

REFERENCES

- Ajzenberg, D., A.L. Bañuls, C. Su, A. Dumètre, M. Demar, B. Carme, and M.L. Dardé. 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 34:1185–1196. doi:10.1016/j.ijpara.2004.06.007
- Blanchard, N., and N. Shastri. 2010. Topological journey of parasite-derived antigens for presentation by MHC class I molecules. *Trends Immunol.* 31:414–421. doi:10.1016/j.it.2010.08.004
- Boothroyd, J.C., and J.F. Dubremetz. 2008. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:79–88. doi:10.1038/nrmicro1800
- Boothroyd, J.C., and M.E. Grigg. 2002. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr. Opin. Microbiol.* 5:438–442. doi:10.1016/S1369-5274(02)00349-1
- Casciotti, L., K.H. Ely, M.E. Williams, and I.A. Khan. 2002. CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* can be induced but not maintained in mice lacking conventional CD4(+) T cells. *Infect. Immun.* 70:434–443. doi:10.1128/IAI.70.2.434-443.2002
- Collazo, C.M., G.S. Yap, G.D. Sempowski, K.C. Lusby, L. Tessarollo, G.F. Woude, A. Sher, and G.A. Taylor. 2001. Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon γ -inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection. *J. Exp. Med.* 194:181–188. doi:10.1084/jem.194.2.181
- Combe, C.L., T.J. Curiel, M.M. Moretto, and I.A. Khan. 2005. NK cells help to induce CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4(+) T cells. *Infect. Immun.* 73:4913–4921. doi:10.1128/IAI.73.8.4913-4921.2005
- Dardé, M.L. 2008. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. *Parasite.* 15:366–371.
- Dubremetz, J.F. 2007. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cell. Microbiol.* 9:841–848. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00909.x
- El Hajj, H., E. Demeijer, J. Poncet, M. Lebrun, B. Wu, N. Galéotti, M.N. Fourmaux, O. Mercereau-Puijalon, H. Vial, G. Labesse, and J.F. Dubremetz. 2006. The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics.* 6:5773–5784. doi:10.1002/pmic.200600187
- El Hajj, H., M. Lebrun, S.T. Arold, H. Vial, G. Labesse, and J.F. Dubremetz. 2007. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 3:e14. doi:10.1371/journal.ppat.0030014
- Fentress, S.J., M.S. Behnke, I.R. Dunay, M. Mashayekhi, L.M. Rommereim, B.A. Fox, D.J. Bzik, G.A. Taylor, B.E. Turk, C.F. Licht, et al. 2010. Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. *Cell Host Microbe.* 8:484–495. doi:10.1016/j.chom.2010.11.005
- Goldszmid, R.S., I. Coppens, A. Lev, P. Caspar, I. Mellman, and A. Sher. 2009. Host ER–parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells. *J. Exp. Med.* 206:399–410. doi:10.1084/jem.20082108
- Holst, J., K.M. Vignali, A.R. Burton, and D.A. Vignali. 2006. Rapid analysis of T-cell selection in vivo using T cell-receptor retrogenic mice. *Nat. Methods.* 3:191–197. doi:10.1038/nmeth858
- Howe, D.K., and L.D. Sibley. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172:1561–1566. doi:10.1093/infdis/172.6.1561
- Hunn, J.P., S. Koenen-Waisman, N. Papic, N. Schroeder, N. Pawlowski, R. Lange, F. Kaiser, J. Zerrahn, S. Martens, and J.C. Howard. 2008. Regulatory interactions between IRG resistance GTPases in the cellular response to *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.* 27:2495–2509. doi:10.1038/emboj.2008.176
- Joynson, D.H.M., and T.J. Wreghitt, editors. 2001. *Toxoplasmosis: A Comprehensive Clinical Guide*. Cambridge University Press, Cambridge. 410 pp.
- Khaminets, A., J.P. Hunn, S. Koenen-Waisman, Y.O. Zhao, D. Preukschat, J. Coers, J.P. Boyle, Y.C. Ong, J.C. Boothroyd, G. Reichmann, and J.C. Howard. 2010. Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole. *Cell. Microbiol.* 12:939–961. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01443.x
- Liang, G., T.E. Audas, Y. Li, G.P. Cockram, J.D. Dean, A.C. Martyn, K. Kokame, and R. Lu. 2006. Luman/CREB3 induces transcription of the endoplasmic reticulum (ER) stress response protein Herp through an ER stress response element. *Mol. Cell. Biol.* 26:7999–8010. doi:10.1128/MCB.01046-06
- Lieberman, L.A., M. Banica, S.L. Reiner, and C.A. Hunter. 2004. STAT1 plays a critical role in the regulation of antimicrobial effector mechanisms, but not in the development of Th1-type responses during toxoplasmosis. *J. Immunol.* 172:457–463.
- Lu, F., S. Huang, and L.H. Kasper. 2009. The temperature-sensitive mutants of *Toxoplasma gondii* and ocular toxoplasmosis. *Vaccine.* 27:573–580. doi:10.1016/j.vaccine.2008.10.090
- Martinon, F., X. Chen, A.H. Lee, and L.H. Glimcher. 2010. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat. Immunol.* 11:411–418. doi:10.1038/ni.1857
- Melo, M.B., P. Kasperkovitz, A. Cerny, S. Koenen-Waisman, E.A. Kurt-Jones, E. Lien, B. Beutler, J.C. Howard, D.T. Golenbock, and R.T. Gazzinelli. 2010. UNC93B1 mediates host resistance to infection with *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 6:e1001071. doi:10.1371/journal.ppat.1001071
- Montoya, J.G., and J.S. Remington. 2008. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin. Infect. Dis.* 47:554–566. doi:10.1086/590149
- Ogawa, M., M. Yamamoto, and K. Takeda. 2010. Role of *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 in Stat6 activation. *Med. J. Osaka Univ.* 53:1–4.
- Ong, Y.C., M.L. Reese, and J.C. Boothroyd. 2010. *Toxoplasma* rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. *J. Biol. Chem.* 285:28731–28740. doi:10.1074/jbc.M110.112359
- Peixoto, L., F. Chen, O.S. Harb, P.H. Davis, D.P. Beiting, C.S. Brownback, D. Ouloguem, and D.S. Roos. 2010. Integrative genomic approaches highlight a family of parasite-specific kinases that regulate host responses. *Cell Host Microbe.* 8:208–218. doi:10.1016/j.chom.2010.07.004
- Pepper, M., F. Dzierzinski, A. Crawford, C.A. Hunter, and D. Roos. 2004. Development of a system to study CD4+ T-cell responses to transgenic ovalbumin-expressing *Toxoplasma gondii* during toxoplasmosis. *Infect. Immun.* 72:7240–7246. doi:10.1128/IAI.72.12.7240-7246.2004
- Reese, M.L., and J.C. Boothroyd. 2009. A helical membrane-binding domain targets the *Toxoplasma* ROP2 family to the parasitophorous vacuole. *Traffic.* 10:1458–1470. doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00958.x
- Richardson, C.E., T. Kooistra, and D.H. Kim. 2010. An essential role for XBP-1 in host protection against immune activation in *C. elegans*. *Nature.* 463:1092–1095. doi:10.1038/nature08762
- Robben, P.M., D.G. Mordue, S.M. Truscott, K. Takeda, S. Akira, and L.D. Sibley. 2004. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J. Immunol.* 172:3686–3694.
- Robben, P.M., M. LaRegina, W.A. Kuziel, and L.D. Sibley. 2005. Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *J. Exp. Med.* 201:1761–1769. doi:10.1084/jem.20050054
- Saeij, J.P., J.P. Boyle, S. Collier, S. Taylor, L.D. Sibley, E.T. Brooke-Powell, J.W. Ajioka, and J.C. Boothroyd. 2006. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science.* 314:1780–1783. doi:10.1126/science.1133690
- Saeij, J.P., S. Collier, J.P. Boyle, M.E. Jerome, M.W. White, and J.C. Boothroyd. 2007. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature.* 445:324–327. doi:10.1038/nature05395
- Shirahata, T., T. Yamashita, C. Ohta, H. Goto, and A. Nakane. 1994. CD8+ T lymphocytes are the major cell population involved in the early gamma interferon response and resistance to acute primary *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 38:789–796.
- Sibley, L.D., and J.C. Boothroyd. 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature.* 359:82–85. doi:10.1038/359082a0
- Sibley, L.D., and D.K. Howe. 1996. Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 219:3–15.
- Sinai, A.P., P. Webster, and K.A. Joiner. 1997. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii*

- parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J. Cell Sci.* 110:2117–2128.
- Steinfeldt, T., S. Könen-Waisman, L. Tong, N. Pawlowski, T. Lamkemeyer, L.D. Sibley, J.P. Hunn, and J.C. Howard. 2010. Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS Biol.* 8:e1000576. doi:10.1371/journal.pbio.1000576
- Stirling, J., and P. O'Hare. 2006. CREB4, a transmembrane bZip transcription factor and potential new substrate for regulation and cleavage by S1P. *Mol. Biol. Cell.* 17:413–426. doi:10.1091/mbc.E05-06-0500
- Subauste, C.S., and J.S. Remington. 1991. Role of gamma interferon in *Toxoplasma gondii* infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10:58–67. doi:10.1007/BF01964408
- Tateda, C., R. Ozaki, Y. Onodera, Y. Takahashi, K. Yamaguchi, T. Berberich, N. Koizumi, and T. Kusano. 2008. NtbZIP60, an endoplasmic reticulum-localized transcription factor, plays a role in the defense response against bacterial pathogens in *Nicotiana tabacum*. *J. Plant Res.* 121:603–611. doi:10.1007/s10265-008-0185-5
- Taylor, G.A., C.M. Collazo, G.S. Yap, K. Nguyen, T.A. Gregorio, L.S. Taylor, B. Eagleson, L. Secrest, E.A. Southon, S.W. Reid, et al. 2000. Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN- γ -inducible gene IGTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:751–755. doi:10.1073/pnas.97.2.751
- Taylor, S., A. Barragan, C. Su, B. Fux, S.J. Fentress, K. Tang, W.L. Beatty, H.E. Hajj, M. Jerome, M.S. Behnke, et al. 2006. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science.* 314:1776–1780. doi:10.1126/science.1133643
- Wang, Y., J. Shen, N. Arenzana, W. Tirasophon, R.J. Kaufman, and R. Prywes. 2000. Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J. Biol. Chem.* 275:27013–27020.
- Wu, J., D.T. Rutkowski, M. Dubois, J. Swathirajan, T. Saunders, J. Wang, B. Song, G.D. Yau, and R.J. Kaufman. 2007. ATF6 α optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev. Cell.* 13:351–364. doi:10.1016/j.devcel.2007.07.005
- Yamamoto, K., T. Sato, T. Matsui, M. Sato, T. Okada, H. Yoshida, A. Harada, and K. Mori. 2007. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP1. *Dev. Cell.* 13:365–376. doi:10.1016/j.devcel.2007.07.018
- Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 301:640–643. doi:10.1126/science.1087262
- Yamamoto, M., S. Yamazaki, S. Uematsu, S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Kuwata, O. Takeuchi, K. Takeshige, et al. 2004. Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature.* 430:218–222. doi:10.1038/nature02738
- Yamamoto, M., T. Okamoto, K. Takeda, S. Sato, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Saitoh, N. Yamamoto, H. Sakurai, K.J. Ishii, et al. 2006. Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat. Immunol.* 7:962–970. doi:10.1038/ni1367
- Yamamoto, M., D.M. Standley, S. Takashima, H. Saiga, M. Okuyama, H. Kayama, E. Kubo, H. Ito, M. Takaura, T. Matsuda, et al. 2009. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *J. Exp. Med.* 206:2747–2760. doi:10.1084/jem.20091703
- Yap, G.S., and A. Sher. 1999. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. *Immunobiology.* 201:240–247.
- Yoshida, H., T. Okada, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi, and K. Mori. 2001. Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6 α and 6 β that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.* 21:1239–1248. doi:10.1128/MCB.21.4.1239-1248.2001
- Zhang, K., and R.J. Kaufman. 2008. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature.* 454:455–462. doi:10.1038/nature07203
- Zhao, Y., D.J. Ferguson, D.C. Wilson, J.C. Howard, L.D. Sibley, and G.S. Yap. 2009. Virulent *Toxoplasma gondii* evade immunity-related GTPase-mediated parasite vacuole disruption within primed macrophages. *J. Immunol.* 182:3775–3781. doi:10.4049/jimmunol.0804190



Identification of a second catalytically active trans-sialidase in *Trypanosoma brucei*

Fumiki Nakatani^{a,1,2}, Yasu S. Morita^{a,b,*}, Hisashi Ashida^{a,3}, Kisaburo Nagamune^{a,4}, Yusuke Maeda^{a,b}, Taroh Kinoshita^{a,b}

^a Department of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan

^b Department of Immunoglycobiology, WPI Immunology Frontier Research Centre, Osaka University, Osaka, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 October 2011

Available online 21 October 2011

Keywords:

Glycosylphosphatidylinositol

Procyclin

Sialic acid

Sleeping sickness

trans-Sialidase

Trypanosoma brucei

ABSTRACT

The procyclic stage of *Trypanosoma brucei* is covered by glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored surface proteins called procyclins. The procyclin GPI anchor contains a side chain of *N*-acetylglucosamine repeats terminated by sialic acids. Sialic acid modification is mediated by trans-sialidases expressed on the parasite's cell surface. Previous studies suggested the presence of more than one active trans-sialidases, but only one has so far been reported. Here we cloned and examined enzyme activities of four additional trans-sialidase homologs, and show that one of them, *Tb927.8.7350*, encodes another active trans-sialidase, designated as TbSA C2. In an *in vitro* assay, TbSA C2 utilized α 2-3 sialyllactose as a donor, and produced an α 2-3-sialylated product, suggesting that it is an α 2-3 trans-sialidase. We suggest that TbSA C2 plays a role in the sialic acid modification of the trypanosome cell surface.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Trypanosoma brucei is a protozoan parasite responsible for African sleeping sickness in humans and a disease called nagana in livestock. It is transmitted by an insect vector, the tsetse fly. The procyclic stage *T. brucei* proliferates in the midgut of the tsetse fly, and is covered by glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins termed procyclins [1]. The GPI anchor of procyclins is modified by a complex poly-*N*-acetylglucosamine side chain, which contains sialic acids as terminal residues [2,3].

Despite the presence of sialylated glycoconjugates on its cell surface, *T. brucei* is unable to synthesize sialic acids *de novo*. The parasite is therefore totally dependent on exogenous sialoglycoconjugates available in the tsetse fly midgut to sialylate procyclins. In order to scavenge sialic acids from the environment, the parasite expresses trans-sialidases that can transfer sialic acids from

host-derived sialoglycoconjugates to terminal β -galactose residues of the GPI side chain by a transglycosylation reaction [4–6].

