

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03282

研究課題名(和文) 1+1=1、2つの生物がどのように1つの生物になったかをゲノムで読み解く

研究課題名(英文) 1+1=1: deciphering how two different organisms became one by comparative genomics

研究代表者

石田 健一郎 (Ishida, Ken-ichiro)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：30282198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,280,000円

研究成果の概要(和文)：二次共生によってクロララクニオン藻が葉緑体を獲得した際の細胞進化を知るため、宿主要素に最も近縁なケルコゾア2種、葉緑体要素に近縁なアオサ藻1種の全ゲノムを解読し、クロララクニオン藻との比較ゲノム解析を行った。その結果、クロララクニオン藻の葉緑体獲得以前に宿主要素の祖先において遺伝子ファミリーの大規模増加があり、葉緑体獲得につながる細胞進化が既に起きていたことが示唆された。また、クロララクニオン藻ゲノムを構成する遺伝子のうち少なくとも約8%は二次共生の祖先以外の生物由来であることが確認されたほか、葉緑体で機能するタンパク質遺伝子の一部は宿主要素由来であることも確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、二次共生の際の細胞進化を、個々の遺伝子ベースにこれまででない精度で、解析することができた。これは二次共生による葉緑体獲得を理解する上で非常に大きな進展をもたらすものである。また、ゲノムデータの少ないケルコゾアとアオサ藻についてそれぞれ2種と1種の全ゲノム解読に成功したことは、クロララクニオン藻の進化だけでなく、真核生物の様々な研究の進展において有意義な貢献となった。

研究成果の概要(英文)：To understand the cellular evolution in the process of chloroplast acquisition by secondary endosymbiosis in chlorarachniophytes, we sequenced the complete genomes of two species of cercozoan that are the most closely related to the chlorarachniophyte's host compartment and one species of ulvophyte green alga that is closely related to the chloroplasts, and performed comparative genome analysis with chlorarachniophyte genome. The results suggest that there was a large-scale increase in gene families in the ancestor of the host compartment before the chloroplast acquisition by the chlorarachniophytes, which indicates that the cellular evolution allowing the chloroplast acquisition had already occurred in ancestral lineage. In addition, about 8% of genes in the chlorarachniophyte genome were found to be derived from organisms other than the host and endosymbiont of the secondary endosymbiosis, and some of the chloroplast protein genes were also found to be derived from the host.

研究分野：系統分類学、細胞進化学

キーワード：二次共生 細胞進化 葉緑体 クロララクニオン藻 ケルコゾア アオサ藻 ゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

葉緑体が一次共生により獲得され、二次共生により多様な生物群に伝播し多様化したことはよく知られている。しかし、2つの祖先生物(宿主と共生者)がどのような変化を伴って1つの光合成生物になったのかは、未だよく解っていない。これを知るためには2つの祖先生物の細胞と葉緑体獲得後の細胞を比較する必要があるが、多くの藻類群で起源となった祖先生物は、大まかな分類群としては推定できているもののさらに精度の良い特定には至っていない。しかし近年、緑藻とケルコゾアの二次共生によって誕生したクロララクニオン藻で、葉緑体の祖先は緑藻植物アオサ藻綱のハネモ目に近縁であることが示された(Jackson et al. 2018)。また、宿主側の祖先生物については、申請者らの先行研究において、ミノリサ(*Minorisa minuta*)を含むクレード(クレード1)がクロララクニオン藻に最も近縁な葉緑体獲得前に分岐したケルコゾアであり、その次に近縁なものが *Rabdamoeba marina* を含むクレード(クレード2)であることを見出している(図1)。つまり、クロララクニオン藻では起源となった祖先生物に近縁な現生の生物群の特定が、他の藻類群よりも宿主と共生藻(葉緑体)の両方でかなりの精度の高さで特定できているといえる。従って、二次共生による葉緑体の獲得に伴って宿主と共生藻の双方でどのような変化が起こり1つの光合成生物が誕生したのかをより具体的に示す上で、クロララクニオン藻は現時点で最も適した生物群である。クロララクニオン藻では、2012年にビゲロウィエラ(*Bigelowiella natans*)の全ゲノムが公開されている。一方、葉緑体の祖先に近縁なアオサ藻綱ハネモ目でゲノム配列が公開されているものはない。また、宿主の祖先に近縁なミノリサやその周辺の系統を含めて無色のケルコゾアで全ゲノム配列が公開されているものはない。

