

特集 : Crossover of Protistology ~原生生物をとりまく多様な世界~

Review

クロララクニオン藻の二次色素体の進化

平川 泰久

筑波大学生命環境系 〒300-8572 茨城県つくば市天王台1-1-1

Secondary plastid evolution of chlorarachniophyte algae

Yoshihisa HIRAKAWA

*Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba
1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan*

SUMMARY

Plastids (chloroplasts) have been evolved by multiple endosymbiotic events between a non-photosynthetic protist and a photosynthetic organism. Plants and a part of algae (green and red algae) acquired plastids from a cyanobacterium through a primary endosymbiosis, and many other algal groups have more complex plastids originated from green or red algal endosymbionts via secondary endosymbioses. In these events, many genes residing in the endosymbiont genomes have been transferred to the host nuclear genomes, and bulk of which encode proteins that are targeted back to plastids across multiple membranes. Plastid targeting of nucleus-encoded proteins is essential to maintain and control an endosymbiont as a photosynthetic organelle. Chlorarachniophytes are an algal group possessing extremely complex plastids acquired by the uptake of green algal endosymbiont. Four membrane surround the plastids and a relict nucleus, called the nucleomorph, of the endosymbiont exists in the periplastidal compartment. This review summarizes current studies on protein targeting into complex plastids of chlorarachniophytes and reductive evolution of the endosymbiotically-derived nucleomorph genomes.

Key words: Endosymbiosis, Nucleomorph, Organelle, Plastid targeting, Translocons

はじめに

真核生物がバクテリアなどの単細胞生物を細胞内に取り込み支配する“細胞内共生”と呼ばれる現象は、真核生物全体に普遍的に見られる。代表的なものとして、原始真核生物がプロテオバクテリアを取り込み誕生したのがミトコンドリアであり、植物や藻類の色素体（葉緑体）は光合成細菌シアノバクテリアを起源とすることは広く知られている。一方、原生生物の中には、光合成真核生物を細胞内共生することで色素体を獲得したグループがいる。つまり、シアノバクテリア起源の色素体をもつ真核微細藻類を、従属栄養性の原生生物が二度目の細胞内共生（二次共生）により取り込み色素体とした。この二次共生が、水圏に広く生息する多様な光合成生物を生み出した主要因であるとされている。本稿では、原生生物（宿主）が微細藻類（共生者）を取り込み、オルガネラ化する過程で起きた2つの重要なイベント“共生者から宿主への遺伝子転移”と“核コード色素体タンパク質の輸送機構の獲得”に関して、二次共生由来の単細胞藻類であるクロララクニオン藻の知見を中心にまとめる。

細胞内共生による色素体の進化

今から十億年以上前に、ある従属栄養性の原生生物

物が光合成細菌であるシアノバクテリアの祖先を細胞内に取り込むことで、色素体（葉緑体）は誕生した。この細胞内共生を“一次共生”と呼び、現世の多様な色素体は一部の例外を除いて過去に一度の一次共生に起因すると考えられている。陸上植物と3つの藻類グループ（緑藻、紅藻、灰色藻）は、共通祖先で一次共生による色素体獲得を行い、その後、各グループに分岐したことが分子系統解析により示唆されている（Rodríguez-Ezpeleta et al., 2005; Price et al., 2012）。近年では、上記のグループとは独立した系統でシアノバクテリアを細胞内共生させた有殻アメーバ *Paulinella* が例外的な一次共生として報告されている（中山・石田, 2008）。一方、一次共生由来の色素体（一次色素体）をもつ単細胞性の緑藻や紅藻を、他の従属栄養性の原生生物が細胞内に取り込み色素体とする“二次共生”と呼ばれる現象も知られている（Gould et al., 2008; Keeling, 2010）。紅藻を二次共生させたグループには、不等毛藻、渦鞭毛藻、ハプト藻、クリプト藻、そして光合成能を失った二次色素体（アピコンプラスト）をもつアピコンプレクサなどが知られている。これらのグループの色素体が単一の紅藻を起源とするかは現在も論争中であるが、渦鞭毛藻とアピコンプレクサ、そして不等毛藻の二次色素体は系統的に近縁であることが示唆されている（Janouskovec et al., 2010）。一方、緑藻を取り込んだグループにはユー