Trans-sialidases are expressed on the parasite's surface as GPI-anchored proteins [4,5]. Compared with procyclins, which are major GPI-anchored proteins, trans-sialidases account for only a small proportion of the GPI-anchored proteins. We have previously generated mutant *T. brucei* deficient in GPI precursor biosynthesis, by deleting the third mannosyltransferase gene, *TbGPI10* [7]. These mutants synthesize truncated GPIs that are structurally defective in anchoring proteins, but can still be expressed on the cell surface as free (unanchored) GPIs, after being elaborated by a poly-*N*-acetylglucosamine side chain. Strikingly, the side chains of such truncated GPIs were modified by sialic acids because of secreted trans-sialidases. In the absence of the GPI precursor, GPI transamidase, which is intact in *TbGPI10* knockout mutants, mediates the hydrolysis of the hydrophobic GPI anchoring signal at the C-terminus of nascent proteins. The mutant consequently secretes GPI-anchored proteins as soluble forms. trans-Sialidases are therefore secreted into the extracellular milieu, where they can function to elaborate the GPI side chain. This mutant was able to proliferate in the tsetse fly midgut, though less effectively than wild-type parasites, suggesting that free GPI with sialylated side chains was sufficient for the survival and growth of the parasite in the midgut [7,8].

In order to determine if sialic acid was critical for the parasite's survival in the midgut, we took advantage of another GPI biosynthetic mutant that is defective in *TbGPI8* [9], the catalytic component of GPI transamidase. The *TbGPI8* deletion mutant accumulates non-protein-linked GPI molecules, and some of these free GPIs are

Abbreviations: GPI, glycosylphosphatidylinositol; ORF, open reading frame; TLC, thin layer chromatography.

* Corresponding author at: Department of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. Fax: +81 6 6875 5233.

E-mail address: ymorita@biken.osaka-u.ac.jp (Y.S. Morita).

¹ These authors contributed equally to this work.

² Current address: Department of Applied Life Sciences, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, Osaka, Japan.

³ Current address: Division of Integrated Life Science, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan.

⁴ Current address: Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan.

located on the cell surface [10]. However, in contrast to the *TbGPI10* mutant that can secrete an unanchored form of trans-sialidases, the *TbGPI8* mutant cannot cleave the GPI-anchor signal, and nascent proteins are therefore unable to be secreted [8]. These nascent proteins are presumably degraded intracellularly. As a consequence, complete GPI precursors elaborated by poly-*N*-acetylglucosamine side chains are produced, but not sialylated, due to the lack of trans-sialidases. The growth of *TbGPI8* mutants was severely compromised in the tsetse fly midgut [8,10], and we therefore suggested that sialic acid was essential for the growth of the procyclic form of the parasites in the fly midgut [8].

We expressed a known trans-sialidase (*i.e.* TbTS encoded by *Tb927.7.6850*) as a soluble form in the *TbGPI8* knockout mutant in an attempt to restore the proliferation of parasites in the midgut. This complemented strain regained the ability to sialylate surface-exposed free GPIs, and showed an improved rate of proliferation in the midgut. However, the level of infection was lower than that achieved by *TbGPI10* knockout parasites [8].

One possible explanation for these results is that TbTS is not the only trans-sialidase involved in GPI side chain modification. There are nine homologs in the *T. brucei* genome database [6,11] (and this study). A recent report suggested that TbSA C is a sialidase, rather than a trans-sialidase [11]. However, there have been no reports of any other functional trans-sialidases in *T. brucei*. We cloned and expressed a number of these trans-sialidase homologs, and examined their ability to function as trans-sialidase enzymes. Contrary to the previous report, our data indicate that TbSA C is an active trans-sialidase, suggesting that it may be a critical enzyme that works together with TbTS to elaborate the GPI side chains.

2. Materials and methods

2.1. Cell strains and culture

The procyclic form of *T. brucei* strain 427 was used in this study. *TbGPI10* and *TbGPI8* knockout mutants were previously established [7,9]. To create trans-sialidase expression cell lines, the plasmids (50 µg) were linearized at a unique *NotI* site and electroporated into *TbGPI10* or *TbGPI8* knockout *T. brucei* mutants. A clonal cell line was established by limiting dilution. Cells were maintained at 27 °C in SDM-79 medium supplemented with 10% foetal bovine serum, 7.5 µg/ml haemin, and appropriate antibiotics.

2.2. Plasmid construction

Tb927.7.6850 (TbTS) was amplified from the *T. brucei* genome by PCR using the following primers: 5'-CTCTTAAGATGGAGGAACACCACCAACAATGC-3' carrying an *AflIII* site and 5'-CCATGGATCGATAACTGCACTGACGACC-3' carrying *NcoI* and *Clal* sites. This resulted in the amplification of an open reading frame (ORF) excluding the predicted omega site (the site cleaved by GPI-transamidase) and the GPI signal sequence at the C-terminus. The amplified fragment was digested with *AflIII* and *NcoI*. The C-terminal omega site and the GPI signal sequence of TbTS were amplified separately using the following primers: 5'-CCATGGTCTAGAGGTATCCCGAAGGTA TG-3' carrying *NcoI* and *XbaI* sites, and 5'-TGCTCTAGATCTCAA ATCGCCAACACATACATTAAG-3' carrying *XbaI* and *BglIII* sites. Fragments were then digested with *XbaI* and *BglIII*. A FLAG-HAT epitope tag was amplified from pMEEB-FLAG-rPIG-W-FLAG-HAT [12] using the following primers: 5'-CTTAAGCCATGGGACTACAAGGACGACGATG-3' carrying *AflIII* and *NcoI* sites and 5'-TCTAGACTTGTTG TGGGATGAGCG-3' carrying an *XbaI* site. The amplified product was then digested with *NcoI* and *XbaI*. These three fragments were ligated into an expression vector (pPPMCSzeo) digested with *AflIII* and *BamHI*. The expression vector pPPMCSzeo was constructed from

pPPMCS [8] by replacing its hygromycin resistance gene with a phleomycin resistance gene. This expression vector, designated as pPPMCSzeo-TbTS-FH, was designed to express and secrete C-terminally FLAG-HAT-tagged TbTS after processing of the N-terminal signal peptide and the C-terminal GPI signal sequence, when transfected into *TbGPI10* knockout mutants.

An expression vector for *Tb927.8.7350* (TbSA C2) was constructed using a similar four-part ligation. TbSA C2 was amplified using the following primer sets: 5'-CTAGTCTAGAGATGCAAAAGAA GGTACTACC-3' carrying an *XbaI* site and 5'-CCGCCGAGATCTATG CTGACAGTAACTGGAG-3', carrying *SacII* and *BglIII* sites. Fragments were then digested with *XbaI* and *BglIII*. This fragment lacks an N-terminal signal peptide, but includes a C-terminal omega-site and a GPI signal sequence. The signal peptide fragment was amplified from the TbTS gene using the following primers: 5'-CTCTTAA-GATGGAGGAACCTCCACCAACAATGC-3' carrying an *AflIII* site and 5'-TCTAGACCATGGGCCCGCAGCCTTGGAGTCAG-3', carrying *XbaI* and *NcoI* sites, and was digested with *AflIII* and *NcoI*. These two fragments and the FLAG-HAT epitope tag (digested with *NcoI* and *XbaI* as above) were ligated together with pPPMCSzeo. The resultant plasmid, designated as pPPMCSzeo-FH-TbSAC2, was designed to express and secrete TbSA C2 with a FLAG-HAT epitope tag at the N-terminus.

Tb927.2.5280 (TbTS-like D1) was amplified using the following primer sets for the ORF excluding the predicted omega site and GPI signal sequence: 5'-CGGGTACCTTAAGATGCGCGTTGTATAC-CAGCG-3' carrying *KpnI* and *AflIII* sites, and 5'-CATGCCATGGATC-GATAGGGGTACGGAACGCGTGTCT-3' carrying *NcoI* and *Clal* sites. The amplified fragment was ligated as in the pPPMCSzeo-TbTS-FH construction. The resultant plasmid, designated as pPPMCSzeo-TbTSD1-FH, was designed to express and secrete TbTS-like D1 protein carrying a FLAG-HAT epitope tag at the C-terminus.

TbGPI8 knockout mutants expressing a soluble form of TbTS have been generated previously [8]. In order to create a *TbGPI8* knockout mutant expressing a soluble form of TbSA C2, we constructed a vector for the expression of soluble TbSA C2 carrying a FLAG-HAT epitope tag at the N-terminus. To clone the mature form of the protein without the GPI signal sequence, TbSA C2 was amplified using the following primer sets: 5'-CTAGTCTAGAGATGCAAAAGA AGGTACTACC-3' carrying an *XbaI* site, and 5'-TGCTCTAGATC-TAGTTTTTCATTCATCTCGTTTCC-3' carrying *XbaI* and *BglIII* sites. The PCR product was digested with *XbaI* and *BglIII*, and ligated with the TbTS signal peptide fragment, the FLAG-HAT epitope tag, and pPPMCSzeo (prepared as described for pPPMCSzeo-FH-TbSAC2). The resultant plasmid, designated as pPPMCSzeo-FH-TbSAC2sol, encoded a soluble form of TbSA C2, which carried a FLAG-HAT epitope tag immediately downstream of the signal peptide. This plasmid was introduced into *TbGPI8* knockout mutant *T. brucei*.

2.3. Protein purification

The medium (typically 30 ml) containing secreted trans-sialidases was incubated with 30–40 µl of anti-FLAG agarose at 4 °C overnight, with rotary mixing. The resin was washed five times with a buffer containing 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20, and successively with 40 mM HEPES buffer (pH 7.4). Bound enzymes were eluted using the FLAG peptide. FLAG peptide was removed from the eluent by dialysis against 40 mM HEPES buffer (pH 7.4), and protein concentrations were measured using a BCA assay (Pierce), and the purities of the enzymes were determined by SDS-PAGE (7.5% gel) and silver staining. For Western blotting, purified proteins were probed with mouse anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma) followed by horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG antibody (GE Healthcare), and detected by enhanced chemiluminescence (PerkinElmer Life Sciences).

2.4. Enzyme assays

Sialidase and trans-sialidase activities were measured as previously described [8,13,14], with minor modifications. For the assays of sialidase activity, the fluorogenic substrate 2'-(4-methylumbelliferyl) α -D-N-acetylneuraminic acid (4MU-NANA; Sigma) was added to a final concentration of 250 μ M. Lactose was added in some experiments, as indicated. One unit of sialidase activity was defined as the activity that releases 1 μ mol of 4MU/min. For the assays of trans-sialidase activity, enzymes were incubated at 32 °C for 14 h with 400 μ M β Gal-4MU as an acceptor, and 200 μ M α 2,3 sialyllactose (3'SL; Calbiochem) or α 2,6 sialyllactose (6'SL; Calbiochem) as a donor in a buffer containing 40 mM HEPES (pH 7.4). Sialylated products were bound to Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) resin, washed with water, eluted with 1 M HCl, and hydrolysed for 30 min at 95 °C. After hydrolysis, the pH was readjusted to 9.5 and the fluorescence of released 4MU was measured using a microplate reader (excitation 365 nm, emission 450 nm). The sialylated fluorescent product was also detected by TLC (silica gel 60 F₂₅₄; Merck) using chloroform/methanol/water (60:40:10, v/v/v) as a developing solvent. The reaction products were detected by UV light. To examine the linkage of sialylated products, the samples were treated with α 2,3 neuraminidase from *Macrobodella decora* (Calbiochem) [15], or α 2,3,6,8,9 sialidase A from *Arthrobacter ureafaciens* (Prozyme), prior to TLC.

3. Results

In addition to the canonical trans-sialidase TbTS encoded by the ORF *Tb927.7.6850*, we cloned four other trans-sialidase homologs (encoded by *Tb927.5.640*, *Tb927.8.7350*, *Tb927.2.5280*, and *Tb927.7.7480*) from the *T. brucei* genome. *Tb927.5.640* and *Tb927.2.5280* encode proteins that have been designated as TbSA B and TbTS-like D1, respectively (Table 1) [11]. *Tb927.8.7350* is present in tandem with *Tb927.8.7340* in the genome. These two ORF are highly homologous, and the amino acid sequence identity of the gene products is 96%. These two proteins have been designated collectively as TbSA C [11], but here we designated the protein products of *Tb927.8.7340* and *Tb927.8.7350* as TbSA C1 and TbSA C2, respectively, in order to differentiate between these two genes more clearly. The protein encoded by *Tb927.7.7480* has not been described previously, but shows the highest homology with TbSA B (84% amino acid identity), and we therefore designated this protein as TbSA B2. CLUSTAL W multiple sequence alignment

Table 1
trans-Sialidase homologs in the *T. brucei* genome.

Systematic name ^a	Common name	Amino acids	Mass (kDa)	GPI anchor prediction		Reference
				fragAnchor ^b	GPI-SOM ^c	
<i>Tb927.7.6850</i>	TbTS	771	84.5	+	++	[6]
<i>Tb927.7.6830</i>	TbTSsh	427	47.4	-	-	[11]
<i>Tb927.5.640</i>	TbSA B	816	90.3	-	-	[11]
<i>Tb927.7.7480</i>	TbSA B2	816	90.2	-	-	This study
<i>Tb927.8.7340</i>	TbSA C1	748	81.0	++	++	[11]
<i>Tb927.8.7350</i>	TbSA C2	748	81.2	++	++	[11]
<i>Tb927.2.5280</i>	TbTS-like D1	702	77.2	++	++	[11]
<i>Tb11.01.3240</i>	TbTS-like D2	681	75.1	+	++	[11]
<i>Tb927.5.440</i>	TbTS-like E	775	84.6	-	-	[11]

^a Bolded systematic names indicate the genes characterized in this study.

^b (++) Highly probable; (+) potentially false positive; (-) rejected.

^c (++) GPI-anchored; (-) not GPI-anchored or uncertain.

indicated that amino acid residues known to be important for the trans-sialidase function are conserved between TbSA B and TbSA B2 (data not shown). In addition, TbSA B2, like TbSA B, does not appear to contain a GPI anchoring signal, based on prediction software such as fragAnchor [16] and GPI-SOM [17] (Table 1).

