

# 真核生物起源研究进展

高志伟<sup>1</sup>, 王龙<sup>2</sup>

1. 南京大学匡亚明学院, 南京 210023

2. 南京大学生命科学院, 医药生物技术国家重点实验室, 南京 210023

**摘要:** 作为重大进化谜题, 真核生物起源的研究对于解码真核基因组、阐释真核细胞内部结构之间的关系有重要启示作用。在 1977 年美国微生物学家 Carl Woese 发现古细菌并提出三域生命之树之后, 大量研究显示古细菌与真核生物在进化上存在着密切联系。21 世纪以来, 系统发育分析方法不断改进, 泉古菌门(Crenarchaeota)、广古菌门(Euryarchaeota)之外与真核生物更加相似的新古细菌门类也相继被发现, 这些证据更加支持将真核生物与古细菌合并为一域, 形成二域生命之树。目前, 通过宏基因组技术发现的 Asgard 古细菌是与真核生物进化距离最近的原核生物。然而, 真核生物祖先的身份以及线粒体起源的时间等核心问题仍是学术界争论的焦点。本文结合近年来国内外研究成果, 从生命之树的形态变化与真核生物演变的具体机制两个角度梳理了目前对真核生物起源的认知过程、现有水平和研究前景, 以期揭示真核生物起源进程的后续研究提供参考与指引。

**关键词:** 真核生物起源; 生命之树; 古细菌; 三域; 二域; 内共生; 线粒体; Asgard 超门

## Progress in elucidating the origin of eukaryotes

Zhiwei Gao<sup>1</sup>, Long Wang<sup>2</sup>

1. Kuang Yaming Honors School, Nanjing University, Nanjing 210023, China

2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, China

**Abstract:** Knowledge of the origin of eukaryotes is key to broadening our understanding of the eukaryotic genome and the relationship among internal structures within a eukaryotic cell. Since the discovery of archaea in 1977 and the proposal of three-domain tree of life by the American microbiologist Carl Woese, the intimate relationship in evolution between eukaryotes and archaea has been demonstrated by considerable experiments and analyses. From the beginning of the 21st century, with the development of phylogenetic methods and the discovery of new archaeal phyla more related to eukaryotes, increasing evidence has shown that Eukarya and Archaea should be merged into one domain, leading to a two-domain tree of life. Nowadays, the Asgard superphylum discovered via metagenomic analysis is regarded as the closest prokaryotes to eukaryotes. Nevertheless, several key questions are still under debate, such as what the ancestors of the eukaryotes were and when mitochondria emerged. Here, we review the current research progress regarding the changes of the tree of life and the detailed eukaryotic evolutionary mechanism. We show that the recent findings have greatly improved

收稿日期: 2020-04-18; 修回日期: 2020-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31970236)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31970236)]

作者简介: 高志伟, 在读本科生, 专业方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: 171240503@smail.nju.edu.cn

通讯作者: 王龙, 博士, 副教授, 研究方向: 分子遗传与进化。E-mail: wanglong@nju.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.20-107

网络出版时间: 2020/6/5 10:08:53

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20200604.1524.001.html>

our knowledge on the origin of eukaryotes, which will pave the way for future studies.

**Keywords:** eukaryogenesis; tree of life; archaea; three domains; two domains; endosymbiosis; mitochondria; Asgard superphylum

真核生物起源被称为生物界仅次于生命起源的第 2 大谜团<sup>[1]</sup>。加拿大著名微生物学家 Roger Stanier 曾指出:“原核生物与真核生物细胞之间的差异是当今世界中已发现的最大的单一不连续性”<sup>[2]</sup>。虽然许多原核生物已经具有带有膜的内部组织结构<sup>[3]</sup>,但真核生物的复杂程度却远高于此。真核生物具有核膜包被的细胞核,将转录与翻译过程分隔开,为基因调控提供更多选择<sup>[4]</sup>;众多细胞器组成的内膜系统使细胞具有精密高效的运输和代谢功能<sup>[5]</sup>。这些结构增强了真核生物的环境适应能力,使其演化为现存物种中数目占大多数的生命形式。

从原核到真核这一巨大转变通常在教科书中被过度简化为一个迅速的单一事件<sup>[6]</sup>。然而从时间上看,化石记录显示目前最早的真细菌<sup>[7,8]</sup>和古细菌化石距今约 35 亿年,相比之下,真核生物化石距今约 18 亿年<sup>[9]</sup>,与利用分子钟计算的 17~19 亿年时间相一致<sup>[10]</sup>,由此推算出的原核生物和真核生物的出现时间相差 17 亿年之久。阐释这一漫长历史过程中真核生物的演变历程对人们认知真核生物乃至人类自身的细胞和基因组结构至关重要。

真核生物的祖先是什么?真核生物演变的具体机制是什么?这两大核心问题也成为学界长久以来争论的焦点。其中,尤其是真核生物在生命之树上所处的关键节点位置,以及线粒体的起源问题上,依然存在有很大的分歧。近年来,与真核生物进化密切相关的 Asgard 古细菌超门的发现<sup>[11,12]</sup>以及其在实验室条件下培养研究的实现<sup>[13]</sup>,为解决这一僵局带来了光明。因此,本文在回顾历史的基础上,重点聚焦近年来在该领域取得的重大研究进展,从生命之树和演化机制两个角度深入阐述真核生物的起源问题。

## 1 生命之树中的真核生物

### 1.1 古细菌的发现和三域生命之树的提出

1977 年,美国微生物学家 Carl Woese 通过

16S/18S rRNA 序列系统发育分析偶然发现了古细菌。他们据此将原核生物分为两大类——真细菌和古细菌,并将真细菌、古细菌和真核生物各分为一个“域”(Domain),作为比“界”(Kingdom)高一级的分类系统,分别命名为细菌域(Bacteria)、古菌域(Archaea)和真核域(Eukarya)<sup>[14]</sup>。自此,真核生物在分类学中的位置迎来巨变,利用保守基因为所有细胞生命建立分类系统的方法开始流行。20 世纪 80 年代末,基于基因重复(gene duplication)<sup>[15]</sup>和 SSU rRNA<sup>[16]</sup>的研究发现真核生物虽与古细菌形态差异大,但属于姐妹群(sister groups),具有一个独立于真细菌之外的共同祖先。据此,Woese 等<sup>[16]</sup>提出了著名的三域(three primary domains, 3D)生命之树(tree of life/universal tree),包含细菌域、古菌域(分为泉古菌门和广古菌门)和真核域(图 1)<sup>[17]</sup>,长期以来得到各类教科书和文献的广泛认可<sup>[18]</sup>。

20 世纪 80 年代到 21 世纪初,许多研究发现古细菌和真核生物在分子层面上高度相关,直接或间接地为 Carl Woese 的三域生命之树提供证明。在遗传信息复制、转录和翻译水平上,真核生物与古细菌具有许多真细菌不具有的相似性。例如,免疫学实验<sup>[19]</sup>和进化计算<sup>[20]</sup>都证明古细菌依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶与真核生物的结构同源性。真核生物与古细菌的启动子和转录起始因子、30 种共有的核糖体蛋白、翻译因子、DNA 复制相关的部分酶、组蛋白等都体现出真细菌所缺乏的相似性<sup>[21]</sup>。此外,真核生物和古细菌具有多种相似的、维持细胞基本生存的酶和代谢通路,如液泡 ATPase、分泌通路、辅酶 A 生物合成的部分酶以及嘧啶和精氨酸生物合成的部分酶等<sup>[21]</sup>。古细菌细胞分裂系统内的部分蛋白甚至与真核生物的内体分选复合体同源<sup>[22,23]</sup>。如此多的进化关联性使古细菌成为揭示真核生物起源的重要研究对象<sup>[24]</sup>。

当然,古细菌和真核生物之间也存在许多差别。最为显著的是膜脂,古细菌采用醚键相连,而真核生物采用酯键相连;古细菌的甘油磷酸骨架使用甘

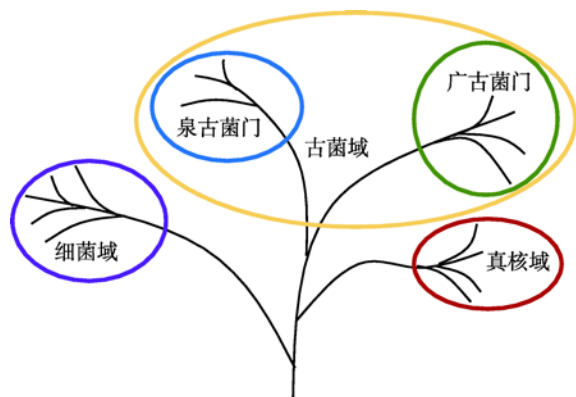


图 1 Carl Woese 的生命之树

Fig. 1 Tree of life proposed by Carl Woese

Carl Woese 依据 16S/18S rRNA 系统发育分析发现古细菌后, 将自然界中的生物分为真核域、细菌域和古菌域三域。根据文献[17]修改绘制。

油-1-磷酸, 而真核生物和真细菌使用甘油-3-磷酸, 两者由不相关的酶合成。古细菌还拥有独特的产甲烷代谢途径、DNA 拓扑异构酶和 DNA 聚合酶等[21]。此外, 真核生物与真细菌也有代谢[25,26]和膜化学性质[27]的部分相似之处。

## 1.2 二域与三域的争端

虽然 Carl Woese 提出的三域系统(图 2A)受到广

泛认可, 但同时期, Lake 等[28]依据核糖体结构证据、Rivera 和 Lake[29]依据延伸因子 EF-1 $\alpha$  同系物保守区有共同氨基酸插入的证据, 提出真核生物是泉古菌门的一个姐妹群, 即真核生物是从古细菌域之内产生的, 是二域, 而一级域仅为真细菌和古细菌, 形成二域(two primary domains, 2D)生命之树(图 2B)。人们对应地提出了许多演化模型支持二域系统, 实质均为古细菌与细菌之间的相互作用[30], 如支持泉古菌门(Crenarchaeota)与细菌相互作用的泉古菌假说(eocyte hypothesis)[28,29], 广古菌门(Euryarchaeota)与细菌相互作用的氢假说(hydrogen hypothesis)[31]和互养共栖假说(syntrophic hypothesis)[32]等。

21 世纪的第一个 10 年中, 生物信息学蓬勃发展。从系统发育重建的角度看, 三域与二域的争端依然激烈。在 2003~2009 年发表的 7 篇文献中, 通过真核生物、真细菌、古细菌物种取样, 测定基因组中的系统发生信号(phylogenetic signal)标记, 进行大规模系统发育学分析, 3 篇文献得出三域系统结果[33~35], 4 篇文献得出二域系统结果[36~39]。7 篇文献采用的数据和方法比较如表 1 所示。

值得注意的是, 上述 7 篇文献使用数据在很大程度上有重叠, 大多基于蛋白相邻类的聚簇(Cluster

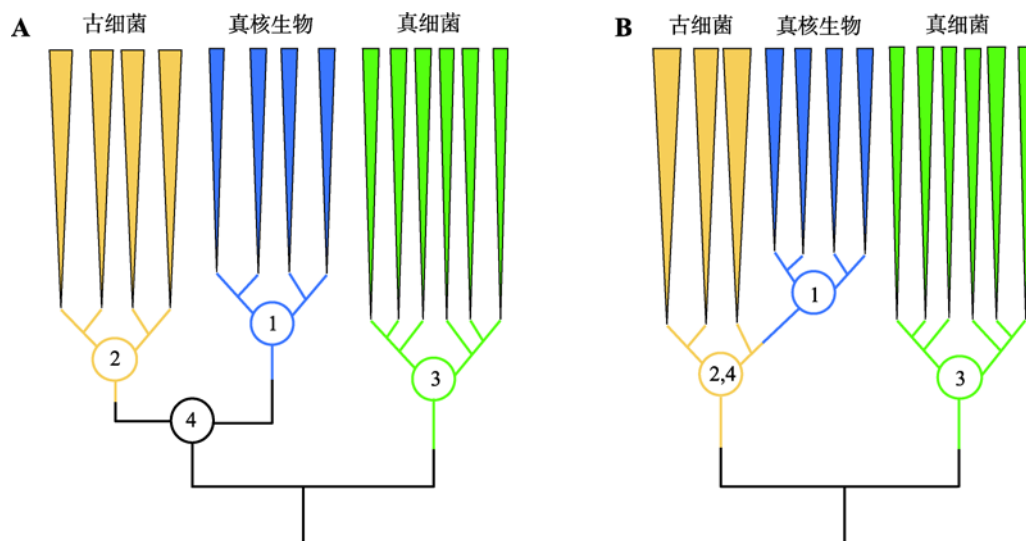


图 2 三域与二域生命之树的对比

Fig. 2 Comparison between the two-domain and three-domain tree of life

A: 三域系统; B: 二域系统。AB 图中的 1、2、3 分别对应真核域、古菌域和细菌域的最近共同祖先; 真核域与古菌域是两个距离遥远的姐妹群, 具有一个最近共同祖先 4。B 图中真核域的最近共同祖先 1 直接产生自古菌域内, 所以古菌域的最近共同祖先 2 同时也是古菌域和真核域的最近共同祖先, 这与 A 图的情况不同。根据文献[21]修改绘制。

