

光合成能の喪失に伴う葉緑体ゲノムの縮退と
機能の喪失に関する新たな知見

加山 基

目次

1 序論	5
1.1 光合成と葉緑体機能.....	5
1.2 光合成性生物の多様性.....	6
1.3 非光合成生物.....	8
1.4 非光合成生物の葉緑体のゲノムと代謝.....	8
1.5 葉緑体の電子伝達体.....	9
1.7 本研究の目的.....	11
第2章 <i>Pteridomonas</i> spp. (不等毛藻類、ディクチオカ藻綱) の葉緑体ゲノムの 解析から見える葉緑体喪失と新たな進化的制約.....	13
2.1 概要.....	13
2.2 背景.....	14
2.3 材料・方法.....	15
2.3.1 葉緑体 DNA 配列の解析.....	16
2.3.2 18S rRNA 遺伝子の系統解析.....	16
2.3.3 葉緑体にコードされたタンパク質の系統解析.....	17
2.3.4 <i>Pteridomonas</i> sp. YPF1301 の <i>rbcL</i> 遺伝子の探索.....	17
2.3.5 <i>Pteridomonas</i> spp. の TufA.....	18
2.3.6 <i>Pteridomonas danica</i> PT 株トランスクリプトームデータにおける葉緑体に保持 されている鉄硫黄クラスタータンパク質の探索と葉緑体機能の推定.....	19

2.4	結果および考察.....	20
2.4.1	<i>Pteridomonas</i> sp. YPF1301、 <i>P. danica</i> NY0221 の葉緑体ゲノム	20
2.4.2	<i>Pteridomonas</i> sp. YPF1301、 <i>P. danica</i> NY0221 の葉緑体ゲノムの組成	22
2.4.3	<i>P. danica</i> NY0221 における <i>clpC</i> の喪失.....	24
2.4.4	<i>Pteridomonas</i> sp. YPF1301 における <i>tufA</i> 遺伝子の水平伝播	24
2.4.5	<i>rbcL</i> 遺伝子の喪失.....	25
2.4.6	鉄硫黄クラスター合成遺伝子の消失.....	27
2.4.7	新たに見えてきた葉緑体ゲノム消失の進化的制約仮説.....	29
2.6	結論.....	54
第3章 非光合成緑藻 <i>Chlamydomonas</i> NrCl902 から光合成電子伝達系の喪失 進化を明らかにする		56
3.1	概要.....	56
3.2	背景.....	56
3.3	材料・方法.....	57
3.3.1	非光合成緑藻 <i>Chlamydomonas</i> NrCl902 の培養.....	57
3.3.2	HPLC を用いたプラストキノン分析.....	57
3.3.3	Homogentisate solanesyltransferase 酵素の RNAi ノックダウン	59
3.4	結果および考察.....	62
3.4.1	<i>Chlamydomonas</i> NrCl902 のプラストキノン/プラストキノール.....	62
3.4.2	<i>Chlamydomonas</i> NrCl902 のプラストキノンの機能予測.....	64
3.4.3	非光合成性葉緑体を持つ真核生物の電子伝達系の進化.....	65

3.6 結論.....	72
第4章 非光合成性珪藻のクロロフィル中間産物の生産.....	73
4.1 概要.....	73
4.2 背景.....	73
4.3 材料・方法.....	74
4.3.1 28S rRNA 遺伝子の系統解析.....	74
4.3.2 DNA・RNA 解析.....	75
4.3.3 葉緑体 DNA 配列の解析.....	76
4.3.4 葉緑体タンパク質の系統解析.....	77
4.3.5 クロロフィル類の HPLC 解析.....	77
4.3.6 <i>Nitzschia</i> sp. KQ18 の Mg- Protoporphyrin IX dimethyl ester.....	78
4.4 結果および考察.....	79
4.4.1 <i>Nitzschia</i> sp. KQ18 の分子系統解析.....	79
4.4.3 <i>Nitzschia</i> sp. KQ18 の非光合成性葉緑体ゲノム.....	80
4.4.4 <i>Nitzschia</i> sp. KQ18 の非光合成性葉緑体機能の推定.....	81
4.4.5 非光合成生物のクロロフィル合成.....	81
4.6 結論.....	98
第5章 総合討論.....	99
参考文献.....	103
謝辞.....	116

1 序論

1.1 光合成と葉緑体機能

酸素発生型光合成性生物は酸素発生を伴いながら光エネルギーを化学エネルギーに変換する光合成をおこなう生物で、一般的に、光合成性真核生物とシアノバクテリアが知られている (Archibald, 2009; Keeling, 2010; Giovannoni et al., 1988; Takahashi and Ichimura 1970)。最初の酸素発生型光合成性生物は、現在のシアノバクテリアの祖先であり、約 30 億年前までには誕生していたと考えられている (Brocks, 1999 ; Ward et al., 2019)。この酸素発生型光合成性生物が誕生し、繁栄したことにより、窒素と二酸化炭素、水素、メタンガスで構成されていた地球の大気組成が、長い年月を経て、酸素と窒素を中心とした大気へと変化した (Ward et al., 2019 ; Krissansen-Totton et al., 2018)。光合成性真核生物とシアノバクテリアは、チラコイド膜上に光合成電子伝達系 (光化学系) が葉緑体内 (シアノバクテリアの場合は細胞内) に存在する (Hohmann-Marriott and Blankenship, 2012; Dekker and Boekema, 2005)。光合成電子伝達系は、光合成を行うための光化学系 I・II とシトクロム *b6/f* 複合体、プラストシアニン、フェレドキシンといったタンパク質またはタンパク質複合体で構成されている。電子の授受は、クロロフィル類、プラストキノン、鉄硫黄クラスター、NAD(P)H などの電子伝達体を介して行われる (Ishikita et al., 2006 ; Durrant et al., 1995 ; kashiyama and Tamiaki 2014 ; Sharma et al., 2012 ; Niyogi, 2000 ; Rochaix, 2011 ; Hohmann-Marriott and Blankenship, 2012 ; Cornic et al., 2012)。これらの電子伝達体は電子を他の物質に授与もしくは、他の物質から給与できる物質であり、酸化型 (電子受容体) と還元型 (電子供与体) の状態がある。光化学系 II において、光エネルギーを使い水を分解することで得られた電子は、プラストキノン、シトクロム *b6/f* 複合体、プラストシアニン、光化学系 I の順に伝達される。電子は最終的にフェレドキシン-NADP⁺レダクターゼに伝達され、NADPH が生産される。この一連の過程で、チラコイド膜のルーメン側とストロマ側にプロトン (水素イオン) の濃度勾配が生じる。ルーメン側

のプロトンが ATP 合成複合体を通過することで、ATP が合成される。また、光合成によって生産された NADPH と ATP を用いて、炭酸固定が行われる。炭酸固定はリブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RubisCO) を初発酵素とし、CO₂ をリブローズ二リン酸に結合することで糖を合成する。

(Ishikita et al., 2006 ; Durrant et al., 1995 ; kashiyama and Tamiaki 2014 ; Sharma et al., 2012)。真核光合成性生物では、これらの反応が葉緑体内で行われる。

葉緑体内で行われる反応は、上記の光合成反応以外に、亜硝酸同化、硫黄同化、イソプレノイド合成、脂肪酸合成、ヘム・クロロフィル合成、カロテノイド合成、鉄硫黄クラスター合成、ペントースリン酸経路、解糖系、アミノ酸合成などがある。これらの反応に関わる多くのタンパク質は、核ゲノムにコードされている遺伝子が発現して葉緑体に輸送されることによって機能している。これは、共生進化の過程でシアノバクテリアの祖先のゲノムに保存されていた遺伝子が、宿主の核ゲノムに水平転移したものと考えられている。

1.2 光合成性生物の多様性

真核生物は多様性であり、「eukaryote Tree of Lif (eToL)」と呼ばれる高次分類群に分けられている。eToL には、アモルフェア (オピストコンタ (後方鞭毛生物、菌類、アプソモナディダ、プレビアータ)、アーボゾア (アメーバ))、クルムス、マラウイオモナダ、ディスコバ (ヘテロロボーサ、ジャコビダ、ツクバモナス、ユーグレノゾア)、メタモナダ、ヘミマスティゴフォラ、クリプティスタ (クリプト藻)、アーケプラスチダ (陸上植物、緑藻、紅藻、ロデルフィス、灰色藻)、ハプティスタ、TSAR (ストラメノパイル (不等毛藻、偽菌類)、アルベオラータ (渦鞭毛藻、アピコンプレクサ、繊毛虫)、リザリア (ケルコゾア、有孔虫、放散虫、エンドミクサ、クロララクニオン藻) テロネミア)、がある (Adl et al., 2019 ; 2012 ; Strassert et al., 2019 ; Burki et al., 2020)。真核光合成生物は、アーケプラスチダ、ハプティスタ、ディスコバ、TSAR などで見られ、多様性を富

んでいる。真核光合成性生物の葉緑体は、シアノバクテリアもしくは光合成性真核生物が従属栄養性生物の細胞内でオルガネラ化したもので、真核生物の様々な eToL 内で葉緑体の獲得が行われた (Archibald, 2009; Keeling, 2010 ; Hohmann-Marriott and Blankenship, 2012)。葉緑体の獲得は、一次共生 (ストレプト植物、緑色植物、紅色植物、灰色植物)、二次共生 (ハプト植物、クリプト植物、ユーグレナ植物、不等毛植物、クロララクニオン植物、クロメラ植物、渦鞭毛植物)、三次共生 (渦鞭毛植物) に大別される (Archibald, 2009)。一次共生生物はアーケプラスチダの真核生物がシアノバクテリアを取り込み、細胞内に共生させることで葉緑体を獲得した光合成性真核生物で、ストレプト植物、緑色植物、灰色植物、紅色植物が知られている。二次共生生物は、真核生物が一次共生生物を取り込み、葉緑体を獲得した生物で、クリプシダのクリプト植物、ハプティスタのハプト植物、ストラメノパイルの不等毛植物、アルベオラータの渦鞭毛植物、ユーグレナ藻類、クロララクニオン藻が知られている。三次共生生物は二次共生生物を取り込み、葉緑体を獲得した光合成性生物として知られている。1-3 次共生の間で、葉緑体包膜の数が異なるのは、共生進化の成立過程の違いであると考えられている (Archibald, 2009)。一次共生の葉緑体の包膜は 2 枚であることが知られており、この 2 枚の包膜はシアノバクテリアの細胞膜と外膜に起因することが示唆されている (Gould et al., 2008)。二次共生生物の祖先はこの一次共生生物を、食胞膜を介して捕食することで獲得していることから、二次共生の葉緑体包膜数は 4 枚と 3 枚のものがおり、4 枚のものはシアノバクテリア由来の包膜に加え、食胞膜または小胞体由来の膜と取り込まれた一次共生の細胞膜の 4 枚になる。3 枚の場合、細胞内共生後から現在に至る間に、包膜が 1 枚失われ 3 枚であることが知られている (例: *Euglena gracilis*、渦鞭毛藻: Archibald, 2009)。

すべての光合成性真核生物の葉緑体は、シアノバクテリアの細胞内共生に由来している。このため、葉緑体内には、シアノバクテリアゲノムに由来する葉緑体ゲノムが存在する。自由生活のシアノバクテリアゲノムは、通常、数 Mb ほど

の大きさである。一方葉緑体ゲノムは、細胞内共生によって不必要な遺伝子の欠失や、核への遺伝子水平伝播により、数十 kb から 1 Mb 程度のサイズに縮退している。

1.3 非光合成生物

非光合成生物は、光合成性真核生物が光合成能を喪失した生物である。多くの非光合成生物は、光合成能を喪失しても、細胞内に 2-4 枚の包膜で囲まれた葉緑体の名残を保持しており、葉緑体内には、葉緑体ゲノムが維持されている。非光合成生物は、光合成能の喪失にともない外部から有機物源を必要とする従属栄養生物に進化している。他の植物や動物に寄生することで栄養を奪取する方法や、土壌や汚水などの富栄養下で栄養を獲得する方法、バクテリアや真核微生物を捕食する方法などで生育している (Olefeld et al., 2018 ; Donaher et al., 2009; Záhonová et al., 2016 ; Koning and Keeling, 2006)。非光合成生物は、陸上植物 (アーケプラスチダ)、緑藻 (アーケプラスチダ)、紅藻 (アーケプラスチダ)、クリプト藻 (クリプティスタ)、ユーグレナ藻 (ディスコーバ)、不等毛藻 (ストラメノパイル)、渦鞭毛藻 (アルベオラータ)、アピコンプレクサ (アルベオラータ) など、多くの系統で報告されている (Hadariová et al., 2018)。一方、灰色藻 (アーケプラスチダ)、クロララクニオン藻 (リザリア)、ハプト植物 (ハプティスタ) の系統には非光合成生物の報告例がない (Maciszewski and Karnkowska, 2019 ; Hadariová et al., 2018)。珪藻やクリプト藻類、ユーグレナなどの系統では、単一の属内で複数回独立して光合成能の喪失が起こったことが報告されている (Marin et al., 2003; Kamikawa et al., 2015; Salomaki and Kolisko, 2019)。

1.4 非光合成生物の葉緑体のゲノムと代謝

光合成性葉緑体ゲノムには光合成電子伝達系 (光化学系、クロロフィル)、フェレドキシン、炭酸固定、タンパク質分解、脂肪酸合成、アデノシン 3 リン酸

(ATP) 合成に関連した、転写・翻訳の遺伝子を含んでいる (Yasuno and Wada, 2002; Kleffmann et al., 2004; DellaPenna and Pogson, 2006; Hörtensteiner and Kräutler, 2011; Terashima et al., 2011; Przybyla-Toscano et al., 2018)。光合成性真核生物の葉緑体ゲノムにコードされている主な遺伝子は光合成に関連するもので、光合成能の喪失は葉緑体ゲノムの進化に大きな影響を与える。非光合成性葉緑体ゲノムが保持する遺伝子は様々で、例えば、*Prototheca* spp. (緑藻) や *Nitzschia* spp. (珪藻) は葉緑体ゲノムに ATP 合成酵素遺伝子が保存されている (Kamikawa et al., 2015; Severgnini et al., 2018; Suzuki et al., 2018)。また、*Cryptomonas paramecium* (クリプト藻類) や *Euglena longa* (ユーグレナ藻類) の葉緑体ゲノムにはリブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) の大サブユニット (rbcL) 遺伝子が保存されている。

一方で、非光合成性葉緑体はいくつかの代謝系を維持している。例えば、*P. falciparum* (アピコンプレクサ) の葉緑体では、脂肪酸、リポ酸、鉄硫黄クラスター (Fe-S)、ヘム合成系路などの代謝が行われている (Ralph et al., 2004)。また、非光合成珪藻 *Nitzschia* sp. NIES-3581 の葉緑体では *P. falciparum* の葉緑体に保持されている代謝に加え、ATP 合成、アミノ酸合成など様々な代謝が行われている。非光合成性緑藻 *Helicosporidium* sp. は、炭酸固定酵素 RuBisCO の遺伝子を除く、ほぼすべての炭酸固定経路を有している (Pombert et al., 2014 ; Smith et al., 2014)。一方、“*Spumella*” sp. NIES-1846 (不等毛藻類) の葉緑体は *P. falciparum* の葉緑体に保持されている代謝に加え、システインやトリプトファンを除くアミノ酸合成が含まれ、脂肪酸合成を欠いている (Dorrell et al., 2019)。

1.5 葉緑体の電子伝達体

光合成性葉緑体が担う機能には、鉄硫黄クラスターやプラストキノン、クロロフィル類、フェレドキシン/フラボトキシン、チトクロム、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸(還元型 : NADPH, 酸化型 : NADP+)などの物質もし

くはタンパク質が用いられ、これらの物質は電子伝達体と呼ばれる (Niyogi, 2000 ; Rochaix, 2011 ; Hohmann-Marriott and Blankenship, 2012 ; Cornic et al., 2012)。

これらの電子伝達体が関与する葉緑体機能は以下に示す。

鉄硫黄クラスターは鉄と硫黄で構成される非ヘム鉄の 1 種である (Przybyla-Toscano et al., 2018)。鉄硫黄クラスターは電子を授受することができるため、酸化還元反応を伴う代謝、例えば光合成電子伝達系やアミノ酸合成や窒素および硫黄代謝、カロテノイド合成、チアゾール合成、リポ酸合成、クロロフィル分解系などに関わるタンパク質に結合していることが多い (Przybyla-Toscano et al., 2018)。

プラストキノンは主に光合成電子伝達系において光化学系 II とシトクロム b6/f 複合体間の電子移動に関与していることが知られている。またカロテノイド合成における電子受容体に使われている (Carol et al., 1999 ; Shikanai et al., 2007 ; Nawrocki et al., 2015 ; Peltier and Shikanai, 2015 ; Peltier and Cournac, 2009)。

クロロフィルは光合成に欠かすことができない色素である。特に、反応中心クロロフィルは光エネルギーを吸収し、励起することで、電子を物質に授与放出する。クロロフィルは光化学系において、光エネルギーをもちいて電子を供給することに寄与している (Ishikita et al., 2006 ; Durrant et al., 1995 ; Sharma et al., 2012)。

フェレドキシンは電子輸送タンパク質の一つで、補因子として鉄硫黄クラスターを結合している。フェレドキシンは光合成電子伝達系のフェレドキシン-NADP⁺還元酵素を使い NADPH を合成している。また、窒素や硫黄代謝の酸化還元反応に関与している (Ralph et al., 2004 ; Mulo et al., 2017 ; Karlusich et al., 2017 ; Seeber and Soldati-Favre, 2010 ; Yoshida et al., 2017)。

フラボトキシンは酸化還元タンパク質の一つで、補因子としてフラビンモノヌクレオチドを利用することで電子伝達を可能にしている。この酸化還元タンパク質は、細胞内の鉄が欠損した時にフェレドキシンの代わりとして機能することが知られている (La Roche et al., 1996)。

プラストシアニンは光合成電子伝達系で利用されている銅タンパク質である。プラストシアニンは、シトクロム *b6/f* から送られてきた電子を光化学系IIに授受している。

上述のように、葉緑体行われる代謝には、酸化還元反応が必要不可欠である。つまり、陸上植物や藻類が持つ葉緑体では、常に葉緑体内で酸化還元反応が行われている。葉緑体の電子伝達体が機能しなくなり、葉緑体内での電子の授受が滞った場合、葉緑体の機能に悪影響が生じる。光合成性生物は葉緑体内の電子のバランスを調整し、酸化還元反応に対する影響を回避する防御機能を有している。たとえば、強光下に置かれた植物では、光合成により大量の電子が生産される。光合成電子伝達系の許容量を超える過剰量の電子は、活性酸素の増加をまねき、NADPHやATP生産の低下につながる(光阻害)。葉緑体呼吸は、NADPHをNADH脱水素酵素II型(NDH2)が酸化し、プラストキノンを介してPTOXに電子が輸送し、過剰量の電子を消去するシステムである(Carol et al., 1999; Shikanai et al., 2007; Peltier and Shikanai, 2015; Peltier and Cournac, 2009)。したがって、葉緑体呼吸は過剰のNADPHが発生した際の安全装置として、酸化還元バランスの恒常性維持に寄与している(Peltier and Cournac, 2002)。

1.7 本研究の目的

光合成性葉緑体から非光合成性葉緑体に進化するプロセスを明らかにするためには、非光合成性葉緑体に残されている代謝について理解する必要がある。光合成能を喪失した非光合成生物はその機能の喪失を通じて、光合成電子伝達系や機能縮退を生じているためである(Hadariová et al., 2018; Wicke et al., 2016; Kamikawa et al., 2017; Dorrell et al., 2019)。しかし、葉緑体ゲノムや葉緑体機能を多く有する非光合成生物はあまり知られていない。そのため、葉緑体喪失進化の初期段階において、葉緑体ゲノムや葉緑体機能に関する報告は少なく、未だ葉緑体喪失進化に関するプロセスは不明な部分も多い(例えば、葉緑体機能における

多数の酸化還元反応、光合成電子伝達系の喪失過程など)。

本研究では、非光合成性葉緑体に多くの代謝を維持していると考えられている非光合成性真核生物の、不等毛藻類 *Pteridomonas danica*、緑藻 *Chlamydomonas* NrC1902、不等毛藻類 *Nitzschia* sp. KQ18 の非光合成性葉緑体が保持する機能を、ゲノム解析あるいはトランスクリプトーム解析によって明らかにすることを目的とした。

