

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H01446

研究課題名(和文) 光合成酸化ストレスへの対処機構の進化による細胞内共生成立過程の解明

研究課題名(英文) Characterization of endosymbiotic evolution by focusing on the mechanisms for coping with photosynthetic oxidative stress

研究代表者

宮城島 進也 (Miyagishima, Shin-ya)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・教授

研究者番号：00443036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 26,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内共生による葉緑体の成立は、真核細胞による単細胞光合成生物の捕食、一時的保持(盗葉緑体および任意共生)、恒久的保持(葉緑体との絶対共生)の順に進行したと考えられている。本研究では藻食の単細胞生物、盗葉緑体性生物および葉緑体を有する単細胞真核藻類を用い、共生進化の各段階にある生物群が、光合成によって生じる酸化ストレスにどのように対応しているのかを解析した。その結果、植物や藻類に存在する光合成酸化ストレスを軽減する機構の少なくとも一部は、葉緑体が成立するよりも遙か前の、捕食・被食段階および一時的な共生関係の段階から順次獲得されてきたことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光合成酸化ストレスへの対処機構は、すでに葉緑体との絶対共生関係を確立させている真核藻類・植物においての研究例があったが、本研究により、捕食・被食関係の段階においても真核藻類・植物に見られる機構の一部が成立していたことが初めて明らかとなった。また、これまでほとんど不明であった細胞内共生進化の初期段階について、絶対共生関係を構築するために必要な機構や遺伝子群を、宿主細胞が捕食・被食関係の段階から漸進的に獲得したという知見が得られた。これらの結果は、細胞内共生進化を理解するために重要な、これまでになかった視点からの発見である。

研究成果の概要(英文)：It is believed that chloroplasts were established through predation and the temporary or facultative retention of photosynthetic prey and then permanent endosymbiotic relationship with photosynthetic organisms (or chloroplasts) by a unicellular eukaryotic host cell. In this study, we have analyzed how organisms in different stages of endosymbiotic evolution cope with photosynthetic oxidative stress. We have found that some mechanisms for coping with photosynthetic oxidative stress had been acquired stepwisely in prey-predator and temporal endosymbiotic relationships before establishment of permanent endosymbiotic relationships (chloroplasts).

研究分野：進化細胞生物学

キーワード：細胞内共生 光合成

1. 研究開始当初の背景

葉緑体はシアノバクテリアの細胞内共生によって誕生し、さらに葉緑体を持つ真核藻類が、複数回独立に非光合成真核細胞に細胞内共生すること(二次共生)で、光合成能を多数の真核生物系統にもたらした。このようにして進化した多様な藻類・植物による光合成は、一次生産者として多大な役割を果たしているが、地球生態系における光合成は、藻類・植物だけでは無く、盗葉緑体性原生生物(藻類を捕食後、その葉緑体、場合によってはその核も数日間保持し光合成を行わせた後に消化する)、真核藻類を任意に細胞内共生させる多様な真核生物(サンゴ、ミドリゾウリムシなど)によっても行われる。藻類捕食、一時的保持(盗葉緑体および任意共生)、絶対共生(葉緑体)の各段階のすべて、または複数が種々の近縁系統群内に見られることから、細胞内共生による葉緑体の成立は、この順に進行したと考えられている。このような進化過程の理解は、光合成真核生物の誕生と多様化、光合成の生態系内への広がりを理解する上で非常に重要であるが、これら多様な真核生物が如何にして細胞内共生関係を維持できるようになったのかについてはほとんど理解が進んでいなかった。

