

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2012

課題番号：24870004

研究課題名（和文） 連続二次共生に伴う葉緑体ゲノム進化：緑色渦鞭毛藻類を例として

研究課題名（英文） Plastid genome evolution in serial secondary plastids of a green-colored dinoflagellate

研究代表者

神川 龍馬 (KAMIKAWA RYOMA)

筑波大学・生命環境系・特任助教

研究者番号：40627634

研究成果の概要（和文）：

本研究では、緑色渦鞭毛藻類 *Lepidodinium* 属の葉緑体ゲノム配列を解読し、その進化や起源に迫ることを目的として実験を行った。次世代シーケンス解析により、ほぼ全長に近い葉緑体ゲノム断片を得ることに成功した。大規模葉緑体遺伝子データを用いた系統解析およびゲノム比較解析により、本種の葉緑体は *Pedinomonas* 属緑藻類に由来し、葉緑体獲得後に大規模なゲノム再編が起きたことが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, in order to retrace origin and evolution of plastids in the green colored dinoflagellate *Lepidodinium*, its plastid genome was sequenced. Nearly complete sequence of the plastid genome was obtained by the next generation sequencing analysis. Phylogenetic analysis with a large plastid gene dataset and comparative genomics revealed that the *Lepidodinium* plastids are derived from a green alga closely related to Pedinophyceae and drastic genome rearrangement has been occurred after the plastid acquisition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 24 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
年度			
総計	1,200,000	360,000	1,560,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、生物多様性・分類

キーワード：葉緑体、ゲノム、進化

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物における光合成能の獲得、すなわち葉緑体の獲得は、捕食性真核生物が光合成細菌であるシアノバクテリアを細胞内共生させることで起きた。この現象は一次共生と呼ばれており、一次共生により誕生した光合成

性真核生物から進化した紅藻類・緑藻類/陸上植物・灰色藻類は一次植物と呼ばれている。光合成種の繁栄をより後押ししたのが、さらなる共生現象を介した「真核生物同士の細胞内共生による光合成能獲得」である。捕食性真核生物が一次植物を取り込み細胞内共生させる現象は二次共生と呼ばれ、その結果生

まれた光合成性真核生物を二次植物と呼ぶ。

渦鞭毛藻類は光合成種と非光合成性種が混在するグループであり、水圏栄養塩の消費者としてのみならず、水圏生態系の一次生産者としての主要な役割を果たしている。光合成性渦鞭毛藻類は紅藻類を細胞内共生させた二次植物であることが分かっている。光合成性渦鞭毛藻類の有する葉緑体は、基本的にはクロロフィルaおよびクロロフィルcに加えて、補助色素としてペリディニンを含んでいる。以下、このような色素組成を有する渦鞭毛藻類の葉緑体を“ペリディニン型葉緑体”と記述する。渦鞭毛藻類のほぼすべての系統を網羅した系統解析では、ペリディニン型葉緑体を有する種は系統樹上で広く分布する。このことは、渦鞭毛藻類の共通祖先がすでにペリディニン型葉緑体を有しており、現存する光合成性渦鞭毛藻類に受け継がれたことを意味する。また、非光合成性種はペリディニン型葉緑体を有する種から成るクレード内に散在するため、二次的にペリディニン型葉緑体を失ったと解釈されている。非常に興味深いことに、光合成性渦鞭毛藻類の大部分がペリディニン型葉緑体を有しているのに対し、ペリディニンを含まない葉緑体を有する種が存在する。*Karenia* 属や *Kryptoperidinium* 属などは他の二次植物を細胞内共生させることで葉緑体の交換を行った「三次植物」として知られており、葉緑体の置換は渦鞭毛藻類に特異的にみられる現象である。

光合成性渦鞭毛藻類は、紅藻類由来葉緑体を有する。しかし、渦鞭毛藻類 *Lepidodinium* は他の渦鞭毛藻類と異なり緑色葉緑体を有している。これまで行われた研究で、*Lepidodinium* 属はペリディニン型葉緑体を有する渦鞭毛藻類である *Gymnodinium catenatum* などと近縁であることが判明している。上述したように、ペリディニン型葉緑体は渦鞭毛藻類の共通祖先ですでに有しており、現存する光合成性渦鞭毛藻類に受け継がれたと考えられているため、*Lepidodinium* の有する葉緑体は、さらなる共生現象に伴う葉緑体の置換が起こったためであると考えられてきた。事実、近年行われた *Lepidodinium* 葉緑体ゲノムにコードされる 11 遺伝子の配列決定とそれらを用いた系統解析では、緑藻綱・アオサ藻綱・トレボウクシア藻綱などから構成される“core chlorophyta”に属する緑藻類のいずれかと近縁であるという結果が得られている。つまり、*Lepidodinium* は紅藻類由来葉緑体から緑藻類由来葉緑体への交換（連続二次共生）を行った種であることが明らかとされた。しかし、その解析では、*Lepidodinium* 属渦鞭毛藻類の祖先が core chlorophyta に属するどのような緑藻を細胞内共生体として獲得した

