

海洋真核微生物の次世代利用に向けたゲノム生物学的研究

神川龍馬 (京都大学農学研究科)
kamikawa.ryoma.7v@kyoto-u.ac.jp

はじめに

真核微生物とは、ヒトと同様に真核生物である一方で、単細胞性である生物の総称である。海洋環境において、光合成性真核微生物は陸上に匹敵する純一次生産量の大部分を担い、複雑な物質循環の起点となる。また、従属栄養性海洋性真核微生物は、一次生産者が産生した有機物を利用する細菌と動物プランクトンをつなぐ物質循環のコネクターとして機能する。一方で、一次生産者である光合成性真核微生物の一部は有毒・有害な赤潮を形成するため、水産業に甚大な被害を与える。このような真核微生物の遺伝子・ゲノムレベルの多様性を解明すること^{e.g., 1)}は、海洋環境における物質循環の理解のみならず有用遺伝子資源の開発および有毒有害赤潮形成種の同定・定量を正確に行う技術の開発に資する。本発表では以下3つのテーマについて概説する。

有毒・有害赤潮形成微細藻類の種特異的分子モニタリング法の開発

サキシトキシンなどの神経毒を産生する有毒渦鞭毛藻類 *Alexandrium tamarense* および *Alexandrium catenella* は、マヒ性貝毒の原因微細藻類である。そのため、それらの分布や赤潮発生のポテンシャルをもつ海域を特定することは、水産業並びに食品衛生上急務の課題であった。*A. tamarense* や *A. catenella* は、増殖に不適な環境などではシストと呼ばれる休眠胞子を形成し、海底堆積物中に存在している。シストは次世代の有毒赤潮発生のシードとして機能するため、シストの分布域を定量的に同定することは、有毒赤潮発生海域の予測に有用である。しかし、*A. tamarense* および *A. catenella* のシストは、形態的特徴に乏しく、有毒種の正確な同定および定量が極めて困難であった。そこで本研究では、有毒赤潮形成種のもつ DNA における種特異的配列の探索を行い、*Alexandrium* 属渦鞭毛藻類の遺伝子領域から種特異的な分子マーカーを報告した^{2,3,4)}。さらにそれらのうち、28S rRNA 遺伝子 D1/D2 領域を標的モデルとしたリアルタイム PCR 法による種特異的な定量的検出法の開発を行った^{5,6)}。海底堆積物には種々の PCR 阻害物質が含まれるため、より効率的な DNA 抽出法の検討を行ったところ、界面活性剤セチルトリメチルアンモニウムブロミドを用いた手法が本種シストを含む海底堆積物からの DNA 抽出に最も適していることが明らかとなった。

リアルタイム PCR を用いた本手法では、海底堆積物 1 グラムあたり 10 シストという低密度でも検出可能であった。本手法を用いて、1997 年～2004 年に採集された日本沿岸の海底堆積物を調査したところ、愛知県三河湾では *A. tamarense* シストのみが検出された一方、山口県徳山湾では *A. catenella* シストのみ検出された。特筆すべきは、その検出感度であった。有毒種が報告されていない海域での海底堆積物からは本リア

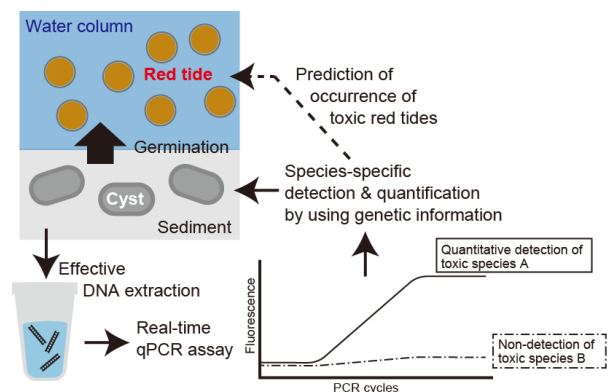


図 1. 遺伝子配列を利用した有毒微細藻類シストの定量的検出と有毒赤潮発生予測

リアルタイム PCR 法でいずれの有毒種シストも検出されなかった一方、有毒種の存在が知られているが従来の形態学的検出手法でシストが観察されなかったサンプルからは極めて低密度で有毒種シストが検出された。以上の結果から、種特異的かつ高感度に有毒微細藻類シストを検出する手法が開発できた。