第2章 *Pteridomonas* spp. (不等毛藻類、ディクチオカ藻綱) の葉緑体ゲノムの解析から見える葉緑体喪失と新たな進化的制約

2.1 概要

Pteridomonas danica (ディクチオカ藻綱, 不等毛藻類) は光合成能を喪失した非光合成性藻類である。にもかかわらず、先行研究で報告されている *P. danica* sekiguchi 株の葉緑体ゲノムには炭酸固定反応の初発酵素であるリブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) ラージサブユニット (*rbcL*) の遺伝子を保持していることが報告されている (Sekiguchi et al., 2002)。一般に、*rbcL* の遺伝子は、葉緑体が光合成能を失う過程において比較的早い段階で葉緑体ゲノムから欠失すると考えられてきた。このことは、*Pteridomonas* 属の葉緑体進化が他の藻類にみられる葉緑体における遺伝子欠失進化と異なっている可能性を示唆した。

本研究では、上記で報告された非光合成性の不等毛藻類 *Pteridomonas* 属の異なる2株 (*Pteridomonas* sp. YPF1301、*Pteridomonas danica* NY0221) の葉緑体ゲノムを明らかにすることによって、*Pteridomonas* 属の葉緑体進化過程について明らかにした。YPF1301 株および NY0221 の葉緑体は、多くの遺伝子を欠失しており、*P. danica* sekiguchi とは異なり、機能が大きく縮退していることが示された。YPF1301 株の葉緑体ゲノムにコードされているタンパク質はすべてハウスキーピング反応 (転写、翻訳、タンパク質分解など) に関与しているものであり、鉄硫黄クラスターに関わる遺伝子 (*sufB*、*sufC*) も失われていた。*P. danica* の葉緑体機能をトランスクリプトームデータから推測したところ、鉄硫黄クラスター合成系、鉄硫黄クラスタータンパク質と多くの代謝系の遺伝子が検出されなかった。一方で、ヘム生合成、解糖、ペントースリン酸経路に関わる遺伝子が検出され、鉄硫黄クラスターを必要としない機能に衰退していた。

2.2 背景

ディクチオカ藻綱は不等毛藻類 (ストラメノパイル) に属する珪質鞭毛虫藻類である。珪質鞭毛虫藻類は、細胞に珪質の内骨格と、1-2本の鞭毛を持つ生物で、浮遊性の光独立栄養生物や混合栄養生物、もしくは非光合成性のバクテリア捕食性の従属静養生物である (Han et al., 2019、Sekiguchi et al., 2002、Eckford-Sope et al., 2016)。珪質鞭毛虫藻類には光合成藻類 9 属と光合成能を喪失した従属栄養性生物 4 属が報告されている。光合成性珪質鞭毛虫は *Dictyocha*、*Rhizochromulina*、*Florenciella*、*Pseudopedinella*、*Pedinella*、*Apedinella*、*Helicopedinella*、*Pseudochattonella*、*Verrucophora*、従属栄養性珪質鞭毛虫は *Actinomonas*、*Pteridomonas*、*Parapedinella*、*Ciliophrys* である (Han et al., 2019、Sekiguchi et al., 2002、Eckford-Sope et al., 2016)。後者にふくまれる *Pteridomonas danica* は非光合成のバクテリア捕食性生物である。先行研究から、*P. danica sekiguchi* 株の葉緑体ゲノムには光合成性葉緑体に見られる炭酸固定酵素リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) のラージサブユニット (*rbcL*) の遺伝子が検出されている (Sekiguchi et al., 2002)。非光合成藻類である *Cryptomonas paramecium* (クリプト藻類) や *Euglena longa* (ユーグレナ藻類) の葉緑体ゲノムも同様に、*rbcL* 遺伝子を保持していることが知られている (Donaher et al., 2009; Záhonová et al., 2016)。RbcL の分子系統解析から、系統樹の *P. danica* の枝長が光合成藻類と同程度であることから、*P. danica sekiguchi* 株の *rbcL* 遺伝子の進化速度には顕著な増大が見られなかったことが報告されている (Sekiguchi et al. 2002)。このことは、*P. danica sekiguchi* 株の葉緑体ゲノムの縮退が、進化の初期段階である可能性を示唆した。本研究は、先行研究で報告されている *P. danica* PT 株 (Keeling et al., 2014) のトランスクリプトームデータを再解析するとともに、他の *Pteridomonas* 株 2 株の葉緑体ゲノムを新たに解析し、*Pteridomonas* の非光合成性葉緑体ゲノムが保持する遺伝子数やコードされているタンパク質遺伝子の種類から、葉緑体機能を明らかにした。さらにその結果か

ら *Pteridomonas* の葉緑体ゲノム縮退過程における進化的制約について考察した。

2.3 材料・方法

単離・培養・DNA シーケンス

本研究では、*Pteridomonas* sp. YPF1301、*Pteridomonas danica* NY0221 をおもな解析対照とした。*Pteridomonas* sp. YPF1301 は海洋研究開発機構の矢吹 彬憲 博士とパリ南大学の雪吹 直治博士によって単離されたものであり、国立環境研究所（つくば市）微生物系統保存施設（NIES コレクション）NIES-3357 として保管されている株を実験に用いた。*Pteridomonas danica* NY0221 の葉緑体ゲノム配列は Anna Karnkowska 博士ら（ワルシャワ大学）によってシーケンスおよびアッセンブルされたものを使用した。

Pteridomonas sp. YPF1301 の全 DNA は DNeasy Plant mini kit（QIAGEN）を用いて回収した。2 週間培養した細胞を遠心機で回収し、400 μ l の Buffer AP1 と 4 μ l の RNase A を加え、65°C で 10 分間加熱した。次に、Buffer P3 を 130 μ l 加え、0-4°C で 5 分間冷却した。この粗雑液を高速遠心機を用いて 20000 rcf 下で 5 分間遠心分離を行い。上清を回収した。回収した上清に 675 μ l の Buffer AW1 を加え、DNeasy Mini spin column に移し、遠心機（8000 rcf、1 分間）で DNA をカラムに付着させた。次に DNA が付着したカラムに Buffer AW2 を 500 μ l 加え、高速遠心（8000 rcf、1 分間）を行った。再度、Buffer AW2 を 500 μ l 加え、高速遠心（8000 rcf、1 分間）を行った。最後に、100 μ l の Buffer AE をカラムに加え、室温で 5 分間静置後、遠心機で DNA を溶出した。

北海道システムサイエンス株式会社（日本）にて、この全 DNA と TruSeq Nano DNA Library Prep Kit（Illumina）を用いて 350-bp ライブラリーを構築し、Illumina HiSeq2500 プラットフォームを用いて 100 bp ペアエンドシーケンシングを行った。このシーケンシングにより、5,400 万リードが生成された。アダプタートリミングおよび品質フィルタリングは、FASTX-Toolkit

(http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) を用いて行った。解析された配列の長さ 75%以上で、20 以上の品質スコアを持つリード以外を除外し、4940 万のペアエンドリードが得られた。フィルタリングしたショートリードは、SPAdes-3.10.0 (Bankevich et al., 2012) のデフォルト設定でアセンブルした。

2.3.1 葉緑体 DNA 配列の解析

Pteridomonas sp. YPF1301 の DNA 解析で得られたアセンブルデータに対して、不等毛藻類 *Florenciella parvula* の葉緑体に保存されているタンパク質配列をクエリとした相同性検索により、葉緑体 DNA に由来する可能性の高い 5 つの AT 含有量の高いコンティグを検出した。このコンティグの末端間のギャップは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) とサンガーシーケンシングを用いて埋めた。PCR はコンティグ配列からプライマーを設計し、Ex taq® (TAKARA) を使用した。PCR の条件は、初期熱変性に 96°C 2 分、熱変性に 98°C 10 秒、アニーリングは 50-55°C 20 秒、伸長反応は 72°C 2 分の条件で行った。

Pteridomonas sp. YPF1301 と *P. danica* NY0221 の葉緑体ゲノムにコードされているタンパク質遺伝子は、MFannot (Beck and Lang, 2010) を用いて同定した。このアノテーションは、*Pteridomonas sp.* YPF1301 と *P. danica* NY0221 の葉緑体エンコードされたタンパク質配列を GenBank non-redundant (nr) データベースと比較して blastP 解析することで確認された。トランスファーRNA 遺伝子は、MFannot (https://megasun.bch.umontreal.ca/cgi-bin/dev_mfa/mfannotInterface.pl) および tRNAscan-SE (Lowe and Chan, 2016) を用いて同定した。

2.3.2 18S rRNA 遺伝子の系統解析

Sekiguchi et al. (2002) で報告されている *Pteridomonas danica* (Accession No : AB081640.1) の 18S rRNA 遺伝子配列をクエリーとして、BlastN 検索を行い、*Pteridomonas sp.* YPF1301 および *P. danica* NY0221 の 18S rRNA 遺伝子配列を

DNA アセンブリデータと、Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP; (Keeling et al., 2014)) で解析されたトランスクリプトームデータから *P. danica* PT 株の 18S rRNA 遺伝子配列をそれぞれ検索した。分子系統解析のデータセットを作成するために GenBank の Blast 検索を用いてデータセットを作成した。得られた配列は、MAFFT (Kato and Standley, 2013) を用いてアラインメントした。アラインメントが曖昧な部位は、BioEdit (Hall, 1999) を用いて手動で削除した。結果として得られた 42 タクサと 1,494 サイトからなるデータセットを、系統解析ソフト IQ-TREE 1.6.12 (Nguyen et al., 2015) を用いて、GTR + Γ + I モデル下で解析を行った。100 回試行によりブートストラップ確率を推定した。

2.3.3 葉緑体にコードされたタンパク質の系統解析

Pteridomonas sp. YPF1301 および *P. danica* NY0221 の葉緑体にコードされたタンパク質配列の進化速度を、他の非光合成種の不等毛藻類と比較するために、非光合成種 5 種を含む 44 種の葉緑体ゲノムから、同じタンパク質の配列を GenBank で検索した。得られた各タンパク質のホモログを、MAFFT (Kato and Standley, 2013) を用いてアラインメントした。アラインメントが曖昧な部位は、BioEdit (Hall, 1999) を用いて手動で削除した。アラインメント後の各タンパク質のデータセットを連結し、44 タクサと 6,660 部位からなる結果のデータセットを、系統解析ソフト IQ-TREE 1.6.12 (Nguyen et al., 2015) を用いて LG+C60+F-PMSF モデルの下で解析を行った。100 回試行によりブートストラップ確率を推定した。

2.3.4 *Pteridomonas sp.* YPF1301 の *rbcL* 遺伝子の探索

Sekiguchi et al., (2002) で報告されている *P. danica* sekiguchi の *rbcL* 遺伝子配列を基に、完全に一致する 2 つのプライマーセット、*rbcLF1/R1* および *rbcLF2/R2* を設計した (Table 2-2)。また、10 種の不等毛藻類 (*Pedinella sp.* AB081639、

Pteridomonas danica AB081642、*Pseudochattonella verruculosa* AB280607、*Synura borealis* HG514235、*Phaeodactylum tricornutum* MH064125。 *Nitzschia palea* MH113811、*Florenciella parvula* MK518352、*Pseudopedinella elastica* MK518353、*Dictyocha speculum* MK561359、*Rhizochromulina marina* MK561360) の RbcL アミノ酸配列を基に、ストラメノパイルの *rbcL* 遺伝子配列に特異的なプライマーを作製した。*Pteridomonas sp.* YPF1301 の DNA データからアクチン遺伝子配列を検索し、アクチンのプライマーセットを別途設計し対照実験に用いた (Table 2-2)。また、葉緑体でコードされた *rpl36* 遺伝子を増幅するプライマーセットを葉緑体ゲノムの配列を基に設計した (Table 2-2)。PCR 増幅は、98°C で 10 秒間の熱変性、55°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 2 分間の伸長反応を行い、これを 30 回繰り返した。

Sekiguchi et al. (2002) で報告されている *Pteridomonas danica* の *rbcL* 遺伝子配列に加え、GenBank に登録されているディクチオカ藻綱の *rbcL* 遺伝子配列を検索し、18 種のディクチオカ藻綱の配列と 7 種の外群配列を得た。得られた配列を、MAFFT (Kato and Standley, 2013) を用いてアラインメントした。アラインメントが曖昧な部位は、BioEdit (Hall, 1999) を用いて手動で削除した。結果として得られた 24 タクサ、1,364 塩基からなるデータセットについて、系統解析ソフト IQ-TREE 1.6.12 (Nguyen et al., 2015) を用いて、GTR + Γ + I + F モデル下で解析を行った。100 回試行によりブートストラップ確率を推定した。

2.3.5 *Pteridomonas spp.* の TufA

Florenciella parvula の葉緑体コードされている TufA タンパク質配列 (GenBank accession number: YP_009684446.1) を *Pteridomonas sp.* YPF1301 の DNA アセンブリに対するクエリとして tblastN 検索を行った。検出された TufA ホモログの配列に対して、MitoFates (Fukasawa et al., 2015) と ASAFind (Gruber et al., 2015) を行い、N 末端領域に存在する葉緑体標的シグナルまたはミトコンドリア標的

シグナルの有無を調べた。また、*Pteridomonas sp.* YPF1301 のミトコンドリアターゲットおよび葉緑体ターゲットの TufA 配列をクエリとして、*P. danica* PT のトランスクリプトームデータに対して tblastN を行い、*P. danica* PT のミトコンドリアおよび葉緑体 TufA 配列を探索した。相同性検索から得られた配列を基にデータセットを作成し、MAFFT (Kato and Standley, 2013) により葉緑体およびミトコンドリアを標的とする真核生物の TufA タンパク質データセットとアラインメントした (Kato and Standley, 2013)。アラインメントが曖昧な部位は、BioEdit (Hall, 1999) を用いて手動で削除した。結果として得られた 147 配列と 369 塩基からなるデータセットを、IQ-TREE 1.6.12 (Nguyen et al., 2015) を用いて LG+Γ+F モデル下で解析を行った。100 回試行によりブートストラップ確率を推定した。

2.3.6 *Pteridomonas danica* PT 株トランスクリプトームデータにおける葉緑体に保持されている鉄硫黄クラスタータンパク質の探索と葉緑体機能の推定

MMETSP (Keeling et al., 2014) から *P. danica* PT 株のアセンブルされたトランスクリプトームデータを取得した。*P. danica* PT 株の鉄硫黄クラスター合成 (サイトゾル、ミトコンドリア、葉緑体) に関わる遺伝子を、*Arabidopsis thaliana* (Couturier et al., 2013; Przybyla-Toscano et al., 2018) および珪藻類 (Kamikawa et al., 2017) のホモログをクエリとして tblastN 検索した。検出された鉄硫黄クラスタータンパク質のホモログを、GenBank の非冗長タンパク質データベースに対して blastP 検索した。ASAFind (Gruber et al., 2015) および Mitofates (Fukasawa et al., 2015) を用いて、検出されたホモログの葉緑体標的配列またはミトコンドリア標的配列の有無を評価した。

他に、*Arabidopsis thaliana* もしくは光合成性不等毛藻類の葉緑体機能で、鉄硫黄クラスターを必要とするタンパク質遺伝子をトランスクリプトームデータに対して tblastN 検索した。tblastN 検索に用いた光合成不等毛藻類の配列は、tblastN

検索を用いて *Arabidopsis thaliana* (Przybyla-Toscano ら、2018) で報告されている鉄硫黄クラスター含有タンパク質と相同性がある配列を用いた。*Arabidopsis thaliana* の配列から得た光合成不等毛藻類のホモログを GenBank の非冗長タンパク質データベースに対して、blastP 検索を行い、ASAFind (Gruber et al., 2015) および Mitofates を用いて、葉緑体標的配列またはミトコンドリア標的配列の有無を評価し、葉緑体標的配列を持つタンパク質を tblastN 検索に用いた。

2.4 結果および考察

2.4.1 *Pteridomonas* sp. YPF1301、*P. danica* NY0221 の葉緑体ゲノム

18S rRNA 遺伝子を用いた分子系統解析により、*Pteridomonas danica* (Sekiguchi et al., 2002) と MMETSP (Keeling et al., 2014) でトランスクリプトーム解析された *P. danica* PT が近縁であることが示された (Fig. 2-1)。

決定した *Pteridomonas* sp. YPF1301 の葉緑体ゲノム DNA データに対して *Pteridomonas* の近縁種の葉緑体ゲノム配列を用いて相同性検索し、*Pteridomonas* の葉緑体ゲノムの候補配列を割り出し、PCR とサンガーシーケンスを繰り返した結果、*Pteridomonas* sp. YPF1301 の葉緑体ゲノムが、両末端に短い逆反復配列領域がある長さ 54,809 bp の線状の構造であることが示唆された (Fig. 2-2)。線状配列の末端を繋げるために、PCR を複数回試みたが、葉緑体ゲノムの両末端のギャップを閉じることはできなかった (Fig. 2-2、3)。一方で、線状の構造を持つ他のゲノム (ミトコンドリアやテロメアの末端) は、ゲノム配列の両末端に短い逆反復配列領域を持つことが報告されている (Nosek et al., 2004; Janouškovec et al. 2013; Oborník and Lukeš, 2015; Salomaki et al. 2015; Kamikawa et al., 2018)。*Pteridomonas* sp. YPF1301 の葉緑体ゲノムは線状のゲノム配列と同様に、短い逆反復配列領域をゲノム配列の両末端に保存しているため、線状の葉緑体ゲノムであると推測した。また、*Pteridomonas* sp. YPF1301 の DNA データ内に、他の葉緑体ゲノムの候補配列が無いことから、*Pteridomonas* sp. YPF1301 の

葉緑体ゲノムをほぼ完全に解析できていると考えられる。

Pteridomonas sp. YPF1301 の葉緑体ゲノムの AT 含量は 79.63%であり、40 個のタンパク質遺伝子、24 個のトランスファーRNA (tRNA) 遺伝子、2 個のリボソーム RNA (rRNA) 遺伝子、および 3 個の機能不明なオープンリーディングフレーム (ORF) が含まれていることが明らかになった (Fig. 2-3)。葉緑体ゲノムのタンパク質遺伝子は、転写に関わる *rpl* や *rps* 遺伝子を 35 個、翻訳に関わる *rpo* 遺伝子を 4 個、タンパク質分解に関わる *clpC* 遺伝子で構成されていた。葉緑体ゲノムの 57.8%を tRNA や rRNA、タンパク質遺伝子が占めており、ORF を含めるとコード領域は 62.3%に相当した (Table 2-1)。逆に、葉緑体ゲノムの 3 分の 1 以上が非コード領域であった。不等毛藻類の葉緑体ゲノムは一般的に、rRNA オペロンの 2 つの逆反復配列 (IR) 領域とそれらに挟まれた 2 つのシングルコピー領域 (SSC および LSC) からなる 4 分構造をとることが知られている (Han et al., 2019)。しかし、*Pteridomonas* sp. YPF1301 の葉緑体ゲノムは rRNA オペロン領域をもたず、4 分構造をとらないことが明らかになった。

P. danica NY0221 の葉緑体ゲノムは、長さ 33,539 bp の環状ゲノムであった (Fig. 2-2)。ゲノム全体の 90.26%が tRNA や rRNA、タンパク質遺伝子などのコード領域によって占められていた。AT 含量は 75.24%であり、39 個のタンパク質遺伝子、24 個の tRNA 遺伝子、2 個の rRNA 遺伝子で構成されていた。含まれるタンパク質遺伝子は、翻訳に関わる 35 の *rpl* や *rps* 遺伝子、転写に関わる 4 つの *rpo* 遺伝子で構成され、タンパク質分解や鉄硫黄クラスター、光合成などに関わる遺伝子は全て欠失していた。また、*Pteridomonas* sp. YPF1301 株と同様に、rRNA オペロン領域を欠いていた。コード領域が葉緑体ゲノムの 90%以上を占める点は、コード領域が 62 %程度である *Pteridomonas* sp. YPF1301 の葉緑体ゲノムと大きく異なる特徴の 1 つである。一般に、非光合成性不等毛藻類の葉緑体ゲノムのコード領域は 80%以上であることから、*P. danica* NY0221 の葉緑体ゲノムのコード領域が占める割合は他の非光合成性不等毛藻類の葉緑体ゲノムに比較的似