のか、すなわち *Lepidodinium* 葉緑体の詳細な起源は未解明である。さらに、*Lepidodinium* 葉緑体ゲノムは未解読であるため、連続二次共生という真核生物進化における稀有なイベントがどのような葉緑体ゲノム進化を誘発したかは興味深い謎として残されたままである。

## 2. 研究の目的

渦鞭毛藻類 *Lepidodinium* は本来の紅藻類由来葉緑体から緑色葉緑体へと葉緑体交換をした唯一の系統であり、そのような葉緑体交換に伴う葉緑体ゲノム進化は極めて興味深く、さらなる遺伝子喪失によるゲノム縮退や進化速度の上昇などが予想される。そこで本申請研究では緑色葉緑体を有する希少な渦鞭毛藻類 *Lepidodinium* 葉緑体に関して、以下 A と B の 2 つの謎に挑戦する。

A. *Lepidodinium* 緑色葉緑体の全ゲノム配列を解読し、葉緑体ゲノムコード遺伝子を大量に使用した系統解析およびゲノム構造解析を行うことで、*Lepidodinium* 葉緑体の詳細な起源を探る。これまで行われてきた系統解析では、*Lepidodinium* 葉緑体の起源を決定することはできなかったが、これは用いられた葉緑体ゲノムコード遺伝子の配列に進化情報が足りなかったためだと考えられる。そのため、60 以上の葉緑体ゲノムコード遺伝子を用いた系統解析を行うことで、結論を下すに足る頑健な系統樹を得ることが可能であると考えられる。本解析により core chlorophyta の綱レベルで起源を決定できると予想している。

B. 起源生物葉緑体ゲノムとの比較から、連続二次共生後 *Lepidodinium* 葉緑体ゲノムに起こったゲノム進化について解明する。core chlorophyta の葉緑体ゲノムは精力的に解読が進んでいるため、*Lepidodinium* 葉緑体ゲノムの解読が終了した後の比較ゲノムの材料は潤沢である。A で解明した起源生物の葉緑体ゲノムとの比較から、遺伝子の消失や進化速度の上昇、遺伝暗号の変更などを個々の遺伝子についてのみならず、ゲノムワイドな視点から連続二次共生による葉緑体ゲノム進化の過程を検出することが可能である。*Lepidodinium* 葉緑体はその起源が不明瞭であるため、本研究では、*Lepidodinium* の有する緑色葉緑体の全ゲノム解読と系統解析により、*Lepidodinium* 緑色葉緑体の起源とその進化を解明し、起源生物との比較ゲノムにより葉緑体交換後の葉緑体ゲノム進化を明らかにする。

### 3. 研究の方法

渦鞭毛藻類 *Lepidodinium chlorophorum* は国立環境研究所より入手した。DNA 抽出は CTAB 緩衝液を使用して行った。抽出 total DNA は次世代シーケンサー illumina HiSeq を用いたシーケンスに用いられた。シーケンスは Paired-endo 法 (100bp 読み取り) にて Multiplex 解析を行った。得られた塩基配列のアダプタートリミングは、cutadapt ver. 1.1 を用いて行い、アセンブリは Velvet ver. 1.2.08 を用いて行われた。遺伝子の同定は Blast による相同性解析により行った。系統解析は RAxML および PhyloBayes を用いて行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 次世代シーケンサーによる葉緑体ゲノム解析

Illumina HighSeq による DNA シーケンス解析により、10 個のコンティグからなる約 62 kb の葉緑体ゲノム断片を得ることに成功した。ゲノム構造の全体像は不明であるが、本ゲノム断片中には 60 個のタンパク質コード配列が同定された。2 種類のタンパク質コード遺伝子にはグループ II イントロンが挿入されていた。また、同定されたタンパク質コード遺伝子には緑藻類 *Pedinomonas* およびその近縁種において特異的にコードされる遺伝子が含まれていた。