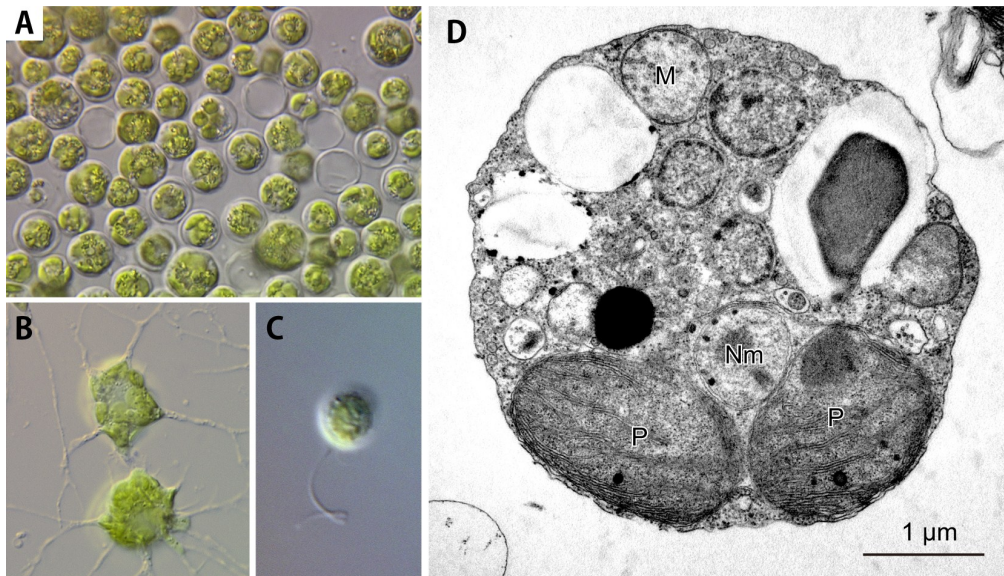


Fig. 1. Morphological diversity of chlorarachniophyte cells. (A) Walled coccoid cells of *Lotharella globosa*. (B) Amoeboid cells of *Amorphochlora amoebiformis*. (C) Flagellate cell with a single flagellum of *Lotharella globosa*. (D) Transmission electron microscopy image of *Bigelowiella natans* (the picture was provided by Marika Akiyama, University of Tsukuba). Nm, nucleomorph; M, mitochondrion; P, plastid.

グレン藻とクロララクニオン藻があり、それぞれ異なる緑藻を二次共生することで二次色素体を獲得したとされている (Rogers et al., 2007) . つまり、過去に最低でも 3 回の独立した二次共生が異なる生物間で起きたことになり、これが現在の光合成生物の系統的多様性を引き起こしたと考えられている。

クロララクニオン藻の色素体起源

クロララクニオン藻は海産の単細胞性藻類で、1930 年の Geitler による *Chlorarachnion reptans* の記載が初めの報告である (Geitler, 1930) . 当時、本種は不等毛藻として誤分類されていたが、約 50 年後の 1984 年に Hibberd と Norris により新設されたクロララクニオン植物門に再分類された歴史を持つ (Hibberd and Norris, 1984) . 現在までにクロララクニオン藻は 8 属 14 種が報告されている (Gile et al., 2010; Ota and Vaultot, 2012) . 細胞形態は多様で、単細胞性の仮足を伸ばしたアメーバ細胞、細胞壁を持つ球状細胞、鞭毛で泳ぐ遊泳細胞が知られており、

希少ではあるが熱帯の沿岸域から外洋まで幅広く分布している (Fig. 1) . クロララクニオン藻は海洋環境において特別な多様性や重要性を持つわけではないが、独特な起源・構造の二次色素体を持つことからオルガネラの共生進化を研究するための材料として注目を集めている。分子系統解析から、クロララクニオン藻はリザリア界のケルコゾア門に属する従属栄養性の原生生物が、UTC グループ (アオサ藻綱, トレボウクシア綱, 緑藻綱) に近縁な緑藻を細胞内共生することで二次色素体を獲得したことが示唆されている (Rogers et al., 2007; del Campo et al., 2013; Tanifuji et al., 2014) . シアノバクテリア起源の一次色素体が 2 枚の包膜に囲まれているのに対して、本藻の二次色素体は 4 枚の包膜構造をしている (Fig. 2) . 内側 2 枚の膜は共生緑藻の色素体膜由来で、外側から 2 枚目の膜は共生緑藻の細胞質膜、最外膜は共生緑藻を取り込んだ際の宿主の食包膜に由来するとされている (Cavalier-Smith, 2000) . そして本藻の二次色素体の最大の特徴として、内側 2 枚と外側 2 枚の色素体膜間領域 PPC (periplastidal compartment) に共生した緑藻の核の痕跡であるヌクレオモルフを保持している (Figs. 1 and 2) . 他の多くの二次共生藻類では、共生藻の核はすでに完全消失しており、ヌクレオモルフをもつ藻類はクロララクニオン藻と紅藻起源の二次色素体をもつクリプト藻だけである。このことから、クロララクニオン藻は二次共生の中間段階を示す色素体をもつ藻類として注目されている。

