, G., Burki, F., Gruber, A., Irimia, M., Maruyama, S., Arias, M.C., Ball, S.G., Gile, G.H., Hirakawa, Y., Hopkins, J.F., Kuo, A., Rensing, S.A., Schmutz, J., Symeonidi, A., Elias, M., Eveleigh, R.J., Herman, E.K., Klute, M.J., Nakayama, T., Oborník, M., Reyes-Prieto, A., Armbrust, E.V., Aves, S.J., Beiko, R.G., Coutinho, P., Dacks, J.B., Durnford, D.G., Fast, N.M., Green, B.R., Grisdale, C.J., Hempel, F., Henrissat, B., Höppner, M.P., Ishida, K., Kim, E., Kořený, L., Kroth, P.G., Liu, Y., Malik, S.B., Maier, U.G., McRose, D., Mock, T., Neilson, J.A., Onodera, N.T., Poole, A.M., Pritham, E.J., Richards, T.A., Rocap, G., Roy, S.W., Sarai, C., Schaack, S., Shirato, S., Slamovits, C.H., Spencer, D.F., Suzuki, S., Worden, A.Z., Zauner, S., Barry, K., Bell, C., Hirakawa, Y.

- Bharti, A.K., Crow, J.A., Grimwood, J., Kramer, R., Lindquist, E., Lucas, S., Salamov, A., McFadden, G.I., Lane, C.E., Keeling, P.J., Gray, M.W., Grigoriev, I.V., & Archibald, J.M. 2012. Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. *Nature* 492: 59–65.
- Hirakawa, Y. 2014. Complex plastids of chlorarachniophyte algae. *Perspect. Phycol.* 1:87–92.
- Hirakawa, Y. & Ishida, K. 2015. Prospective function of FtsZ proteins in the secondary plastid of chlorarachniophyte algae. *BMC Plant Biol.* 15:276.
- Keeling, P.J. 2013. The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64:583–607.
- Monnier, A., Liverani, S., Bouvet, R., Jesson, B., Smith, J.Q., Mosser, J., Corellou, F., & Bouget, F.Y. 2010. Orchestrated transcription of biological processes in the marine picoeukaryote *Ostreococcus* exposed to light/dark cycles. *BMC Genomics* 11:192.
- Suzuki, S., Hirakawa, Y., Kofuji, R., Sugita, M., & Ishida, K. 2016a. Plastid genome sequences of *Gymnochlorella stellata*, *Lotharella vacuolata*, and *Partenskyella glossopodia* reveal remarkable structural conservation among chlorarachniophyte species. *J. Plant. Res.* 129:581–590.
- Suzuki, S., Ishida, K., & Hirakawa, Y. 2016b. Diurnal transcriptional regulation of endosymbiotically derived genes in the chlorarachniophyte *Bigelowiella natans*. *Genome Biol. Evol.* 8:2672–2682.
- Suzuki, S., Shirato, S., Hirakawa, Y., & Ishida, K. 2015. Nucleomorph genome sequences of two chlorarachniophytes, *Amorphochlora amoebiformis* and *Lotharella vacuolata*. *Genome Biol. Evol.* 7:1533–1545.
- Yang, Y., Matsuzaki, M., Takahashi, F., Qu, L., & Nozaki, H. 2014. Phylogenomic analysis of “red” genes from two divergent species of the “green” secondary phototrophs, the chlorarachniophytes, suggests multiple horizontal gene transfers from the red lineage before the divergence of extant chlorarachniophytes. *PLoS One* 9:e101158.
- Zones, J.M., Blaby, I.K., Merchant, S.S., Umen, J.G. 2015. High-resolution profiling of a synchronized diurnal transcriptome from *Chlamydomonas reinhardtii* reveals continuous cell and metabolic differentiation. *Plant Cell* 27:2743–69.

ミカヅキモの有性生殖・生殖隔離・生殖様式

土金勇樹

日本女子大学理学部物質生物科学科

〒112-8681 東京都文京区目白台 2-8-1

Yuki Tsuchikane

Analysis of reproductive isolation, reproductive compatibility, and sexual reproduction in
Closterium

Key words: algae, *Closterium*, pheromone, reproductive isolation, sexual reproduction

Department of Chemical and Biological Sciences, Faculty of Science, Japan Women's
University, 2-8-1 Mejirodai, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8681, JAPAN

DOI: 10.24480/bsj-review.8d1.00126

1. はじめに

筆者は有性生殖の解析を行うためにミカヅキモという藻類に注目している。本総説では、ミカヅキモと呼ばれる藻類の紹介を行い、有性生殖機構、生殖隔離機構、生殖様式における研究例をあげながら、なぜミカヅキモを用いて研究を行うのか解説したい。また、本稿は基本的に過去の総説（土金・関本 2012, 土金 2013, Sekimoto Abe and Tsuchikane 2012）の内容に基づいて加筆・再構成を行った。

2. 陸上植物とミカヅキモの関係

ミカヅキモ属 (*Closterium*) はシャジクモ藻綱に属した藻類である。このシャジクモ藻綱は陸上植物にもっとも近縁な藻類であることが知られている (McCourt et al. 2004)。中でも、ホシミドロ目、コレオケーテ目、シャジクモ目のいずれが陸上植物と近縁であるかについて、様々な解析がなされており、近年では、ミカヅキモ属を含むホシミドロ目が陸上植物に最も近縁であることが示唆されている (図 1, Wickett et al. 2014, Delwiche and cooper 2015)。つまりミカヅキモは陸上植物にもっとも近縁な藻類の仲間であり、植物の進化を考える上で重要な位置に存在する。

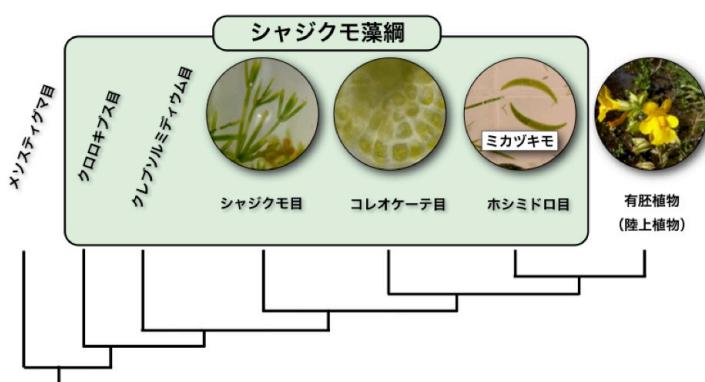


図 1 ストレプトファイツ類の簡易系統関係

Wickett et al. 2014 を参考にした。陸上植物とシャジクモ藻綱などを合わせた单系統群をストレプトファイツ類と呼ぶ。ホシミドロ目、コレオケーテ目、シャジクモ目のいずれが陸上植物と最も近縁であるかについて議論されてきたが、近年ではこの図の関係が支持されている。

