ヌクレオモルフの reductive genome evolution

谷藤 吾朗

Reductive genome evolution in nucleomorphs

Goro TANIFUJI

Canadian Institute for Advanced Research, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, B3H 4R2, Canada

Key words: Endosymbiosis, Cryptomonads, Chlorarachniophytes, Plastid

はじめに

細胞内共生は2つ以上の独立した生物の一方(共 生者)が、もう一方(宿主)の細胞に取り込まれ一 体となって生活する生物現象であり、時に新たな機 能を獲得した生物を誕生させる.全ての真核生物は 細胞内共生に由来するミトコンドリア(あるいはそ れに由来するオルガネラ)を持ち,また光合成真核 生物のもつプラスチド(葉緑体)も細胞内共生を通 して成立したことから,細胞内共生は進化の大きな 原動力の一つであると据えることが出来る (Gray et al., 1999; Dolezal et al., 2006; Reyes-Prieto et al., 2007; Gould et al., 2008). 2つの生物が1つの生物として成 立するためには、様々な遺伝的統合が必要であると 考えられるが、その結果の一つとして、共生者側の ゲノムの大規模な減少(本稿では reductive genome evolution と呼ぶ) が挙げられる (Martin and Herrmann, 1998; Martin et al., 2002; Keeling et al., 2005; Nakabachi et al., 2006; Archibald and Lane, 2009; McCutcheon et al.,

Tel: +1-902-494-6193/Fax: +1-902-494-1355 E-mail: gorot@dal.ca Received: 26 April 2011; Accepted: 22 July 2011. 2009; Moran et al., 2009). これは共生者ゲノムから宿 主ゲノムへの遺伝子移動(endosymbiotic gene transfer: EGT)と、オルガネラ化によって必要なくなった共生 者側の遺伝子の欠失が主な理由と考えられている (Martin and Herrmann, 1998; Martin et al., 2002; Martin, 2003) (図 1a). また, 核にコードされた共生者由来 のタンパク質は共生者細胞区画で働くと考えられて いるが (van Dooren et al., 2001; Bock and Timmis, 2008), 近年では核にコードされる多くの plastid-targeting 遺 伝子群の起源が、プラスチドの起源そのものと異なる 事例が報告されており(Archibald et al., 2003; Moustafa et al., 2009; Wisecaver and Hackett, 2010, 2011), 細胞内 共生に際した遺伝的統合がどのように行われてきた のか未だ理解は不十分である. このような reductive genome evolution は、光合成機能の獲得に代表される ような細胞内共生に限って見られる現象ではなく,2 種の生物がある一定以上の特殊性を持った関係に発 展した場合しばしば見られる. 例えば昆虫の腸内共生 細菌であるブフネラでは自由生活性の近縁種に比べ て著しいゲノム減少が起こっているし(Moran et al., 2008; McCutcheon et al., 2009), また寄生関係において も,哺乳類に対し重篤な影響をもたらす真菌類 mycoplasma や微胞子虫などでも非常に小さなゲノム



図1 クリプト藻類とクロララクニオン藻類. (a) 細胞内共生におけるゲノム再編の様子を表す模式図. 細胞のモデル はクリプト藻類. (b) クリプト藻類, *Cryptomonas* sp. の光学顕微鏡像. スケールバー=10 μ m. (c) クロララクニオン 藻類, *Amorphochlora amoebiformis* の光学顕微鏡像 (大田修平博士提供). スケールバー=10 μ m. (d) クリプト藻類, *Guillardia thea* の電子顕微鏡像 (Eunsoo Kim 博士提供). EGT: endosymbiotic gene transfer, Nu: 核, Nm: ヌクレオモル フ, Pl: プラスチド, PPC: ペリプラスチダルコンパートメント (periplastidal compartment).

を持っていることが知られている (Katinka et al., 2001; Keeling and Fast, 2002; Sasaki et al., 2002; Keeling et al., 2005). 細胞内共生だけでなく寄生関係の成立も生物 界全体で独立に何度も起こっていることから, reductive genome evolution に関する研究は, 生物学的 興味はもちろん, 社会的にも大きく貢献することが期 待される.

本稿では reductive genome evolution について, ヌク レオモルフに焦点を当てて紹介したい. ヌクレオモル フは二次共生者の痕跡的核であり,これまでにクリプ ト藻類とクロララクニオン藻類でのみ見つかってい る (Archibald, 2007; Cavalier-Smith, 2002; Moore and Archibald, 2009) (図 1b-d). クリプト藻類は二本鞭毛 を持った単細胞性藻類で、淡水・汽水・海水域に広く 生息しており、海や池の水を観察するとたいてい見つ けることができる (図 1b). クロララクニオン藻類は, アメーバ状, 球状, あるいは一本鞭毛を持った単細胞 性藻類で,現在,海産種のみが知られている(図 lc). クロララクニオン藻類は、ケルコゾア(アメーバ鞭毛 虫)と呼ばれる原生生物のグループに属している.他 の二次共生生物では共生者核を完全に消失している にもかかわらず, ヌクレオモルフには共生者由来のゲ ノムが未だに保持されており、両系統群は核、ヌクレ オモルフ, 葉緑体, ミトコンドリアの4つのゲノムを 一つの細胞の中に有している. プラスチドやミトコン

ドリアと同様に、ヌクレオモルフにも大規模な reductive genome evolution が起こっていることが知ら れており、ヌクレオモルフの多様性を理解することは 2 つの生物が遺伝的に統合する上でどのような出来 事があったのか、特に真核一真核生物の細胞内共生に おいて共生者ゲノムがどのように減少したのかとい う問題に対し、重要な知見をもたらすことが予想され る.

ヌクレオモルフはその進化学上の特異性から、ゲノ ムに焦点を当てた研究が藻類学の中では比較的蓄積 しており、これまでにクリプト藻類で3種、クロララ クニオン藻類1種でヌクレオモルフゲノムの完全解 読が報告されている.近年、著者らによって、ヌクレ オモルフを有しているのにも関わらず光合成能力を 持たない Cryptomonas paramecium のヌクレオモルフ ゲノムとプラスチドゲノムの完全解読が行われ、 reductive genome evolution に関する知見として一定の 成果を上げた.本稿では特にヌクレオモルフの比較ゲ ノム学に焦点を当てながら、reductive genome evolution がどのように起こったのか、最新の知見をあわせて紹 介したい.

細胞内共生とヌクレオモルフ

細胞内共生説が多くの研究者に受け入れられるの

に、ヌクレオモルフは重要な役目を果たしたと言って よいだろう. Lin Margulis によって細胞内共生説が提 唱されたのは1970年のことである.70年代には電子 顕微鏡法の技術により様々な生物の微細構造が精力 的に研究され、光合成真核生物ではプラスチドが 2 重膜に囲まれたグループ(緑藻類,紅藻類,灰色藻類) と3重,4重で囲まれたグループ(ユーグレナ藻類, 渦鞭毛藻類, クリプト藻類, 他の Chromophyte (現在) のクロミスタの多くを含む藻類))が認識されていた (e.g. Gibbs, 1978; Whatley and Whatley, 1981). さらに, クロロフィルや他の光合成色素等の生化学的研究の 成果など,細胞内共生説を支持する証拠が集められて いった(e.g. Gray and Doolittle, 1982). 現在では2重 膜を持つグループは光合成原核生物が無色真核生物 に取り込まれ起こった一次共生生物,3,4重膜を持つ グループがそれによって生じた一次共生生物がさら に他の真核生物に取り込まれた二次(多次) 共生生物 であることがほぼ受け入れられている (e.g. Reyes-Prieto et al., 2007; Gould et al., 2008) . ヌクレオモルフ が初めてクリプト藻から発見されたのは、細胞内共生 説が完全に受け入れられる前の 1974 年だった

(Greenwood, 1974). このオルガネラは核と同じよう に 2 重の膜に囲まれ,また核小体のような構造を有 していたために nucleo (核) -morph (の様な形)とし て名付けられた.注目すべき点は,ヌクレオモルフが プラスチドの 2 枚目と 3 枚目の膜の間,すなわち二 次共生者由来の細胞質区画 (periplastidal compartment : PPC) と一致する位置に存在していたことであった (図 la, d). さらに Ludwig and Gibbs (1985) により ヌクレオモルフには DNA が含まれていることが示 され,ヌクレオモルフは二次共生者の痕跡的核である と示された.