It has been reported that several TbTS homologs expressed and purified from bacteria were inactive [11]. Therefore, instead of relying on bacterial expression system, we took advantage of our *T. brucei* GPI mutants, which efficiently secrete proteins with signal peptide and GPI anchoring signal [8]. We first expressed these proteins in *TbGPI10* knockout mutant under the control of the PARP promoter. We designed the cloning so that epitope tags were attached to either the N- or C-terminus of the protein after the signal peptide was removed and the GPI anchor signal was hydrolysed at the omega site in the absence of a mature GPI precursor. We investigated whether or not the resultant soluble proteins were secreted into the culture medium. As previously reported [8], medium from empty vector transformant showed a certain level of sialidase activity due to secretion of endogenous trans-sialidases (Fig. 1A). When the cells expressing canonical TbTS were used, the resultant medium showed an increase in sialidase activity, confirming that our mutant *T. brucei* cell line functions as an efficient protein expression/secretion system. Strikingly, medium from TbSA C2-expressing cells showed a significantly higher level of sialidase activity than empty vector control. In contrast, TbSA D1 expression did not result in an increased level of sialidase activity, suggesting that TbSA D1 is not a functional sialidase under the condition we used. Taken together, among additional TbTS homologs, TbSA C2 appears to function as a sialidase.

The use of *TbGPI10* mutant results in a significant level of background sialidase activity due to endogenous TbTS. In contrast, we have previously shown that *TbGPI8* knockout mutant transfected

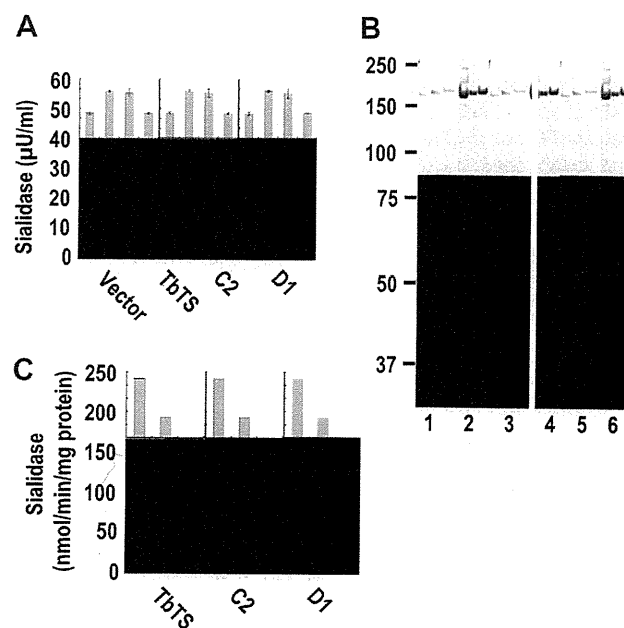


Fig. 1. Purification and sialidase activities of TbTS and its homologs. (A) *TbGPI10* knockout cells were transfected with various trans-sialidase homologs. These cells secrete trans-sialidases as soluble forms. Culture supernatants were examined for sialidase activities. Each measurement was repeated 3 times, and the average and standard deviation are shown. (B) trans-Sialidase homologs were expressed in *TbGPI8* knockout cells, purified by affinity purification, and examined for purity by SDS-PAGE and silver staining (lanes 1–3) or Western blotting (lanes 4–6). Lanes 1 and 4, TbTS; lanes 2 and 5, TbSA C2; lanes 3 and 6, TbTS-like D1. Molecular weight markers are indicated on the left (kDa). (C) Sialidase activities of purified enzymes. Each measurement was in duplicate, and averages are shown.

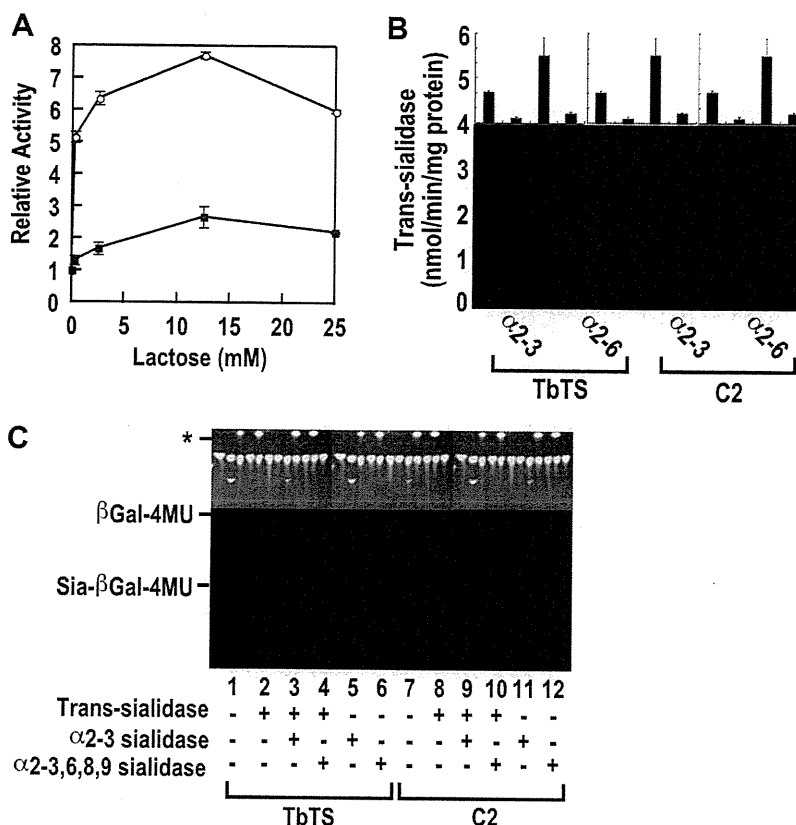


Fig. 2. trans-Sialidase activity of TbSA C2. (A) Activities of soluble forms of TbTS and TbSA C2 are enhanced by lactose. Open circle, TbTS; closed square, TbSA C2. Relative activities to those at 0 mM lactose are shown. The assay was performed in triplicate and averages and standard deviations are shown. (B) TbTS and TbSA C2 were examined for trans-sialidase reaction using α 2,3 or α 2,6 sialyllactose as a donor. The assay was performed in triplicate and averages and standard deviations are shown. (C) The product formed by the trans-sialidase reaction was visualised by TLC separation and fluorographic imaging. The bands denoted by asterisk in lanes 3, 5, 9 and 11 indicate free 4MU, which was apparently generated due to a β -galactosidase, a known contaminant of α 2,3 neuraminidase preparations.

with empty vector does not secrete significant levels of endogenous trans-sialidases [8]. This is because the *TbGPI8* mutant cannot cleave the hydrophobic GPI anchoring signal and therefore cannot secrete unanchored proteins [8]. The culture medium of the *TbGPI8* knockout mutant is therefore devoid of endogenous trans-sialidases, which is advantageous for subsequent protein purification.

We therefore expressed secretory forms of trans-sialidase homologs in *TbGPI8* knockout mutant. Each trans-sialidase homolog carries a FLAG epitope tag, which was used to affinity-purify the secreted trans-sialidases. The use of *TbGPI8* knockout mutant and affinity purification of epitope-tagged protein allowed us to obtain a highly purified protein, which is essentially homogeneous based on silver staining of SDS-PAGE gel (Fig. 1B, left panel). These bands, which were at positions near to the predicted molecular weights, were also detected by Western blotting using anti-FLAG antibodies (Fig. 1B, right panel). Taken together, Fig. 1B excludes a possibility of co-purifying other endogenous trans-sialidase homologs and there was also no significant level of protein degradation. We examined the sialidase activity of the purified enzymes. As shown in Fig. 1C, TbTS-like D1 showed little activity, while TbSA C2 showed a significant level of activity, being consistent with the data described in Fig. 1A. We were also able to express and purify TbSA B and TbSA B2, but we could not detect enzyme activities (data not shown).

We decided to focus on TbSA C2, and examined its enzymatic characteristics. As shown in Fig. 2A, lactose-dependent enhancement of sialidase activity was observed for both TbTS and TbSA C2. Lactose can act as a surrogate acceptor for the trans-sialidase

reaction, suggesting that the secreted soluble TbSA C2 may be an active trans-sialidase. In order to demonstrate the trans-sialidase activity of TbSA C2 more directly, we set up a trans-sialidase assay in which the enzyme was incubated with α 2,3 or α 2,6 sialyllactose (as a donor) and β Gal-4MU (as an acceptor). The product Sia- β Gal-4MU was purified and hydrolysed, and released 4MU was measured. As shown in Fig. 2B, TbSA C2 as well as TbTS were able to mediate the trans-sialidase reaction when α 2,3 sialyllactose was provided as a donor. The α 2,3 sialyllactose-dependent product formation was further demonstrated by TLC (Fig. 2C), in which the product Sia- β Gal-4MU was detected in reactions containing TbSA C2 as a source of enzyme. The product was sensitive to digestion by an α 2,3-specific sialidase, suggesting that the enzyme mediates the production of α 2,3-linked sialic acid. Taken together, we conclude that TbSA C2 is a catalytically active α 2,3 trans-sialidase.

4. Discussion

In this study, we identified a new trans-sialidase (TbSA C2 encoded by *Tb927.8.7350*) in *T. brucei*, in addition to the known trans-sialidase (TbTS encoded by *Tb927.7.6850*). We showed that TbSA C2 was an active enzyme, able to transfer α 2,3-linked sialic acid from donor glycoconjugates to acceptor glycoconjugates. *Tb927.8.7350* exists in tandem with *Tb927.8.7340* in the *T. brucei* genome, and the gene products TbSA C1 and TbSA C2 are highly homologous (96% identity). We did not investigate TbSA C1 in this study, but it is likely that TbSA C1 is also an active trans-sialidase.

We did not detect any enzyme activities from the other three homologs (i.e. TbSA B, TbSA B2 and TbTS-like D1). Among them, TbTS-like D1 lacks the amino acid residues that are predicted to be critical for the catalytic domains of a trans-sialidase [11], and its lack of enzymatic activity is therefore consistent with its structural features.

Almost complete inhibition of trans-sialidase activity has previously been achieved with TbTS RNAi [11]. This observation suggested that TbTS was the major trans-sialidase in *T. brucei*. We demonstrated that TbSA C2 can function as a trans-sialidase. Considering the major contribution of TbTS to trans-sialidase activity, TbSA C2 might make only a minor contribution to the sialylation of GPI side chains. However, this enzyme might act on a specific structural motif within the GPI side chain, or some other, yet-unknown glycoconjugates. We hypothesize that TbSA C2 is a physiologically important enzyme, carrying out modifications critical for the growth of *T. brucei* in the fly midgut. In the light of recent reports that TbSA C2 RNAi affects sialidase activity more significantly than trans-sialidase activity, it is possible that TbSA C2 remodels the sialic acid modifications, rather than simply functioning as an additional trans-sialidase [11]. Future experiments to test the restoration of midgut infectivity of *TbGPI8* knockout mutants expressing soluble forms of both TbTS and TbSA C2 will provide further information on the biological functions of the trans-sialidase gene family in *T. brucei*.

Acknowledgments

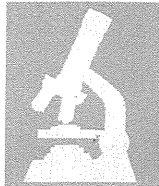
We thank Keiko Kinoshita, Fumiko Mori, and Kana Miyanagi for assistance. This work was supported by grants from MEXT to T.K., and from the Human Frontier Science Program Organization to Y.S.M.

References

- [1] I. Roditi, A. Furger, S. Ruepp, N. Schurch, P. Butikofer, Unravelling the procyclin coat of *Trypanosoma brucei*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 91 (1998) 117–130.
- [2] A. Treumann, N. Zitzmann, A. Hulsmeier, A.R. Prescott, A. Almond, J. Sheehan, M.A. Ferguson, Structural characterisation of two forms of procyclic acidic repetitive protein expressed by procyclic forms of *Trypanosoma brucei*, *J. Mol. Biol.* 269 (1997) 529–547.
- [3] M.A. Ferguson, P. Murray, H. Rutherford, M.J. McConville, A simple purification of procyclic acidic repetitive protein and demonstration of a sialylated glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor, *Biochem. J.* 291 (1993) 51–55.
- [4] M. Engstler, G. Reuter, R. Schauer, The developmentally regulated trans-sialidase from *Trypanosoma brucei* sialylates the procyclic acidic repetitive protein, *Mol. Biochem. Parasitol.* 61 (1993) 1–13.
- [5] L.C. Pontes de Carvalho, S. Tomlinson, F. Vandekerckhove, E.J. Bienen, A.B. Clarkson, M.S. Jiang, G.W. Hart, V. Nussenzweig, Characterization of a novel trans-sialidase of *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes and identification of procyclin as the main sialic acid acceptor, *J. Exp. Med.* 177 (1993) 465–474.
- [6] G. Montagna, M.L. Cremona, G. Paris, M.F. Amaya, A. Buschiazzi, P.M. Alzari, A.C. Frasch, The trans-sialidase from the African trypanosome *Trypanosoma brucei*, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 2941–2950.
- [7] K. Nagamune, T. Nozaki, Y. Maeda, K. Ohishi, T. Fukuma, T. Hara, R.T. Schwarz, C. Sutterlin, R. Brun, H. Riezman, T. Kinoshita, Critical roles of glycosylphosphatidylinositol for *Trypanosoma brucei*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 10336–10341.
- [8] K. Nagamune, A. Acosta-Serrano, H. Uemura, R. Brun, C. Kunz-Renggli, Y. Maeda, M.A. Ferguson, T. Kinoshita, Surface sialic acids taken from the host allow trypanosome survival in tsetse fly vectors, *J. Exp. Med.* 199 (2004) 1445–1450.
- [9] K. Ohishi, K. Nagamune, Y. Maeda, T. Kinoshita, Two subunits of glycosylphosphatidylinositol transamidase, GPI8 and PIG-T, form a functionally important intermolecular disulfide bridge, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 13959–13967.
- [10] S. Lillico, M.C. Field, P. Blundell, G.H. Coombs, J.C. Mottram, Essential roles for GPI-anchored proteins in African trypanosomes revealed using mutants deficient in GPI8, *Mol. Biol. Cell* 14 (2003) 1182–1194.
- [11] G.N. Montagna, J.E. Donelson, A.C. Frasch, Procyclic *Trypanosoma brucei* expresses separate sialidase and trans-sialidase enzymes on its surface membrane, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 33949–33958.
- [12] Y. Murakami, U. Siripanyapinyo, Y. Hong, J.Y. Kang, S. Ishihara, H. Nakakuma, Y. Maeda, T. Kinoshita, PIG-W is critical for inositol acylation but not for flipping of glycosylphosphatidylinositol-anchor, *Mol. Biol. Cell* 14 (2003) 4285–4295.
- [13] S. Schrader, E. Tiralongo, G. Paris, T. Yoshino, R. Schauer, A nonradioactive 96-well plate assay for screening of trans-sialidase activity, *Anal. Biochem.* 322 (2003) 139–147.
- [14] M. Engstler, R. Schauer, R. Brun, Distribution of developmentally regulated trans-sialidases in the Kinetoplastida and characterization of a shed trans-sialidase activity from procyclic *Trypanosoma congolense*, *Acta Trop.* 59 (1995) 117–129.
- [15] M.Y. Chou, S.C. Li, Y.T. Li, Cloning and expression of sialidase L, a NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal-specific sialidase from the leech, *Macrobella decora*, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 19219–19224.
- [16] G. Poisson, C. Chauve, X. Chen, A. Bergeron, FragAnchor: a large-scale predictor of glycosylphosphatidylinositol anchors in eukaryote protein sequences by qualitative scoring, *Genom. Proteom. Bioinf.* 5 (2007) 121–130.
- [17] N. Fankhauser, P. Maser, Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map, *Bioinformatics* 21 (2005) 1846–1852.