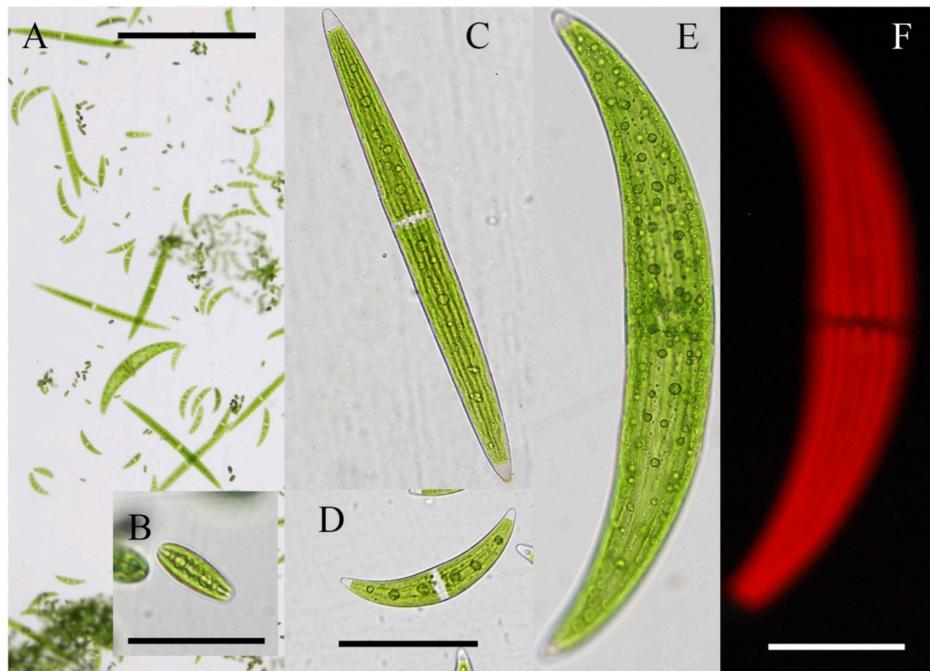


図2 様々なミカヅキモ

A) 以下4種のミカヅキモを混合したもの。形態的に実に多様であることがわかる。B) ヒメウリミカヅキモ (*C. navicula*; NIES-175) .C) ナガミカヅキモ (*C. acerosum*; NIES-127) .D) ジュズミカヅキモ (*C. moniliferum*; NIES-3646) .E) オオミカヅキモ (*C. ehrenbergii*; NIES-228) .F) オオミカヅキモの葉緑体。蛍光顕微鏡を用いて葉緑体の自家蛍光を撮影したもので、葉緑体の形態を詳細に観察することができる。スケールバー = 500 μm (A) , 50 μm (B) , 100 μm (C, D, E, F) .以上の株は国立環境研究所微生物系保存施設から分譲された。

3.ミカヅキモについて

3-1. 生息域と分類

ホシミドロ目には、単細胞のものと一列細胞無分枝の糸状体のものがある。ミカヅキモ属の仲間は世界中の湖沼や水田などの淡水性止水域に生育する単細胞生物であり、細胞の形や大きさ、細胞先端の特徴などによって分類される。その形態は多様であり、どのように進化してきたのか、興味が持たれる（図2 A, B, C, D, E）。細胞壁に包まれた1つの細胞は、2つの葉緑体と、それに挟まれる形で核を持つ。葉緑体にはピレノイドが観察され、これも形態的分類の指標の一つとなる。また、葉緑体は浅裂しているため、複数の溝が観察される（図2 F.）。

ミカヅキモ研究は Ralfs (1848) により 36 種が発表されたことに始まる。以来分類学的な研究がなされており、その研究史は伊藤 (1965) により詳細にまとめられている。中でも注目するべき仕事は、W. West and G. S. West 「A Monograph of the British Desmidaceae」（第一巻が 1904 年に発表され、1923 年両 West 死去後に、Nellie Carter が第 5 巻を出して完結している）であり、基本種 60 種、変種 37 種、品種 6 種が記載されている。

現在、研究に最も用いられている種類は *Closterium peracerosum- strigosum- littorale* complex と呼ばれている（図 3）。Ichimura and Watanabe (1976) により、3種 (*C. peracerosum*, *C. strigosum*, *C. littorale*) の種複合体とされた。このように長い名称を持つため、筆者は本生物集団を通称としてヒメミカヅキモと呼んでいる。今後、一形態種のミカヅキモに3つの異なる学名が付けられたシノニムであるのか、やはり3種は別の種なのか、分類学的な再検討が必要である。

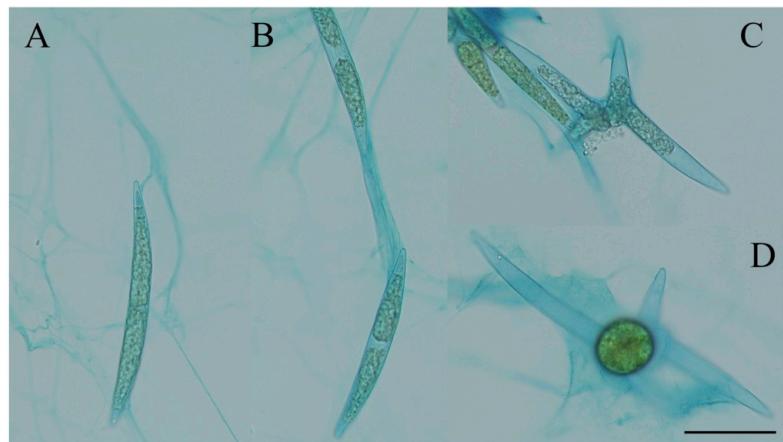


図3 ヘテロタリズム系統の接合過程

アルシアンブルー染色を施し、多糖性の粘液を青色に可視化した。A) 栄養細胞。B) 有性分裂。2つの配偶子嚢細胞が形成される。C) プロトプラスト（配偶子）放出。D) 接合子。スケールバー = 50 μm.

