
Review

ヌクレオモルフの reductive genome evolution

谷藤 吾朗

Reductive genome evolution in nucleomorphs

Goro TANIFUJI

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

Key words: Endosymbiosis, Cryptomonads, Chlorarachniophytes, Plastid

はじめに

細胞内共生は2つ以上の独立した生物の一方（共生者）が、もう一方（宿主）の細胞に取り込まれ一体となって生活する生物現象であり、時に新たな機能を獲得した生物を誕生させる。全ての真核生物は細胞内共生に由来するミトコンドリア（あるいはそれに由来するオルガネラ）を持ち、また光合成真核生物のもつプラスチド（葉緑体）も細胞内共生を通して成立したことから、細胞内共生は進化の大きな原動力の一つであると据えることが出来る（Gray et al., 1999; Dolezal et al., 2006; Reyes-Prieto et al., 2007; Gould et al., 2008）。2つの生物が1つの生物として成立するためには、様々な遺伝的統合が必要であると考えられるが、その結果の一つとして、共生者側のゲノムの大規模な減少（本稿では reductive genome evolution と呼ぶ）が挙げられる（Martin and Herrmann, 1998; Martin et al., 2002; Keeling et al., 2005; Nakabachi et al., 2006; Archibald and Lane, 2009; McCutcheon et al.,

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

Tel: +1-902-494-6193/Fax: +1-902-494-1355

E-mail: gorot@dal.ca

Received: 26 April 2011; Accepted: 22 July 2011.

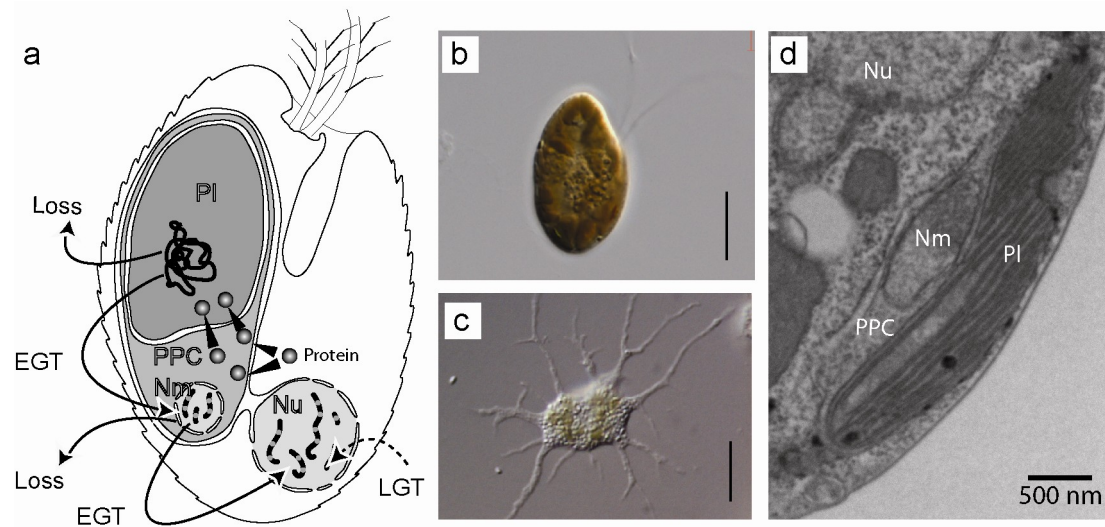


図1 クリプト藻類とクロララクニオン藻類. (a) 細胞内共生におけるゲノム再編の様子を表す模式図. 細胞のモデルはクリプト藻類. (b) クリプト藻類, *Cryptomonas* sp. の光学顕微鏡像. スケールバー = 10 μ m. (c) クロララクニオン藻類, *Amorphochlora amoebiformis* の光学顕微鏡像 (大田修平博士提供). スケールバー = 10 μ m. (d) クリプト藻類, *Guillardia thea* の電子顕微鏡像 (Eunsoo Kim 博士提供). EGT: endosymbiotic gene transfer, Nu: 核,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

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

本稿では reductive genome evolution について, ヌクレオモルフに焦点を当てて紹介したい. ヌクレオモルフは二次共生者の痕跡的核であり, これまでにクリプト藻類とクロララクニオン藻類でのみ見つかっている (Archibald, 2007; Cavalier-Smith, 2002; Moore and Archibald, 2009) (図 1b-d). クリプト藻類は二本鞭毛を持った単細胞性藻類で, 淡水・汽水・海水域に広く生息しており, 海や池の水を観察するとたいいてい見つけることができる (図 1b). クロララクニオン藻類は, アメーバ状, 球状, あるいは一本鞭毛を持った単細胞性藻類で, 現在, 海産種のみが知られている (図 1c). クロララクニオン藻類は, ケルコゾア (アメーバ鞭毛虫) と呼ばれる原生生物のグループに属している. 他の二次共生生物では共生者核を完全に消失しているにもかかわらず, ヌクレオモルフには共生者由来のゲノムが未だに保持されており, 両系統群は核, ヌクレオモルフ, 葉緑体, ミトコンドリアの4つのゲノムを一つの細胞の中に有している. プラスチドやミトコン