1984 年にはクロララクニオン藻類からもヌクレオ モルフが発見され (Hibberd and Norris, 1984), さらに ヌクレオモルフとプラスチドのゲノムにコードされ る遺伝子による系統解析から、クリプト藻類は紅藻 類, クロララクニオン藻類は緑藻類を共生者の起源と することが明らかにされた (Douglas et al., 1990; McFadden et al., 1995; Cavalier-Smith et al., 1996; Ishida et al., 1997; Douglas and Penny, 1999; Ishida et al., 1999). また,近年では真核生物は少なくとも 6 つのスー パーグループに分けられることが示されているが,ク リプト藻類の宿主はクロムアルベオラータ,クロララ クニオン藻類の宿主はリザリアに属している(Burki et al., 2009; Hampl et al., 2009). すなわち, 両系統群は 宿主も共生者も全く異なる系統の生物を起源として おり,細胞内共生が独立した系統で複数回起こったこ とを強力に証明する生物である.他の二次共生生物は 二次共生者核を完全に消失しているため、 クリプト藻

類とクロララクニオン藻類は reductive genome evolution の中間的な形質を未だ残している生物群と 想定された.

ゲノム構造からみるヌクレオモルフの収斂進化

ヌクレオモルフの核型はパルスフィールド電気泳 動法によるヌクレオモルフゲノムの分離と、リボソー マル DNA などをプローブとしたサザンハイブリダイ ゼーション法により比較的良く研究されてきた. クリ プト藻類では約 50種、クロララクニオン藻類では約 20種のヌクレオモルフの核型解析が行われており, 既に調べられた株では 100-400 kbp 程度の直鎖状染色 体を常に 3 本含んでいる (Eschbach et al., 1991; Rensing et al., 1994; Lane et al., 2006; Lane and Archibald, 2006; Silver et al., 2007; Phipps et al., 2008; Tanifuji et al., 2010; Ishida et al., 2011a). また, クリプト藻類とクロ ララクニオン藻類のヌクレオモルフゲノムは, 染色体 ごとに向きや構成の違いはあるものの, 染色体末端の テロメア配列の内側 (sub-telomeric region) にリボソー マル DNA を持つという特徴を共有している(Lane and Archibald, 2006; Lane and Archibald, 2008; Silver et al., 2010). 全く系統が異なるにも関わらず, 3本の染 色体と sub-telomeric リボソーマル DNA という特徴 を共有することは、両者の reductive genome evolution の過程で共通の選択圧が働いたことによる収斂進化 の結果と示唆される. Cavalier-Smith は, このような染 色体の構造は物理的に退化したヌクレオモルフの構 造にあわせて進化した結果ではないかと指摘してい る (Cavalier-Smith, 2002). また, 微胞子虫に属する寄 生虫 Encephalitozoon cuniculi はわずか 2.9 Mbp のゲノ ムサイズを持つ真核生物であるが, ヌクレオモルフと 同様に sub-telomeric リボソーマル DNA オペロンを 染色体上に持っているため, reductive genome evolution と染色体末端のリボソーマル DNA は何らかの関係 があるのではないかと推察される(Katinka et al., 2001). しかしながら, reductive genome evolution とこ れらのゲノム構造との関係に関しての研究は今のと ころない.

ヌクレオモルフゲノムサイズはこれまでに知られ ている真核型ゲノムとしては最も小さく,クリプト藻 類では 0.45-0.87 Mbp,クロララクニオン藻類では 0.33-1 Mbpとゲノムサイズも比較的似ている(Silver et al., 2007; Tanifuji et al., 2010; Ishida et al., 2011a).自由 生活性の真核生物は比較的ゲノムサイズが小さいも のでも紅藻類 Cyanidiales で 10-16 Mbp (Moreira et al., 1994; Muravenko et al., 2001; Matsuzaki et al., 2004),緑 藻類 *Micromonas* では約 20 Mbp (Worden et al., 2009), *Ostreococcus* では 12.6 Mbp であるので (Derelle et al., 2006), ヌクレオモルフは起源種に近縁な生物に比べ て、少なくとも10%以下までゲノムサイズが縮小して いるといえる. 図2にクリプト藻類とクロララクニオ ン藻類のヌクレオモルフゲノムサイズと系統関係を 示した.図で示されたように、両者のヌクレオモルフ ゲノムサイズはそれぞれの主要クレードの中である 程度多様性があるが,例えばクリプト藻類の Rhodomons $\mathcal{D} \lor - ert \mathcal{D}$ 650-845 kbp, Hemiselmis + Chroomonas クレードの 560-815 kbp のように、クレー ド間のヌクレオモルフゲノムサイズがオーバーラッ プしている.このことは、少なくともそれぞれのクリ プト藻類がそれぞれの系統に分岐した後にもヌクレ オモルフのゲノムサイズが変化したということを示 唆している. さらに, Cryptomonas 属では 18S rDNA 配 列の比較では遺伝的距離が非常に近いのにも関わら ず,最大で 40% ものヌクレオモルフゲノムサイズの 差が観察されていることから、ヌクレオモルフのゲノ ムサイズの変化(おそらくゲノム縮小)がごく最近で も起こっている可能性が示唆されている(Tanifuji et al., 2010) .

これまでにクリプト藻類では Guillardia theta (Douglas et al., 2001), Hemiselmis andersenii (Lane et al., 2007), Cryptomonas paramecium (Tanifuji et al., 2011)の3種, クロララクニオン藻類では Bigelowiella natans (Gilson et al., 2006),計4種のヌク レオモルフゲノムが完全解読されている. それぞれ のヌクレオモルフゲノムの概要を表1に示した.ヌ クレオモルフゲノムの G+C 含有量は 25-35% 程度 であり,非常に AT-rich なゲノムである. この特徴 はプラスチドやミトコンドリア,昆虫の腸内細菌な ど多くの reductive genome にも見られる特徴である (Moran, 1996; Nakabachi et al., 2006; Smith, 2009).

遺伝子間領域は平均で 95-130 bp 程度,遺伝子密度 は 0.93-1.10 kbp/gene と,ゲノムに対し遺伝子が密に 詰め込まれたような,非常にコンパクトなゲノム構 造である. Lane et al. (2007) は *H. andersenii と G. theta* のヌクレオモルフゲノムの比較から,ヌクレオ モルフにコードされるタンパク質の平均長,遺伝子 間領域が,自由生活性の紅藻類などのゲノムに比べ て有意に短く,また,よりヌクレオモルフゲノムサ イズの大きい *H. andersenii* に含まれるタンパク質の 平均長,遺伝子間領域の長さが *G. theta* に比べて長 いことを示した.このことは,reductive genome evolution の過程で,単純な遺伝子欠失,EGT 以外に も遺伝子間領域,タンパク質のそれほど重要でない 領域が高度にそぎ落とされたような構造になったこ とを示唆する.