4. 接合と呼ばれる有性生殖

ミカヅキモには遺伝的に決定された性を持つものが存在し、それらはヘテロタリズムと呼ばれる。この相補的な性は雌雄にあたるもの、形態的な違いが観察されないために+型、-型と呼ばれている。通常はそれが細胞分裂による無性生殖を行い増殖するが、窒素源の欠如などのストレス条件下で+型細胞と-型細胞の間で接合と呼ばれる有性生殖が行われる（図4 A）。

4-1. 粘液放出

ヘテロタリズム系統の接合では、まず+型、-型の細胞から多糖性の粘液の分泌が促進される（図3 A）（Akatsuka et al. 2003）。図3はアルシアンブルー染色を施し、粘液を青色に可視化したものである。ミカヅキモは生活環を通して鞭毛のような運動器官を持たないため、この粘液が細胞の移動にかかわるものと考えられている（Domozych et al. 1993）。

4-2. 有性分裂

次に両接合型細胞が細胞分裂を行う（図3 B）。この有性生殖時に同調的に起こる細胞分裂は有性分裂と呼ばれ（Ichimura 1971），DNA合成中の細胞の融合を避けるために、細胞周期を同調させる働きがあると考えられている（Tsuchikane et al. 2003）。また、この有性分裂を行った後の細胞は分裂面の半細胞が伸長せず、左右非対称な形態を示しており、配偶子嚢細胞（gametangial cell）と呼ばれている（Ichimura 1971）。

4-3. ペア形成とプロトプラスト（配偶子）放出

次に+型と-型の配偶子嚢細胞がペアとなり接合突起を形成する（図3C）。この接合突起に向けて両細胞の細胞質が凝縮し、最終的に放出される。ミカヅキモでは、この細胞質（プロトプラスト, protoplast）は配偶子（gamete）と呼ばれ、それらが融合して接合子を形成する（図3D）。この接合子は乾燥などのストレスに耐性があり、環境が回復すると接合子から発芽嚢が放出される。この状態で減数分裂が起こり次世代の+型と-型の細胞がそれぞれ一個体ずつ形成される。このような接合過程は単一接合胞子型（single zygospore type）と呼ばれ、ヒメミカヅキモ（図3）やナガミカヅキモ（図2C）で観察される。一方、ジュズミカヅキモ（図2D）やオオミカヅキモ（図2E）などはペア形成と有性分裂の順番が異なる、双子接合胞子型（twin zygospore type）の接合を行う事が知られている（Ichimura 1978, 土金 2015）。

5. ヘテロタリズム系統の性フェロモン

5-1. 有性生殖の誘起と性フェロモン

ミカヅキモの+型、-型細胞は、窒素源を含む栄養培地（C培地）を用いて別々に培養され、系統株として維持されている。また、両者を窒素源を含まない接合誘導培地（MI培地）中で混合することで接合を誘起することが可能であり（Ichimura 1971），どちらか1つの接合型細胞を接合誘導培地で培養しても接合は誘起されない。このように、ミカヅキモの培養方法は市村（1979a, b）により確立された。この合成功地を用いた培養法と有性生殖の安定した誘導方法の存在が、ミカヅキモを実験材料として使う利点の1つである。実際に、この培養系を用いる事で、有性生殖における解析が可能となり、多くの研究が行われてきた（Hamada et al. 1982, Ichimura 1983, Ichimura and Kasai 1987, 1995, Kasai and Ichimura 1987, 1990, Kato et al. 1981, 1983, Watanabe and Ichimura 1982）。そして、多くの研究者が注目したのが、性認識機構である。ヒメミカヅキモの両接合型細胞を、寒天培地を用いて直接の接触を妨げた状態で共存させた場合、片方の接合型細胞から細胞質の放出が行われることが示唆され（Kato et al. 1981），ヒメミカヅキモにおける細胞間の相互認識には培地中を拡散する物質、すなわち性フェロモンが関わっていることが示唆された。拡散性の性フェロモンが存在するならば、ヒメミカヅキモの接合を誘起することで、培地中に放出されているはずである。

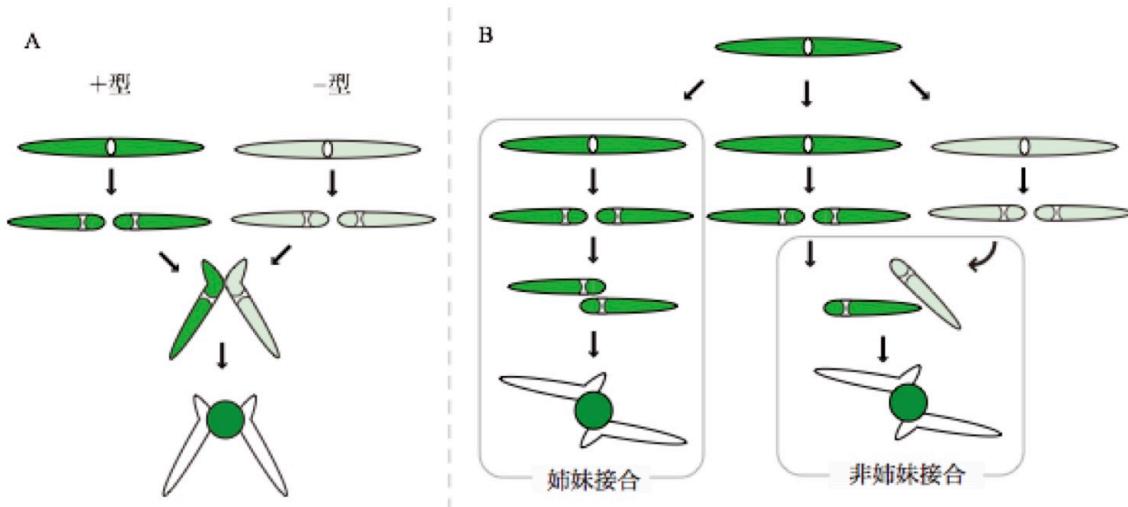


図4 ヒメミカヅキモの接合過程

A: ヘテロタリズム系統の接合過程。B: ホモタリズム系統における姉妹接合と非姉妹接合。姉妹接合は1細胞由来の姉妹配偶子嚢細胞同士が接合する。非姉妹接合は別個体由來の配偶子嚢細胞同士が接合する。土金 2013 より改変後転載。

5-2. 性フェロモン, PR-IP Inducer と PR-IP

Sekimoto ら (1990) は、ヒメミカヅキモの接合を誘起した後、細胞を除去することで性フェロモンが含まれているであろう培地を回収した。このような調製培地を-型細胞に添加すると、細胞は相手が存在するかのように細胞質を放出した。一方、+型細胞に添加しても細胞質の放出は観察されなかった。そして、この調製培地から-型細胞の細胞質を放出させる活性を指標にして、活性タンパク質が精製された。PR-IP（プロトプラスト放出誘導タンパク質；Protoplast-Release-Inducing Protein）である。この物質は 19 k と 42 k のサブユニットから構成される糖タンパク質であり、+型細胞から放出され、-型細胞に特異的に作用する (Sekimoto et al. 1990)。また、19 k サブユニットが-型細胞の表面に存在するであろう受容体と相互作用することがビオチン化 PR-IP を用いた実験から示されている (Sekimoto et al. 1993)。この PR-IP は細胞混合時に効率良く放出されることから、-型細胞の影響を受けていることが考えられた。そして、-型細胞のみを培養した調製培地から、PR-IP の放出を促進する性フェロモンである PR-IP Inducer が単離された (Nojiri et al. 1995)。この性フェロモンは 18.7 k の糖タンパク質であり、+型細胞のみに作用する。このように、ヒメミカヅキモにおいては性を特徴付け、有性生殖を制御する性フェロモンが単離同定され、有性生殖時の情報交換機構の解析が進められてきた。