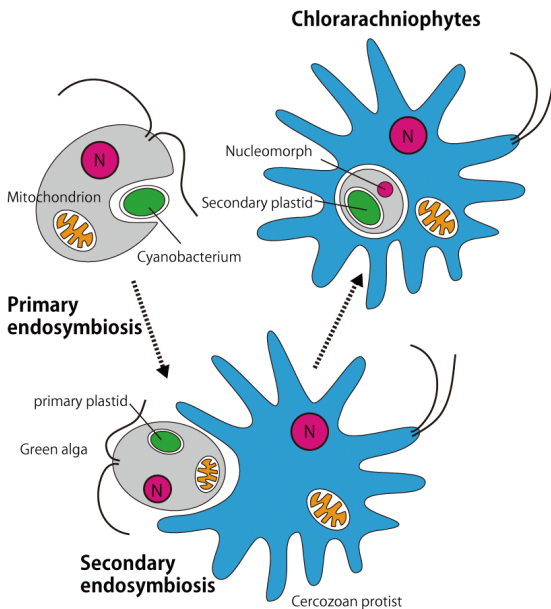


Fig. 2. Plastid evolution via endosymbiotic events. Primary plastids were originated by the uptake of a photosynthetic cyanobacterium, and this event is called primary endosymbiosis. Chlorarachniophyte algae acquired complex plastids (secondary plastids) by the secondary endosymbiosis between a cercozoan protist and a green alga with primary plastid. Chlorarachniophyte plastids are surrounded by four membranes and the relict nucleus, the so-called nucleomorph, of engulfed green alga still exists in the periplastidal compartment. N, nucleus.

共生者の痕跡的な核“ヌクレオモルフ”の進化

細胞内共生により取り込まれた共生者がオルガネラへ進化する過程で、共生者ゲノムにあった遺伝子の大部分は失われるか、または宿主の核ゲノムへと水平伝播したとされている (Timmis et al., 2004) . これにより共生者は、宿主細胞の外では生存できない、宿主依存的なオルガネラへと進化した。一次共生では、取り込まれた共生シアノバクテリアのゲノム (自由生活性のシアノバクテリアのゲノムサイズは数 Mb) は約 200 kb 以下の色素体ゲノムへと縮小しており、最近の研究では、寄生植物のラフレシアや非光合成緑藻のポリトメラ属の色素体ゲノムは完全消失していることが報告されている (Smith and Lee, 2014; Molina et al., 2014) . 色素体ゲノムから消失した遺伝子の多くは宿主の核ゲノムに転移しており、シロイヌナズナの場合、約 25,000 の核コードタンパク質遺伝子内、約 4,500 遺伝子がシアノバクテリア由来であることが推定されている (Martin et al., 2002) . 一方、二次共生でも、色素体関連遺伝子は共生した緑藻や紅藻の核ゲノムから宿主の核ゲノ

ムへと水平伝播しており、多くの二次共生藻類では共生者核が完全に消失している。例外として、クロララクニオン藻とクリプト藻の二次色素体には現在も共生者の痕跡核“ヌクレオモルフ”が見られ、そこには非常に縮小した真核型ゲノムが含まれており、二次共生による共生者ゲノムの進化過程を研究するうえでヌクレオモルフは好適な材料であると言える (Archibald, 2007; Tanifuji and Archibald, 2014)。

クロララクニオン藻のヌクレオモルフは、1984年の Hibberd と Norris の電子顕微鏡観察により初めて報告され (Hibberd and Norris, 1984)、その後の分子実験により、ヌクレオモルフ内には DNA を含む染色体構造が存在することが発見された (Ludwig and Gibbs, 1989; McFadden et al., 1994)。現在までに、クロララクニオン藻では *Bigelowiella natans* (Gilson et al., 2006) と *Lotharella oceanica* (Tanifuji et al., 2014) の 2 種でヌクレオモルフゲノム配列の解読が終了している。これら 2 種のヌクレオモルフゲノムの主要な特徴をまとめると、どちらのゲノムも 3 本の染色体で構成され、サイズは 373 kbp と 611 kbp と一般的な真核型ゲノムと比較して非常に小さい。各染色体の両末端にはテロメア配列 [TCTAGGG]_n と rDNA オペロン (18S - 5.8S - 28S rDNA) が存在し、内部には 284 と 610 個のタンパク質遺伝子、約 20 個の tRNA がコードされている。通常の真核ゲノムに比べてヌクレオモルフゲノムは各遺伝子が非常に密にコードされており、複数の遺伝子が一つの mRNA にオーバーラップして転写される現象も知られている (Williams et al., 2005)。また、ゲノム内の AT 含量も高く (約 70%)、他の共生者由来のゲノム (色素体 DNA やミトコンドリア DNA) と類似した特徴をもつ。興味深いことに、クロララクニオン藻のヌクレオモルフゲノムは高度に縮退しながら、約 1,000 個の極小スプライシング型イントロン (18 から 22 塩基で GT-AG のスプライシング境界配列をもつ) を保持しており、これらは共生者ゲノムにあったイントロンのサイズが大きく縮小したものであると考えられている (Slamovits and Keeling, 2009)。

ヌクレオモルフ遺伝子の内訳をみると、大多数はハウスキーピング (転写, 翻訳, タンパク修飾, DNA 代謝) に関わるものだが、クロララクニオン藻では 17 個の色素体関連タンパク質をコードしている (Gilson et al., 2006; Tanifuji et al., 2014)。このことから、多くのハウスキーピング遺伝子は少数の色素体関連タンパク質を発現させるために存在しており、ヌクレオモルフは色素体の機能に重要な役割を果たしていると考えられる。一方、ヌクレオモルフゲノムは、DNA 合成酵素や一部のリボソームタンパク質など重要な遺伝子を多く欠いており、これらは核コードタンパク質に依存していると考えられてい