一般に、絶対共生系の確立は、共生体から宿主への遺伝子転移と、宿主(核ゲノム)による共生体制御系の獲得に起因すると考えられている。そのため、この分野の研究は「遺伝子転移に基づく宿主細胞による共生体の制御機構とその進化」という観点で、分子細胞生物学(宿主核コードタンパク質の共生体への輸送機構、宿主ゲノムによる共生体のゲノム発現、成長、分裂の制御など)、分子系統学を基盤として進められてきた(Dorrell and Howe, J. Cell Sci., 2012)。しかしながら我々は、細胞内共生は、宿主上位、共生体下位の一方的な現象では無いので、細胞内共生関係およびその進化を理解するためには、共生体側から宿主に作用する現象の解析も重要であると考えた。このような考えに基づき、共生体の光合成が、宿主細胞の成長・分裂(細胞周期進行)に必須である一方で、光合成酸化ストレス(光合成に起因する多量の活性酸素種)によって宿主細胞成長・分裂をどの様に制約するかという、この分野にはなかった研究を開始した。その結果、真核藻類においては、昼間発生する葉緑体光合成酸化ストレスのため、宿主はこれを避けてDNA複製と細胞分裂を行う必要が生じ、宿主細胞周期進行が夜間に限定される可能性を見いだした(Miyagishima et al., Nature Commun., 2014)。そこで以下の「研究の目的」に記載するように、宿主細胞が、どのように光合成性共生体の生じる酸化ストレスへの対処機構を進化させてきたのかという問題に着目して、細胞内共生関係の進化過程を理解する必要性が生じた。

2. 研究の目的

光合成による酸化ストレスは、光により励起された光合成色素(クロロフィル等)が酸素分子にエネルギーを渡す(一重項酸素)または光化学系電子伝達鎖から電子が漏れ酸素に渡る(過酸化水素、ヒドロキシラジカルなど)ことによって発生する。これら活性酸素種(ROS)またはROSによって生成する種々のラジカル生体分子は、葉緑体外に移動し、宿主細胞にダメージを与える(Mittler, 2002)。したがって、絶対共生関係にある真核藻類・植物だけで無く、光合成性共生体は、盗葉緑体および任意共生の関係においても宿主細胞に対して光合成酸化ストレスを与えると予想される。さらに、光合成性被食者も、完全に消化されるまでの間に光が当たれば、光合成色素(クロロフィル等)が光エネルギーを吸収するため、ROSを発生し捕食者に対して酸化ストレスを与えると予想される。また、消化中においては、被食者の光化学系の調節が不完全となること、より毒性の高い遊離クロロフィルなどが生じ、より高濃度のROSが発生する可能性が高い。

そこで本研究では、藻食アメーバ(捕食 被食関係)、盗葉緑体性渦鞭毛虫(一過的共生関係)、真核藻類(絶対共生関係)を用い、それぞれの二者の関係において、共生体(または被食者)が、どの程度の酸化ストレスを、宿主(または捕食者)に与えているか、宿主(または捕食者)細胞は、どの様に光合成酸化ストレスを回避しながら増殖するかを明らかにすることを目的とした。また、これの結果に基づき、共生の各段階における光合成酸化ストレスへの対処戦略の比較を行い、捕食、一過的共生、絶対共生の各段階において、光合成の毒性に対抗するために、どのような制約が、またどのような機構の必要性が、宿主細胞に求められるのかを明らかにし、細胞内共生による、真核生物の光合成能獲得の過程を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 単細胞性真核藻類における葉緑体光合成と宿主細胞の成長・分裂の関係

真生の葉緑体を確立している単細胞性真核藻類として、ゲノムサイズが小さいためオミクス解析が比較的容易であり、遺伝的改変技術も構築されている、単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* を主材料として選んだ。また、研究結果の真核藻類における一般性を捉えるために、紅藻とは進化的に大きく離れている単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を副材料として選んだ。これらを12時間明期12時間暗期の環境下で培養し、光合成活性、呼吸活性、トランスクリプトーム、メタボロームの変動を解析した。さらに *C. merolae* においては、MRE11 タンパク質の局在を解析

することで、光合成酸化ストレスによる核 DNA 二本鎖切断の頻度解析も行った。

(2) 盗葉緑体性渦鞭毛虫における盗葉緑体光合成と宿主渦鞭毛虫の成長増殖の関係

盗葉緑体性渦鞭毛虫 *Nusuttodinium aeruginosum* と、盗葉緑体源となるクリプト藻 (*Chroomonas* sp.) の無菌二員培養系を確立した。盗葉緑体を保持している *N. aeruginosum* の暗条件および明条件下でのトランスクリプトームおよび細胞形態比較解析と、盗葉緑体を消化しきった *N. aeruginosum* の集団にクリプト藻を与えた後の、恒明条件下でのトランスクリプトームおよび細胞形態変動解析を行った。また光合成酸化ストレスが *N. aeruginosum* に与える影響を、盗葉緑体を保持している *N. aeruginosum* を暗黒下、弱光下 ($10\text{-}100 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) および強光下 ($200 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) で培養することにより解析した。