5-3. 有性分裂誘導フェロモンと多糖性粘液放出誘導フェロモン

有性生殖の初期に起こる分裂は、単独の培養ではほとんど観察されず、+型細胞と-型細胞を混合する事で促進されることから、有性分裂と呼ばれ、両接合型の相互作用により誘導されることが示唆されていた (Ichimura 1971)。Tsuchikane ら (2003) は、この現象が性フェロモンにより制御されているのかを、調製培地を作成することにより検証した。有性分裂

は通常の細胞分裂と形態的に区別することができない。そのため、接合誘導培地、または前もって両接合型細胞を混合培養し、細胞を除去した調製培地で培養した場合の細胞分裂を比較した。接合誘導培地で培養した細胞では、10%程度の細胞が分裂を行ったが、調製培地を用いて培養した細胞では60%程度の細胞が分裂したため、増加した約50%の分裂を有性分裂と考えた。このようにして、+型細胞から放出され、-型細胞の有性分裂を誘導する活性(SCD-IP-minus, sexual cell division inducing pheromone - minus)と、-型細胞から放出され、+型細胞の有性分裂を誘導する活性(SCD-IP-plus)の2種類が、+型と-型細胞を混合した調製培地から検出された(Tsuchikane et al. 2003)。また、有性生殖の初期から多糖性粘液の放出が促進されるが、これもそれぞれの接合型細胞が特異的に放出する性フェロモン(MS-SP, mucilage secretion-stimulating pheromone)によることが明らかになっている(Akatsuka et al. 2003)。

5-4. 性フェロモンは複数の活性を持つ

これら有性分裂誘導フェロモンと、粘液放出誘導フェロモンの生理学的、生化学的特徴が、既に単離同定されていた性フェロモンと類似していたことから、性フェロモンの多機能性についての解析が行われた。PR-IP Inducerを酵母発現系により産生させ、その活性を調べたところ、PR-IP 放出誘導活性のみならず、有性分裂誘導活性をも保持していた(Tsuchikane et al. 2005)。また、精製したPR-IPでは、プロトプラスト(配偶子)放出誘導活性のみならず低濃度の添加で有性分裂誘導活性が観察され、さらに低濃度の添加で多糖性粘液放出誘導活性が観察された(Akatsuka et al 2006)。すなわち、ヒメミカヅキモの接合では、-型細胞から放出されるPR-IP Inducerと、それを受容した+型細胞が放出するPR-IPの二つの性フェロモンが、複数の活性を持つことで、有性生殖の各段階を制御するのである。

5-5. 別種のミカヅキモの性フェロモン

一方、双子接合胞子型のオオミカヅキモにおいても性フェロモンの解析が行われており、そのアミノ酸配列はヒメミカヅキモのPR-IP Inducerと類似していることから、性フェロモンによる有性生殖の制御はミカヅキモ属に広く共通する機構であると考えられる(Fukumoto et al 2003)。このようにミカヅキモでは有性生殖時における情報交換機構の解析が行われてきた。そして、これらの知見は、次に示すような種生物学的研究のブレイクスルーへとつながった。

6. ミカヅキモにおける生物学的種

6-1. 交配群

種分化の研究において、種の客観的認識と同定は必須である。ミカヅキモは形態形質が少ないこともあり、形態学的種概念の他に、生物学的種概念が導入され解析されてきた(Ichimura 1983, Coesel and Menken 1988, Ichimura and Kasai 1984)。Ichimura(1981)は一形態種であるオオミカヅキモについて、各地から採集した株を用いて接合実験を行う事で、生殖隔離の状況を明らかにした。常に接合子が形成される株同士を1つの交配群としてまとめ、それらと安定して接合子を形成しない別の株から区別した。交配群の異なる株では多く

の場合、生殖反応はおこらないものの、場合によっては接合子が形成される。しかし、そのほとんどは雑種崩壊などを起こし、安定した子孫は得られない。このように、ミカヅキモの形態種には、さらに生殖的に隔離した生物学的種（交配群）が含まれていることが明らかになっている。

6-2. シンゲン

原生生物であるゾウリムシ (*Paramecium aurelia* など) では、生物学的種の単位としてシンゲン (syngen) が用いられている (Sonneborn 1957)。同一のシンゲンに属する集団間では遺伝子交流が可能であるが、異なるシンゲンの間では遺伝子の交流が起こらない。ミカヅキモでは Ichimura (1981) により生物学的種に対して、シンゲンではなく、交配群という言葉が使用された。これは、交配群内における接合子が正常に発芽し、正常な子孫が得られるか不明であったためである。現在では、交配群も 1 つの生物学的種であり、シンゲンと同じ概念として扱われる。

6-3. ヒメミカヅキモの交配群

Denboh ら (2003) によりオオミカヅキモにおける 15 の交配群の系統関係が明らかにされたが、生殖隔離の原因について、生理学的、分子生物学的な解析は行われておらず、種の認識機構の詳細は不明であった。生理学的解析が進んでいるヒメミカヅキモにおいても、生殖的に隔離された 6 つの交配群, II-A, II-B, II-C, I-D, I-E, I-F の存在が報告されていた (Ichimura 1973, Watanabe 1977, Watanabe and Ichimura 1978)。国立環境研究所微生物系保存施設では、交配群 I-D を IA, I-E を IB と表記している。また、交配群 I-F とされた系統 (M-10-21) は現存しない。これまで性フェロモンの解析に主に用いられてきたのは交配群 I-E であり、これは他の交配群の細胞と接合を試みても有性生殖が観察されず、完全に生殖隔離している (図 5 B) (Watanabe 1977, Sekimoto et al. 1995, Tsuchikane et al. 2008)。また、生殖的な隔離が不完全に行われている交配群 (II-A, II-B) の間では有性生殖が観察され、若干の接合子が形成される (図 5 B) (Tsuchikane et al. 2008)。これら交配群 II-A と交配群 II-B は系統的に近い関係にあり、完全な隔離の観察される交配群 I-E との関係は遠く、生殖隔離の状況と分子系統関係に相関がみられる (図 5 A) (Tsuchikane et al. 2008)。筆者はこれらヒメミカヅキモの交配群を用い、種生物学的解析に有性生殖機構の知見を融合することで、次に示すような種分化研究を行ってきた。

