

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：82617

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03723

研究課題名（和文）非光合成生物の光適応進化の全容解明

研究課題名（英文）Elucidation of evolutionary process of light adaptation in a course of loss of photosynthesis.

研究代表者

谷藤 吾朗 (Tanifuji, Goro)

独立行政法人国立科学博物館・動物研究部・研究主幹

研究者番号：70438480

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：光合成能力を二次的に消失した単細胞生物であるクリプト生物（Cryptomonas sp.）のゲノム解析と、光応答機能のサーベイを行なった。光合成近縁株との比較ゲノム解析から、本株は光合成機能が単純に衰退したのではなく、ゲノムサイズ増大が起きていることが明らかになった。また、葉緑体ゲノムでは光化学系の遺伝子を消失している一方でクロロフィル合成系遺伝子の一部が残存することと、同様に核ゲノムにも光合成関連遺伝子が残存することが明らかになった。光応答実験の成果から光条件に依存する物質の同定を行なった。それらのそれらの主成果については現在投稿準備中であるが、関連する研究成果を複数公表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

葉緑体の機能は光合成だけではない。それはマラリア原虫や寄生性植物などが光合成を失っても非光合成葉緑体を維持していることから明らかである。また、一見有利な形質に見える光合成が、生物にとって必ずしも良い面だけを面だけをもつとも言い切れない。本研究は従来あまり議論されてこなかった、非光合成の葉緑体に残存する従来“光合成以外の機能が想定されてこなかった”遺伝子機能に注目した。この点は独創的と言え、既知とされている遺伝子の新たな機能探索は今後の生態学、光合成学及び育種などにも波及する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The genome survey for Cryptistan organisms, Cryptomonas sp., which secondarily lost the photosynthetic ability was carried out. Also the light-respond functions in C. sp were surveyed. The genome size expansion was observed in of C. sp. with comparison a photosynthetic relative despite of the loss of ability. As well as retaining chlorophyll biosynthesis proteins in the plastid genome, the photosynthesis-related genes are partially retain in the nuclear genome. And we tried to identified a substance produced as respond to light conditions in C. sp. The main publication in the project is in preparation and the multiple papers partially relating to the project have been published.

研究分野：比較ゲノム学、原生生物学、進化学

キーワード：非光合成葉緑体 比較ゲノム 光応答 クリプト生物 進化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

葉緑体の重要な機能の一つは光合成であるが、マラリア原虫、寄生性植物、ミドリムシの一部など、多くの真核生物で光合成能をもたない非光合成葉緑体が保持されている。研究開始当初、一部の生物では非光合成葉緑体で脂肪酸代謝系やイソプレノイド合成系などが機能していることが分かっていたが、系統によって認識される機能にはばらつきがあり、非光合成葉緑体の“一般則”は不明瞭であった。また、光合成機能を消失した後でも、特に自由生活性生物の場合は光の影響を受ける環境に生息し続けていることから、光環境への生理的適応は必須と考えられる。しかし、非光合成葉緑体の機能が光環境への適応に関わっている可能性はほとんど議論されてこなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、非光合成クリプト生物 *Cryptomonas* sp. 1634B 株をモデルとして光合成生物が光合成機能を消失する過程でどのような生理的変化があったのか？特に、それまで光に多くの栄養を依存していた生物が、栄養的に光を必要としなくなった後に、光とどう向き合っていくのかに注目し、光合成消失の過程で起こる光への適応について回答を得ようと試みた。

### 3. 研究の方法

本種のゲノム DNA を抽出後、illumina short reads, nanopore long reads など次世代シーケンスによるシーケンスを行った。それらを各種アセンブラーでゲノム配列の再現を行った。各アセンブラーの出力を、1) K-mer 頻度解析によるゲノムサイズの推定値に近似していること、2) N50 の値など、より長いゲノム配列が再現されていること、3) BUSCO などによる真核生物共通に保存されている遺伝子が再現できていること、などを基準に解析に用いるアセンブルを決定した。また、K-mer 頻度解析により本種は diploid であることが予測されたため、purge\_haplotigs などのソフトを用いてハプロティグ配列をプライマリー配列から分離し後の解析に供した。配列は scaffolding, polish などいくつかのアセンブル後の処理をした後、いくつかの遺伝子予測ソフトを試し、最も BUSCO score が高くなった funannotate の遺伝子予測を採用した。

