

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：63801

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06834

研究課題名(和文) Nusuttodinium属渦鞭毛藻における盗葉緑体拡大・分裂機構の解明

研究課題名(英文) Study on mechanisms of kleptochloroplast enlargement and division in the dinoflagellate Nusuttodinium

研究代表者

大沼 亮 (Onuma, Ryo)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・博士研究員

研究者番号：80756825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：渦鞭毛藻 *Nusuttodinium aeruginosum* はクリプト藻の葉緑体を取り込んで細胞内に保持する盗葉緑体現象を示す。本研究で行った発現遺伝子解析により、クリプト藻の核は渦鞭毛藻細胞内でも広範な転写活性を維持し、光合成、無機窒素同化が行われていることが示唆された。一方で、細胞周期関連遺伝子群の発現量は低下しており、クリプト藻細胞周期進行が停止していることが示唆された。また、盗葉緑体同調分裂機構の解明のため、クリプト藻 *Guillardia theta* を用いて葉緑体分裂制御機構の解析を行い、葉緑体分裂のタイミングはクリプト藻の核にコードされる因子によって制御されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dinoflagellate *Nusuttodinium aeruginosum* possesses kleptochloroplast stolen from cryptomonad. To investigate molecular mechanism of kleptochloroplastidy, we compared transcriptomes of cryptomonad as free-living cell and as ingested form. The analysis showed that the ingested nucleus remained active and suggested that the activities of photosynthesis and nitrogen assimilation were retained. In contrast, expressions of cell cycle-related genes were decreased, implying that the cell cycle of the ingested cryptomonad was not progressed. In addition, prior to study on mechanism of kleptochloroplast division, we investigate mechanisms of regulation of chloroplast division in cryptophyte *Guillardia theta*. Nucleomorph-encoded genes/proteins that are related to nucleomorph replication and chloroplast division were constantly expressed throughout the cell cycle, suggesting that the timing of chloroplast division is regulated by as-yet-unidentified gene/protein that encoded in the nucleus.

研究分野：進化細胞生物学

キーワード：盗葉緑体 細胞内共生 渦鞭毛藻 クリプト藻 *Nusuttodinium*

1. 研究開始当初の背景

真核生物における葉緑体の獲得は、シアノバクテリアと非光合成性真核生物、または光合成性真核生物と非光合成真核生物間の細胞内共生に由来し、真核生物系統の様々な系統で独立に複数回起こった現象である。細胞内共生は葉緑体獲得の進化において重要な現象であるが、その細胞内共生がどのようなプロセスを経て成立したかについては不明な点が多い。

一方で、他の藻類の葉緑体を細胞内に取り込み、一時的に保持し光合成産物を得る、盗葉緑体という現象がいくつかの真核生物で知られており、この現象は葉緑体成立に向けた細胞内共生の前段階であると考えられている。渦鞭毛藻類 *Nusuttodinium* 属はもともと葉緑体をもたないが、クリプト藻の葉緑体を取り込んで保持する盗葉緑体現象を示す。これまで研究代表者が行った研究によって、淡水産種 *N. aeruginosum* はクリプト藻の核を保持しながら取り込んだ葉緑体を元の葉緑体の 20 倍以上に拡大し、且つ宿主の細胞分裂時に盗葉緑体を同調分裂させることが示された。一方で、クリプト藻核は分裂せず、常に片方の渦鞭毛藻細胞のみに受け継がれて行くことが明らかとなった。クリプト藻核を保持した細胞は盗葉緑体の大きさを維持できるのに対し、クリプト藻核を失うと葉緑体のサイズを維持できなくなることから、盗葉緑体の維持にはクリプト藻核の保持が必要であることが示唆された。

以上より、*N. aeruginosum* では、永続的な葉緑体獲得に必要な葉緑体の拡大と同調分裂が起こることが明らかとなった。しかしながら、本種の研究は形態観察のみであるため、盗葉緑体の拡大・維持及び同調分裂に関わる分子メカニズムは全く不明である。

2. 研究の目的

(1) 発現遺伝子の網羅的探索による盗葉緑体維持・拡大機構の解明

自由生活クリプト藻と、クリプト藻を細胞内に維持している渦鞭毛藻細胞のトランスクリプトームを解析・比較を行い、取り込まれたクリプト藻の遺伝子発現及び代謝活性がどのように変化することで、盗葉緑体の拡大が起こるのか、また一時的な共生関係が成り立つのかを明らかにすることを目的とした。