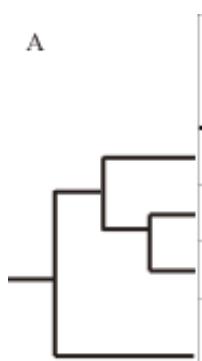
6-4. 性フェロモンによる生殖隔離

生物学的種概念に基づく種とは、生殖的に他の集団から隔離されている集団のことであり、種分化は、生殖隔離が進むことにより起こる。つまり、生殖隔離機構を解析することで、種分化機構が理解できる。筆者らは種分化機構を解析する上で、ヒメミカヅキモは極めて適した生物であると考えた。なぜなら、ヒメミカヅキモは雌雄のコミュニケーションを司る物質が単離同定されている数少ない生物の 1 つだからである。そして、交配群内では、2

つの性フェロモンが相互に作用し合いながら有性生殖が進行するが、交配群間での性フェロモンの認識が損なわれることで生殖隔離が起こるものと推定した。

解析を進めたところ、交配群 I-E の性フェロモン PR-IP は交配群 II-B に作用させても反応はなく (Sekimoto et al. 1995, Tsuchikane et al. 2008) , PR-IP Inducer も作用し合わない

(Tsuchikane et al. 2008)。実際、それぞれの交配群における PR-IP Inducer 遺伝子の単離を行い、配列を比較したところ、PR-IP Inducer が作用し合う交配群 II-A と交配群 II-B の間で高い相同性が得られたものの、それらと比較して交配群 I-E の相同性は低いものであった (Tsuchikane et al. 2008)。また、交配群 II-A の PR-IP が交配群 II-B に作用し難いことで非対称な生殖隔離が起きていることも示唆されている（未発表）。このように、交配群間の性フェロモンの認識が損なわれることが生殖隔離の原因の 1 つであり、同種と異種の個体識別は性フェロモンより行われることが示唆された。



A	B	交配群 II-A		交配群 II-B		ホモタリズム 系統 (kodama20)	交配群 I-E	
		-型	-型	-型	-型		+型	
	交配群 II-A	+型	Z	Z	n.a.	—	—	—
	交配群 II-B	+型	—	Z	z*	—	—	—
	ホモタリズム系統 (NIES-2666)		n.a.	—	Z**	n.a.	n.a.	n.a.
	交配群 I-E	+型	—	—	n.a.	Z	—	—
		-型	—	—	n.a.	—	—	Z

図 5 交配群間の系統関係と生殖隔離の状況

A) ホモタリズム系統とヘテロタリズム系統の系統関係。Tsuchikane et al. 2012 を参考に作成した。B) 生殖隔離の状況。Z, 接合子が観察される。z*, 若干のハイブリッド接合子が観察される。Z**, 姉妹接合子が観察される。-, 接合反応は観察されない。n.a., 未試験。土金 2013 より改変後転載。

以上のように、従来の種生物学的解析に遺伝子レベルでの解析が加わることで、交配前隔離の原因分子が特定された。今後もミカヅキモを用いた更なる解析により、種分化の実体に迫ることが可能であろう。加えて、そのためには性フェロモンの受容体の情報が不可欠である。ミカヅキモにおける有性生殖機構の解析が進めば、種生物学的解析にも大きな展開が訪れることが期待される。

7. ミカヅキモの生殖様式

7-1. ホモタリズム

ヒメミカヅキモの接合様式にはこれまで紹介してきたヘテロタリズム（図4A）の他に、自家和合でクローン細胞同士での接合が可能なホモタリズムが知られている。これまでにホシミドロ目におけるホモタリズムの解析例は少なく、ヘテロタリズム系統との系統関係、性フェロモンの存在やその機能に関して多くの点が謎であった。ヒメミカヅキモにおける生殖の実体を明らかにするうえでも、我々はホモタリズム系統 (kodama20; NIES-2666) をフィールドから新たに採集し、接合過程の解析を行った (Tsuchikane et al. 2010b)。

クローン細胞同士で接合するホモタリズムであるが、実は、1つの細胞が、細胞分裂した後、一細胞由来の姉妹配偶子嚢細胞同士が進んで接合することが明らかとなった（図6）(Tsuchikane et al. 2010b)。この自殖のような接合を姉妹接合と呼んでいる。また姉妹接合する際に別の配偶子嚢細胞が割り込み、そちらと接合する場合が10%程度あり、これを非姉妹接合として区別している（図4B）。

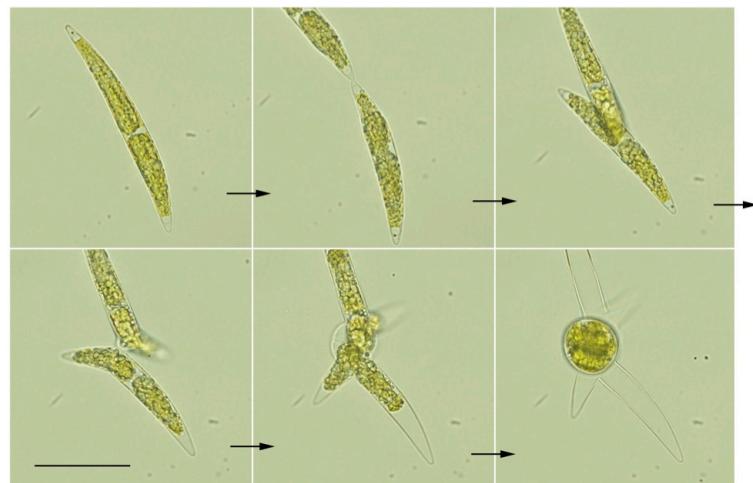


図6 ホモタリズム系統の姉妹接合

元は1つだった姉妹細胞同士が進んで接合する。
スケールバー=50 μm。土金2013より改変後転載。

7-2. ホモタリズム系統の性フェロモン

ホモタリズム系統では、細胞密度が高すぎても低すぎても接合せず、接合に最適な細胞密度が存在することが示された。このことから、細胞が自身の細胞密度を何らかの因子によって認識しているものと示唆され、細菌におけるクオラムセンシングと類似した機構が藻類に存在することが明らかとなった (Tsuchikane et al. 2010a)。Tsuchikaneら (2010a) は、この情報交換因子の同定を試みることで、ヘテロタリズム系統において性特異的に発現し、性認識に関わる性フェロモン PR-IP Inducer は、ホモタリズム系統においても細胞間相互作用に関わり接合を制御することが明らかとなった。また、ホモタリズム系統とヘテロタリズム系統の PR-IP Inducer の配列は極めて類似しており、生殖様式が異なっても作用しうるのかどうか、両者の生物学的関係が注目された。

7-3. ホモタリズム系統とヘテロタリズム系統の関係

ヒメミカヅキモにおけるホモタリズム系統とヘテロタリズム系統の関係について 18S rDNA のイントロン領域を用いた系統解析を行うことで、ヘテロタリズム系統である交配群 II-B と解析に使用していたホモタリズム系統 (NIES-2666) が極めて近縁である事が明らか