藻類の仲間たち



本文:早川昌志¹ 写真提供:西村文秀氏¹, 加藤将博士¹, 末友靖隆博士², 松山幸彦博士³, 金澤篤志氏⁴, 一宮陸雄講師⁵, 桑田晃博士⁶, 山田和正氏⁷, 永宗喜三郎室長⁸, 福士路花氏⁸, 海老根一生博士⁸, 吉見英明氏

Key words : 藻類、大型藻類、微細藻類、複合栄養、原生動物、細胞内共生、二次共生、葉緑体の退化・喪失、クロムアルベオラータ、原生生物、共生藻、奪葉緑体

藻類とは、細胞内に葉緑体を持って、光合成をすることを可能とした生物のことを言います。藻類の仲間は、生物の進化の中で何度も繰り返し創出されてきた多系統群であり、非常に多様な為、その全貌を把握するのは容易ではありません。

それはさておき、まずは、藻類とはどんな仲間たちなのか紹介し、藻類の進化と生き方については、本稿の後半で議論するとしましょう。

大型藻類 Large Algae

藻類という名前を聞くと、日本人だと特に、食卓でよく馴染みのある、ノリとかワカメとかいった「大型藻類」肉眼で見える藻類を思い浮かべると思います。大型藻類は、見ためこそ、陸上植物(コケ、シダ、種子植物)に似ていますが、その大半は進化的起源を異なるものたちばかりです。大型藻類は、緑藻、紅藻、褐藻の3つに分けられます。主要なものは、海藻(Fig. 1)として、海洋に生息していますが、淡水に生息しているものもいます。

緑藻、紅藻、褐藻は、形質的には持っている色素で分類されています。植物や藻類は、光合成をする為に色素を持って、美しい色を持つことにあると言えるでしょう。緑藻は、陸上植物と同じで、クロロフィルaとクロロフィルbという色素を持ち、緑色の姿をしています。紅藻は、クロロフィルaとフィコビリンという色素を持ち、紅色の姿をしています。褐藻は、クロロフィルaとクロロフィルcという色素を持ち、茶色の姿をしています。普段、陸上で目にしている植物たちは緑色をしているので、つい光合成=緑色という感覚がありますが、水中に目を向けてみると、地球上で光合成を支えているのは、緑だけではない、ということがわかります。

ところで、陸上植物とは、どういう存在なのでしょう。緑藻と陸上植物は、同じ光合成色素を持ち、緑

色をしています。これには意味があって、つまり陸上植物とは、緑藻の仲間が水中から陸上に進出して進化した仲間たちなのです。具体的には、緑藻の仲間であるシャジクモ(Fig. 2)のご先祖様からコケ植物が派生し、更にシダ植物、種子植物が派生してきたと考えられています。

進化の道筋を逆に辿っていくと面白い事実が現れます。陸上植物のご先祖様に最も近いとされるシャジクモの、更なるご先祖様はミカヅキモやイカダモといった単細胞性の微細藻類という仲間になってしまいます。しかし、緑藻には、アオサやミルといった多細胞性の大型藻類がたくさんいます。実は、これらの大型緑藻は、シャジクモや陸上植物とは違う単細胞性の緑藻が多細胞化して進化してきたのです。

単細胞性の微細藻類からの多細胞化と大型藻類の出現は、藻類の世界で何度も起こっています。先に紹介した紅藻や褐藻も、それぞれ違う微細藻類から進化してきた存在です。現在の世界では、たまたま淡水に進出した微細緑藻が多細胞化し、陸上に進出して、緑色の植物を創出しましたが[1. McCourt et al. 2004]、もしかしたら、赤い植物や茶色い植物が陸上で繁栄している別のパラレルワールドもあったかもしれませんね。

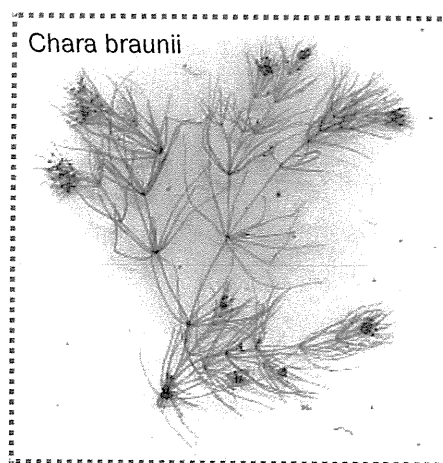


Fig. 2 シャジクモ。漢字では車軸藻と書く。淡水域に分布している、陸上植物に最も近縁な緑藻類。
写真提供:加藤将博士

¹神戸大学、²岩国市立ミクロ生物館、³水産総合研究センター、⁴岡山大学、⁵熊本県立大学、⁶東北区水産研究所、⁷福井県立大学、⁸国立感染症研究所

Fig. 1

海藻(大型藻類)の仲間たち

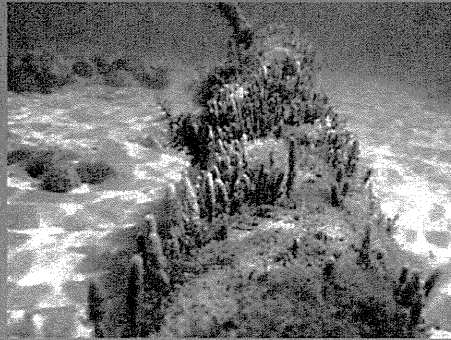
撮影：西村文秀氏

GREEN ALGAE

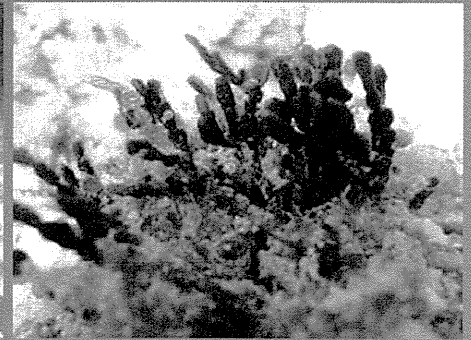
緑藻の仲間



ミル



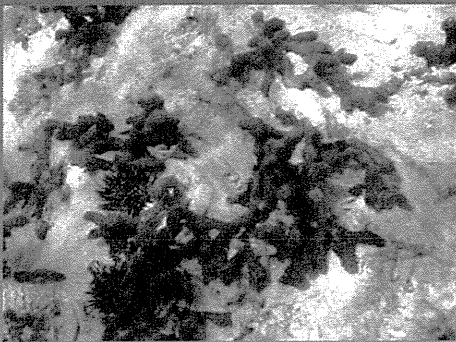
イソスギナ



サボテングサ

RED ALGAE

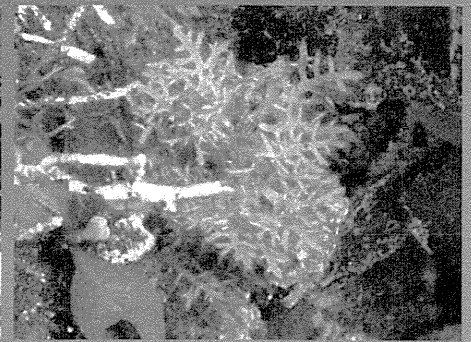
紅藻の仲間



カイメンソウ



ピリヒバ



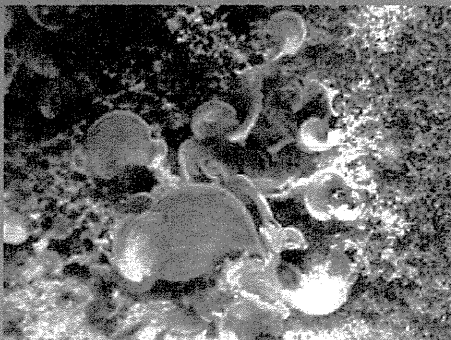
ヒラワツナギソウ

BROWN ALGAE

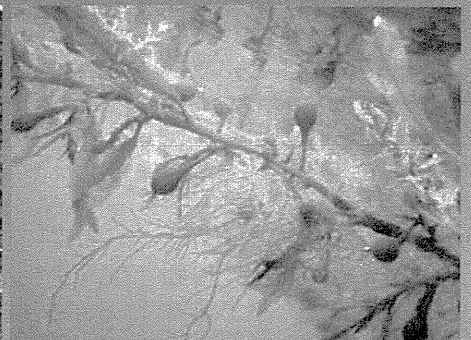
褐藻の仲間



ヒジキ



ウミウチワ



モズク&エンドウモク

微細藻類。単細胞性の藻類の仲間。マイクロな姿で肉眼で見ることはできませんが、多くの仲間たちがいます。多様な微細藻類から、いろいろな大型藻類が進化してきたわけですが、大型藻類の多様性を支えてきた微細藻類の多様性は更に広大です。微細藻類の仲間たちを紹介します。

シアノバクテリア *Cyanobacteria*

シアノバクテリア、日本語では藍藻と呼ばれる仲間たち (Fig. 4) は、藻類の世界でも特殊な立場にあります。なぜなら、他の藻類は真核生物、核を持つ仲間になりますが、シアノバクテリアは原核生物、核を持たない細菌 (バクテリア) の仲間です。更には、光合成小器官である葉緑体も持ちません。シアノバクテリアの細胞自体が光合成器官、葉緑体そのものとして機能しています。その理由は、他の真核藻類の葉緑体は、このシアノバクテリアのご先祖さまが、かつて細胞内共生した存在であるということを理解すればわかるのですが、その話はこの稿のあとにまわしましょう。

ちなみに、シアノバクテリア以外にも、光合成をする細菌には、光合成細菌と総称されるグループが多数存在します。バクテリアの世界の多様さを教えてくださいませぬ。

アーケプラスチダ *Archaeplastida*

日本語では、一次共生藻類とも呼ぶべき仲間たちでしょうか。灰色藻、紅藻、緑藻の3系統群から構成されます。陸上植物に繋がる系統である為、プランタ (*Planta*) とも呼ばれます。

灰色藻 (Fig. 4) は、淡水にのみ生息する青緑色の葉緑体を持つ単細胞性の藻類の仲間です。灰色藻の葉緑体は、シアノバクテリアの構造を色濃く残しており、かつてはシアネレ (*cyanelle*) とも呼ばれていました。かつては、他の藻類の葉緑体とは別物ともされていましたが、現在では、他の葉緑体と同一起源であることがわかっています [2. Bhattacharya and Medlin 1995]。

紅藻の仲間は、大半が多細胞性の大型藻類ですが、単細胞性のもの (Fig. 5) も知られています。鞭毛などの運動装置を持たず不動な仲間たちです。

単細胞性の緑藻 (Fig. 6) は、特に淡水域で多様性を誇っています。複数の細胞が規則正しく配列して、多細胞構造をつくるものも多く、均整のとれたその美しい姿には惚れ惚れしてしまいます。淡水に進出した単細胞緑藻たちの中から、シャジクモや陸上植物が進化したことも緑藻の魅力です。

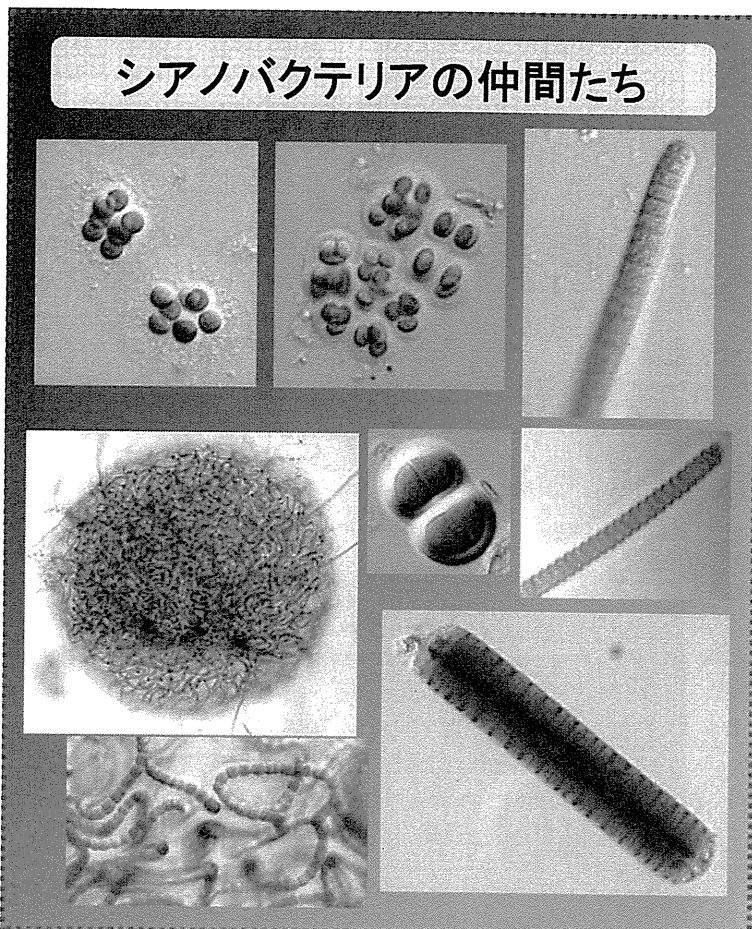


Fig. 3 シアノバクテリアの仲間たち
シアノバクテリアは、細菌の仲間であるが、形態的にも色彩的にもバラエティに富む。多細胞体制のものが多く、細胞同士が連結して、紐状になるものも少なくない。

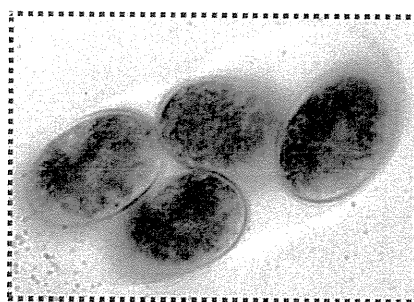


Fig. 4 灰色藻
Glaucocystis nostochinearum
(NIES-1369)