ー方で、クリプト藻類とクロララクニオン藻類の ヌクレオモルフゲノムの構造的な大きな違いとして



図 2 クリプト藻類とクロララクニオン藻類のヌクレオ モルフゲノムサイズと系統関係の比較. Moore and Archibald (2009) に Ota et al. (2007), Ishida et al. (2011a, b), Tanifuji et al. (2010) を加え改変.

あげられるのは、第一にイントロンの数、第二にテ ロメア配列の多様性である. クリプト藻類のヌクレ オモルフでは, G. theta で 17 個, C. paramecium で 2 個, H. andersenii ではイントロンが全く見つかって おらず、また、それを反映するようにクリプト藻類 のヌクレオモルフゲノムにはスプライシングに関わ る遺伝子がわずか(15 個程度)しかない(Douglas et al., 2001; Lane et al., 2007; Tanifuji et al., 2011) . とこ ろがクロララクニオン藻類 B. natans では 18-21 bp の短いイントロンが 852 個も存在しており、また、 スプライシング関連遺伝子は 41 個コードされてい た (Gilson et al., 2006) . このコードされるイントロ ンの数が,異なった進化の過程の結果を示すのか, それともそれぞれの祖先種から引き継いだ特徴なの かは今のところ分かっていない. しかしながら, B. natans の 18-21 bp というイントロンの長さは一般の 自由生活性生物のイントロンと比べ短く, reductive genome evolution の結果, イントロンが短くなったの かもしれない. また, クロララクニオン藻類では種 ごとのヌクレオモルフテロメア配列が保存されてい るのに、 クリプト藻類では種ごとにテロメア配列が 異なるという違いも観察される(Douglas et al., 2001; Gilson et al., 2006; Lane et al., 2007; Silver et al.; 2007; Silver et al., 2010: Ishida et al., 2011a: Tanifuii et al., 2011). ヌクレオモルフやプラスチドにコードされ る遺伝子を用いた系統解析から、クリプト藻類、ク ロララクニオン藻類の二次共生はそれぞれの系統で

種名	Guillardia theta	Hemiselmis andersenii	Cryptomonas paramecium	Bigelowiella natans
ゲノムサイズ (kbp)	合計 550.5 染色体1 195.9 染色体2 180.6 染色体3 173.9	合計 571.4 染色体1 207.3 染色体2 184.6 染色体3 179.4	合計 485.9 染色体1 177.0 染色体2 159.7 染色体3 149 1	合計 372.9 染色体1 140.6 染色体2 134.1 染色体3 98.1
G + C 含有量(%)	26.43	25.18	26.05	<35
遺伝子数 (タンパク質遺伝子/合計)	487/548	472/525	466/519	293/340
タンパク遺伝子のアミノ酸平均長	311.66	338.41	289.39	321.90
遺伝子間領域平均長(bp)	94.89	132.14	103.49	113
遺伝子密度(kbp/gene)	1.00	1.09	0.93	1.10
重複遺伝子数	44	11	33	numerous
イントロン数	17	0	2	852
葉緑体関連遺伝子数	30	31	18	17
テロメア配列	(AG) ₇ AAG ₆ A	GA ₁₇	GA ₉	TCTAGGG

表1 ヌクレオモルフゲノムの概要

データは Douglas et al. (2001), Gilson et al. (2006), Lane et al. (2007) and Tanifuji et al. (2011) より引用. 公表後の解析により 数値は引用元と異なる場合がある.

ー回であると考えられるので,祖先種はそれぞれ 1 種類のテロメア配列を持っていたはずである (McFadden et al., 1995; Ishida et al., 1997; Douglas and Penny 1999; Ishida et al., 1999; Khan et al., 2007; Rogers et al., 2007; Donaher et al., 2009). よって, クリプト 藻類のヌクレオモルフがそれぞれ異なるテロメア配 列を持つようになったのは細胞内共生の後であり, 進化の過程で異なるテロメア配列を獲得したものと 思われる.動物や植物など比較的広い系統でもある 程度テロメア配列は保存されているので (Podlevsky et al., 2008), 種によってテロメア配列が異なるのは クリプト藻類のヌクレオモルフ独自の特色かもしれ ない.

ヌクレオモルフとプラスチド関連遺伝子

ヌクレオモルフのゲノム解読が完了する以前,多 くの研究者はヌクレオモルフ機能がプラスチド及び 光合成機能に大きく関わっているのではないかと考 えていたようである. なぜなら, 宿主側が二次共生 によって獲得した主要な機能は光合成機能であるの で、ヌクレオモルフにはまだ宿主核に移動しきれて いないプラスチド関連遺伝子が豊富にコードされて いると予想された. しかしながら, ヌクレオモルフ の完全解読により示された結果は意外なものであっ た. Douglas らは 2001 年に G. theta のヌクレオモル フゲノムを初めて解読した(Douglas et al., 2001). 最新の解析では, G. theta のヌクレオモルフは 548 個の遺伝子をコードしており、そのうち 487 個はタ ンパク質コード遺伝子であることが分かっている (Tanifuji et al., 2011) . 驚くことに, そのうちわず か 30 個しかプラスチド関連遺伝子はなく、それ以 外の機能が予測された遺伝子のほとんどはリボソー マルタンパク質や伸長因子などの遺伝子の発現、翻 訳などに関連するハウスキーピング遺伝子であっ た. その後別なクリプト藻類の H. andersenii では 525 個の遺伝子中ほぼ同じ 31 個のプラスチド関連遺 伝子が見つかり(Lane et al., 2007), 光合成機能を 二次的に欠失した C. paramecium では 519 個の遺伝 子中にプラスチド関連遺伝子は 18 個であった (Tanifuji et al., 2011). さらに, クロララクニオン 藻類 B. natans では 340 個の遺伝子が見つかり, そ のうち 293 個のタンパク遺伝子中, クリプト藻類と は異なる組み合わせの 17 個が葉緑体関連遺伝子と 同定された(Gilson et al., 2006). すなわち, これま で完全解読されたヌクレオモルフゲノムでは、コー ドされるプラスチド関連遺伝子は全体の遺伝子のわ ずか 3-6% であり、ヌクレオモルフゲノムにコード される遺伝子の大部分はハウスキーピング遺伝子で ある.

しかしながら、これらのハウスキーピング遺伝子 がヌクレオモルフの現状の存在意義、ひいてはヌク レオモルフが未だに残っている主要な理由であると は信じがたい.なぜなら、これらのハウスキーピン グ遺伝子は真核生物に共通して保存性の高い遺伝子 群であり、ある特定の生物にだけヌクレオモルフが 残る理由とは考えがたいからである.Gilson et al. (2006)はこれらのハウスキーピング遺伝子は、ごく わずかに残っているプラスチド関連遺伝子が機能す るために残っているのであって、わずかに残ってい るプラスチド関連遺伝子が宿主核へ移動してしまっ たら、これらのハウスキーピング遺伝子も必要なく なるため、ヌクレオモルフ自体もいずれ消えるかも しれないと述べている.また、Tanifuji et al. (2011) はクリプト藻類 3 種とクロララクニオン藻類のプラ スチド関連遺伝子の比較から、1) 非光合成の C. paramecium は他のクリプト藻類と比べて光合成遺伝 子以外のプラスチド関連遺伝子もいくつか消失して いること、2) クリプト藻類が共通して保有する 13 の葉緑体関連遺伝子のうち 8 個は、宿主の系統と姉 妹群を形成すると考えられるハプト藻類の核ゲノム から見つかっていること、からこれらのプラスチド 関連遺伝子が将来にわたって存在され続ける積極的 な理由は見あたらないと述べている.しかしなが ら、ヌクレオモルフが reductive genome evolution の途 中なのか終点なのかという議論は未だヌクレオモル フの最大の謎の一つであるので、別章を割き再度議 論したい.