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

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

細胞内共生とヌクレオモルフ

細胞内共生説が多くの人々に受け入れられるの

に、ヌクレオモルフは重要な役目を果たしたと言ってよいだろう。Lin Margulis によって細胞内共生説が提唱されたのは 1970 年のことである。70 年代には電子顕微鏡法の技術により様々な生物の微細構造が精力的に研究され、光合成真核生物ではプラスチドが 2 重膜に囲まれたグループ（緑藻類、紅藻類、灰色藻類）と 3 重、4 重で囲まれたグループ（ユーグレナ藻類、渦鞭毛藻類、クリプト藻類、他の Chromophyte（現在のクロミスタの多くを含む藻類））が認識されていた（e.g. Gibbs, 1978; Whatley and Whatley, 1981）。さらに、クロフィルや他の光合成色素等の生化学的研究の成果など、細胞内共生説を支持する証拠が集められていった（e.g. Gray and Doolittle, 1982）。現在では 2 重膜を持つグループは光合成原核生物が無色真核生物に取り込まれ起こった一次共生生物、3, 4 重膜を持つグループがそれによって生じた一次共生生物がさらに他の真核生物に取り込まれた二次（多次）共生生物であることがほぼ受け入れられている（e.g. Reyes-Prieto et al., 2007; Gould et al., 2008）。ヌクレオモルフが初めてクリプト藻から発見されたのは、細胞内共生説が完全に受け入れられる前の 1974 年だった（Greenwood, 1974）。このオルガネラは核と同じように 2 重の膜に囲まれ、また核小体のような構造を有していたために nucleo (核) -morph (の様な形) として名付けられた。注目すべき点は、ヌクレオモルフがプラスチドの 2 枚目と 3 枚目の膜の間、すなわち二次共生者由来の細胞質区画 (periplastidal compartment: PPC) と一致する位置に存在していたことであった（図 1a, d）。さらに Ludwig and Gibbs (1985) によりヌクレオモルフには DNA が含まれていることが示され、ヌクレオモルフは二次共生者の痕跡の核であると示された。

1984 年にはクロララクニオン藻類からもヌクレオモルフが発見され（Hibberd and Norris, 1984）、さらにヌクレオモルフとプラスチドのゲノムにコードされる遺伝子による系統解析から、クリプト藻類は紅藻類、クロララクニオン藻類は緑藻類を共生者の起源とすることが明らかにされた（Douglas et al., 1990; McFadden et al., 1995; Cavalier-Smith et al., 1996; Ishida et al., 1997; Douglas and Penny, 1999; Ishida et al., 1999）。また、近年では真核生物は少なくとも 6 つのスーパーグループに分けられることが示されているが、クリプト藻類の宿主はクロムアルベオラータ、クロララクニオン藻類の宿主はリザリアに属している（Burki et al., 2009; Hampel et al., 2009）。すなわち、両系統群は宿主も共生者も全く異なる系統の生物を起源としており、細胞内共生が独立した系統で複数回起こったことを強力に証明する生物である。他の二次共生生物は二次共生者核を完全に消失しているため、クリプト藻

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

ゲノム構造からみるヌクレオモルフの収斂進化

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

ヌクレオモルフゲノムサイズはこれまでに知られている真核型ゲノムとしては最も小さく、クリプト藻類では 0.45-0.87 Mbp、クロララクニオン藻類では 0.33-1 Mbp とゲノムサイズも比較的似ている（Silver et al., 2007; Tanifuji et al., 2010; Ishida et al., 2011a）。自由生活性の真核生物は比較的ゲノムサイズが小さいものでも紅藻類 Cyanidiales で 10-16 Mbp（Moreira et al., 1994; Muravenko et al., 2001; Matsuzaki et al., 2004）、緑藻類 *Micromonas* では約 20 Mbp（Worden et al., 2009）、*Ostreococcus* では 12.6 Mbp であるので（Derelle et al.,

2006), ヌクレオモルフは起源種に近縁な生物に比べて, 少なくとも 10% 以下までゲノムサイズが縮小しているといえる. 図 2 にクリプト藻類とクロララクニオン藻類のヌクレオモルフゲノムサイズと系統関係を示した. 図で示されたように, 両者のヌクレオモルフゲノムサイズはそれぞれの主要クレードの中である程度多様性があるが, 例えばクリプト藻類の *Rhodomonas* クレードの 650-845 kbp, *Hemiselmis* + *Chroomonas* クレードの 560-815 kbp のように, クレード間のヌクレオモルフゲノムサイズがオーバーラップしている. このことは, 少なくともそれぞれのクリプト藻類がそれぞれの系統に分岐した後もヌクレオモルフのゲノムサイズが変化したということを示唆している. さらに, *Cryptomonas* 属では 18S rDNA 配列の比較では遺伝的距離が非常に近いのにも関わらず, 最大で 40% ものヌクレオモルフゲノムサイズの差が観察されていることから, ヌクレオモルフのゲノムサイズの変化 (おそらくゲノム縮小) がごく最近でも起こっている可能性が示唆されている (Tanifuji et al., 2010).

これまでにクリプト藻類では *Guillardia theta* (Douglas et al., 2001), *Hemiselmis andersenii* (Lane et al., 2007), *Cryptomonas paramecium* (Tanifuji et al., 2011) の 3 種, クロララクニオン藻類では *Bigelowiella natans* (Gilson et al., 2006), 計 4 種のヌクレオモルフゲノムが完全解読されている. それぞれのヌクレオモルフゲノムの概要を表 1 に示した. ヌクレオモルフゲノムの G + C 含有量は 25-35% 程度であり, 非常に AT-rich なゲノムである. この特徴はプラスチドやミトコンドリア, 昆虫の腸内細菌など多くの reductive genome にも見られる特徴である (Moran, 1996; Nakabachi et al., 2006; Smith, 2009). 遺伝子間領域は平均で 95-130 bp 程度, 遺伝子密度は 0.93-1.10 kbp/gene と, ゲノムに対し遺伝子が密に詰め込まれたような, 非常にコンパクトなゲノム構造である. Lane et al. (2007) は *H. andersenii* と *G. theta* のヌクレオモルフゲノムの比較から, ヌクレオモルフにコードされるタンパク質の平均長, 遺伝子間領域が, 自由生活性の紅藻類などのゲノムに比べて有意に短く, また, よりヌクレオモルフゲノムサイズの大きい *H. andersenii* に含まれるタンパク質の平均長, 遺伝子間領域の長さが *G. theta* に比べて長いことを示した. このことは, reductive genome evolution の過程で, 単純な遺伝子欠失, EGT 以外にも遺伝子間領域, タンパク質のそれほど重要でない領域が高度にそぎ落とされたような構造になったことを示唆する.

