

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04411

研究課題名(和文) クロララクニオン藻成立に至る宿主ケルコゾアの進化

研究課題名(英文) Evolution of host cercozoans toward the establishment of chlorarachniophytes

研究代表者

石田 健一郎 (ISHIDA, Ken-ichiro)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：30282198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：クロララクニオン藻が二次共生により葉緑体を獲得するまでの宿主側の進化を解明するために、クロララクニオン藻に近縁な無色ケルコゾアの探索を行い、系統、分類、進化について、形態、微細構造、トランスクリプトーム解析などから新知見を得た。まず、クロララクニオン藻近縁ケルコゾアに3系統群の存在を明らかにすると共に、最もクロララクニオン藻に近縁な系統群の5培養株を確立し、この系統群の詳細な研究を初めて可能にした。これら5株の中からミノリサ属の3新種を見出すと共に、クロララクニオン藻の葉緑体獲得がクロララクニオン藻の分岐後に起こったことを明らかにした。鞭毛装置構造をはじめとする形態進化についても知見を得た。

研究成果の概要(英文)：The chlorarachniophytes acquired their plastids from a green alga via a secondary endosymbiosis. To know the evolution of ancestral host-related organisms before the plastid acquisition, the colorless cercozoans that are closely related to the chlorarachniophytes were searched and 5 new cultured strains were established, and new findings on the phylogeny, taxonomy and evolution were obtained from morphological and ultrastructural observations and RNAseq analyses. The present research revealed that there are 3 clades of cercozoans that are closely related to the chlorarachniophytes and that the acquisition of plastid via the secondary endosymbiosis occurred at the ancestor of chlorarachniophytes after diverged from those sister cercozoans. The new findings on the evolution of flagellar apparatus were also provided. The presence of three new species of *Minorisa*, the closest colorless relative of chlorarachniophytes, were also suggested.

研究分野：系統分類学、細胞進化学

キーワード：進化 二次共生 *Minorisa* 原生物 系統分類 藻類 クロララクニオン藻 ケルコゾア

### 1. 研究開始当初の背景

ケルコゾアは、スーパーグループ「リザリア」を構成する主要系統群の1つであり、多様性の把握が著しく遅れている生物群の一つである。クロララクニオン藻はケルコゾアに属する単系統群で、その共通祖先において二次共生により緑藻由来の葉緑体を獲得しており、葉緑体獲得に伴う進化に注目が集まっている。そのような状況で、クロララクニオン藻の葉緑体側については、共生藻のオルガネラ化を中心とした進化的解析が大きく進展してきた。一方宿主側については、ミノリサ (*Minorisa minuta*) と呼ばれる新奇ケルコゾアがクロララクニオン藻に近縁であることが示された以外は、クロララクニオン藻に至る進化、つまり葉緑体獲得前と後で宿主側にどのような変化が起こったかは不明であった。ミノリサの培養株はその後絶えている。

申請者らは長年クロララクニオン藻研究をベースとして、近年、系統的位置が不明であったラブドアメーバ (*Rhabdamoeba*) の1種と思われる新奇培養株 (SRT404) が分子系統樹上でクロララクニオン藻クレードの根元から分岐することを明らかにした。この生物は、葉緑体を欠き、葉緑体獲得以前の祖先生物を代表でき、クロララクニオン藻の葉緑体獲得に至る宿主側の進化を解明する「カギ」となる生物としての唯一の培養株であったことから、本研究の申請に至る着想を得た。

### 2. 研究の目的

本研究では、ラブドアメーバの培養株確立を契機に、(1) 近縁生物の探索・培養株化を推進し、クロララクニオン藻の祖先に近縁な生物の多様性を把握し、ケルコゾアの多様性の理解に貢献すること、(2) それら培養株の形態、微細構造、RNAseq データの解析により、無色捕食性ケルコゾアが、二次共生により葉緑体を獲得しクロララクニオン藻へと進化する過程における、宿主側の進化の一端を明らかにすること、を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) クロララクニオン藻近縁ケルコゾアの探索と培養株化：日本各地およびパラオ共和国の海水サンプル等について、独自に開発したプライマーによる環境 PCR により、クロララクニオン藻近縁ケルコゾアの有無を確認し、確認できたサンプルの祖培養からピペット洗浄法あるいは希釈法により培養株を作成した。

