

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15853

研究課題名（和文）盗葉緑体性渦鞭毛虫類における無機窒素同化機構とその進化の解明

研究課題名（英文）Mechanism and evolution of inorganic nitrogen assimilation in kleptoplasmic dinoflagellates

研究代表者

大沼 亮 (Onuma, Ryo)

神戸大学・内海域環境教育研究センター・講師

研究者番号：80756825

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：藻類は細胞内共生によって誕生したとされるが、捕食栄養性から細胞内共生を経て藻類化する進化過程には不明な点が多い。本研究は盗葉緑体性渦鞭毛藻類 *Nusuttodinium* spp. を主な対象とし、盗葉緑体の維持機構を解明することを目的とした。捕食に近い盗葉緑体現象を示す *N. poecilochroum* は硝酸同化関連遺伝子群が発現しないのに対し、真の葉緑体に近い現象を示す *N. aeruginosum* ではそれらの遺伝子群が明期で発現上昇することがわかった。*N. aeruginosum* の硝酸還元酵素はクリプト藻からの水平転移によって獲得されたものであり、窒素源に応じて発現が変動することも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一時的に共生体を維持する生物を用いたこれまでの研究では、宿主と共生体の系統解析、宿主への遺伝子の水平転移などに焦点を当てられてきた。対して本研究では、植物・藻類と類似した硝酸同化機構を盗葉緑体性の段階でも進化させうることを示し、細胞内共生の成立には光合成能の維持とその制御だけではなく、無機栄養塩の同化能も重要である可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Algae are known to have evolved via endosymbiosis. However, the evolutionary process of the endosymbiosis is still unclear. The present study focused on kleptoplasmic dinoflagellates *Nusuttodinium* spp. aimed to elucidate the mechanism by which they temporarily maintain the kleptoplast. *N. poecilochroum*, which exhibits a “predator-like” kleptoplasty, does not express nitrate transporter and nitrate reductase genes, whereas these genes are upregulated in *N. aeruginosum*, which exhibits a “advanced” kleptoplasty, in the light phase. Nitrate reductase in *N. aeruginosum* was acquired by horizontal gene transfer from cryptophytes, and its expression is changed depending on the extracellular nitrogen source. Furthermore, the expression of genes related to nitrogen assimilation in *N. aeruginosum* shares some similarities with gene expression patterns found in algae and plants.

研究分野：藻類学

キーワード：渦鞭毛虫 クリプト藻 盗葉緑体 細胞内共生 窒素同化

### 1. 研究開始当初の背景

光合成真核生物がもつ葉緑体は、元々捕食栄養性だった単細胞真核生物が光合成性単細胞生物を「取り込んで」自身の細胞に統合した細胞内共生に由来する。葉緑体の獲得によって、宿主細胞は光合成による無機炭素固定能に加えて、無機窒素源からアミノ酸を合成する機構(窒素同化)を獲得した。窒素同化能は、真核細胞が単細胞藻類を捕食して有機窒素を得る段階から、取り込んだ藻類細胞を一時的に保持する段階(盗葉緑体)を経て、恒久的に維持し葉緑体とした(絶対共生)段階への進化のどこかで成立したと想定されるが、宿主と共生体の共同作業である窒素同化機構がどのように生じ進化したかは不明である。

盗葉緑体現象は、真核生物の様々な系統に散見される現象で、葉緑体をもたない真核細胞が藻類細胞を取り込み、取り込んだ細胞またはその葉緑体を一定期間維持し光合成を行わせ、やがて消化するという「一時的な細胞内共生関係」である。盗葉緑体現象は捕食-被食関係から絶対共生関係に至る進化の中間段階であると解釈され、盗葉緑体現象の研究は細胞内共生の進化過程の理解に大いに貢献すると期待されている。渦鞭毛虫類 *Nusuttodinium* 属は単細胞性藻類クリプト藻を取り込み、その葉緑体を細胞内で一定期間維持する。*Nusuttodinium* 属には、捕食に近い現象から真の葉緑体に近い現象まで、盗葉緑体現象にバリエーションが見られることから、細胞内共生の進化の研究には格好の材料であると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、渦鞭毛虫 *Nusuttodinium aeruginosum* とクリプト藻との一時的な細胞内共生を主な研究対象として、宿主がどのように外界から無機窒素を取り込み、共生藻に送り込んでいるのかを明らかにし、それらに関わる因子を特定することを目的とする。加えて、*N. aeruginosum* で得た結果を、盗葉緑体を拡大しない近縁種と比較することで、窒素同化能の成立・進化過程の解明を試みる。