一方で, クリプト藻類とクロララクニオン藻類のヌクレオモルフゲノムの構造的な大きな違いとして

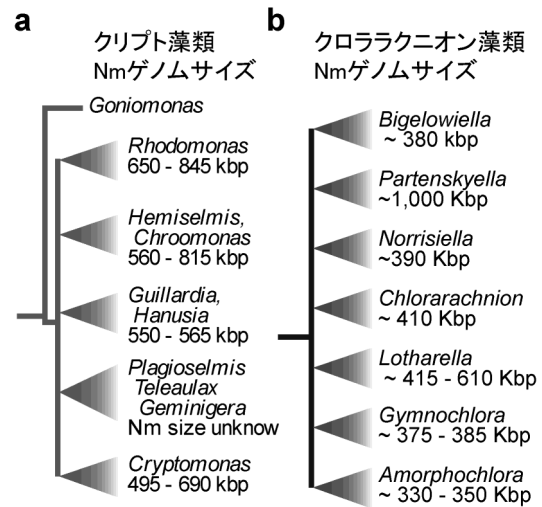


図 2 クリプト藻類とクロララクニオン藻類のヌクレオモルフゲノムサイズと系統関係の比較. Moore and Archibald (2009) に Ota et al. (2007), Ishida et al. (2011a, b), Tanifuji et al. (2010) を加え改変.

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

表1 スクレオモルフゲノムの概要

種名	<i>Guillardia theta</i>	<i>Hemiselms andersenii</i>	<i>Cryptomonas paramecium</i>	<i>Bigelowiella natans</i>
	合計 550.5	合計 571.4	合計 485.9	合計 372.9
ゲノムサイズ (kbp)	染色体1 195.9 染色体2 180.6 染色体3 173.9	染色体1 207.3 染色体2 184.6 染色体3 179.4	染色体1 177.0 染色体2 159.7 染色体3 149.1	染色体1 140.6 染色体2 134.1 染色体3 98.1
G + C 含有量 (%)	26.43	25.18	26.05	<35
遺伝子数 (タンパク質遺伝子/合計)	487/548	472/525	466/519	293/340
タンパク質遺伝子のアミノ酸平均長	311.66	338.41	289.39	321.90
遺伝子間領域平均長 (bp)	94.89	132.14	103.49	113
遺伝子密度 (kbp/gene)	1.00	1.09	0.93	1.10
重複遺伝子数	44	11	33	numerous
イントロン数	17	0	2	852
葉緑体関連遺伝子数	30	31	18	17
テロメア配列	(AG) ₇ AAG ₆ A	GA ₁₇	GA ₉	TCTAGGG

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

一回であると考えられるので、祖先種はそれぞれ 1 種類のテロメア配列を持っていたはずである (McFadden et al., 1995; Ishida et al., 1997; Douglas and Penny 1999; Ishida et al., 1999; Khan et al., 2007; Rogers et al., 2007; Donaher et al., 2009). よって、クリプト藻類のスクレオモルフがそれぞれ異なるテロメア配列を持つようになったのは細胞内共生の後であり、進化の過程で異なるテロメア配列を獲得したものと思われる. 動物や植物など比較的広い系統でもある程度テロメア配列は保存されているので (Podlevsky et al., 2008), 種によってテロメア配列が異なるのはクリプト藻類のスクレオモルフ独自の特色かもしれない.

スクレオモルフとプラスチド関連遺伝子

スクレオモルフのゲノム解読が完了する以前、多くの研究者はスクレオモルフ機能がプラスチド及び光合成機能に大きく関わっているのではないかと考えていたようである. なぜなら、宿主側が二次共生によって獲得した主要な機能は光合成機能であるので、スクレオモルフにはまだ宿主核に移動しきれていないプラスチド関連遺伝子が豊富にコードされていると予想された. しかしながら、スクレオモルフの完全解読により示された結果は意外なものであった. Douglas らは 2001 年に *G. theta* のスクレオモルフゲノムを初めて解読した (Douglas et al., 2001). 最新の解析では、*G. theta* のスクレオモルフは 548 個の遺伝子をコードしており、そのうち 487 個はタンパク質コード遺伝子であることが分かっている (Tanifuji et al., 2011). 驚くことに、そのうちわずか 30 個しかプラスチド関連遺伝子はなく、それ以外

の機能が予測された遺伝子のほとんどはリボソーマルタンパク質や伸長因子などの遺伝子の発現、翻訳などに関連するハウスキーピング遺伝子であった. その後別なクリプト藻類の *H. andersenii* では 525 個の遺伝子中ほぼ同じ 31 個のプラスチド関連遺伝子が見つかり (Lane et al., 2007), 光合成機能を二次的に欠失した *C. paramecium* では 519 個の遺伝子中にプラスチド関連遺伝子は 18 個であった (Tanifuji et al., 2011). さらに、クロララクニオン藻類 *B. natans* では 340 個の遺伝子が見つかり、そのうち 293 個のタンパク質遺伝子中、クリプト藻類とは異なる組み合わせの 17 個が葉緑体関連遺伝子と同定された (Gilson et al., 2006). すなわち、これまで完全解読されたスクレオモルフゲノムでは、コードされるプラスチド関連遺伝子は全体の遺伝子のわずか 3-6% であり、スクレオモルフゲノムにコードされる遺伝子の大部分はハウスキーピング遺伝子である.