表 1 2003~2009 年间发表的 7 篇阐释生命之树中古细菌与真核生物关系的文章比较

Table 1 Comparison among results from seven publications elucidating the relationship between eukaryotes and archaea in tree of life, published from 2003 to 2009

文献	三域中使用的 标记数目	取样种类(数目)	氨基酸位 置数	方法	结果	优势	缺陷
Harris 等 <sup>[33]</sup>	50	细菌(25); 泉古菌门(1); 广古菌门(7); 真核生物(3)	与所分析 基因相关	单基因分析; 最大似然法; 最大简约法; 距离法	3D	选取数据范围从 此前的 SSU rRNA 扩展到其他基因	当时的基因数据 有限, 单基因分 析可靠性不强
Ciccarelli 等 <sup>[34]</sup>	31	细菌(150); 泉古菌门(4); 广古菌门(14); 真核生物(23)	8090	分散基因串联	3D	取样物种广泛, 增加了客观的 HGT 过滤方法	先在域内对齐序 列, 跨域整合时 可能将非同源基 因对齐
Yutin 等 <sup>[35]</sup>	136	与所用基因 相关	与所分析 基因相关	单基因分析; 最大似然法	3D	数据集丰富, 分析 的基因数目多	单个基因提供的 系统发育信号弱
Rivera 和 Lake <sup>[36]</sup>	<i>Archaeoglobus fulgidus</i> 全基 因组	细菌(2); 泉古菌门(1); 广古菌门(2); 真核生物(2)	不适用	基因组条件 重建	2D; 真核生物与泉古 菌门为姐妹群	使用全基因组 分析	取样物种少, 受 HGT 和基因丢失 影响大
Pisani 等 <sup>[37]</sup>	未提供数据	细菌(97); 泉古菌门(4); 广古菌门(17); 真核生物(17)	与所分析 基因相关	超树法 (Supertree)	2D; 真核生物与广古 菌门为姐妹群	综合众多数据集 信息, 在单基因 树基础上建立二 级树	过滤步骤后剩余 的有效数据少, 且拥有单基因分 析的局限性
Cox 等 <sup>[38]</sup>	45	细菌(10); 泉古菌门(3); 广古菌门(11); 真核生物(16)	5521	分散基因串联; 贝叶斯方法; 最大似然法; 最大简约法	2D; 真核生物与泉古 菌门为姐妹群	除简单模型外使 用了更多更复杂 的模型, 首例使用 新模型证明了 2D 系统结果	复杂模型的参数 估计的精确性难 以保证
Foster 等 <sup>[39]</sup>	41	细菌(8); 泉古菌门(8); 奇古菌门(2); 广古菌门(6); 真核生物(11)	5222	分散基因串联; 贝叶斯方法; 最大似然法; 最大简约法	2D; 真核生物是一个 由泉古菌门和奇 古菌门构成的群 的姐妹群	同上, 作者相同, 选取的数据更多, 使用了新发现的 古细菌门类数据	复杂模型的参数 估计的精确性难 以保证

3D: 三域系统; 2D: 二域系统; HGT: 水平基因转移。表格根据 Gribaldo 等<sup>[21]</sup>的综述拓展。

of Orthologous Groups of proteins, COG)数据库, 最终却得到了截然不同的结论, 集中体现了系统发育学方法在解决真核生物起源时面临的典型难题:

(1)长期的碱基替换导致基因组中遗留的系统发育信号很微弱, 若使用单基因位点或较短的 16S rRNA、18S rRNA 分析跨域的物种, 背景噪声大, 可以得到的有效信息很少, 如前述 Harris 等<sup>[33]</sup>与 Yutin 等<sup>[35]</sup>两文的方法正如此。同时, 单个基因可能受基因特异性事件影响(如基因重复、丢失和转移), 不能反映真实的物种进化情况<sup>[40,41]</sup>。

(2)为解决单基因信号微弱的问题, 许多研究采用了分散基因串联(concatenation)的方法<sup>[34,38,39]</sup>, 即

将多个不连续的基因直接串联组合为“普遍基因”(universal gene), 序列对齐后再统一分析。但此举的局限性在于真核生物起源分析的范围广, 真核生物、古细菌和真细菌 3 个类群跨域分析时很可能将非同源蛋白强制对齐, 在组合基因时人为引入偏差<sup>[21]</sup>。此外, 可供大范围跨域分析的“普遍基因”本身数量也十分有限。

(3)同样为解决单基因信号微弱的问题, 有研究采用全基因组比对, 但局限性在于可用的全基因组数据比单基因数据少, 且计算更加复杂。选取物种数少时, 结果受抽样本身影响大, 例如 Rivera 和 Lake<sup>[36]</sup>仅仅使用了 7 个全基因组, 偶然误差较大。

但该方法随着未来基因组数据的快速增加和组学分析方法的不断进步, 有望提供更多可靠的信息。

(4)不同物种间的水平基因转移(horizontal gene transfer, HGT)和基因丢失都可能抹去进化印记。HGT 和基因丢失可能发生在真核生物进化的各个阶段(图 3), 机制包括转化、转导和接合等<sup>[42-44]</sup>。在 Cox 等<sup>[38]</sup>的研究中, 检测到选取的 80 个基因有 30 个受到 HGT 影响, 数据舍弃不用。Akanni 等<sup>[45]</sup>利用超树方法分析了 392 个真细菌和 51 个古细菌基因组, 在古细菌进化树基部发现了两个来自真细菌的大规模 HGT, 基因来源涉及  $\delta$ -变形杆菌、梭菌和放

线菌。对此, Cotton 等<sup>[46]</sup>和 Cohen 等<sup>[47]</sup>认为, 与转录、翻译相关的核心基因的负选择压大, 受 HGT 的影响应比一般代谢通路的基因小, 是更加合适的分析对象。

(5)长支吸引(long branch attraction, LBA), 由于不同域间的基因差别可能很大, 在同源性高的物种之外可能形成进化距离遥远但仍然相互靠近的长支, 造成偏差<sup>[48,49]</sup>。早在 1999 年, Tourasse 等<sup>[50]</sup>便认为三域树结果是受 LBA 影响产生的。

(6)建立的模型本身设计过于简单, 模拟能力差<sup>[48]</sup>。近 10 年来, 随着模型的复杂化和基因数据的积

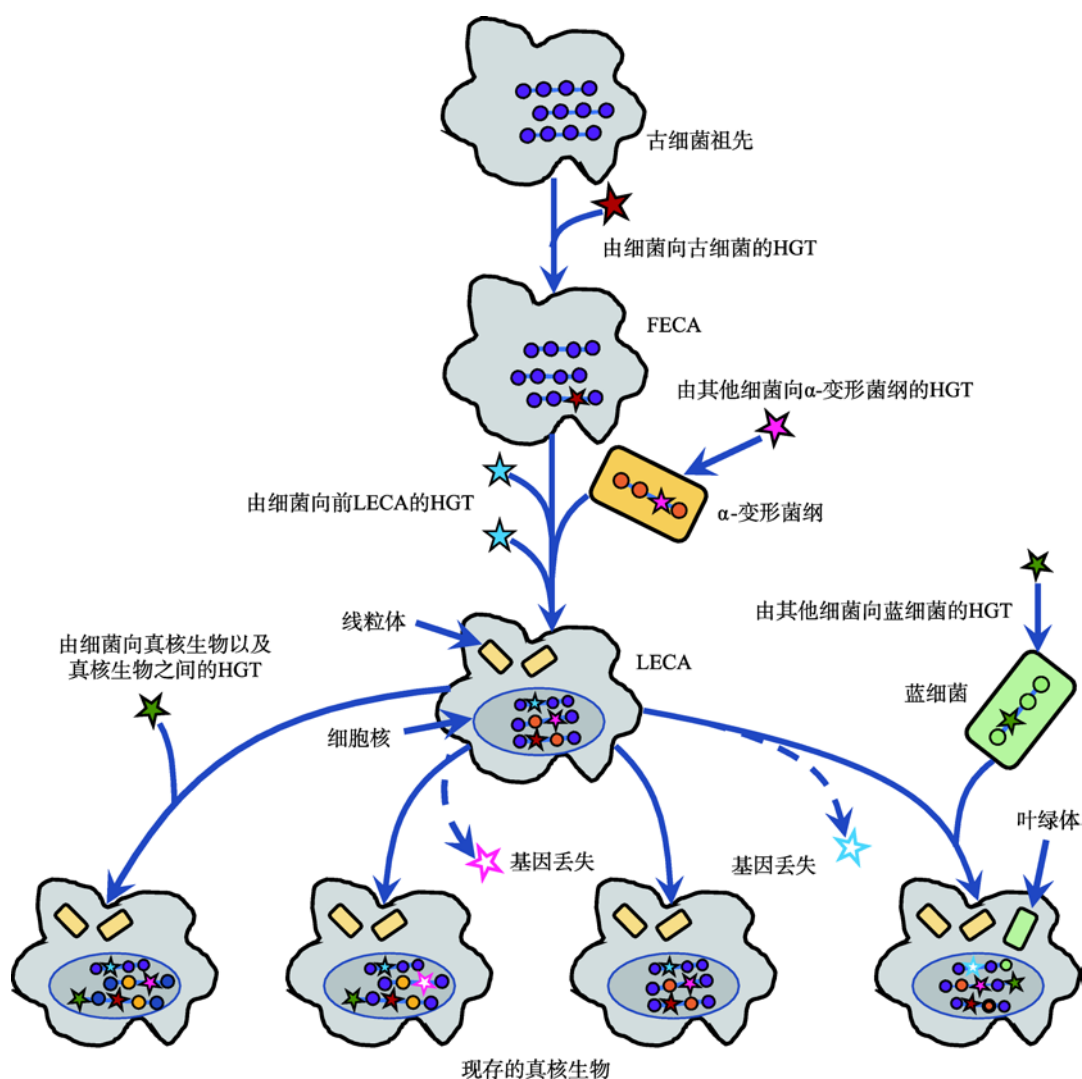


图 3 真核生物进化过程中的水平基因转移(HGT)与基因丢失

Fig. 3 HGT and gene loss during the evolution of eukaryotes

HGT 可能发生在古细菌祖先→FECA→LECA→现存真核生物演化进程中的各个阶段。线粒体和叶绿体的内共生过程也为 HGT 的发生提供条件。HGT 和基因丢失均能削弱现存生物基因组中遗留的系统发育信号。根据文献<sup>[17]</sup>修改绘制。



累,人们尽量规避上述 6 点对结果的影响。2011~2013 年发表的 3 篇文献结果都支持二域系统<sup>[48,51,52]</sup>。2014 年, Rochette 等<sup>[53]</sup>的系统发育分析显示,真核生物与古细菌间的联系比真细菌紧密得多,但与泉古菌门和广古菌门没有密切联系,真核生物分支接近古细菌并很可能从中发出。与此同时,泉古菌和广古菌以外古细菌门类的发现为二域系统提供了更多的支持,相关内容将在下一部分阐述。

### 1.3 新古细菌类群的发现对生命之树的影响

2004 年, Venter 等<sup>[54]</sup>首次采用不经实验室培养直接测定环境中微小生物基因组的“全基因组鸟枪测序”方法,即通常所说的宏基因组(metagenome)技术,研究海水中的微生物样本,发现了 148 个新细菌种类和 120 万个此前未知的基因。此后,人们不断利用宏基因组技术发现多个泉古菌门、广古菌门之外的古细菌新门,为生命之树带来巨大变化。

2008 年后,奇古菌门(Thaumarchaeota)<sup>[55]</sup>、初古菌门(Korarchaeota)<sup>[56]</sup>、曙古菌门(Aigarchaeota)<sup>[57]</sup>相继被发现。其中奇古菌门是被发现的第一个新古细菌门类,而曙古菌门是第一个完全由宏基因组学数据重建的基因组,并且发现了与真核生物同源的泛素系统。依据 16S rRNA 测序结果,这 3 个新门与泉古菌门一起归为一个单系群(monophyletic group),称为“TACK”超门(TACK superphylum)或变形古菌(Proteoarchaeota)<sup>[58,59]</sup>。通过改进的最大似

然估计或贝叶斯网络模型,人们发现真核生物从 TACK 超门内分支出来或是 TACK 超门的一个姐妹群(图 4A)<sup>[17,60]</sup>。这表明真核生物分支是从古细菌域内发出的,支持上一部分所叙述的二域系统,否定三域系统。新发现的 TACK 超家族成员含有大量一般只在真核生物中表达或与其相关的真核生物标志蛋白(eukaryotic signature proteins, ESPs),如肌动蛋白、微管蛋白的古细菌同源物、转录翻译因子类似的蛋白等<sup>[11]</sup>。TACK 超门成为追溯真核细胞起源的重要研究材料。