Cryptomonas paramecium に見る reductive genome evolution

Cryptomonas paramecium は淡水産のクリプト藻類 の1種であり、光合成機能を持たない(少なくとも光 合成色素を持たない)種でありながら、未だにヌクレ オモルフとプラスチド (leucoplast) のゲノムを保持し ている (e.g. Hoef-Emden and Melkonian, 2003). 二次的 に光合成機能を失った生物は他にもユーグレナ藻類 の Euglena longa 等があるが (Gockel and Hachtel, 2000),二次的に光合成機能を失い,且つヌクレオモ ルフとプラスチドゲノムを維持し続けているのは C. paramecium だけが知られている. 近年筆者らの研究 により本種のプラスチドとヌクレオモルフゲノムが 報告された(Donaher et al., 2009; Tanifuji et al., 2011). クリプト藻類ではプラスチドでも G. theta と *Rhodomonas salina* でゲノムが解読されていることか ら,比較ゲノム解析が可能である(Douglas and Penny, 1999; Khan et al., 2007). そこで本章では、 クリプト藻 類間の真核型ゲノム (ヌクレオモルフ) と原核型ゲノ ム (プラスチド) についての, 少なくとも属レベルで 分岐した後に起こった"比較的最近の" reductive genome evolution について議論してみたい.

本種のプラスチドゲノムサイズは約78 kbp であり, 他の光合成クリプト藻類のゲノムサイズが約120-160 kbp であることから著しい genome reduction が起こっ ていることが予想された (Tanifuji et al., 2010). 光合 成クリプト藻類のプラスチドゲノムは G. theta で 147 個, R. salina で 146 個のほぼ同じタンパクコード 遺伝子をコードしている. それらタンパク質遺伝子が ゲノムに対して占める割合は, 121 kbp のゲノムサイ ズである G. theta は 87.7%, 136 kbp のゲノムサイズ を持つ R. salina は 80.8% であり,より小さなゲノム サイズの G. theta の方がよりコンパクトなゲノム構

造であった.非光合成生物である C. paramecium では ゲノムの 87.0% が coding 領域であり G. theta とほぼ 変わらないものの、タンパク遺伝子は 82 個しかな く、ゲノムサイズの縮小はコードする遺伝子の欠失に よるところが大きいことが示された(Donaher et al., 2009). 一方でヌクレオモルフゲノムでは, C. paramecium のゲノムサイズは 485.9 kbp であり, G. *theta* や *H. andersenii* に比べると小さいが(表 1), 光 合成クリプト藻類の中で最小のゲノムサイズは 495 kbp であり、光合成機能の消失がヌクレオモルフゲノ ムサイズに与える影響は比較的小さいようである (Tanifuji et al., 2010; Tanifuji et al., 2011) . C. paramecium のヌクレオモルフがコードするタンパク 質遺伝子の数は, 85 kbp もゲノムサイズが大きい H. andersenii と比較して 6 個しか少ない程度であり, コードする遺伝子数はゲノムサイズには直接関係し ていなかった. さらに, 遺伝子間領域の長さは 65 kbp ほどゲノムサイズの大きい G. theta よりもむしろ長 かった. タンパク質の平均長は他の2種に比べ短く, 計算上ではタンパク質の平均長がゲノムサイズの小 ささに最も影響していたものの, 統計学的な有意差は 見られなかった(Tanifuji et al., 2011). よって, クリ プト藻類の種間のヌクレオモルフゲノムサイズの多 様性は遺伝子の数,遺伝子間領域の長さ、タンパク質 の大きさなどでは説明できず,種間のヌクレオモルフ ゲノムサイズの差が genome reduction の結果なのか, 多様性の誤差の範囲になるのか明らかでない. すなわ ち、ヌクレオモルフゲノムが自由生活性の藻類の核ゲ ノムよりコンパクトな構造であることに変わりはな いが (Lane et al., 2007), クリプト藻類間に見られる ヌクレオモルフゲノムサイズの多様性(図2)が何に 起因するのか、今後より多くの、特に近縁種間でゲノ ムサイズが大きく異なるヌクレオモルフゲノムの比 較が必要だろう.

ヌクレオモルフとプラスチドのゲノムを比較した時大きく異なるのは、全遺伝子数に対する機能不明遺 伝子の割合である.前章ではヌクレオモルフにコード される機能が予測された遺伝子のうち、ほとんどがハ ウスキーピング遺伝子であると紹介した.しかしなが ら、リボソーマル RNA やトランスファー RNA など の構造 RNA を含む"機能の予測された"遺伝子は、ヌ クレオモルフゲノムにコードされる全遺伝子の 65% 程度でしかなく、残りの 35% のほとんどが最新の解 析でも他の真核生物との相同性、あるいは機能ドメイ ン共に認識できない遺伝子群である. Tanifuji et al. (2011) はこれら機能不明なヌクレオモルフ遺伝子を nucleomorph ORFans (nORFans) と呼び、クリプト藻 類 3 種のヌクレオモルフゲノム中でどの程度共有さ れているか調査した.その結果、3 種間で共有されて



図3 クリプト藻類のプラスチドゲノムの物理地図とシンテニー. (a) *Guillardia theta* + *Rhodomonas salina*(外円) と *Cryptomonas paramecium*(内円)のプラスチドゲノムのシンテニー. (b) Simple loss 領域 2 の拡大図. 陰付き点線は遺 伝子の欠失位置を表す. 実線の右側と左側の箱は遺伝子の方向を表している. データは Douglas et al. (1999), Khan et al. (2007), Donaher et al. (2009) を引用.

いた nORFans はわずか 11-13% (23 遺伝子) であり, 70-81% (127-160 遺伝子)の nORFans は他の真核生物 だけでなく他のヌクレオモルフ遺伝子とも全く相同 性が認められなかった(true ORFans).対照的に、タ ンパク質コードのハウスキーピング遺伝子のうち約 90% (213遺伝子)は3種のヌクレオモルフゲノムに 共通にコードされていた. すなわち, ハウスキーピン グ遺伝子のほとんどは3種間で共通であるのに、共 有する nORFans はわずかであった. 一般的に reductive genome に ORFans は多くない. これは reductive evolution の過程で、必須の遺伝子のみが残 り, 例えば自由生活には必須だがオルガネラ化した後 には必要のない遺伝子や種に特有な遺伝子は消失し てしまうからと考えられる.実際,クリプト藻類の葉 緑体ゲノムでは G. theta, C. paramecium, R. salina の 3 種あわせてもわずか 6 個しかない (Douglas and Penny, 1999; Khan et al., 2007; Donaher et al., 2009) . ま た,昆虫の共生菌である Buchnera sp. APS 株では 575 タンパク遺伝子中, ORFans はわずか 7 個である (Shigenobu et al., 2000; Degnan et al., 2005). しかしな がらヌクレオモルフ true ORFans はヌクレオモルフ 遺伝子の内の 24-29% を占めており決して少なくな い. すなわち, ハウスキーピング遺伝子だけみれば最 小の遺伝子セットのみがコードされ, それほど重要で

ない遺伝子はそぎ落とされたゲノムのように見える が、反対に nORFans の多様性は維持されているとい う矛盾がある.