(2) 培養株の系統的位置の確認：得られた培養株の 18SrRNA 遺伝子配列を取得し、最尤法で分子系統樹を構築した。

(3) 形態・微細構造の観察：培養株の細胞形態、運動、生活環については光学顕微鏡を用いて、直接あるいはビデオ撮影に

より観察した。細胞内部の微細構造、鞭毛装置構造の観察では、透過型電子顕微鏡により連続切片を観察した。

(4) RNAseq データの取得：得られた培養株の中から、SRT609 株の RNAseq データを取得し、別予算で取得したラブドアメーバの RNAseq データとともに、バイオフィォマティクスにより葉緑体の痕跡となりうる遺伝子の探索を行った。

### 4. 研究成果

(1) クロララクニオン藻近縁ケルコゾアの探索と培養株化：まず、クロララクニオン藻近縁ケルコゾアに特異的なプライマー作成のためにデータベースに登録されている 18SrRNA 遺伝子の環境配列等をもとに分子系統解析を実施し、クロララクニオン藻近縁ケルコゾアの配列を探索した。その結果、クロララクニオン藻近縁ケルコゾアには3つの系統群(クレード1、2、3)が存在することを見出した(図1)。各クレードに特異的なプライマーを用いた環境 PCR により、日本各地から得られた海水等のサンプルからこれらケルコゾアの存在を確認した上で各サンプルの祖培養から培養株を確立した。本研究課題の実施期間中に、沖縄県宮古島市から1株(SRT609)、東京都江戸川区から1株(Y-KSI-01)、三重県四日市市から1株(Y-YKI-01)、三重県志摩市から2株(SRT705、SRT710)の合計5株のクロララクニオン藻近縁ケルコゾアの新規培養株確立に成功した(図2)。これにより、既存のラブドアメーバ培養株(SRT404)とあわせて6培養株が利用可能となった。

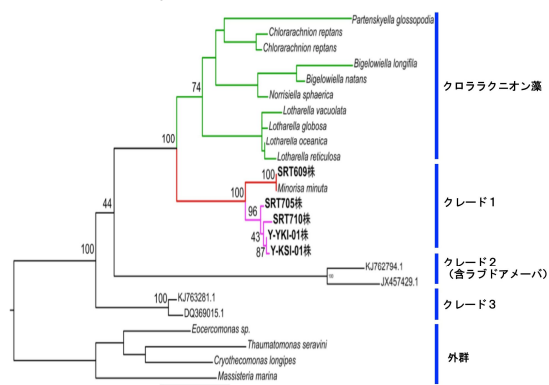


図1. 18SrRNA 遺伝子を用いたクロララクニオン藻と近縁ケルコゾアの系統樹。太字の OTU が本研究で新たに取得した培養株を示す。

(2) クロララクニオン藻近縁ケルコゾアの多様性：ラブドアメーバ (SRT404) と新規培養株 5 株 (SRT609, SRT705, SRT710, Y-KSI-01, Y-YKI-01) について、18SrRNA 遺伝子配列を用いた分子系統解析、細胞の形態観察、微細構造観察を実施した。その結果、ラブドアメーバはクレード2に位置し、残りの5株はクレード1に位置することが明らかとなった。クレード

1の5株のうち、SRT609株は遺伝的にも形態的にも *M. minuta* と同定できた。Y-KSI-01株とY-YKI-01株は互いに区別できないが、細胞の大きさや鞭毛の長さが *M. minuta* と大きく異なるほか、遺伝的にも *M. minuta* から離れており、明らかにミノリサ属の新種であると結論できる。また、SRT705株とSRT710株も系統的な位置に加えて、細胞の大きさと鞭毛の長さ、遊泳様式の比較などから *M. minuta* や他の培養株とそれぞれ異なることから、ミノリサ属の新種であることが示唆された。