#### (2) 葉緑体ゲノムコード遺伝子による系統解析

葉緑体ゲノム断片中に同定された 60 種の葉緑体ゲノムコードタンパク質遺伝子のうち、アラインメントが容易である 43 種を抽出した。それらのコードするアミノ酸配列 7000 座位以上を用いて大規模データを作成した。RAxML および LG +  $\Gamma$  + F モデルを用いた系統解析により *Lepidodinium* 属葉緑体は *Pedinomonas* の葉緑体と単系統群を形成し、これは非常に高いブートストラップ値およびベイズ事後確率により支持された (図 A)。このことは過去に *Lepidodinium* 属渦鞭毛藻類の祖先が、*Pedinomonas* 属の祖先細胞を細胞内共生させ、葉緑体化させたことを強く示唆している。これは上述したように、特異な遺伝子シンテニーを共有している事実から

も支持される。

非常に興味深いことに *Pedinomonas* 属は淡水性であり、*Lepidodinium* 属は海産である。そのため、これらの生物がどのような環境で共生関係を確立したのか、非常に興味深い。*Pedinomonas* 属が属する *Pedinophyceae* は、淡水生の *Pedinomonadales* と海水性の *Marsupiomonadales* に分けられる。*Lepidodinium* 属の有する緑色葉緑体がどのような環境で獲得されたかをより詳細に解明するためにも、*Marsupiomonadales* に属する種の葉緑体ゲノムの解読が必要である。

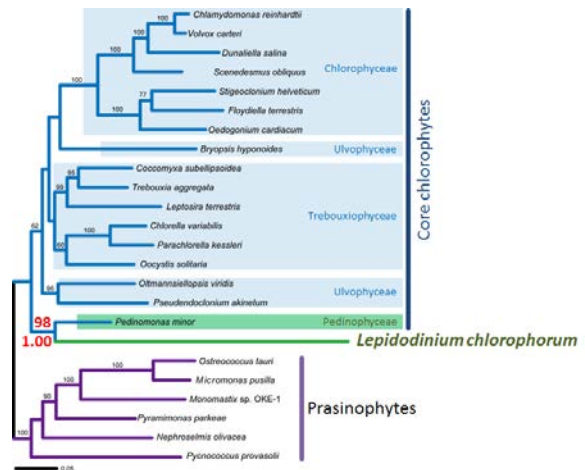


図 A. 葉緑体ゲノムコード遺伝子を用いて作成した緑藻類および緑色渦鞭毛藻類 *Lepidodinium chlorophorum* の最尤系統樹。プラシノ藻類 (紫色) を外群として用いた。

#### (3) 連続二次共生後のゲノム進化

連続二次共生後のゲノム進化を解明するため、*Lepidodinium* 属葉緑体ゲノムとその起源である *Pedinomonas* 属葉緑体と比較した。その結果、様々な生物の葉緑体ゲノムで保存されている遺伝子のシンテニーは *Lepidodinium* 属葉緑体ゲノムにおいて維持されていなかった。たとえば葉緑体 RNA ポリメラーゼ遺伝子である RpoB、RpoC1、RpoC2 は葉緑体ゲノム中でオペロンを形成しているが、*Lepidodinium* 葉緑体ゲノム断片では、それらはそれぞれ別の遺伝子と隣接しており、オペロンとはなっていない。このような遺伝子の並びに関わる保存性の低さは、連続二次共生後に大規模なゲノム再編が起きたことを示している。オペロンが保存されていないことは、転写制御とも関係してくるため、本葉緑体ゲノムの転写システムは通常の緑藻類葉緑体のものと異なる可能性がある。今

後本生物の葉緑体ゲノムの完全長の決定に加え、転写システムについても研究を行う必要がある。

また、*Pedinomonas*の葉緑体ゲノムには、*Lepidodinium*に見られたグループ II イントロンは存在しない。これも同様に共生後に獲得されたものである可能性がある。また、他の *Pedinomonas* 類における葉緑体ゲノム中には存在し *Lepidodinium* 葉緑体に受け継がれた可能性も否定できないため、このような個々の遺伝子における特徴が、*Lepidodinium* 葉緑体の起源をより詳細に同定する分子マーカーとなりうる可能性を示唆している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Kawaichi S, Itoh N, Ryoma Kamikawa, Sugawara T, Yoshida T, Sako Y. *Ardenticatena maritima* gen. nov., sp. nov., a ferric iron- and nitrate-reducing bacterium of the phylum *Chloroflexi* isolated from an iron-rich coastal hydrothermal field, and description of *Ardenticatena* classis nov. Int J Syst Evol Microbiol in press. 査読有

