

## Histioneis 属渦鞭毛藻に共生するシアノバクテリアのゲノム解析および系統解析

浅賀 巧匠 (筑波大学 生物学類)

指導教員：中山 卓郎 (筑波大学 生命環境系)

### 【背景・目的】

貧栄養な外洋域に分布する従属栄養性の微生物には、生態的戦略としてシアノバクテリア等の光合成微生物と共生する例が多く知られる。Dinophysis 目渦鞭毛藻のうち外洋域に分布する非光合成性の種も、その多くがシアノバクテリアと共生関係にあり、シアノバクテリアを共生させる空間である共生チャンパーを発達させるなど、共生を前提とした細胞形態を持つ。そのような Dinophysis 目渦鞭毛藻のうち、Ornithocercus 属の共生シアノバクテリアについてはゲノムが解読され、この共生体は Synechococcus 属シアノバクテリアに由来することが明らかとなった。さらに当該共生シアノバクテリアは宿主と絶対共生の関係にあり、宿主の世代を超えて受け継がれてきたことが示唆されている<sup>[1]</sup>。一方で、Dinophysis 目渦鞭毛藻に見られる共生シアノバクテリアには形態的特徴に多様性があり、宿主となっている渦鞭毛藻の系統間で異なる場合がある。特に Histioneis 属渦鞭毛藻の種では、単一個体の共生チャンパー内においても明らかに形態の異なる 2 タイプのシアノバクテリアが存在することが知られ、先行研究において一方の種類のシアノバクテリアには窒素固定能があることが示唆されている。これを踏まえると、Histioneis をはじめとする Dinophysis 目渦鞭毛藻の共生シアノバクテリアには系統的な多様性があり、それぞれ独立して宿主渦鞭毛藻と共生関係を構築したと推測されるが、その進化過程は詳細には明らかとなっていない。そこで本研究では Dinophysis 目渦鞭毛藻の中でも特に Histioneis 属に着目し、渦鞭毛藻宿主と 2 タイプのシアノバクテリアとの共生進化過程を類推することを目的とした。

研究室の先行研究で、Histioneis biremis, H. pietschmanii, H. depressa の 3 種それぞれに見られる 2 タイプの共生シアノバクテリアゲノムについて、illumina シーケンサによるショートリードおよび Oxford Nanopore シーケンサによるロングリードの配列が得られていた。本研究ではこれらの配列を元にゲノム解析を行い、共生体間の系統関係や遺伝子の有無などを調査することで Histioneis 属にみられる 2 タイプのシアノバクテリアの進化を推定した。

### 【方法】

#### ■ゲノム配列の再構築

シーケンサが出力したリードから、fastp および filtlong によって低品質のリードを除去した。その後、Unicycler でゲノム配列の再構築 (アセンブリ) を行った。

#### ■ゲノムアセンブリの評価

得られたゲノムアセンブリに対して、DFAST を用いてアノテーションを行った。その後、推定されたタンパク質のアミノ酸配列それぞれを用いて diamond で NCBI RefSeq proteins データベースに対して相溶性検索を実行し、それぞれのタンパク質がシアノバクテリアに由来するかどうかを検討した。相溶性検索の結果と併せてアセンブリグラフも参照し、シアノバクテリア以外の生物に由来すると思われる配列を除去した。最終的に得られたゲノム配列を共生体のゲノムとして扱った。

得られたシアノバクテリアゲノムを用いて再び DFAST によるアノテーションを行った後、他の自由生活性のシアノバクテリア (計 334 OTU) とともに OrthoFinder によるオルソログ推定を行った。

#### ■多遺伝子系統解析

オルソログ推定の結果から、①98%以上の OTU が持っており、②コピー数が 1.00 であるオルソログのアミノ酸配列を抽出 (計 85 遺伝子) し、これらを多遺伝子系統解析に用いた。最尤法による分子系統解析は IQ-TREE を用いて行った。置換モデルには LG+C20+F+G を用いた。

#### ■系統マーカー遺伝子の単遺伝子系統解析

2 タイプの共生体それぞれのゲノムから、系統マーカーとなる領域 (窒素固定系統: *nifH*、非窒素固定系統: 16S rRNA および 23S rRNA コーディング領域のスペーサー配列 (ITS) ) を抽出し、近縁系統の自由生活性シアノバクテリアの相同配列も含め、IQ-TREE を用いて最尤法による分子系統解析を行った。

#### ■比較ゲノム解析

OrthoFinder によるオルソログ推定や、BlastKOALA による KEGG Orthology ID の割り振りの結果を元に、それぞれの共生体を持つタンパク質遺伝子のレポトリーを抽出し、近縁な自由生活性シアノバクテリアのゲノムと比較を行った。

### 【結果・考察】

多遺伝子系統解析では、*H. biremis*, *H. pietschmanii*, *H. depressa* のいずれの共生体も、既知の *Ornithocercus* 属渦鞭毛藻の共生体とは異なる系統のシアノバクテリアに由来することがわかった。また、2 タイプの共生シアノバクテリアは窒素固定性および非窒素固定性のシアノバクテリア系統において、それぞれ単系統群を形成した。また単一の系統マーカー遺伝子を用い、より近縁な OTU を取り入れた系統解析においても、同様に窒素固定系統・非窒素固定系統それぞれにおいて単系統群が形成された。これらの結果から、Histioneis 属渦鞭毛藻はその共通祖先において Ornithocercus 属渦鞭毛藻とは独立にシアノバクテリア共生体を獲得し、その後の種分化の過程を通じて共生体を垂直伝播してきたことが示唆される。本属における共生関係は、Dinophysis 目渦鞭毛藻とシアノバクテリアの共生関係の構築過程についての洞察を深める材料ともなるだろう。

2 タイプの共生シアノバクテリアは Histioneis 属の進化過程を通じて保持されてきたと予想される一方で、比較ゲノム解析からは、既知の細胞内共生性シアノバクテリアと比較して明らかでないゲノム縮小はみられなかった。これは Histioneis 属渦鞭毛藻とシアノバクテリア間の共生関係の確立が比較的最近であることに起因すると考えられる。

### 【参考文献】

1. Nakayama, T. et al. Single-cell genomics unveiled a cryptic cyanobacterial lineage with a worldwide distribution hidden by a dinoflagellate host. Proceedings of the National Academy of Sciences 116, 15973–15978 (2019).