

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15168

研究課題名(和文) Nusuttodinium属渦鞭毛藻における共生藻との親密化機構の解明

研究課題名(英文) Study on mechanisms of endosymbiont restriction in the kleptoplastic dinoflagellate Nusuttodinium

研究代表者

大沼 亮 (Onuma, Ryo)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・特別研究員(PD)

研究者番号：80756825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000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で維持する盗葉緑体現象を示す。本研究課題では、異なる共生藻を与えたときの宿主と共生藻の形態と代謝の変化を比較した。HrL01株を与えた場合、共生藻は窒素欠乏状態に類似したトランスクリプトームを示した対し、Dc01株を与えた場合、窒素飢餓を特徴づける変化が見られなかった。このことから、宿主は共生相手を選んで栄養塩を供給している可能性があること示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

葉緑体獲得の進化における研究は、既に恒久的な絶対共生を確立した真核藻類と植物を対象として行われてきた。葉緑体獲得に至る途中の段階であると考えられる盗葉緑体生物においては、盗葉緑体のオルガネラ化と共生藻との親密化を関連付けた研究例がほとんどない。本研究は、共生藻の選好性を比較研究する実験基盤を構築し、栄養供給システムの違いが共生藻との親密化に関連している可能性を示したことで、藻類全体における共生確立の進化に対する理解を深めることができると期待される。

研究成果の概要(英文)：Dinoflagellate *Nusuttodinium aeruginosum* possesses kleptoplast stolen from cryptomonad. In this study, differences in the morphology and metabolism of the host and endosymbiont were compared between different cryptomonad prey as a source of kleptoplast. Transcriptomic change of cryptomonad HrL01 endosymbiont resembled to changes observed under nitrogen-depleted condition, while such transcriptomic change was not detected in cryptomonad Dc01 endosymbiont. Therefore, this study suggested that the host might select its endosymbiont to which the host supplies nutrients.

研究分野：進化原生生物学

キーワード：盗葉緑体 細胞内共生 渦鞭毛藻 クリプト藻

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現存の光合成生物がもつ葉緑体は、他の光合成生物を‘取り込んで’自身の細胞に統合することに成功した細胞内共生の賜物である。葉緑体の獲得は真核生物の様々な系統で独立に複数回起こっており、非光合成生物を植物化・藻類化する進化の強力な原動力である[1]。しかし、もはや光合成生物から葉緑体を切り離して生かすことは不可能であるため、葉緑体が成立する細胞内共生の過程の研究はできない。従って、葉緑体の起源となった生物が取り込まれてからオルガネラ化する過程は、葉緑体を獲得した生物群のどの系統でも明らかとなっていない。

盗葉緑体現象とは、葉緑体をもたない生物が他の光合成生物を取り込み、光合成をさせながら一定期間細胞内で維持し、やがて消化する現象を指す[2]。この現象は他の生物を捕食してすぐに消化してしまう段階から一歩進んで、他の藻類の葉緑体を何とか我が物にしようとしている段階であると考えられており、細胞内共生確立の過程の解明に貢献し得る現象である。

研究代表者はクリプト藻を特異的に取り込んで盗葉緑体とする渦鞭毛藻類 *Nusuttodinium* spp. を対象とし、淡水産種 *N. aeruginosum* では、盗葉緑体の拡大、クリプト藻核の維持、宿主細胞との同調分裂が起こることを明らかにした。これらは海産の種では見られない現象である。*Nusuttodinium* 属は近縁種間で捕食に近い段階からオルガネラ化が進んでいる段階まで多様な現象を観察できるため、細胞内共生確立の研究における格好のモデルである。