ており (Kamikawa et al., 2018; Dorrell et al., 2019)、コード領域が占める割合が 62%程度の *Pteridomonas sp.* YPF1301 の葉緑体ゲノムがむしろ例外的であると考えられる。

2.4.2 *Pteridomonas sp.* YPF1301、*P. danica* NY0221 の葉緑体ゲノムの組成

Pteridomonas sp. YPF1301 の葉緑体ゲノムにコードされている 40 個のタンパク質は、翻訳に関わる 35 個のタンパク質 (リボソームタンパク質)、転写に関わる 4 個のタンパク質 (RNA ポリメラーゼ)、タンパク質分解に関わる 1 つの遺伝子 (ClpC サブユニット) からなっていた。*P. danica* NY0221 の葉緑体ゲノムには、それらのうち ClpC 遺伝子、2 つの翻訳タンパク質 (*rps2*, *rpl32*) が欠失していた。その一方で、翻訳伸長因子 Tu 遺伝子 (*tufA*) が含まれていた。また、本研究で用いた *Pteridomonas sp.* YPF1301、*P. danica* NY0221 の葉緑体ゲノムには、*P. danica* において報告されている *rbcL* 遺伝子 (Sekiguchi et al., 2002) に対応する配列は得られなかった (Fig. 2-3)。

Pteridomonas sp. YPF1301、*P. danica* NY0221 の両葉緑体ゲノムでは、遺伝子組成やゲノムの大きさが相互に異なる一方で、タンパク質遺伝子の配置はほぼ同じであった。ただし、2 つのタンパク質遺伝子 (*rpl33*, *rpl11*) とつのタンパク質遺伝子の集合体が逆向きになっていた (Fig. 2-3、4)。また、tRNA をコードする遺伝子の順番が大きく異なっていた。これらのことは、葉緑体ゲノムの進化の過程で、遺伝子の再配置が起きたことを示唆する。光合成性ディクチオカ藻類の葉緑体ゲノムは tRNA やタンパク質遺伝子の再配置が起きている。一方、*Pteridomonas spp.* の葉緑体ゲノムは、他のディクチオカ藻類とは対照的にタンパク質をコードする遺伝子の順番には顕著な影響を与えていないように思われる (Fig. 2-4 ; Han et al., 2019)。

両葉緑体ゲノムは、小サブユニット、大サブユニットリボソーム RNA のそれぞれを 1 コピーずつコードしていた。しかし、ゲノム上のリボソーム RNA 遺伝

子の位置は両葉緑体ゲノムで異なっていた。*P. danica* NY0221 では小サブユニットおよび大サブユニットのリボソーム RNA 遺伝子が隣接しており、同一のストランドにコードされていた。これは、他のディクチオカ藻綱 *Dictyocha speculum* (Han et al., 2019) や、*Pseudo-nitzschia multiseriata* (珪藻 ; Cao et al., 2016)、ユーグレナ藻 (Karnkowska et al., 2018)、緑藻 (Turmel et al., 2017) と同様である。しかし、*Pteridomonas* sp. YPF1301 では、小サブユニット、大サブユニットのリボソーム RNA 遺伝子が異なるストランドに存在し、その間には、18 個のタンパク質遺伝子が存在していた。リボソーム RNA 遺伝子がオペロンを構成していないこのような配置は、寄生性の非光合成性緑藻 *Helicosporidium* sp. の葉緑体ゲノムに報告されている (Koning and Keeling, 2006)。

これまでに 4 種の光合成性ディクチオカ藻の葉緑体ゲノムが決定されており、それらのサイズは 108-140kb であることが報告されている。光合成ディクチオカ藻の葉緑体ゲノムには、光合成、炭酸固定、クロロフィル合成に関わるタンパク質遺伝子が 37-42 個、翻訳に関わる遺伝子が 42-44 個、転写に関わる遺伝子が 5-6 個、タンパク質の輸送に関わる遺伝子が 4-5 個、タンパク質分解に関わる遺伝子が 1 個コードされている。それらの光合成性ディクチオカ藻の葉緑体ゲノムと比較すると、*Pteridomonas* sp. YPF1301、*P. danica* NY0221 の葉緑体ゲノムでは、翻訳と転写の遺伝子が保持されているのみで、その機能が大規模に縮退していた。その結果として、両 *Pteridomonas* の葉緑体ゲノムサイズが、光合成ディクチオカ藻綱の葉緑体ゲノムの 1/2 以下に縮退したものと考えられる (Fig. 2-3B)。また両 *Pteridomonas* の葉緑体ゲノムは、アピコンプレクサや不等毛藻類、非光合成紅藻など、紅藻由来の葉緑体を有する他の非光合成種の葉緑体ゲノムと比較しても、コードする遺伝子の数が少なかった (Fig. 2-6)。さらに、緑藻や植物の系統の非光合成種に葉緑体ゲノムと比較しても、その傾向は変わらなかったことから、*Pteridomonas* sp. YPF1301、*P. danica* NY0221 の葉緑体ゲノムは、相対的に縮退が進んだ進化段階にあるものと推定された。

さらに、*Pteridomonas sp.* YPF1301、*P. danica* NY0221 の葉緑体ゲノムのタンパク質遺伝子は、分子系統樹において長い枝長を示した。枝長は座位当たりの置換数を反映するため、*Pteridomonas sp.* YPF1301、*P. danica* NY0221 葉緑体ゲノム遺伝子はその進化速度が大きいことを強く示唆している (Fig. 2-5)。このことも、両葉緑体ゲノムが縮退の進んだ進化段階にある傍証の 1 つと考えられる。

2.4.3 *P. danica* NY0221 における *clpC* の喪失

P. danica NY0221 の *clpC* の欠落には、単純な遺伝子欠失と内部共生の遺伝子が水平伝播した可能性があった。そこで *P. danica* NY0221 の DNA シーケンスデータに対して相同性検索を行ったが、*clpC* 遺伝子の候補配列は検出されなかった。*P. danica* NY0221 と *Pteridomonas sp.* YPF1301 の分子系統関係から、*P. danica* NY0221 は *Pteridomonas sp.* YPF1301 と分岐した後 (Fig. 2-1) に、*clpC* 遺伝子を喪失したと考えられる。

2.4.4 *Pteridomonas sp.* YPF1301 における *tufA* 遺伝子の水平伝播

Pteridomonas sp. YPF1301 の *tufA* 遺伝子の欠落にも、単純な遺伝子欠失と内部共生の遺伝子が水平伝播した可能性があった。そこで、*Pteridomonas sp.* YPF1301 の DNA データから *tufA* 遺伝子を含む配列を検索したところ、葉緑体標的配列が付加した *tufA* 遺伝子断片を含む 2 つの GC リッチなコンティグが検索された。そのうちの 1 つのコンティグにイントロンが含まれていた。このことは、*tufA* 遺伝子が *Pteridomonas sp.* YPF1301 の核ゲノムにコードされていることを示唆している。つまり、葉緑体ゲノムにコードされていた *tufA* 遺伝子が水平伝播により核に移行した可能性が高いことを示している。検索された 2 つのコンティグにコードされている *tufA* 遺伝子は、それぞれ TufA の半分ずつをコードし、1 つが N 末端側、もう一つが C 末端側をコードしていた (Fig. 2-7A、B)。いずれの *tufA* 遺伝子断片の TufA の N 末端にも、シグナルペプチドとトランジットペプチド

の葉緑体標的化配列が付加されており (Fig. 2-7A、B)、このこともこの遺伝子が核ゲノムにコードされていることを支持していた。

検索された TufA が葉緑体ゲノムから移行したことをさらに検証するために、この TufA の分子系統的位置を解析したところ、TufA の N 末端側配列が、ブートストラップ値 64% で支持されて、*P. danica* NY0221 葉緑体にコードされている TufA と単系統を形成した (Fig. 2-7C)。また、*Pteridomonas* sp. YPF1301 と MMETSP のトランスクリプトームデータから検出された核コード由来の TufA の C 末端配列は単系統を形成した (ブートストラップ値=61% ; Fig. 2-7C)。いずれも、*Pteridomonas* の単系統のブートストラップ値は低く、解析に使用したタンパク質のデータセットの系統情報が不十分である可能性が高い。いずれも、*Pteridomonas* sp. YPF1301 および *P. danica* の *tufA* 遺伝子は葉緑体ゲノムの *tufA* と単系統を形成するため、2 株の *tufA* 遺伝子は葉緑体ゲノムから核ゲノムに水平伝播したことを支持する。この結果は、縮退した非光合成の葉緑体ゲノムが遺伝子喪失だけでなく、非光合成性葉緑体から核への遺伝子流動によって形成し、光合成能喪失後も未だ転移した遺伝子を利用している例を示していると考えられる。

2.4.5 *rbcL* 遺伝子の喪失

Pteridomonas sp. YPF1301、*P. danica* NY0221 の葉緑体ゲノムから、RubisCO の *rbcL* 遺伝子が欠失していたことは、*Pteridomonas* 属の葉緑体ゲノムの進化を考えるうえで特筆すべき点である。両株の近縁種である *P. danica* str. Sekiguchi には、それらの遺伝子が保持されていることが報告されていた (Sekiguchi et al., 2002)。*rbcL* 遺伝子が核ゲノムに水平伝播している可能性を考え、既に報告されている *P. danica* str. Sekiguchi の *rbcL* 配列をクエリとして *Pteridomonas* sp. YPF1301 の DNA データから *rbcL* 配列を探索した。しかし、候補配列は全く検索されなかった。また、*P. danica* str. Sekiguchi の *rbcL* 配列に完全一致する

ライマーや、既報の RbcL 配列から設計した縮重プライマーを用いて PCR 増幅を試みても、*Pteridomonas sp.* YPF1301 の全 DNA を鋳型にした際の断片の増幅は見られなかった (Fig. 2-8)。また相同性検索では RubisCO の小サブユニット rbcS 遺伝子も検出されなかった。*P. danica* NY0221 の DNA データに対しても同様の検索を行ったが、*rbcL* と *rbcS* 遺伝子ともに、検索されなかった。これらの結果は、先行研究で報告された *P. danica str Sekiguchi* の葉緑体ゲノムに *rbcL* 遺伝子が保持されていることと異なっていた。

この *Pteridomonas* 属の非光合成性葉緑体ゲノム上の *rbcL* 遺伝子の有無の相違には、*Pteridomonas sp.* YPF1301 と *P. danica* NY0221 において特異的な *rbcL* 遺伝子の欠失が起こった可能性と、*P. danica str Sekiguchi* において特異的な *rbcL* 遺伝子の獲得が起こった可能性、*Sekiguchi* らの実験の際に、コンタミネーションなどのアーティファクトに由来して検出された可能性の 2 つが考えられた。これらの可能性を評価するために、*Sekiguchi et al.* (2002) よりも OUT 数の多いデータセットを用いて *P. danica str Sekiguchi* の *rbcL* 遺伝子の分子系統学的位置の再解析を行ったところ、報告されている *P. danica* の *rbcL* 遺伝子は光合成性ディクチオカ藻 *Pseudopedinella sp.* CCMP1476 や *Pedinella sp.* と単系統群 (ブートストラップ値=90% ; Fig. 2-9) を形成した。一方、非光合成性ディクチオカ藻 *Ciliophrys infusionum* (*Sekiguchi et al.* 2002) の *rbcL* 遺伝子は、*Rhizochromulina* の単系統内に帰属し (ブートストラップ値=100% ; Fig. 2-9)、*Rhizochromulina marina* と単系統群 (ブートストラップ値=100% ; Fig. 2-9) を形成した。

次に、核にコードされている 18S rRNA の分子系統解析 (Fig. 2-1) によって *P. danica str Sekiguchi* の分子系統学的位置を明らかにしたところ、*P. danica str Sekiguchi*、*Pteridomonas sp.* YPF1301、*P. danica* NY0221 はいずれも、単系統群を形成した (ブートストラップ値=85% ; Fig. 2-1)。一方、*C. infusionum* は *Rhizochromulina* と姉妹群を形成し、*P. danica str Sekiguchi* とは、異なる系統に帰属した。18S rRNA 遺伝子配列に基づく *P. danica str Sekiguchi* の分子系統関係と、

P. danica str Sekiguchi の配列として報告されている *rbcL* の分子系統関係は明らかに矛盾していた。これらの結果は、*Pteridomonas* sp. YPF1301 と *P. danica* NY0221 において特異的な *rbcL* 遺伝子の欠失が起こった可能性を棄却し、残りの2つの可能生、*P. danica* str Sekiguchi や *C. infusionum* の *rbcL* 遺伝子が垂直伝播に由来するものではなく、特定の生物からの水平伝播によって獲得された可能性と、*P. danica* str Sekiguchi に検出された *rbcL* 遺伝子がコンタミネーションに由来する混入遺伝子であった可能性を支持した。残念ながら本研究では、これらの両可能性のうちどちらがより適切な解釈であるかに関する結論は出すことができなかった。*Pteridomonas* 属内の *rbcL* 遺伝子喪失過程の詳細に関するさらなる解明には、すでに、*P. danica* str Sekiguchi が系統保存されていないことから、*P. danica* str Sekiguchi の再分離あるいは、複数の *Pteridomonas* を単離し、葉緑体ゲノムの詳細な解析が必要である。

2.4.6 鉄硫黄クラスター合成遺伝子の消失

Pteridomonas sp. YPF1301、*P. danica* NY0221 の葉緑体ゲノムから、鉄硫黄クラスター合成に関わる *sufC* 遺伝子が欠失していたことも、*Pteridomonas* 属の葉緑体ゲノムの進化を考えるうえで特筆すべき点である。*sufC* 遺伝子は、*sufB* 遺伝子とともに、光合成性ディクチオカ藻の葉緑体ゲノムにおいて保存されており、また、紅藻由来の葉緑体をもつ二次共生生物から派生した非光合成真核生物においても、ごく一部の例外を除いて保持されている (Fig. 2-6) (Janouškovec et al., 2015; Dorrell et al., 2019; Han et al., 2019)。鉄硫黄 (Fe-S) クラスターの形成には、葉緑体ゲノムにコードされているタンパク質 *sufB* および *sufC*、核ゲノムにコードされている *sufA*、*sufD*、*sufE* および *sufS* が必要である (Lill, 2009; Balk and Schaedler, 2014; Przybyla-Toscano et al., 2018)。

Pteridomonas 葉緑体ゲノムには *sufB* および *sufC* が欠失していた。核に移行している可能性を検討するため、核コードの Suf 遺伝子を探索することとした。具

体的には、*Arabidopsis thaliana* (Przybyla-Toscano et al., 2018) と光合成性不等毛藻類の Suf ホモログをクエリとして、トランスクリプトームデータから Suf ファミリー (*sufA*, *sufB*, *sufC*, *sufD*, *sufE*, *sufS*; Lill, 2009; Balk and Schaedler, 2014) を探索した。しかし、Suf ファミリーのホモログは検出されなかった (Fig. 2-10)。この結果は、*Pteridomonas* が葉緑体の Suf のみならず、葉緑体ゲノム内で機能する Suf ファミリー遺伝子一切を欠失していることを示した。一方、ミトコンドリアおよびサイトゾルの Fe-S クラスタ形成に関わる遺伝子は存在することが知られている (Fig. 2-10; Lill, 2009; Balk and Schaedler, 2014)。このことから、*Pteridomonas* の葉緑体が保持する反応には Fe-S クラスタを必要としないことが示された。

Fe-S クラスタは、光合成、アミノ酸合成、窒素・硫黄同化、カロテノイド合成、ビタミン・チアゾール合成、クロロフィル合成・分解、リポ酸合成など、葉緑体における様々な代謝に関わるタンパク質に必須な構造である (Przybyla-Toscano et al., 2018)。そこで、*Pteridomonas danica* PT のトランスクリプトームデータから Fe-S クラスタを補因子として必要とする葉緑体標的タンパク質を調査した。*P. danica* PT の葉緑体で行われている反応には、いずれも Fe-S クラスタもつタンパク質を必要としない、シキミ酸経路、ヘム合成、解糖系、ペントースリン酸経路に関わるタンパク質のみが検出された (Fig. 2-10)。一方、*Arabidopsis thaliana* (Przybyla-Toscano et al., 2018) と光合成性不等毛藻類で検出される鉄硫黄クラスタタンパク質、鉄硫黄クラスタを必要とする代謝系の遺伝子を探索したが、それらが関与する代謝系はすべて検出できなかった (Fig. 2-11)。

先行研究から、葉緑体 *suf* 遺伝子が欠損した *T. parva* 株は、生育が阻害され、葉緑体の形状が崩壊することが報告されている (Gisselberg et al., 2013)。そのため、非光合成性葉緑体は、葉緑体を維持するために *suf* 遺伝子は必要不可欠であると思われていた。しかし、本研究では、*P. danica* の葉緑体 *sufB* 遺伝子はおそ

らく全ゲノムから欠如していることを示した。この結果は、上述のアピコンプレクサとは異なり、鉄硫黄クラスター喪失した後も葉緑体を維持できることを示した。本系統においては葉緑体喪失進化の過程において、葉緑体機能は NADPH を用いる代謝 (Fig. 2-11) のみ残していることが示唆された。

2.4.7 新たに見えてきた葉緑体ゲノム消失の進化的制約仮説

Pteridomonas spp.の葉緑体ゲノムに鉄硫黄クラスターの形成に必要な遺伝子が欠失しており *sufB* 遺伝子も保持されていなかったことは、*sufB* 遺伝子が葉緑体ゲノムの喪失に対する進化的制約であると考えられてきたことと矛盾した (上述)。葉緑体ゲノムの消失に対する進化的制約に関する別の仮説として、「*clpC* 遺伝子が葉緑体ゲノムに保持されている必要があること」がアピコンプレクサ *Theileria parva* の葉緑体ゲノムの喪失に対する進化的制約として提案されている (Janouškovec et al., 2015, 2019)。しかし、*P. danica* NY0221 は *clpC* 遺伝子を葉緑体ゲノムから喪失しているため、この仮説も *Pteridomonas* spp.の葉緑体ゲノムには当てはまらない。そこで、*Pteridomonas* spp.に関しては、葉緑体ゲノムに保持されている *trnE* 遺伝子が葉緑体ゲノムの喪失に対する進化的制約として働いている可能性を示した (Barbrook et al., 2006; Hadariová et al., 2018)。葉緑体の機能の 1 つであるヘム合成は、*trnE* 遺伝子の転写物から合成された tRNA-Glu と、tRNA-Glu 合成酵素によって合成されたグルタミン酸アミノアシル tRNA から始まる (Barbrook et al., 2006)。*trnE* 遺伝子は、*P. danica* NY0221 の葉緑体ゲノムにコードされている遺伝子のなかで唯一、遺伝子発現に無関係な機能を有するものである。また、*P. danica* NY0221 の葉緑体ゲノムに転写に関わる遺伝子 (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2*) および翻訳に関わる遺伝子 (*tufA*, *rps*, *rpl*, rRNA, tRNAs) が保存されていることは、*trnE* 遺伝子を転写するためであると考えられる。さらに、既知の非光合成性葉緑体ゲノムのすべてにおいて保存されている (Barbrook et al., 2006; Wicke et al., 2016; Hadariová et al., 2018)。これらの

ことから、*trnE* 遺伝子を葉緑体ゲノム上に保持することが葉緑体ゲノム消失の進化的制約となっている可能性は、アピコンプレクサを除くすべての非光合成性葉緑体に当てはまる可能性を有している。

アピコンプレクサの葉緑体ゲノムが例外的な理由には、アピコンプレクサ型のヘム合成経路が、ミトコンドリアにおけるグリシンとコハク酸からのヘム前駆体合成によって開始される経路であり、tRNA-Glu からの合成ではないからであると考えられる (Oborník and Green, 2005)。