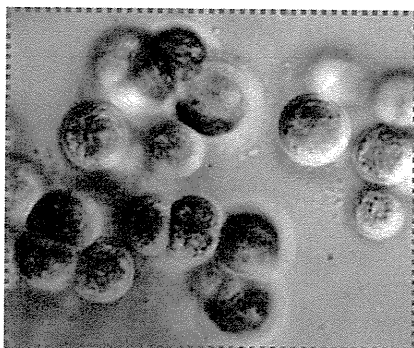
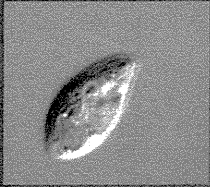


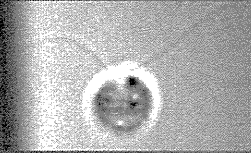
Fig. 5 紅藻 (単細胞性)
Porphyridium aerugineum
(チノリモ, NIES-1957)

Fig. 6

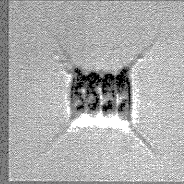
緑藻(微細藻類)の仲間たち



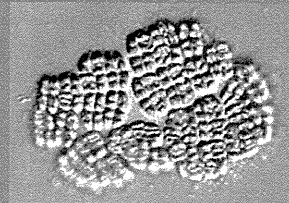
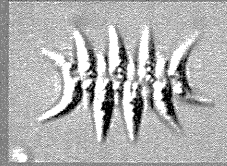
Chlorogonium
(クロゴニウム)



Chlamydomonas
(コナミドリムシ)



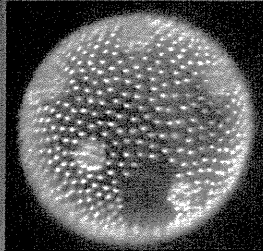
Scenedesmus
(イカダモ)



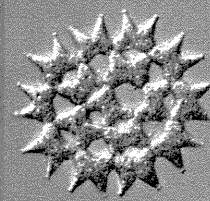
Crucigenia



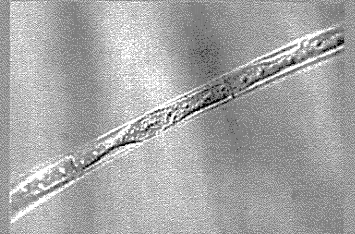
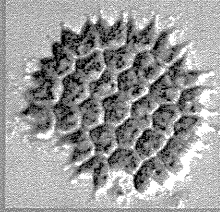
Eudorina
(タマヒゲマワリ)



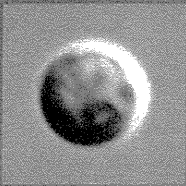
Volvox
(オオヒゲマワリ)



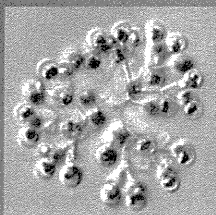
Pediastrum
(クンショウモ)



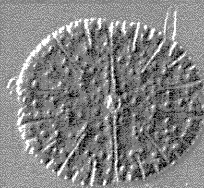
Mougeotia
(ヒザオリ)



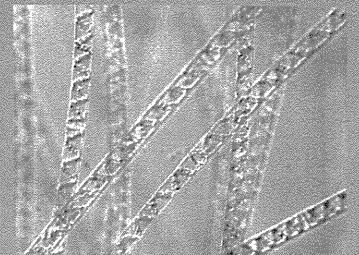
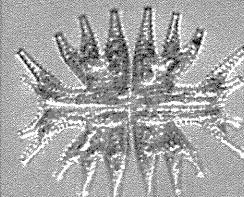
Chlorella vulgaris
(クロレラ)



Dictyosphaerium



Micrasterias
(アワセオオギ, クンショウチリモ)



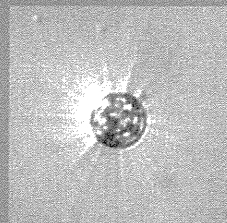
Spirogyra
(アオミドロ)



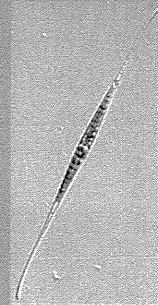
Micractinium



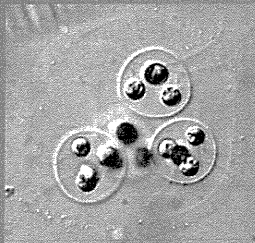
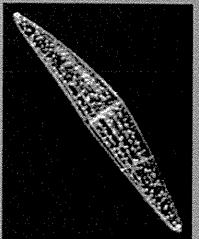
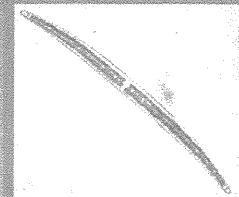
Golenkinia



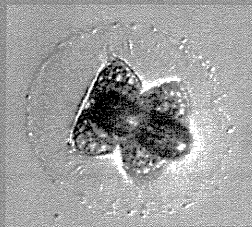
Acanthosphaera



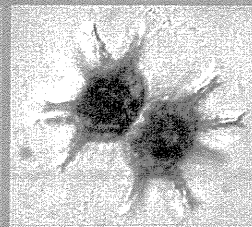
Closterium
(ミカヅキモ)



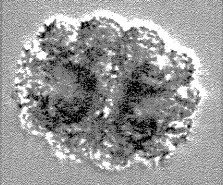
Paulschulzia



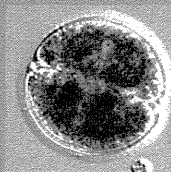
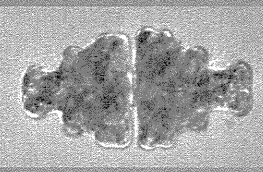
Staurastrum
(ホンガタモ)



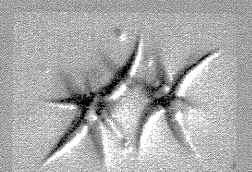
Pleurotaenium
(コウガイチリモ)



Euastrum
(イボタマモ)



Cosmarium
(ツヅミモ)



Ankistrodesmus

ユーグレナ藻・クロララクニオ藻
Euglenophyte and Chlorarachniophyte

ユーグレナ藻とクロララクニオ藻は、とても原生動物「らしい」藻類です。

ユーグレナ藻は (Fig. 8)、ミドリムシ、ウチワヒゲムシ、カラヒゲムシから構成される鞭毛藻の仲間です。特にミドリムシは世間的にもよく知られており、ユーグレナ運動と呼ばれる細胞の伸縮運動を行い動物的特徴を多く残しています。捕食機能こそ持ちませんが、ユーグレナ藻は、ユーグレノゾア(ユーグレナ動物)と呼ばれる多くが捕食性の原生動物のスーパーグループに属し、葉緑体を獲得して光合成をする前は、捕食性の原生動物だったと考えられています[3. Suzaki and Williamson 1986]。ちなみに、ユーグレナという名は、ユーグレナ藻の鞭毛基部で見られる美しい赤色の眼点構造から由来しています。

クロララクニオ藻 (Fig. 7) は、海洋にのみ生息するアメーバ型の藻類です。糸状の仮足を持ち、アメーバ運動をします。種類によっては、個体同士で糸状の仮足が融合し、ネットワーク構造を形成するものがあります。クロララクニオン(緑色のクモの巣)という名前は、この現象から命名されました[4. Geitler 1930]。環境条件によって、環境耐性型の球状細胞や、鞭毛を持った遊泳細胞をつくることが知られています。クロララクニオ藻も、ケルコゾア(アメーバ鞭毛虫)と呼ばれる多くが捕食性の原生動物のスーパーグループに属し、葉緑体を獲得して光合成をする前は、捕食性の原生動物として生活していたのでしょう。

ユーグレナ藻と、クロララクニオ藻は、緑色の葉緑体を持っていますが、いずれも緑藻ではなく、原生動物のスーパーグループに属し、緑藻とは起源を違える存在です。その理由は、後述する二次共生が説明してくれます。

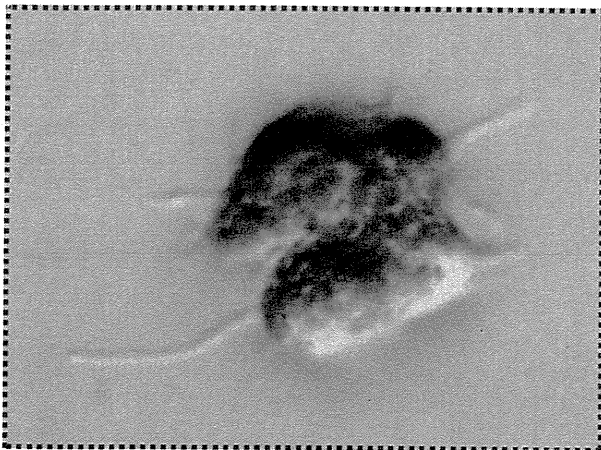
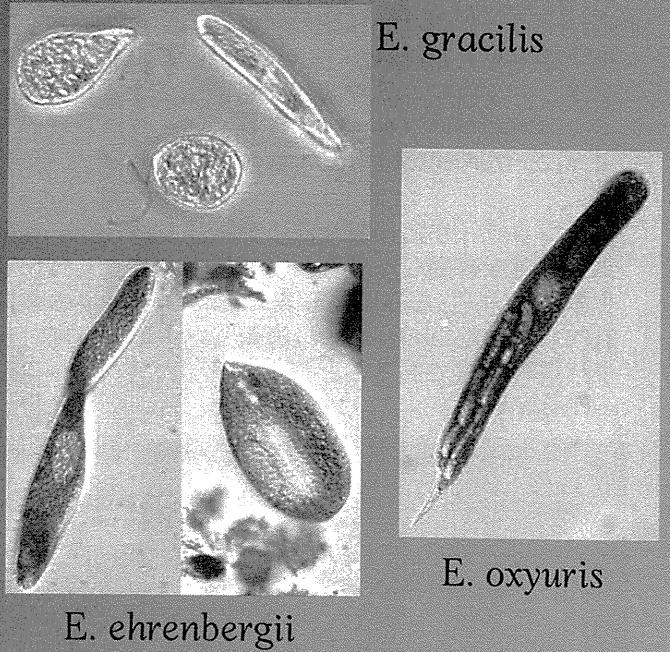


Fig. 7 クロララクニオ藻

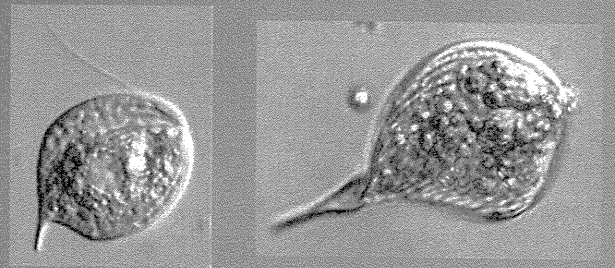
緑色の葉緑体を持ち、糸状の仮足を出すアメーバにて藻類という興味深い原生生物。この写真は、*Chlorarachnion reptans* (NIES-624)。

ユーグレナ藻の仲間たち

ミドリムシ (Euglena) の仲間



ウチワヒゲムシ (Phacus) の仲間



カラヒゲムシ (Trachelomonas) の仲間

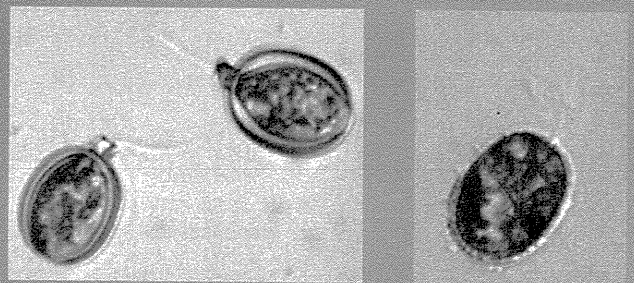


Fig. 8 ユーグレナ藻

ミドリムシ (Euglena) に代表される分類群。全て鞭毛を持って運動性を持つ。また、ミドリムシの仲間は、*E. gracilis* (小型) や、*E. ehrenbergii* (大型) の写真で示すように、細胞の形態がダイナミックに変化するユーグレナ運動を行う。

渦鞭毛藻 Dinophyte

渦鞭毛藻は、原生動物と藻類の間を行ったり来たりしているような、興味深い存在です。この存在は、葉緑体を持たない渦鞭毛虫とセットにして考えなければなりません。渦鞭毛藻と渦鞭毛虫は、基本的な細胞構造は共通しており、細胞の横側を周回し推進力を生み出す横鞭毛と、細胞から垂れて進行方向を決定する縦鞭毛という機能の異なる鞭毛を持ちます。この基本構造を共有しながらも、写真を見ていただければわかるように、この仲間は形態的な多様性に富んでいます。

ヤコウチュウに代表される葉緑体を持たない渦鞭毛虫は、遊泳運動しながら、別の生物を捕食している原生動物です(ちなみに、写真のヤコウチュウの姿は一般的な渦鞭毛虫の姿からは逸脱した栄養体と呼ばれる生活環の状態であることにご注意ください。[5. Fukuda and Endoh 2006])

一方、ツノモなどの代表的な渦鞭毛藻ですが、葉緑体を持ちながらも捕食機能を持っています。つまり、光合成もできるし、餌も食べられるわけです。藻なのか虫なのかわからなくなってしまいます。多くの葉緑体を持つ渦鞭毛藻は、このように捕食機能を兼ね持っており、鞭毛運動だけのみならずご飯も食べるという原生動物そのものな生き方をしています。「藻」とは何か考えさせてくれる仲間たちです。

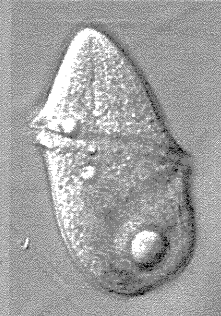
更に、この渦鞭毛虫あるいは渦鞭毛藻には、例えばカンムリムシのように、捕食した別の藻類の葉緑体を自分のものとして使う「奪葉緑体」を行うものもいます。渦鞭毛虫・渦鞭毛藻の仲間たちを見ると、同じ形にも関わらず、葉緑体の有ったり無かったりするものが多く、よくわかりません。この仲間は、よく略して「渦鞭」と呼ぶことが多いのですが、虫とか藻とか、型にはめてはいけない仲間たちなのかもしれません。この「渦鞭」の謎は、この稿の後半で説明します。

Fig. 9

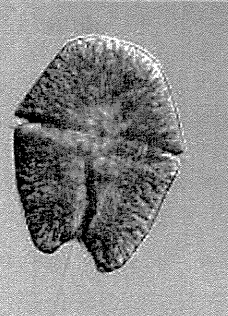
渦鞭毛虫・渦鞭毛藻の仲間たち



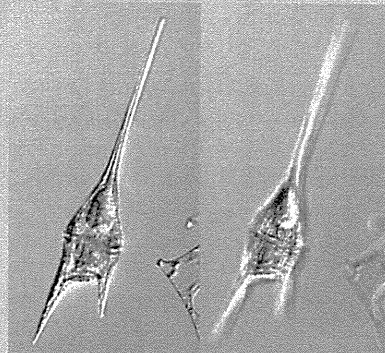
Noctiluca scintillans
ヤコウチュウ
この姿は栄養体で、たらんと伸びているのは触手(非鞭毛)