(3) 微細藻類を捕食する単細胞生物群における光合成酸化ストレスへの対処機構

小田貫湿原 (静岡県富士宮市) から 3 種の藻食アメーバを単離した。18S リボソーム DNA の配列解析の結果、それぞれ *Acanthamoeba* sp. (Amoebozoa)、*Vannella* sp. (Amoebozoa)、*Naegleria* sp. (Excavata) であることが判明した。これらのアメーバに光合成性 (シアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7942) または非光合成性 (窒素源欠乏下で培養し無色化させたシアノバクテリア) の餌を与え、暗条件および明条件下で培養し、トランスクリプトーム解析、細胞数の変動解析および捕食能の変動解析を行った。

4. 研究成果

(1) 単細胞性真核藻類における葉緑体光合成と宿主細胞の成長・分裂の関係

多細胞性の陸上植物においては、細胞増殖は茎頂および根端等の光合成を行わない分裂組織に限定され、「危険な光合成」と「DNA を安全に複製すべき細胞増殖と次世代個体の創出」は場所 (組織) によって分業されていることが知られている。しかしながら、細胞内共生進化の結果、最初に地球上に出現した光合成性真核生物は単細胞性の真核藻類であり、単細胞藻類では、同一細胞が光合成を行いながら成長と分裂を行うが、光合成の危険性にどのように対処しながら増殖しているかは不明であった。

単細胞紅藻 *C. merolae* を 12 時間明期 12 時間暗期の環境下で培養し、光合成活性、呼吸活性、トランスクリプトーム、メタボロームの変動を解析したところ、(i) 葉緑体の光合成とミトコンドリアの呼吸 (光合成ほどでは無いがこちらにも活性酸素種を生じる) 活性が朝方最大となり夕方に向けて低下する、(ii) 光合成・呼吸に比べるとエネルギー変換効率が低い解糖・発酵系が夕方から夜に活性化される、(iii) 核の DNA 複製と細胞分裂は夜間におこることが明らかとなった。さらに (iv) 夜間の細胞に光を当てて光合成を行わせると DNA の損傷頻度が高くなることが明らかとなった。また、同様の結果が葉緑体成立後間もなく紅藻と分岐した緑藻 (単細胞緑藻 *C. reinhardtii*) でも見られた。

以上の結果、活性酸素種を生じる光合成と、葉緑体と同様にバクテリアの細胞内共生によって誕生したミトコンドリアにおける呼吸活性が低下する夕方から夜間に DNA 複製を行うことで「安全な」細胞増殖が行われていることが明らかとなった。

(2) 盗葉緑体性渦鞭毛虫における盗葉緑体光合成と宿主渦鞭毛虫の成長増殖の関係

盗葉緑体現象は、自前の葉緑体をもたない生物が他の藻類またはその葉緑体を自身の細胞内に取り込み、細胞内で一時的に維持する現象で、真の葉緑体を獲得する手前の進化段階であると考えられている。盗葉緑体性渦鞭毛虫 *N. aeruginosum* (宿主) は、クリプト藻という単細胞藻類 (使い捨ての一時的共生体) を取り込み、細胞内でその葉緑体を元のサイズの 20 倍以上に拡大させて数週間利用した後に消化することが知られていた。

盗葉緑体を保持している宿主渦鞭毛虫の暗条件および明条件下でのトランスクリプトーム比較解析に加え、盗葉緑体を消化しきった宿主渦鞭毛虫の集団にクリプト藻を与え、恒明条件下での細胞形態及びトランスクリプトーム変動解析を行った結果以下のことが明らかとなった。