### 3. 研究の方法

本研究では、以前より研究室で維持している *Nusuttodinium aeruginosum* と *N. poecilochroum* の培養株を用いた。各渦鞭毛藻株には餌生物としてそれぞれクリプト藻 *Chroomonas* sp. Dc01 株と *Chroomonas* sp. Ak01 株を与えて培養した。明暗に応じたトランスクリプトームの変動解析の培養条件として、餌のクリプト藻を取り除いた後、暗期で 24 時間培養したものを基準とし(0 時間)、明期に移して 1 時間後、6 時間後、12 時間後、再度暗期に移して 1 時間後(13 時間)とし、明期と暗期のトランスクリプトームの変動も比較可能な実験系とした。*N. aeruginosum* における異なる窒素源に応じたトランスクリプトームの変動解析の培養条件として、餌のクリプト藻を取り除いた後、硝酸のみ、亜硝酸のみ、アンモニウムのみ、窒素源なしの 4 条件で 5 日間の連続明期培養を行い、トランスクリプトームを比較した。

### 4. 研究成果

- (1) 明暗に応じたトランスクリプトーム解析の結果、捕食に近い盗葉緑体現象を示す *N. poecilochroum* は硝酸輸送体、硝酸還元酵素の遺伝子群が発現しておらず、その他栄養塩の輸送に関わると考えられる遺伝子群(アンモニウム輸送体)は明暗の切り替えで発現が変動しないことが明らかとなった。対して、真の葉緑体に近い現象を示す *N. aeruginosum* では硝酸還元酵素、栄養塩輸送体(硝酸、アンモニウム)の遺伝子群が明期で発現上昇することがわかった(図1)。

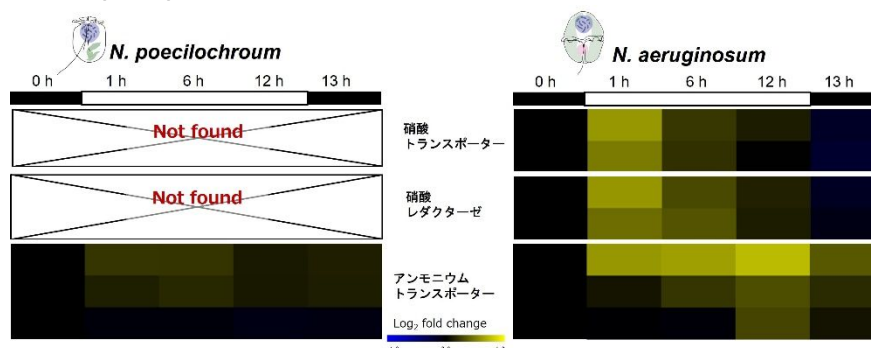
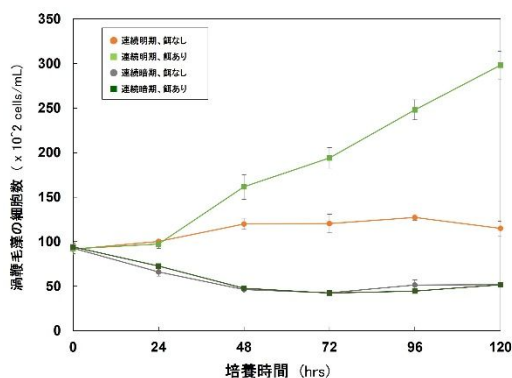


図1. *Nusuttodinium aeruginosum* と *N. poecilochroum* の明暗に応じた窒素同化関連遺伝子の発現変動。暗期 24 時間培養した細胞のトランスクリプトームを基準とし、発現が上がったものを黄色、下がったものを青で示す。