一方で、光合成を行わない藻類や陸生植物の中には、葉緑体ゲノムを完全に欠いているものの、葉緑体内で tRNA-Glu に依存したヘム生合成を保持しているものも知られている。その場合は、葉緑体内に tRNA-Glu が輸送されていることが示唆されている (Dorrell et al., 2019)。つまり、非光合成生物の葉緑体が外部から tRNA を効率的に入手できるようになれば、*trnE* 遺伝子を含む tRNA 遺伝子を葉緑体ゲノム上に保持する必要はなくなる。実際、いくつかの非光合成陸上植物は、サイトゾルもしくはミトコンドリアから特定の tRNA を入手する仕組みを有していることが示唆されている (Wicke et al., 2016; Barbrook et al., 2006)。これらのことも、*trnE* 遺伝子を葉緑体ゲノム上に保持することが葉緑体ゲノム消失の進化的制約となっている可能性を支持する。

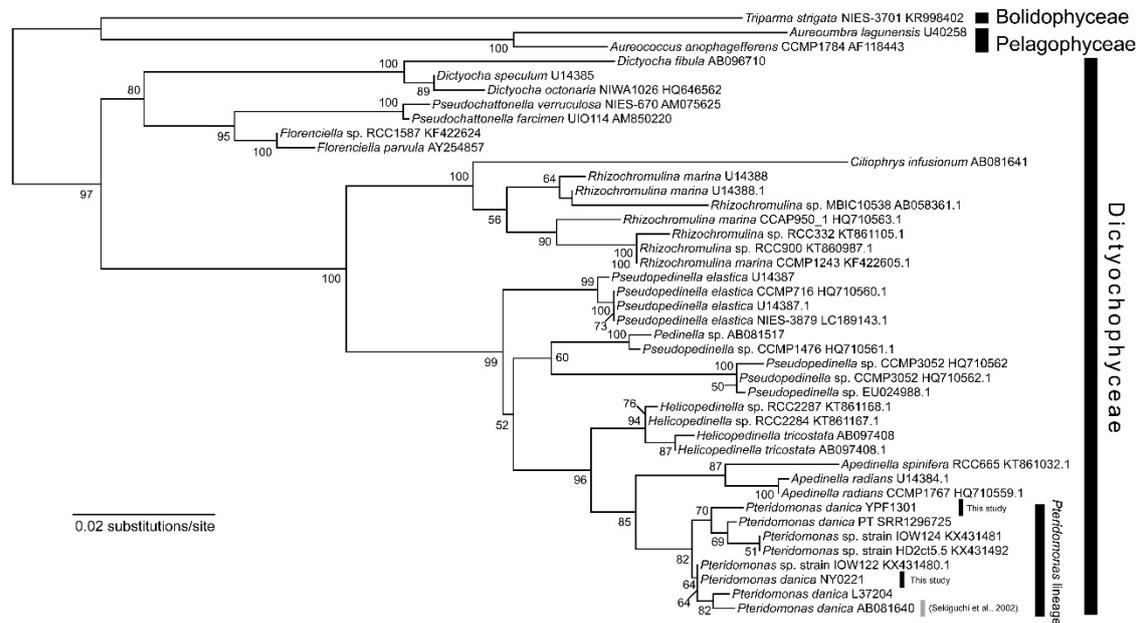


Fig. 2-1 : 18S rRNA 配列に基づく最尤法分子系統樹。分子系統樹は IQ-TREE 1.6.12 を用いて GTR+ Γ +I モデルで解析した。ブートストラップ値は ≥ 50 のみを示した。灰色の線は *rbcL* 遺伝子が報告された *Pteridomonas danica* を示した (Sekiguchi et al., 2002)。

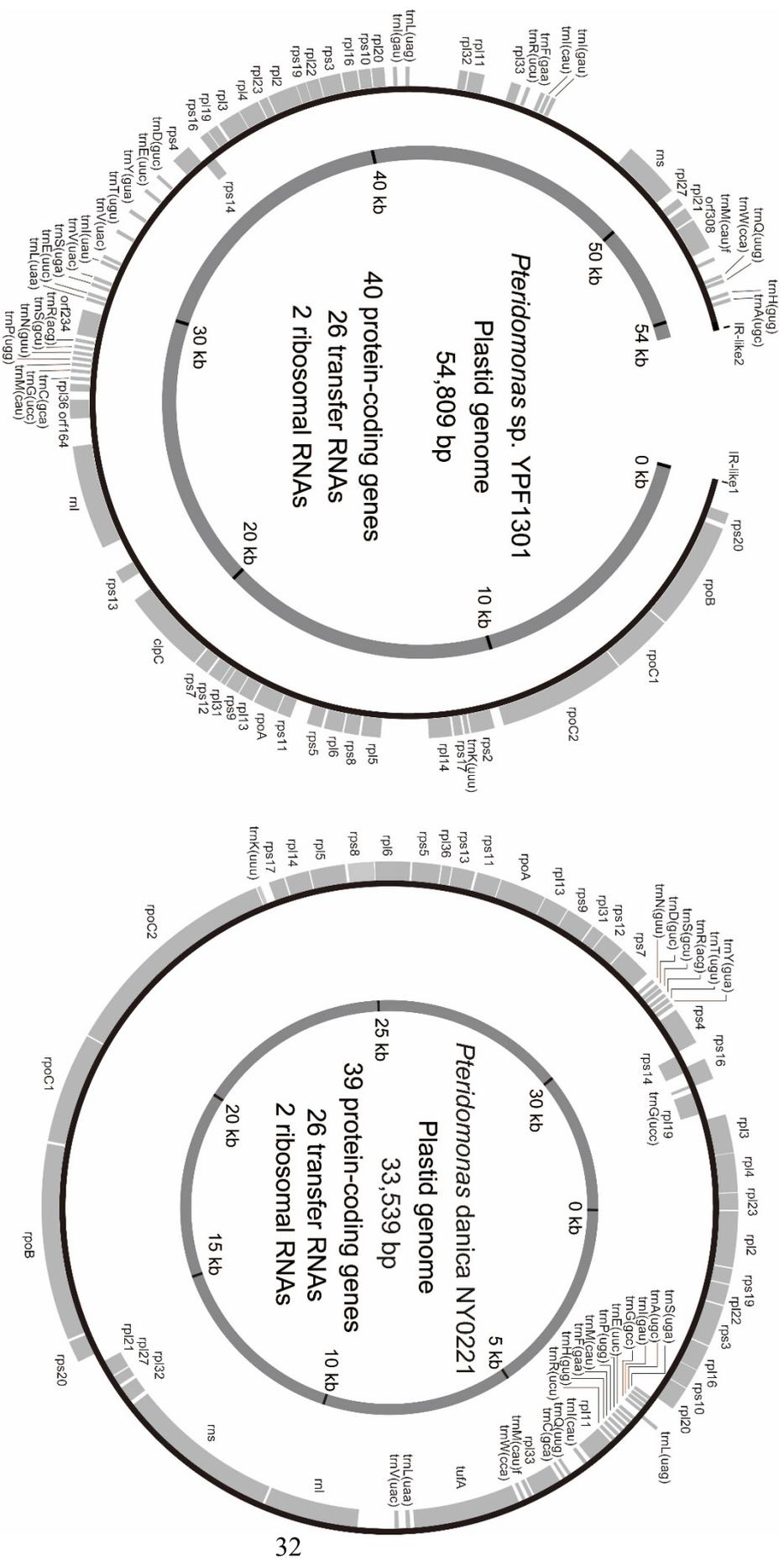


Fig. 2-2 : *Pteridomonas* sp. YPF1301、*P. danica* NY0221 の葉緑体ゲノム。灰色のボックスはタンパク質遺伝子を示している。灰色の線は tRNA 遺伝子を示している。

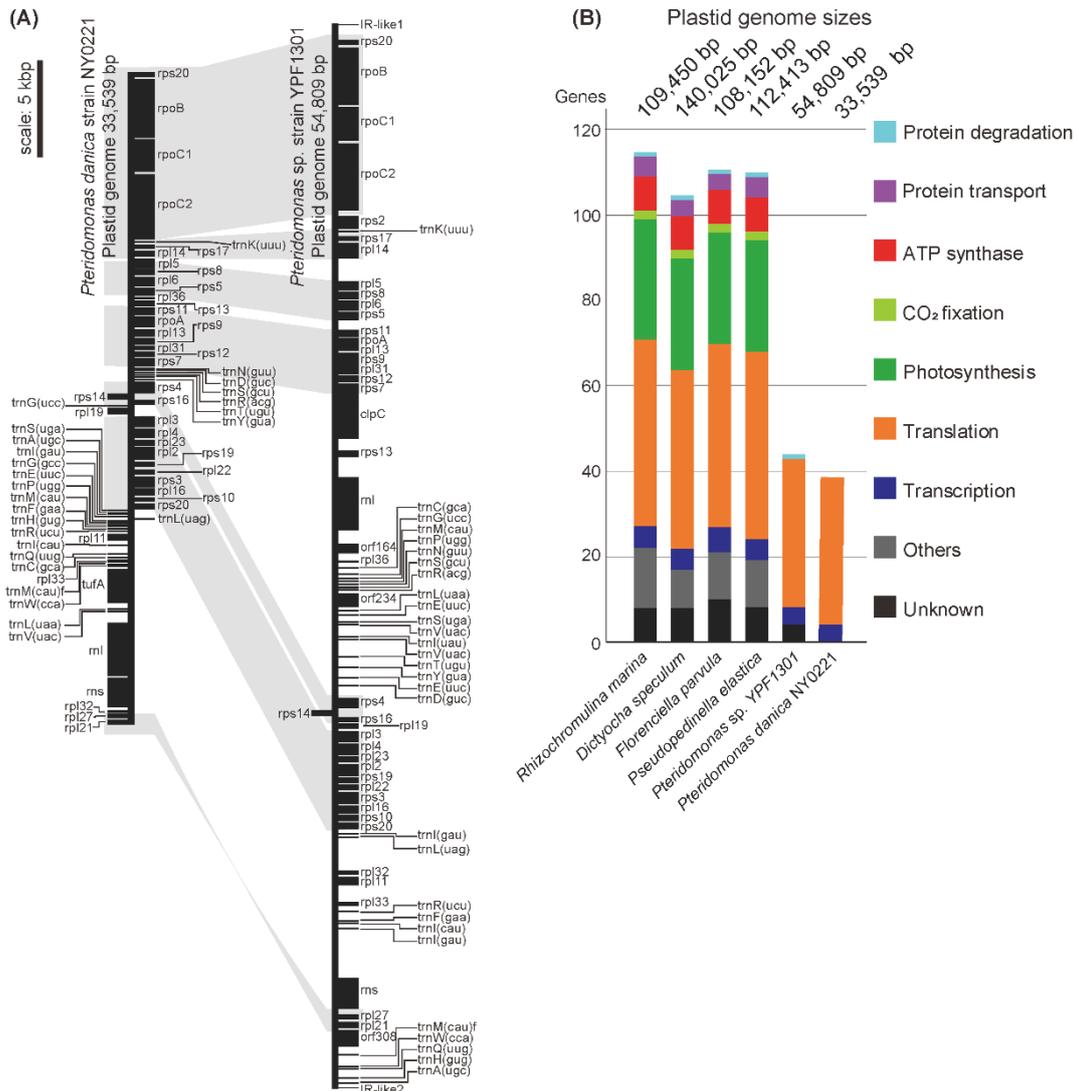


Fig. 2-3 : *Pteridomonas* sp. YPF1301 と *P. danica* NY0221 の葉緑体ゲノムのシンテニー。A: 葉緑体ゲノムマップ。ゲノムは線状に示しているが、*P. danica* NY0221 は環状である (Fig. 2-2)。タンパク質遺伝子の領域は黒の箱で示している。トランスファーRNA は黒の線で示している。同じ順序で保存されている領域は灰色で強調している。B: ディクチオカ藻綱の光合成種、*Pteridomonas* sp. YPF1301、*P. danica* NY0221 の葉緑体ゲノム間のサイズとタンパク質遺伝子の比較 (Han et al.,2019)。各色調は葉緑体機能の種類を示す。タンパク質分解 (*clpC*) を水色、輸送タンパク質 (*sec*、*tatC*) を紫色、ATP 合成酵素 (*atp*) を赤、炭酸固定 (*rbcL*、

rbcS) を薄緑色、光化学系タンパク質 (*psa*、*psb*、*pet*) を緑色、翻訳に関わる遺伝子 (*rps*、*rpl*、*tufA*) をオレンジ色、転写に関わる遺伝子 (*rpo*) を青、既知のその他の遺伝子を灰色、未知の機能遺伝子を黒色 (*orf*、*ycf*) で示した。

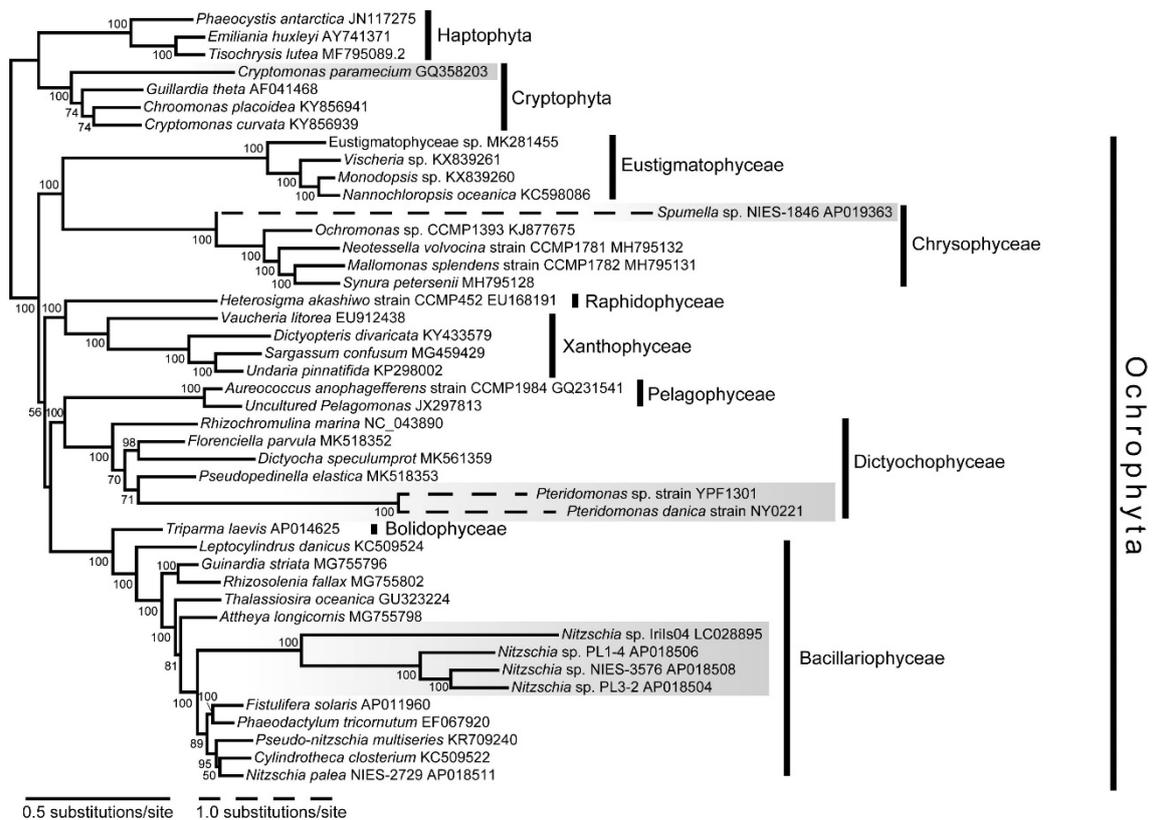


Fig. 2-5 : 38 葉緑体タンパク質のデータセットを用いた最尤分子系統樹。葉緑体にコードされている 38 個タンパク質配列を結合し、44 タクサと 6,660 サイトのデータセットを作成した。このデータセットと IQ-TREE 1.6.12 を用いて LG+C60+F+Γ-PMSF モデルで解析した。ブートストラップ値は ≥ 50 のものを示す。非光合成性生物を灰色で強調した。

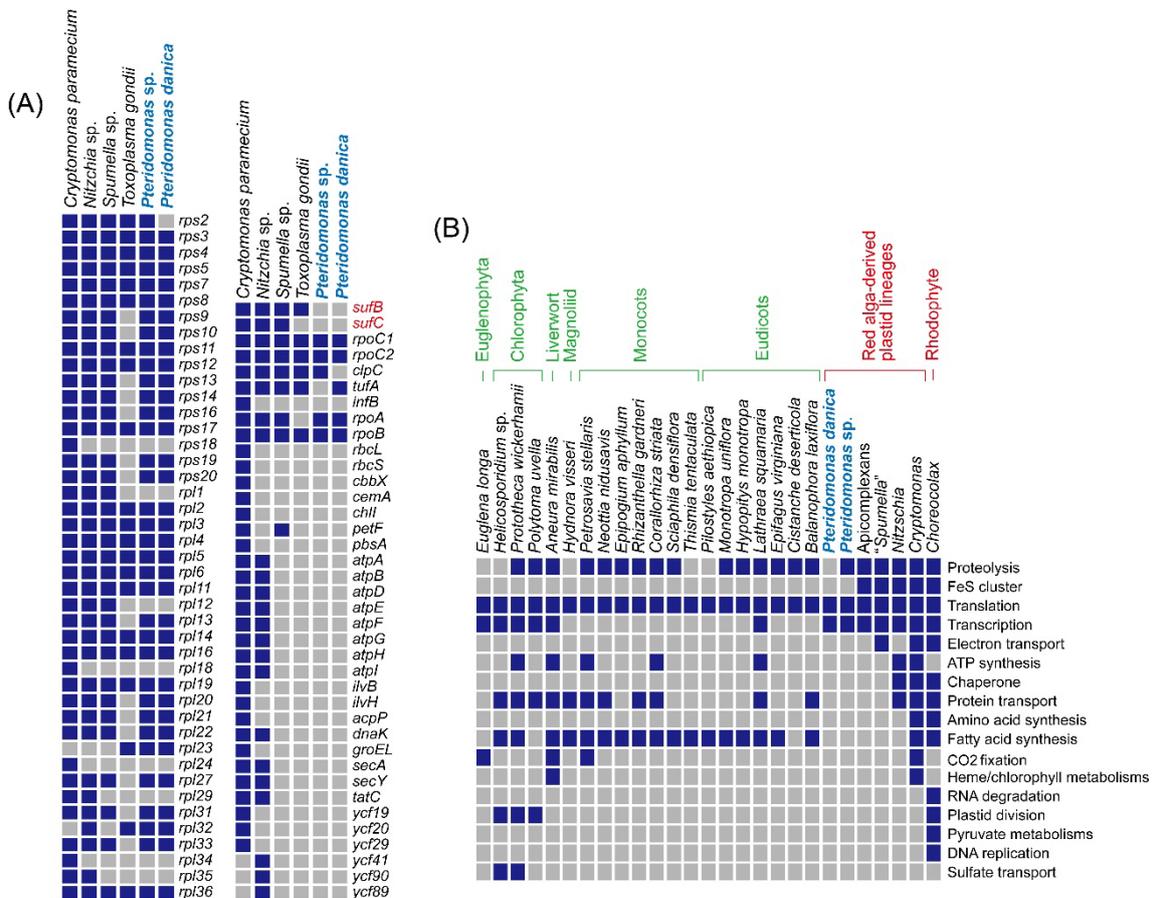


Fig. 2-6 : 非光合成生物の葉緑体ゲノムの遺伝子組成と代謝機能の比較。A : 非光合成生物の葉緑体ゲノムの遺伝子含有量と紅藻由来葉緑体の比較。 *Nitzschia* sp. NIES-3581 (Bacillariophyceae; GenBank no. AP018508; (Kamikawa et al., 2015))、 *Cryptomonas paramecium* (Cryptophyta; GenBank no. GQ358203; (Donaher et al., 2009))、 *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa; GenBank no. U87145; (Köhler et al., 1997))、 "*Spumella*" sp. NIES-1846 (Chrysophyceae; GenBank no. AP019363; (Dorrell et al., 2019)) を比較のために使用した。検出された遺伝子は青色、非検出の遺伝子は灰色で示している。B : 非光合成葉緑体ゲノムにコードされている機能の比較。水色で強調している *Pteridomonas* spp.以外の生物データは Dorrell et al. (2019) と Hadariová et al. (2018) から得られたデータを基に作成した。

(A) *Pteridomonas* sp. YPF1301 (1) **M K S I A V S L C F V V M T S F V T D A F M I K H O S S F I R Y N S R I S P L K A I T G K R** * * * * * (58)
 N-terminal half of TuFA protein