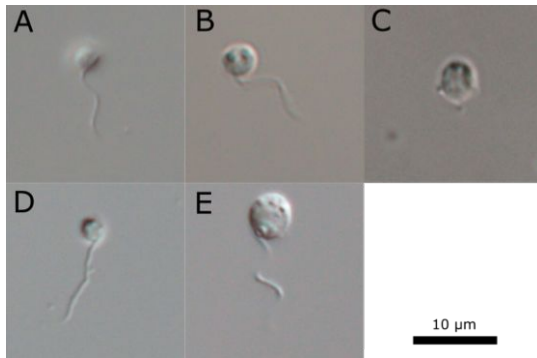


図2. 新規に確立した5株の遊泳細胞。A: SRT609、B: Y-KSI-01、C: Y-TKI-01、D: SRT705、E: SRT710。

6株に共通の特徴として、いずれも短い仮足を持つアメーバ状の形態を示すことがある、ということが見出された。また、細胞内に葉緑体の痕跡と思われる構造は発見されなかった。

ラブドアメーバ(クレード2)とSRT609株を用いて鞭毛装置構造の比較解析を行い、ラブドアメーバが放射状に伸びる多数の微小管を有する特殊な鞭毛装置を持つものに対し、SRT609株(クレード1)では鞭毛に鞭毛小毛はみられず、微小管性鞭毛根は少数の微小管から構成されており、クロララクニオン藻の鞭毛装置に近い単純な構造であることが明らかとなった。クロララクニオン藻の鞭毛装置の原型はクレード1との共通祖先の段階ですでに存在したことが示唆され、クロララクニオン藻成立に至る宿主ケルコゾアの進化に関する重要な知見を得た。

(3) RNAseqデータの解析: クレード1のSRT609株(ミノリサ)についてRNAseqデータを取得した。別に取得したクレード2のラブドアメーバのRNAseqデータとともに、葉緑体の痕跡となる緑藻からのEGT(共生による遺伝子水平伝播)の有無について調査した。クロララクニオン藻 *Bigelowiella natans* において葉緑体へ輸送されるタンパク質遺伝子に相同性のある遺伝子を探索し、それぞれ分子系統解析により由来を確認したところ、緑藻類からEGTしたと思われる遺伝子は一つも検出されなかった。微細構造観察でも葉緑体の痕跡は検出できなかったことも考慮すると、クレード1もクレード2も二次共生に

より緑藻から葉緑体を獲得する以前の生物群である可能性が高く、クロララクニオン藻の葉緑体はクレード1とクロララクニオン藻が分岐した後に起こった二次共生により獲得されたと考えるのが妥当である。

RNAseqデータを用いた代謝系の詳細な比較解析はまだ完了しておらず将来の課題として残ったが、本研究によりクレード2からクロララクニオン藻までのRNAseqデータを揃えることができたため、近い将来に代謝経路の進化についても議論できると考えている。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計20件)

Shiratori T., Fujita S., Shimizu T., Nakayama T., Ishida K. (2017) *Viridiuvalis adhaerens* gen. et sp. nov., a novel colony-forming chlorarachniophyte. *Journal of Plant Research* 130:999-1012. (査読あり)

Shiratori T., Ishida K. (2016) A New Heterotrophic Cryptomonad: *Hemiarma marina* n. g., n. sp.. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 63(6):804-812. (査読あり)

Suzuki S., Ishida K., Hirakawa Y., (2016) Diurnal Transcriptional Regulation of Endosymbiotically Derived Genes in the chlorarachniophyte *Bigelowiella natans*. *Genome Biology and Evolution* 8(9):2672-2682. (査読あり)