る (Gilson et al., 2006; Curtis et al., 2012)。では、ヌクレオモルフは消失過程の途中段階にあるのか? という疑問に関して考えてみると、クロララクニオン藻ではヌクレオモルフゲノムの縮小がほぼ停止していると思われる。系統の異なる 4 種のクロララクニオン藻のヌクレオモルフゲノム (未発表データを含む) を比較したところ、共通して 17 個の色素体関連遺伝子が保存されており、種分化後の色素体関連遺伝子の消失は確認されていない。またハウスキーピング遺伝子に関しても種間でほぼ保存されており、2012 年に解読が終了したクロララクニオン藻 *B. natans* の核ゲノム配列からは種分化後にヌクレオモルフから水平伝播した遺伝子は見つかっていない (Curtis et al., 2012)。これらのことからクロララクニオン藻のヌクレオモルフゲノムは縮退進化の一つの終着点に達していると考えられる。一方、クロララクニオン藻の種間でヌクレオモルフゲノムのサイズや遺伝子数に差異があることも報告されており、これは種分化後に一部のヌクレオモルフゲノムで遺伝子重複と機能未知遺伝子の獲得が起こったことに起因すると考えられている (Tanifuji et al., 2014)。

紅藻起源の二次色素体をもつクリプト藻でも 4 種でヌクレオモルフゲノムの解読が終了しており、クロララクニオン藻と同様、両末端に rDNA オペロンをもつ 3 本の染色体に約 500 のタンパク質が密にコードされたゲノムであることが明らかになっている (Douglas et al., 2001; Lane et al., 2007; Tanifuji et al., 2011; Moore et al., 2012)。3 種のクリプト藻では 31 個の色素体関連遺伝子が保存されており、光合成能を失っている *Cryptomonas paramecium* ではその内 18 個が保存されていた。クロララクニオン藻と同様に、クリプト藻のヌクレオモルフも色素体維持に重要なタンパク質をコードしており、一部の種を除いて縮退進化の終着点に達していると考えられる。なぜ全く異なる系統の二つの藻類グループで構造的に非常に類似したヌクレオモルフゲノムが進化したのかは不明だが、異なる出発点から異なる経路で行き着いた収斂進化の結果であると考えられている (Moore et al., 2012; Tanifuji et al., 2014)。

クロララクニオン藻の二次色素体へのタンパク質輸送機構

細胞内共生の過程で、共生者側から宿主側へと多くの遺伝子が水平伝播しているが、それらの遺伝子の産物である色素体タンパク質は、細胞質で合成された後に色素体へと輸送されている。核コードタンパク質には、細胞質やミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、細胞膜など様々な場所で機能するものがあり、この中から色素体タンパク質を識別して色素体

へと輸送するシステムは、細胞内共生による色素体成立には必要不可欠であった。シアノバクテリア起源の色素体をもつ陸上植物では、数千の色素体タンパク質が核にコードされているが、これらのタンパク質は一般的に、N 末端側に transit peptide と呼ばれる輸送シグナル配列を持っており、2 枚の色素体包膜に存在するタンパク質輸送装置 TOC と TIC (Translocon at the Inner/Outer envelope membrane of Chloroplast) を介して色素体内へと輸送されている (Bruce, 2000; Andrès et al., 2010; Kovács-Bogdán et al., 2010) (Fig. 3) . 一方、緑藻の二次共生により誕生したクロララクニオン藻の二次色素体は 4 枚の包膜

に囲まれ、植物よりも複雑な色素体タンパク質輸送機構をもつ。

2003 年に Archibald らは、クロララクニオン藻 *B. natans* の EST (expression sequence tag) 解析から、78 個の核コード色素体タンパク質が N 末端側に 2 領域から成る輸送シグナル様の伸長配列をもつことを報告した (Archibald et al., 2003) . 一つは疎水的なアミノ酸が豊富な配列で、小胞体輸送シグナル配列 signal peptide と類似する特徴を持ち、もう一つはセリンやアルギニンが豊富で、グルタミン酸やアスパラギン酸を欠く transit peptide 様の配列であった。いずれの配列も保存されたモチーフなどは含まず、伸