(2) クリプト藻における葉緑体分裂同調機構の解明

クリプト藻は紅藻を細胞内共生させることで葉緑体を獲得した藻類で、紅藻の核の名残であるヌクレオモルフを保持している。葉緑体の分裂機構は渦鞭毛藻に取り込まれる前の自由生活性のクリプト藻でも明らかにさ

れていない。そこで、ドラフトゲノム配列情報が明らかとなっているクリプト藻 *Guillardia theta* を用いて、クリプト藻細胞分裂と、ヌクレオモルフの複製及び葉緑体分裂の同調機構を明らかにすることを試みた。この点を明らかにすることで、渦鞭毛藻細胞内での盗葉緑体同調分裂機構の解析のための基盤を作ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 発現遺伝子の網羅的探索による盗葉緑体維持・拡大機構の解明

自由生活条件下のクリプト藻細胞のリファレンス作成と網羅的遺伝子発現解析
渦鞭毛藻に与えているクリプト藻 *Chroomonas* sp. Dc01 の無菌株を連続明期で培養し、この株から DNA と total RNA を抽出した。RNA については poly A 精製によって mRNA のみを精製した。これらのサンプルを、次世代シーケンサー (NGS) によってそれぞれ配列を取得した。取得した配列を用いてアセンブリとアノテーションを行い、*Chroomonas* Dc01 株の核、ミトコンドリア、葉緑体、ヌクレオモルフのリファレンスをそれぞれ作成した。作成したリファレンスに対して RNA-seq のリードをマッピングすることでそれぞれのオルガネラにコードされる遺伝子の発現量 (RPKM) を算出した。

渦鞭毛藻の発現遺伝子リストの作成と取り込み前後の遺伝子発現解析

無菌化した渦鞭毛藻培養株を RNA Later で固定し、取り込む前、葉緑体維持中、葉緑体消化中等の様々な段階の細胞を 135 細胞単離した。このサンプルから Nucleospin RNA XS (TaKaRa 社) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA から SMARTer Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing - v3 (Clontech 社) によって cDNA を合成し、16 サイクルの PCR をすることで cDNA を増幅した。このサンプルを NGS でシーケンシングし、渦鞭毛藻 (と取り込まれたクリプト藻) のリードを得た。得られたリードにはクリプト藻に由来するリードが含まれているため、上記で作成したクリプト藻 *Chroomonas* sp. Dc01 株のリファレンスを用いて渦鞭毛藻とクリプト藻の配列を区別した。また、渦鞭毛藻と取り込まれたクリプト藻から得たリードを、クリプト藻のリファレンスに対してマッピングし、発現量 (RPKM) の算出と取り込み前の発現量の比較を行った。

(2) クリプト藻における葉緑体分裂同調機構の解明

ヌクレオモルフ複製同調機構の解明

クリプト藻核にはヌクレオモルフに標的されると予測されているヒストン H2A がコードされている（以後、ヌクレオモルフ H2A とよぶ）。ヌクレオモルフ H2A に対して抗体を作成し、間接蛍光抗体法によってヌクレオモルフ H2A の局在を解析した。次に、明暗同調株を用いて、クリプト藻核の細胞周期マーカー（核の H2A、サイクリン A、サイクリン B）とヌクレオモルフの細胞周期マーカー（ヌクレオモルフ H2A、H2B、サイクリン B）の mRNA レベルを qPCR によって定量した。加えて、EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) を用いて同調培養株のパルスラベリングをすることで、核とヌクレオモルフの DNA 複製のタイミングを解析した。

葉緑体分裂同調機構の解明

ヌクレオモルフには *ftsZ* 遺伝子がコードされており、FtsZ は陸上植物や緑藻、紅藻などで、葉緑体分裂時に分裂リングを形成することが知られている。同調培養株を用いて、クリプト藻核の細胞周期マーカーと葉緑体分裂マーカー (*FTSZ*、*MIND*、*MINE*) の mRNA レベルを qPCR によって定量した。また、クリプト藻 *FtsZ* に対して抗体を作成した抗体を用いて、*FtsZ* の局在を間接蛍光抗体法により解析し、同調培養株中における *FtsZ* タンパク質の発現量をウエスタンブロットにより定量した。