Pteridomonas danica NY (1) M V N K N S L S K K I H V N I G T I G H (20)
Dityocha speculum (1) M A R E K F E R S K P H V N I G T I G H (20)
Florencia parvula (1) M A R E K F E R S K P H V N I G T I G H (20)
Pseudopedinella elastica (1) M A R E K F E R S K P H V N I G T I G H (20)
Rhizochromulina marina (1) M A R E K F E R S K P H V N I G T I G H (19)

(B) *Pteridomonas* sp. YPF1301 C-terminal half of TuFA protein (1) **M R V F Y L I G F F I S E S V D A F V P F S T F A S N F G Y K F S A L S T Q S** (40)
Pteridomonas danica PT C-terminal half of TuFA protein (1) **M K I S L F I I L H L F R I D A F V P S S F L O N V P L K I F E A T S A S I S T K Q K H M R** (47)
Pteridomonas sp. YPF1301 N-terminal half of TuFA protein (239) **D F M D K I D E Y I P L P K R A L D K P F L L A V E D V F S V T G R G T V A T G L I E S E G V** (285)
Pteridomonas danica NY0221 (201) **M K V D F I D S Y I Q V P T R D I E K P F L M G V E D V F S I T G R G T V A T G R I E R G K I** (247)
Dityocha speculum (201) **M L S E I I D S I E T P V R D T E K F L M A V E D V F S I T G R G T V A T G R I E R G V I** (247)
Florencia parvula (201) **L M D S V D E Y I P T R D T E K F L M A V E D V F S I T G R G T V A T G R I E R G V I** (247)
Florencia parvula (201) **L M D S V D E Y I P T R D T E K F L M A V E D V F S I T G R G T V A T G R I E R G V I** (247)
Pseudopedinella elastica (201) **L M D E V D N Y I P T P E R D T E K F L M A V E D V F S I T G R G T V A T G R I E R G V I** (247)
Rhizochromulina marina (200) **A L M D E V D N Y I P T P E R D T E K F L M A V E D V F S I T G R G T V A T G R I E R G V I** (246)

Pteridomonas sp. YPF1301 C-terminal half of TuFA protein (41) **F F L D S S T K G Q F P R C M I A N A - F T S K D C E L P R - N A N L A G D N V G V L L R G I** (85)
Pteridomonas danica PT C-terminal half of TuFA protein (47) **C H H N H L L Q M K S Y V Q N I E T - N V G N S V N H F I - N A N L A G D N V G V L L R G I** (92)
Pteridomonas sp. YPF1301 N-terminal half of TuFA protein (249) **K T G D H M V V G F S T T P L P T I A I G I E M F N S N L N D S G K A G D S N I I S - -** (329)
Pteridomonas sp. YPF1301 N-terminal half of TuFA protein (249) **K T G D H M V V G F S T T P L P T I A I G I E M F N S N L N D S G K A G D S N I I S - -** (329)
Dityocha speculum (248) **N V G D T I E I V G L G D T Q S T T V - T G V E M F Q K T L - D S G M A G D N V G I L L R G I** (292)
Florencia parvula (248) **N V G D T I E I V G L A D T Q T T V - T G V E M F Q K T L - D S G M A G D N V G I L L R G I** (292)
Pseudopedinella elastica (248) **N V G D T I E I V G L G D T Q T T V - T G V E M F Q K T L - D S G M A G D N V G I L L R G I** (292)
Rhizochromulina marina (247) **N V G D T I E I V G L G E T K S T T V - T G V E M F Q K T L - E S S M A G D N V G I L L R G I** (291)

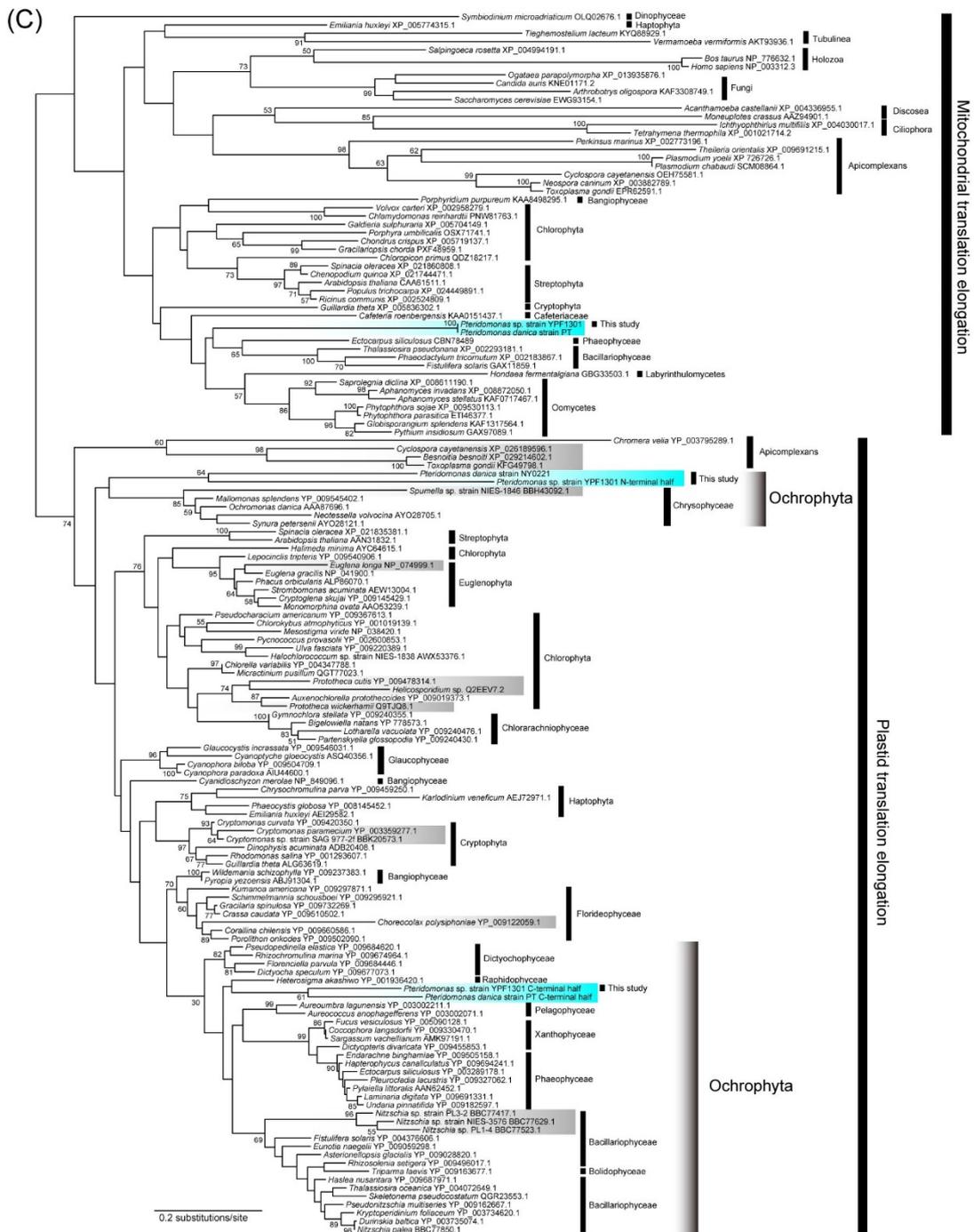


Fig. 2-7 : TufA のアミノ酸配列と分子系統樹。A : 葉緑体ゲノムにコードされているディクチオカ藻 an と *Pteridomonas danica* NY0221 の TufA の N 末端側と *Pteridomonas* sp. YPF1301 の N 末端側のアミノ酸配列。オレンジ色の線で囲まれた領域はシグナルペプチドを示し、青色の線で囲まれた領域はトランジットペプチドを示す。括弧内の数字は N 末端からのアミノ酸番号を示す。B : 葉緑体ゲノムにコードされているディクチオカ藻と *P. danica* NY0221 の TufA の N 末端側と *Pteridomonas* sp. YPF1301 と *P. danica* PT の C 末端側のアミノ酸配列。C : オルガネラ TufA 配列に基づく最尤系統樹。147 タクサと 369 サイトで構成されたデータセットを、IQ-TREE 1.6.12 を用いて LG+F+ Γ モデルで分子系統解析を行った。ブートストラップ値は ≥ 50 のみを示す。*Pteridomonas* spp. は水色で強調した。他の非光合成生物は灰色で強調している。

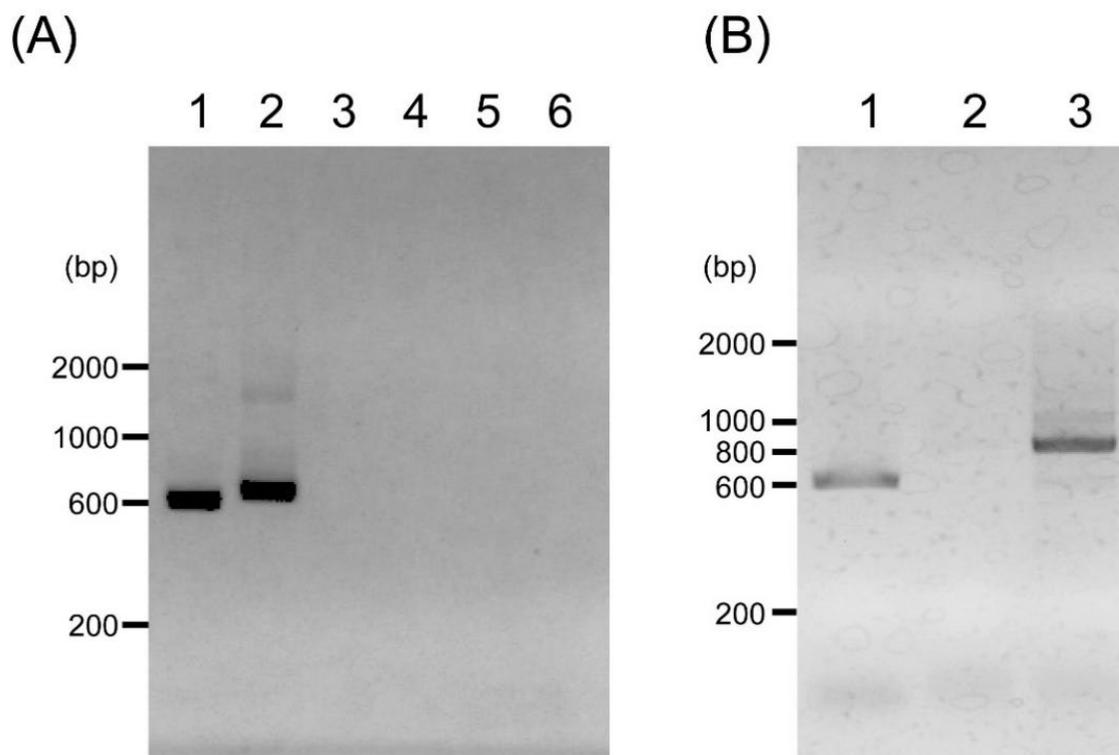


Fig. 2-8 : *rbcL* の PCR assay 結果。A : *Pteridomonas* sp. strain YPF1301 の *rbcL* 遺伝子の検出。レーン 1 はコントロールとして Pterido_Actin_89_F、Pterido_Actin_693_R のプライマーセットを用いて核ゲノムコードのアクチン遺伝子を増幅した。レーン 2 は rpl36F と rpl36R のプライマーセットを用いてプライマーセットを用いて PCR を行った。レーン 3 は rbcLF1 と rbcLR1 のプライマーセットを用いて *rbcL* 遺伝子の PCR を行った。レーン 4 はネガティブコントロールとして rbcLF1 と rbcLR1 のプライマーセットを用いて *rbcL* 遺伝子の PCR を行った。レーン 5 は rbcLF2 と rbcLR2 のプライマーセットを用いて *rbcL* 遺伝子の PCR を行った。レーン 6 はネガティブコントロールとして rbcLF2 と rbcLR2 のプライマーセットを用いて *rbcL* 遺伝子の PCR を行った。B : *rbcL* の縮重プライマーを用いた PCR assay。レーン 1 はコントロールとして Pterido_Actin_89_F、Pterido_Actin_693_R のプライマーセットを用いて核ゲノムコードのアクチン遺伝子を増幅した。レーン 2 は stramenopiles の *rbcL* 遺伝子

用に設計した stramenopiles RbcL F、stramenopiles RbcL R のプライマーセットを用いて rbcL 遺伝子の PCR を行った。レーン 4 は stramenopiles RbcL F、stramenopiles RbcL R のプライマーセットを用いて *P. tricornutum* DNA から *rbcL* 遺伝子の PCR を行った。

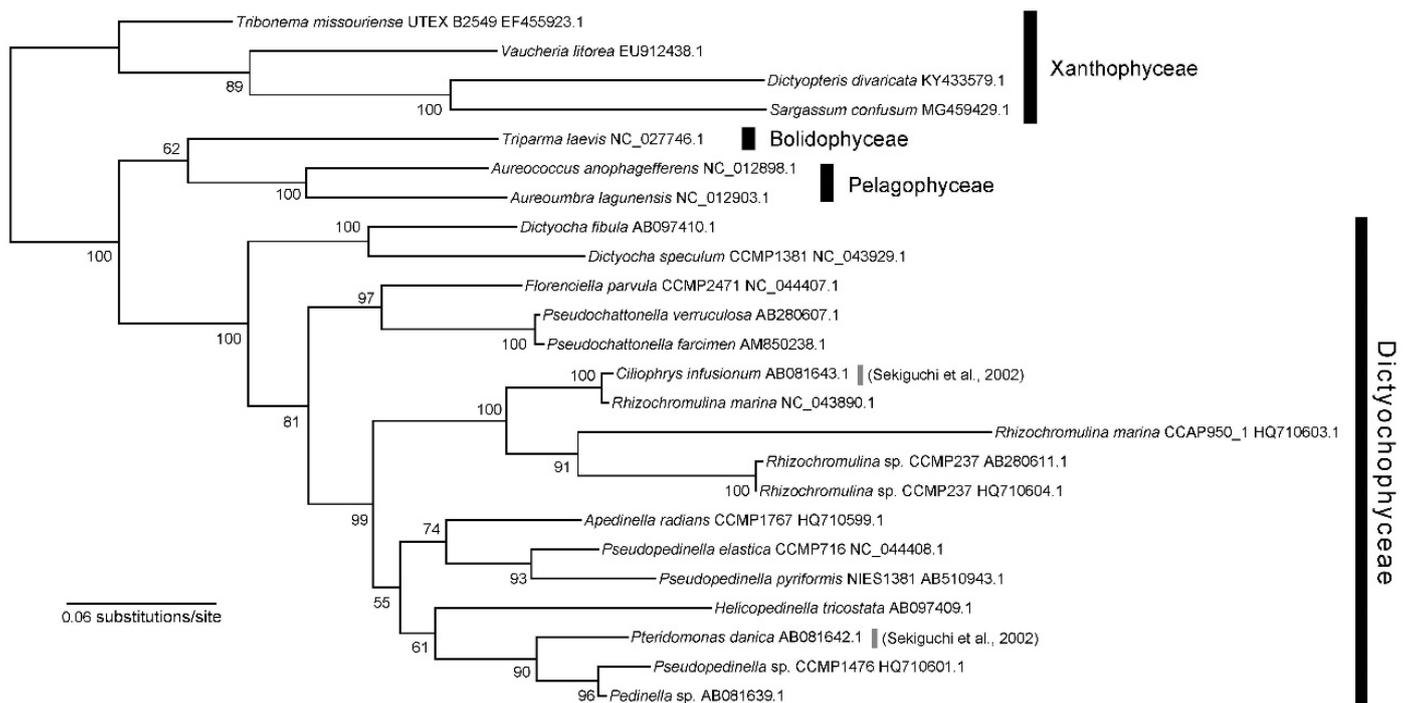


Fig. 2-9 : *rbcL* rRNA 配列に基づく最尤法分子系統樹。分子系統樹は IQ-TREE 1.6.12 を用いて GTR+Γ+I+F モデルで解析した。ブートストラップ値は ≥ 50 のみを示す。

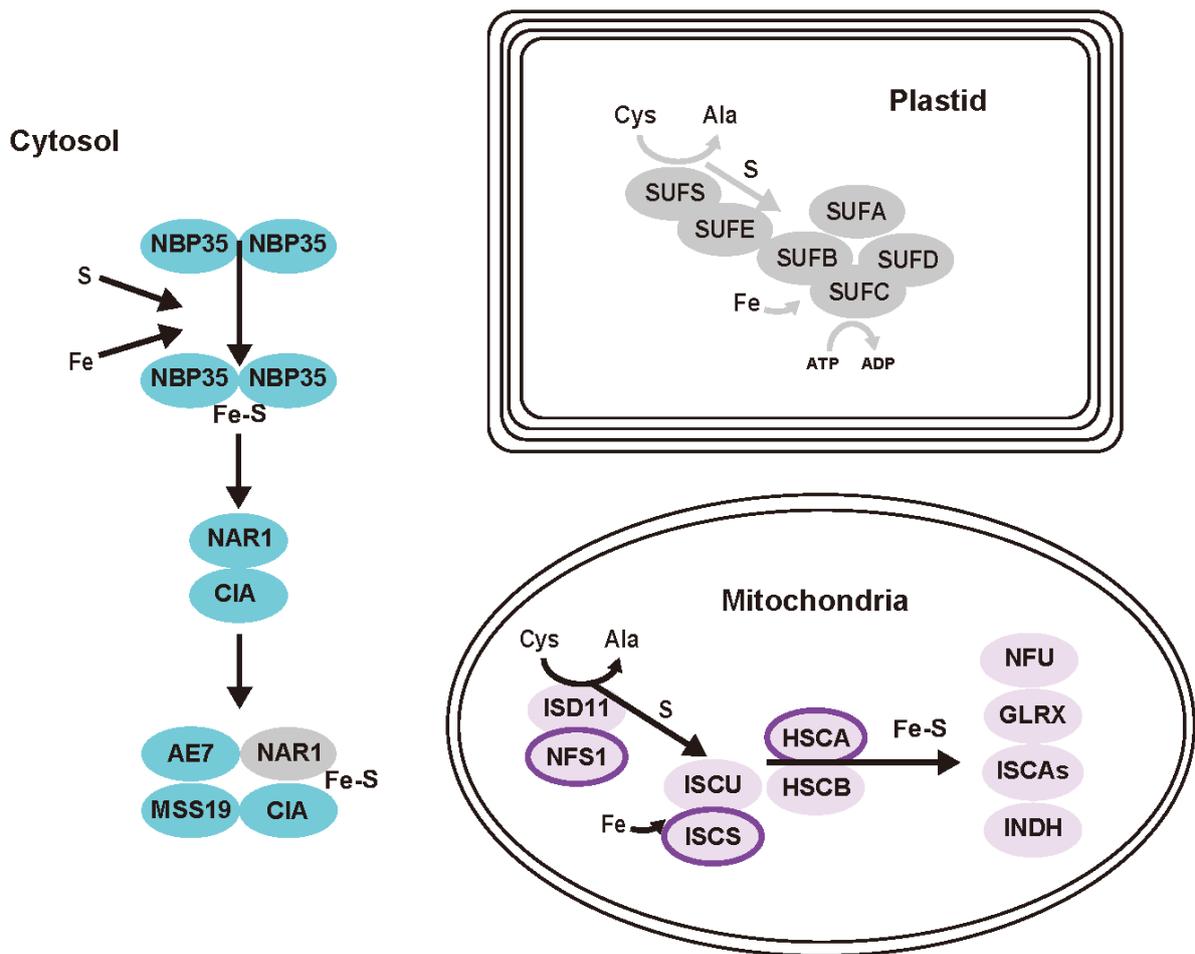


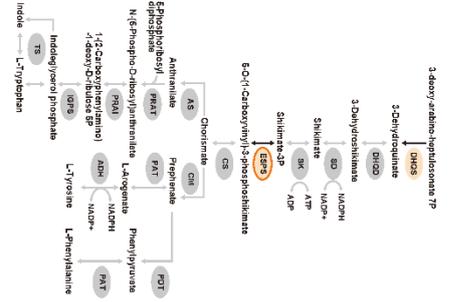
Fig. 2-10 : *Pteridomonas danica* PT の鉄硫黄クラスター合成経路。明るい紫色の円と紫色の枠線はミトコンドリア標的配列が検出されたタンパク質を示す。明るい紫色の円はトランスクリプトームデータから検出されたが、5′末端を喪失しているタンパク質を示す。水色はサイトゾルで機能するタンパク質を示す。灰色は検出されなかったタンパク質を示す。AE7, cytosolic iron-sulfur assembly component AE7; Cfd1, Cytosolic Fe-S cluster assembly factor CFD1; Cia1, Cytosolic iron-sulfur protein assembly protein 1; Dre2, Fe-S cluster assembly protein DRE2; GLRX, Glutaredoxin-related protein; HscA, Fe-S protein assembly chaperone HscA; HscB, iron-sulfur cluster co-chaperone protein HscB; INDH, ATP binding protein-like; ISCA1, iron-sulfur cluster assembly 1; ISCA2, iron-sulfur cluster assembly 2; IscS,

cysteine desulfurase; IscU, iron-sulfur cluster assembly enzyme; ISD11, Protein ISD11; MMS19, DNA repair/transcription protein MET18/MMS19; Nar1, Protein NAR1; Nbp35, Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NBP35; NFS1, Cysteine desulfurase, mitochondrial; NFU4, NifU protein 4 (Balk and Schaedler 2014; Lill 2009; Grosche et al., 2018) .

