

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15164

研究課題名（和文）渦鞭毛藻細胞に見られるシアノバクテリア共生体の機能および進化の解明

研究課題名（英文）Genome analysis of symbiotic cyanobacteria seen in pelagic dinoflagellates

研究代表者

中山 卓郎（Nakayama, Takuro）

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：70583508

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：外洋域に生息するディノフィシス目渦鞭毛藻には、シアノバクテリアを共生させる種が複数知られている。本研究ではディノフィシス目渦鞭毛藻に共生するシアノバクテリアがどのような性質を持つかを調べるため、本目に属する *Ornithocercus magnificus* および *Histioneis depressa* の共生体ゲノムの解読を行なった。解析の結果2つの共生体は窒素固定能の有無に代表される代謝能力、環境中での宿主との共生関係に差異が見られ、本目渦鞭毛藻類の共生シアノバクテリアには、共生関係の強さやその役割に多様性が存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シアノバクテリアは海洋における重要な一次生産者の一つである。これまでその多様性や生態学的な特徴を把握するため数々の網羅的な解析が行われてきた。一方で本研究で明らかとなった渦鞭毛藻共生性シアノバクテリアは、これまでの海洋シアノバクテリアの多様性解析では認識されてこなかった系統であった。解析の結果を踏まえると、これまでの海洋シアノバクテリアの多様性解析は、本研究で対象としたような真核生物に共生するシアノバクテリアを見逃していた可能性がある。この知見は海洋におけるシアノバクテリアの生態および多様性をより正確に把握するために重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Pelagic species of Dinophysiales dinoflagellates are known to host symbiotic cyanobacteria. In this study, in order to know the properties of cyanobacteria in symbiosis with those pelagic dinoflagellate, we analyzed the genomes of cyanobacterial symbionts of two Dinophysiales dinoflagellates, *Ornithocercus magnificus* and *Histioneis depressa*. Our analysis revealed that the two symbionts differ in their metabolic abilities (e.g., nitrogen-fixing capacity) and in their symbiotic status in the natural environments, suggesting that symbiotic cyanobacteria of dinoflagellates have diversity in their metabolic roles and the strength of their symbiotic relationships with the dinoflagellate hosts.

研究分野：進化生物学

キーワード：シアノバクテリア 渦鞭毛藻 共生 メタゲノム 進化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

海洋には陸上に匹敵する生態系が存在するが、それを支える一次生産者として代表的ものの一つにシアノバクテリアが挙げられる。海洋の様々な環境に分布するシアノバクテリアは、光合成のみならず窒素固定能も持つことから海洋および全球的な物質循環に大きく寄与すると考えられている。そのため海洋シアノバクテリアについて生態学的・系統学的な特性を明らかにするため様々な研究が行われている。

これまで、海洋に広く分布するシアノバクテリアは自由生活性のものが代表的であると認識されてきたが、近年の研究において多くのシアノバクテリアが単独で存在するのではなく、単細胞性の真核生物と強固な共生関係を築いていることが明らかとなってきた。例えば UCYN-A (*Candidatus Atelocyanobacterium thalassa*) と呼ばれるシアノバクテリアは海洋環境中に広く分布することが環境 DNA 解析によって知られていたが、この系統は真核単細胞藻類であるハプト藻類の細胞内に共生することが近年の研究により明らかとなった。シアノバクテリアを共生させる真核生物には珪藻やハプト藻のみならず、渦鞭毛藻や放散虫、有孔虫といった多くの単細胞真核生物が知られている。その中でも渦鞭毛藻とシアノバクテリアの共生関係は 100 年以上前から認識されているにもかかわらずほとんど理解が進んでいない。