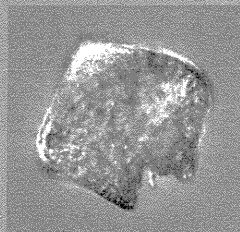
Gyrodinium spirale
オオタテスジムシ



Akashiwo sanguina
アカシオオビムシ



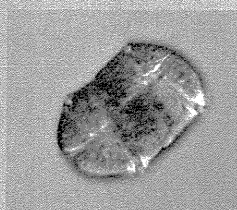
Ceratium furca
フタマタツノモ
左: 細胞内部に焦点(核が見える)
右: 細胞表層に焦点(鎧板が見える)



Protoperidinium
スケオビムシ



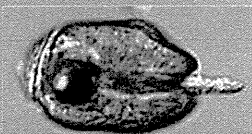
Polykrikos schwartzii
ヨツゴハダカオビムシ
複数の細胞が融合して一団体として振舞う偽群体を形成している



Polykrikos hartmannii
チャイロハダカオビムシ
偽群体をつくり葉緑体を持つ



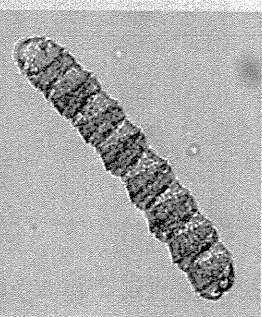
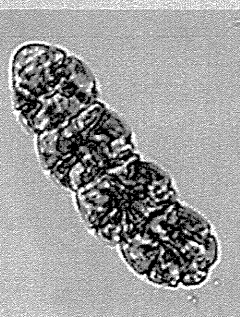
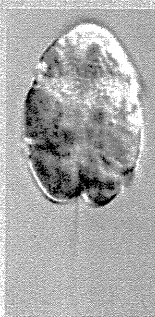
Dinophysis acuminata
カンムリムシ
クリプト藻(Fig. 15)由来の奪葉緑体を持つ



Erythroperidinium agile
ナガジタメダムシ
オセルス眼と呼ばれるレンズ眼と素早く伸縮するピストンを持つユニークな渦鞭

写真提供: 末友靖隆博士・松山幸彦博士
「日本の海産プランクトン図鑑」(共立出版)より
A. sanguina, *P. schwartzii*, *P. hartmannii*, *E. agile*, *C. polykrikoides*

早川撮影写真
N. scintillans, *G. spirale*, *Protoperidinium*, *C. furca*, *D. acuminata*



Cochlodinium polykrikoides
(クサリタスキムシ)

2~8つの細胞が鎖状に連なって、細胞群体をつくる

不等毛藻 *Heterokontophyte*

不等毛藻は、多様な藻類の仲間を含む分類群です。黄金色藻、ラフィド藻、珪藻、パルマ藻、ディクチオカ藻などの微細藻類と、大型藻類の一角である褐藻から構成されます。不等毛藻は、褐藻の色からもわかるように褐色の葉緑体を持つ事と、名前の由来にもなっている機能の異なる二本の鞭毛を持つ事が特徴です。

原生動物や藻類の持つ鞭毛には、マストゴネマと呼ばれる小毛が生えていることが多いのですが、とりわけ不等毛藻の鞭毛は特殊で、管状マストゴネマと呼ばれています。管状マストゴネマは、前鞭毛にあり、本来、鞭毛が波打って起こす推進方向を、逆転させる働きがあるとされます[6. Holwill and Patricia 1974]。多くの鞭毛虫や鞭毛藻は、進行方向とは逆向きに鞭毛を波打たせることで、進行方向への推進力を作り出しますが、この不等毛藻(と後述する無色ストラメノパイル)は、細胞の進行方向に鞭毛を波打たせながら、進行することができるのです。

黄金色藻 (Fig. 11) は、主に淡水に分布している藻類で、オクロモナスのような単細胞のものから、サヤツナギのように多くの細胞が集めた多細胞体制のものまで、さまざまです。黄金色藻の特徴としては、褐色

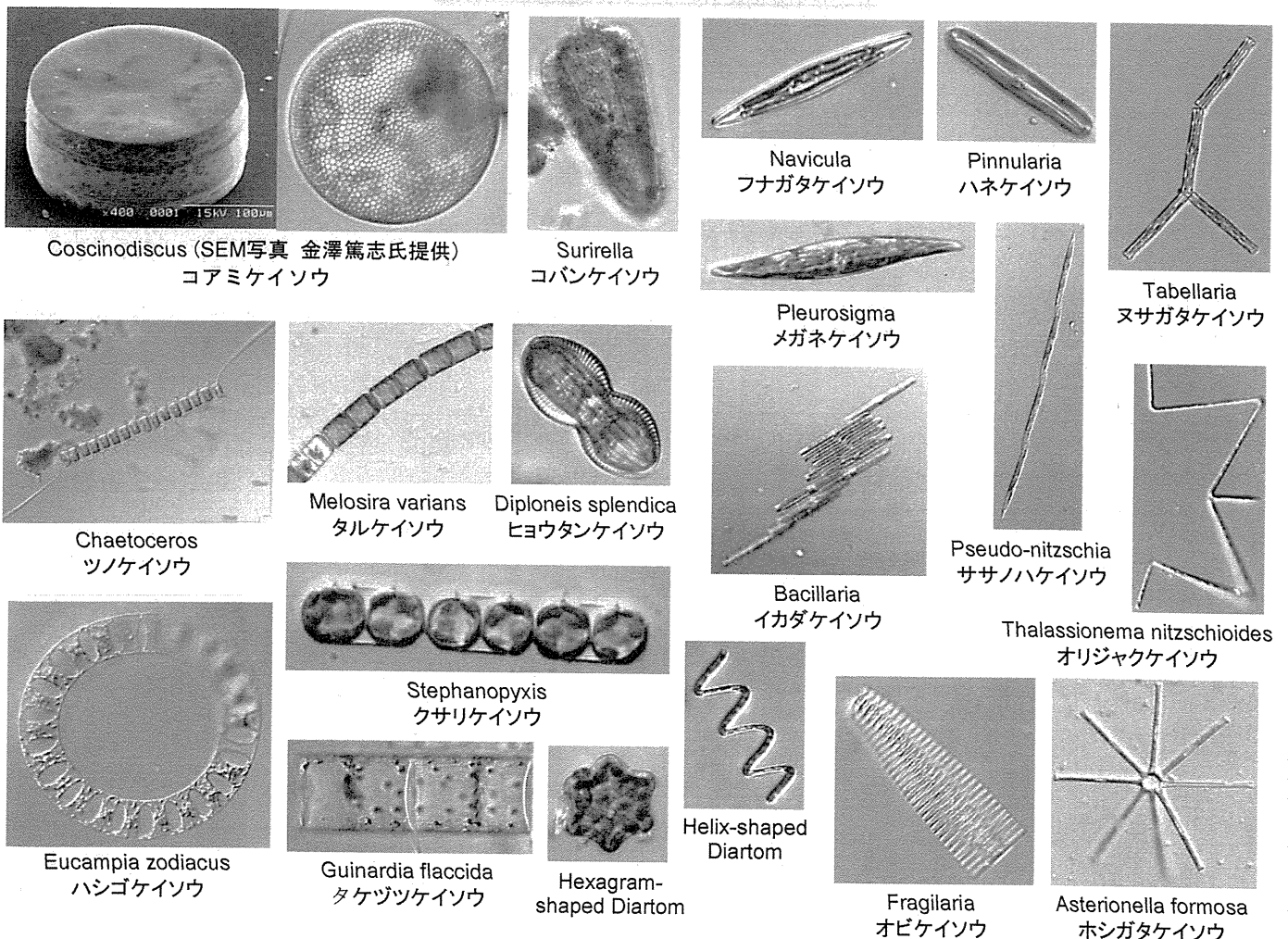
の葉緑体を持って光合成をするのと同時に、捕食機能を持って、バクテリアなどの餌を食べることがあります。餌も食べられる藻類は、先の渦鞭毛藻にもいましたが、生態学的には、植物プランクトン(独立栄養生物)であると同時に、動物プランクトン(従属栄養生物)でもある、複合栄養生物と呼ばれています。光合成をして自分で栄養を作れるにも関わらず、餌も食べることができるなんて、お得感のある生き物です。

不等毛藻には、珪酸質(ガラス質)の殻を持つものが多くいます。まずは、種数は数万種を超え、単細胞生物の世界でも一、二を争う多様性があるとされる珪藻 (Fig. 10) がいます。珪藻は、量的にも、淡水・海水問わず莫大に存在し、地球生態系の中における巨大な光合成生産者とされます。その姿は、ガラスでできた上蓋と下蓋で細胞がパッキングされたような基本構造を持ちつつ複雑な形態形成をして多様化しています。

パルマ藻 (Fig. 14) は、聞き慣れない藻類ですが、海洋に広く分布する藻類です。サイズは数 μm ほどの小さい藻類で、珪酸質のプレートで覆われています。これまで培養が困難とされ、詳しい生物学的情報などは未知に包まれていましたが、近年、培養株が確立して

Fig. 10

珪藻の仲間たち



分子系統解析等の結果、珪藻にもっとも近縁な仲間の一つであることが報告されました[7. Ichinomiya et al. 2011]。今後、珪藻との関連性も含めて、藻類の多様性と進化についての研究が期待される生き物です。

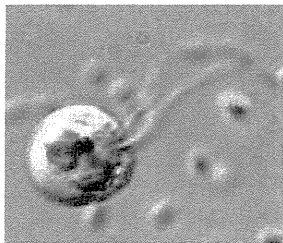
ディクチオカ藻(Fig. 13)は、珪質鞭毛藻とも呼ばれ、美しいガラスの骨格をもった鞭毛藻です。

これらのように、不等毛藻は、とても多様な微細藻類の一群を含みますが、同時に、コンブやヒジキなどの褐藻も含まれています。冒頭で、褐藻は、陸上植物や緑藻とは違うご先祖様から進化したと述べましたが、これらの珪藻や黄金色藻のような単細胞藻類のご先祖様から進化したわけです。不等毛藻の仲間である証拠として、褐藻が生活環の中で作る遊走細胞は、他の黄金色藻などと同じく、2本の鞭毛を持って、前鞭毛には、管状マストゴネマが生えています。

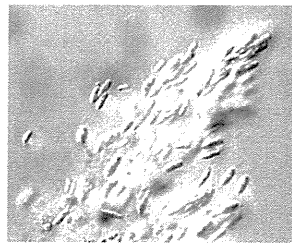
褐藻は、一見すると、大型の緑藻や紅藻の仲間と混同してしまいます。しかし、実際はかけ離れた仲間で、同じ褐色の珪藻などの仲間であるということは、一筋縄ではいかない生物の世界の興味深さを感じさせてくれます。

Fig. 11

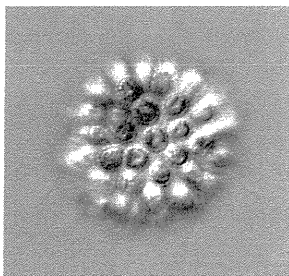
黄金色藻の仲間たち



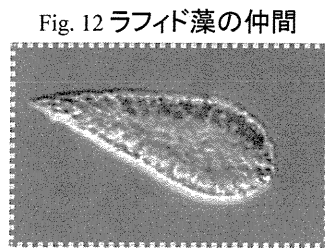
Ochromonas
(ハダカヒゲムシ)



Dinobryon (サヤツナギ)



Synura



Chattonella marina var. antiqua
オオチャヒゲムシ

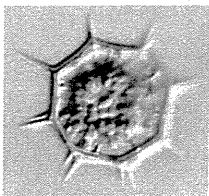
写真提供: 末友靖隆博士・松山幸彦博士
「日本の海産プランクトン図鑑」(共立出版)より

Fig. 12 ラフィド藻の仲間

Fig. 13

ディクチオカ藻の仲間たち

写真提供: 末友靖隆博士・松山幸彦博士
「日本の海産プランクトン図鑑」(共立出版)より



Dictyocha speculum
シリカヒゲムシ

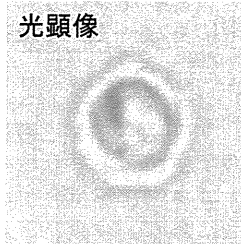


Dictyocha fibula
ヒシシリカヒゲムシ

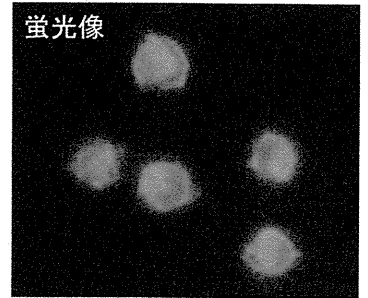
Fig. 14

パルマ藻の仲間たち

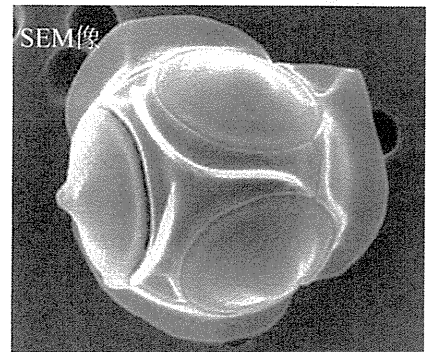
Triparma laevis f. *inornata* (culture)



提供: 山田和正氏

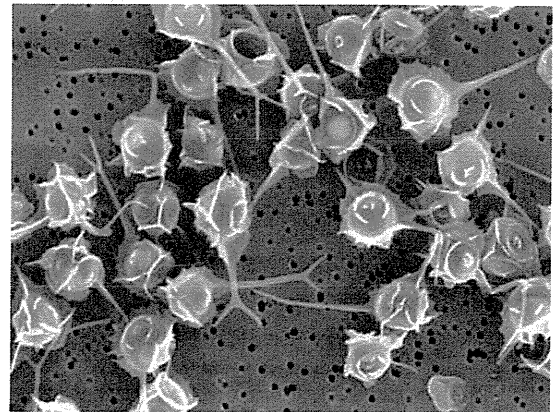


提供: 山田和正氏



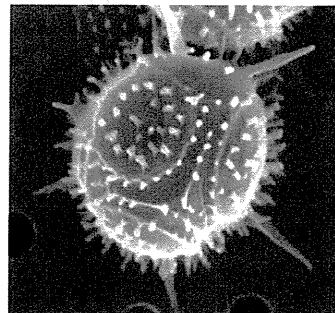
提供: 桑田晃博士

Triparma laevis f. *longispina* (culture)