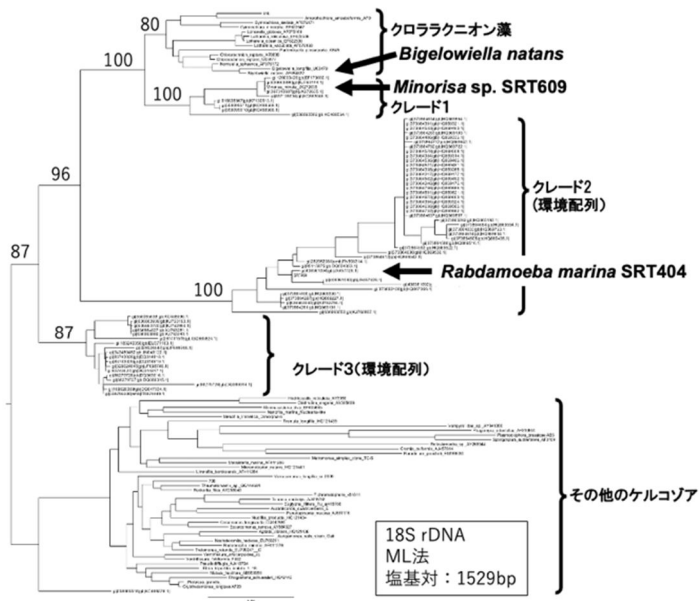


図1:ケルコゾアの系統樹。クロララクニオン藻に近縁な無色ケルコゾア *Minorisa* sp. SRT609と *Rabdamoeba marina* SRT404の系統的位位置を示す。

## 2. 研究の目的

細胞内共生による葉緑体の獲得において2つの生物がどのように統合されて1つの光合成生物になったのか、を知るためのアプローチの一つとして、本研究では、宿主と共生藻がもつ代謝系や細胞周期、細胞運動、光応答、タンパク質輸送などに関わる遺伝子群が、二次共生を経てどのように再構成されたのか、それぞれの遺伝子の由来は何か、共生による遺伝子転移(Endosymbiotic Gene Transfer; EGT)の貢献はどの程度なのか、

を調査することにより、葉緑体獲得に伴う細胞進化をより具体的に理解したい。従って、本研究では、クロララクニオン藻の葉緑体要素と宿主要素それぞれの祖先に最も近縁な生物群の全ゲノムを解読し、既にゲノム配列が公開されているクロララクニオン藻のゲノム配列と比較し、二次共生による葉緑体獲得に伴うクロララクニオン藻細胞への細胞進化を具体的に理解することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 材料: 本研究で新たにゲノム解読を行った生物は、宿主要素として、クロララクニオン藻に最も近縁な無色ケルコゾア系統“クレード1”に属し細菌食の *Minorisa* sp. SRT609 株、そのすぐ外側に位置する“クレード2”に属し真核生物食の *Rhabdamoeba marina* SRT404 株の2つ、葉緑体要素として、アオサ藻アオサ目系統に属する分子糸状緑藻の一種 BFA203 株(おそらく新種)の1株、合計3株である(図2)。いずれも先行研究において我々が独自に確立した培養株である。当初は、葉緑体要素として *Ostreobium queketti* のゲノム解読も予定していたが、研究期間中に海外のグループがゲノム配列を公開したため(Iha et al. 2021)、解析にはその配列を用いることとした。

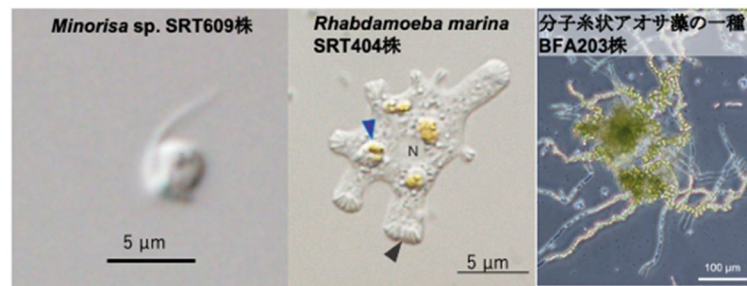


図2: 本研究でゲノム配列を解読した生物

(2) ゲノム解読: *Minorisa* sp. SRT609 株の細胞は小さく、ゲノム解読において餌バクテリアを事前に除くことが困難であるということが判明した。そのため、すでにゲノム配列がわかっているバクテリア *Alteromonas macleodii* (NBRC 102226) との二員培養を確立し、ゲノム解読に供した。また、*Rhabdamoeba marina* SRT404 株についても、真核餌生物との二員培養確立と餌生物のゲノム解読を行った上で、ゲノム解読を進めた。ゲノム解読において、*Minorisa* sp. SRT609 株は Illumina PE + PacBio、*Rhabdamoeba marina* SRT404 株は Illumina PE + MP のそれぞれ組み合わせで配列を取得し、比較ゲノム解析に供した。アオサ藻の一種 BFA203 株は MinION Nanopore sequencing で配列を取得し、簡易的なアセンブリまでを完了した。