細胞内共生は宿主1種に対して共生藻1種の関係で成立している。一方、その前段階と考えられるオルガネラ化が進んだ盗葉緑体性生物では、盗葉緑体として保持できる共生藻を特定の属や種にまで限定 (= 親密化) している[3, 4]。このことから、葉緑体獲得の進化には、「オルガネラ化を進めながら共生藻を限定していくこと」が渦鞭毛藻以外の系統の共生でも必要であると考えられる。*Nusuttodinium* 属にも属内でクリプト藻との親密化が見られる。海産種ではどのクリプト藻でも取り込む一方 [5, 6]、*N. aeruginosum* では *Chroomonas* 属のクリプト藻を特異的に取り込む[7]。研究代表者の予備実験では、*N. aeruginosum* に与えるクリプト藻を同属他種に変更した場合、クリプト藻の取り込みは見られるが、葉緑体が十分に拡大できないことがわかっている。また、日本の池数カ所所で採集した *N. aeruginosum* の葉緑体の系統を調べると、取り込んだクリプト藻はある特定の数種に集中しており、他の種は取り込まれていないことがわかった。これらのことから、*N. aeruginosum* は共生相手を種レベルにまで限定していると示唆されている。しかしながら、盗葉緑体のオルガネラ化と共生藻との親密化を関連付けた研究例がないため、オルガネラのように使える共生藻と使えない共生藻の間では何が異なり、その差異がどのように共生藻維持に関連するのかが不明である。

2. 研究の目的

Nusuttodinium aeruginosum には取り込んでオルガネラのように使えるクリプト藻と、取り込むが何らかの理由で共生関係が破綻するクリプト藻があり、共生藻との親密化を進めている段階にある生物である。本研究は、本種において異なるクリプト藻を与えたときの差異を比較することで、共生藻のオルガネラ化と共生藻との親密化を進行させる候補を特定することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では渦鞭毛藻 *N. aeruginosum* とクリプト藻2種 (Dc01 株及び HrL01 株) を用いて、クリプト藻の種による盗葉緑体の形態、及び渦鞭毛藻とクリプト藻の代謝の違いを比較した。

(1) HrL01 株を与えた場合の形態観察

渦鞭毛藻はクリプト藻を除いて培養すると葉緑体を失い、無色化する。無色化させた渦鞭毛藻に

HrL01 株を与え *Chroomonas* sp. HrL01 株を与えてからの経過時間ごとに光学、及び透過型電子顕微鏡観察を行った。また、異なるクリプト藻を与えたときの二員培養中の盗葉緑体の状態の光学顕微鏡観察を行った。

(2) 異なるクリプト藻株を与えたときの渦鞭毛藻及びクリプト藻のトランスクリプトームの変動解析

渦鞭毛藻に *Chroomonas* sp. Dc01 株と *Chroomonas* HrL01 株をそれぞれ与えた二員培養株を作成した。一定時間、20、連続明期条件で培養した後、フィルターで渦鞭毛藻とクリプト藻を分別し、それぞれから RNA 抽出・次世代シーケンサーによる配列取得を行った。その後、渦鞭毛藻、及びクリプト藻 2 種のアセンブリを行い、異なるクリプト藻供与時の渦鞭毛藻トランスクリプトームの比較、及び渦鞭毛藻内のクリプト藻のトランスクリプトームの比較（ホモログの比較）を行った。

4. 研究成果

(1) *Chroomonas* sp. HrL01 株を与えた場合の盗葉緑体の形態観察

【光学顕微鏡観察】取り込み直後の *Chroomonas* sp. HrL01 の葉緑体は渦鞭毛藻細胞後方に位置し、その後 1 日後までにやや拡大されることが明らかとなった。しかしながら、Dc01 株供与時とは異なり、渦鞭毛藻細胞全体にわたる顕著な葉緑体の拡大は観察されなかった。Dc01 株供与時の渦鞭毛藻は葉緑体が細胞全体に拡大されてから細胞分裂するが、HrL01 株では葉緑体が未拡大でも細胞分裂することが明らかとなった。

【透過型電子顕微鏡観察】*Chroomonas* sp. HrL01 を取り込んだ渦鞭毛藻細胞には、Dc01 株供与時と同様に、*Chroomonas* sp. HrL01 の葉緑体に加えて、細胞質、核、ミトコンドリアが観察された。その後、これらのオルガネラは少なくとも 48 時間後まで維持されることが示された。取り込み直後のチラコイドは互いに密であるが、取り込まれてから 48 時間後にはチラコイド膜の間隔が広がることが明らかとなった。48 時間後のクリプト藻細胞質には、取り込まれる前よりもミトコンドリアが密になることがわかったが、各オルガネラの体積変化を定量的に示すには、詳細な解析が必要である。

