

## 葉緑体を置換すると光合成関連遺伝子群には何が起こるか？

川久保 卓志 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 稲垣 祐司 (筑波大学 生命環境系)

## 研究の背景

光合成性渦鞭毛藻の大多数は細胞内共生した紅藻を起源とする 2 次葉緑体を持つが、ハプト藻や緑藻由来の「非典型的」葉緑体を持つ系統が知られている。非典型的葉緑体をもつ系統では、細胞内共生させたハプト藻/緑藻を葉緑体化し、元々持っていた祖先的葉緑体と置き換えたと考えられる。当該研究室では、葉緑体置換を行った渦鞭毛藻を対象とし、(i) 細胞内共生藻が葉緑体化する際の核・葉緑体ゲノムとそこにコードされていた遺伝子群にどのような変化が起こったのか、(ii) 宿主 (渦鞭毛藻) ゲノムは紅藻由来葉緑体用の遺伝子群をコードしていたはずだが、その遺伝子群は葉緑体置換によりどのような影響を受けたのか、などを研究してきた [文献 1]。葉緑体置換を行った渦鞭毛藻系統において、渦鞭毛藻核ゲノムにコードされる葉緑体の機能および維持に用いられる遺伝子には、祖先型葉緑体で使用されていた「垂直伝播型」、葉緑体化した共生藻から獲得した「共生体由来型」、宿主とも共生体とも異なる生物種から獲得された「水平伝播型」が存在する [文献 1]。

本研究では、緑藻由来葉緑体をもつ渦鞭毛藻 *Oxytoxum* sp. SG436 株を対象に、クロロフィル *a* (Chl *a*) 合成に係る核コード遺伝子群の同定とその起源の推定を行った。当研究室で行われた先行研究 [文献 1] では、緑藻由来葉緑体をもつ渦鞭毛藻 *Lepidodinium chlorophorum* の核コード Chl *a* 合成関連遺伝子の起源が詳細に解明されているが、*Oxytoxum* sp. は *L. chlorophorum* とは独立に緑藻由来葉緑体を確立したことが判っている (本研究未発表データ)。本研究では、細胞内共生緑藻の葉緑体化を独立におこなった 2 種の渦鞭毛藻間で、Chl *a* 合成系の改変がどのように起こったかを詳細に比較することを目的とした。本研究の結果は、葉緑体置換に伴う宿主・共生体ゲノムの進化における基本原理解明の一助となると期待できる。

## 材料・方法

## [mRNA-seq 解析]

当研究室にて培養した細胞は遠心操作により回収し、TRIzol Reagents を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA サンプルを NextSeq 500 を用いた mRNA-seq 解析に供すること (生物技研に外注) で、トランスクリプトーム解析を行った (150 塩基長の paired-end シーケンスを 226.6 M リード取得した; 総塩基長は 32 G)。得られたリードデータは fastp v0.12.6 によるクオリティフィルタリングを行い、得られた 141.5 M リード (総塩基長 16.8 G) を TRINITY v2.5.1 によりアセンブルし、mRNA 配列を復元した (合計 229703 コンティグ)。

[Chl *a* 合成系関連遺伝子の探索]

光合成生物の Chl *a* 合成系関連遺伝子配列をクエリとし、*Oxytoxum* sp. のコンディグデータに対して相同性検索 (tblastn) を行った。相同性検索において E-value  $\leq 1e-20$  でクエリにヒットしたコンディグ配列はアミノ酸に翻訳し、その推定アミノ酸配列をクエリに NCBI non-redundant データベースに対し相同性検索 (blastp) を行った。この blastp 解析で用

いたクエリが Chl *a* 合成系関連タンパク質にヒットした場合、*Oxytoxum* sp. の Chl *a* 合成系関連タンパク質とみなし、それぞれの起源を推測するために系統解析を行った。

## [系統解析]

トランスクリプトームデータから得た Chl *a* 合成系に関連する 7 種類の酵素 (合計 9 配列) を、系統的に広範な光合成生物の相同配列とアライメントした。先行研究 [文献 1] で用いたアライメントデータに *Oxytoxum* sp. の配列を追加することで新しいデータセットを作成したが、アライメントと座位選択はやり直した (それぞれ MAFFT v7.721 と trimAI v1.4 を使用)。最終的なアライメントは IQ-TREE v1.6.9 を用いた最尤系統解析を行った。アミノ酸置換モデルはそれぞれのアライメントについて IQ-TREE により選択されたものを適用した。推測された最尤系統樹中の各分岐に対する信頼性は、リサンプリングデータ 100 個を用いたノンパラメトリックブートストラップ法により検証した。

## 結果と考察

Chl *a* 合成系の 13 遺伝子のうち、核ゲノムにコードされる酵素 6 種類 (7 タンパク質) について、*Oxytoxum* sp. から得られた合計 9 種類の配列を含む 7 タンパク質の最尤系統樹を作成した。その結果、Chl *a* 合成系関連タンパク質配列種類のうち、3 配列が共生体由来型、1 配列が垂直伝播型、2 配列が水平伝播型と推測され、残りの 3 配列は十分な信頼性を担保してタイプ分けできなかった。先行研究により、*L. chlorophorum* の Chl *a* 合成系は、共生体由来型と垂直伝播型がそれぞれ 1 配列ずつ、水平伝播型が 5 配列で構成されている [文献 1]。本研究により *Oxytoxum* sp. の Chl *a* 合成系は、*L. chlorophorum* よりも共生体由来型遺伝子の寄与が大きいたことが明らかとなった。

先行研究では、垂直伝播型遺伝子が *L. chlorophorum* の Chl *a* 合成系にほとんど寄与していないことから、葉緑体置換前に光合成能力が一度失われたという説が提唱された [文献 1]。*L. chlorophorum* 同様、垂直伝播型遺伝子の寄与が *Oxytoxum* sp. の Chl *a* 合成系に対して少ないことから、*Oxytoxum* sp. も緑藻由来葉緑体を獲得する前に光合成能力を失ったと考えられる。*L. chlorophorum* では共生体由来型遺伝子が 1 種しか見つからず、Chl *a* 合成系の再構築への緑藻共生体の寄与は少ないと推測されたのに対し、*Oxytoxum* sp. の Chl *a* 合成系では共生体由来型遺伝子が 3 種発見された。Chl *a* 合成系の再構築に対する共生体由来遺伝子の寄与に違いがみられるのは、2 種の渦鞭毛藻細胞が緑藻共生体を独立に葉緑体化したことを反映していると考えられる。

## 参考文献

Matsuo E, Inagaki Y. 2018. Patterns in evolutionary origins of heme, chlorophyll *a* and isopentenyl diphosphate biosynthetic pathways suggest non-photosynthetic periods prior to plastid replacements in dinoflagellates. PeerJ 6:e5345 <https://doi.org/10.7717/peerj.5345>