さらにヌクレオモルフとプラスチドゲノムの相違 点として, ゲノムアレンジメントの頻度が挙げられ る. プラスチドゲノムの比較では, G. theta と R. salina では、遺伝子の並び方と向きは全く同じ、 すなわちシ ンテニックである (Douglas and Penny, 1999; Khan et al., 2007; Donaher et al., 2009). 著しい遺伝子欠失が起こっ ている C. paramecium と比較しても、1カ所のみゲノ ムアレンジメントが起こっている領域が見つかった が,他の領域は基本的に遺伝子の並び方は同じであっ た(図 3a).多くの遺伝子欠失を起こしている領域は ゲノムアレンジメントが起こっている領域以外に 3 カ所見つかったが,遺伝子単体の欠失と,光合成に関 連する遺伝子群の領域が丸ごと消失していることか ら, ゲノムアレンジメントを起こさずに欠失 (simple loss) していると考えられる(図 3a, b). 一方で, ヌ クレオモルフでは3種のヌクレオモルフゲノム間で シンテニックな領域がゲノムの至る所に散見される ことから、高い頻度でゲノムアレンジメントが起こっ ていることが示された(Douglas et al., 2001; Lane et al., 2007; Tanifuji et al., 2011) (図 4a). 不思議なことに, nORFans の多くは DNA 配列には全く相同性がない



図4 クリプト藻類のヌクレオモルフゲノムの物理地図とシンテニー. (a) Cryptomonas paramecium のヌクレオモルフ ゲノムと Guillardia theta (左), Hemiselmis andersenii (右) のシンテニー. ORFans を除く 4 つ以上の遺伝子が同じ 並び方のものを syntenic とする. 図は Tanifuji et al. (2011)を改変. (b) Cryptomonas paramecium, Guillardia theta, Hemiselmis andersenii ヌクレオモルフゲノム間における nucleomorph ORFans (nORFans)の位置関係の一例. 黒塗りの 箱は syntenic nORFans を示す. 影付きの実線は全く相同性のない syntenic nORFan の位置関係を示し, 点線は相同性の あるものを示す. 全く相同性のない true ORFans の方が多いことが示される. 線の上と下の箱は遺伝子の方向を示し ている. データは Douglas et al. (2001), Lane et al. (2007), Tanifuji et al. (2011)を引用.

にも関わらず,他の種のヌクレオモルフゲノムのシン テニックな位置にほぼ同じ大きさの ORF として (syntenic nORFans)が存在している(Lane et al., 2007; Tanifuji et al., 2011) (図 4b).これらの syntenic nORFans は配列に相同性がないものの,同じ遺伝子に 由来するものと考えられ、また、少なくとも半数の nORFans は EST によるサポートがあることから, nORFans は配列に保存性が乏しいにも関わらず、タン パク質の大きさと位置は保存され、実際に転写されて いる(Tanifuji et al., 2011).

このように、クリプト藻類のヌクレオモルフとプラ スチドゲノムは共に reductive genome であり低い G +C含有量やコンパクトなゲノム構造などの似た構造 を共有する一方、ゲノムアレンジメントの頻度やコー ドする遺伝子の構成などいくつかの相違点を示した. 特に、なぜヌクレオモルフに多量の nORFans がコー ドされているのかは全くの謎である. Archibald and Lane (2009) はヌクレオモルフが AT-rich なゲノムで あることから、潜在的にフェニルアラニン、イソロイ シン、アスパラギン、ロイシン、チロシンをコードす る頻度が高いことに注目した. これらのアミノ酸は細 胞膜相互作用, 膜貫通タンパク質に関連することが多いため(Deber et al., 1999),機能不明な遺伝子群である nORFans が膜作用に関連するのではないかと指摘している.しかしながら実際に nORFans の機能を調査した例はまだない.

ヌクレオモルフは reductive genome evolution の 結果か途中か?

ヌクレオモルフの最も大きな謎の一つは,他の二 次共生生物は共生者核を完全に消失しているの に、"なぜクリプト藻類とクロララクニオン藻類だ け"がヌクレオモルフを持っているのかということで ある.代表的な reductive genome であるプラスチドゲ ノムやミトコンドリアゲノムが未だに維持されてい る説明として尤もらしいのは、redox potential regulation による遺伝子制御が挙げられる.つまり、それ らのゲノムにコードされる遺伝子発現がオルガネラ 内の酸化還元電位によって制御されているため、ゲ ノムの完全消失は遺伝子発現機構そのものが破綻す ることを意味する (Allen, 1993, 2003).しかし、こ

の説明は真核型ゲノムであるヌクレオモルフには適 用できない. 他の二次共生生物の reductive genome evolution とは何か異なる過程をたどった結果なの か、あるいはゲノムが消失する過程にあるだけなの だろうか? 当然, すでに共生者核を失ってしまった 他の二次共生藻類とヌクレオモルフゲノムを比較す ることは出来ない.しかしながら、クリプト藻類と クロララクニオン藻類のヌクレオモルフゲノムを比 べた場合、クロララクニオン藻類の方がより reductive genome evolution が進んだ状態であるかもしれな い. Tanifuji et al. (2011) はクリプト藻類 3 種に共有 される 217 個のハウスキーピング遺伝子と、クロラ ラクニオン藻類 B. natans のスプライシング関連遺伝 子を除く 120 個の遺伝子を比較した. その結果, B. natans のハウスキーピング遺伝子のうち 81% (98/120 個) はクリプト藻類も共有しており、さら にクリプト藻類間ではクロララクニオン藻類と共有 する 98 個の遺伝子に加え、119 個の遺伝子を共有す ることが見いだされた. クロララクニオン藻類のヌ クレオモルフ遺伝子の多くが、クリプト藻類の持つ 遺伝子群の一部に含まれるという事実は、クロララ クニオン藻類のヌクレオモルフはクリプト藻類に比 べてよりゲノム減少が進んだ状態であることを示唆 する. また, このことはクロララクニオン藻類のヌ クレオモルフの方がクリプト藻類よりも、祖先種の ゲノムと比較した時の変異がより蓄積しているとい う事実とも合致する(Patron et al., 2006). 基本的に 同じような遺伝子セットであるならば、クロララク ニオン藻類では消失している遺伝子が、クリプト藻 類でもいずれ消失して不思議はない.少なくとも, クリプト藻類がコードしているハウスキーピング遺 伝子のうち, クロララクニオン藻類がコードしてい ない 119 個の遺伝子に関しては、今後消失する可能 性を十分に秘めているかもしれない.

では、ヌクレオモルフゲノムは消失する過程にあ ると考えてよいのだろうか? 前述のようにヌクレオ モルフゲノムの比較では、将来にわたってヌクレオ モルフが存在し続ける積極的な証拠は見つからな い.また、もしプラスチド関連遺伝子がヌクレオモ ルフの現在の主要な存在意義なのだとしたら、それ らが宿主核に移動してしまえば、やがてヌクレオモ ルフは消えてしまうかもしれない.とはいっても、 未だ何らかの理由で reductive genome evolution が止 まってしまった可能性も否定できない.そもそも、 ヌクレオモルフから遺伝子が消失するにはどのよう な過程が必要だろうか? 現在ヌクレオモルフにコー ドされている遺伝子(あるいはその機能を補う相同 遺伝子)が宿主核にコードされ,且つ共生者細胞質 区画(PPC かプラスチド)にターゲットされなけれ ばならない. そのためには 1) EGT によってヌクレ オモルフから宿主核へ遺伝子が移動、さらにター ゲット配列を獲得する.2)元々宿主ゲノムが持って いる遺伝子が(遺伝子重複などを経て)ターゲット 遺伝子になる. 3) Lateral gene transfer (LGT) によ り全く別の生物から遺伝子を獲得する.の3通りの 過程が想定できる.このことを検証するには核ゲノ ムの情報が必要であり, 実際, 現在 G. theta と B. natans の核ゲノムプロジェクトが進行中である (http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/50026.html) . 意外なことに、これまでの核ドラフトゲノムの解析 からは、ミトコンドリアからの DNA 断片の移動は 示されたが(Curtis and Archibald, 2010),明白にヌ クレオモルフゲノムに相同性の高い配列はほとんど 発見されていない(Archibald lab., unpublished data). すなわち、ヌクレオモルフから宿主核ゲノムへの"最 近の" EGT はほとんど見つかっていないのである. もしヌクレオモルフから宿主核への EGT が起こら ないのだとしたら、少なくともプラスチド関連遺伝 子の供給源は LGT のみということになってしま い, ヌクレオモルフから遺伝子が消失する機会の多 くが奪われることになる. つまり, ヌクレオモルフ ゲノムの比較では reductive genome evolution の中途 段階に見えたとしても、核ゲノムの情報を加味する と、ゲノム減少そのものは、事実上、止まっている ようにも見える.結局のところ、ヌクレオモルフが 将来にわたって維持される理由もなければ、積極的 に reductive genome evolution が起こっていることを 示す証拠もまたないというのが実際のところであ る.