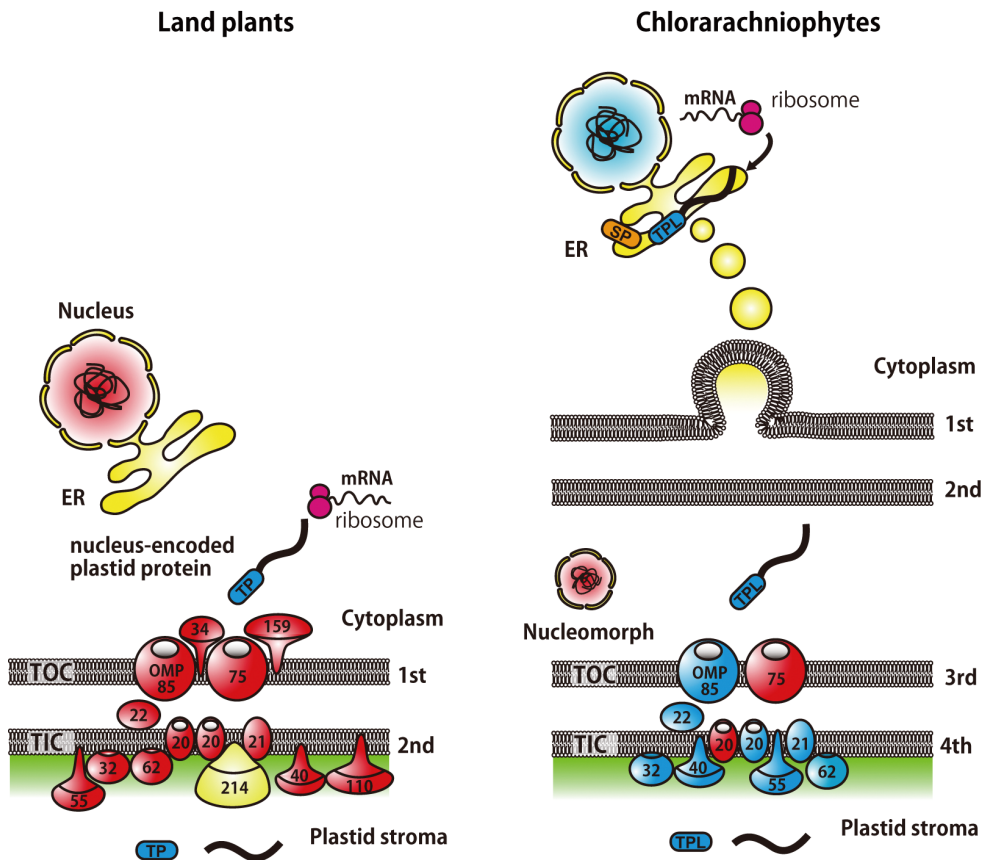


Fig. 3. Trafficking of nucleus-encoded plastid proteins. In land plants, nucleus-encoded plastid proteins are translated by cytoplasmic ribosomes as precursors with an N-terminal transit peptide (TP), and these proteins passed through two plastid membranes via TOC and TIC (Translocon at the Inner/Outer envelope membrane of Chloroplast). Most of TOC and TIC components are encoded by nuclear genomes except for plastid-encoded TIC214. In contrast, chlorarachniophyte plastid is bounded by four membranes. Nucleus-encoded plastid proteins carry an N-terminal bipartite extension consisting of a signal peptide (SP) and a transit peptide-like (TPL) sequence. These proteins are cotranslationally targeted to the endoplasmic reticulum (ER), and transported into the plastid stroma across four membranes. Plant-like TOC and TIC homologs have been identified as putative translocons for the inner two membranes. TOC75 and TIC20 are encoded by nucleomorph genomes, and the others are nucleus-encoded proteins. N-terminal extension sequences are cleaved by peptide processing enzymes.

長配列の詳細な機能は明らかにされていなかった。2008年に我々のグループが、クロララクニオン藻 *Amorphochlora amoebiformis* への緑色蛍光タンパク質 GFP の遺伝子導入系の開発に成功した (Hirakawa et al., 2008)。この技術を用いて核コード色素体タンパク質の N 末端配列の機能解析を行ったところ、色素体タンパク質は signal peptide により小胞体へ輸送された後、分泌経路を介して transit peptide 様配列により色素体内へと輸送されることが明らかとなった (Hirakawa et al., 2009) (Fig. 3)。さらに、transit peptide 様配列の C 末端側の数アミノ酸が小胞体から色素体最外膜への輸送に関与していること、transit peptide 様配列内の正電荷のアミノ酸であるアルギニンやリシンが、4枚の色素体膜の中、内側2枚を通過するのに必要であることも実験的に示された。ヌクレオモルフのある色素体膜間領域 PPC (内側2枚と外側2枚の膜間) に輸送される核コードタンパク質も 2008年に初めて発見され、そのタンパク質の N 末端側には signal peptide と transit peptide 様配列が存在した (Gile and Keeling, 2008)。2010年の我々の研究で、核コードの色素体タンパク質と PPC タンパク質は同様の分泌経路で輸送されているが、transit peptide 様配列内のアミノ酸構成に違いがあり、正に帯電した transit peptide 様配列は色素体内までタンパク質を輸送し、一方、中性、または負に帯電した transit peptide 様配列はタンパク質の輸送を色素体膜間領域で停止することが明らかとなった (Hirakawa et al., 2010)。つまり、クロララクニオン藻は transit peptide 様配列の電荷の違いによりタンパク質の輸送場所を区別している。クロララクニオン藻 *B. natans* の全ゲノム配列を基にした解析では、約 700 と 1,000 の核コードタンパク質が 2 領域から成る輸送シグナル配列をもち、それぞれ色素体内、または色素体膜間領域へと輸送されていることが予測されている (Curtis et al., 2012)。