渦鞭毛藻は海洋、陸水を問わず広く分布する単細胞性真核生物の一群で、非常に大きな多様性をもつ。半数近くの種が光合成性であり、しばしば赤潮を形成することでも知られる。葉緑体を持たない非光合成の渦鞭毛藻であるディノフィシス目の種には、シアノバクテリア共生体をもつものが知られる (*Ornithocercus* 属、*Histioneis* 属、*Citharistes* 属など)。これらの種は複雑な形状の細胞外被構造をもち、翼片と呼ばれる翼のような特徴的な構造を有する。複雑な細胞外被の中には大きな袋状の間隙があり、共生シアノバクテリアはこの間隙に存在する (以降、共生チャンパーと呼ぶ)。この共生チャンパーは種により大きさが異なり、細胞容量の大半を占める種もある。これらの渦鞭毛藻はサンプリングが容易な沿岸域での個体密度が低く、さらに難培養性であるため、これまで限られたアプローチでしか研究が行われてこなかった。とくに分子生物学的な研究はほとんど行われておらず、共生シアノバクテリア、宿主渦鞭毛藻ともにリボソーム RNA 遺伝子配列 (rDNA 配列) 等ごく限られた分子情報の取得に留まっている。興味深いことに、rDNA 配列で系統解析を行なうと、渦鞭毛藻に共生するシアノバクテリアは、シアノバクテリア全体の系統の中で特有の単系統群を形成することが知られている。このことは、渦鞭毛藻と共生シアノバクテリアの共生関係には強い特異性があり、共生シアノバクテリアは渦鞭毛藻との共生に特化した進化をしている可能性を示している。

## 2. 研究の目的

本研究では渦鞭毛藻細胞に共生するシアノバクテリアの全ゲノム解析を行い、共生体の系統および代謝的特徴を明らかにするとともに、宿主渦鞭毛藻との共生関係および進化について考察することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### サンプリング・DNA 調整

筑波大学臨海実験センターの協力のもと、下田湾沖においてプランクトンネットの表層曳によるサンプリングを行った。サンプル内に発見されたシアノバクテリアを共生させるディノフィシス渦鞭毛藻 2 種 (*Ornithocercus magnificus* および *Histioneis depressa*) を顕微鏡下でマイクロキャピラリーにて単離した。それぞれの渦鞭毛藻細胞の共生チャンパーからシアノバクテリア共生体をさらに単離し、それぞれ単細胞ゲノム増幅を行うことでシアノバクテリアゲノム DNA サンプルの確保を行った。

### シーケンシング・ゲノムアセンブリ・アノテーション

増幅されたそれぞれのゲノム DNA を Illumina 社 MiSeq および Oxford Nanopore Technology 社 MinION を用いて解析し、配列解読を行った。MiSeq および MinION によって得られたショート

リード・ロングリードを用いて SPAdes ソフトウェアによるゲノムアセンブリを行った。得られたゲノムスキファールドにはコンタミネーション由来と思われるシアノバクテリア以外の細菌ゲノム配列が見られたため、個々のスキファールドに予測されるタンパク質コード遺伝子全ての系統解析を行い、それぞれのスキファールドにみられる系統的シグナルを基準に混入した非シアノバクテリア配列の除去を行った。得られたドラフトゲノムのアノテーションは主に PROKKA ソフトウェアを用いて行なった。

### 系統解析

*O. magnificus* および *H. depressa* の共生体について近縁なシアノバクテリアゲノムとの系統関係をそれぞれ 40 および 33 のタンパク質配列を連結したデータセットを用いて系統解析を行った。最尤法による系統解析には IQ-tree ソフトウェアを用い、いずれも LG+C60+F+G モデルで解析を行った。複数タンパク質を用いた系統解析とは別に、単一遺伝子を用いた系統解析も行った。*O. magnificus* 共生体では ITS および 16S rRNA 遺伝子配列、*H. depressa* 共生体では NifH タンパク質配列を用いた系統解析を行った。全ての系統解析において IQ-tree による最尤系統樹推定を行った。

### メタゲノム解析

Tara Oceans プロジェクトによって解析・公開された海洋微生物メタゲノムデータから、572 のメタゲノムショートリードデータをダウンロードし、その中に *O. magnificus* 共生体および *H. depressa* 共生体と同様の配列に由来すると考えられるリードを、BLASTn ソフトウェアを用いて探索した。その際、系統間で保存されていると考えられるゲノム中の rRNA 遺伝子領域は解析から除外した。