さらに本研究では、同様のリアルタイム PCR による検出法を種々の有害赤潮形成微細藻類の栄養細胞に応用した^{6,7)}。日本沿岸における代表的赤潮形成種 *Chattonella* spp.、*Heterosigma akashiwo*、*Karenia mikimotoi*、*Heterocapsa circularisquama*、*Cochlodinium polykrikoides* の栄養細胞において、1 細胞から検出可能な定量的 PCR 検出法の開発を行った。本手法は、細胞の増殖段階に影響を受けず、また複数の種が混合した状態でも種特異的に検出できることが明らかとなった。

非光合成性微細藻類における代謝機能

葉緑体は光合成性真核生物の光合成細胞小器官（オルガネラ）であり、多様な生合成系が機能している^{6,8)}。抗酸化物質として知られる脂肪酸やカロテノイドなどの合成系は、葉緑体で合成され、その後細胞質などに輸送される。真核微細藻類は海洋の主要な一次生産者であるが、緑藻類、紅藻類、クリプト藻類、珪藻類、黄金色藻類、ディクチオカ藻類、渦鞭毛藻類など多くの系統で光合成能を完全に喪失したことが知られている。一方で、そのような非光合成性微細藻類の多様性や非光合成性微細藻類のもつ細胞機能は未解明であった。そこで本研究では、日本沿岸域からサンプリングを行い、非光合成性真核微細藻類の分離培養を通じて、新奇培養株の確立を行った。その結果、珪藻類という海洋一次生産の約 40%を担うとされる真核微細藻類の新奇非光合成性培養株を多数確立することに成功した⁹⁾。これらの多くが新種であり、現在新種記載に向けて作業を進めている。非常に興味深い事に、これらの非光合成性珪藻類は葉緑体を保持しており、また分子系統解析の結果単系統群を形成せず、葉緑体を保持しつつ光合成能を喪失する進化が珪藻類の中で複数回独立に生じたことを示唆した⁹⁾。さらに本研究では、分離培養株のうちの一つをモデルとしてトランスクリプトーム解析およびオルガネラゲノム解析を行い、その細胞内代謝経路を解明した^{10,11,12,13)}。その結果、光合成電子伝達系およびクロロフィル合成系、そして炭酸固定に関わる遺伝子群が完全に喪失しており、従属栄養性であることが遺伝子データからも支持された。代謝経路の解析から、アミノ酸合成系やヘム合成系などの代謝経路に加え、脂肪酸合成系や脂質合成系関連遺伝子が多数検出された。これらは葉緑体局在タンパク質をコードしており、光合成能喪失後も葉緑体は代謝の場として機能していることが明らかと

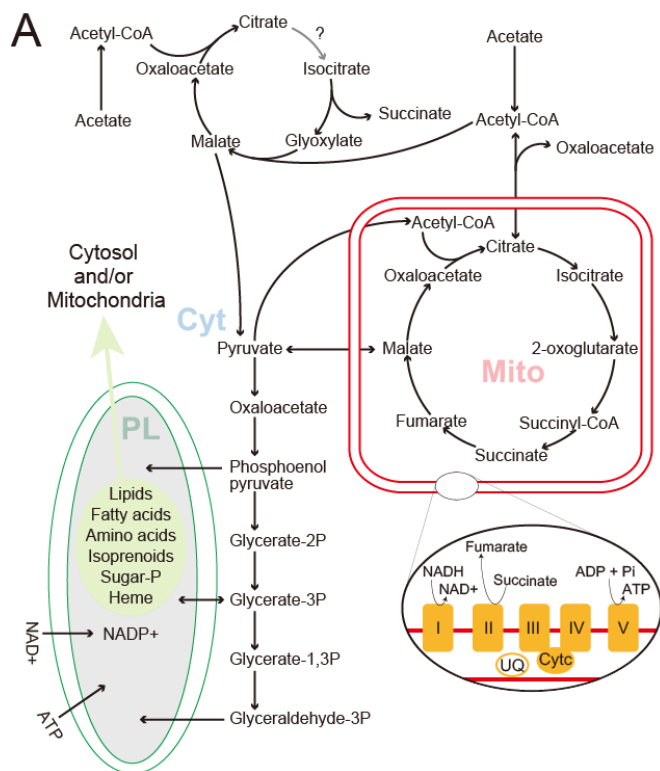


図 2. 非光合成性緑藻類で検出された遺伝子から推定される代謝経路の概略。それぞれの代謝物名とその反応経路を矢印で示した。PL: 非光合成性葉緑体、Mt: ミトコンドリア、Cyt: 細胞質、I-V: 電子伝達系複合体 I-V。