2014 年以来,通过改进的宏基因组技术——解码宏基因组(genome-resolved metagenomics),人们又在 TACK 超门中发现新的古细菌门:深古菌门(Bathyarchaeota)、地古菌门(Geoarchaeota)和韦斯特古菌门(Verstraetearchaeota) (图 4B)<sup>[17]</sup>。广古菌门外还存在着一个深枝 DPANN 超门(DPANN superphylum),包含丙盐古菌门(Diapherotrites)、小古菌门(Parvarchaeota)、谜古菌门(Aenigmarchaeota)、纳古菌门(Nanoarchaeota)和纳盐古菌门(Nanohaloarchaeota) (图 4B)<sup>[17]</sup>。这些发现极大地丰富了生命之树中古细菌的分支。

近 5 年来的一个重要突破是发现了与真核生物遗传关系更近的 Asgard 古细菌。Asgard 古细菌大多生活在海底,分类上原先属于海洋底栖类群 B (Marine Benthic Group B, MBG-B)、古代古细菌群(Ancient Archaeal Group, AAG)、深海古细菌群

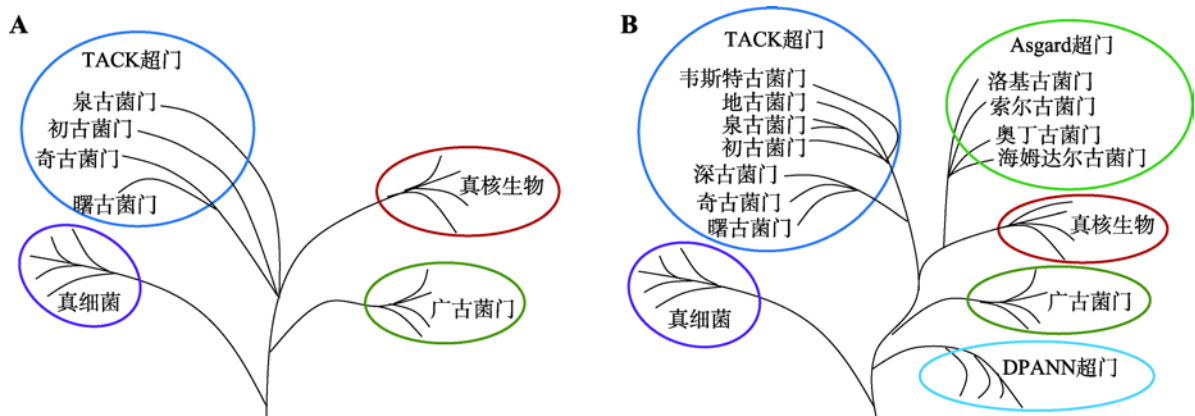


图 4 发现新门类古细菌后的生命之树

Fig. 4 Tree of life after the discovery of new archaeal phyla

A: 新发现 TACK 超门古细菌。真核生物是 TACK 超门的一个姐妹群,或者直接从 TACK 超门中产生。B: 新发现 DPANN 超门和 Asgard 超门古细菌。DPANN 超门形成古细菌的一个深枝, Asgard 超门与真核生物进化距离最近,真核生物是 Asgard 超门的一个姐妹群,或者直接从 Asgard 超门中产生。根据文献<sup>[17]</sup>修改绘制。

(Deep-sea Archaeal Group, DSAG)和海洋热液喷口群(Marine Hydrothermal Vent Group)<sup>[61]</sup>。2015 年,瑞典乌普萨拉大学 Ettema 课题组在北冰洋 Loki's Castle 附近的海底沉积物中利用宏基因组技术重建出一种新的古细菌基因组,命名为洛基古菌门(Lokiarchaea),蛋白质组中的重要部分(175 个蛋白质,占比 3.3%)都与真核蛋白相似,为 ESPs,参与膜的变形和细胞形状的形成过程<sup>[11]</sup>。此后,又发现了与 Lokiarchaea 门相近的 3 个新门:奥丁古菌门(Odinarchaeota)、索尔古菌门(Thorarchaeota)和海姆达尔古菌门(Heimdallarchaeota)<sup>[12,62]</sup>。这 4 个新门被一并命名为 Asgard 超门(Asgard superphylum)<sup>[11,12]</sup>(图 4B),是真核生物的姐妹群。其中,海姆达尔古菌门与真核生物距离最近<sup>[63]</sup>。

不过,新的发现也引发了学术界的争议。一方面, Da Cunha 等<sup>[64]</sup>指出, Ettema 课题组的取样存在污染,最终结果也因为取到演化速度快的序列而造成 LBA 效应,并且去除数据集中的蛋白延伸因子 EF2 便足够破坏真核生物与 Lokiarchaea 的密切关系。他们认为 Lokiarchaea 和 Asgard 超门是广古菌门的姐妹群,而非真核生物的姐妹群,且真核生物为单系群,根源通往 TACK 超门中 Thaumarchaeota 的分支,最终结果是三域系统。Ettema 课题组的 Spang 等对此进行了反驳,认为没有证据表明取样污染,去除 EF2 依然能够证明 Asgard 与真核生物属于一个单系群,而 Da Cunha 等使用了不合适的方法导致三域系统结果<sup>[65]</sup>。此后双方仍有争论,但未有结果<sup>[66,67]</sup>。最近, Williams 等<sup>[49]</sup>针对 Da Cunha 等<sup>[64]</sup>的结果,使用相同软件的不同最大似然方法包分析相同数据,得到与原文不同的二域系统结果;他们进一步使用多个新模型分析 35 个基因的对齐结果,真核生物均与 Asgard 古细菌形成姐妹群;基于“超树”和基因合并对齐方法分析 3000 多个古细菌和真核生物基因的结果显示真核生物是从古细菌域内产生的,因此认为“生命之树”应当为二域系统。另一方面, Harish 等<sup>[68~70]</sup>以蛋白质折叠作为分析对象,将前人证明三域系统的模型<sup>[71,72]</sup>扩展为非平稳模型(non-stationary model),推算出的生命之树树根将细胞生命分为无核生物(Akaryote,即古细菌与真细菌)和真核生物二域,形成了一个与此前二域、三域生命之树均不同的二域系统(图 5)。分析结果还指出, Asgard 古细菌与所有其他的古细菌是姐妹群,难以作为一

个整体处理。这一结论说明细胞生命内最深层次的分裂位于原核与真核之间。相比常用的蛋白质氨基酸序列<sup>[49]</sup>, Harish 等<sup>[73]</sup>认为蛋白质结构域在生化角度上非冗余和更保守,更适合作为进化标记进行系统发育学分析。然而,这个新的二域生命之树是选取不同进化分子标记的结果,违背了此前众多研究所证明的真核生物与古细菌间的密切关系,因此争论依然存在。

对于 Asgard 古细菌与真核生物的密切关系也存在不同解读。Fournier 和 Poole<sup>[74]</sup>便试图以现代哺乳动物的祖先合弓纲(Synapsida)与现代爬行动物的进化关系作为平行案例,说明仅从真核生物与 Asgard 古细菌的谱系关系无法解决二域/三域争论,此外还应确定古细菌和真细菌之间的根源。

虽有上述争论,但发现新的、进化上更接近于真核生物的 Asgard 种类依然是重要的研究方向。Seitz 等<sup>[75]</sup>发现了新的 Asgard 古细菌海拉古菌门(Helarchaeota)。深圳大学李猛课题组利用开源数据库中的现有数据分析 Asgard 古细菌 16S rRNA 序列,发现了 5 个此前未知的 Asgard 亚组(subgroup),并且为 Asgard 古细菌的转录活性混合营养型生活方式提供了证据<sup>[76]</sup>。他们利用几个沿海沉积物样本重建出 15 个基因组,其中包括一个新的 Asgard 门类“Gerdarchaeota”<sup>[77]</sup>。最近,他们设计的新 SSU rRNA 引物完成了 Asgard 中一种不能与通用引物匹配的新类群的扩增工作<sup>[78]</sup>。Ettema 课题组未发表的结果也显示发现了 5 个新 Asgard 类群,其中 Idunnarchaeota 是目前与真核生物最接近的类群<sup>[79]</sup>。

总之,随着模型的复杂化、基因序列和蛋白质序列数据的积累以及新门类古细菌的发现,学术界对于生命之树的争论已逐渐由三域系统向二域系统学说倾斜。主流观点认为真核生物产生自古细菌域内, Asgard 超门是目前与其进化距离最接近的古细菌。在未来,生命之树的形态以及真核生物的定位仍可能不断改变,但 Carl Woese 的三域生命之树仍将长期存在于教科书与人们的脑海中。

## 2 真核生物的起源机制

### 2.1 真核生物起源机制的研究现状

关于真核生物的起源,首先需要明确的两个概

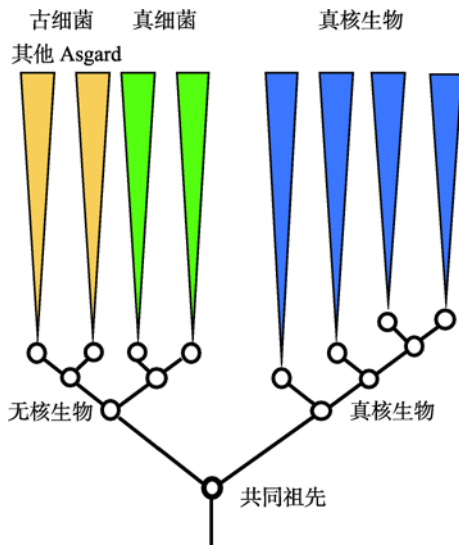


图 5 有争议的新二域生命之树

**Fig. 5 The controversial new two-domain tree of life**

依据蛋白质折叠分析结果构建的生命之树将生物分为真核生物和无核生物两域。根据文献[73]修改绘制。

念是 FECA 和 LECA。FECA (first eukaryotic common ancestor) 指所有真核生物的最早共同祖先；而 LECA (last eukaryotic common ancestor) 指所有现存真核生物距今最近共同祖先<sup>[17]</sup>。FECA 与 LECA 间的阶段常被称为进化树上的茎期(stem phase)<sup>[80]</sup>。大量原核生物和多细胞生物的基因组学和细胞生物学研究已证明，LECA 拥有现代真核生物的大部分遗传和细胞结构特征，如细胞核、线粒体、细胞骨架、囊泡和运输系统、细胞周期等<sup>[6]</sup>。保守估计 LECA 基因组有至少 4000~5000 个基因<sup>[80,81]</sup>。

从理论上分析，原核生物向真核生物的转变大致涉及以下方面：由厌氧向兼性厌氧、好氧代谢方式的转变，共生与内共生，吞噬作用的产生，基因组嵌合体的变化，细胞核的出现，信号通路的复杂化，被膜细胞器的出现，细胞周期的出现，细胞体积的增大等等<sup>[1]</sup>。研究真核生物起源机制的关键在于以 FECA 和 LECA 为坐标，理清茎期中这些进化事件的先后关系和具体过程。

结合实验数据与理论分析，一些局部的问题已经得到充分阐释，例如 GTPase、longins、COPs 和 ESCRT-III 复合物等真核生物标志性蛋白的进化历程，内膜系统和核孔复合物等真核细胞结构的组建过程已在大量综述中有详尽描述<sup>[6,82,83]</sup>。

然而，从整体上解决真核生物的起源机制始终绕不开线粒体的起源问题(图 6)<sup>[6,84]</sup>。作为细胞的能量工厂，线粒体为真核生物在“大氧化事件”后在有氧环境中的辐射进化提供了必要条件；真核生物内膜系统与细胞核的产生也与线粒体的内共生密切相关。

## 2.2 线粒体与真核生物起源

线粒体普遍存在于现代真核生物体内，且随不同物种展现出丰富的多样性<sup>[85]</sup>。许多真核生物(多营寄生生活)为适应厌氧环境，将线粒体简化为线粒体相关细胞器(mitochondrion-related organelles, MROs)<sup>[86,87]</sup>。极端的例子如 *Monocercomonoides* sp. 的线粒体已完全丧失<sup>[88]</sup>。但学界普遍认为线粒体的