(3) 比較ゲノム解析: 本研究で新たに取得した3種のゲノム配列のうち宿主要素ケルコゾア2種(*Minorisa* sp. SRT609 株と *Rhabdamoeba marina* SRT404 株)と、既にゲノム配列が公開されている2種(葉緑体要素アオサ藻1種 *Ostreobium queketti*、クロララクニオン藻1種 *Bigelowiella natans*)の合計4種のゲノム配列について、比較ゲノム解析を実施した。また、クロララクニオン藻ゲノムを構成する各遺伝子の由来を、新たに取得したゲノム配列も含めた分子系統解析により、調査した。

### 4. 研究成果

(1) 本研究で解読したゲノム配列: *Minorisa* sp. SRT609 株: 29 Mbp のアセンブリが得られ(180 スキャフォールド、N50: 308 kbp)、12,889 タンパク質コード遺伝子の存在が予測され

た。アセンブリの完全性を BUSCO 解析によって評価したところ 80.4%であり、比較解析に使用可能な品質であることが示された。このゲノムはミノリサが属するリザリア内で、寄生性の *Plasmodiophora* (24 Mbp) に次いで小さく、本種がシンプルな体制をもつピコプランクトンであることを反映していると思われる。

*Rhabdamoeba marina* SRT404 株：アセンブリは 96 Mbp であり (26,405 スキャフォールド、N50: 5 kbp) 37,505 タンパク質コード遺伝子の存在が予測された。アセンブリの完全性を BUSCO 解析によって評価したところ 70.2%であり、比較解析に使用可能な品質であることが示された。両種ともに主要な光合成関連遺伝子は見られず、透過型電子顕微鏡による精査においても細胞内に葉緑体の痕跡を示す構造は見られないことから、これらの生物は葉緑体を獲得したことはなく、クロララクニオン藻の葉緑体の獲得はこれらの生物の分岐後に起こったことが強く示唆された。

アオサ藻アオサ目系統に属する分子糸状緑藻の一種 BFA203 株：63 Mbp のアセンブリが得られ (643 コンティグ、N50: 314 kbp) 10,849 タンパク質コード遺伝子の存在が予測された。アセンブリの完全性を BUSCO 解析によって評価したところ 75.6%であり、比較解析に使用可能な品質であることが示された。ゲノム配列を得られたのが最近であるため、まだ比較ゲノム解析に加えていないが、今後このゲノムも含めた比較ゲノム解析も実施する予定である。

本研究により、ゲノム解読が進んでいないケルコゾアとアオサ藻でそれぞれ 2 種と 1 種のゲノム配列を解読したことは、生物学の発展に重要な貢献になると考えている。

(2) 比較ゲノム解析：リザリアにおける遺伝子ファミリーの進化を明らかにするために、本研究で解読したケルコゾア 2 種 (*R. marina*, *Minorisa* sp.) のゲノム配列とクロララクニオン藻 (*Bigelowiella natans*) のゲノムに加えて、三つのリザリアの既知ゲノム配列 (*Paulinella micropora*, *Plasmodiophora brassicae*, *Reticulomyxa filosa*) を用いて、それらの系統樹にお

ける各クレードの共通祖先で保存された遺伝子ファミリーを予測した。その結果、ケルコゾアの中でも *P. micropora* が分岐後、*R. maria*、*Minorisa* sp. *B. natans* の共通祖先において大きな遺伝子ファミリーの増加が起こったことが分かった (図 3)。特にファゴサイトーシスに関連する遺伝子ファミリーに顕著な

増加が見られた。このことは、葉緑体を獲得する以前に、これら 3 種の共通祖先において既に発達したファゴサイトーシスを獲得しており、細胞内共生の成立に貢献したと考えられる。さらに、*B. natans* では、*R. marina* や *Minorisa* sp. と比較して、アミノ酸合成系などの一部の代謝経路の遺伝子が重複していることが分かった。このことは、*B. natans* が宿主と共生者のそれぞれに由来する重複した機能をもつ遺伝子を未だ維持していることを意味する。この状態は共生者由来のゲノムが宿主ゲノムと統合されていく過程であると思われる。

また、それぞれの遺伝子の進化的な起源を明らかにするために、*B. natans* の核ゲノムにコードされる遺伝子を用いてオルソログ解析を行った。得られた 9,889 オルソロググループのうち、4,367 オルソロググループについて、系統解析を行った。その結果、*B. natans* の全オルソログ