上記のゲノム情報を下地とし、異なる光環境下での網羅的遺伝子発現量解析により光変動遺伝子を同定した。全タンパク質情報から葉緑体局在タンパク質を網羅的に予測し、機能解析を行った。近縁多種との比較ゲノム解析から各生活様式特異的遺伝子と機能及びパラエティーを把握した。さらに、培養実験・各種顕微鏡観察に基づいて光環境下の生理変化を明らかにし、特定の培養条件下での網羅的スクリーニングにより光吸収物質を同定を試みた。

### 4. 研究成果

ゲノム解析の成果から、本種は約 400 Mbp のゲノムをもつことが明らかになった。このサイズはクリプトスタ生物の光合成モデル種である *Guillardia theta* の 87 Mbp の四倍以上の大きさであり、光合成機能が消失したからといって、単純にゲノムが小さくなっているのではないことが明らかとなった。また、クリプトスタ生物が光合成を獲得する前の状態と考えられる（構造体としてのプラスチドをもたない）*Goniomonas avonlea* は 92 Mbp のゲノムサイズをもつことから、*Cryptomonas* sp. 1634B は比較的最近ゲノムサイズが増大したことが示唆される。一方で、*Cryptomonas* 属の光合成種のゲノムサイズが明らかでないため、ゲノムサイズ増大が光合成消失に直接伴うかどうかは今後の同属光合成種ゲノム情報を待つ必要がある。得られたゲノム・アセンブリから遺伝子予測を行ったところ、28,414 遺伝子が予測された。*Gu. theta* は 24,840 遺伝子、*Go. avonlea* の 33,470 遺伝子が予測されており、また、eukaryotic orthologous group (KOG) による遺伝子機能比較において、約 80% は 3 種間で共通していた。すなわち、*Cryptomonas* sp. 1634B はゲノムサイズが増大しているにも関わらず、遺伝子数に顕著な変化はなく、少なくとも KOG による機能比較においては遺伝子のバラエティーでもそれほど変わらないことが示された。*Cryptomonas* sp. 1634B の葉緑体機能としては、鉄-硫黄クラスター・アセンブリー、アミノ酸合成、脂質代謝系の遺伝子の他、シャペロニン、プロテアーゼなどが維持されていた。*Cryptomonas* sp. 1634B では光合成を失っていることを反映するように、光化学系 I/II, サイトクローム b/6 などの光合成に直接関連する（主に明反応の）遺伝子は消失していた。しかしながらプロトクロロフィリド・レダクターゼ、Mg-プロトポルフィリン IX キタラーゼなどのクロロフィル合成遺伝子の一部が核ゲノム、プラスチドゲノム双方に残存していた。さらに、これらの遺伝子による産物を生化学的に同定することに成功した。一般にクロロフィル前駆体は光により一

重項酸素を産生することから、非光合成生物にとっては毒であると考えられている。遺伝子だけでなくクロフィル前駆体が非光合成生物から検出できたのは初である。また、この物質は細胞周期の特定の時期に産出される事も明らかとなり、機能性があることが示唆された。一方で、*Cryptomonas* sp.1634B に近縁であるが独立に光合成能力を失った *Cryptomonas paramecium* では、ルビスコ関連遺伝子 ( *rbcL*, *rbcS*, *cbbX* ) が検出されるが、*Cryptomonas* sp.1634B は欠失しているという違いが明らかになった。