【二員培養株の観察】HrL01 株と二員培養した渦鞭毛藻の細胞中には、ほぼ全てに葉緑体を消化したと思われる赤い顆粒が観察された。このような顆粒は Dc01 株を与えた細胞には観察されないことから、HrL01 株を与えた渦鞭毛藻細胞中では、クリプト藻の消化が常に起こっていると考えられる。また、Dc01 株との二員培養株は常に安定的であるが、HrL01 株との培養株はクリプト藻交換後約 20 日でクリプト藻の取り込み率の低下が起こり、それ以上の継代培養ができなくなることが明らかとなった。

(2) 異なるクリプト藻株を与えたときの渦鞭毛藻及びクリプト藻のトランスクリプトームの変動解析

【渦鞭毛藻のトランスクリプトームの変動】RNA-seq データをアセンブリして構築した渦鞭毛藻リファレンス (82,866 コンティグ) に対してマッピング、発現変動遺伝子解析を行ったところ、883 コンティグが有意に発現変動することがわかった。すなわち、これらの 883 コンティグが異なるクリプト藻を与えたときに発現変動する遺伝子群である。これらの遺伝子群の機能推定を行ったが、機能が推定できなかったものが多く、発現変動遺伝子群が特定の代謝系に集中するというものもなかった。さらに、他の生物で既知の遺伝子と相同な配列が本渦鞭毛藻にも見いださ

れたが、これらは異なるクリプト藻を与えた条件間の比較では発現変動しないことがわかった。渦鞭毛藻の先行研究では、周囲の環境変動によって転写物量が変化しない、または転写物量の変化の大きさが非常に小さいことが示されており、本種の渦鞭毛藻でも、細胞の状態が転写物の変動に必ずしも反映されるものではないと考えられる。

【渦鞭毛藻内のクリプト藻のトランスクリプトームの変動】渦鞭毛藻に取り込まれた *Chroomonas* sp. Dc01 株と *Chroomonas* sp. HrL01 株のホモログにおいて、取り込まれる前と取り込まれた後の発現の変化を比較したところ、Dc01 株では窒素源の取り込みに関する遺伝子群の発現が取り込まれる前と取り込まれた後で変化しないのに対し、HrL01 株ではそれらの遺伝子群の発現が有意に上昇することがわかった。このことから、渦鞭毛藻に取り込まれた *Chroomonas* sp. HrL01 は窒素飢餓状態に陥っている可能性があることがわかった。

< 引用文献 >

1. Keeling (2011) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**:783-788.
2. Schnepf & Elbrächter (1992) *Eur J Protistol* **28**: 3-24.
3. Yamaguchi *et al.* (2014) *J Plant Res* **127**: 241-247.
4. Nishitani *et al.* (2010) *Appl Environ Microbiol* **76**: 2791-2798.
5. Horiguchi & Pienaar (1992) *Jpn J Phycol* **40**: 353-363.
6. Larsen (1988) *Phycologia* **27**: 366-377.
7. Schnepf *et al.* (1989) *Pl Syst Evol* **164**: 75-91.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 Ryo Onuma, Shunsuke Hirooka, Yu Kanesaki, Takayuki Fujiwara, Hirofumi Yoshikawa, Shin-ya Miyagishima | 4. 巻 - |
| 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 The ISME Journal | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/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 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

| |
|---------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 大沼亮、廣岡俊亮、藤原崇之、兼崎友、吉川博文、宮城島進也 |
| 2. 発表標題 渦鞭毛藻類Nusuttodiniumの盗葉緑体現象から紐解く細胞内共生の進化 |
| 3. 学会等名 日本藻類学会第43回京都大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 大沼亮、廣岡俊亮、兼崎友、吉川博文、宮城島進也 |
| 2. 発表標題 渦鞭毛藻Nusuttodinium aeruginosumの盗葉緑体現象における宿主と共生藻の発現遺伝子変動解析 |
| 3. 学会等名 日本藻類学会第42回仙台大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------------------|
| 1. 発表者名 大沼亮 |
| 2. 発表標題 盗葉緑体性渦鞭毛藻ヌスットディニウムから紐解く細胞内共生の進化 |
| 3. 学会等名 原生物・寄生虫・進学セミナー（招待講演） |
| 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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|