しかしながら、これらのハウスキーピング遺伝子がスクレオモルフの現状の存在意義、ひいてはスクレオモルフが未だに残っている主要な理由であるとは信じがたい. なぜなら、これらのハウスキーピング遺伝子は真核生物に共通して保存性の高い遺伝子群であり、ある特定の生物にだけスクレオモルフが残る理由とは考えがたいからである. Gilson et al. (2006) はこれらのハウスキーピング遺伝子は、ごくわずかに残っているプラスチド関連遺伝子が機能するために残っているのであって、わずかに残っているプラスチド関連遺伝子が宿主核へ移動してしまったら、これらのハウスキーピング遺伝子も必要なくなるため、スクレオモルフ自体もいずれ消えるかもしれないと述べている. また、Tanifuji et al. (2011)

はクリプト藻類 3 種とクロララクニオン藻類のプラスチド関連遺伝子の比較から、1) 非光合成の *C. paramecium* は他のクリプト藻類と比べて光合成遺伝子以外のプラスチド関連遺伝子もいくつか消失していること、2) クリプト藻類が共通して保有する 13 の葉緑体関連遺伝子のうち 8 個は、宿主の系統と姉妹群を形成すると考えられるハプト藻類の核ゲノムから見つかっていること、からこれらのプラスチド関連遺伝子が将来にわたって存在され続ける積極的な理由は見あたらないと述べている。しかしながら、ヌクレオモルフが *reductive genome evolution* の途中なのか終点なのかという議論は未だヌクレオモルフの最大の謎の一つであるので、別章を割り再度議論したい。

Cryptomonas paramecium* に見る *reductive genome evolution

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

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

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

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

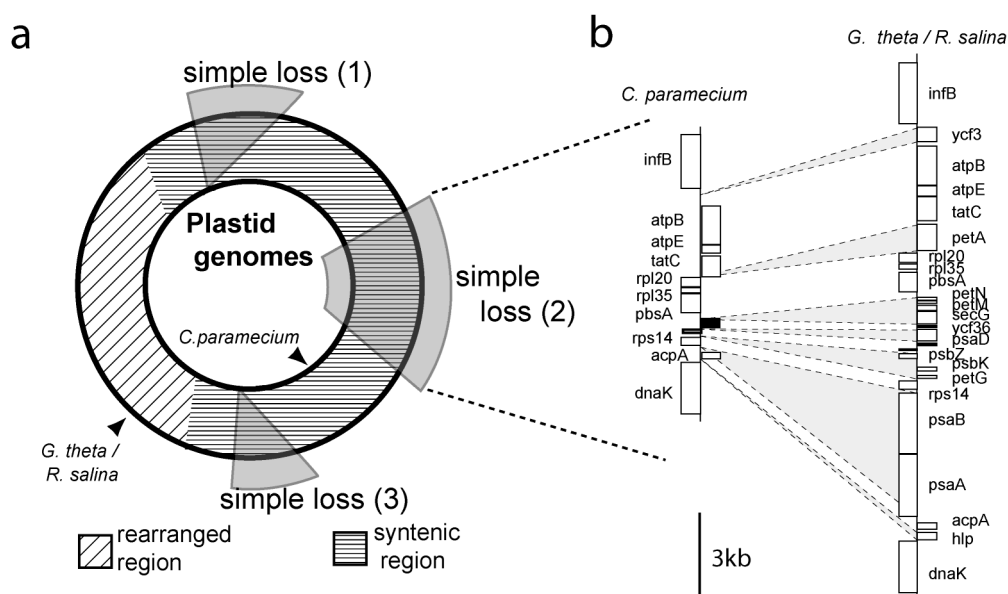
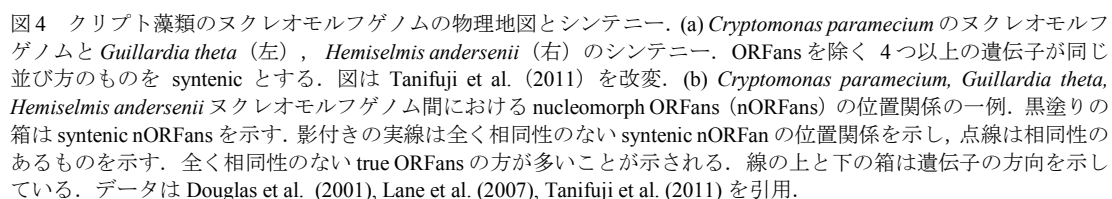


図3 クリプト藻類のプラスチドゲノムの物理地図とシンテニー. (a) *Guillardia theta* + *Rhodomonas salina* (外円) と *Cryptomonas paramecium* (内円) のプラスチドゲノムのシンテニー. (b) Simple loss 領域 2 の拡大図. 陰付き点線は遺伝子の欠失位置を表す. 実線の右側と左側の箱は遺伝子の方向を表している. データは Douglas et al. (1999), Khan et al. (2007), Donaher et al. (2009) を引用.