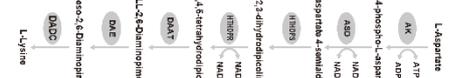
Fig. 2-11 : *Pteridomonas danica* strain PT が担うと推定される代謝。オレンジ色の枠線と円は葉緑体標的配列を持つタンパク質を示す。オレンジ色の円はトランスクリプトームデータから検出された配列に 5'末端が欠落していたタンパク質を示す。灰色は検出されなかったタンパク質を示す。P. danica PT の葉緑体ゲノムは検出できないため、アスタリスクは、RuBisCO が存在するかどうか不明であることを示している。

ALAD, Delta-aminolevulinic acid dehydratase; CPOX, Coproporphyrinogen oxidase; CS, chorismate synthase; DAHPS, 3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase; DHQD, bifunctional 3-dehydroquinate dehydratase; DHQS, 3-dehydroquinate synthase; EL, enolase; ESPS, 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase; FBA, fructose 1,6-bisphosphate aldolase; FeCH, Ferrochelatase.; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GluRS, Glutamyl tRNA synthase; GluTR, Glutamyl tRNA reductase; GSAT, Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase; HMBS, Hydroxymethylbilane synthase; PGK, phosphoglycerate kinase; PGM, phosphoglycerate mutase; PPI-PFK, pyrophosphate-dependent phosphofructokinase; PPOX, Protoporphyrinogen oxidase; PRK, phosphoribulokinase; RuBisCO, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large and small subunits; RPE, ribulose 5-phosphate 3-epimerase; RPI, ribose 5-phosphate isomerase; SD, shikimate dehydrogenase; SK, shikimate kinase; TAL, transaldolase; TKL, transketolase; TPI, triosephosphate isomerase; UROD, Uroporphyrinogen decarboxylase; UROS, Uroporphyrinogen III synthase。

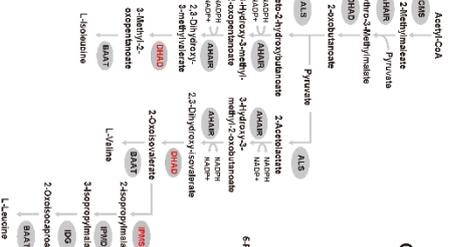
Phenylalanine, Tyrosine, Tryptophan



Lysine



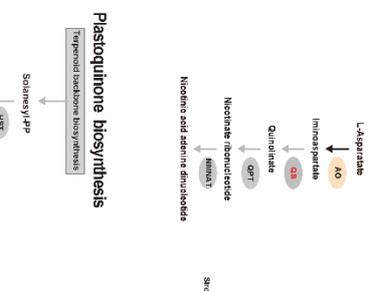
Valine, leucine, Isoleucine



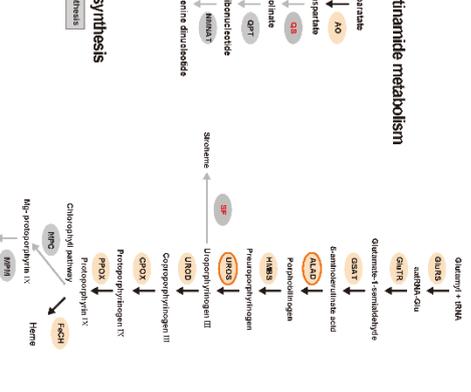
Glutamine



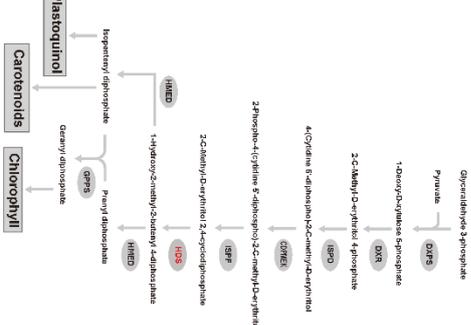
Nicotrate and nicotinamide metabolism



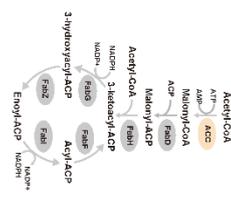
Porphyrin and chlorophyll, Heme biosynthesis



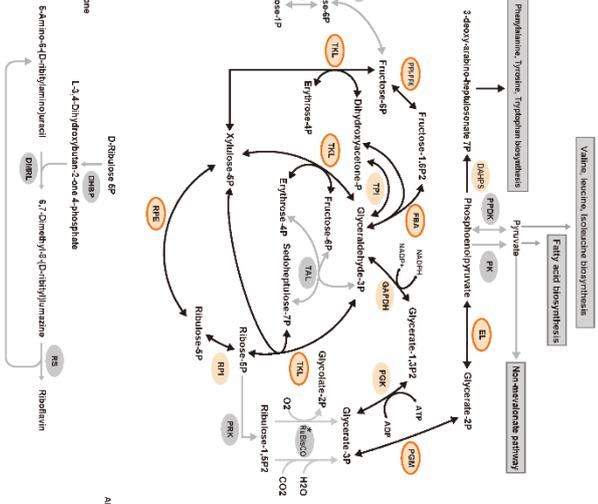
Terpenoid backbone biosynthesis



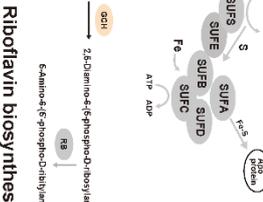
Fatty acid biosynthesis



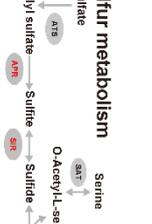
Pentose phosphate pathway Glycolysis and Gluconeogenesis



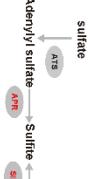
Iron-sulfur clusters



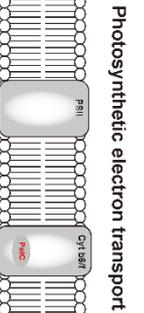
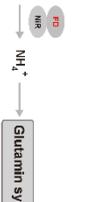
Riboflavin biosynthesis



Sulfur metabolism

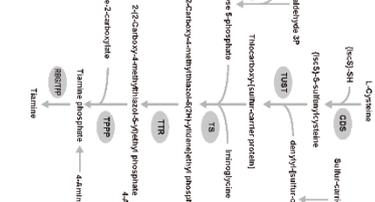


Nitrogen metabolism

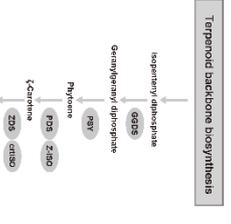


Photosynthetic electron transport

Thiazole Biosynthesis



Carotenoid Biosynthesis



Lipic acid metabolism

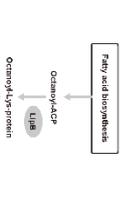


Fig. 2-12 : *Pteridomonas danica* strain PT における葉緑体代謝。オレンジ色の枠線と円は葉緑体標的配列を持つタンパク質を示す。オレンジ色の円はトランスクリプトームデータから検出された配列に 5'末端が欠失していたタンパク質を示す。灰色は検出されなかったタンパク質を示す。赤色の文字は

P. danica PT の葉緑体ゲノムは検出できないため、アスタリスクは、RuBisCO が存在するかどうか不明であることを示している。

ACC, acetyl-coa carboxylase; ALAD, porphobilinogen synthase; AO, L-aspartate oxidase; APR, adenylyl-sulfate reductase; AS, anthranilate synthase component I; ATS, ATP sulfurylase; CAO, chlorophyll a oxygenase; CBR, chlorophyll b reductase; CDPMEK, 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase; CDS, cysteine desulfurase; CM, chorismate mutase; CMO, choline monooxygenase; CPOX, coproporphyrinogen III oxidase; CPS, chlorophyll synthase; crtISO, prolycopene isomerase; CrtL-b, lycopene beta-cyclase; CS, chorismate synthase; Cyt b6/f, cytochrome b6f complex; D27, beta-carotene isomerase D27; DADC, diaminopimelate decarboxylase; DJC76, Chaperone protein dnaJ C76; DHAD, dihydroxy-acid dehydratase; DHBP, 3, 4-dihydroxy 2-butanone 4-phosphate synthase / GTP cyclohydrolase II; DHQS, 3-dehydroquinate synthase; DVR, divinyl chlorophyllide a 8-vinyl-reductase; DXPS, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; DXR, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase; EL, enolase; ESPS, 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase; FabD, [acyl-carrier-protein] S-malonyltransferase; FabF, 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II; FabH, 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III; FabG, 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein]; FabZ, 3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase; FBA, fructose-bisphosphate aldolase class II; FBP, fructose-1, 6-bisphosphatase I; FD, Ferredoxin; FeCH, protoporphyrin/coproporphyrin ferrochelataase; FLD, Flavodoxin ; FNR, ferredoxin-NADP reductase; FTR, ferredoxin-thioredoxin reductase; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GCH, 3,4-dihydroxy 2-butanone 4-phosphate synthase / GTP

cyclohydrolase II; GDR, geranylgeranyl diphosphate reductase; GGDS, geranylgeranyl diphosphate synthase; GluRS, glutamyl-tRNA synthetase; GluTR, glutamyl-trna reductase; GOGAT, glutamate synthase (ferredoxin) ; GPAT, glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase; GPI, glucose-6-phosphate isomerase; GPPS, geranyl pyrophosphate synthase; GS2, glutamate synthase; GSAT, glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase; HCAR, 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase; HDR, 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate reductase; HMBS, hydroxymethylbilane synthase; HMED, (E) -4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase; HST, homogentisate solanesyltransferase; IGPS, indole-3-glycerol phosphate synthase; IPMI, isopropyl malate isomerase; ISPD, 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate reductase; ISPF, 2-C-methyl-D-erythritol 2, 4- cyclodiphosphate synthase; ISPG, 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase; KDPHS, 3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase; LDPR, protochlorophyllide reductase; LipA, lipoic acid synthetase; LipB, lipoyl (octanoyl) transferase; MAT, [acyl-carrier-protein] S-malonyltransferase; MGDG, monogalactosyldiacylglycerol synthase; MOD1, enoyl-[acyl-carrier protein] reductase I; MPC, magnesium-chelatase; MPM, Magnesium protoporphyrin IX methyltransferase; MPMEC, magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester (oxidative) cyclase; NDH, NAD (P) H-quinone oxidoreductase; NEET, iron-sulfur domain-containing protein NEET; NIR, Ferredoxin-nitrite reductase; NMNAT, nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase; OTS-TL, O-acetylserine (thiol) -lyase; PAO, pheophorbide a oxygenase; PAT, bifunctional aspartate aminotransferase and glutamate/aspartate-prephenate aminotransferase; PC, plastocyanin; PCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PDS, 15-cis-phytoene desaturase; PetC, cytochrome b6-f complex; PFK1, 6-phosphofructokinase 1; PGK, phosphoglycerate kinase; PGM, phosphoglucomutase; PK, pyruvate kinase; PPK, phosphate dikinase; PPOX, protoporphyrinogen/coproporphyrinogen III oxidase; PRK,

phosphoribulokinase; PQ, plastoquinone; PQH2, plastoquinol; PRA, phosphoribosylanthranilate isomerase; PRAT, anthranilate phosphoribosyltransferase; PsaA, Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1; PsaA, Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein; PsaB, Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2; PsaC, Photosystem I iron-sulfur center; PSI, Photosystem I; PSII, Photosystem II; PSY, phytoene synthetase; PTC52, Protochlorophyllide-dependent translocon component 52; QS, Quinolate synthase; QPT, quinolate phosphoribosyltransferase; RuBisCO, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large and small subunits; RPE, ribulose-phosphate 3-epimerase; RPI, ribose 5-phosphate isomerase; SAT, serine O-acetyltransferase; SEC61A, SEC61-alpha subunit of ER-translocon; SIR, sulfite reductase; SIRB, sirohydrochlorin ferrochelatae; SUFA, B, C, D, E, S, cysteine desulfurase; TAL, transaldolase; TIC55, translocator of the inner chloroplast envelope membrane 55; THIC, thiamine biosynthesis; TKL, transketolase; TPI, triosephosphate isomerase; TPT, triose phosphate phosphate translocator; UROD, Uroporphyrinogen decarboxylase; UROS, uroporphyrinogen III synthase; VDE, violaxanthin de-epoxidase; VTE3, MPBQ/MSBQ methyltransferase; ZDS, zeta-carotene desaturase; ZEP, zeaxanthin epoxidase; Z-ISO, zeta-carotene isomerase (Bock and Khan, 2004; DellaPenna and Pogson, 2006; Moog et al., 2011; Hiltunen et al., 2012; Kamikawa et al., 2017; Przybyla-Toscano et al., 2018) .

Table 2-1 葉緑体ゲノムの PCR に用いたプライマー

標的	プライマー名	プライマー配列 (5' -3')
葉緑体ゲノム	P1_F2-8557 Fw	GCCCAACGAGCTACCAATCT
葉緑体ゲノム	P1_R2-9119 Rv	GCGTATAAAGAAAGGATTACCGAGA
葉緑体ゲノム	P2_FN11603 Fw	CTCGTTAGTAAAACAAGCAGC
葉緑体ゲノム	P2_RN252-116 Rv	CACATACTTACCGTAAATTTGCC
葉緑体ゲノム	P3_FN616-17777 Fw	TTTGGACCACGATAACGAGACA
葉緑体ゲノム	P3_6486 Rv	CTGTCACGATGGATGTTGCG
葉緑体ゲノム	P4_F3-R5 F	GGAGATACTCAGATTTGAAC
葉緑体ゲノム	P4_RN11603-Rv	ACTCTGACGTTGATTATGTTTTGG
葉緑体ゲノム	P5_rpl36F	ATTA ACTAATGGCCGAAACC
葉緑体ゲノム	P5_rpl36R	GGAGATACTCAGATTTGAAC

Table 2-2 *rbcL*, *actin*, 葉緑体 *rpl36* 遺伝子の PCR に用いたプライマー

標的	プライマー名	プライマー配列 (5' -3')
RbcL	rbcLF1	TCAACCAGGTGTAGATCCAGTG
RbcL	rbcLR1	AGTGAATACCACCAGAAGCTAC
RbcL	rbcLF2	AGTGAATACCACCAGAAGCTAC
RbcL	rbcLR2	CGCATCCATTTACAAATTACACG
RbcL	stramenopiles RbcL F	GCNACNTGGACNGTNGTNTGGAC
RbcL	stramenopiles RbcL R	CCNGCRTGDATRTGRTCNACNCC
Actin	Pterido Actin 89 F	ATGTAGTGCCTGTATATGAAGG
Actin	Pterido Actin 693 R	GTAATCTTGCTTTGAGATCCAG
Rpl36	rpl36F	ATTAACTAATGGCCGAAACC
Rpl36	rpl36R	GGAGATACTCAGATTTGAAC

Table 2-3. *Pteridomonas* spp.の葉緑体ゲノム

株名	<i>Pteridomonas</i> YPF1301	sp. <i>Pteridomonas</i> NY0221	<i>danica</i>
ゲノムサイズ (bp)		54809	33539
コード領域 (%)		57.76	90.26
タンパク質遺伝子数		40	39
A+T 含量 (%)		79.63	75.24
タンパク質 翻訳		35	35
転写		4	4
タンパク質分解		1	-
ORFs		3	-
RNAs	rRNA	2	2
	tRNA ^b	26	26

^a機能が割り当てられていない ORF は除外した。

^b重複した遺伝子は 1 つとして計算した。

- ; 非検出

2.6 結論

本研究で得られた結果は、これまでほとんど研究がされていない光合成能を失った光合成生物の葉緑体における葉緑体機能の喪失という現象について重要な知見を与える。今まで、葉緑体ゲノムの喪失において *sufB* と *sufC* 遺伝子が関与していると考えられていた。しかし、*Pteridomonas* spp. は *sufB* と *sufC* 遺伝子を欠いているため、*sufB* と *sufC* 遺伝子が必ず葉緑体ゲノムの喪失に関与していないことが示された。一方で、葉緑体を完全に喪失した非光合成生物を除いて、葉緑体-鉄硫黄クラスターを持たない非光合成生物は知られていなかった。

しかし、*Pteridomonas* spp. は *sufB* と *sufC* 遺伝子を欠いているため、*sufB* と *sufC* 遺伝子が必ずしも葉緑体ゲノムの喪失に関与しているわけではないことが示された。代替え案として、*Pteridomonas* の葉緑体ゲノムは葉緑体のヘム合成に不可欠な tRNA-Glu 遺伝子によって維持されていることを提案した。また、*Pteridomonas* spp. は近縁種であるにも関わらず、光合成を行わない葉緑体ゲノムにおいて、タンパク質遺伝子の喪失と保持のパターンが異なることが見られた。しかし、この消失もしくは維持のパターンは他の光合成能を喪失した生物、寄生性陸上植物 ハマウツボ科 (Wicke et al., 2013)、クリプト藻類 *Cryptomonas* (Tanifuji et al., 2020)、珪藻 *Nitzschia* (Kamikawa et al., 2018)、緑藻 *Prototheca* (Fig. ueroa-Martinez et al., 2015; Severgnini et al., 2018; Suzuki et al., 2018) などで知られているため、特異的な現象では無い。非光合成生物のグループにおいて、光合成能の消失は複数回発生していることが示唆されている (Onyshchenko et al., 2019)。

本研究から得られた知見は、非光合成性葉緑体におけるゲノムの喪失に対して、普遍的な制約の存在は考えにくいことを示唆する。その代わりに、葉緑体ゲノムの機能の喪失と保存は、各生物の系統の進化的、生態学的背景、およびさまざまな予測不可能な出来事によって異なると考えられる。そのため、非常に近い、近縁種であっても、葉緑体のゲノムや機能は、同一でない可能性がある。しかし、

これらの結果は、葉緑体ゲノムと近縁種のトランスクリプトームデータに基づいているため、葉緑体で機能する核ゲノムにコードされたタンパク質遺伝子に対して説明は出来ない。また、*trnE* 遺伝子による葉緑体ゲノムの維持の重要性に関しても、生化学的研究によって示していないため、別の研究で詳細に検討し評価する必要がある (Oborník and Green, 2005; Barbrook et al., 2006; Wicke et al., 2016; Hadariová et al., 2018)。

第3章 非光合成緑藻 *Chlamydomonas* NrC1902 から光合成電子伝達系の喪失進化を明らかにする

3.1 概要

非光合成性緑藻 *Chlamydomonas* NrC1902 はボルボクス目に属する緑藻の仲間、光合成能を喪失している。*Chlamydomonas* NrC1902 は、オレンジ色の眼点を持ち、非光合成性葉緑体を保持している (陳 2018)。葉緑体内にはデンプン顆粒が観察される。*Chlamydomonas* NrC1902 の葉緑体は光合成能を除く葉緑体の代謝系のほとんどを保持し、さらに、核ゲノムにはプラストキノン、カロテノイド合成、*plastid terminal oxidase*、フェレドキシン-NADP⁺オキシドレダクターゼ (Fd-FNR) などの電子伝達に関わる物質の合成に関与する一部のタンパク質配列も検出された。しかし、非光合成生物がプラストキノン合成している報告はなく、非光合成葉緑体においてプラストキノンがどのような役割を果たしているかについては不明である。