## 4. 研究成果

本研究において *O. magnificus* のシアノバクテリア共生体（以下 OmCyn）および *H. depressa* のシアノバクテリア共生体（以下 HdCynA）の高精度なドラフトゲノムを取得することに成功した。それぞれのドラフトゲノムの総塩基長は OmCyn: 1.87 Mbp、HdCynA: 5.38 Mbp であり、それぞれ 1,846 および 6,064 のタンパク質がコードされていることが予想された。複数のオーソログタンパク質を連結したデータセットを用いた系統解析によって、OmCyn・HdCynA は異なる系統のシアノバクテリアに由来し、それぞれ外洋域に広く分布するシアノバクテリアである *Synechococcus/Prochlorococcus* 属および *Chrocosphaera* 属に近縁であることが明らかとなった（図 1）。OmCyn が属する *Synechococcus/Prochlorococcus* 系統は非窒素固定系統であり、OmCyn ゲノムにも窒素固定に関連する遺伝子は認められなかったが、その一方で HdCynA が属する *Chrocosphaera* は窒素固定を行うことで知られる。HdCynA のゲノムにコードされるタンパク質を精査したところ、窒素固定を行う酵素であるニトロゲナーゼのサブユニットタンパク質およ

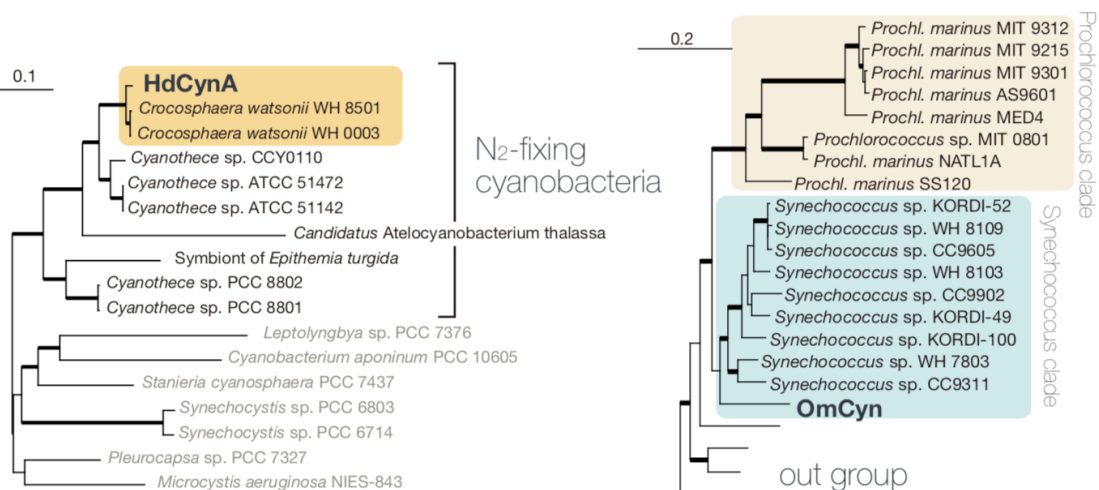


図 1. HdCynA および OmCyn の複数タンパク質アライメントに基づく最尤系統樹

びニトログナーゼの活性に必要な FeMo 補因子の生合成に必要なタンパク質がすべてコードされていることが明らかとなり、HdCynA は *H. depressa* の共生チャンバーの中で窒素固定を行っていることが示唆された。

2 系統のシアノバクテリア共生体は属レベルでの大まかな系統関係はいずれも明らかとなったが、それぞれの系統内における既知配列との類似性には違いが見られた。HdCynA は既知の *Chrocosphaera* 系統の培養/未培養のシアノバクテリア配列と非常に近縁であることが示されたが、OmCyn は今まで知られていた *Synechococcus/Prochlorococcus* の系統の配列とは独立した系統であり、シアノバクテリアの進化において *Synechococcus* 属および *Prochlorococcus* 属が分かれた後すぐに *Synechococcus* 系統から分枝した系統であることが示唆された。