クロララクニオン藻では、核コード色素体タンパク質が二次共生により増えた色素体外膜を通過するシステムとして、signal peptide と分泌経路を介した輸送機構を進化させたが、興味深いことに、他の紅藻や緑藻を起源とする二次色素体をもつ二次共生藻類でも同様の signal peptide を用いた色素体タンパク質輸送機構が存在する (Bolte et al., 2009)。これは、二次色素体の最外膜が共通して宿主の細胞質膜 (食胞膜) に由来することを考えると合点がいく。真核生物では、小胞体を介した輸送系は主に細胞質膜へのタンパク質分泌に用いられるが、二次共生藻類では色素体最外膜へのタンパク質輸送に従来の小胞体輸送系を利用するようになった。一部の二次共生藻類 (不等毛藻、ハプト藻、クリプト藻) では、色素体最外膜と小胞体が連結しているものも知られ

ており、これらの藻類では、核コード色素体タンパク質は色素体最外膜に直接輸送されている。Signal peptide に続く transit peptide 様の配列に関しても、二次共生藻類の色素体タンパク質に共通して見られる (Patron and Waller, 2007)。しかし、紅藻を起源とする二次色素体をもつ不等毛藻やクリプト藻、アピコンプレクサなどでは、transit peptide 様配列内の芳香族アミノ酸 (フェニルアラニンなど) が二次色素体内膜 2 枚を通過するために重要で、クロララクニオン藻の正電荷のアミノ酸とは異なる (Patron and Waller, 2007)。このことから、紅藻起源と緑藻起源の二次色素体では、一部異なる輸送機構が進化したと考えられる。

クロララクニオン藻の二次色素体の内側 2 枚の包膜は、緑藻の色素体膜由来であるとされているが、これらの膜をタンパク質が通過するために、本藻は緑藻由来の色素体タンパク質輸送機構を利用している。先にも述べた、クロララクニオン藻の色素体タンパク質のもつ transit peptide 様配列は、正電荷のアミノ酸を含む点で緑藻の色素体タンパク質の transit peptide と類似しており、クロララクニオン藻のゲノムには、緑藻の色素体膜で機能しているタンパク質輸送装置の相同遺伝子が存在している。クロララクニオン藻 *B. natans* の全ゲノム配列を対象に、植物や緑藻で同定されている色素体タンパク質輸送装置 TOC, TIC の相同遺伝子を検索した結果、全部で 11 個の相同遺伝子 (TOC75, OMP85 (TOC75 のホモログ), TIC20 (2 コピー), TIC21, TIC22 (2 コピー), TIC32, TIC40, TIC55, TIC62) が同定され、その内 9 つは核ゲノム、2 つはヌクレオモルフゲノムにコードされていた (Hirakawa et al., 2012) (Fig. 3)。植物や緑藻と比較すると、クロララクニオン藻では一部の TOC (レセプター機能を持つ TOC159, TOC34) を失っているものの、チャンネルを形成すると考えられている TOC75, OMP85, TIC20, TIC21 は保存されていた (Fig. 3)。他の二次共生由来の色素体をもつ藻類でも、複数の TOC, TIC 相同遺伝子が発見されており、2 枚の色素体内膜をタンパク質が通過する機構は、共生した緑藻や紅藻から引き継いで利用していると考えられる (Agrawal and Striepen, 2010; Stork et al., 2013)。クロララクニオン藻の外側から 2 枚目の膜に関しては、現在も輸送装置が不明であるが、紅藻起源の色素体をもつ不等毛藻やクリプト藻などでは、小胞体関連分解 (ERAD) に関わる Derlin タンパク質が 2 枚目の色素体膜の輸送装置として同定されている (Hempel et al., 2009)。2 枚目の色素体膜をタンパク質が通過する機構は、クロララクニオン藻と紅藻起源の二次共生藻類との間で異なる進化をとげたと考えられるが、今後の詳しい解析が待たれる。

まとめ

細胞内共生の過程で、共生者ゲノムから宿主核ゲノムへと多くの遺伝子が水平伝播し、共生者は宿主核にコントロールされたオルガネラへと進化した。共生成立において、核コードタンパク質のオルガネラへの輸送機構、つまり核へ転移した遺伝子の産物であるタンパク質をオルガネラへと送り戻す機構は非常に重要であった。二次共生により色素体を獲得したクロララクニオン藻では、宿主がもっていた小胞体輸送システムと共生緑藻から獲得した輸送システムを合わせて、新たな核コード色素体輸送機構を進化させていた。興味深いことに、同様の色素体輸送機構の進化は他の二次共生由来の藻類にも見られた。色素体タンパク質輸送機構の観点から色素体の二次共生が複数回起きた要因を考えてみると、全く新しいタンパク質輸送機構を進化させた一次共生に比べ、既存の宿主と共生者のタンパク質輸送機構を応用した二次共生の方が、共生成立が容易であったのかもしれない。