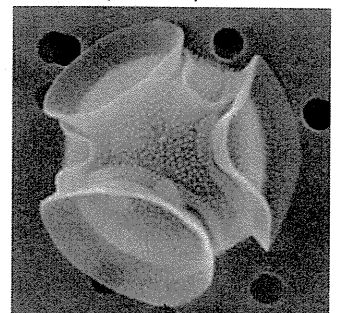
提供: 一宮睦雄講師

Triparma strigata (culture)



提供: 一宮睦雄講師

Tetraparma catinifera (natural)



提供: 桑田晃博士

クリプト藻・ハプト藻 Cryptophyte and Haptophyte

クリプト藻は、淡水・海水問わず広く分布し、それほど珍しくない藻類です。池などの水を取ってくると、2本の鞭毛を持って動き回る姿をよく見ることができます。藻類の進化と多様化に関する「二次共生」のブレークスルーをもたらした存在としても知られ、クリプト藻の葉緑体には二次共生の名残である共生核「ヌクレオモルフ」を見ることができます[8. McFadden 1990]。二次共生については、後半の稿にて。

キロモナス (Cilomonas) は、富栄養な環境で大量に湧くような鞭毛虫で、無色ですがクリプト藻と同じ外見をしています。彼らは、電顕的には葉緑体様構造を持ち、クリプト藻の仲間が葉緑体を退化させた存在であることがわかっています[9. Sepsenwol 1973]。現在では、キロモナスは、クリプト藻クリプトモナス属の1種として分類が再編成されています。

クリプト藻の仲間は、「二次共生」と「葉緑体の退化」という、藻類の進化を考える上で重要となる二つの現象を示してくれる存在です。

ハプト藻は、大多数が海洋に分布しています。ハプト藻は、二本の鞭毛の間から伸びる「ハプトネマ」と呼ばれる糸状構造を持つものが多くいます。ハプトネマは、基物に付着して滑走運動を行ったり、巻き縮めて反対向きへの遊泳逃避反応を行ったり、餌を捕獲して食作用を行うなど、ハプト藻の生活に密接に関わっています。

ハプト藻には、「円石藻」と呼ばれる分類群が存在します。円石と呼ばれる炭酸カルシウムの円盤型の鱗片を細胞表層に持っており、化石としても発見され、石灰岩の形成に関与してきたともされています。

現在の分子系統学は、藻類や原生動物などの原生物の仲間たちの系統関係を明らかにしています。その流れの中で、クリプト藻とハプト藻は、真核生物における系統位置がなかなか定まらないことでも知られており、クロミスタ大系統群に含まれるという説[10. Cavalier-Smith 1993]から、ハクロビア大系統群を新設するという説[11. Okamoto et al. 2009]まで、未だに決着のついていない藻類です。

「藻類」と呼ばれている生物たちを、さまざま見てきました。しかし、彼らは種類によって千差万別で、「葉緑体を持っている」という共通する形質以外は、全く異なる生物たちにも見えてきます。彼らの間には、まだ見落としている抜けた欠片があるようです。

その断絶は「原生動物」の存在と、「細胞内共生」という現象が埋めてくれます。藻類学と原生動物学を進化という視点で統合して、原生物学へと昇華させる概念は、1970年、マーグリスによって提唱されました。後半からは、藻類の多様性を生み出した、原生物の世界の進化について紹介します。



Fig. 15
クリプト藻



Fig. 16
キロモナス

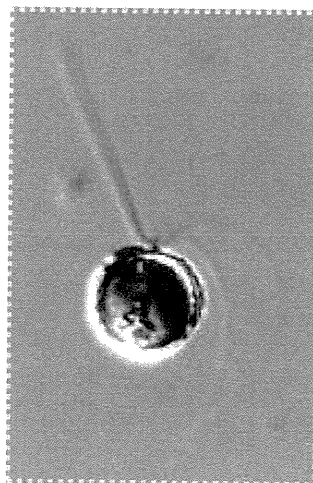
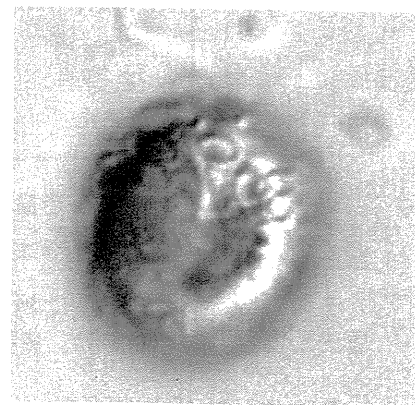


Fig. 17
ハプト藻 *Pleurochrysis roscoffensis* (NIES-8, 円石藻の一種)
右の写真では、細胞表層の円石を見ることができる。



細胞内共生

生物の世界は、進化の働きによって、一つの幹が多くの枝を作るように、多くの種を生み出してきました。多様な藻類。はたして藻類とは、この壮大な生命の樹における1本の枝が、多様に分岐して生じた存在なのでしょうか。しかし、藻類の多様さを見ると、それだけでは説明できない気がしてきます。

単細胞生物の世界には、この雑誌の主題でもある「原生動物」という存在があります。原生動物とは、捕食と運動を基本として生活している単細胞真核生物の仲間です。そして、この原生動物こそが、藻類という多様な存在の説明をしてくれるのです。

藻類には、クロララクニオ藻のようにアメーバのようなものがありました。ユーグレナ藻のように細胞が伸びたり縮んだりするものがありました。渦鞭毛藻や黄金色藻のように餌を食べることができるものがありました。不等毛藻の鞭毛のように水流を逆転させる特殊な管状マストゴネマを持つものがありました。これらの捕食や運動に特化した特徴は、まさに原生動物そのもの

のと言える特徴です。そして実際に、同じ特徴を持つ原生動物が存在しています。

藻類や植物アイデンティティでもある葉緑体は、光合成をする細胞内小器官です。これらの葉緑体について、まだ一般には知られていませんが、生物学の研究者の世界では常識となっている事実があります。

葉緑体とは、かつては光合成をする別の生き物であり、それらが、もともと光合成をしなかった原生動物の細胞の内部に入って、住むようになり、分裂増殖をしながら、やがて今のような葉緑体の姿へと進化している現象です。この理論は、「細胞内共生説」と呼ばれ、1970年に提唱されました[12. Margulis 1970]。

この細胞内共生説によって、藻類という存在の正体が見えてきます。バクテリア(細菌)の仲間であるシアノバクテリア(藍藻)は、葉緑体を持たない藻類と最初に説明しました。この説明は、半分正しく、半分間違っています。なぜなら、シアノバクテリアそのものが葉緑体と言えるからです。現在に至る藻類の進化のシナリオの第一段階は、以下ようになります。

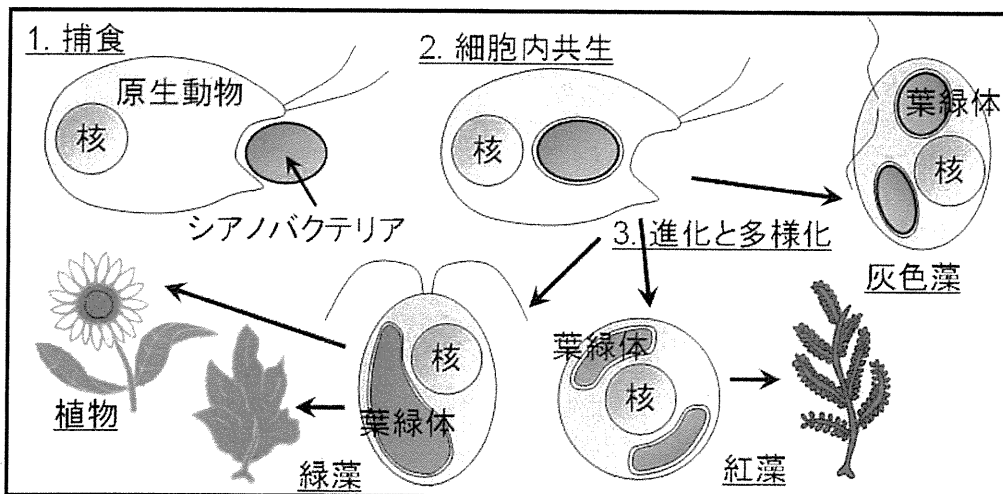


Fig. 18
一次共生の流れ

遠い昔。光エネルギーを自分が生きる為に利用できるシアノバクテリアが出現し、多様化した。

その当時。捕食と運動に特化した真核生物の一群、原生動物も出現しており、多様化していた。

そして。光合成ができるシアノバクテリアの一種と、捕食ができる原生動物の一種が出会い、そのシアノバクテリアを原生動物が捕食した(Fig. 18-1)。

捕食されたシアノバクテリアは、原生動物の内部で通常なら消化され栄養源とされてしまうだろう。しかし、そのシアノバクテリアは、原生動物の内部で生き残り、光合成をした。そして、光合成によって作られた栄養を、原生動物に供給するシステムが構築されたに違いない。その原生動物は、シアノバクテリアを消化するのではなく、効率の良い栄養提供者として住ませることを選択した。原生動物という宿主の中で、

シアノバクテリアが細胞内共生した瞬間である。シアノバクテリアは、原生動物の内部で分裂・増殖し、住み続けた(Fig. 18-2)。

こうして、光合成能を獲得した原生動物は、光合成に依存した生き方に適応して姿を変え、多様化していった。餌がいない為、捕食装置や、餌を求める為の鞭毛装置を喪失したものも多い。紅藻・緑藻・そして植物のように、大型化したものいる(Fig. 18-3)。

内部のシアノバクテリアも変容した。宿主の中で安泰に生きられる為、余分な細胞構成成分を纏わなくなった。細胞壁の喪失、タンパク質合成種の減少。更には、遺伝子すらも減少し、一部は宿主の原生動物に差し出してしまった。

こうして、原生動物は藻類に、シアノバクテリアは葉緑体に、それぞれ共に進化していったのである。

これこそが、アーケプラスチダ、すなわち灰色藻と紅藻と緑藻、そして陸上植物の誕生です。しかも、これらの葉緑体の起源となったシアノバクテリアは同一であるらしく[2]、アーケプラスチダは、シアノバクテリアを共生させた後に、多様化したのでしょう。

ところが、藻類への進化の道のりはまだ終わりではありません。アーケプラスチダは、その名前の意味が示すように「最初の葉緑体」、藻類進化の第一段階に過ぎません。藻類進化の第二段階は、「二次共生」と呼ばれています。

アーケプラスチダは、灰色藻、紅藻、緑藻へと分岐進化していった。一方、葉緑体を獲得し損ねた原生動物たちは依然、捕食によって別の生物を摂取する従属栄養生活者の身であった。シアノバクテリアを獲得し損ねた彼らは、このまま永遠に捕食に依存した生活をしなないといけないのだろうか・・・

ある時、とある原生動物は、葉緑体を持つアーケプラスチダを捕食し、そして、スマートなシステムを構築した。やはり細胞内共生である。しかも、そんな原生動物は数多く出現した。

ケルコゾアと呼ばれる原生動物の仲間で、緑藻を共生させることに成功したものがいる。それが現在のクロララクニオ藻である (Fig. 19-1)。

ユーグレノゾアと呼ばれる原生動物の仲間にも、やはり緑藻を共生たものがいる。現在のミドリムシの仲間たちである (Fig. 19-2)。

紅藻を共生させた仲間は多い (Fig. 19-3)。褐藻を含む不等毛藻、渦鞭毛藻、クリプト藻、ハプト藻。

これらの細胞内共生した緑藻や紅藻たちは、宿主原生動物の中で暮らすうちに、葉緑体以外のさまざまなものを失った。細胞壁、細胞質、そして核。しかし、痕跡(多重膜、ヌクレオモルフなど)を残しているものも多い。

こうして、藻類という分類群は大きく拡大した。

この、第二段階の細胞内共生、真核藻類を更に細胞内共生させて葉緑体化した現象は、二次共生と呼ばれています[13. Gibbs 1981]。

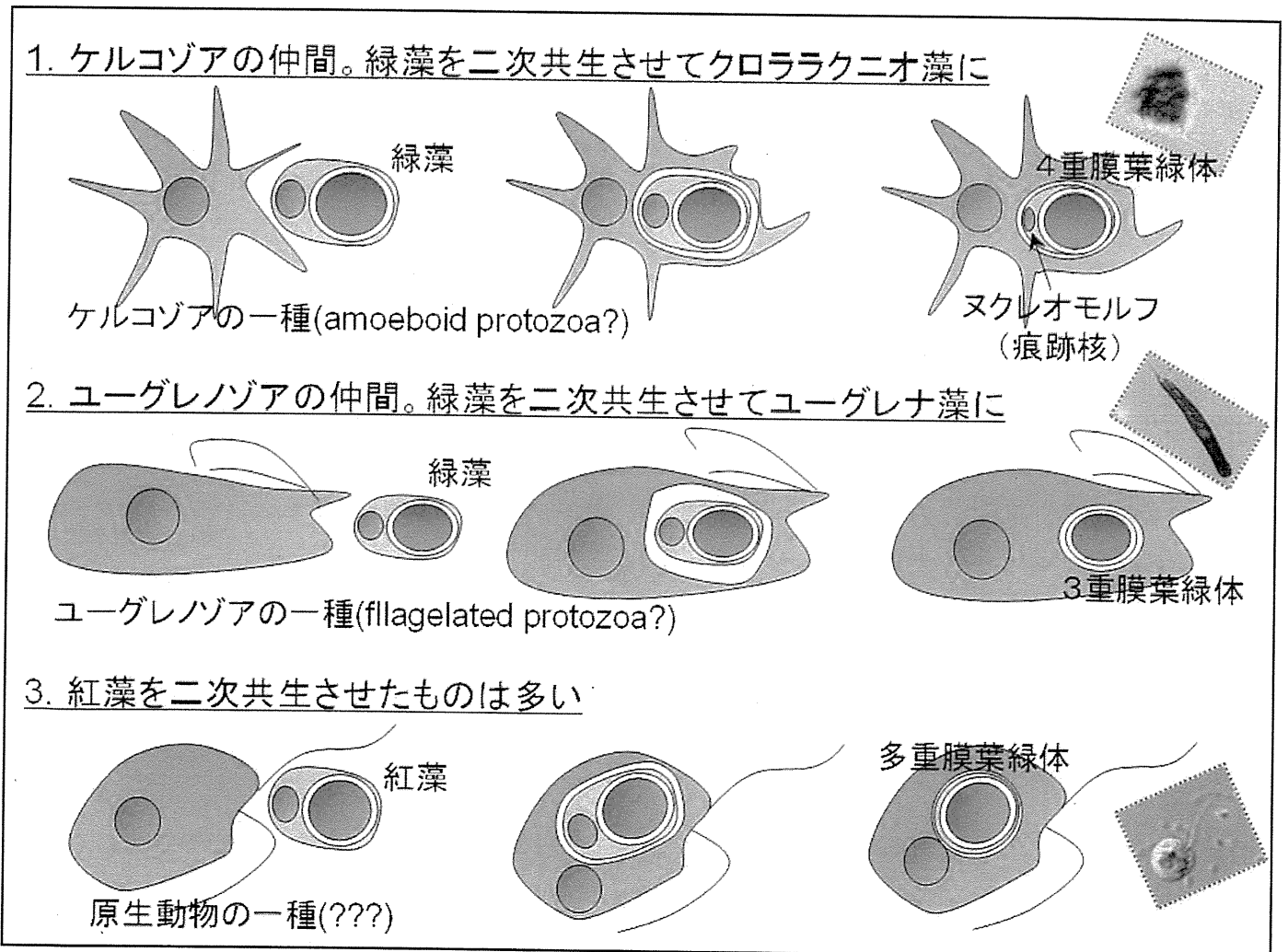


Fig. 19 二次共生の流れ

葉緑体の退化・喪失

藻類のお話はまだまだ終わりません。藻類には見えなくとも、実は藻類なのかもしれない、と考えさせられる生物がまだまだいます。

例えば、マラリア原虫 (*Plasmodium*, Fig. 20a) やトキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*, Fig. 20b-d) がいます。マラリア原虫やトキソプラズマは、感染症の原因となる寄生性の原生動物です。マラリア原虫やトキソプラズマは、光合成こそしませんが、実は葉緑体を持っているようです。いえ、正しくは、葉緑体の名残を持っているというべきでしょうか。