② Nishimura Y, Ryoma Kamikawa, Hashimoto T, Inagaki Y. 2012. Separate origins of group I introns in two mitochondrial genes of the katablepharid *Leucocryptos marina*. PLoS One 7(5): e37307. Doi: 10.1371/journal.pone.0037307. 査読有

③ Ishitani Y, Ryoma Kamikawa, Yabuki A, Inagaki Y, Takishita K. 2012. Evolution of elongation factor-like (EFL) protein in Rhizaria is revised by radiolarian EFL gene sequences. Journal of Eukaryotic Microbiology 59(4): 367-373. Doi: 10.1111/j.1550-7408.2012.00626.x. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

① 神川龍馬, Kolisko M, Andersson JO, Simpson AGB, Roger AJ, 稲垣祐司, 橋本哲男. ミトコンドリア関連オルガネラの縮退進化. 日本ミトコンドリア学会 第 12 回年会 2012/12/20 筑波大学

② 神川龍馬, 西村 祐貴, 矢吹 彬憲, Kolisko M, Simpson AGB, Roger AJ, 石田 健

一郎, 橋本 哲男, 稲垣 祐司. 新奇単細胞真核生物 *Tsukubamonas globosa* の系統的位置とミトコンドリアゲノム. 第 35 回日本分子生物学会 2012/12/12 福岡マリンメッセ

③ 神川龍馬, 西村 祐貴, 左子 芳彦, 橋本哲男, 稲垣 祐司. 真核生物における翻訳伸長因子 EF-1alpha と EFL を両有するゲノムの分布 第 35 回日本分子生物学会年会 2012/12/12 福岡マリンメッセ

④ 神川龍馬, Kolisko M, Andersson J, Simpson AGB, Roger AJ, 稲垣 祐司, 橋本哲男. 嫌気環境に適応したフォルニカータ生物群におけるミトコンドリア関連オルガネラのトランスクリプトーム比較解析 第 35 回日本分子生物学会 2012/12/12 福岡マリンメッセ

⑤ 神川龍馬. 断捨離: ミトコンドリアにおける機能縮退進化 第 1 回日本細胞共生学会若手の会 (JSPYS) 2012/11/09 筑波大学下田臨海実験センター

⑥ 神川龍馬, Kolisko M, Andersson JO, Simpson AGB, Roger AJ, 稲垣祐司, 橋本哲男. フォルニカータ生物群におけるミトコンドリア関連オルガネラの縮退進化 — ハイドロジェノソームからマイトソームへ 第 7 2 回寄生虫学会東日本支部会/第 1 0 回分子寄生虫マラリアフォーラム 2012/10/11 群馬大学

⑦ Ryoma Kamikawa, Yabuki A, Hashimoto T, Nishimura Y, Inagaki Y. Searching for missing pieces in natural environments: With the emphasis on the importance of culture strains of enigmatic eukaryotes for global eukaryotic phylogeny. JSME2012 2012/09/19-22 Toyohashi, Japan.

⑧ 神川龍馬. Mitochondrial evolution: from genomes to metabolisms 筑波大学遺伝子実験センター 形質転換植物デザイン研究拠点研究セミナー 2012/09/10 筑波大学遺伝子実験センター

⑨ Ryoma Kamikawa, Nishimura Y, Yabuki A, Kolisko M, Simpson AGB, Roger AJ, Ishida K, Hashimoto T, Inagaki Y. The phylogenetic position and mitochondrial genome sequence of the enigmatic discobid *Tsukubamonas globosa*. Protist2012 2012/07/29-2012/08/03 University of Oslo, Norway

⑩神川龍馬, 吉田昌樹, 平美砂歌, 石田健一郎, 橋本哲男, 稲垣祐司. 光合成能進化研究のモデルとしての無色珪藻類 *Nitzschia* spp. 第 36 回 日本藻類学会 2012/07/13-2012/07/15 北海道大学

〔図書〕(計1件)

Shiraishi T, **Ryoma Kamikawa**, Sako Y, Imai I. 2012. Monitoring harmful microalgae by using a molecular biological technique. Food Quality, Chapter 2, 15-28.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

神川龍馬 (KAMIKAWA RYOMA)

筑波大学・生命環境系・特任助教

研究者番号: 40627634