(i) 宿主渦鞭毛虫は明条件下でのみクリプト藻を取り込む。取り込み後 6 日間は細胞と盗葉緑体の成長は起こるが細胞分裂は停止し、その後細胞分裂と盗葉緑体の分裂が再開する。(ii) 宿主渦鞭毛虫に取り込まれたクリプト藻核は転写活性を維持しており、取り込まれる前よりも代謝・翻訳・DNA 合成に関する遺伝子群の発現が上昇すること、クリプト藻核のはたらきは、特に光合成酸化ストレスを生じる強光条件下では宿主渦鞭毛藻の生存に必須である。(iii) 宿主渦鞭毛虫核ゲノムには水平転移で獲得された硝酸還元酵素がコードされており、藻類・植物の葉緑体の場合と同様に、共生体に亜硝酸の形で窒素源を供給し共生体内でのタンパク質合成を調節していること、葉緑体タイプの三炭糖リン酸トランスポーターも核ゲノムにコードされており、共生体から光合成産物を吸収するためにはたらく可能性が示唆された。

(3) 微細藻類を捕食する単細胞生物群における光合成酸化ストレスへの対処機構

光合成性の餌が活発に光合成を行うと考えられる日当たりの良い湿原 (富士宮市、小田貫湿原)

から、系統の大幅に異なる3種の藻食アメーバ(アメーボゾア2種とエクスカバータ1種)を単離し培養することに成功した。これらのアメーバに光合成性(シアノバクテリア)または非光合成性(窒素源欠乏下で培養し無色化させたシアノバクテリア)の餌を与え、暗条件および明条件下で培養し解析を行った結果、以下のことが3種のアメーバに共通して起こることが明らかとなった。(i)藻食アメーバは餌の光合成性と光特異的に強い酸化ストレスに曝される。光合成酸化ストレスが上昇する強光下で光合成生物を補食すると死ぬこともある。(ii)昼間にはアメーバの酸化ストレス対応遺伝子群の発現が上昇し、一方でアクトミオシン等のファゴサイトーシス関連遺伝子群の発現が抑制される。また上記の真核藻類で見られたように、中間はS期およびM期進行に関わる遺伝子群の発現が抑制される。(iii)アメーバは昼間には餌の取り込みを抑制する一方で、それでもなお取り込んでしまう餌の消化速度を速める。つまり、細胞内の光合成性餌の数を減少させることで活性酸素種の発生を抑えていると予想される。これに似た現象として、光合成酸化ストレスが高まる環境下で、細胞内の共生藻類を消化または吐き出すことが、ミドリゾウリムシ、サンゴなどで知られている。(iv)アメーバは、これまで藻類・植物でのみ見つかったクロロフィル(光合成色素;光合成装置から遊離した状態で光を受けると活性酸素種を生じる)の分解・無毒化遺伝子を、それぞれ独立に、光合成生物からの遺伝子水平転移により獲得している。これらの遺伝子は、光または酸化ストレスにより発現誘導される。