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

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

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



このように、クリプト藻類のヌクレオモルフとプラスチドゲノムは共に **reductive genome** であり低い G+C 含有量やコンパクトなゲノム構造などの似た構造を共有する一方、ゲノムアレンジメントの頻度やコードする遺伝子の構成などいくつかの相違点を示した。特に、なぜヌクレオモルフに多量の nORFans がコードされているのかは全くの謎である。Archibald and Lane (2009) はヌクレオモルフが AT-rich なゲノムであることから、潜在的にフェニアラニン、イソロイシン、アスパラギン、ロイシン、チロシンをコードする頻度が高いことに注目した。これらのアミノ酸は細

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

ヌクレオモルフの最も大きな謎の一つは、他の二次共生生物は共生者核を完全に消失しているのに、“なぜクリプト藻類とクロララクニオン藻類だけ”がヌクレオモルフを持っているのかということである。代表的な **reductive genome** であるプラスチドゲノムやミトコンドリアゲノムが未だに維持されている説明として尤もらしいのは、**redox potential regulation** による遺伝子制御が挙げられる。つまり、それらのゲノムにコードされる遺伝子発現がオルガネラ内の酸化還元電位によって制御されているため、ゲノムの完全消失は遺伝子発現機構そのものが破綻することを意味する (Allen, 1993, 2003)。しかし、こ

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

では、ヌクレオモルフゲノムは消失する過程にあると考えてよいのだろうか？ 前述のようにヌクレオモルフゲノムの比較では、将来にわたってヌクレオモルフが存在し続ける積極的な証拠は見つからない。また、もしプラスチド関連遺伝子がヌクレオモルフの現在の主要な存在意義なのだとしたら、それらが宿主核に移動してしまえば、やがてヌクレオモルフは消えてしまうかもしれない。とはいっても、未だ何らかの理由で *reductive genome evolution* が止まってしまった可能性も否定できない。そもそも、ヌクレオモルフから遺伝子が消失するにはどのような過程が必要だろうか？ 現在ヌクレオモルフにコードされている遺伝子（あるいはその機能を補う相同遺伝子）が宿主核にコードされ、且つ共生者細胞質区画 (PPC かプラスチド) にターゲットされなけれ

ばならない。そのためには 1) EGT によってヌクレオモルフから宿主核へ遺伝子が移動、さらにターゲット配列を獲得する。2) 元々宿主ゲノムが持っている遺伝子が（遺伝子重複などを経て）ターゲット遺伝子になる。3) Lateral gene transfer (LGT) により全く別の生物から遺伝子を獲得する。の 3 通りの過程が想定できる。このことを検証するには核ゲノムの情報が必要であり、実際、現在 *G. theta* と *B. natans* の核ゲノムプロジェクトが進行中である (<http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/50026.html>)。意外なことに、これまでの核ドラフトゲノムの解析からは、ミトコンドリアからの DNA 断片の移動は示されたが (Curtis and Archibald, 2010)、明白にヌクレオモルフゲノムに相同性の高い配列はほとんど発見されていない (Archibald lab., unpublished data)。すなわち、ヌクレオモルフから宿主核ゲノムへの“最近の” EGT はほとんど見つからないのである。もしヌクレオモルフから宿主核への EGT が起こらないのだとしたら、少なくともプラスチド関連遺伝子の供給源は LGT のみということになってしまい、ヌクレオモルフから遺伝子が消失する機会の多くが奪われることになる。つまり、ヌクレオモルフゲノムの比較では *reductive genome evolution* の中途段階に見えたとしても、核ゲノムの情報を加味すると、ゲノム減少そのものは、事実上、止まっているようにも見える。結局のところ、ヌクレオモルフが将来にわたって維持される理由もなければ、積極的に *reductive genome evolution* が起こっていることを示す証拠もまたないというのが実際のところである。

終わりに

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

表2 クリプト藻類とクロララクニオン藻類のヌクレオモルフゲノムの特徴

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

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

また、生物界にはミトコンドリア、プラスチドやヌクレオモルフのように完全にオルガネラ化した細胞内共生だけでなく、渦鞭毛藻類やウミウシに見られる盗葉緑体や (Rumpho et al., 2008; Wisecaver and Hackett, 2010)、細胞内共生者を分離培養可能なゾウリムシとクロレラの関係など (Kodama and Fujishima, 2010)、宿主と共生者の関係がそれほど強固でない段階の生物群も現存している。さらに、2 種以上の生物間の関係の特殊化という意味合いでは、レジオネラなどのアメーバ細胞内に存在する様々な病原菌類や (Moliner et al., 2010)、アピコンプレクサ類 (マラリア原虫など: Morrison, 2009) やキネトプラスチダ類 (*Trypanosoma* など: Simpson et al., 2006)、微孢子虫とそれらの宿主に見られる寄生関

係もこの分野と関係が深い (Keeling and Fast, 2002; Keeling et al., 2005)。なぜ一方では共生、一方では寄生になってしまうのだろうか？近年の分子生物学的技術の発展により、それら 2 つ以上の生物ゲノムの包括的な挙動、生物間の遺伝子移動を直接比較することが現実的になってきている。そのような研究から、将来的には、共生と寄生に関するメカニズムの違いの研究のように、基礎生物学だけでなく社会的にも重要な知見が蓄積されることが期待される。

謝辞

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

引用文献

- Allen, J. F. (1993) Control of gene-expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. *J. Theor. Biol.*, 165, 609–631.
- Allen, J. F. (2003) The function of genomes in bioenergetic organelles. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*, 358, 19–37.
- Archibald, J. M. (2007) Nucleomorph genomes: structure, function, origin and evolution. *Bioessays*, 29, 392–402.
- Archibald, J. M. and Lane, C. E. (2009) Going, going, not quite gone: nucleomorphs as a case study in nuclear genome reduction. *J. Hered.*, 100, 582–590.
- Archibald, J. M., Rogers, M. B., Toop, M., Ishida, K. and Keeling, P. J. (2003). Lateral gene transfer and the evolution of plastid-targeted proteins in the secondary plastid-containing alga *Bigeloviella natans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 7678–7683.
- Bock, R. and Timmis, J. N. (2008) Reconstructing evolution: gene transfer from plastids to the nucleus. *Bioessays*, 30, 556–566.
- Burki, F., Inagaki, Y., Bråte, J., Archibald, J. M., Keeling, P. J., Cavalier-Smith, T., Sakaguchi, M., Hashimoto, T., Horak, A., Kumar, S., Klaveness, D., Jakobsen, K. S., Pawlowski, J. and Shalchian-Tabrizi, K. (2009)