- (2) 培養実験の結果、*N. poecilochroum* はクリプト藻を除いた条件では増殖することができず、明所でクリプト藻添加したときのみ増殖が確認された(図2)。これらのことから、*N. poecilochroum* では盗葉緑体への栄養塩輸送を行っておらず、光合成、および葉緑体での無機栄養塩の同化に依存しているというよりは、捕食によって得られる物質に依存していると考えられる。



▶図2. *Nusuttodinium poecilochroum* の培養実験。明所で餌がある条件のみで増殖が認められる。

- (3) 硝酸還元酵素の系統解析から、渦鞭毛藻が持っている硝酸還元酵素はクリプト藻からの水平転移によって獲得されたものであることが明らかとなった。
- (4) 異なる窒素源に応じたトランスクリプトーム解析の結果、宿主渦鞭毛藻の硝酸同化に関わる遺伝子群(硝酸還元酵素、硝酸輸送体)は硝酸を与えたときに発現上昇し、藻類や植物に共通する発現パターンを示すことがわかった(表1)。*N. aeruginosum* はクリプト藻を除去し、それぞれアンモニウム、亜硝酸、硝酸イオンを唯一の窒素源とした培地で増殖することが可能であるため、これらのイオンを積極的に細胞外から取り込み、共生体に輸送していることが示唆された。特に、硝酸単体でも増殖可能であることから、宿主渦鞭毛藻はクリプト藻から獲得した硝酸還元酵素を使って取り込んだ硝酸を還元して共生体に与えている可能性も示唆された。本種の窒素同化に関連する遺伝子群の発現は、藻類や植物に見られる遺伝子発現パターンと共通しているものもあり、これらの遺伝子群の転写制御は永続的な共生に至る前にも獲得されうることが示唆された。

表1. *Nusuttodinium aeruginosum* の異なる窒素源に応じた窒素同化関連遺伝子の発現変動。NRT、NR、AMT はそれぞれ硝酸輸送体、硝酸還元酵素、アンモニウム輸送体遺伝子である。発現量はRPKMで示す。

Annotation	アンモニウム	亜硝酸	硝酸	窒素なし	FDR
Vacuolar amino acid transporter 7	27.57622	28.93575	20.34844	10.64404	7.87E-36
NRT2.5	23.65323	22.81609	49.90967	51.89857	6.90E-31
NRT2.1	25.32467	25.56508	55.8974	59.23721	5.26E-28
NR	2.907542	2.844936	7.079313	8.839452	3.66E-28
NR2	6.549831	6.669152	13.98776	15.44022	6.71E-15
AMT, putative	76.76959	79.76113	109.858	114.7205	8.61E-10
AMT1	14.61228	17.73772	24.82002	24.37075	2.59E-08

- (5) 宿主のトランスクリプトーム解析の結果から、窒素源を与えていない条件で発現が低下する(窒素源があるときに発現上昇する)アミノ酸輸送体の遺伝子があることが明らかとなった(表1)。このアミノ酸輸送体は、共生体が同化したアミノ酸を、共生体から宿主へ輸送するために働いている可能性があることが示唆された。

## 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 2件）

1. 著者名 大沼亮	4. 巻 32
2. 論文標題 盗葉緑体性渦鞭毛藻類ヌストディニウムから探る細胞内共生の進化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 光合成研究	6. 最初と最後の頁 27-37
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 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 Onuma Ryo, Hirooka Shunsuke, Kanesaki Yu, Fujiwara Takayuki, Yoshikawa Hirofumi, Miyagishima Shin-ya	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 The ISME Journal	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 -

〔学会発表〕 計2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
2. 発表標題 渦鞭毛藻ヌストディニウムの盗葉緑体現象と細胞内共生の進化
3. 学会等名 藻類談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大沼亮
2. 発表標題 葉緑体ドロボウは共生のはじまり？ 盗葉緑体現象から紐解く細胞内共生の進化
3. 学会等名 第21回日本分類学連合公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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