*Tara Oceans* プロジェクトによるメタゲノムデータを用いて海洋における分布解析を行ったところ、OmCyn および HdCynA はいずれも全球規模で広く存在することが示唆された。*Tara Oceans* プロジェクトでは 1 つのサンプリングサイトにおいて異なる水深および異なる生物サイズごとにメタゲノムシーケンスを行っている。これらのパラメータごとに OmCyn および HdCynA に一致するメタゲノムリードの頻度を比較したところ、生物サイズにおいて 2 つの共生体に大きな差異があることが明らかとなった。

HdCynA は既知の *Chrocosphaera* のゲノムと同様にシアノバクテリアサイズ (< 5 μm) に総量の 90%以上が存在することが示されたが、OmCyn ゲノムに対応する配列はその細胞サイズよりも大きい 20-180 μm のサイズ区画のサンプルに最も多く見られることが明らかとなった(図 2)。この分布パターンはメタバーコードデータに基づく *O. magnificus* の分布パターンはほぼ一致することから、OmCyn は宿主である *O. magnificus* と常に共生した状態で生育することが予想される。

近縁な系統との比較ゲノム解析の結果、OmCyn のゲノムは進化の過程で大きく縮退していることが示唆された。現生の *Synechococcus* および *Prochlorococcus* ゲノムにコードされるタンパク質多様性から、2,114 の祖先的なタンパク質遺伝子セットが推定できるが、OmCyn に近縁な *Synechococcus* 属ゲノムは平均してこの遺伝子セットの 86%を保持するのに対して、OmCyn は 65%しか保持しないことが明らかとなった。このことは OmCyn 系統が他の *Synechococcus* 系統と分岐した後、多くの遺伝子を失ったことを示唆している。失われたと予想される遺伝子の多くは細胞膜に局在するトランスポーターなど、細胞外の環境との相互作用に関わるタンパク質遺伝子であった。

以上の結果から OmCyn と HdCynA における宿主渦鞭毛藻との共生関係について考察したい。HdCynA については既知の自由生活性 *Chrocosphaera* と非常に近縁であることが示されたのに加え、HdCynA に相当すると考えられる DNA 配列はバクテリアサイズのサイズ画分に多く検出されたことから、このシアノバクテリアはその多くが環境中で単独で生息している可能性がある。*H. depressa* を含む *Histioneis* 属渦鞭毛藻は共生チャンバー内に *Chrocosphaera* 様のシアノバクテリア共生体を持つことが数多く報告されているが、これらのシアノバクテリアは条件的な共生体であり、渦鞭毛藻はそれぞれの環境中において自由生活性の *Chrocosphaera* を取り込み共生さ