- Large-scale phylogenomic analyses reveal that two enigmatic protist lineages, telonemia and centroheliozoa, are related to photosynthetic chromalveolates. *Genome Biol. Evol.*, 1, 231–238.
- Cavalier-Smith, T. (2002) Nucleomorphs: enslaved algal nuclei. *Curr. Opin. Microbiol.*, 5, 612–619.
- Cavalier-Smith, T., Couch, J. A., Thorsteinsen, K. E., Gilson, P., Deane, J. A., Hill, D. R. A. and McFadden, G. I. (1996) Cryptomonad nuclear and nucleomorph 18S rRNA phylogeny. *Eur. J. Phycol.*, 31, 315–328.
- Curtis, B. A. and Archibald, J. M. (2010) A spliceosomal intron of mitochondrial DNA origin. *Curr. Biol.* 20, R919–R920.
- Deber, C. M., Liu, L. P. and Wang, C. (1999) Perspective: peptides as mimics of transmembrane segments in proteins. *J. Pept. Res.*, 54, 200–205.
- Degnan, P. H., Lazarus, A. B. and Wernegreen, J. J. (2005) Genome sequence of *Blochmannia pennsylvanicus* indicates parallel evolutionary trends among bacterial mutualists of insects. *Genome Res.*, 15, 1023–1033.
- Derelle, E., Ferraz, C., Rombauts, S., Rouze, P., Worden, A. Z., Robbens, S., Partensky, F., Degroove, S., Echeynie, S., Cooke, R., Saeys, Y., Wuyts, J., Jabbari, K., Bowler, C., Panaud, O., Piegu, B., Ball, S. G., Ral, J. P., Bouget, F. Y., Piganeau, G., De Baets, B., Picard, A., Delseny, M., Demaille, J., Van de Peer, Y. and Moreau, H. (2006) Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 11647–11652.
- Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J. and Lithgow, T. (2006) Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science*, 313, 314–318.
- Donaher, N., Tanifuji, G., Onodera, N. T., Malfatti, S. A., Chain, P. S. G., Hara, Y. and Archibald, J. M. (2009) The complete plastid genome sequence of the secondarily nonphotosynthetic alga *Cryptomonas paramecium*: reduction, compaction, and accelerated evolutionary rate. *Genome Biol. Evol.*, 1, 439–448.
- Douglas, S., Zauner, S., Fraunholz, M., Beaton, M., Penny, S., Deng, L. T., Wu, X. N., Reith, M., Cavalier-Smith, T. and Maier, U. G. (2001) The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. *Nature*, 410, 1091–1096.
- Douglas, S. E., Durnford, D. G. and Morden, C. W. (1990) Nucleotide-sequence of the gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase from *Cryptomonas phi* - evidence supporting the polyphyletic origin of plastids. *J. Phycol.*, 26, 500–508.
- Douglas, S. E. and Penny, S. L. (1999) The plastid genome of the cryptophyte alga, *Guillardia theta*: complete sequence and conserved syntenic groups confirm its common ancestry with red algae. *J. Mol. Evol.*, 48, 236–244.
- Eschbach, S., Hofmann, C. J. B., Maier, U. G., Sitte, P. and Hansmann, P. (1991) A eukaryotic genome of 660 kb: electrophoretic karyotype of nucleomorph and cell-nucleus of the cryptomonad alga, *Pyrenomonas salina*. *Nucleic. Acids. Res.*, 19, 1779–1781.
- Gibbs, S. P. (1978) Chloroplasts of euglena may have evolved from symbiotic green-algae. *Can. J. Bot.*, 56, 2883–2889.
- Gilson, P. R., Su, V., Slamovits, C. H., Reith, M. E., Keeling, P. J. and McFadden, G. I. (2006) Complete nucleotide sequence of the chlorarachniophyte nucleomorph: nature's smallest nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 9566–9571.
- Gockel, G. and Hachtel, W. (2000) Complete gene map of the plastid genome of the nonphotosynthetic euglenoid flagellate *Astasia longa*. *Protist*, 151, 347–351.
- Gould, S. B., Waller, R. R. and McFadden, G. I. (2008) Plastid evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 491–517.
- Gray, M. W., Burger, G. and Lang, B. F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science*, 283, 1476–1481.
- Gray, M. W. and Doolittle, W. F. (1982) Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol. Rev.* 46, 1–42.
- Greenwood, A. (1974) The cryptophyta in relation to phylogeny and photosynthesis. In: 8th International congress of electron microscopy. Sanders, J. and Goodchild, D. (ed.). Australian Academy of Sciences, Canberra, pp. 566–567.
- Hapl, V., Hug, L., Leigh, J. W., Dacks, J. B., Lang, B. F., Simpson, A. G. B. and Roger, A. J. (2009) Phylogenomic analyses support the monophyly of excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 3859–3864.
- Hibberd, D. J. and Norris, R. E. (1984) Cytology and ultrastructure of *Chlorarachnion reptans* (Chlorarachniophyta divisio nova, chlorarachniophyceae classis nova). *J. Phycol.*, 20, 310–330.
- Hoef-Emden, K. and Melkonian, M. (2003) Revision of the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae): a combination