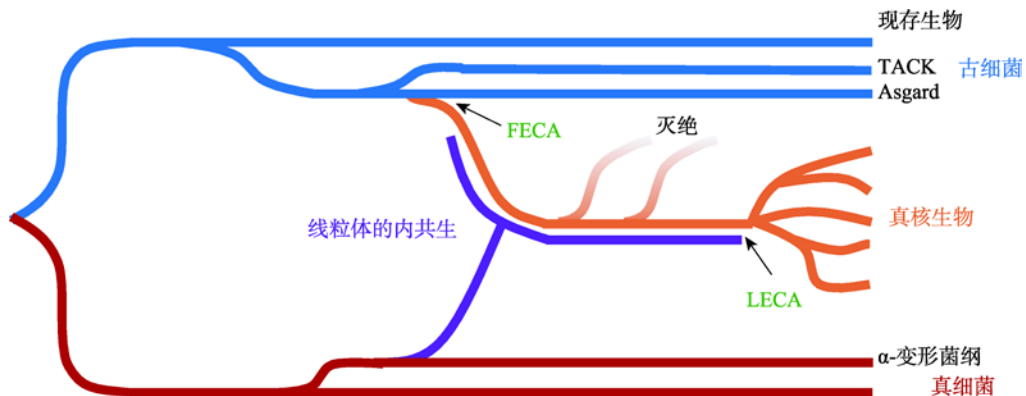


图 6 线粒体内共生是引发真核生物起源的重要事件

**Fig. 6 The endosymbiosis of mitochondrion was an important event in eukaryogenesis**

现有的主流观点认为一种类似于现存 Asgard 超门的古细菌宿主内共生一种  $\alpha$ -变形菌后形成胞内的线粒体，原核细胞逐渐演化为真核细胞。根据文献[6]修改绘制。



简化丧失是发生在 LECA 之后比较新的进化行为, LECA 拥有线粒体结构<sup>[30,81,89]</sup>。

真核生物祖先最初通过内共生途径获得线粒体。1905 年, 俄国植物学家 Konstantin Mereschkowsky 便提出叶绿体由内共生形成的构想; 20 世纪 20 年代, Wallin 将此推广至线粒体<sup>[90]</sup>。40 多年后, 美国生物学家 Lynn Sagan (后来的 Lynn Margulis)重拾内共生理论, 在著名的 *On the Origin of Mitosing Cells* 一文中提出真核生物的细胞器包括线粒体和叶绿体在内都是由内共生细菌演化而来的<sup>[91]</sup>, 引发巨大争议。不过, 随后对于线粒体、叶绿体的基因和蛋白的分析显示它们都拥有与真核谱系相距甚远的原核特征, 分别对应  $\alpha$ -变形菌和蓝细菌, 为内共生学说提供了佐证<sup>[92-94]</sup>。后来在 *Symbiosis in Cell Evolution* 一书中, Margulis 正式提出线粒体是原始真核生物吞噬革兰氏阴性好氧细菌后, 通过长期内共生作用形成的<sup>[90]</sup>, 逐渐得到学术界的广泛认可。自此, 线粒体的内共生起源成为真核生物起源研究的核心点。

### 2.2.1 线粒体内共生的早期与晚期之争

长期以来, 学界在线粒体内共生发生的时间问题上存在争论。主要观点分为两派: 一派认为宿主吞噬好氧的  $\alpha$ -变形菌前, 已经先通过不同途径形成细胞核, 成为具有真核细胞特征(含细胞核、动态细胞骨架、内膜系统)的过渡体, 具有原始吞噬功能等, 被称为晚期线粒体模型(“Mito-late” models); 另一派认为, 宿主首先与好氧的  $\alpha$ -变形菌内共生形成带有线粒体的原核细胞, 随后促进原核细胞演化出细胞核、内膜系统等真核生物特征, 被称为早期线粒体模型(“Mito-early” models)。

20 世纪 80 年代, 研究者在现存真核生物中发现了不含线粒体的物种, 如贾第虫属(*Giardia*)、毛滴虫属(*Trichomonas*)等, 大多是寄生虫。英国演化生物学家 Cavalier-Smith 将它们归类为源真核生物(archezoans)<sup>[95]</sup>, 祖先是细胞内部已具有复杂结构而尚未内共生线粒体的初级真核生物, 属于真核生物树中的早期分支谱系<sup>[96]</sup>。传统的晚期线粒体假说认为, 细胞内部的复杂结构以及吞噬营养能力是线粒体起源的前提, 细胞核的出现是为了避免细胞骨架牵拉对 DNA 的损伤<sup>[97,98]</sup>。基于此的真核生物起源机制有很多, 几个影响深远的模型如(图 7, A~D)

所示<sup>[32,97,99-101]</sup>。内共生学说提出者 Margulis 本人认为吞噬宿主是一种类似现代 *Thermoplasma* spp. (属于广古菌门)的嗜酸无壁古细菌, 细胞核在嵌合细胞形成后自发进化形成(图 7A)<sup>[100,102]</sup>; 著名的互养共栖假说(图 7B)认为真核生物来自产甲烷菌与  $\delta$ -变形杆菌的共生作用<sup>[32]</sup>; Cavalier-Smith 本人则认为真核生物与古细菌演化自一个共同祖先, 真核域与古菌域归属于新壁总域(Neomura) (图 7D)<sup>[98]</sup>。

但是, 针对 Cavalier-Smith 提出的源真核生物概念, 21 世纪以来的研究表明, 此前发现的所有不含线粒体的真核生物均含有产氢体(hydrogenosome)或 mitosome 等细胞器, 与线粒体同源, 是上文所说的 MROs<sup>[1,30,105]</sup>。早期支持源真核生物概念的研究也被认为受到分析偏差影响, 导致源真核生物概念不再流行<sup>[30]</sup>。

此后, 另一派早期线粒体假说获得了许多拥护者。几个经典的 Mito-early 模型如(图 7, E~G)所示<sup>[31,103,104]</sup>, 相似之处在于都是一对古细菌和真细菌首先形成共生关系, 真细菌是古细菌代谢产物的受体, 随后内共生, 形成细胞核等其他结构, 其中包含著名的氢假说(图 7E)。

早期线粒体假说最有力的论据在于现存生物中尚未发现不含线粒体或其同源物的真核细胞过渡形态, 这似乎暗示线粒体的内共生应发生在一个较早的时期, 很可能早于细胞核。Von Dohlen 等<sup>[106]</sup>在非吞噬作用的原核细胞体内发现存在其他原核细胞的现象也表明, 内共生或许不需要真核生物祖先拥有复杂的吞噬营养系统。

从线粒体与真核细胞其他结构的关系角度也支持早期线粒体假说。Martin 等<sup>[4,107-110]</sup>提出了对线粒体、细胞核和真核细胞分裂形式出现顺序的推测。在线粒体始祖进入宿主胞质形成内共生体后, 两者间的基因重组和启动子的相互关联导致内共生体(原始线粒体)基因在宿主细胞质内表达<sup>[107]</sup>。这种嵌合的原核基因组模糊了宿主与内共生体间的区别, 彼此出现基因片段交换, 如从线粒体基因组向宿主基因组转移 II 型内含子等。然而, 原核生物的共转录翻译机制无法解决内含子剪接速度比蛋白翻译速度慢从而产生缺陷肽链的矛盾, 细胞核的出现则为转录和翻译提供了物理屏障<sup>[4]</sup>。随后染色体被局限在细胞核内, 失去与细胞膜的接触, 在细胞分裂时

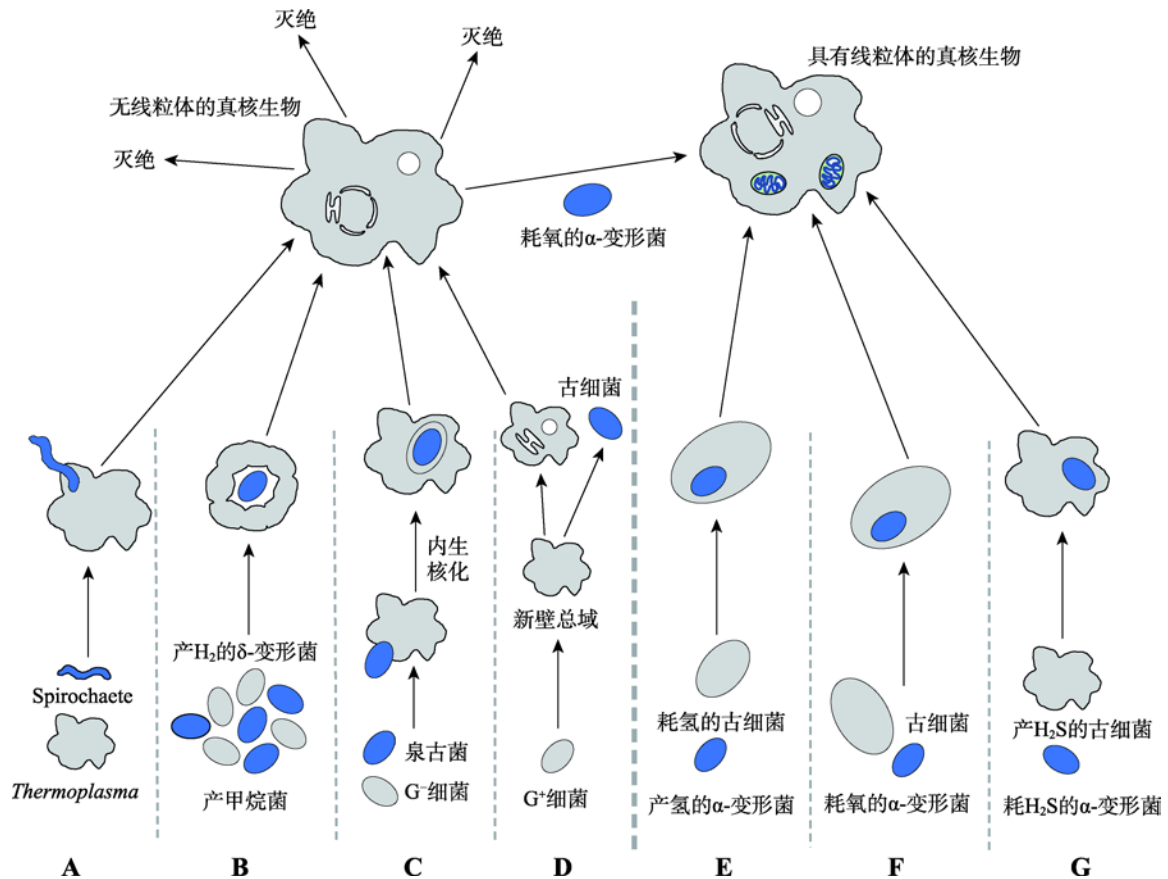


图 7 有关线粒体起源的模型

Fig. 7 Models of the origin of mitochondrion

A~D 为晚期线粒体模型, E~G 为早期线粒体模型。A: Margulis 认为古细菌宿主热原体菌(*Thermoplasma*)首先与螺旋菌(*Spirochaete*)内共生, 逐渐演化出细胞核, 后形成线粒体<sup>[100]</sup>。B: 互养共栖假说, 产甲烷古细菌与  $\delta$ -变形菌在代谢上存在氢的交换。一个产甲烷菌被多个  $\delta$ -变形菌包围后,  $\delta$ -变形菌间的相互作用促进胞质融合, 形成内质网、细胞核等结构,  $\delta$ -变形菌基因组随着基因的转移逐渐消失, 线粒体的内共生最后发生<sup>[32]</sup>。C: 内生核假说, 泉古菌与 G-真细菌相互作用, 泉古菌形成细胞核, 真细菌形成细胞质, 再与  $\alpha$ -变形菌内共生形成线粒体<sup>[101]</sup>。D: Cavalier-Smith 认为真核生物与古细菌演化自一个共同祖先, 同属新壁总域<sup>[97,99]</sup>。E: 氢假说, 宿主是严格依赖氢且严格自养的厌氧古细菌, 共生体能进行有氧呼吸, 但通过厌氧异养代谢为宿主提供氢气<sup>[31]</sup>。F: 古细菌宿主在形成真核细胞的其他复杂结构前首先与耗氧的  $\alpha$ -变形菌内共生形成线粒体<sup>[103]</sup>。G: 基于硫元素的代谢循环, 宿主是产  $H_2S$  的古细菌, 线粒体祖先是耗  $H_2S$  的  $\alpha$ -变形菌<sup>[104]</sup>。根据文献<sup>[30]</sup>修改绘制。

无法自动分离, 使细胞体积较原核生物显著增加<sup>[108]</sup>。同时, 胞质内由于富含线粒体产生的 ATP, 蛋白表达水平显著升高。为解决染色体分离问题, 可能出现了依赖于微管的染色体分离方式, 最终形成减数分裂、真核细胞周期和有丝分裂过程<sup>[109,110]</sup>。此外, 线粒体早期内共生释放外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)的过程也有利于解释真核生物内膜系统的快速形成<sup>[111]</sup>, 详细机制可参阅 McBride<sup>[112]</sup>的综述。