なった。ガスクロマトグラフィーによって脂肪酸の同定および相対的な定量を行ったところ、有用脂肪酸として知られるエイコサペンタエン酸などを細胞内に含むことが分かった（未発表）。珪藻類に加え、緑藻類や黄金色藻、ディクチオカ藻類も同様にゲノム生物学的解析を行い^{14,15,16}、それらのもつ代謝系を明らかにしたところ（図2）、特に非光合成性緑藻類の葉緑体では、抗酸化物質であるカロテノイド合成系が存在することが明らかとなった¹⁵。高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、抗酸化物質であるカロテンやゼアキサンチンなどが検出され、実際に合成していることが証明された。

嫌気性真核微生物による水素生産能

真核生物はその細胞内にミトコンドリアを有し、酸素を最終電子受容体として好気呼吸を行うことでATPを得る¹⁷。一方で、ヒトの腸内や海底堆積物中には酸素濃度が極めて低い嫌気環境が存在し、そのような環境には酸素を必要としない嫌気性真核微生物が生息している¹⁸。特に、真核微生物メタモナーダ類は嫌気性真核微生物のみからなる真核微生物のグループであり、ヒトや家畜の腸内に感染し下痢症状を引き起こすランブルベン毛虫や性感染症原因生物の一つであるトリコモナスが含まれる。それまでメタモナーダ類などの嫌気性真核微生物の間の系統関係の詳細やそれらのもつ細胞内代謝系・嫌気環境での生存戦略は明らかではなかった。本研究では、環境中から単離培養されたメタモナーダ類培養株やその他の嫌気性真核微生物の大規模なトランスクリプトームデータセットを作成し、分子系統学的位置とその代謝経路を解析した^{19,20}。その結果、トリコモナスやランブルベン毛虫に近縁な、自由生活性の嫌気性真核微生物を同定することに成功した。また、それらのトランスクリプトームデータを

解析したところ、ミトコンドリアにおける酸素を最終電子受容体とした好気呼吸鎖をもたないことが明らかとなった。さらに、上述2種の寄生性真核微生物に近縁な嫌気性真核微生物からは、スクシニル CoA を利用した基質レベルのリン酸化による ATP 合成経路をもつことが示唆され、極めて乏しい酸素濃度である嫌気環境で酸素に依存しないエネルギー生産を行うことが明らかとなった。酸素を最終電子受容体にした電子伝達を行わない一方、ヒドロゲナーゼおよびその成熟化酵素遺伝子が検出された。遺伝子の進化学的解析から、これら基質レベルのリン酸化およびヒドロゲナーゼによる水素ガス生産は、嫌気環境に適応したミトコンドリア内において行われることが示唆された（図3）。以上のことから、嫌気性真核微生物メタモナーダ類のもつ、嫌気環境に適応したミトコンドリア内において、電子受容体としてプロトンを用いた水素ガス生産能を有することが明らかとなった。

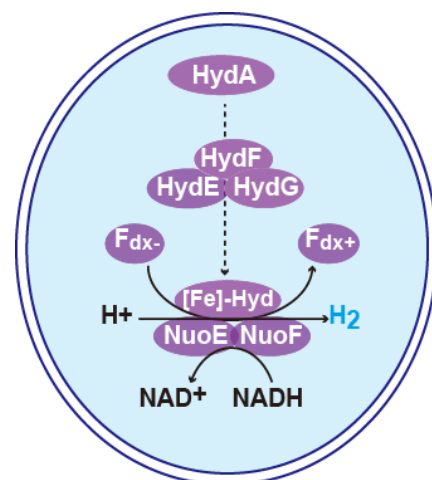


図3. 嫌気性真核微生物のミトコンドリア水素生成経路の概略図。

謝辞

本研究を行うにあたり、学生時代から今日に至るまでご指導賜りました左子芳彦 名誉教授（京都大学農学研究科）、吉田天士教授（京都大学農学研究科）、稲垣祐司教授（筑波大学計算科学研究センター）、橋本哲男教授（筑波大学生命環境系）、宮下英明教授（京都大学人間・環境学研究