- of molecular phylogeny and morphology provides insights into a long-hidden dimorphism. *Protist*, 154, 371–409.
- Ishida, K., Cao, Y., Hasegawa, M., Okada, N. and Hara, Y. (1997) The origin of chlorarachniophyte plastids, as inferred from phylogenetic comparisons of amino acid sequences of EF-Tu. *J. Mol. Evol.*, 45, 682–687.
- Ishida, K., Green, B. R. and Cavalier-Smith, T. (1999) Diversification of a chimaeric algal group, the chlorarachniophytes: phylogeny of nuclear and nucleomorph small-subunit rRNA genes. *Mol. Biol. Evol.*, 16, 321–331.
- Ishida, K., Endo, H. and Koike, S. (2011a) *Partenskyella glossopodia* (Chlorarachniophyceae) possesses a nucleomorph genome of approximately 1 Mbp. *Phycol. Res.*, 59, 120–122.
- Ishida, K., Yabuki, A. and Ota, S. (2011b) *Amorphochlora amoebiformis* gen. et comb. nov. (Chlorarachniophyceae). *Phycol. Res.*, 59, 52–53.
- Katinka, M. D., Duprat, S., Cornillot, E., Metenier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J. and Vivares, C. P. (2001) Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 414, 450–453.
- Keeling, P. J. and Fast, N. M. (2002) Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56, 93–116.
- Keeling, P. J., Fast, N. M., Law, J. S., Williams, B. A. P. and Slamovits, C. H. (2005) Comparative genomics of microsporidia. *Folia Parasit.*, 52, 8–14.
- Khan, H., Parks, N., Kozera, C., Curtis, B. A., Parsons, B. J., Bowman, S. and Archibald, J. M. (2007) Plastid genome sequence of the cryptophyte alga *Rhodomonas salina* CCMP1319: Lateral transfer of putative DNA replication machinery and a test of chromist plastid phylogeny. *Mol. Biol. Evol.*, 24, 1832–1842.
- Kodama, Y. and Fujishima, M. (2010) Secondary symbiosis between *Paramecium* and *Chlorella* cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 279, 33–77.
- Lane, C. E. and Archibald, J. M. (2006) Novel nucleomorph genome architecture in the cryptomonad genus *Hemiselmis*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 53, 515–521.
- Lane, C. E. and Archibald, J. M. (2008) New marine members of the genus *Hemiselmis* (Cryptomonadales, Cryptophyceae). *J. Phycol.*, 44, 439–450.
- Lane, C. E., Khan, H., MacKinnon, M., Fong, A., Theophilou, S. and Archibald, J. M. (2006) Insight into the diversity and evolution of the cryptomonad nucleomorph genome. *Mol. Biol. Evol.*, 23, 856–865.
- Lane, C. E., van den Heuvel, K., Kozera, C., Curtis, B. A., Parsons, B. J., Bowman, S. and Archibald, J. M. (2007) Nucleomorph genome of *Hemiselmis andersenii* reveals complete intron loss and compaction as a driver of protein structure and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 19908–19913.
- Ludwig, M. and Gibbs, S. P. (1985) DNA is present in the nucleomorph of cryptomonads - further evidence that the chloroplast evolved from a eukaryotic endosymbiont. *Protoplasma*, 127, 9–20.
- Martin, W. (2003) The smoking gun of gene transfer. *Nat. Genet.*, 33, 442–442.
- Martin, W. and Herrmann, R. G. (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiol.*, 118, 9–17.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M. and Penny, D. (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 12246–12251.
- Matsuzaki, M., Misumi, O., Shin-I, T., Maruyama, S., Takahara, M., Miyagishima, S. Y., Mori, T., Nishida, K., Yagisawa, F., Nishida, K., Yoshida, Y., Nishimura, Y., Nakao, S., Kobayashi, T., Momoyama, Y., Higashiyama, T., Minoda, A., Sano, M., Nomoto, H., Oishi, K., Hayashi, H., Ohta, F., Nishizaka, S., Haga, S., Miura, S., Morishita, T., Kabeya, Y., Terasawa, K., Suzuki, Y., Ishii, Y., Asakawa, S., Takano, H., Ohta, N., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Shimizu, N., Sugano, S., Sato, N., Nozaki, H., Ogasawara, N., Kohara, Y. and Kuroiwa, T. (2004) Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature*, 428, 653–657.
- McCutcheon, J. P., McDonald, B. R. and Moran, N. A. (2009) Origin of an alternative genetic code in the extremely small and GC-rich genome of a bacterial symbiont. *PLoS Genet.*, 5, e1000565.
- McFadden, G. I., Gilson, P. R. and Waller, R. F. (1995) Molecular phylogeny of chlorarachniophytes based on plastid ribosomal-RNA and *rbcL* Sequences. *Arch.*