近 10 年来, 有关 Mito-late 和 Mito-early 模型的问题仍有争论。延续 Mito-early 假说风潮, 主流

观念认为线粒体祖先先于宿主吞噬作用出现, 直接侵入古细菌细胞内发生内共生, 导致真核细胞的产生<sup>[53,113]</sup>。然而, 发现 Asgard 古细菌 Lokiarchaeota 后, 基因组重建出大量细胞骨架相关的 ESPs, 开启了具有吞噬作用的原核生物谱系从古细菌域内部进化的可能性, 支持 Mito-late 模型<sup>[11,114]</sup>。但后续基于宏基因组重建的研究显示, Asgard 古细菌不具备吞噬营养功能, 吞噬作用的形成涉及来自古细菌、真细菌以及真核生物新基因的组合<sup>[115]</sup>, 宿主是否具有吞噬功能依然未知。不过, 限于主流观念大多是依据对当今真核生物组织和功能方面的观察所作的进

化推断,始终缺乏确切的实验分析证据,Hampl 等<sup>[116]</sup>便认为没有充分的理由肯定线粒体产生于细胞吞噬作用之前。

总的来说,目前 Mito-early 假说更为流行,但也面临着其他一些无法解释的现象:真核生物的嵌合性基因组中,大多数来自细菌的基因无法回溯到线粒体的祖先  $\alpha$ -变形菌。2016 年,Pittis 和 Gabaldón<sup>[2,117]</sup>首次通过比较真核生物与距离最近的原核生物蛋白间的亲缘距离,发现  $\alpha$ -变形菌与真细菌来源蛋白之间的进化距离短于真细菌与古细菌来源蛋白之间的进化距离,推测线粒体内共生前,真核细胞祖先可能已与其他真细菌内共生形成嵌合基因组,胞内有内质网和高尔基体,但还不是进化成熟的真核细胞。Ettema<sup>[118]</sup>将其称为介于 Mito-early 和 Mito-late 间的中期线粒体(Mito-intermediate)假说。但此结果引发许多质疑。William 和 Nelson-Sathi<sup>[119]</sup>认为作者采用了错误的统计和分析方法;Esposti 也认为 Pittis 和 Gabaldón 的方法早已被证明失准<sup>[53]</sup>,低估了  $\alpha$ -变形菌祖先对真核生物谱系的影响<sup>[120]</sup>。此外,目前认为与真核生物祖先关系最密切的 Asgard 古细菌本身也存在大量其他真细菌基因<sup>[17]</sup>。又鉴于位于现存  $\alpha$ -变形菌纲深枝的磁球菌(*Magnetococcus*)具有一个  $\alpha$ -变形菌成分仅占 1/3 的嵌合基因组,Esposti<sup>[120]</sup>推测久远的线粒体祖先本身很可能就是一个嵌合基因组,而非仅有  $\alpha$ -变形菌的血统<sup>[121]</sup>,所以 Pittis 与 Gabaldón 的最终结论显得有些草率。

至今,线粒体内共生的早期与晚期之争依旧无法定论,不过可以确定的是,线粒体的内共生发生在 TACK 和 Asgard 古细菌基因组中所编码的 ESPs 基因出现之后。若真如 Esposti 所说,线粒体祖先是一个嵌合基因组的话,这段长达 30 余年的争论便可以画上句号。

### 2.2.2 线粒体祖先的确定

探索线粒体始祖细菌的性质有助于人们了解真核生物的内共生过程。长久以来,线粒体祖先与  $\alpha$ -变形菌纲相关的结论为学术界广泛接受<sup>[93]</sup>,但与其中哪一谱系更加接近的问题始终没有解决,给重建线粒体与现存  $\alpha$ -变形菌谱系的最近祖先(last common ancestor)带来困难。

大量通过单基因或全基因组基因串联建树的结

果常常将线粒体与立克次氏体目(Rickettsiales)相关联<sup>[122,123]</sup>。而当引入 Pelagibacterales 目(SAR11)基因组数据作系统发育分析时,则发现 Pelagibacterales 目是线粒体-立克次氏体目一枝的姐妹群<sup>[124]</sup>,或甚至是线粒体的姐妹群<sup>[125]</sup>。后来的分析表明,这些结果是受到线粒体和 Pelagibacterales 目之间趋同相似性影响带来的偏差<sup>[126,127]</sup>。随后,依赖于核基因编辑和线粒体基因编辑的线粒体蛋白数据库的分析结果支持线粒体发源自立克次氏体目内<sup>[128,129]</sup>。

但是,上述将线粒体与立克次氏体目关联的研究也存在缺陷。第一,线粒体、立克次氏体目以及上文提到的 Pelagibacterales 目(SAR11)与其他  $\alpha$ -变形菌纲的物种相比进化更加迅速且已经失去了许多基因,在基因组层面 A+T 占比颇高,很容易招致 LBA 偏差<sup>[89]</sup>。对此,一些研究的应对措施是选用较早由线粒体基因组转移到核基因组的基因进行分析<sup>[128]</sup>,但不可忽视的一点是前文所提到的核基因组中存在的碱基替换、基因丢失和 HGT 问题。第二,推测的立克次氏体目在地球上的存在时间不够长,目内处于主干地位的 *Wolbachia* 属仅有大约 5 亿年历史<sup>[120]</sup>。第三,立克次氏体目的代谢方式也与线粒体差别很大,普遍不存在现代真核生物的厌氧性状,不编码调节线粒体嵴的 MICOS 蛋白和功能等同于线粒体 ATP 合酶抑制亚基的相关结构<sup>[120]</sup>。

另一种通过单基因数据集和多基因串联数据集推断网络的方法将线粒体与其他  $\alpha$ -变形菌纲分支相连,如红螺菌目(Rhodospirillales)的红螺菌属(*Rhodospirillum*)和根瘤菌目(Rhizobiales)的苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)<sup>[89]</sup>。从代谢相似性来看,有分析认为线粒体可能更加接近于红螺菌属<sup>[120]</sup>。还有研究认为线粒体来自  $\alpha$ -变形菌纲内的一个独立深枝<sup>[127]</sup>。

2018 年,Martijn 等<sup>[130]</sup>通过宏基因组重建得到 12 个  $\alpha$ -变形菌纲谱系(包含几个新发现的谱系),将线粒体放在了这些谱系的进化分支之外,是所有测序的  $\alpha$ -变形菌纲序列的姐妹群,与此前的众多结果存在矛盾。然而,2019 年 Fan 等<sup>[131]</sup>的结果则又显著支持线粒体来源于  $\alpha$ -变形菌纲内的传统观点,并指出 Martijn 等在规避异源基因的处理时可能存在模型过度拟合的缺陷。

形成这一僵局的原因来自多方面。首先,许多现存的  $\alpha$ -变形菌纲生物受到与其他细菌之间的双向



水平基因转移(HGT)影响<sup>[132]</sup>, 线粒体始祖本身甚至可能就有个嵌合体基因组<sup>[120]</sup>; 其次, 线粒体基因在进化上比一般自由生活的细菌更加迅速<sup>[128]</sup>, 且线粒体基因组向核基因的转移与时间呈现非线性关系<sup>[133]</sup>, 为模型的建立带来困难; 最后,  $\alpha$ -变形菌纲作为一个成员变异性极大的纲, 现存成员间的进化关系仍在调整, 例如 Muñoz-Gómez 等<sup>[134]</sup>的研究已将 Holosporales 目从“广义的立克次氏体目”(Rickettsiales sensu lato)中分离出来。环境微生物基因组的测定也在不断发现新的  $\alpha$ -变形菌纲物种。

综上, 线粒体始祖的判定仍是探索真核生物起源道路上亟需解决的问题。

### 2.2.3 古细菌宿主的确定

长期以来的系统发育基因组学研究已经基本确定线粒体内共生的宿主与古细菌相关<sup>[84]</sup>。宏基因组技术出现之前, 古细菌分为广古菌门和泉古菌门两门。宿主身份有颇多说法。泉古菌假说支持宿主属于泉古菌门<sup>[28,29]</sup>; 氢假说(图 7E)<sup>[31]</sup>与互养共栖假说(图 7B)<sup>[32]</sup>支持宿主属于广古菌门中的产甲烷菌(methanogens); Searcy 等<sup>[135]</sup>与 Margulis 等<sup>[100]</sup>支持宿主属于广古菌门中的热原体菌(*Thermoplasma*) (图 7A)。这些模型虽彼此对立, 但共同点是线粒体内共生仅涉及一个古细菌宿主和一个真细菌内共生体。然而, 与此不同的其他一些模型则认为宿主是两种原核生物的嵌合体, 这些观点被统一称作三元假说(ternary hypothesis)。其中较为流行的是内生核假说(endokaryotic hypothesis) (图 7C), 推测宿主的细胞核起源于一种古细菌, 而细胞质起源于一种真细菌, 以此解释真核生物基因组中无法追溯到  $\alpha$ -变形菌纲的细菌来源基因<sup>[101,136]</sup>。然而, 后期的系统发育检验并没有发现这样一个细菌谱系, 这表明内生核假说缺乏证据支持<sup>[53]</sup>。面对众多模型长期不可调和的僵局, 2012 年, Godd<sup>[137]</sup>提出了另一种三元假说。在融合纳古菌属(*Nanoarchaeum*) (当时未独立为门, 属于广古菌门)和燃球菌属(*Ignicoccus*) (属于泉古菌门)两种古细菌的基因组后, Godd 发现可以解释当时的大部分数据, 提出宿主可能是两种古细菌的嵌合体(chimera)。这一设想具有很强的创新性, 但仍然需要大量的系统发育分析和细胞学研究检验

才能令人信服。

在结合宏基因组和单细胞基因组分析技术发现 TACK 超门和 Asgard 超门以后, 内共生宿主的身份逐渐明朗, 也基本消除了第三个原始真核生物谱系存在的可能性<sup>[11,17]</sup>。Asgard 古细菌中大量 ESPs 的出现同时否定了其他一些有关病毒影响真核生物起源的理论。这些理论认为真核生物的大量基因, 甚至细胞核本身都来自核质大 DNA 病毒(nucleocytoplasmic large DNA viruses, NCLDV<sub>s</sub>)<sup>[138,139]</sup>, 其基于的证据主要是在 NCLDV<sub>s</sub> 中发现了许多与真核生物相关的基因。而如今 Asgard 古细菌中大量 ESPs 的发现以及随后纠正的系统发育分析则表明, NCLDV<sub>s</sub> 中的真核样基因实际来自于真核生物病毒的 HGT。病毒的高进化速率为此前的系统发育重建带来偏差, 导致了 NCLDV<sub>s</sub> 是真核生物基因甚至是细胞核源头的判断。事实上, NCLDV<sub>s</sub> 可能是 Asgard 古细菌或相关谱系的古老成员<sup>[90]</sup>。

如今, 对 Asgard 古细菌的分析研究已经成为了了解真核生物祖先的重要手段。Asgard 超门呈现出丰富的代谢方式。宏基因组重建分析推测 Asgard 超门普遍存在氮和硫代谢循环<sup>[61]</sup>, 不能进行吞噬作用<sup>[115]</sup>, Lokiarchaeota 存在依赖氢的代谢途径<sup>[140]</sup>, Thorarchaeota 存在依赖无机碳和有机碳的混合代谢以及产乙酸途径<sup>[62,141]</sup>, Lokiarchaeota 和 Thorarchaeota 存在卤代有机物代谢途径<sup>[142]</sup>, Heimdallarchaeota 存在光能营养途径<sup>[143,144]</sup>, Helarchaeota 存在厌氧碳氢化合物代谢途径<sup>[75]</sup>, 部分 Lokiarchaeota 编码镍铁氢化酶<sup>[142]</sup>。基于这些代谢研究提出的真核生物起源新模型也不断涌现, 如电子或氢从有机异养古细菌宿主流向细菌共生体的“逆流模型”(reverse flow model) (图 8A)<sup>[145]</sup>。此外, 对水底生物垫内 Asgard 古细菌与周围其他细菌的基因组综合研究也有助于阐释线粒体祖先与宿主内共生前的共生关系, 例如 Saghai 等<sup>[146]</sup>便利用 16S/18S rRNA 宏条形码和多元统计分析技术, 在盐沼池水中发现了 Lokiarchaeota 与此前知之甚少的细菌门类 TA06 间的强正相关关系, 可能存在共生作用。