科) に深く感謝申し上げます。また、ここでは記述しきれませんが、国内および海外の共同研究者や、研究にご協力いただきました皆様方に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Kamikawa R., Inagaki Y. and Sako Y.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:6965-6969 (2008)
- 2) Kamikawa R., Inagaki Y. and Sako Y.: *Protist* 158: 239-245 (2007)
- 3) Kamikawa R., Hosoi-Tanabe S., Yoshimatsu S., Oyama K., Masuda I. and Sako Y.: *Journal of Applied Phycology* 20:153-159 (2008)
- 4) Kamikawa R., Nishimura H. and Sako Y.: *Phycological Research* 57:1-11 (2009)
- 5) Kamikawa R., Hosoi-Tanabe S., Nagai S., Itakura S. and Sako Y.: *Fisheries Science* 71:987-991 (2005)
- 6) Kamikawa R., Nagai S., Hosoi-Tanabe S., Itakura S., Yamaguchi M., Uchida Y., Baba T. and Sako Y.: *Harmful Algae* 6:413-420 (2007)
- 7) Kamikawa R., Asai J., Miyahara T., Murata T., Oyama K., Yoshimatsu Y., Yoshida T. and Sako Y.: *Microbes & Environments* 21:163-173 (2006)
- 8) Sarai C., Tanifuji G., Nakayama T., Kamikawa R., Takahashi K., Yazaki E., Matsuo E., Miyashita H., Ishida K., Iwataki M. and Inagaki Y.: *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117:5364-5375 (2020)
- 9) Kamikawa R., Yubuki N., Yoshida M., Taira M., Nakamura N., Ishida K., Leander BS., Miyashita H., Hashimoto T., Mayama S. and Inagaki Y.: *Phycological Research* 63:19-28 (2015)
- 10) Kamikawa R., Tanifuji G., Ishikawa SA., Ishii K., Matsuno Y., Onodera NT., Ishida K., Hashimoto T., Miyashita H., Mayama S. and Inagaki Y.: *Molecular Biology and Evolution* 32:2598-2604 (2015)
- 11) Kamikawa R., Moog D., Zauner S., Tanifuji G., Mayama S., Ishida K., Miyashita H., Hashimoto T., Archibald JM. and Inagaki Y.: *Molecular Biology and Evolution* 34:2355-2366 (2017)
- 12) Kamikawa R., Azuma T., Ishii K., Matsuno Y. and Miyashita H.: *Protist* 169: 351-361 (2018)
- 13) Moog D., Nozawa A., Tozawa Y. and Kamikawa R.: *Scientific reports* 10:1167 (2020)
- 14) Dorrell RG., Azuma T., Nomura M., Audren de Kerdrel G., Paoli L., Yang S., Bowler C., Ishii K., Miyashita H., Gile GH. and Kamikawa R.: *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116:6914-6923 (2019)
- 15) Kayama M., Chen JF., Nakada T., Nishimura Y., Azuma T., Miyashita T., Shikanai T., Takaichi S., Kashiya Y. and Kamikawa R.: *BMC Biology* 18:126 (2020)
- 16) Kayama M., Maciszewski K., Yabuki Y., Miyashita H., Karnkowska A. and Kamikawa R.: *Frontiers in Plant Science* in press (2020)
- 17) Roger AJ., Muñoz-Gómez SA. and Kamikawa R.: *Current Biology* 27: R1177-R1192 (2017)
- 18) Gawryluk R., Kamikawa R., Stairs CW., Silberman JD., Brown MW. and Roger AJ.: *Current Biology* 26:2729-2738 (2016)
- 19) Kamikawa R., Inagaki Y., Tokoro M., Roger AJ. and Hashimoto T.: *Current Biology* 21:311-315 (2011)
- 20) Leger M., Kolisko M., Kamikawa R., Stairs CW., Kume K., Čepicka I., Silberman JD., Andersson JO., Xu F., Yabuki A., Eme L., Zhang Q., Takishita K., Inagaki Y., Simpson AGB., Hashimoto T. and Roger AJ.: *Nature Ecology and Evolution* 1:0092 (2017)