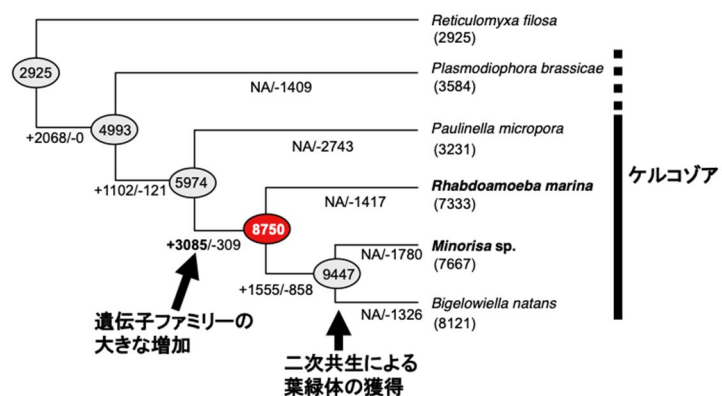


図3:ケルコゾアにおける遺伝子ファミリーの進化。  
葉緑体獲得以前に宿主要素側で葉緑体の獲得と維持のために必要な進化が起きていた可能性を示唆。

グループの 75%に当たる 7,374 オルソロググループは、宿主系統である SAR に由来することが分かった。一方、明確に共生者である緑色植物に由来するものは 449 オルソロググループであり、全オルソロググループの 4.5%のみであった(図 4)。また、*B. natans* のタンパク質の予測細胞内局在をもとに、遺伝子の由来を分類すると、興味深いことに、進化的に共生者に由来するオルガネラである色素体やヌクレオモルフに輸送される

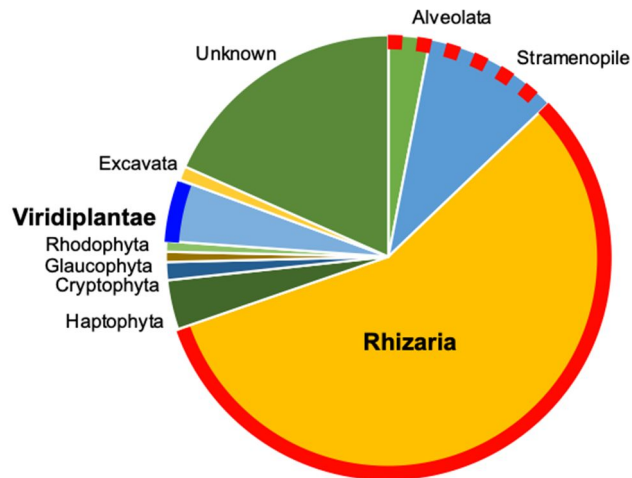


図4:クロララクニオン藻 *B. natans* ゲノムの遺伝子の由来。約75%が宿主由来(赤い太線)、約4.5%が色素体の祖先(緑色植物)由来(青い太線)、約8%がその他の真核生物由来であることを示す。

タンパク質コード遺伝子もその多くが宿主由来であった。しかしながら、光合成の光化学系等のコア機能に関する遺伝子は緑色植物に由来していた。このことは細胞内共生成立前に、遺伝子の水平伝播などによって、予め色素体の維持に必要な遺伝子の一部を獲得していたことを意味する。

今後、葉緑体要素の祖先に近縁だと考えられるアオサ藻のゲノム配列 (*Ostreobium queketti* とアオサ藻に属する分子系状緑藻の一種 BFA203 株) についても同様の比較ゲノム解析を実施し、クロララクニオン藻ゲノムへの共生者の貢献やゲノム進化についても明らかにし、葉緑体獲得に伴うクロララクニオン藻の細胞進化の全貌解明に迫るとともに、英文原著論文として学術誌に投稿する予定である。

本研究は、コロナ禍の影響により期間内に終了できなかった部分はあったが、3種の新たなゲノム解読に成功し、それによりクロララクニオン藻の宿主要素の二次共生に至る進化について、新知見を提供するものである。

#### <引用文献>

- Jackson, C., Knoll, A.H., Chan, C.X. *et al.* Plastid phylogenomics with broad taxon sampling further elucidates the distinct evolutionary origins and timing of secondary green plastids. *Scientific Reports* 8, 1523 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18805-w>
- Iha *et al.* Genomic adaptations to an endolithic lifestyle in the coral-associated alga *Ostreobium*. *Current Biology* 31(2): 1393-1402 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.018>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木重勝、白鳥峻志、南波紀昭、石田健一郎
2. 発表標題 クロララクニオン藻ゲノムのつくり方
3. 学会等名 日本共生生物学会第5回大会
4. 発表年 2021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	白鳥 峻志  (Shiratori Takashi)  (70800621)	筑波大学・生命環境系・助教   (12102)	

	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	鈴木 重勝  (Suzuki Shigekatsu)		
研究協力者	南波 紀昭  (Namba Noriaki)		

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
---------	---------