になった（図 5 A）（Tsuchikane et al 2010b, 2012）。このことから、両者を構成する遺伝子群に大きな差は存在しないものと考えられた。

7-4. ハイブリッド接合子の形成

ホモタリズム系統は主に姉妹接合を行うが、元は 1 つである細胞が、分裂後どのように特定の相手を認識するのだろうか。先行研究から、1) ホモタリズム系統は接合する直前に必ず細胞分裂を行うこと、2) ヘテロタリズム系統において性特異的に発現する PR-IP Inducer がホモタリズム系統の接合にも関与していること、3) 非常に近縁なホモタリズム系統とヘテロタリズム系統ではゲノム上の大きな差はなく、生殖様式は比較的少ない遺伝子変異により推移しうる可能性が示唆されている。筆者は、ホモタリズム系統では、細胞分裂を介してヘテロタリズムの + 型、- 型のような状態に分化することで、速やかに姉妹接合するものと考えた。この仮説が正しいなら、近縁なホモタリズム系統とヘテロタリズム系統を混合すれば、何らかの接合反応が観察されると考えた。しかし、ホモタリズムとヘテロタリズムの接合は過去に成功の報告はなく（Lippert 1967），いくつかの問題を解決しなくてはならなかつた。過去の実験では使用した株同士が近縁でなかつたために、ハイブリッド接合子が形成されなかつたものと考え、生物学的に近縁な系統を実験に用いることにした。前述の通り、ヘテロタリズム系統における交配群 II-A と交配群 II-B は部分的に接合する（Watanabe and Ichimura 1978）。分子系統学的にも近縁な両者であるが、今回の実験ではこの交配群 II-B に加えて、交配群 II-A よりも交配群 II-B に近縁であり、接合の可能性を考えられるホモタリズム系統（NIES-2666）を実験材料に選択した（図 5 A）。しかし、近縁な株を用いることで更なる問題が生じた。両者は形態的にも類似しており、混合すると区別がつかないのである。そのため生体染色の検討を行つた。そして接合子形成に影響の表れなかつたカルコフロールホワイトによる細胞壁染色を選択することにした。

この手法を用いて染色した + 型細胞と未染色のホモタリズム系統を用いて接合実験を試みたところ、染色された接合子の観察に成功した。+ 型細胞単独では接合反応を示さないため、これは + 型細胞とホモタリズム系統のハイブリッド接合子であると考えられた（Tsuchikane et al. 2012）。一方、- 型細胞とホモタリズム系統との混合では、まれにハイブリッド接合子が観察されたものの再現性が低く、再解析が必要であった。しかし現在では、別の系統のホモタリズム系統を使うことで少ないながらもどちらの接合型のヘテロタリズム系統とも安定してハイブリッド接合子が形成されることを確認している（未発表）。

以上のように、ホモタリズム系統とヘテロタリズム系統の間で接合子が形成されることが明らかになった。これにより、両者の接合機構、例えば性フェロモンによる情報交換機構は共通していることが示唆された。さらに、ホモタリズム系統にはヘテロタリズム系統のような「性」が生じていることが示唆される。これは「ホモタリズム系統において、一細胞由來の細胞が、ヘテロタリズム系統における + 型、- 型のような状態に分化することで有性生殖を行う」という仮説を支持する。今後も、細胞分裂による性分化の解析、さらには生殖様式の決定機構の解析が期待される。

7-5. 生殖様式の進化

ミカヅキモと同じくホシミドロ目に属するタテブエという藻類におけるホモタリズム系統の解析も行われ、同様の姉妹接合が観察された (Tsuchikane et al. 2011)。これにより、姉妹接合はミカヅキモに特異的な現象ではなく、ホシミドロ目に一般的な様式であることが考えられた。それぞれの系統にヘテロタリズムと姉妹接合を行うホモタリズムが存在することが明らかになっているが。これは、それぞれの系統で、独立にホモタリズム化、あるいはヘテロタリズム化が起きた事を示唆する。しかし、ホモからヘテロが現れたのか、ヘテロからホモが現れたのか、依然として不明である。

もしもホモタリズムの中からヘテロタリズムが突然変異として出現したのなら、この姉妹接合が性の原型であると考えられる。あるいは、ヘテロタリズムからホモタリズムが進化したのであれば、遺伝子の多様性という意味でみれば不利である自殖を行うこの姉妹接合が、別々の系統で独立に進化したことになる。この意義は非常に興味深い。この生殖様式の進化はそれぞれの分類群における系統解析により、明らかになっていくと思われる。

また、オオミカヅキモには、単為胞子を形成する株が存在する。別個体と接合することなく単為胞子を形成するため、実質的には無性生殖で、遺伝的多様性は極めて低いことが考えられる。この生殖様式においては、変動の激しい環境への適応進化の可能性も議論されている (Hendrayanti et al. 2004, Tsuchikane et al. 2014)。筆者はフィールドにてミカヅキモ採集を行っているが、水田から採れるヒメミカヅキモのほとんどがホモタリズムである。水田のように毎年水が枯れる変動の激しい環境では、有性生殖に相手が必要なヘテロタリズム系統よりも、ホモタリズム系統の様に自ら耐乾燥性の接合子を形成する自殖のほうが有利なのかも知れない (土金 2016)。今後、さらなる採集を積み重ねることで、それぞれの接合様式が好んで生息する環境の解明が期待される。

8. 分子生物学的基盤

ホシミドロ目の藻類は、前述した系統関係から、植物の進化を解析する上で注目されている。ホシミドロ目では、タテブエ (*Penium margaritaceum*) においてアグロバクテリウムを用いた遺伝子導入法が確立されている (Sørensen et al. 2013)。一方、ヒメミカヅキモにおいては、パーティクルガン法を用いることで、安定した遺伝子導入が可能であり (Abe et al. 2011)、遺伝子の抑制法も確立されている (Hirano et al. 2015, Abe et al. 2016)。RNA-seq, 概要ゲノム解析も行われており (未発表)，分子生物学的基盤が整っている。

9. おわりに

シャジクモ藻綱に含まれる藻類は、植物の分子進化を考える上で重要な分類群であるにもかかわらず、この分類群に注目した研究例は未だ少なく、今後の解析が期待される。そして、ミカヅキモは有性生殖時の情報交換機構の解析が行われており、分子生物学的な基盤も整っている。そのため、性の進化を解析するうえでも、中心となる重要な生物であると考えている。

別系統の藻類であるボルボックス目では性分化に関するゲノムレベルでの解析が進んでいるが、シャジクモ藻綱の藻類では多くが不明のままである。ボルボックス目の雌雄認識機構や性決定機構はミカヅキモと共通しているのか？それとも性は独立に進化しているのか？ど