4. 研究成果

(1) 発現遺伝子の網羅的探索による盗葉緑体維持・拡大機構の解明

自由生活条件下クリプト藻の発現遺伝子リストの取得

NGS を用いて取得したゲノム情報から、自由生活条件下のクリプト藻のミトコンドリア、葉緑体、ヌクレオモルフコードの遺伝子をそれぞれ 41、150、438 遺伝子予測した。これらは近縁のクリプト藻とほぼ同等の数であることが確かめられた。また、RNA-seq によって得たトランスクリプトーム情報から核以外のオルガネラ由来の遺伝子を除去することで、核コードの発現遺伝子リストを作成した。

渦鞭毛藻に取り込まれたクリプト藻の遺伝子発現解析

クリプト藻葉緑体遺伝子のリファレンスに対し、渦鞭毛藻細胞（及び取り込まれたクリプト藻細胞）から得たリードをマッピングすることで、渦鞭毛藻に取り込まれた後の葉緑体遺伝子を探索したところ、予測されたクリプト藻葉緑体遺伝子 150 のうち 137 遺伝子が取り込み後も発現していることが確かめられた。

葉緑体遺伝子と同様に、ヌクレオモルフ遺伝子リファレンスを用いて渦鞭毛藻細胞内で発現している遺伝子を探索したところ、予測された 438 ヌクレオモルフ遺伝子のうち、

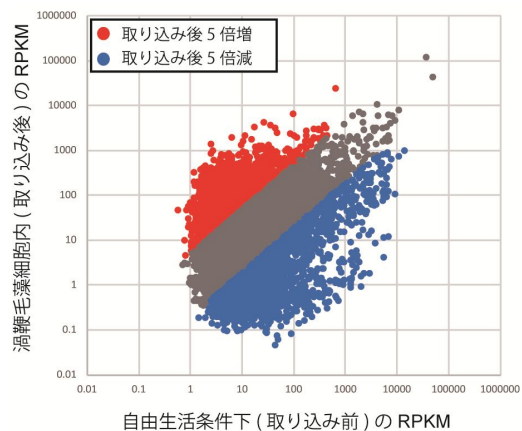


図1 取り込み前後のクリプト藻核発現遺伝子の比較

渦鞭毛藻細胞内と自由生活条件下の RPKM のスカッタープロット。各軸は対数軸である。取り込み後に 5 倍発現が上がるしている遺伝子を赤色、5 倍下がる遺伝子を青色で示す。

クリプト藻取り込み後の渦鞭毛藻細胞では 430 遺伝子の発現が確認された。

クリプト藻核コードの遺伝子を取り込み前後で比較したところ、自由生活条件下で発現している 25,658 配列のうち、渦鞭毛藻内でも発現しているものは 10,618 配列であった。取り込み後に 5 倍発現量が上がる配列は 3,609 配列、発現量が 5 分の 1 になる配列は 1,734 配列であった(図 1)。

次に取り込み前後のクリプト藻核コード遺伝子を KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) でアノテーションし、取り込み前後の代謝の変化を予測した。渦鞭毛藻に取り込まれても、炭化水素、アミノ酸、核酸、脂肪酸などの代謝に関わる様々な遺伝子群の発現を維持していることが明らかとなった。カルビンサイクルに用いられる酵素の遺伝子すべてが渦鞭毛藻内でも発現しており、全体的に取り込み前よりも発現量が上がる傾向にあった。また、活性酸素消去遺伝子群の発現は渦鞭毛藻細胞内で上昇することが明らかとなった。これらのことから、渦鞭毛藻細胞内のクリプト藻細胞は、光合成によって発生する活性酸素に対処しつつ、活発に光合成を行っていることが示唆された。