終わりに

ヌクレオモルフはクリプト藻類とクロララクニオ ン藻類にだけ見られるオルガネラであり、二次共生 者核の名残である.細胞内共生は生物進化にとって 重要な意味を持ち, ヌクレオモルフを持つクリプト 藻類とクロララクニオン藻類は宿主と共生者がどの ような遺伝的統合を果たしたのかを調査するのに格 好のモデルであると言える.本稿ではこれまでのヌ クレオモルフに関する知見について、特にヌクレオ モルフの reductive genome evolution に焦点を当て比 較ゲノム学の成果を紹介してきた. クリプト藻類と クロララクニオン藻類のヌクレモルフゲノムの共通 点と相違点を表2 に示した. クリプト藻類は紅藻 類、クロララクニオン藻類は緑藻類を共生者として おり、宿主、共生者共に起源が全く異なる. にもか かわらず、クリプト藻類とクロララクニオン藻類の ヌクレオモルフはいくつかの共通点を持つ. 染色体

表2 クリプト藻類とクロララクニオン藻類のヌク レオモルフゲノムの特徴

クリプト藻類	クロララクニオン藻類			
Sub-telomeric rDNA を持つ				
ゲノムサイズが小さい(0.33-1 Mbp)				
GC 含有量が低い				
ハウスキーピング遺伝子を豊富に持つ				
プラスチド関連遺伝子はわずか(3-6%)				
紅藻類起源	緑藻類起源			
イントロンが少ない	イントロンが豊富			
テロメア配列が多様	テロメア配列が同一			

数はこれまで調査された株全てで3本であり、その ゲノムサイズは両系統で比較的近く, 0.33-1 Mbp で ある. ヌクレオモルフゲノムにコードされる遺伝子 はほとんどがハウスキーピング遺伝子と nORFans で、プラスチド関連遺伝子は少数であり、クロララ クニオン藻類とクリプト藻類のヌクレモルフは基本 的に同様の遺伝子セットを持っている.一方で、な ぜ常に 3 本の染色体が残されているのか? なぜ DNA配列に保存性が乏しいのに関わらず nORFans が残っているのか? nORFans の機能は何かという問 題は未だ解決されていない. さらに、なぜクリプト 藻類とクロララクニオン藻類だけ共生者核が残って いるのか? このゲノムは reductive genome evolution の中途段階なのか,あるいは結果なのかという大き な疑問も残ったままである. ヌクレオモルフゲノム の解析に加え, G. theta と B. natans の核ゲノムが近 い将来公開されることで, 今後はどのような核コー ド遺伝子が PPC にターゲットされているのか? そ れらはどのようにして獲得されたのか? のような, 核とヌクレオモルフの情報を相互に利用した切り口 による研究が活発になると予想される.

また、生物界にはミトコンドリア、プラスチドや ヌクレオモルフのように完全にオルガネラ化した細 胞内共生だけでなく、渦鞭毛藻類やウミウシに見ら れる盗葉緑体や(Rumpho et al., 2008; Wisecaver and Hackett, 2010),細胞内共生者を分離培養可能なゾウ リムシとクロレラの関係など(Kodama and Fujishima, 2010),宿主と共生者の関係がそれほど強固でない 段階の生物群も現存している.さらに、2種以上の 生物間の関係の特殊化という意味合いでは、レジオ ネラなどのアメーバ細胞内に存在する様々な病原菌 類や(Moliner et al., 2010),アピコンプクレクサ類 (マラリア原虫など: Morrison, 2009)やキネトプラ スチダ類(*Trypanosoma* など: Simpson et al., 2006),微胞子虫とそれらの宿主に見られる寄生関 係もこの分野と関係が深い(Keeling and Fast, 2002; Keeling et al., 2005). なぜ一方では共生, 一方では 寄生になってしまうのだろうか? 近年の分子生物学 的技術の発展により, それら 2 つ以上の生物ゲノム の包括的な挙動, 生物間の遺伝子移動を直接比較す ることが現実的になってきている. そのような研究 から, 将来的には, 共生と寄生に関するメカニズム の違いの研究のように, 基礎生物学だけでなく社会 的にも重要な知見が蓄積されることが期待される.

謝辞

本稿の執筆にあたって様々なアドバイスと, Guillardia theta, Bigelowiella natansの核ゲノムデータ の一部使用許可をいただいた Dalhousie University の John M. Archibald 博士に感謝致します.また,写真の 提供をいただきました University of Osloの大田修平 博士, Dalhousie University の Eunsoo Kim 博士,原稿に 対し助言をいただいた小野寺直子氏に感謝致します. 本稿を執筆する機会をいただいた日本原生動物学会 と山口大学の藤島政博教授にお礼申し上げます.

引用文献

- Allen, J. F. (1993) Control of gene-expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. J. Theor. Biol., 165, 609– 631.
- Allen, J. F. (2003) The function of genomes in bioenergetic organelles. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B, 358, 19– 37.
- Archibald, J. M. (2007) Nucleomorph genomes: structure, function, origin and evolution. Bioessays, 29, 392– 402.
- Archibald, J. M. and Lane, C. E. (2009) Going, going, not quite gone: nucleomorphs as a case study in nuclear genome reduction. J. Hered., 100, 582–590.
- Archibald, J. M., Rogers, M. B., Toop, M., Ishida, K. and 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. and Timmis, J. N. (2008) Reconstructing evolution: gene transfer from plastids to the nucleus. Bioessays, 30, 556–566.
- Burki, F., Inagaki, Y., Bråte, J., Archibald, J. M., Keeling, P. J., Cavalier-Smith, T., Sakaguchi, M., Hashimoto, T., Horak, A., Kumar, S., Klaveness, D., Jakobsen, K. S., Pawlowski, J. and Shalchian-Tabrizi, K. (2009)

Large-scale phylogenomic analyses reveal that two enigmatic protist lineages, telonemia and centroheliozoa, are related to photosynthetic chromalveolates. Genome Biol. Evol., 1, 231–238.