のように進化したのか？今後ミカヅキモを用いた解析により、これらの疑問が解消されるものと期待される。この様にミカヅキモは陸上植物と藻類のミッシングリンクを埋める可能性を秘めた研究材料と言えるだろう。

10. 謝辞

本稿で紹介した著者らの研究は、研究活動に関わるすべての皆様のご協力により遂行されました。研究の推進にあたり、藤伊正教授（元東洋大学）、関本弘之教授（日本女子大学）、伊藤元己教授（東京大学）、野崎久義准教授（東京大学）、阿部淳博士（中央大学）、加藤将博士（日本国際湿地保全連合）より有益なご助言を頂きました。図2の写真は立川真侑子、平田優香、福島早貴が共同で撮影しました。日本女子大学において大滝知子、神田奈保、佐藤真知子、国分夢、土屋美紀、中井彩香氏を始め共に研究を行った皆様。この紙面を借りてこれらすべての皆様に心から感謝の意を表します。

11. 引用文献

- Abe, J., Hirano, N., Komiya, A., Kanda, N., Fujiwara, A., Hori, S., Tsuchikane, Y. & Sekimoto, H. 2016. Preparation of knockdown transformants of unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Bio-protocol* 6: e1813.
- Abe, J., Hori, S., Tsuchikane, Y., Kitao, N., Kato, M. & Sekimoto, H. 2011. Stable nuclear transformation of the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Plant Cell Physiol.* 52: 1676-1685.
- Akatsuka, S., Tsuchikane, Y., Fukumoto, R., Fujii, T., & Sekimoto, H. 2006. Physiological characterization of the sex pheromone protoplast-release-inducing protein from the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (charophyta). *Phycol. Res.* 54: 116-121.
- Akatsuka, S., Sekimoto, H., Iwai, H., Fukumoto, R.H. & Fujii, T. 2003. Mucilage secretion regulated by sex pheromones in *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Plant Cell Physiol.* 44: 1081-1087.
- Coesel, P. & Menken, S. 1988. Biosystematic studies on the *Closterium moniliferum/ehrenbergii* complex (chlorophyta, conjugatophyceae) in western europe. I. Isozyme patterns. *Eur. J. Phycol.* 23: 193-198.
- Delwiche, C.F. & Cooper, E.D. 2015. The evolutionary origin of a terrestrial flora. *Curr. Biol.* 25: R899-910.
- Denboh, T., Ichimura, T., Hendrayanti, D. & Coleman, A.W. 2003. *Closterium moniliferum-ehrenbergii* (charophyceae, chlorophyta) species complex viewed from the 1506 group i intron and its2 of nuclear rDNA. *J. Phycol.* 39: 960-977.
- Domozych, C.R., Plante, K. & Blais, P. 1993. Mucilage processing and secretion in the green alga *Closterium*. 1. Cytology and biochemistry. *J. Phycol.* 29: 650-659.
- Fukumoto, R., Fujii, T. & Sekimoto, H. 2003. Cloning and characterization of a cDNA encoding a sexual cell division-inducing pheromone from a unicellular green alga *Closterium ehrenbergii* (chlorophyta). *J. Phycol.* 39: 931-936.
- Hamada, J., Yoshizawa-Katoh, T. & Tsunewaki, K. 1982. Genetic study on mating type genes by a new type of tetrad analysis in *Closterium ehrenbergii*. *Bot. Mag. Tokyo* 95: 101-108.
- Hendrayanti, D., Denboh, T., Ichimura, T. & Motomura, T. 2004. Molecular evidence of parallel origins of two different parthenosporic lineages directly from heterothallic lineages in the

- Closterium moniliferum-ehrenbergii* (charophyceae, chlorophyta) species complex. *Phycologia* 43: 727-736.
- Hirano, N., Marukawa, Y., Abe, J., Hashiba, S., Ichikawa, M., Tanabe, Y., Ito, M., Nishii, I., Tsuchikane, Y. & Sekimoto, H. 2015. A receptor-like kinase, related to cell wall sensor of higher plants, is required for sexual reproduction in the unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Plant Cell Physiol.* 56: 1456-1462.
- Ichimura, T. 1971 Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum*. In Nishizawa, K. [ed.], Proceedings of the 7th international seaweed symposium, 208-214. University of Tokyo Press, Tokyo.
- Ichimura, T. 1973 The life cycle and its control in some species of *Closterium*, with special reference to the biological species problem. University of Tokyo.
- Ichimura, T. 1981. Mating types and reproductive isolation in *Closterium-ehrenbergii meneghini*. *Bot. Mag. Tokyo* 94: 325-334.
- Ichimura, T. 1983. Hybrid inviability and predominant survival of mating type minus progeny in laboratory crosses between two closely related mating groups of *Closterium-ehrenbergii*. *Evolution* 37: 252-260.
- 市村輝宜 1979a 有性生殖の誘起と交配実験法. 西澤一俊, 千原光雄 (編) 藻類研究法. pp. 195-209. 共立出版. 東京.
- 市村輝宜 1979b 代表的な淡水産微細藻類の培養例. 西澤一俊, 千原光雄 (編) 藻類研究法, pp. 209-223. 共立出版. 東京.
- Ichimura, T. & Kasa, F. 1984. Post-zygotic isolation between allopatric mating groups of *Closterium ehrenbergii meneghini* (conjugatophyceae). *Phycologia* 23: 77-85.
- Ichimura, T. & Kasai, F. 1987. Time-lapse analyses of sexual isolation between two closely related mating groups of the *Closterium ehrenbergii* species complex (chlorophyta). *J. Phycol.* 23: 523-534.
- Ichimura, T. & Kasai, F. 1995. Dissection of conjugants and mating type plus and minus cells in selfing clones of the isogamous green alga *Closterium ehrenbergii*. *Sex. Plant. Reprod.* 8: 44-48.
- Ichimura, T. & Watanabe, M.M. 1976. Biosystematic studies of *Closterium-peracerosum-strigosum-littorale* complex 1. Morphological variation among inbreeding populations and an experimental demonstration for source of cell-size variation. *Bot. Mag. Tokyo* 89: 123-140.
- 伊藤市郎 1965. 興味深い淡水藻チリモ類. 採集と飼育 27: 124-133.
- Kasai, F. & Ichimura, T. 1987. Stable diploids from intragroup zygospores of *Closterium ehrenbergii menegh* (conjugatophyceae). *J. Phycol.* 23: 344-351.
- Kasai, F. & Ichimura, T. 1990. A sex determining mechanism in the *Closterium ehrenbergii* (chlorophyta) species complex. *J. Phycol.* 26: 195-201.
- Kato, A., Obokata, J. & Sasaki, K. 1981. Mating type interaction in *Closterium peracerosum-strigosum-littorale*: Mating induced protoplast release. *Plant Cell Physiol.* 22: 1215-1222.
- Kato, A., Takagi, T. & Sasaki, K. 1983. Light conditions for sexual reproduction in heterothallic strains of *Closterium*. *Plant Cell Physiol.* 24: 93-100.
- Lippert, B.E. 1967. Sexual reproduction in *Closterium moniliferum* and *Closterium ehrenbergii*. *J. Phycol.* 3: 182-198.
- McCourt, R.M., Delwiche, C.F. & Karol, K.G. 2004. Charophyte algae and land plant origins. *Trends Ecol. Evol.* 19: 661-666.