上記に進化的考察を加え主要論文を準備中であるが、一部の成果は、特に葉緑体ゲノムの進化を中心として Tanifuji et al. (2020) GBE にて発表した。また、関連する内容で Sarai et al. (2020)PNAS, Nakayama et al.(2020)Commun Integ Biol など複数の国際誌で成果発表をおこなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tanifuji Goro, Kamikawa Ryoma, Moore Christa E, Mills Tyler, Onodera Naoko T, Kashiya Yuichiro, Archibald John M, Inagaki Yuji, Hashimoto Tetsuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Comparative Plastid Genomics of Cryptomonas Species Reveals Fine-Scale Genomic Responses to Loss of Photosynthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genome Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 3926 ~ 3937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/gbe/evaa001	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 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kashiya 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 The ISME Journal	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 谷藤吾朗	4. 巻 65
2. 論文標題 ヌクレオモルフ・ゲノミクス. 二次細胞内共生に伴うゲノム再編	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 藻類	6. 最初と最後の頁 100-102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Kanikawa Ryoma, Moog Daniel, Zauner Stefan, Tanifuji Goro, Ishida Ken-Ichiro, Miyashita Hideaki, Mayama Shigeaki, Hashimoto Tetsuo, Maier Uwe G., Archibald John M., Inagaki Yuji	4. 巻 34
2. 論文標題 A Non-photosynthetic Diatom Reveals Early Steps of Reductive Evolution in Plastids	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 2355 ~ 2366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/molbev/msx172	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 Tanifuji Goro, Onodera Naoko T.	4. 巻 84
2. 論文標題 Cryptomonads: A Model Organism Sheds Light on the Evolutionary History of Genome Reorganization in Secondary Endosymbioses	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Secondary Endosymbioses	6. 最初と最後の頁 263 ~ 320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.abr.2017.06.005	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8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Tanifuji Goro, Akinori Yabuki, Ito Motoo, Motono Yuki, Nomaki Hidetaka, Ishitani Yoshiyuki, Kamikawa Ryoma, Kashiya Yuichiro
2. 発表標題 Non-photosynthetic Cryptomonas has carbon fixation machinery?
3. 学会等名 VIII European Congress of Protistology - ISOP Joint meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakayama Takuro, Takano Yoshihito, Nomura Mami, Shiba Kogiku, Inaba Kazuo, Tanifuji Goro, Inagaki Yuji, Kawata Masakado
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 European Congress of Protistology - ISOP Joint meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名	Kamikawa Ryoma, Nakayama Takuro, Moog Daniel, Fujiwara Takayuki, Onuma Ryo, Miyagishima Shin-Ya, Kume Keitaro, Cenci Ugo, Henrissat Bernard, Oyama Kaori, Kato Misako, Miyashita Hideaki, Tanifuji Goro, Tanizawa Yasuhiro, Mochizuki Takako, Sakamoto Mika, Nakamura Yasukazu
2 . 発表標題	Intracellular evolution through loss of photosynthesis and adaptation to a heterotrophic lifestyle revealed by the complete genome analysis of a non-photosynthetic diatom.
3 . 学会等名	The 14th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis. ( 国際学会 )
4 . 発表年	2019年

1 . 発表者名	Nakayama Takuro, Takano Yoshihito, Nomura Mami, Shiba Kogiku, Inaba Kazuo, Tanifuji Goro, Inagaki Yuji, Kawata Masakado
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	The 6th CWRU-TOHOKU Joint Symposium on Data Science in Life Science and Engineering.
4 . 発表年	2019年

1 . 発表者名	Tanifuji, G., R. Kamikawa, C. E. Moore, T. Mills, N. T. Onodera, J. M. Archibald, Y. Inagaki and T. Hashimoto.
2 . 発表標題	Comparative genomics of photosynthetic and non-photosynthetic <i>Cryptomonas</i> (Cryptophyta) species.
3 . 学会等名	International Society for evolutionary protistology ( 国際学会 )
4 . 発表年	2018年

1 . 発表者名	谷藤吾朗
2 . 発表標題	The smoking gun -共生体痕跡核の示すもの-
3 . 学会等名	第1回日本共生物学会・第50回日本原生生物学会合同大会 ( 招待講演 )
4 . 発表年	2017年

1. 発表者名 谷藤吾朗
2. 発表標題 Web of life, 真核-真核の細胞内共生がもたらした生物多様性
3. 学会等名 第19回日本進化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷藤吾朗
2. 発表標題 ヌクレオモルフ研究10年の進歩 -わかったこと, わからないこと, そして今後-
3. 学会等名 日本藻類学会第41回大会 (招待講演)
4. 発表年 2017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
研究分担者	柏山 祐一郎 (Yuichiro Kashiya) (00611782)	福井工業大学・環境情報学部・教授  (33401)	
研究分担者	神川 龍馬 (Ryoma Kamikawa) (40627634)	京都大学・農学研究科・准教授  (14301)	
研究分担者	稲垣 祐司 (Yuji Inagaki) (50387958)	筑波大学・計算科学研究センター・教授  (12102)	

#### 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			
カナダ	Dalhousie University			
ドイツ	Philipps University of Marburg			
フランス	Universite de Lille			
カナダ	Dalhousie University			
フランス	Station Biologique de Roscoff			
ニュージーランド	Natl. Inst. of Water and Atmospheric Res			
中国	Institute of Hydrobiology			
ドイツ	Philipps-Universitat Marburg			