- Cavalier-Smith, T. (2002) Nucleomorphs: enslaved algal nuclei. Curr. Opin. Microbiol., 5, 612–619.
- Cavalier-Smith, T., Couch, J. A., Thorsteinsen, K. E., Gilson, P., Deane, J. A., Hill, D. R. A. and McFadden, G. I. (1996) Cryptomonad nuclear and nucleomorph 18S rRNA phylogeny. Eur. J. Phycol., 31, 315–328.
- Curtis, B. A. and Archibald, J. M. (2010) A spliceosomal intron of mitochondrial DNA origin. Curr. Biol. 20, R919–R920.
- Deber, C. M., Liu, L. P. and Wang, C. (1999) Perspective: peptides as mimics of transmembrane segments in proteins. J. Pept. Res., 54, 200–205.
- Degnan, P. H., Lazarus, A. B. and Wernegreen, J. J. (2005) Genome sequence of *Blochmannia pennsylvanicus* indicates parallel evolutionary trends among bacterial mutualists of insects. Genome Res., 15, 1023–1033.
- Derelle, E., Ferraz, C., Rombauts, S., Rouze, P., Worden, A. Z., Robbens, S., Partensky, F., Degroeve, S., Echeynie, S., Cooke, R., Saeys, Y., Wuyts, J., Jabbari, K., Bowler, C., Panaud, O., Piegu, B., Ball, S. G., Ral, J. P., Bouget, F. Y., Piganeau, G., De Baets, B., Picard, A., Delseny, M., Demaille, J., Van de Peer, Y. and Moreau, H. (2006) Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 11647–11652.
- Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J. and Lithgow, T. (2006) Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. Science, 313, 314–318.
- Donaher, N., Tanifuji, G., Onodera, N. T., Malfatti, S. A., Chain, P. S. G., Hara, Y. and Archibald, J. M. (2009) The complete plastid genome sequence of the secondarily nonphotosynthetic alga *Cryptomonas paramecium*: reduction, compaction, and accelerated evolutionary rate. Genome Biol. Evol., 1, 439–448.
- Douglas, S., Zauner, S., Fraunholz, M., Beaton, M., Penny, S., Deng, L. T., Wu, X. N., Reith, M., Cavalier-Smith, T. and Maier, U. G. (2001) The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. Nature, 410, 1091–1096.
- Douglas, S. E., Durnford, D. G. and Morden, C. W. (1990) Nucleotide-sequence of the gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase from *Cryptomonas phi* - evidence

supporting the polyphyletic origin of plastids. J. Phycol., 26, 500–508.

- Douglas, S. E. and Penny, S. L. (1999) The plastid genome of the cryptophyte alga, *Guillardia theta*: complete sequence and conserved synteny groups confirm its common ancestry with red algae. J. Mol. Evol., 48, 236–244.
- Eschbach, S., Hofmann, C. J. B., Maier, U. G., Sitte, P. and Hansmann, P. (1991) A eukaryotic genome of 660 kb: electrophoretic karyotype of nucleomorph and cell-nucleus of the cryptomonad alga, *Pyrenomonas salina*. Nucleic. Acids. Res., 19, 1779–1781.
- Gibbs, S. P. (1978) Chloroplasts of euglena may have evolved from symbiotic green-algae. Can. J. Bot., 56, 2883–2889.
- Gilson, P. R., Su, V., Slamovits, C. H., Reith, M. E., Keeling, P. J. and McFadden, G. I. (2006) Complete nucleotide sequence of the chlorarachniophyte nucleomorph: nature's smallest nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 9566–9571.
- Gockel, G. and Hachtel, W. (2000) Complete gene map of the plastid genome of the nonphotosynthetic euglenoid flagellate *Astasia longa*. Protist, 151, 347– 351.
- Gould, S. B., Waller, R. R. and McFadden, G. I. (2008) Plastid evolution. Annu. Rev. Plant Biol., 59, 491– 517.
- Gray, M. W., Burger, G. and Lang, B. F. (1999) Mitochondrial evolution. Science, 283, 1476–1481.
- Gray, M. W. and Doolittle, W. F. (1982) Has the endosymbiont hypothesis been proven? Microbiol. Rev. 46, 1–42.
- Greenwood, A. (1974) The cryptophyta in relation to phylogeny and photosynthesis. In: 8th International congress of electron microscopy. Sanders, J. and Goodchild, D. (ed.). Australian Academy of Sciences, Canberra, pp. 566–567.
- Hampl, V., Hug, L., Leigh, J. W., Dacks, J. B., Lang, B. F., Simpson, A. G. B. and Roger, A. J. (2009) Phylogenomic analyses support the monophyly of excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 3859–3864.
- Hibberd, D. J. and Norris, R. E. (1984) Cytology and ultrastructure of *Chlorarachnion reptans* (Chlorarachniophyta divisio nova, chlorarachniophyceae classis nova). J. Phycol., 20, 310–330.
- Hoef-Emden, K. and Melkonian, M. (2003) Revision of the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae): a combination

of molecular phylogeny and morphology provides insights into a long-hidden dimorphism. Protist, 154, 371–409.

- Ishida, K., Cao, Y., Hasegawa, M., Okada, N. and Hara, Y. (1997) The origin of chlorarachniophyte plastids, as inferred from phylogenetic comparisons of amino acid sequences of EF-Tu. J. Mol. Evol., 45, 682–687.
- Ishida, K., Green, B. R. and Cavalier-Smith, T. (1999) Diversification of a chimaeric algal group, the chlorarachniophytes: phylogeny of nuclear and nucleomorph small-subunit rRNA genes. Mol. Biol. Evol., 16, 321–331.
- Ishida, K., Endo, H. and Koike, S. (2011a) Partenskyella glossopodia (Chlorarachniophyceae) possesses a nucleomorph genome of approximately 1 Mbp. Phycol. Res., 59, 120–122.
- Ishida, K., Yabuki, A. and Ota, S. (2011b) Amorphochlora amoebiformis gen. et comb. nov. (Chlorarachniophyceae). Phycol. Res., 59, 52–53.
- Katinka, M. D., Duprat, S., Cornillot, E., Metenier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretaillade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J. and Vivares, C. P. (2001) Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. Nature, 414, 450–453.
- Keeling, P. J. and Fast, N. M. (2002) Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. Annu. Rev. Microbiol., 56, 93–116.
- Keeling, P. J., Fast, N. M., Law, J. S., Williams, B. A. P. and Slamovits, C. H. (2005) Comparative genomics of microsporidia. Folia Parasit., 52, 8–14.
- Khan, H., Parks, N., Kozera, C., Curtis, B. A., Parsons, B. J., Bowman, S. and Archibald, J. M. (2007) Plastid genome sequence of the cryptophyte alga *Rhodomonas salina* CCMP1319: Lateral transfer of putative DNA replication machinery and a test of chromist plastid phylogeny. Mol. Biol. Evol., 24, 1832–1842.
- Kodama, Y. and Fujishima, M. (2010) Secondary symbiosis between *Paramecium* and *Chlorella* cells. Int. Rev. Cell Mol. Biol., 279, 33–77.
- Lane, C. E. and Archibald, J. M. (2006) Novel nucleomorph genome architecture in the cryptomonad genus *Hemiselmis*. J. Eukaryot. Microbiol., 53, 515–521.
- Lane, C. E. and Archibald, J. M. (2008) New marine members of the genus *Hemiselmis* (Cryptomonadales, Cryptophyceae). J. Phycol., 44,

439-450.

- Lane, C. E., Khan, H., MacKinnon, M., Fong, A., Theophilou, S. and Archibald, J. M. (2006) Insight into the diversity and evolution of the cryptomonad nucleomorph genome. Mol. Biol. Evol., 23, 856–865.
- Lane, C. E., van den Heuvel, K., Kozera, C., Curtis, B. A., Parsons, B. J., Bowman, S. and Archibald, J. M. (2007) Nucleomorph genome of *Hemiselmis* andersenii reveals complete intron loss and compaction as a driver of protein structure and function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 19908– 19913.
- Ludwig, M. and Gibbs, S. P. (1985) DNA is present in the nucleomorph of cryptomonads - further evidence that the chloroplast evolved from a eukaryotic endosymbiont. Protoplasma, 127, 9–20.
- Martin, W. (2003) The smoking gun of gene transfer. Nat. Genet., 33, 442–442.
- Martin, W. and Herrmann, R. G. (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? Plant Physiol., 118, 9–17.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M. and Penny, D. (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 12246–12251.
- 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. and Kuroiwa, T. (2004) Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. Nature, 428, 653–657.
- McCutcheon, J. P., McDonald, B. R. and Moran, N. A. (2009) Origin of an alternative genetic code in the extremely small and GC-rich genome of a bacterial symbiont. PLoS Genet., 5, e1000565.
- McFadden, G. I., Gilson, P. R. and Waller, R. F. (1995) Molecular phylogeny of chlorarachniophytes based on plastid ribosomal-RNA and *rbcl* Sequences. Arch.