引用文献

- Agrawal, S. and Striepen, B. (2010) More membranes, more proteins: complex protein import mechanisms into secondary plastids. *Protist*, 161, 672–687. doi:10.1016/j.protis.2010.09.002.
- Andrès, C., Agne, B. and Kessler, F. (2010) The TOC complex: preprotein gateway to the chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta*, 1803, 715–723. doi:10.1016/j.bbamer.2010.03.004.
- Archibald, J. M. (2007) Nucleomorph genomes: structure, function, origin and evolution. *BioEssays*, 29, 392–402. doi:10.1002/bies.20551.
- 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 *Bigeloviella natans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 7678–7683. doi:10.1073/pnas.1230951100.
- Bolte, K., Bullmann, L., Hempel, F., Bozarth, A., Zauner, S. and Maier, U. G. (2009) Protein targeting into secondary plastids. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 56, 9–15. doi:10.1111/j.1550-7408.2008.00370.x.
- Bruce, B. D. (2000) Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends Cell Biol.*, 10, 440–447.
- Cavalier-Smith, T. (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.*, 5, 174–182.
- Curtis, B. A., Tanifuji, G., Burki, F., Gruber, A., Irimia, M., Maruyama, S., Arias, M. C., Ball, S. G., Gile, G. H., Hirakawa, Y. et al. (2012) Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. *Nature*, 492, 59–65. doi:10.1038/nature11681.
- del Campo, J., Not, F., Forn, I., Sieracki, M. E. and Massana, R. (2013) Taming the smallest predators of the oceans. *ISME J.*, 7, 351–358. doi:10.1038/ismej.2012.85.
- Douglas, S., Zauner, S., Fraunholz, M., Beaton, M., Penny, S., Deng, L.-T., Wu, X., Reith, M., Cavalier-Smith, T. and Maier, U. G. (2001) The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. *Nature*, 410, 1091–1096. doi:10.1038/35074092.
- Geitler, L. (1930) Ein grünes Filarplasmodium und andere neue Protisten. *Arch. Protistenkd.*, 69, 615–636.
- Gile, G. H. and Keeling, P. J. (2008) Nucleus-encoded periplastid-targeted EFL in chlorarachniophytes. *Mol. Biol. Evol.*, 25, 1967–1977. doi:10.1093/molbev/msn147.
- Gile, G. H., Stern, R. F., James, E. R. and Keeling, P. J. (2010) DNA barcoding of chlorarachniophytes using nucleomorph ITS sequences. *J. Phycol.*, 46, 743–750. doi:10.1111/j.1529-8817.2010.00851.x.
- 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. U.S.A.*, 103, 9566–9571. doi:10.1073/pnas.0600707103.
- Gould, S. B., Waller, R. F. and McFadden, G. I. (2008) Plastid evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 491–517. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092915.
- Hempel, F., Bullmann, L., Lau, J., Zauner, S. and Maier, U. G. (2009) ERAD-derived preprotein transport across the second outermost plastid membrane of diatoms. *Mol. Biol. Evol.*, 26, 1781–1790. doi:10.1093/molbev/msp079.
- 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. doi:10.1111/j.0022-3646.1984.00310.x.
- Hirakawa, Y., Burki, F. and Keeling, P. J. (2012) Genome-based reconstruction of the protein import machinery in the secondary plastid of a chlorarachniophyte alga. *Eukaryot. Cell*, 11, 324–333. doi:10.1128/EC.05264-11.