本研究では、*Chlamydomonas* NrC1902 株の葉緑体において、実際にプラストキノンが合成されているかどうかを精査し、さらに光合成能を喪失した葉緑体におけるプラストキノンの役割を考察した。

3.2 背景

プラストキノン、ベンゾキノン環の 6 位にイソプレニル誘導体が側鎖として結合した構造をもつ。1 電子で還元されたものをセミプラストキノンとよび、さらに 1 電子 (合計 2 電子) で還元されたものをプラストキノールとよぶ。光合成電子伝達系においては、水分子の分解によって得られた 2 電子を光化学系 II から受取り、プラストキノールとなって、チラコイド膜内に蓄積され、シトクロム *b6/f* 複合体への電子移動を仲介する役割をもつ。また、直接的な活性酸素の除去などの働きをもつ。チラコイド膜内におけるプラストキノールの蓄積状況

をプラストキノンプールとよび、プラストキノンプールの酸化還元レベルは、転写制御のシグナルとしての役割も担っている。このようにプラストキノンは、葉緑体において多岐にわたる役割を担っている。

従属栄養性緑藻 *Chlamydomonas* NrC1902 はボルボックス目に属する緑藻の仲間であり、光合成能を喪失している。その一方で、*Chlamydomonas* NrC1902 は細胞内に眼点と葉緑体様の構造を持つことが電子顕微鏡観察で確認されている（陳 2018）。この *Chlamydomonas* NrC1902 は光合成能を除く緑藻の葉緑体機能のほとんどを有し、さらに、プラストキノン、カロテノイド合成、PTOX、Fd-FNR などの光合成電子伝達系の一部が検出された。そこで、本研究では、トランスクリプトームデータ、HPLC 解析と RNAi を用いた実験を行い、非光合成生物の光合成電子伝達系の機能と、光合成電子伝達系の喪失進化について明らかにする。

3.3 材料・方法

3.3.1 非光合成緑藻 *Chlamydomonas* NrC1902 の培養

本研究で用いた株は、慶応義塾大学 仲田崇志特任講師（現在：横浜国立大学 非常勤教員）から単離株（NIES-4405）を分譲いただいた。培養には AFAC 培地（国立環境研究所 NIES コレクション；<https://mcc.nies.go.jp/02medium.html>）を用いた。

3.3.2 HPLC を用いたプラストキノン分析

100 ml の AFAC 培地で 3 日間培養した *Chlamydomonas* NrC1902 を冷却高速遠心分離機で分離したのち、上清を破棄しペレットを得た。これに 2-プロパノール（LC-MS グレード、関東化学株式会社、東京都）を 1 ml 添加したのち、氷水で満たした超音波装置に入れ、1 分間処理した。超音波破碎した試料を高速遠心分離機で遠心分離したのち、上清を 800 μ l 回収した。回収した上清の 400 μ l を HPLC-MS/MS（SHIMAZU）分析試料とした。残りの 400 μ l を全プラストキノン

の測定試料とした。全プラストキノンの測定は、試料に 1.2 mM FeCl₃ 水溶液を 2 ul 添加した後、高速遠心分離機で遠心分離後、上清を HPLC-MS/MS (SHIMAZU) で分析した。残りの 400 ul を全プラストキノンの測定試料とした。全プラストキノンの測定は、試料に 1.2 mM FeCl₃ 水溶液を 2 ul 添加した後、高速遠心分離機で遠心分離後、上清を HPLC-MS/MS (SHIMAZU) で分析した。HPLC-MS/MS は、送液ポンプ LC-30AD、HPLC 脱気装置 DGU-20A3R/5R、カラムオープン CTO-20AC、大気圧化学イオン化 (APCI) 法のインターフェースを介したトリプル四重極型質量分析装置 LCMS-8030、HPLC 液クロマトシステムコントローラー CBM-20A で構成され、これら装置は HPLC 液クロマトシステムコントローラー CBM-20A を介して、パーソナルコンピューターにインストールされている HPLC ソフト LabSolution で制御されている。プラストキノンの分析に用いたカラムは、Zorbax Eclipse Plus C18 カラム (Rapid Resolution HT、3.0 × 100 mm、1.8 μm、Agilent Technologies、Santa Clara、アメリカ) を使用した。移動相は 0.1% [v/v]ギ酸 (LC-MS グレード、和光純薬工業株式会社) -酢酸エチル (LC-MS グレード、Honeywell、Seelze) 溶媒と 0.1% [v/v]ギ酸-メタノール (LC-MS グレード、関東化学株式会社) 溶媒を調整し、これら移動相は真空ポンプと超音波を用いて脱気した。また、HPLC の濃度勾配設定は 0.1% [v/v]ギ酸-メタノール溶媒を 1.0 分で 30%、4.0 分で 30-80%、3 分で 80%、0.1 分で 80-30%、3.9 分で 30%の割合で 0.1% [v/v]ギ酸-酢酸エチルに添加した。質量分析装置の設定は、Collision energy (V) -30eV、ネブライザーガスの流量は 3.0 L min⁻¹、APCI インターフェース温度 350°C、Curved Desolvation Line 温度 200°C、ヒートブロック温度 200°C、乾燥ガス流量 5 L min⁻¹ に設定した。質量分析装置の計測は正イオンモードの多重反応モニタリング (MRM) とプリカーサイオンスキャンで行った。MRM はプラストキノン、ユビキノン、プラストキノール、ユビキノール用に個々にパラメーターを設定した。プラストキノンは Precursor ion mass m/z 751.6、Product ion mass m/z 151.1、ユビキノンは Precursor ion mass m/z 797.6、Product ion mass m/z

197.1、プラストキノールは Precursor ion mass m/z 749.65、Product ion mass m/z 151.1、ユビキノールは Precursor ion mass m/z 795.6、Product ion mass m/z 197.1 で設定した。保持時間 1.8-2.6 分に Precursor ion mass m/z 749.65、Product ion mass m/z 151.1、保持時間 2.3-3.0 分に Precursor ion mass m/z 795.6、Product ion mass m/z 197.1、保持時間 3.4-4.1 分にユビキノンの Precursor ion mass m/z 797.6、Product ion mass m/z 197.1、保持時間 4.1-5.0 分に Precursor ion mass m/z 751.6、Product ion mass m/z 151.1 を検出するように設定した。プリカーサイオンスキャンの設定は、Scan range (m/z) を 100.00-800.00、Scan rate を 714 unit/sec で行った。

3.3.3 Homogentisate solanesyltransferase 酵素の RNAi ノックダウン

Chlamydomonad NrCl902 のトランスクリプトームデータから得られた Homogentisate solanesyltransferase (HST) 配列を siDirect2.0 (<http://sidirect2.rnai.jp/>) を用いて RNA 干渉による一過性のノックダウン (RNAi) に適した small interfering RNA 領域を予測した。予測した領域を基に T7 配列 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') を付加した 3 種類のプライマーを設計した。AFAC で培養した Chlamydomonad NrCl902 を高速遠心分離機で回収し Total RNA を抽出した。RNA 抽出には TRIZOL® (Thermo Fisher Scientific) を用いた。植え継ぎ 2 日目の培養株を高速遠心分離機で回収し、細胞のペレットを得た。ペレットに TRIZOL を 1 ml 添加し懸濁した後、5 分間室温で静置し、0.2 ml のクロロフォルムを加え、30 秒間激しく転倒混和を行い 5 分間静置した。次に遠心分離 (12,000 rcf、15 分間、4°C) を行い、水層を回収した。回収した水層に 0.5 ml の 2-プロパノールを加え、転倒混和後、室温で 10 分間静置した。再度、高速冷却遠心機で遠心分離 (12,000 rcf、15 分間、4°C) を行い、上清を破棄し、1 ml の 75%エタノールを加え RNA を洗浄した。その後、遠心分離 (7,500 rcf、5 分間、4°C) を行い 1 µg の Total RNA を得た。抽出した 1 µg の Total RNA を鋳型として、3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Thermo Fisher

Scientific) を用いて cDNA 合成を行った。cDNA 合成を行うために、Total RNA 1 μg を 10 μl の DEPC 処理水に溶解させ、10 mM AP Primer (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') を 1 μl 加えた後、70°C で 10 分間加熱した。加熱した試料を氷水で急冷させた後、試料に 10 \times PCR buffer 2 μl 、25 mM MgCl₂ 2 μl 、10 mM dNTP mix 1 μl 、0.1 M DTT 2 μl を加え、42°C で 5 分間加温後、SuperScriptTM II RT を 1 μl 添加し 42°C で 50 分間保温した。保温後、70°C で 15 分間加熱した試料を氷水で急冷した。試料中に存在する RNA を除去するために、RNase H を 1 μl 添加し 37°C で 30 分間保温した。得られた cDNA を鋳型として PCR を行った。PCR は KOD -Plus- Ver.2 (TOYOBO) と HST 配列を基に siDirect2.0 から作成したプライマー (5'-AGCCTGAATAATGGCGCAAG-3' および 5'-TGACGAAGGCGGTGATGAAG-3') を用いて DNA 断片を増幅した。PCR の条件は、熱変性に 98°C 10 秒、アニーリングは 55°C 30 秒、伸長反応は 68°C 3 分の条件で行い、この反応を 15 回行った。アガロース電気泳動で PCR 産物から標的バンドを切り出し、HST の DNA 断片を精製した。精製した HST DNA 断片を鋳型として、再度、PCR を行った。PCR は KOD -Plus- Ver.2 (TOYOBO) と siDirect 2.0 を用いて作成したプライマー (HST1F : 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGAGAATAATGGCGCAAGATCAGCTTC-3'、HST1R. 5'-CTAATACGACTCACTATAGAGGGAGACTTGTTCCACCACGTCAATGTCC-3') を用いて 5'末端に T7 プロモーターが付着した HST1 DNA 断片を調製した。また、RNAi 効果がオフターゲットである可能性を低減するために、HST1 の DNA 断片を 2 つに分けた HST2 (HST2 : 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGCCTGAATAATGGCGCAAGAT-3' および HST2R : 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGAGACACCTGGCTGTCATTTGTGGA-3') および HST3 (HST3F. 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGAGAAAATTCAGCCATGCGTTTTGG-3' および HST3R: 5'-

CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGACCACACCGGTTGACATCTCG-3'

)と呼ばれる2つのプライマーを作製した。このプライマーを用いてHST1と同じくPCRを行うことで、T7を付加したPCR産物を作製した。このT7が付加したPCR産物を鋳型とし、MEGA script RNAi Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて二本鎖RNA (dsRNA)を合成した。dsRNA合成は1 µgのHST1 DNA断片を2 µlのDNA free waterに溶解させた。この試料に10× T7 Reaction buffer、ATP solution、GTP solution、CTP solution、UTP solution、T7 Enzyme MIXをそれぞれ2 µl加えた後、37°Cで4時間保温した。4時間後、75°Cに設定したヒートブロックで試料を5分間加熱した後、ヒートブロックの電源を切断し、ヒートブロックの温度が室温になるまで放置した。冷却後、試料にNulease free water 21 µl、10×Digestion Buffer 5 µl、DNase I 2 µl、RNase I 2 µlをそれぞれ添加し37°Cで1時間保温した。1時間後、試料にNulease free water 150 µl、10×Binding Buffer 50 µl、100% エタノール (分子生物学用、和光純薬株式会社)をそれぞれ加え、付属のフィルターでろ過した。dsRNAが付着したフィルターにWash Solutionを500 µl加え、dsRNAを洗浄した後、Elution Solutionを100 µl加えdsRNAを溶出させた。このように調整したdsRNAをRNAiに用いた。RNAiはAFAC培地で4日間Chlamydomonas NrCl902を培養した。この培養した株はRNAiを行う24時間前に新しい培地に置換した。培養した細胞をスイング式遠心機で、2,500 rpm、5分間遠心分離することにより回収し、40 mMスクロースを含むTAP培地(Thermo Fisher Scientific)で洗浄した。8.0×10⁵個の細胞を40 µlのTAP+40 mMスクロース培地に懸濁した。細胞懸濁液を2 mmのギャップを有するエレクトロポレーションキュベット (NEPAGENE)に入れた。エレクトロポレーションの条件はNEPA21スーパーエレクトロポレーター (NEPAGENE)を用いて、Yamano et al.の条件で行った。エレクトロポレーションキュベットに入れている8.0×10⁵個の細胞を含む40 µlのTAP+40 mMスクロース培地に、4 µgのHST1 dsRNAを添加または、添加無しの2種類を用意して、エレクトロポレーションを実施した。エ

レクトロポレーションの設定は、ポーリングパルスの電圧は 300V の 1 回の交換パルス（パルス長 8 ms、パルス間隔 50 ms、減衰率 40%）で行い、トランスファーパルスは 20 V の 10 回の交換パルス（パルス長 50 ms、パルス間隔 50 ms、減衰率 40%）で実施した（Yamano et al., 2013）。この条件で行った時の電気抵抗値は 440–500 Ω の値で行った。レクトロポレーション後の細胞懸濁液を 20 ml の ACAC 培地に移し、暗条件下で培養した。レクトロポレーションから 48 時間後まで、ビルケルチェルク血球計数盤を用いて光学顕微鏡下で 12 時間ごとに細胞を計数した。レクトロポレーションの 36 時間後に細胞を回収して Total RNA 抽出とプラストキノンの定量を行った。Total RNA は TRIZOL を用いて上述と同じ方法で行い、1 μ g の Total RNA を鋳型として 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends（Thermo Fisher Scientific）を用いて cDNA 合成を行った。この cDNA を鋳型に、HST 用プライマーセット（5'-AGCCTGAATAATGGCGCAAG-3'および 5'-TGACGAAGGCGGTGATGAAG-3'）、またはアクチン用プライマーセット（5'-ACTCATACGTCGGTGATGATGAG-3'および 5'-GCTCCATCAAGATCTTCATC-3'）を用いて RT-PCR を実施した。プラストキノンの定量は、上述と同じ HPLC-MS/MS を用いて行い、塩化第二鉄で全酸化したプラストキノンとユビキノン量を定量した。

RNAi の結果がオフターゲット効果の可能性を減少させるために、HST1 を 2 つに分けた dsRNA（HST2、HST3）を上述の方法で合成し、HST1、HST2 および HST3 の dsRNA を使い、レクトロポレーションを行った。レクトロポレーション後、1.5 日目と 3 日目の細胞に対して RT-PCR assay を行った。また、レクトロポレーション後、3 日間、細胞の計数を行った。

3.4 結果および考察

3.4.1 Chlamydomonas NrCl902 のプラストキノン/プラストキノール

非光合成性緑藻 Chlamydomonas NrCl902 細胞がプラストキノンを含むかを明

らかにするために、HPLC-MS/MS 分析をおこなった。その結果、微弱なプラストキノンの候補ピークとプラストキノール候補の明瞭なピークが検出された。これらのほかに、ミトコンドリアの電子伝達系の電子受容体であるユビキノンとユビキノールも検出された。プラストキノールの候補ピークの MS スペクトルは、プラストキノール (PQH₂-9) であることを示した (Fig. 3-1)。一方で、プラストキノンの候補ピークの MS スペクトルは s/n 比が悪く同定できなかった (Fig. 3-1b)。細胞抽出物を FeCl₃ で酸化させると、PQH₂-9 のピークは消滅し、プラストキノンの候補ピークが明瞭になった。このピークの MS スペクトルは PQH₂-9 であることを示した (Fig. 3-1c)。以上の解析結果から、Chlamydomonas NrC1902 細胞は、プラストキノンを保有していることが示唆された。これは、光合成能を喪失した非光合成生物が、プラストキノン合成反応を保持し、プラストキノンを合成している初めての例である。

つぎに、プラストキノンが Chlamydomonas NrC1902 の生育・生残に必須なのかを明らかにするために、Chlamydomonas NrC1902 のプラストキノン合成に関わる Homogentisate solanesyltransferase (HST) 遺伝子に対して、RNAi による一過性のノックダウン実験を行った。エレクトロポレーションから 1.5 日後の RT-PCR で、対照としたハウスキーピング遺伝子のアクチンの転写産物は検出されたのに対して、HST の転写産物は検出されなかった (Fig. 3-2B)。このことにより RNAi により転写産物が減少していることを確認した。非 RNAi 株において、HST、アクチン遺伝子の転写産物が検出されることは RT-PCR 法により事前に確認した。次に、RNAi 株のプラストキノンの定量を HPLC-MS/MS を用いて行った。エレクトロポレーション 1.5 日後のプラストキノン/ユビキノン量比が、干渉していない株より有意に約 40%減少した (Fig. 3-2C) ことから、HST の RNAi によって、Chlamydomonas NrC1902 のプラストキノン合成が抑制されたことを確認した。このとき、細胞増殖が抑制されていたことから、プラストキノン量の減少が細胞の増殖に負の影響を与えた可能性が示唆された (Fig. 3-2D)。

細胞増殖の抑制がエレクトロポレーションにともなうオフターゲット効果（目的とする塩基配列以外の別の DNA 鎖上に、意図せぬ突然変異を引き起こしてしまうこと）の影響である可能性を排除するために、HST1 と同じ標的領域内から、異なる 2 つの領域の dsRNA（HST2、HST3）を設計し（Fig. 3-2A）、これらを用いて、RNA 干渉による転写産物の変化を確認した。この 2 つの dsRNA を用いてエレクトロポレーションを行った細胞では、HST の転写産物生産、細胞増殖ともに抑制された（Fig. 3-3）。したがって、*Chlamydomonas* NrCl902 は、生育のためにプラストキノンを必要とすることがわかった。

3.4.2 *Chlamydomonas* NrCl902 のプラストキノンの機能予測

プラストキノンは光合成における電子伝達以外にも、カロテノイド生合成反応におけるフィトエンデサチユラーゼ（PDS または CrtP）やカロテノイドデサチユラーゼ（ZDS または CrtQ）の電子受容体として機能している（Fig. 3-4A； Nawrocki et al., 2015）。*Chlamydomonas* NrCl902 のトランスクリプトーム解析によりカロテノイド生合成タンパク質を保持していることが確認できた（Fig. 3-4）。HPLC による色素解析においても、 β -カロテン、 γ -カロテン、ゼアキサンチンなどが合成されていることが報告されている（陳 2018）。*Chlamydomonas* NrCl902 のカロテノイド生合成に、プラストキノンを電子受容体として利用されている場合、生成されるプラストキノールを再酸化するため電子受容体が必要である。他にも、プラストキノールを再酸化は PTOX を介して行われ（Carol et al., 1999； Nawrocki et al., 2015； Peltier and Shikanai, 2015）、カロテノイド生合成が機能していることが推測される（Fig. 3-4B）。

他にも、*Chlamydomonas* NrCl902 のプラストキノンの機能を調査した結果、葉緑体ターゲット配列が付加された NDH2 が検出された。この NDH2 は、おそらく NADPH とプラストキノンの酸化還元反応を触媒するため、プラストキノンプールもしくは NADPH から PTOX への電子伝達系の一部に関与している可

能性がある (Shikanai et al., 2007 ; Nawrocki et al., 2015 ; Peltier and Shikanai, 2015)。光合成のモデル生物 *Chlamydomonas reinhardtii* においてプラストキノンプールはカロテノイド生合成、NADH 脱水素酵素II型 (NDH2) の葉緑体呼吸、電子伝達系に関与している (Peltier and Shikanai, 2015 ; Fig. 3-4A)。葉緑体呼吸は $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$ の恒常性に関与することが提案されているため、*Chlamydomonad* NrCl902 の非光合成性葉緑体は光合成電子伝達系の NDH2 とプラストキノンプールを用いている可能性がある (Peltier and Shikanai, 2015 ; Peltier et al., 2002 ; Fig. 3-4B)。