由于大量 Asgard 古细菌的研究结论都只是基于宏基因组分析的结果, 细胞生物学层面的研究验证便显得尤为重要。然而, Asgard 古细菌的生长环境



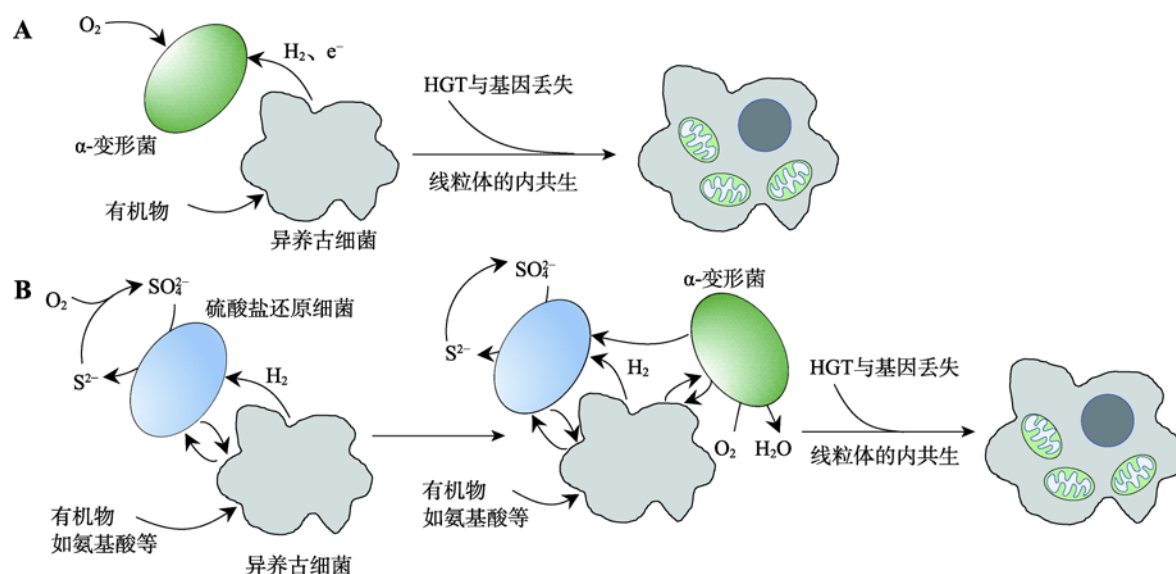


图 8 真核生物起源的逆流模型与  $E^3$  模型的对比

Fig. 8 Comparison between reverse flow model and  $E^3$  model

A: 逆流模型; B:  $E^3$  模型。两个模型的共同点是异养古细菌宿主与  $\alpha$ -变形菌内共生形成线粒体; 不同点在于  $E^3$  模型比逆流模型多引入了一个共生菌——硫酸盐还原细菌。

大多处于海底沉积物中, 且可能依赖其他共生细菌生存, 这为 Asgard 古细菌的分离培养和蛋白的提纯带来巨大困难, 相关工作开展缓慢。Akil 和 Robinson<sup>[147]</sup>取得了标志性成果。他们利用质粒载体表达 Asgard 古细菌的前纤维蛋白编码基因, 发现表达产物能够成功与哺乳动物的肌动蛋白结合, 即使相距 2、30 亿年的进化距离依旧与哺乳动物的相关蛋白呈现结构和功能的相似性, 这为 Asgard 超门与真核生物的相似性提供了一个细胞学证据。

近年来, 对 Asgard 古细菌的研究终于迎来里程碑式的成果。日本科学家 Imachi 等<sup>[13]</sup>花费 12 年时间利用连续流动生物反应器, 成功从深海沉积物中分离, 并首次在实验室环境下提纯培养出一个 Asgard 古细菌菌株 MK-D1, 属于 Lokiarchaeota。该研究的原始目的是寻找甲烷降解菌<sup>[148]</sup>。分离到的 Lokiarchaeota 门古细菌生长缓慢, 滞后期长达 3~6 个月, 二倍扩增需 14~25 天。进一步观察显示, 这是一种小型厌氧球菌, 细胞可以形成凸起结构、气泡和胞外小泡, 没有明显的真核样细胞器, 具备厌氧代谢氨基酸的能力, 依赖共生菌一起生存。Imachi 等据此提出了新的真核生物起源模型——纠缠-吞噬-内生(entangle-engulf-endogenize,  $E^3$ )模型: 厌氧古细菌宿主与一种硫酸盐还原细菌共生, 共生细菌

是宿主氨基酸代谢产生的脂肪酸和氢气的受体, 随后宿主与另一好氧细菌内共生形成线粒体, 共涉及 3 种原核生物。这与此前仅涉及两个原核生物的“逆流模型”<sup>[145]</sup>存在不同(图 8)。逆流模型认为古细菌代谢产生的氢气直接被线粒体祖先消耗, 无需引入假设的另一个共生伴侣(图 8A), 而  $E^3$  模型中的线粒体起源是处于共生关系下的厌氧宿主古细菌对环境中氧气浓度增加的适应行为(图 8B)。

在未来, 有关古细菌宿主的研究无疑将借鉴 Imachi 等的经验, 从环境中发现并在实验室条件下培养研究与真核生物进化距离更近的微生物。

### 3 结语与展望

近几十年来对真核生物起源的研究积累了大量数据、模型和观点, 这是一个涉及进化生物学、微生物学、生物化学、分子生物学、细胞生物学和古生物学等多领域的宏大问题。新技术的发明(如 16S/18S rRNA 测序、基因组测序、宏基因组测序和单细胞全基因组测序)、新物种的发现(如古细菌域、TACK 超门和 Asgard 超门)以及分析方法的改进不断推动我们对于真核生物起源的认知。

然而争论依然存在, 主流观点将生命之树上的

真核生物分支放在古细菌域内,从 Asgard 超门内发出或是 Asgard 超门的姐妹群,对应二域系统生命之树;真核生物的始祖是一个类似 Asgard 超门的古细菌,在与一种  $\alpha$ -变形菌纲细菌内共生形成线粒体后促进其他细胞内部结构的进化。

未来的研究重点,一方面在于改进系统发育分析方法,并延续环境微生物的宏基因组重建分析工作。在确定古细菌宿主的角度上,发现新的 Asgard 古细菌,甚至是其他与真核生物更接近的古细菌新门类。在确定线粒体祖先的角度上,亟需理清  $\alpha$ -变形菌纲的谱系关系。目前可获取到基因组数据的  $\alpha$ -变形菌纲物种大多与医学与农业相关,或者是部分可在实验室条件下分离培养的菌种<sup>[120,130]</sup>,可能存在一定的取样偏差,不一定能完全代表现存  $\alpha$ -变形菌的多样性。因此,在海水、地下水和土壤等环境中发现未培养微生物,扩展  $\alpha$ -变形菌纲物种数的工作可能仍是重中之重。此外,发展基因树-物种树(gene tree-species tree)综合分析<sup>[149]</sup>等更加复杂的计算方法也有望为线粒体的祖先提供更加精确的定位。另一方面,实验室中的细胞生物学研究亟需跟进。在确定古细菌宿主的角度上,借鉴 Imachi 等<sup>[13]</sup>的工作,实验室条件下直接培养 Asgard 古细菌进行基因组测序可以避免宏基因组重建时的误差,直接观察细胞形态和代谢过程。但这面临两个问题,一是需要改进生物反应器系统,缩短 Asgard 古细菌的分离提纯时间;二是需要研究自然条件下 Asgard 古细菌的生活环境和共生细菌等,摸索其在实验室中的最适培养条件,加快繁殖速度以供实验需求。在确定线粒体祖先的角度上,Hu<sup>[150]</sup>通过冷冻电镜发现 HeLa 细胞线粒体存在与许多现存  $\alpha$ -变形菌纲生物相似的出芽增殖方式,不同于传统主流观点所描述的二分裂增殖方式,而这一现象难以在常用的荧光显微镜下观察到。此结果说明或许可以将新一代显微成像技术应用于线粒体祖先的研究中,从形态学层面比较线粒体与立克次氏体等现存  $\alpha$ -变形菌的异同,为系统发育学分析提供必要补充。此外,实验室内对真核细胞进化某些步骤的直接模拟实验也有利于我们还原真核生物始祖的内共生效应和细胞器的进化历程。相关研究工作已在开展之中,例如 2018 年 Mehta 等<sup>[151]</sup>报道的在酵母胞质内培养大肠杆菌多达 120 天的工作。

最后,值得提出的一点是,现在采用的 Asgard 古细菌等研究对象并不古老,也同真核生物一样走过了十几亿年的辐射进化历程。现存代谢方式丰富多样的 Asgard 古细菌不可能完全代表原始的真核生物。未来的目标将是通过分析大量现存与即将涌现的数据,提出一个适用于所有真核生物特征的真核生物起源模型。

## 致谢

本文在撰稿及写作过程中得到南京大学生命科学院杨四海教授的悉心指导,特此表示由衷的感谢。

## 参考文献(References):

- [1] Blackstone NW. An evolutionary framework for understanding the origin of eukaryotes. *Biology (Basel)*, 2016, 5(2): 18. [DOI]
- [2] Gabaldón T. Relative timing of mitochondrial endosymbiosis and the “pre-mitochondrial symbioses” hypothesis. *IUBMB Life*, 2018, 70(12): 1188–1196. [DOI]
- [3] Fuerst JA. Intracellular compartmentation in planctomycetes. *Annu Rev Microbiol*, 2005, 59: 299–328. [DOI]
- [4] Martin W, Koonin EV. Introns and the origin of nucleus-cytosol compartmentalization. *Nature*, 2006, 440(7080): 41–45. [DOI]
- [5] Lin L, Shi AB. Endocytic recycling pathways and the regulatory mechanisms. *Hereditas(Beijing)*, 2019, 41(6): 451–468.  
林珑, 史岸冰. 细胞内吞循环运输通路及其分子调控机制. *遗传*, 2019, 41(6): 451–468. [DOI]
- [6] Dacks JB, Field MC, Buick R, Eme L, Gribaldo S, Roger AJ, Brochier-Armanet C, Devos DP. The changing view of eukaryogenesis—fossils, cells, lineages and how they all come together. *J Cell Sci*, 2016, 129(20): 3695–3703. [DOI]
- [7] Shen Y, Buick R, Canfield DE. Isotopic evidence for microbial sulphate reduction in the early Archean era. *Nature*, 2001, 410(6824): 77–81. [DOI]
- [8] Ueno Y, Ono S, Rumble D, Maruyama S. Quadruple sulfur isotope analysis of ca. 3.5 Ga Dresser Formation: New evidence for microbial sulfate reduction in the early Archean. *Geochim Cosmochim Acta*, 2008, 72(23): 5675–5691. [DOI]
- [9] Yan YZ, Liu ZL. Significance of eucaryotic organisms

- in the microfossil flora of Changcheng system. *Acta Micropalaeontol Sin*, 1993, 10(2): 167–180. [DOI]
- [10] Parfrey LW, Lahr DJG, Knoll AH, Katz LA. Estimating the timing of early eukaryotic diversification with multigene molecular clocks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(33): 13624–13629. [DOI]
- [11] Spang A, Saw JH, Jørgensen SL, Zaremba-Niedzwiedzka K, Martijn J, Lind AE, van Eijk R, Schleper C, Guy L, Ettema TJG. Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*, 2015, 521(7551): 173–179. [DOI]
- [12] Zaremba-Niedzwiedzka K, Caceres EF, Saw JH, Bäckström D, Juzokaite L, Vancaester E, Seitz KW, Anantharaman K, Starnawski P, Kjeldsen KU, Stott MB, Nunoura T, Banfield JF, Schramm A, Baker BJ, Spang A, Ettema TJ. Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*, 2017, 541(7637): 353–358. [DOI]
- [13] Imachi H, Nobu MK, Nakahara N, Morono Y, Ogawara M, Takaki Y, Takano Y, Uematsu K, Ikuta T, Ito M, Matsui Y, Miyazaki M, Murata K, Saito K, Sakai S, Song CH, Tasumi E, Yamanaka Y, Yamaguchi T, Kamagata Y, Tamaki H, Takai K. Isolation of an archaeon at the prokaryote–eukaryote interface. *Nature*, 2020, 577(7791): 519–525. [DOI]
- [14] Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74(11): 5088–5090. [DOI]
- [15] Iwabe N, Kuma K, Hasegawa M, Osawa S, Miyata T. Evolutionary relationship of archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(23): 9355–9359. [DOI]
- [16] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(12): 4576–4579. [DOI]
- [17] Eme L, Spang A, Lombard J, Stairs CW, Ettema TJG. Archaea and the origin of eukaryotes. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(12): 711–723. [DOI]
- [18] Pace NR. Time for a change. *Nature*, 2006, 441(7091): 289–289. [DOI]
- [19] Huet J, Schnabel R, Sentenac A, Zillig W. Archaeobacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type. *EMBO J*, 1983, 2(8): 1291–1294. [DOI]
- [20] Zillig W, Klenk HP, Palm P, Pühler G, Gropp F, Garrett RA, Leffers H. The phylogenetic relations of DNA-dependent RNA polymerases of archaeobacteria, eukaryotes, and eubacteria. *Can J Microbiol*, 1989, 35(1): 73–80. [DOI]
- [21] Gribaldo S, Poole AM, Daubin V, Forterre P, Brochier-Armanet C. The origin of eukaryotes and their relationship with the Archaea: are we at a phylogenomic impasse? *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(10): 743–752. [DOI]
- [22] Lindås AC, Karlsson EA, Lindgren MT, Ettema TJ, Bernander R. A unique cell division machinery in the Archaea. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(48): 18942–18946. [DOI]
- [23] Samson RY, Obita T, Freund SM, Williams RL, Bell SD. A role for the ESCRT system in cell division in archaea. *Science*, 2008, 322(5908): 1710–1713. [DOI]
- [24] Li J, Zhang KQ. Genetic diversity of microorganisms. *Hereditas(Beijing)*, 2012, 34(11): 1399–1408. 李娟, 张克勤. 微生物的遗传多样性. 遗传, 2012, 34(11): 1399–1408. [DOI]
- [25] Rivera MC, Jain R, Moore JE, Lake JA. Genomic evidence for two functionally distinct gene classes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(11): 6239–6244. [DOI]
- [26] Canback B, Andersson SG, Kurland CG. The global phylogeny of glycolytic enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(9): 6097–6102. [DOI]
- [27] Peretó J, López-García P, Moreira D. Ancestral lipid biosynthesis and early membrane evolution. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29(9): 469–477. [DOI]
- [28] Lake JA, Henderson E, Oakes M, Clark MW. Eocytes: a new ribosome structure indicates a kingdom with a close relationship to eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(12): 3786–3790. [DOI]
- [29] Rivera MC, Lake JA. Evidence that eukaryotes and eocyte prokaryotes are immediate relatives. *Science*, 1992, 257(5066): 74–76. [DOI]
- [30] Embley TM, Martin W. Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature*, 2006, 440(7084): 623–630. [DOI]
- [31] Martin W, Müller M. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature*, 1998, 392(6671): 37–41. [DOI]
- [32] Moreira D, López-García P. Symbiosis between methanogenic archaea and  $\delta$ -proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis. *J Mol Evol*, 1998, 47(5): 517–530. [DOI]
- [33] Harris JK, Kelley ST, Spiegelman GB, Pace NR. The genetic core of the universal ancestor. *Genome Res*, 2003, 13(3): 407–412. [DOI]