- Hirakawa, Y., Gile, G. H., Ota, S., Keeling, P. J. and Ishida, K. (2010) Characterization of periplastidal compartment-targeting signals in chlorarachniophytes. *Mol. Biol. Evol.*, 27, 1538–1545. doi:10.1093/molbev/msq038.
- Hirakawa, Y., Kofuji, R. and Ishida, K. (2008) Transient transformation of a chlorarachniophyte alga, *Lotharella amoebiformis* (chlorarachniophyceae), with *uidA* and *egfp* reporter genes. *J. Phycol.*, 44, 814–820. doi:10.1111/j.1529-8817.2008.00513.x.
- Hirakawa, Y., Nagamune, K. and Ishida, K. (2009) Protein targeting into secondary plastids of chlorarachniophytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106, 12820–12825. doi:10.1073/pnas.0902578106.
- Janouskovec, J., Horák, A., Oborník, M., Lukes, J. and Keeling, P. J. (2010) A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107, 10949–10954. doi:10.1073/pnas.1003335107.
- Keeling, P. J. (2010) The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B Biol. Sci.*, 365, 729–748. doi:10.1098/rstb.2009.0103.
- Kovács-Bogdán, E., Soll, J. and Bölter, B. (2010) Protein import into chloroplasts: the Tic complex and its regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1803, 740–747. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.01.015.
- 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. U.S.A.*, 104, 19908–19913. doi:10.1073/pnas.0707419104.
- Ludwig, M. and Gibbs, S. P. (1989) Evidence that the nucleomorphs of *Chlorarachnion reptans* (Chlorarachniophyceae) are vestigial nuclei: morphology, division and DNA-DAPI fluorescence. *J. Phycol.*, 25, 385–394. doi:10.1111/j.1529-8817.1989.tb00135.x.
- 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. U.S.A.*, 99, 12246–12251. doi:10.1073/pnas.182432999.
- McFadden, G. I., Gilson, P. R., Hofmann, C. J., Adcock, G. J. and Maier, U. G. (1994) Evidence that an amoeba acquired a chloroplast by retaining part of an engulfed eukaryotic alga. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 3690–3694.
- Molina, J., Hazzouri, K. M., Nickrent, D., Geisler, M., Meyer, R. S., Pentony, M. M., Flowers, J. M., Pelser, P., Barcelona, J., Inovejas, S. A. et al. (2014) Possible loss of the chloroplast genome in the parasitic flowering plant *Rafflesia lagascae* (Rafflesiaceae). *Mol. Biol. Evol.*, 31, 793–803. doi:10.1093/molbev/msu051.
- Moore, C. E., Curtis, B., Mills, T., Tanifuji, G. and Archibald, J. M. (2012) Nucleomorph genome sequence of the cryptophyte alga *Chroomonas mesostigmatica* CCMP1168 reveals lineage-specific gene loss and genome complexity. *Genome Biol. Evol.*, 4, 1162–1175. doi:10.1093/gbe/evs090.
- 中山卓郎, 石田健一郎 (2008) もう一つの一次共生? —*Paulinella chromatophora*とそのシアネレー。原生動物学雑誌, 41, 27–31.
- Ota, S. and Vaultot, D. (2012) *Lotharella reticulosa* sp. nov.: a highly reticulated network forming chlorarachniophyte from the Mediterranean Sea. *Protist*, 163, 91–104. doi:10.1016/j.protis.2011.02.004.
- Patron, N. J. and Waller, R. F. (2007) Transit peptide diversity and divergence: A global analysis of plastid targeting signals. *BioEssays*, 29, 1048–1058.
- Price, D. C., Chan, C. X., Yoon, H. S., Yang, E. C., Qiu, H., Weber, A. P. M., Schwacke, R., Gross, J., Blouin, N. A., Lane, C. et al. (2012) *Cyanophora paradoxa* genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants. *Science*, 335, 843–847. doi:10.1126/science.1213561.
- Rodríguez-Ezpeleta, N., Brinkmann, H., Burey, S. C., Roure, B., Burger, G., Löffelhardt, W., Bohnert, H. J., Philippe, H. and Lang, B. F. (2005) Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *Curr. Biol.*, 15, 1325–1330. doi:10.1016/j.cub.2005.06.040.
- Rogers, M. B., Gilson, P. R., Su, V., McFadden, G. I. and Keeling, P. J. (2007). The complete chloroplast genome of the chlorarachniophyte *Bigeloviella natans*: evidence for independent origins of chlorarachniophyte and euglenid secondary endosymbionts. *Mol. Biol. Evol.*, 24, 54–62. doi:10.1093/molbev/msl129.
- Slamovits, C. H. and Keeling, P. J. (2009). Evolution of ultrasmall spliceosomal introns in highly reduced nuclear genomes. *Mol. Biol. Evol.*, 26, 1699–1705. doi:10.1093/molbev/msp081.
- Smith, D. R. and Lee, R. W. (2014) A plastid without a

- genome: evidence from the nonphotosynthetic green algal genus *Polytomella*. *Plant Physiol.*, 164, 1812–1819. doi:10.1104/pp.113.233718.
- Stork, S., Lau, J., Moog, D. and Maier, U. G. (2013) Three old and one new: protein import into red algal-derived plastids surrounded by four membranes. *Protoplasma*, 250, 1013–1023. doi:10.1007/s00709-013-0498-7.
- Tanifuji, G. and Archibald, J. M. (2014) Nucleomorph comparative genomics. *Endosymbiosis*, Löffelhardt, W. (ed.). Springer Wein New York. 197–213. doi:10.1007/978-3-7091-1303-5_11.
- Tanifuji, G., Onodera, N. T., Brown, M. W., Curtis, B. A., Roger, A. J., Wong, G. K.-S., Melkonian, M. and Archibald, J. M. (2014) Nucleomorph and plastid genome sequences of the chlorarachniophyte *Lotharella oceanica*: convergent reductive evolution and frequent recombination in nucleomorph-bearing algae. *BMC Genomics*, 15, 374. doi:10.1186/1471-2164-15-374.
- 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. doi:10.1093/gbe/evq082.
- Timmis, J. N., Ayliffe, M. A., Huang, C. Y. and Martin, W. (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat. Rev. Genet.*, 5, 123–135. doi:10.1038/nrg1271.
- Williams, B. A. P., Slamovits, C. H., Patron, N. J., Fast, N. M. and Keeling, P. J. (2005) A high frequency of overlapping gene expression in compacted eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 10936–10941. doi:10.1073/pnas.0501321102.