(3)まとめ

以上3つの研究の結果、光合成酸化ストレスの軽減、光合成時の細胞周期進行停止、共生体への光合成原料提供と共生体からの光合成産物取得など、光合成生物を細胞内に共生させ、さらには葉緑体として利用するための機構は、捕食・被食の段階から漸進的に準備されてきたことが示唆される。これまで、葉緑体タンパク質をコードする核ゲノムの遺伝子群の多くは、恒久的な細胞内共生の確立後、共生体ゲノムから宿主核ゲノムに移行することで獲得されたと考えられてきた。しかしながら、今回の研究の結果、それらの少なくとも一部は、葉緑体との絶対共生関係が成立するよりも遙か前の、捕食・被食段階および一時的な共生関係の段階から(例えば光合成性餌ゲノムから捕食者の核ゲノムへの)水平転移によって順次獲得されてきたことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Onuma, R., Hirooka, S., Kanesaki, Y., Fujiwara, T., Yoshikawa, H., Miyagishima, S.	4. 巻 14
2. 論文標題 Changes in the transcriptome, ploidy, and optimal light intensity of a cryptomonad upon integration into a kleptoplastic dinoflagellate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ISME J.	6. 最初と最後の頁 2407-2423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41396-020-0693-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fujiwara, T., Hirooka, S., Ohbayashi, R., Onuma, R., Miyagishima, S.	4. 巻 183
2. 論文標題 Relationship between cell cycle and diel transcriptomic changes in metabolism in a unicellular red alga.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiol.	6. 最初と最後の頁 1484-1501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/pp.20.00469	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kashiyama, Y. et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Taming chlorophylls by early eukaryotes underpinned algal interactions and the diversification of the eukaryotes on the oxygenated Earth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ISME J.	6. 最初と最後の頁 1899-1910
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41396-019-0377-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Uzuka, A., Kobayashi, Y., Onuma, R., Hirooka, S., Kanesaki, Y., Yoshikawa, H., Fujiwara, T., Miyagishima, S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Responses of unicellular predators to cope with the phototoxicity of photosynthetic prey.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 Article 5606
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-13568-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyagishima, S., Era, A., Hasunuma, T., Matsuda, M., Hirooka, S., Sumiya, N., Kondo, A., Fujiwara, T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Day/night separation of oxygenic energy metabolism and nuclear DNA replication in the unicellular red alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e00833-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.00833-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara, T., Hirooka, S., Mukai, M., Ohbayashi, R., Kanesaki, Y., Watanabe, S., Miyagishima, S.	4. 巻 3
2. 論文標題 Integration of a <i>Galdieria</i> plasma membrane sugar transporter enables heterotrophic growth of the obligate photoautotrophic red alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 e00134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pld3.134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirooka, S., Hirose, Y., Kanesaki, Y., Higuchi, S., Fujiwara, T., Onuma, R., Era, A., Ohbayashi, R., Uzuka, A., Nozaki, H., Yoshikawa, H., and Miyagishima, S.	4. 巻 114
2. 論文標題 Acidophilic green algal genome provides insights into adaptation to an acidic environment	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	6. 最初と最後の頁 E8304-E8313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1707072114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 宮城島 進也, 宇塚 明洋, 小林 優介, 大沼 亮, 廣岡 俊亮, 藤原 崇之
2. 発表標題 藻食単細胞生物における餌の光毒性に対する対処機構
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮城島 進也
2. 発表標題 細胞内共生による光合成真核生物の成立と光合成の毒性への対処
3. 学会等名 第13回日本ゲノム微生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮城島 進也
2. 発表標題 細胞内共生と光合成生物の進化・多様化
3. 学会等名 第51回日本原生生物学会公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin-ya Miyagishima
2. 発表標題 Cyanidiales for interdisciplinary and international studies
3. 学会等名 International Symposium: Cyanidioschyzon merolae as an arising model for unicellular eukaryotes（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮城島 進也
2. 発表標題 細胞内共生による葉緑体の獲得光合成の毒性による制約
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮城島 進也
2. 発表標題 ミトコンドリアと葉緑体のようなエネルギー変換器はどの様に誕生したか - 微細藻類を用いて細胞内共生による生命進化を探る
3. 学会等名 大隅基礎科学創成財団 第三回創発セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮城島 進也
2. 発表標題 細胞内共生に関する基礎研究と 産業利用に向けた研究における微細藻類の利用
3. 学会等名 ナショナルリソースプロジェクト公開成果報告会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮城島 進也
2. 発表標題 真核宿主細胞と細胞内共生体由来オルガネラの協調増殖機構
3. 学会等名 第17回名古屋大学遺伝子実験施設公開セミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮城島 進也
2. 発表標題 真核細胞と葉緑体・光合成性細胞内共生体の協調増殖機構
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮城島 進也
2. 発表標題 真核宿主細胞と細胞内共生オルガネラの協調増殖機
3. 学会等名 日本進化学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮城島 進也
2. 発表標題 真核細胞と葉緑体・光合成性細胞内共生体の時間分業による協調増殖機構
3. 学会等名 生物リズム若手研究者の集い2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kuroiwa, T., Miyagishima, S., Matsunaga, S., Sato, N., Nozaki, H., Tanaka, K., Misumi, O.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 376
3. 書名 Cyanidioschyzon merolae: A New Model Eukaryote for Cell and Organelle Biology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------