また、クリプト藻核コードの窒素同化に関する遺伝子群も取り込み後に発現量が著しく上昇することが明らかとなった。加えて転写・翻訳に関わる遺伝子群も発現量が上昇する傾向にあることがわかった。このことから、取り込まれたクリプト藻が渦鞭毛藻内でも活発にアミノ酸・タンパク質合成を行っていると考えられる。対して、細胞周期に関連する遺伝子群は取り込み後に発現していない、または発現量が低下するものが多く、今回使用した渦鞭毛藻細胞内のクリプト藻はある地点で細胞周期の進行が止められている可能性がある。さらに、Tubulin や Actin の発現が取り込み後に著しく低下していた。この結果は、渦鞭毛藻細胞内でクリプト藻の核分裂や細胞分裂の収縮間形成が起こらないという形態観察の結果とも符合する。以上より、無機窒素同化、転写・翻訳関連の発現が上昇

し、細胞周期関連遺伝子の発現が低下していることが予測され、共生クリプト藻では細胞周期を停止している間も積極的にタンパク質を合成していると示唆された。このことが葉緑体の拡大に関与していると考えられる。

また、渦鞭毛藻核コードの発現遺伝子群には盗葉緑体に無機塩類を送り込むトランスポーターの候補、共生体からの光合成産物を取り出すトリオースリン酸トランスポーターの候補が確認され、宿主-共生体間で物質の授受が行われていることが示唆された。

(2) クリプト藻における葉緑体分裂同調機構の解明

ヌクレオモルフ複製の細胞周期依存的制御機構

抗ヌクレオモルフ H2A 抗体を用いた間接蛍光抗体法によって、当該タンパク質は DAPI 染色によるヌクレオモルフのシグナルと共局在することが明らかとなり、ヌクレオモルフに標的されていることが確認された。次に、同調培養株を 8 時間明期/16 時間暗期条件で培養し、4 時間毎に細胞周期マーカーの mRNA レベルを定量したところ、クリプト藻核の S 期マーカー(*H2A*、*CYCLIN A*)は培養開始から 8 時間後、M 期マーカー(*CYCLIN B*)は、8 時間後と 12 時間後にピークを示し (図 2-1)、これらはクリプト藻宿主の S 期と M 期に相当すると考えられた。ヌクレオモルフ *H2A* は 8 時間後と 12 時間後に mRNA レベルのピークがあり、細胞周期依存的な発現を示した (図 2-1)。対してヌクレオモルフにコードされる *H2B*、*CYCLIN B* の mRNA は常に一定量検出され、細胞周期依存的な発現は見られなかった (図 2-1)。EdU のパルスラベリングでは、ヌクレオモルフ DNA の複製がクリプト藻核の DNA 複製の後、暗期に行われることが明らかとなった。これらのことから、ヌクレオモルフは自身の細胞周期を制御する機構を失っており、ヌクレオモルフの DNA 複製や細胞周期の制御は、細胞周期依存的に発現するクリプト藻核コードの因子によって行われていることが示唆された。

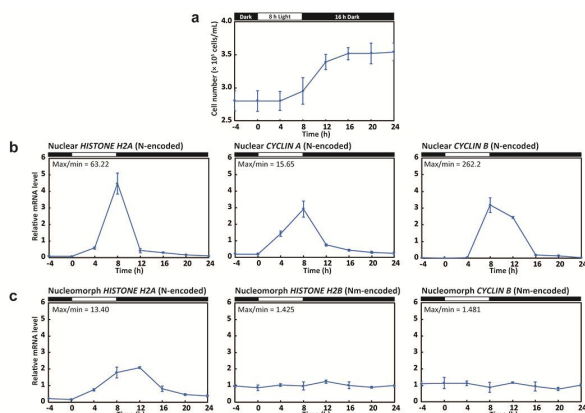


図 2-1 *G. theta* 同調培養株におけるクリプト藻核とヌクレオモルフ細胞周期マーカー mRNA レベルの変動

(a) 同調培養株中の細胞数の変化。(b) クリプト藻核の細胞周期マーカー mRNA の変動。(c) ニュクレオモルフの細胞周期マーカーの変動。内部標準は 18S rDNA を用いた。