- Nojiri, T., Fujii, T. & Sekimoto, H. 1995. Purification and characterization of a novel sex pheromone that induces the release of another sex pheromone during sexual reproduction of the heterothallic *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Plant Cell Physiol.* 36: 79-84.
- Ralfs, J. 1848. The british desmidieae. London : Reeve, Benham, and Reeve.
- Sekimoto, H., Abe, J. & Tsuchikane, Y. 2012. New insights into the regulation of sexual reproduction in *Closterium*. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 297: 309-338.
- Sekimoto, H., Satoh, S. & Fujii, T. 1990. Biochemical and physiological properties of a protein inducing protoplast release during conjugation in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Planta* 182: 348-354.
- Sekimoto, H., Satoh, S. & Fujii, T. 1993. Analysis of binding of biotinylated protoplast-release-inducing protein that induces release of gametic protoplasts in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Planta* 189: 468-474.
- Sekimoto, H., Sone, Y. & Fujii, T. 1995. Biochemical, physiological, and molecular analysis of sexual isolation in the species complex *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* (chlorophyta). *J. Phycol.* 31: 611-615.
- Sonneborn, T.M. 1957 Breeding systems, reproductive methods, and species problems in protozoa. In Mayr, E. [ed.], The species problem, 125-324. American Association for the Advancement of Science, Washington, DC.
- Sørensen, I., Fei, Z., Andreas, A., Willats, W.G.T., Domozych, D.S. & Rose, J.K.C. 2013. Stable transformation and reverse genetic analysis of *penium margaritaceum*: A platform for studies of charophyte green algae, the immediate ancestors of land plants. *Plant J.* 77: 339-351.
- 土金勇樹 2013. 藻類における生殖様式の多様性と進化. *Bunrui* 13:77-84.
- 土金勇樹 2015. ミカヅキモ属における接合様式の多様性. *Japan J. Phycol.* 63:98-102.
- 土金勇樹 2016. ミカヅキモの性. iBooks, Apple, USA. <https://itunes.apple.com/jp/book/%E3%80%80%E3%80%80id1183243875?mt=11>
- Tsuchikane, Y., Fujii, T., Ito, M. & Sekimoto, H. 2005. A sex pheromone, protoplast release-inducing protein (PR-IP) Inducer, induces sexual cell division and production of PR-IP in *Closterium*. *Plant Cell Physiol.* 46: 1472-1476.
- Tsuchikane, Y., Fukumoto, R., Akatsuka, S., Fujii, T. & Sekimoto, H. 2003. Sex pheromones that induce sexual cell division in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (charophyta). *J. Phycol.* 39: 303-309.
- Tsuchikane, Y., Ito, M. & Sekimoto, H. 2008. Reproductive isolation by sex pheromones in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (zygnematales, charophyceae). *J. Phycol.* 44: 1197-1203.
- Tsuchikane, Y., Kokubun, Y. & Sekimoto, H. 2010a. Characterization and molecular cloning of conjugation-regulating sex pheromones in homothallic *Closterium*. *Plant Cell Physiol.* 51: 1515-1523.
- Tsuchikane, Y., Nakai, A. & Sekimoto, H. 2014. Detailed analyses on the parthenospore formation in *Closterium moniliferum* (zygnematophyceae, charophyta). *Phycologia* 53: 571-578.
- Tsuchikane, Y., Sato, M., Ootaki, T., Kokubun, Y., Nozaki, H., Ito, M. & Sekimoto, H. 2010b. Sexual processes and phylogenetic relationships of homothallic strain of the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (zygnematales, charophyceae) . *J. Phycol.* 46: 274-284.

- 土金勇樹 関本弘之 2012. ミカヅキモの生殖について. 海洋と生物 34:426-434.
- Tsuchikane, Y., Tsuchiya, M., Hindak, F., Nozaki, H. & Sekimoto, H. 2012. Zygospore formation between homothallic and heterothallic strains of *Closterium*. *Sex. Plant. Reprod.* 25: 1-9.
- Tsuchikane, Y., Tsuchiya, M., Kokubun, Y., Abe, J. & Sekimoto, H. 2011. Conjugation processes of *penium margaritaceum* (zygnemophyceae, charophyta). *Phycol. Res.* 59: 74-82.
- Watanabe, M.M. 1977 Biosystematics in *Closterium* of sexual unicellular green algae and *calothrix* and *spirulina* of asexual filamentous blue-green algae, with special reference to the analyses of natural populations. Hokkaido University.
- Watanabe, M.M. & Ichimura, T. 1978. Biosystematic studies of *Closterium-peracerosum-strigosum-littorale* complex ii. Reproductive isolation and morphological variation among several populations from northern kanto area in japan. *Bot. Mag. Tokyo* 91: 1-10.
- Watanabe, M.M. & Ichimura, T. 1982. Biosystematic studies of the *Closterium-peracerosum-strigosum-littorale* complex iv. Hybrid breakdown between two closely related groups, group ii-a and group ii-b. *Bot. Mag. Tokyo* 95: 241-247.
- West, W., West, G. S., & Carter, N. A monograph of the British Desmidiaceae I-V. Ray Society, London. 1904-1923.
- Wickett, N.J., Mirarab, S., Nguyen, N., Warnow, T., Carpenter, E., Matasci, N., Ayyampalayam, S., Barker, M.S., Burleigh, J.G., Gitzendanner, M.A., Ruhfel, B.R., Wafula, E., Der, J.P., Graham, S.W., Mathews, S., Melkonian, M., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Miles, N.W., Rothfels, C.J., Pokorny, L., Shaw, A.J., DeGironimo, L., Stevenson, D.W., Surek, B., Villarreal, J.C., Roure, B., Philippe, H., dePamphilis, C.W., Chen, T., Deyholos, M.K., Baucom, R.S., Kutchan, T.M., Augustin, M.M., Wang, J., Zhang, Y., Tian, Z., Yan, Z., Wu, X., Sun, X., Wong, G.K.-S. & Leebens-Mack, J. 2014. Phylogenomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *PNAS*. 111: E4859-E4868.