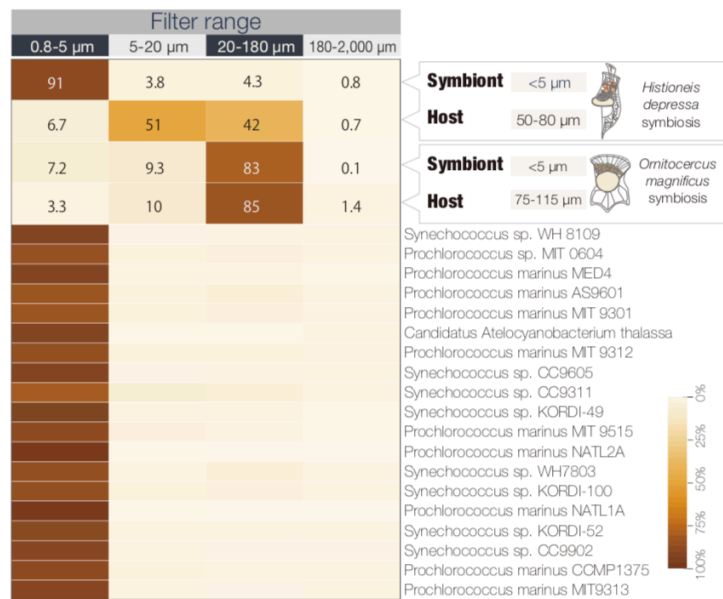


図 2. HdCynA および OmCyn とそれぞれの宿主渦鞭毛藻配列の各サイズ画分ごとの出現頻度

せているのかもしれない。これについては *H. depressa* 以外の *Histioneis* 属渦鞭毛藻の共生体も同様にゲノム解析し、検討する必要がある。対して OmCyn は、他の *Synechococcus/Prochlorococcus* とは独立した系統であること、その分布パターンが *O. magnificus* のものと一致することから、*O. magnificus* の絶対共生体として進化してきた可能性が高い。OmCyn がこれまでの進化の過程で失ったと考えられる遺伝子に、細胞外の環境との相互作用に関わるタンパク質遺伝子が多く含まれることを考慮すると、当該共生体に見られるゲノムの縮退も渦鞭毛藻の共生チャンバーという外界から半ば隔離された環境に適応した結果であるかもしれない。

本研究の結果はシアノバクテリアの多様性研究にも大きな示唆を与える。これまでシアノバクテリアの多様性把握のために環境 DNA 解析を始めとする網羅的な調査が多くなされてきた。特に次世代シーケンサーを利用した近年のメタゲノム・メタバーコーディング解析は海洋シアノバクテリアの実態把握に大きく寄与してきたが、それに反して OmCyn に対応する系統はこれまで認識されてこなかった。これはシアノバクテリア多様性研究の多くにおいて、シアノバクテリアよりも大きな細胞サイズ画分が取り除かれたサンプルを用いて調査が行われていたことに起因する可能性がある。シアノバクテリアと共生する真核生物は今回調査した渦鞭毛藻種以外にも多く知られていることから、今後海洋におけるシアノバクテリアの生態学的なインパクトをより正確に捉えるために、真核生物と共生するシアノバクテリアをターゲットとした多様性解析も必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sarai Chihiro, Tanifuji Goro, Nakayama Takuro, Kamikawa Ryoma, Takahashi Kazuya, Yazaki Euki, Matsuo Eriko, Miyashita Hideaki, Ishida Ken-ichiro, Iwataki Mitsunori, Inagaki Yuji	4. 巻 117
2. 論文標題 Dinoflagellates with relic endosymbiont nuclei as models for elucidating organellogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 5364 ~ 5375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1911884117	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 -

1. 著者名 Nakayama Takuro, Nomura Mami, Takano Yoshihito, Tanifuji Goro, Shiba Kogiku, Inaba Kazuo, Inagaki Yuji, Kawata Masakado	4. 巻 116
2. 論文標題 Single-cell genomics unveiled a cryptic cyanobacterial lineage with a worldwide distribution hidden by a dinoflagellate host	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 15973 ~ 15978
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1902538116	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takuro Nakayama, Yoshihito Takano, Mami Nomura, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba, Goro Tanifuji, Yuji Inagaki, Masakado Kawata
2. 発表標題 Genome analysis of a symbiotic cyanobacterium in a dinophysalean dinoflagellate, <i>Ornithocercus magnificus</i>
3. 学会等名 XXII Meeting of the International Society of Evolutionary Protistology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山卓郎, 高野義人, 野村真未, 柴小菊, 稲葉一男, 谷藤吾朗, 河田雅圭, 稲垣祐司
2. 発表標題 外洋性渦鞭毛藻 <i>Ornithocercus magnificus</i> に見られる共生シアノバクテリアのゲノム解析
3. 学会等名 日本藻類学会第42回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuro Nakayama, Mami Nomura, Yoshihito Takano, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba, Goro Tanifuji, Yuji Inagaki, Masakado Kawata
2. 発表標題 Genome analysis of a symbiotic nitrogen-fixing cyanobacterium in a pelagic dinoflagellate, <i>Histioneis depressa</i> .
3. 学会等名 VIII ECOP-ISOP Joint congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	高野 義人  (Takano Yoshihito)	高知大学・農林海洋科学部  (16401)	