Protistenkd., 145, 231-239.

- Moliner, C., Fournier, P. E. and Raoult, D. (2010) Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. FEMS Microbiol. Rev., 34, 281–294.
- Moore, C. E. and Archibald, J. M. (2009) Nucleomorph genomes. Annu. Rev. Genet., 43, 251–264.
- Moran, N. A. (1996) Accelerated evolution and Muller's rachet in endosymbiotic bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 2873–2878.
- Moran, N. A., McCutcheon, J. P. and Nakabachi, A. (2008) Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. Annu. Rev. Genet., 42, 165–190.
- Moran, N. A., McLaughlin, H. J. and Sorek, R. (2009) The dynamics and time scale of ongoing genomic erosion in symbiotic bacteria. Science, 323, 379–382.
- Moreira, D., Lopezarchilla, A. I., Amils, R. and Marin, I. (1994) Characterization of 2 new thermoacidophilic microalgae - genome organization and comparison with *Galdieria sulphuraria*. FEMS Microbiol. Lett., 122, 109–114.
- Morrison, D. A. (2009) Evolution of the Apicomplexa: where are we now? Trends Parasitol., 25, 375–382.
- Moustafa, A., Beszteri, B., Maier, U. G., Bowler, C., Valentin, K. and Bhattacharya, D. (2009) Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms. Science, 324, 1724–1726.
- Muravenko, O. V., Selyakh, I. O., Kononenko, N. V. and Stadnichuk, I. N. (2001) Chromosome numbers and nuclear DNA contents in the red microalgae *Cyanidium caldarium* and three *Galdieria* species. Eur. J. Phycol., 36, 227–232.
- Nakabachi, A., Yamashita, A., Toh, H., Ishikawa, H., Dunbar, H. E., Moran, N. A. and Hattori, M. (2006) The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella*. Science, 314, 267.
- Ota, S., Ueda, K. and Ishida, K. I. (2007) Norrisiella sphaerica gen. et sp. nov., a new coccoid chlorarachniophyte from Baja California, Mexico. J. Plant Res., 120, 661–670.
- Patron, N. J., Rogers, M. B. and Keeling, P. J. (2006) Comparative rates of evolution in endosymbiotic nuclear genomes. BMC Evol. Biol., 6, 46.
- Phipps, K. D., Donaher, N. A., Lane, C. E. and Archibald, J. M. (2008) Nucleomorph karyotype diversity in the freshwater cryptophyte genus *Cryptomonas*. J. Phycol., 44, 11–14.
- Podlevsky, J. D., Bley, C. J., Omana, R. V., Qi, X. D. and Chen, J. J. L. (2008) The telomerase database.

Nucleic Acids Res., 36, D339-D343.

- Rensing, S. A., Goddemeier, M., Hofmann, C. J. B. and Maier, U. G. (1994) The presence of a nucleomorph hsp70 gene is a common feature of cryptophyta and chlorarachniophyta. Curr. Genet., 26, 451–455.
- Reyes-Prieto, A., Weber, A. P. M. and Bhattacharya, D. (2007) The origin and establishment of the plastid in algae and plants. Annu. Rev. Genet., 41, 147–168.
- Rogers, M. B., Gilson, P. R., Su, V., McFadden, G. I. and Keeling, P. J. (2007) The complete chloroplast genome of the chlorarachniophyte *Bigelowiella natans*: evidence for independent origins of chlorarachniophyte and euglenid secondary endosymbionts. Mol. Biol. Evol., 24, 54–62.
- Rumpho, M. E., Worful, J. M., Lee, J., Kannan, K., Tyler, M. S., Bhattacharya, D., Moustafa, A. and Manhart, J. R. (2008) Horizontal gene transfer of the algal nuclear gene psbO to the photosynthetic sea slug *Elysia chlorotica*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 17867–17871.
- Sasaki, Y., Ishikawa, J., Yamashita, A., Oshima, K., Kenri, T., Furuya, K., Yoshino, C., Horino, A., Shiba, T., Sasaki, T. and Hattori, M. (2002) The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. Nucleic Acids Res., 30, 5293–5300.
- Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y. and Ishikawa, H. (2000) Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. Nature, 407, 81–86.
- Silver, T. D., Koike, S., Yabuki, A., Kofuji, R., Archibald, J. M. and Ishida, K. I. (2007) Phylogeny and nucleomorph karyotype diversity of chlorarachniophyte algae. J. Eukaryot. Microbiol., 54, 403–410.
- Silver, T. D., Moore, C. E. and Archibald, J. M. (2010) Nucleomorph ribosomal DNA and telomere dynamics in chlorarachniophyte algae. J. Eukaryot. Microbiol., 57, 453–459.
- Simpson, A. G. B., Stevens, J. R. and Lukeš, J. (2006) The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. Trends Parasitol., 22, 168–174.
- Smith, D. R. (2009) Unparalleled GC content in the plastid DNA of *Selaginella*. Plant Mol. Biol., 71, 627–639.
- Tanifuji, G., Onodera, N. T. and Hara, Y. (2010) Nucleomorph genome diversity and its phylogenetic implications in cryptomonad algae. Phycol. Res., 58, 230–237.

- Tanifuji, G., Onodera, N. T., Wheeler, T. J., Dlutek, M., Donaher, N. and Archibald, J. M. (2011) Complete nucleomorph genome sequence of the nonphotosynthetic alga *Cryptomonas paramecium* reveals a core nucleomorph gene set. Genome Biol. Evol., 3, 44–54.
- van Dooren, G. G., Schwartzbach, S. D., Osafune, T. and McFadden, G. I. (2001) Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids. Biochim. Biophys. Acta, 1541, 34–53.
- Whatley, J. M. and Whatley, F. R. (1981) Chloroplast Evolution. New Phytol., 87, 233–247.
- Wisecaver, J. H. and Hackett, J. D. (2010) Transcriptome analysis reveals nuclear-encoded proteins for the maintenance of temporary plastids in the dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. BMC Genomics, 11, 366.
- Wisecaver, J. H. and Hackett, J. D. (2011) Dinoflagellate genome evolution. Annu. Rev. Microbiol., 65, 369–

387

Worden, A. Z., Lee, J. H., Mock, T., Rouze, P., Simmons, M. P., Aerts, A. L., Allen, A. E., Cuvelier, M. L., Derelle, E., Everett, M. V., Foulon, E., Grimwood, J., Gundlach, H., Henrissat, B., Napoli, C., McDonald, S. M., Parker, M. S., Rombauts, S., Salamov, A., Von Dassow, P., Badger, J. H., Coutinho, P. M., Demir, E., Dubchak, I., Gentemann, C., Eikrem, W., Gready, J. E., John, U., Lanier, W., Lindquist, E. A., Lucas, S., Mayer, K. F. X., Moreau, H., Not, F., Otillar, R., Panaud, O., Pangilinan, J., Paulsen, I., Piegu, B., Poliakov, A., Robbens, S., Schmutz, J., Toulza, E., Wyss, T., Zelensky, A., Zhou, K., Armbrust, E. V., Bhattacharya, D., Goodenough, U. W., Van de Peer, Y. and Grigoriev, I. V. (2009) Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeukaryotes Micromonas. Science, 324, 268-272.