葉緑体分裂の細胞周期依存的制御機構
qRCR によって葉緑体分裂マーカーの mRNA を定量したところ、*MIND* と *MINE* の mRNA レベルは細胞周期を通して一定で、細胞周期依存的な発現は見られなかった (図 2-2)。ヌクレオモルフにコードされる *FtsZ* は明期に増加し、暗期に減少する発現パターンを示したが (図 2-2)、この増減はクリプト藻核の細胞周期を停止させたときにも見られたため、明暗の切り替え、または細胞の成長に起因するものであると結論づけた。抗 *FtsZ* 抗体を用いたウエスタンプロットでは、細胞周期全体に渡って一定量の *FtsZ* タンパク質の発現があることが明らかとなった。蛍光抗体法による観察では、*FtsZ* リングは間期の細胞を含む全ての細胞に観察され、葉緑体分裂開始時に収縮し、細胞質分裂中に新たなリングが形成されることが明らかとなった (図 3)。このように、ヌクレオモルフと葉緑体にコードされる葉緑体分裂タンパク質は常に発現しており、細胞周期依存的な発現が見られないことから、葉緑体分裂の細胞周期依存的な制御は、クリプト藻核にコードされる因子が分裂時に葉緑体に供給させることで行われていると示唆された。

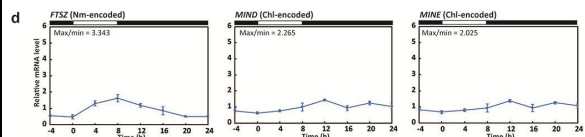


図 2-2 *G. theta* 同調培養株における葉緑体分裂関連遺伝子 mRNA レベルの変動

(d) 葉緑体分裂関連遺伝子 mRNA の変動。各 mRNA レベルの値は図 2-1 と同一の cDNA サンプルを用いて定量を行った。

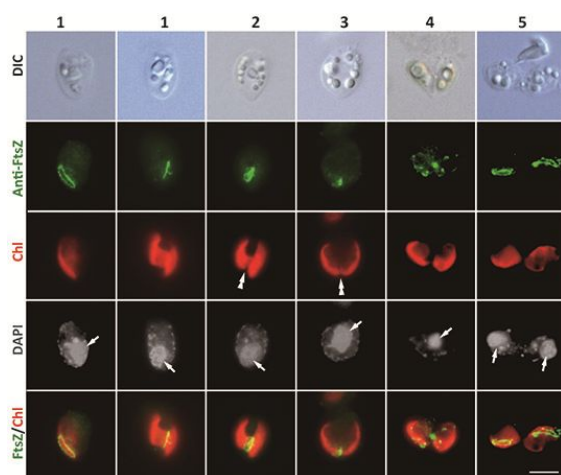


図 3 *FtsZ* タンパク質の局在解析

緑色の蛍光は抗 *FtsZ* 抗体のシグナル、赤は葉緑体の自家蛍光、灰色は DAPI 染色のシグナルを示す。二重の矢戻は葉緑体の収縮部位を、矢印はクリプト藻核を示す。*FtsZ* は間期の細胞(ステージ 1)にも観察され、分裂時(ステージ 2-4)に収縮し、クリプト藻核分裂後(ステージ 5)に再形成される。スケールバーは 5 μ m。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ryo Onuma, Mishra Neha, Shin-ya Miyagishima. (2017) Regulation of

chloroplast and nucleomorph replication by the cell cycle in the cryptophyte *Guillardia theta*. *Scientific Reports*, 査読有, 7:2345, DOI: 10.1038/s41598-017-02668-2

〔学会発表〕(計 3 件)

○大沼亮、宮城島進也、「クリプト藻 *Guillardia theta* の葉緑体分裂と共生藻細胞周期による分裂制御機構の解明」、日本藻類学会、PB28、東京、2016年3月19~20日(ポスター・査読なし)

Ryo Onuma, Takeo Horiguchi, Shin-ya Miyagishima. “Ultrastructural and transcriptomic studies of the kleptochloroplastidic dinoflagellate *Nusuttodinium aeruginosum*”, Protist 2016 Moscow Forum, 2-#20, Moscow, Russia, 2016年6月6~10日(ポスター発表・査読なし)

大沼亮、廣岡俊亮、兼崎友、吉川博文、宮城島進也、「盗葉緑体性渦鞭毛藻 *Nusuttodinium aeruginosum* に取り込まれた共生クリプト藻の網羅的発現遺伝子解析」、日本藻類学会、B18、高知、2017年3月24~25日(口頭発表・査読なし)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大沼 亮 (ONUMA, Ryo)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・博士
研究員

研究者番号：80756825