- [34] Ciccarelli FD, Doerks T, Von Mering C, Creevey CJ, Snel B, Bork P. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science*, 2006, 311(5765): 1283–1287. [DOI]
- [35] Yutin N, Makarova KS, Mekhedov SL, Wolf YI, Koonin EV. The deep archaeal roots of eukaryotes. *Mol Biol Evol*, 2008, 25(8): 1619–1630. [DOI]
- [36] Rivera MC, Lake JA. The ring of life provides evidence for a genome fusion origin of eukaryotes. *Nature*, 2004, 431(7005): 152–155. [DOI]
- [37] Pisani D, Cotton JA, McInerney JO. Supertrees disentangle the chimerical origin of eukaryotic genomes. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1752–1760. [DOI]
- [38] Cox CJ, Foster PG, Hirt RP, Harris SR, Embley TM. The archaeobacterial origin of eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(51): 20356–20361. [DOI]
- [39] Foster PG, Cox CJ, Embley TM. The primary divisions of life: a phylogenomic approach employing composition-heterogeneous methods. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2009, 364(1527): 2197–2207. [DOI]
- [40] Boussau B, Daubin V. Genomes as documents of evolutionary history. *Trends Ecol Evol*, 2010, 25(4): 224–232. [DOI]
- [41] Som A. Causes, consequences and solutions of phylogenetic incongruence. *Brief Bioinform*, 2015, 16(3): 536–548. [DOI]
- [42] Lerat E, Daubin V, Ochman H, Moran NA. Evolutionary origins of genomic repertoires in bacteria. *PLoS Biol*, 2005, 3(5): e130. [DOI]
- [43] Soucy SM, Huang J, Gogarten JP. Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(8): 472–482. [DOI]
- [44] Wagner A, Whitaker RJ, Krause DJ, Heilers JH, Van Wolferen M, Van Der Does C, Albers SV. Mechanisms of gene flow in archaea. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(8): 492–501. [DOI]
- [45] Akanni WA, Siu-Ting K, Creevey CJ, McInerney JO, Wilkinson M, Foster PG, Pisani D. Horizontal gene flow from Eubacteria to Archaeobacteria and what it means for our understanding of eukaryogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2015, 370(1678): 20140337. [DOI]
- [46] Cotton JA, McInerney JO. Eukaryotic genes of archaeobacterial origin are more important than the more numerous eubacterial genes, irrespective of function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(40): 17252–17255. [DOI]
- [47] Cohen O, Gophna U, Pupko T. The complexity hypothesis revisited: connectivity rather than function constitutes a barrier to horizontal gene transfer. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(4): 1481–1489. [DOI]
- [48] Williams TA, Foster PG, Cox CJ, Embley TM. An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature*, 2013, 504(7479): 231–236. [DOI]
- [49] Williams TA, Cox CJ, Foster PG, Szöllősi GJ, Embley TM. Phylogenomics provides robust support for a two-domains tree of life. *Nat Ecol Evol*, 2020, 4(1): 138–147. [DOI]
- [50] Tourasse NJ, Gouy M. Accounting for evolutionary rate variation among sequence sites consistently changes universal phylogenies deduced from rRNA and protein-coding genes. *Mol Phylogenet Evol*, 1999, 13(1): 159–168. [DOI]
- [51] Guy L, Ettema TJ. The archaeal ‘TACK’ superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends Microbiol*, 2011, 19(12): 580–587. [DOI]
- [52] Williams TA, Foster PG, Nye TM, Cox CJ, Embley TM. A congruent phylogenomic signal places eukaryotes within the Archaea. *Proc Biol Sci*, 2012, 279(1749): 4870–4879. [DOI]
- [53] Rochette NC, Brochier-Armanet C, Gouy M. Phylogenomic test of the hypotheses for the evolutionary origin of eukaryotes. *Mol Biol Evol*, 2014, 31(4): 832–845. [DOI]
- [54] Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkuch C, Rogers YH, Smith HO. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 2004, 304(5667): 66–74. [DOI]
- [55] Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(3): 245–252. [DOI]
- [56] Elkins JG, Podar M, Graham DE, Makarova KS, Wolf Y, Randau L, Hedlund BP, Brochier-Armanet C, Kunin V, Anderson I, apidus A, Goltsman E, Barry K, Koonin EV, Hugenholtz P, Kyrpides N, Wanner G, Richardson P, Keller M, Stetter K. A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(23): 8102–8107. [DOI]
- [57] Nunoura T, Takaki Y, Kakuta J, Nishi S, Sugahara J,



- Kazama H, Chee GJ, Hattori M, Kanai A, Atomi H, Takai K, Takami H. Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(8): 3204–3223. [DOI]
- [58] Guy L, Saw JH, Ettema TJ. The archaeal legacy of eukaryotes: a phylogenomic perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6(10): a016022. [DOI]
- [59] Petitjean C, Deschamps P, López-García P, Moreira D. Rooting the domain archaea by phylogenomic analysis supports the foundation of the new kingdom Proteoarchaeota. *Genome Biol Evol*, 2015, 7(1): 191–204. [DOI]
- [60] Raymann K, Brochier-Armanet C, Gribaldo S. The two-domain tree of life is linked to a new root for the Archaea. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(21): 6670–6675. [DOI]
- [61] MacLeod F, Kindler GS, Wong HL, Chen R, Burns BP. Asgard archaea: diversity, function, and evolutionary implications in a range of microbiomes. *AIMS Microbiol*, 2019, 5(1): 48–61. [DOI]
- [62] Seitz KW, Lazar CS, Hinrichs KU, Teske AP, Baker BJ. Genomic reconstruction of a novel, deeply branched sediment archaeal phylum with pathways for acetogenesis and sulfur reduction. *ISME J*, 2016, 10(7): 1696–1705. [DOI]
- [63] López-García P, Moreira D. Eukaryogenesis, a syntrophy affair. *Nat Microbiol*, 2019, 4(7): 1068–1070. [DOI]
- [64] Da Cunha V, Gaia M, Gabelle D, Nasir A, Forterre P. Lokiarchaea are close relatives of Euryarchaeota, not bridging the gap between prokaryotes and eukaryotes. *PLoS Genet*, 2017, 13(6): e1006810. [DOI]
- [65] Spang A, Eme L, Saw JH, Caceres EF, Zaremba-Niedzwiedzka K, Lombard J, Guy L, Ettema TJG. Asgard archaea are the closest prokaryotic relatives of eukaryotes. *PLoS Genet*, 2018, 14(3): e1007080. [DOI]
- [66] Da Cunha V, Gaia M, Nasir A, Forterre P. Asgard archaea do not close the debate about the universal tree of life topology. *PLoS Genet*, 2018, 14(3): e1007215. [DOI]
- [67] Narro AB, Spang A, Stairs CW, Caceres EF, Baker BJ, Miller CS, Ettema TJG. Complex evolutionary history of translation Elongation Factor 2 and diphthamide biosynthesis in Archaea and parabasalids. *Genome Biol Evol*, 2018, 10(9): 2380–2393. [DOI]
- [68] Harish A, Tunlid A, Kurland CG. Rooted phylogeny of the three superkingdoms. *Biochimie*, 2013, 95(8): 1593–1604. [DOI]
- [69] Harish A, Kurland CG. Akaryotes and Eukaryotes are independent descendants of a universal common ancestor. *Biochimie*, 2017, 138: 168–183. [DOI]
- [70] Harish A. What is an archaeon and are the Archaea really unique? *PeerJ*, 2018, 6: e5770. [DOI]
- [71] Caetano-Anollés G, Caetano-Anollés D. An evolutionarily structured universe of protein architecture. *Genome Res*, 2003, 13(7): 1563–1571. [DOI]
- [72] Yang S, Doolittle RF, Bourne PE. Phylogeny determined by protein domain content. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(2): 373–378. [DOI]
- [73] Harish A, Morrison DA. The deep(er) roots of Eukaryotes and Akaryotes. *FI1000 Res*, 2020, 9(112): 112. [DOI]
- [74] Fournier GP, Poole AM. A briefly argued case that Asgard archaea are part of the eukaryote tree. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1896. [DOI]
- [75] Seitz KW, Dombrowski N, Eme L, Spang A, Lombard J, Sieber JR, Teske AP, Ettema TJ, Baker BJ. Asgard archaea capable of anaerobic hydrocarbon cycling. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1–11. [DOI]
- [76] Cai MW, Liu Y, Zhou ZC, Yang YC, Pan J, Gu JD, Li M. Asgard archaea are diverse, ubiquitous, and transcriptionally active microbes. *bioRxiv*, 2018: 374165. [DOI]
- [77] Cai MW, Liu Y, Yin XR, Zhou ZC, Friedrich MW, Richter-Heitmann T, Nimzyk R, Kulkarni A, Wang XW, Li WJ, Pan J, Yang YC, Gu JD, Li M. Highly diverse Asgard archaea participate in organic matter degradation in coastal sediments. *bioRxiv*, 2019: 858530. [DOI]
- [78] Zhang RY, Zou B, Yan YW, Jeon CO, Li M, Cai M, Quan ZX. Design of targeted primers based on 16S rRNA sequences in meta-transcriptomic datasets and identification of a novel taxonomic group in the Asgard archaea. *BMC Microbiol*, 2020, 20(1): 25. [DOI]
- [79] Caceres EF. Genomic and evolutionary exploration of Asgard archaea. *Acta Univ Ups*, 2019, 60–61. [DOI]
- [80] Koonin EV. The origin and early evolution of eukaryotes in the light of phylogenomics. *Genome Biol*, 2010, 11(5): 209. [DOI]
- [81] Koumandou VL, Wickstead B, Ginger ML, Van Der Giezen M, Dacks JB, Field MC. Molecular paleontology and complexity in the last eukaryotic common ancestor. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013, 48(4): 373–396. [DOI]
- [82] Rout MP, Field MC. The evolution of organellar coat