- Protistenkd., 145, 231–239.
- Moliner, C., Fournier, P. E. and Raoult, D. (2010) Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.*, 34, 281–294.
- Moore, C. E. and Archibald, J. M. (2009) Nucleomorph genomes. *Annu. Rev. Genet.*, 43, 251–264.
- Moran, N. A. (1996) Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 2873–2878.
- Moran, N. A., McCutcheon, J. P. and Nakabachi, A. (2008) Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu. Rev. Genet.*, 42, 165–190.
- Moran, N. A., McLaughlin, H. J. and Sorek, R. (2009) The dynamics and time scale of ongoing genomic erosion in symbiotic bacteria. *Science*, 323, 379–382.
- Moreira, D., Lopezarchilla, A. I., Amils, R. and Marin, I. (1994) Characterization of 2 new thermoacidophilic microalgae - genome organization and comparison with *Galdieria sulphuraria*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 122, 109–114.
- Morrison, D. A. (2009) Evolution of the Apicomplexa: where are we now? *Trends Parasitol.*, 25, 375–382.
- Moustafa, A., Beszteri, B., Maier, U. G., Bowler, C., Valentin, K. and Bhattacharya, D. (2009) Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms. *Science*, 324, 1724–1726.
- Muravenko, O. V., Selyakh, I. O., Kononenko, N. V. and Stadnichuk, I. N. (2001) Chromosome numbers and nuclear DNA contents in the red microalgae *Cyanidium caldarium* and three *Galdieria* species. *Eur. J. Phycol.*, 36, 227–232.
- Nakabachi, A., Yamashita, A., Toh, H., Ishikawa, H., Dunbar, H. E., Moran, N. A. and Hattori, M. (2006) The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella*. *Science*, 314, 267.
- Ota, S., Ueda, K. and Ishida, K. I. (2007) *Norrsiella sphaerica* gen. et sp. nov., a new coccoid chlorarachniophyte from Baja California, Mexico. *J. Plant Res.*, 120, 661–670.
- Patron, N. J., Rogers, M. B. and Keeling, P. J. (2006) Comparative rates of evolution in endosymbiotic nuclear genomes. *BMC Evol. Biol.*, 6, 46.
- Phipps, K. D., Donaher, N. A., Lane, C. E. and Archibald, J. M. (2008) Nucleomorph karyotype diversity in the freshwater cryptophyte genus *Cryptomonas*. *J. Phycol.*, 44, 11–14.
- Podlevsky, J. D., Bley, C. J., Omana, R. V., Qi, X. D. and Chen, J. J. L. (2008) The telomerase database. *Nucleic Acids Res.*, 36, D339–D343.
- Rensing, S. A., Goddemeier, M., Hofmann, C. J. B. and Maier, U. G. (1994) The presence of a nucleomorph hsp70 gene is a common feature of cryptophyta and chlorarachniophyta. *Curr. Genet.*, 26, 451–455.
- Reyes-Prieto, A., Weber, A. P. M. and Bhattacharya, D. (2007) The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annu. Rev. Genet.*, 41, 147–168.
- Rogers, M. B., Gilson, P. R., Su, V., McFadden, G. I. and Keeling, P. J. (2007) The complete chloroplast genome of the chlorarachniophyte *Bigeloviella natans*: evidence for independent origins of chlorarachniophyte and euglenid secondary endosymbionts. *Mol. Biol. Evol.*, 24, 54–62.
- Rumpho, M. E., Worful, J. M., Lee, J., Kannan, K., Tyler, M. S., Bhattacharya, D., Moustafa, A. and Manhart, J. R. (2008) Horizontal gene transfer of the algal nuclear gene psbO to the photosynthetic sea slug *Elysia chlorotica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 17867–17871.
- Sasaki, Y., Ishikawa, J., Yamashita, A., Oshima, K., Kenri, T., Furuya, K., Yoshino, C., Horino, A., Shiba, T., Sasaki, T. and Hattori, M. (2002) The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic Acids Res.*, 30, 5293–5300.
- Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y. and Ishikawa, H. (2000) Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature*, 407, 81–86.
- Silver, T. D., Koike, S., Yabuki, A., Kofuji, R., Archibald, J. M. and Ishida, K. I. (2007) Phylogeny and nucleomorph karyotype diversity of chlorarachniophyte algae. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 54, 403–410.
- Silver, T. D., Moore, C. E. and Archibald, J. M. (2010) Nucleomorph ribosomal DNA and telomere dynamics in chlorarachniophyte algae. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 57, 453–459.
- Simpson, A. G. B., Stevens, J. R. and Lukeš, J. (2006) The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.*, 22, 168–174.
- Smith, D. R. (2009) Unparalleled GC content in the plastid DNA of *Selaginella*. *Plant Mol. Biol.*, 71, 627–639.
- Tanifuji, G., Onodera, N. T. and Hara, Y. (2010) Nucleomorph genome diversity and its phylogenetic implications in cryptomonad algae. *Phycol. Res.*, 58, 230–237.

- Tanifuji, G., Onodera, N. T., Wheeler, T. J., Dlutek, M., Donaher, N. and Archibald, J. M. (2011) Complete nucleomorph genome sequence of the nonphotosynthetic alga *Cryptomonas paramecium* reveals a core nucleomorph gene set. *Genome Biol. Evol.*, 3, 44–54.
- van Dooren, G. G., Schwartzbach, S. D., Osafune, T. and McFadden, G. I. (2001) Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1541, 34–53.
- Whatley, J. M. and Whatley, F. R. (1981) Chloroplast Evolution. *New Phytol.*, 87, 233–247.
- Wisecaver, J. H. and Hackett, J. D. (2010) Transcriptome analysis reveals nuclear-encoded proteins for the maintenance of temporary plastids in the dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *BMC Genomics*, 11, 366.
- Wisecaver, J. H. and Hackett, J. D. (2011) Dinoflagellate genome evolution. *Annu. Rev. Microbiol.*, 65, 369–387.
- Worden, A. Z., Lee, J. H., Mock, T., Rouze, P., Simmons, M. P., Aerts, A. L., Allen, A. E., Cuvelier, M. L., Derelle, E., Everett, M. V., Foulon, E., Grimwood, J., Gundlach, H., Henrissat, B., Napoli, C., McDonald, S. M., Parker, M. S., Rombauts, S., Salamov, A., Von Dassow, P., Badger, J. H., Coutinho, P. M., Demir, E., Dubchak, I., Gentemann, C., Eikrem, W., Gready, J. E., John, U., Lanier, W., Lindquist, E. A., Lucas, S., Mayer, K. F. X., Moreau, H., Not, F., Otiillar, R., Panaud, O., Pangilinan, J., Paulsen, I., Piegu, B., Poliakov, A., Robbens, S., Schmutz, J., Toulza, E., Wyss, T., Zelensky, A., Zhou, K., Armbrust, E. V., Bhattacharya, D., Goodenough, U. W., Van de Peer, Y. and Grigoriev, I. V. (2009) Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeukaryotes *Micromonas*. *Science*, 324, 268–272.