Nomura M., Ishida K. (2016) Fine-structural observations on siliceous scale production and shell assembly in the testate amoeba *Paulinella chromatophora*. *Protist* 167 (4):303-318. (査読あり)

Suzuki S., Hirakawa Y., Kofuji R., Sugita M., Ishida K. (2016) Plastid genome sequences of *Gymnochlorella stellata*, *Lotharella vacuolata*, and *Partenskyella glossopodia* reveal remarkable structural conservation among chlorarachniophyte species. *Journal of Plant Research* 129(4):581-590. (査読あり)

Shiratori T., Ishida K. (2016) *Trachyrhizium urniformis* n. g., n. sp., a Novel Marine Filose Thecate Amoeba Related to a Cercozoan Environmental Clade (Novel Clade 4). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 63(6):722-731. (査読あり)

Shiratori T., Ishida K. (2016) *Entamoeba marina* n. sp.; a New Species of *Entamoeba* Isolated from Tidal Flat Sediment of Iriomote Island, Okinawa, Japan. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 63(3):280-286. (査読あり)

Shiratori T., Nakayama T., Ishida K. (2015) A new deep-branching stramenopile, *Platysulculus tardus* gen. nov. sp. nov. *Protist* 166:337-348. (査読あり)

〔学会発表〕(計 21 件)

Shiratori T., Yazaki E., Inagaki Y., Ishida K., Morphology, ultrastructure and phylogeny of a new species of *Glissandra* (Protista incertae sedis), 15th international congress of protistology, 2017

加藤雄大、白鳥峻志、石田健一郎、クロララクニオン藻に近縁な無色ケルコゾア生物の分類学的研究、**第 50 回日本原生生物学会大会 第 1 回日本共生生物学会大会合同大会、2017 年**

Takur R., Shiratori T., Ishida K., Phylogeny and evolution of Basal Stramenopiles, 日本藻類学会第 41 回大会、2017 年

加藤雄大、白鳥峻志、石田健一郎、クロララクニオン藻に近縁な無色ケルコゾア生物の分類学的研究、日本藻類学会第 41 回大会、2017 年

野村真未、石田健一郎、有殻アメーバの被殻構築から探る細胞機能の可能性、日本植物学会第 80 回大会、2016 年

渡辺ありさ、鈴木重勝、平川泰久、石田健一郎、クロララクニオン藻のオルガネラ DNA ポリメラーゼの進化、日本植物学会第 80 回大会、2016 年

平川泰久、鈴木重勝、石田健一郎、クロララクニオン藻の遺伝子発現から紐解く色素体制御機構、日本植物学会第 80 回大会、2016 年

Watanabe A., Suzuki S., Hirakawa Y., Ishida K. Evolution of organeller DNA polymerases in chlorarachniophyte algae. The 13<sup>th</sup> International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, 2016

Suzuki S., Shiratori T., Ishida K. Identification and transcript analysis of a non-photosynthetic eukaryovorous amoeba phylogenetically related to chlorarachniophytes. The 13<sup>th</sup> International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, 2016

Hirakawa Y., Watanabe A., Suzuki S., Ishida K. Organelle DNA replication in chlorarachniophyte algae. Protist 2016, 2016

〔図書〕(計 2 件)

石田健一郎、他(大野博司 編) 化学同人、共生微生物～生物と密接に関わるミクロな生命体～、2016、281

石田健一郎、他(長谷部光泰 監) 秀潤社、進化の謎をゲノムで解く、2015、198

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石田 健一郎 (ISHIDA, Ken-ichiro)  
筑波大学・生命環境系・教授  
研究者番号：30282198

### (3) 連携研究者

中山 剛 (NAKAYAMA, Takeshi)  
筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：40302369

### (4) 研究協力者

白鳥 峻志 (SHIRATORI, Takashi)

鈴木 重勝 (SUZUKI, Shigekatsu)

加藤 雄大 (KATO, Yuta)