マラリア原虫やトキソプラズマが属する「アピコンプレクサ」と呼ばれる大半が寄生性の原生動物の一群の中には、「アピコプラスト」と呼ばれる独自のゲノ

ムDNAのある細胞小器官を持つものが多いです。そして、このアピコプラストは、色こそありませんが、もともと紅藻由来の二次共生葉緑体であったそうです [14. Cai et al. 2003]。つまり、アピコンプレクサの仲間は、今でこそ動物の身体の中など、光のあたらない所で寄生生活をしているですが、かつては日の下で暮らす藻類だったかもしれないのです。

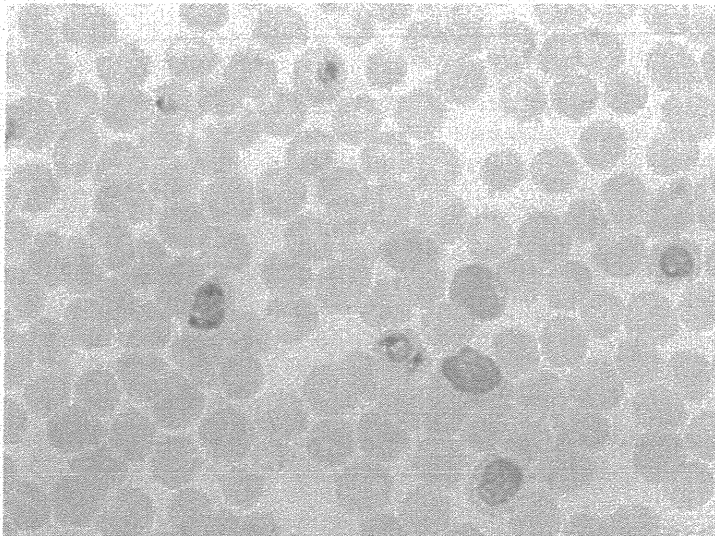
アピコプラストは、光合成機能こそ失っているものの、葉緑体様の代謝を行って原虫の生存に関与しており、アピコプラストを標的とした抗原虫薬の開発も提言されています [15. Waller and McFadden 2005]。

光合成こそしませんが、このように退化した葉緑体を持つとされる藻類？(あるいは原生動物?)は、他にもキロモナス (Fig. 16, クリプト藻) [9] や、ポリトマ (*Polytoma*, 緑藻) [16. Lang 1963] などが知られています

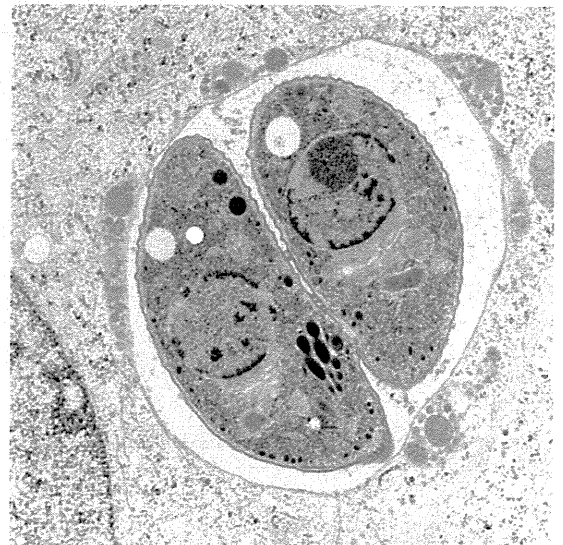
Fig. 20

アピコンプレクサの仲間たち

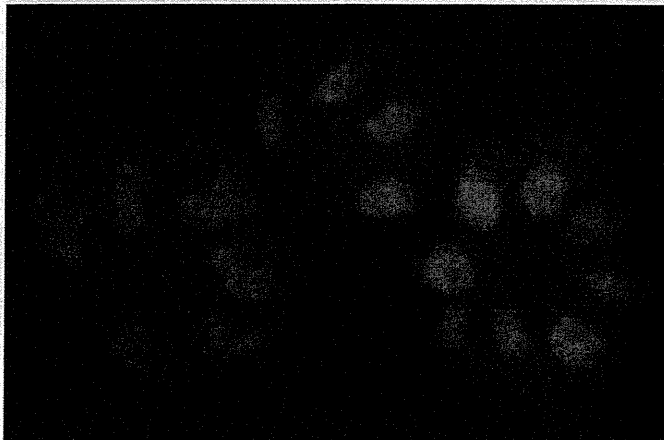
写真提供：永宗喜三郎室長、福士路花氏、海老根一生博士



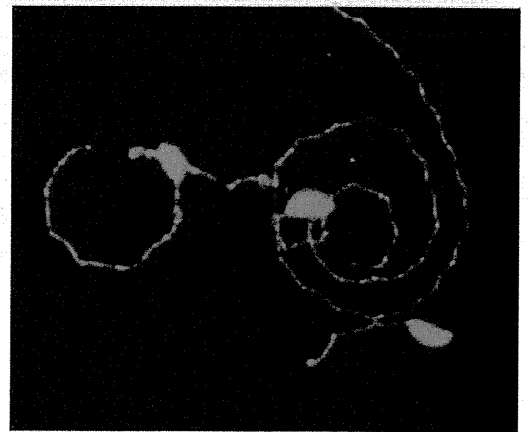
a) マラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) が、マウスの赤血球に寄生している様子。ギムザ染色。



b) 宿主細胞内に寄生しているトキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*)。透過型電子顕微鏡写真。



c) トキソプラズマの蛍光顕微鏡写真。



d) トキソプラズマが滑走運動している様子。このように感染細胞へと移動する。

退化した葉緑体を持つものがあるならば、葉緑体を完全に喪失してしまった生物も多くいます。ミズカビやエキビョウキン(Fig. 25)などの卵菌類は、キノコやカビなどの真菌とは独立に菌様体制を獲得した原生生物で、葉緑体は持っていません。しかし、この卵菌の全ゲノムを解読すると、ゲノム中に葉緑体関連遺伝子が大量に見つかったといいます[17. Tyler et al. 2006]。つまり、彼らもかつては藻類だった可能性があるということです。卵菌類は、遊走子の鞭毛に管状マストゴネマを持っており、すなわち不等毛藻(Fig. 11-14)に近縁であると言われていますが、そもそも葉緑体を持った不等毛藻そのものであったのかもしれませんが。葉緑体を喪失した元藻類というべき存在は、他にもアスタシア(Astasia, ユーグレナ類)などがいます。

ヤコウチュウなどの渦鞭毛虫(Fig. 10)は既に紹介しました。二次共生の概念で考えると、ツノモなどの葉緑体を持つ渦鞭毛藻は、葉緑体を持たない渦鞭毛虫が紅藻を二次共生させたと考えてしまいそうですが、そうではない可能性が示唆されています。先ほど、アピコンプレクサという退化した二次共生葉緑体を持つ寄生原虫の話をしました。このアピコンプレクサと渦鞭毛虫・渦鞭毛藻のグループは、互いに非常に近縁な、いわゆる姉妹群と呼ばれる関係であることがわかっています。しかも、主要な渦鞭毛藻の持つ二次共生葉緑体と、アピコンプレクサの持つ退化した二次共生葉緑体・アピコプラストは、起源が同一であるという報告があるのです[18. Moore et al. 2008]。つまり、すべての渦鞭毛虫・渦鞭毛藻は、アピコンプレクサと分岐する以前から二次共生葉緑体を持っており、その後、一部の渦鞭毛藻が葉緑体を喪失して、ヤコウチュウなどの従属栄養性の渦鞭毛虫になったということです。更に、従属栄養に戻った渦鞭毛虫が、再び別の藻類を二次共生(あるいは三次共生)させているものも知られています[19. Horiguchi and Pienaar 1994]。渦鞭毛虫・渦鞭毛藻の仲間の複雑さはここに由来しているのですね。

話はまだ終わりません。アピコンプレクサと渦鞭毛虫は、更にゾウリムシなどの繊毛虫(Fig. 26)と近縁で、3つの分類群を合せて、アルベオラータ(Alveolata)というスーパーグループを作ります。そして、この繊毛虫類も、遺伝子を調べてみると葉緑体関連遺伝子を持つという報告があります[20. Reyes-Prieto 2008]。さすがに、まだ仮説の域を出ない話ですが、原生動物の世界のスターである繊毛虫すらもかつては藻類だったかもしれないのです。

アルベオラータは、更にストラメノパイルと呼ばれるスーパーグループと姉妹群を作ります。ストラメノパイルとは、基本的に管状マストゴネマを持つ原生動物・藻類の仲間、すなわち、不等毛藻(Fig. 11-14)や卵菌(Fig. 21)、その他葉緑体を持たないラビリンチュラや太陽虫類をまとめた分類群です。ストラメノパイルには、紅藻由来の葉緑体を持つ不等毛藻や、持っていたとされる卵菌が含まれる為、やはり紅藻由来の葉緑体を持つクリプト藻やハプト藻との近縁性が議論さ

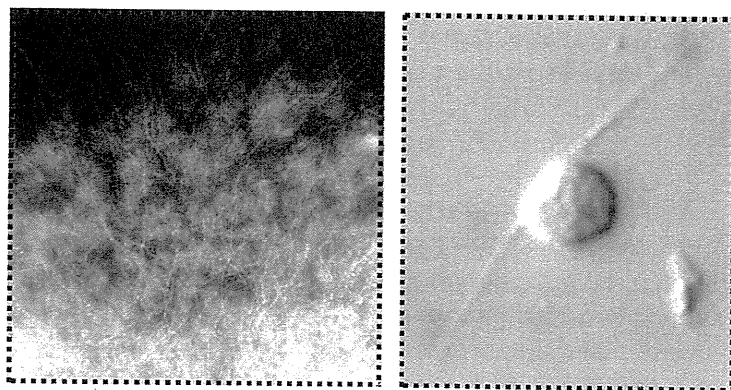


Fig. 21 エキビョウキン (疫病菌, *Phytophthora nicotianae*)
左: 菌糸体、右: 遊走子 (写真提供: 吉見英明氏)

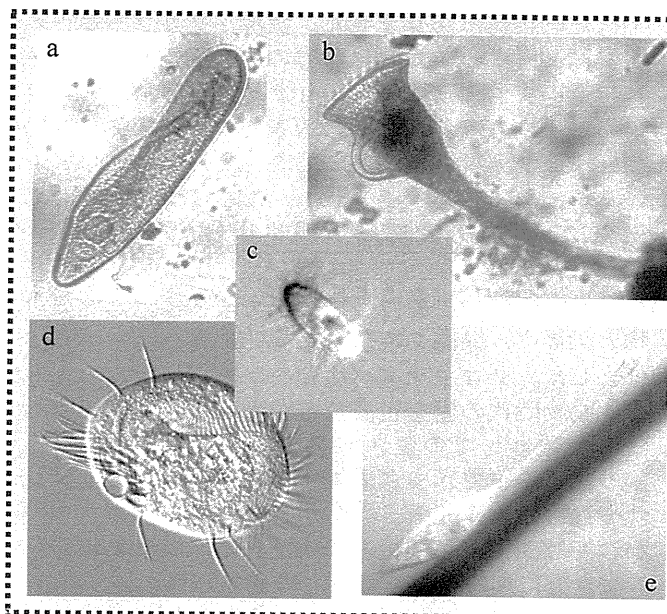


Fig. 22 繊毛虫の仲間たち a. ゾウリムシ (*Paramecium*), b. ラップムシ(*Stentor*), c. シクリディウム(*Cyclidium*), d. ミズヒラタムシ(*Euplotes*), e. ロクロクビムシ(*Lacrymaria olor*)

原生動物の世界で圧倒的な多様性を誇る繊毛虫類も、実はかつては藻類だった可能性がある[20]。

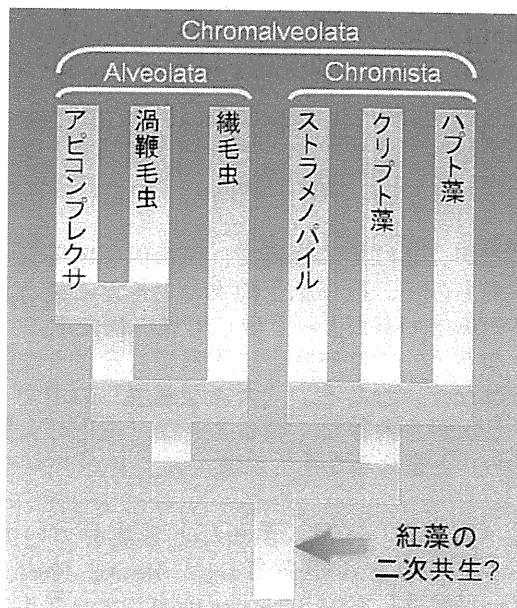


Fig. 28 クロムアルベオラータ仮説