- complexes and organization of the eukaryotic cell. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86: 637–657. [DOI]
- [83] Gould SB. Membranes and evolution. *Curr Biol*, 2018, 28(8): R381–R385. [DOI]
- [84] López-García P, Moreira D. Open questions on the origin of eukaryotes. *Trends Ecol Evol*, 2015, 30(11): 697–708. [DOI]
- [85] Gray MW. Mosaic nature of the mitochondrial proteome: Implications for the origin and evolution of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(33): 10133–10138. [DOI]
- [86] Santos HJ, Makiuchi T, Nozaki T. Reinventing an organelle: the reduced mitochondrion in parasitic protists. *Trends Parasitol*, 2018, 34(12): 1038–1055. [DOI]
- [87] Tachezy J. Hydrogenosomes and mitosomes: mitochondria of anaerobic eukaryotes. *Springer*, 2019, 1–20. [DOI]
- [88] Karnkowska A, Vacek V, Zubáčová Z, Treitli SC, Petrželková R, Eme L, Novák L, Žárský V, Barlow LD, Herman EK, Soukal P, Hroudová M, Doležal P, Stairs CW, Roger AJ, Eliáš M, Dacks JB, Vlček Č, Hampel V. A eukaryote without a mitochondrial organelle. *Curr Biol*, 2016, 26(10): 1274–1284. [DOI]
- [89] Roger AJ, Muñoz-Gómez SA, Kamikawa R. The origin and diversification of mitochondria. *Curr Biol*, 2017, 27(21): R1177–R1192. [DOI]
- [90] López-García P, Eme L, Moreira D. Symbiosis in eukaryotic evolution. *J Theor Biol*, 2017, 434: 20–33. [DOI]
- [91] Sagan L. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol*, 1967, 14(3): 255–274. [DOI]
- [92] Bonen L, Cunningham RS, Gray MW, Doolittle WF. Wheat embryo mitochondrial 18S ribosomal RNA: evidence for its prokaryotic nature. *Nucleic Acids Res*, 1977, 4(3): 663–671. [DOI]
- [93] Schwartz RM, Dayhoff MO. Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. *Science*, 1978, 199(4327): 395–403. [DOI]
- [94] Yang D, Oyaizu Y, Oyaizu H, Olsen GJ, Woese CR. Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(13): 4443–4447. [DOI]
- [95] Cavalier-Smith T. Eukaryotes with no mitochondria. *Nature*, 1987, 326(6111): 332–333. [DOI]
- [96] Cavalier-Smith T. Archaeobacteria and archezoa. *Nature*, 1989, 339(6220): 100–101. [DOI]
- [97] Cavalier-Smith T. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, 52(2): 297–354. [DOI]
- [98] Cavalier-Smith T. Origin of the cell nucleus, mitosis and sex: roles of intracellular coevolution. *Biol Direct*, 2010, 5(1): 7. [DOI]
- [99] Cavalier-Smith T. Only six kingdoms of life. *Proc Biol Sci*, 2004, 271(1545): 1251–1262. [DOI]
- [100] Margulis L, Dolan MF, Whiteside JH. “Imperfections and oddities” in the origin of the nucleus. *Paleobiology*, 2005, 31(2): 175–191. [DOI]
- [101] Sapp J. Microbial Phylogeny and Evolution: Concepts and Controversies. Oxford: Oxford University Press on Demand, 2005, 184–206. [DOI]
- [102] Margulis L, Dolan MF, Guerrero R. The chimeric eukaryote: origin of the nucleus from the karyomastigont in amitochondriate protists. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(13): 6954–6959. [DOI]
- [103] Vellai T, Takács K, Vida G. A new aspect to the origin and evolution of eukaryotes. *J Mol Evol*, 1998, 46(5): 499–507. [DOI]
- [104] Searcy DG. Origins of mitochondria and chloroplasts from sulfur-based symbioses. In: Hartman H, Matsuno K eds. The Origin and Evolution of the Cell. Singapore: World Scientific, 1992, 47–78. [DOI]
- [105] van der Giezen M, Tovar J, Clark CG. Mitochondrion-derived organelles in protists and fungi. *Int Rev Cytol*, 2005, 244: 175–225. [DOI]
- [106] Von Dohlen CD, Kohler S, Alsop ST, McManus WR. Mealybug  $\beta$ -proteobacterial endosymbionts contain  $\gamma$ -proteobacterial symbionts. *Nature*, 2001, 412(6845): 433–436. [DOI]
- [107] Henze K, Martin W. How do mitochondrial genes get into the nucleus? *Trends Genet*, 2001, 17(7): 383–387. [DOI]
- [108] Martin WF, Garg S, Zimorski V. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2015, 370(1678): 20140330. [DOI]
- [109] Lane N, Martin W. The energetics of genome complexity. *Nature*, 2010, 467(7318): 929–934. [DOI]
- [110] Garg SG, Martin WF. Mitochondria, the cell cycle, and the origin of sex via a syncytial eukaryote common ancestor. *Genome Biol Evol*, 2016, 8(6): 1950–1970. [DOI]
- [111] Gould SB, Garg SG, Martin WF. Bacterial vesicle secretion and the evolutionary origin of the eukaryotic endomembrane system. *Trends Microbiol*, 2016, 24(7): 525–534. [DOI]
- [112] McBride HM. Mitochondria and endomembrane origins.

- Curr Biol*, 2018, 28(8): R367–R372. [DOI]
- [113] Yutin N, Wolf MY, Wolf YI, Koonin EV. The origins of phagocytosis and eukaryogenesis. *Biol Direct*, 2009, 4(1): 9. [DOI]
- [114] Embley TM, Williams TA. Steps on the road to eukaryotes. *Nature*, 2015, 521(7551): 169–170. [DOI]
- [115] Burns JA, Pittis AA, Kim E. Gene-based predictive models of trophic modes suggest Asgard archaea are not phagocytotic. *Nat Ecol Evol*, 2018, 2(4): 697–704. [DOI]
- [116] Hampl V, Čepička I, Eliáš M. Was the mitochondrion necessary to start eukaryogenesis? *Trends Microbiol*, 2019, 27(2): 96–104. [DOI]
- [117] Pittis AA, Gabaldón T. Late acquisition of mitochondria by a host with chimaeric prokaryotic ancestry. *Nature*, 2016, 531(7592): 101–104. [DOI]
- [118] Ettema TJ. Evolution: Mitochondria in the second act. *Nature*, 2016, 531(7592): 39–40. [DOI]
- [119] Martin WF, Roettger M, Ku C, Garg SG, Nelson-Sathi S, Landan G. Late Mitochondrial origin is an artifact. *Genome Biol Evol*, 2017, 9(2): 373–379. [DOI]
- [120] Degli Esposti M. Phylogeny and Evolution of Bacteria and Mitochondria. CRC Press, 2018. [DOI]
- [121] Ku C, Nelson-Sathi S, Roettger M, Sousa FL, Lockhart PJ, Bryant D, Hazkani-Covo E, McInerney JO, Landan G, Martin WF. Endosymbiotic origin and differential loss of eukaryotic genes. *Nature*, 2015, 524(7566): 427–432. [DOI]
- [122] Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO, Sicheritz-Pontén T, Alsmark UCM, Podowski RM, Näslund AK, Eriksson AS, Winkler HH, Kurland CG. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, 1998, 396(6707): 133–140. [DOI]
- [123] Fitzpatrick DA, Creevey CJ, McInerney JO. Genome phylogenies indicate a meaningful  $\alpha$ -proteobacterial phylogeny and support a grouping of the mitochondria with the Rickettsiales. *Mol Biol Evol*, 2006, 23(1): 74–85. [DOI]
- [124] Williams KP, Sobral BW, Dickerman AW. A robust species tree for the alphaproteobacteria. *J Bacteriol*, 2007, 189(13): 4578–4586. [DOI]
- [125] Thrash JC, Boyd A, Huggett MJ, Grote J, Carini P, Yoder RJ, Robbertse B, Spatafora JW, Rappé MS, Giovannoni SJ. Phylogenomic evidence for a common ancestor of mitochondria and the SAR11 clade. *Sci Rep*, 2011, 1: 13. [DOI]
- [126] Brindefalk B, Ettema TJ, Viklund J, Thollesson M, Andersson SG. A phylometagenomic exploration of oceanic alphaproteobacteria reveals mitochondrial relatives unrelated to the SAR11 clade. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24457. [DOI]
- [127] Rodríguez-Ezpeleta N, Embley TM. The SAR11 group of alpha-proteobacteria is not related to the origin of mitochondria. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30520. [DOI]
- [128] Wang Z, Wu M. An integrated phylogenomic approach toward pinpointing the origin of mitochondria. *Sci Rep*, 2015, 5: 7949. [DOI]
- [129] Wang Z, Wu M. Phylogenomic reconstruction indicates mitochondrial ancestor was an energy parasite. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110685. [DOI]
- [130] Martijn J, Vosseberg J, Guy L, Offre P, Ettema TJ. Deep mitochondrial origin outside the sampled alphaproteobacteria. *Nature*, 2018, 557(7703): 101–105. [DOI]
- [131] Fan L, Wu DF, Goremykin V, Xiao J, Xu YB, Garg S, Zhang CL, Martin WF, Zhu RX. Mitochondria branch within Alphaproteobacteria. *bioRxiv*, 2019, 715870. [DOI]
- [132] Le PT, Pontarotti P, Raoult D. Alphaproteobacteria species as a source and target of lateral sequence transfers. *Trends Microbiol*, 2014, 22(3): 147–156. [DOI]
- [133] Janouškovec J, Tikhonenkov DV, Burki F, Howe AT, Rohwer FL, Mylnikov AP, Keeling PJ. A new lineage of eukaryotes illuminates early mitochondrial genome reduction. *Curr Biol*, 2017, 27(23): 3717–3724.e5. [DOI]
- [134] Muñoz-Gómez SA, Hess S, Burger G, Lang BF, Susko E, Slamovits CH, Roger AJ. An updated phylogeny of the Alphaproteobacteria reveals that the parasitic Rickettsiales and Holosporales have independent origins. *eLife*, 2019, 8: e42535. [DOI]
- [135] Searcy DG. Metabolic integration during the evolutionary origin of mitochondria. *Cell Res*, 2003, 13(4): 229–238. [DOI]
- [136] Lake JA, Rivera MC. Was the nucleus the first endosymbiont? *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(8): 2880. [DOI]
- [137] Godde JS. Breaking through a phylogenetic impasse: a pair of associated archaea might have played host in the endosymbiotic origin of eukaryotes. *Cell Biosci*, 2012, 2(1): 29. [DOI]
- [138] Forterre P, Gaïa M. Giant viruses and the origin of modern eukaryotes. *Curr Opin Microbiol*, 2016, 31: 44–49. [DOI]
- [139] Bell P. The viral eukaryogenesis hypothesis: a key role for viruses in the emergence of eukaryotes from a

- prokaryotic world environment. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1178(1): 91–105. [DOI]
- [140] Sousa FL, Neukirchen S, Allen JF, Lane N, Martin WF. Lokiarchaeon is hydrogen dependent. *Nat Microbiol*, 2016, 1(5): 1–3. [DOI]
- [141] Liu Y, Zhou ZC, Pan J, Baker BJ, Gu JD, Li M. Comparative genomic inference suggests mixotrophic lifestyle for Thorarchaeota. *ISME J*, 2018, 12(4): 1021–1031. [DOI]
- [142] Manoharan L, Kozlowski JA, Murdoch RW, Löffler FE, Sousa FL, Schleper C. Metagenomes from coastal marine sediments give insights into the ecological role and cellular features of Loki-and Thorarchaeota. *mBio*, 2019, 10(5): e02039–02019. [DOI]
- [143] Pushkarev A, Inoue K, Larom S, Flores-Urbe J, Singh M, Konno M, Tomida S, Ito S, Nakamura R, Tsunoda SP, Philosof A, Sharon I, Yutin N, Koonin EV, Kandori H, Béjà O. A distinct abundant group of microbial rhodopsins discovered using functional metagenomics. *Nature*, 2018, 558(7711): 595–599. [DOI]
- [144] Bulzu PA, Andrei AŞ, Salcher MM, Mehrshad M, Inoue K, Kandori H, Beja O, Ghai R, Banciu HL. Casting light on Asgardarchaeota metabolism in a sunlit microoxic niche. *Nat Microbiol*, 2019, 4(7): 1129–1137. [DOI]
- [145] Spang A, Stairs CW, Dombrowski N, Eme L, Lombard J, Caceres EF, Greening C, Baker BJ, Ettema TJG. Proposal of the reverse flow model for the origin of the eukaryotic cell based on comparative analyses of Asgard archaeal metabolism. *Nat Microbiol*, 2019, 4(7): 1138–1148. [DOI]
- [146] Saghai A, Gutiérrez-Preciado A, Deschamps P, Moreira D, Bertolino P, Ragon M, López-García P. Unveiling microbial interactions in stratified mat communities from a warm saline shallow pond. *Environ Microbiol*, 2017, 19(6): 2405–2421. [DOI]
- [147] Akıl C, Robinson RC. Genomes of Asgard archaea encode profilins that regulate actin. *Nature*, 2018, 562(7727): 439–443. [DOI]
- [148] Imachi H, Aoi K, Tasumi E, Saito Y, Yamanaka Y, Saito Y, Yamaguchi T, Tomaru H, Takeuchi R, Morono Y, Inagaki F, Takai K. Cultivation of methanogenic community from subseafloor sediments using a continuous-flow bioreactor. *ISME J*, 2011, 5(12): 1913–1925. [DOI]
- [149] Szöllősi GJ, Tannier E, Daubin V, Boussau B. The inference of gene trees with species trees. *Syst Biol*, 2015, 64(1): e42–e62. [DOI]
- [150] Hu GB. Whole cell cryo-electron tomography suggests mitochondria divide by budding. *Microsc Microanal*, 2014, 20(4): 1180–1187. [DOI]
- [151] Mehta AP, Supekova L, Chen JH, Pestonjamas P, Webster P, Ko Y, Henderson SC, McDermott G, Supek F, Schultz PG. Engineering yeast endosymbionts as a step toward the evolution of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(46): 11796–11801. [DOI]

(责任编辑: 刘钢)