3.4.3 非光合成性葉緑体を持つ真核生物の電子伝達系の進化

Chlamydomonad NrCl902 のトランスクリプトームデータから、*Chlamydomonad* NrCl902 は葉緑体の光合成電子伝達系に関するフェレドキシンと Fd-FNR を有していることが明らかになった (陳 2018)。*Chlamydomonad* NrCl902 における Fd-FNR の詳しい役割は不明であるが、非光合成性葉緑体の Fd-FNR は、ヘテロシストを形成した電子輸送系が存在しないシアノバクテリア、陸上植物の根の細胞に含まれる非光合成性葉緑体の Fd-FNR で示されているように、NADPH 由来の電子によるフェレドキシンの還元もしくは酸化に機能している可能性がある (Razquin et al., 1996 ; Lange et al., 2000)。NADPH からフェレドキシンへの電子輸送は非光合成性葉緑体の還元型フェレドキシン依存の亜硝酸および硫酸同化、フェレドキシン-チオレドキシン還元酵素による酸化型チオレドキシンの還元、鉄硫黄クラスターの合成で説明することができる (Ralph et al., 2004 ; Mulo et al., 2017 ; Karlusich et al., 2017 ; Seeber and Soldati-Favre, 2010 ; Yoshida et al., 2017)。また、葉緑体の Fd-FNR は *Chlamydomonad* NrCl902 の葉緑体において NADPH を酸化することで、 $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$ の恒常性維持に寄与している可能性がある (Peltier and Cournac 2002)。

光合成能を喪失した藻類や陸上植物において、アピコンプレクサや

Rhodospirillum rubrum の葉緑体から Fd-FNR (Röhrich et al., 2005 ; Balconi et al., 2009 ; Gawryluk et al., 2019)、非光合成黄金色藻の葉緑体は plastid terminal oxidase が報告されている (Dorrell et al., 2019)。また、非光合成性珪藻はフェレドキシンを欠いているが、NADPH-フェレドキシン電子伝達系を有している。しかし、フェレドキシンを持たない珪藻は NADPH-フェレドキシン電子伝達系を利用できないと思われる。非光合成性珪藻はフェレドキシンの代替えとして機能する葉緑体-フラボドキシンが検出されているため、非光合成性珪藻の NADPH-フェレドキシン電子伝達系はフラボドキシンを用いていることが示唆されている。この FNR やフェレドキシン/フラボドキシンは、一部を除く非光合成性葉緑体を持つ藻類や陸上植物から検出されている。したがって、FNR が媒介するフェレドキシン/フラボドキシンと NADP (H) の電子伝達遷移は、非光合成性葉緑体を維持するために不可欠な機能の 1 つである可能性が高い。NDH2、PTOX、プラストキノ合成の遺伝子は生物間で点在し分布していることが示されている (Fig. 3-4C)。NDH2 は緑藻のみ検出され、PTOX やプラストキノ合成は陸上植物、緑藻、珪藻類、黄金色藻から検出されている (Fig. 3-4C)。これらの生物は、それぞれ独立して光合成能を喪失していることが示唆され、NDH2、PTOX、プラストキノ合成の遺伝子を維持する収斂進化を示している (Pombert et al., 2014)。

プラストキノ合成の最後のタンパク質 MPBQ/MSBQ methyltransferase や FNR、PTOX などの重要なタンパク質の系統の多くは、遺伝子の垂直伝播であり、水平伝播である明確な証拠は示されていない (Dorrell et al., 2019 ; Fig. 3-4C)。また、Chlamydomonas reinhardtii や垂直伝播による派生の非光合成性葉緑体を持つ非光合成生物は、上述の PTOX およびプラストキノを媒介とする電子伝達系を最近まで保持していた可能性がある。しかし、プラストキノ合成遺伝子を持つ非光合成生物が、実際にプラストキノを合成できるかどうかは、生化学的に調査する必要がある。

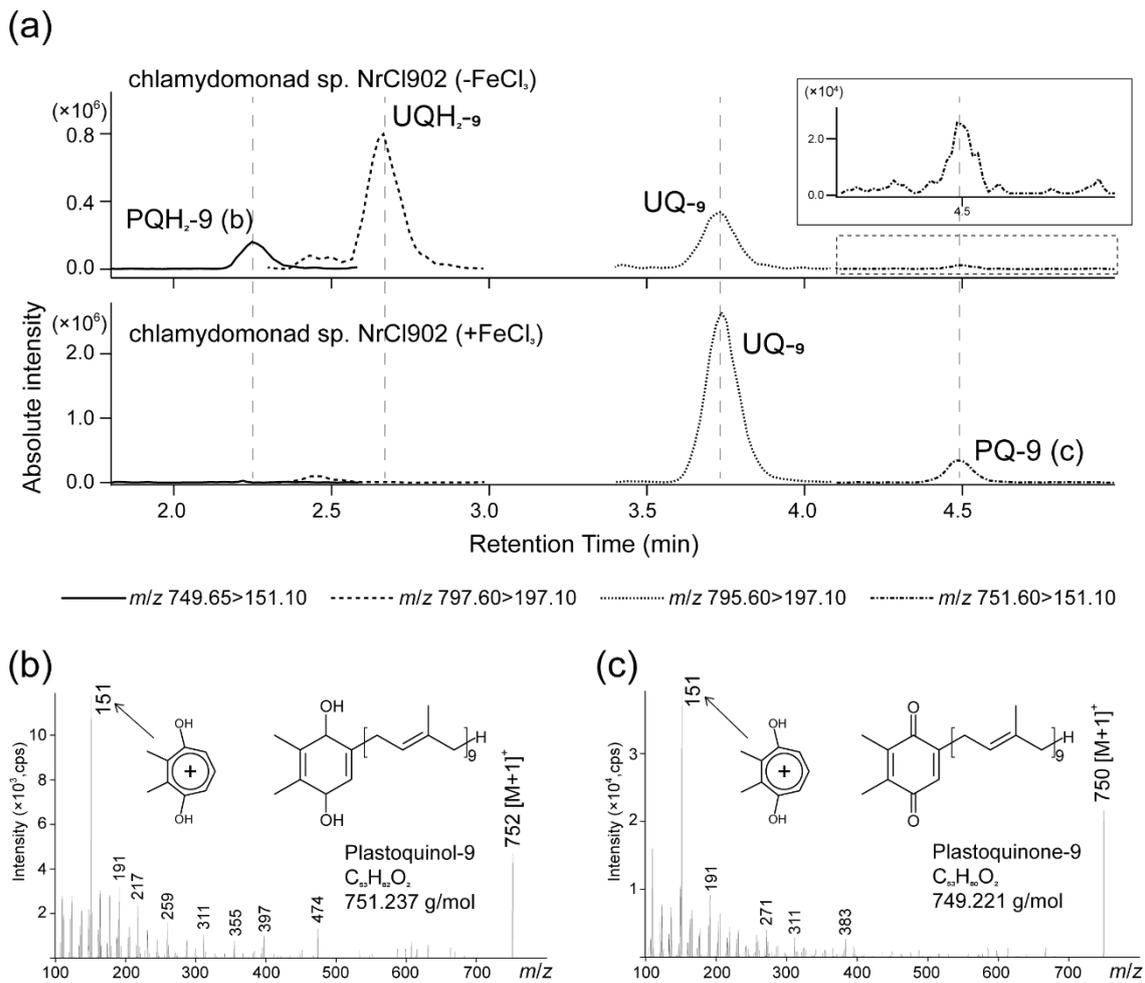


Fig. 3-1 : Chlamydomonad NrCl902 のプラストキノン/プラストキノール、ユビキノン/ユビキノールの検出・同定。a : アセトン抽出物の HPLC-MS/MS クロマトグラム (上)。アセトン抽出物を塩化鉄で酸化処理した後の HPLC-MS/MS クロマトグラム (下) b : 得られたプラストキノンの MS スペクトル。c : プラストキノールの MS スペクトル。

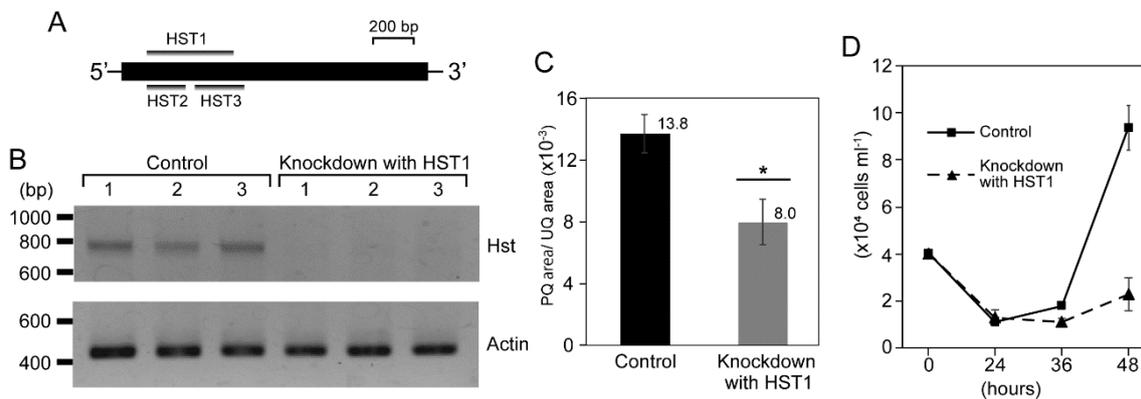


Fig. 3-2 : プラストキノン合成の抑制。A : RNAi の標的領域。B : HST1 およびアクチンの RT-PCR 結果。Control のレーン 1-3 は非 RNAi 株、HST1 のレーン 1-3 は RNAi 株。C : プラストキノンの相対量。エラーバーは標準偏差、数値は平均値を示す。星は Welch t-test で有意差が示された ($p < 0.05$)。D : 非 RNAi 株と RNAi 株の増殖の比較。エレクトロポレーションから 48 時間後まで示す。エラーバーは標準偏差を示す。これらの実験は全て 3 回に分けて行っている。

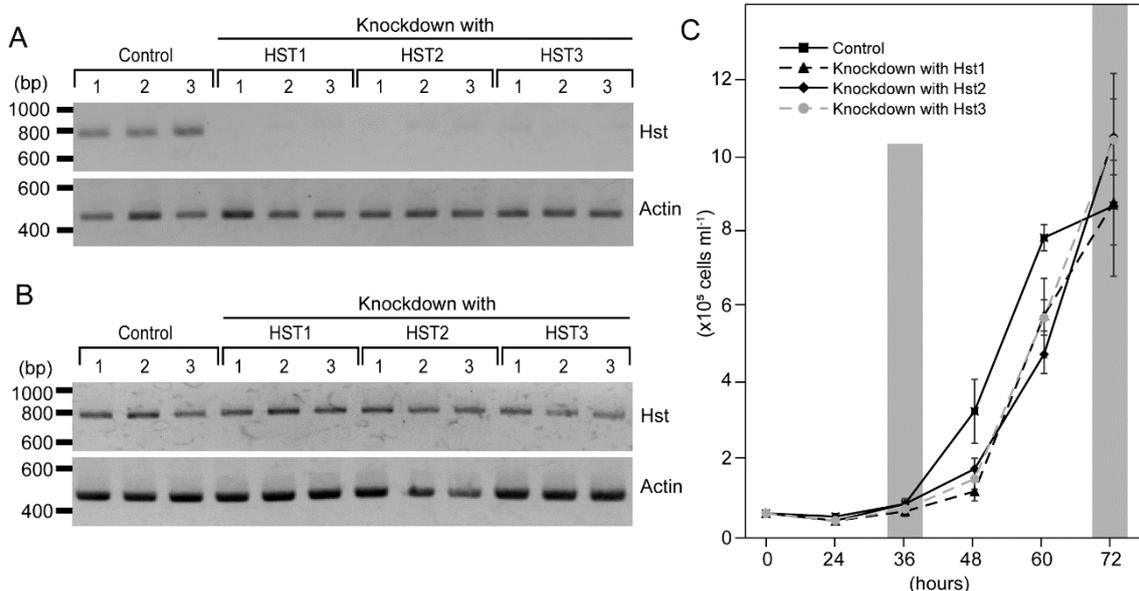


Fig. 3-3 : HST2、HST3 領域の dsRNA を用いた RNAi。A : エレクトロポレーションから 1.5 日経過後の HST1-3 およびアクチンの転写物の RT-PCR。Control 1-3 は dsRNA を用いていない非 RNAi 株から抽出した Total RNA を用いた。HST1 のレーン 1-3 の RT-PCR は RNAi 株から抽出した Total RNA を用いた。HST2 のレーン 1-3 の RT-PCR は RNAi 株から抽出した Total RNA を用いた。HST3 のレーン 1-3 の RT-PCR は RNAi 株から抽出した Total RNA を用いた。B : エレクトロポレーションから 3 日経過後の HST1-3 およびアクチンの転写物の RT-PCR。Control のレーン 1-3 は dsRNA を用いていない非 RNAi 株から抽出した Total RNA を用いた。HST1 のレーン 1-3 の RT-PCR は RNAi 株から抽出した Total RNA を用いた。HST2 のレーン 1-3 の RT-PCR は RNAi 株から抽出した Total RNA を用いた。HST3 のレーン 1-3 の RT-PCR は RNAi 株から抽出した Total RNA を用いた。C : 非 RNAi 株、RNAi 株 1-3 の増殖比較。エレクトロポレーションから 72 時間後まで示す。エラーバーは標準偏差を示す。これらの実験は全て 3 回に分けて行っている。

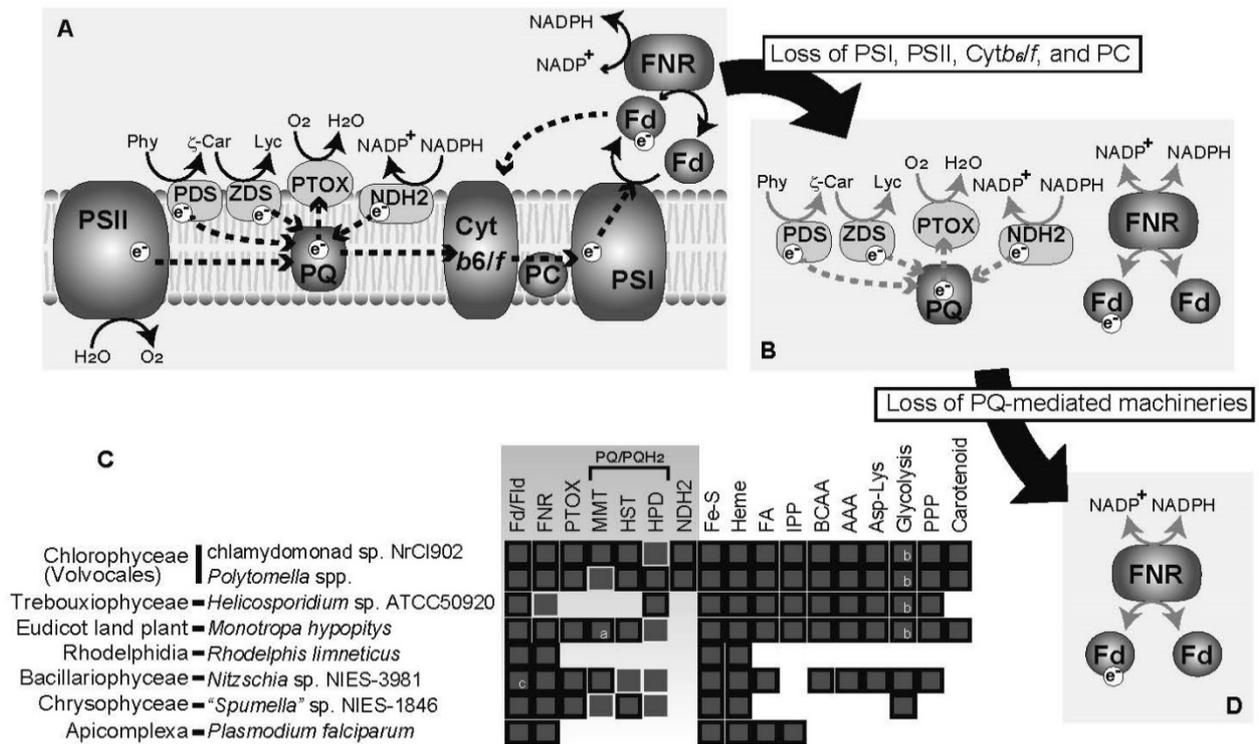


Fig. 3-4 : 葉緑体の光合成電子伝達系の進化。A : *Chlamydomonas reinhardtii* などで見られる光合成葉緑体。光合成電子伝達系は、電子伝達システム、plastid terminal oxidase (PTOX) を介す電子移動、循環的電子伝達経路、フェレドキシン-NADP+オキシドレダクターゼ (FNR) を介する NADPH-フェレドキシン電子移動から構成されている (Niyogi, 2000 ; Rochaix, 2011 ; Hohmann-Marriott and Blankenship, 2012 ; Cornic and Baker, 2012)。実線の矢印は反応の方向、破線の矢印は電子の流れを示す。B: 電子伝達システムを喪失した非光合成生物の葉緑体ないでの電子の流れ。灰色の矢印は、光合成葉緑体から推測された電子の流れ (破線) と反応 (実践) の方向を示すが、生化学的実験は行っていない。C : 非光合成葉緑体を有する真核生物における葉緑体標的タンパク質/葉緑体機能の分布。実線で囲まれた濃い灰色の箱は、対応するタンパク質や機能が葉緑体に局在していることを示し、実線のない箱は葉緑体を標的とする配列を持たないホモログが検出されている。明るい灰色で強調している箇所は、電子移動に関する

遺伝子である。*Polytomella* spp. (クラミドモナス目)、*Helicosporidium* sp. (トレボウクシア藻綱)、*Monotropa hypopithys* (陸上植物)、*Nitzschia* sp. (珪藻)、“*Spumella*” sp. (黄金色藻)、*Rhodolphis* spp. (Rhodelphidia)、*Plasmodium falciparum* (アピコンプレクサ) のデータは先行研究から抜粋した (Ralph et al., 2004 ; Pombert et al., 2014 ; Smith and Lee 2014 ; Asmail and Smith 2016 ; Ravin et al., 2016 ; Kamikawa et al., 2017 ; Dorrell et al., 2019 ; Gawryluk et al., 2019)。*Polytomella*、*Monotropa*、*Nitzschia*、*Spumella* はトランスクリプトーム、それ以外はゲノムデータから明らかになった。a は植物由来を示す (Cheng et al., 2003)。b は *enolase* と *phosphoglycerate mutase* が欠落している。c はフェレドキシン (Fd) の代わりにフラボドキシン (Flv) を使用している。D : *Helicosporidium* sp. の非光合成葉緑体は NADPH-Fd 電子移動のみを有する。AAA: aromatic amino acids、Asp-Lys: Aspartate-Lysine conversion、BCAA: branched chain amino acids、FA: Fatty acids、Fe-S: iron sulfur cluster、FNR: Ferredoxin-NADP⁺ reductase、HPD: 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase、HST: homogentisate solanesyltransferase、IPP: isopentenyl pyrophosphate、MMT: MPBQ/MSBQ methyltransferase、NDH2: type 2 NADH dehydrogenase、PSI: Photosystem I、PSII: Photosystem II、Cyt b6/f: cytochrome b6/f、PC: plastocyanin、PQ: plastoquinone、Phy: Phytoene、PPP: pentose phosphate pathway、 ζ -Car: ζ -Carotene、Lyc: Lycopene、e-: electron。

3.6 結論

本研究では、光合成を喪失した葉緑体の中にはプラストキノンを媒介とした電子伝達系を持つ非光合成生物が存在し、この非光合成性葉緑体の電子伝達系は葉緑体喪失進化の中間段階を反映していると考えられる。したがって、光合成性は、光合成能の喪失に伴い、光合成電子伝達系の光化学系IおよびII、シトクロム b/6f 複合体、プラストシアニンが喪失し、プラストキノンを媒介とする電子伝達系とフェレドキシンと FNR のみ維持される (Fig. 3-4B)。その後、プラストキノンを媒介とする電子伝達系を喪失した後、*Helicosporidium* sp.の葉緑体で見られるように、フェレドキシンと FNR のみが残される (Fig. 3-4D)。したがって、プラストキノン合成の遺伝子を持つ複数の非光合成性葉緑体を持つ生物は、Fig. 3-4B に示す進化段階であることが考えられる。これら生物は、解糖系およびペントースリン酸経路のような、酸化還元反応を必要とする代謝系がプラストキノンプールの喪失進化に対する制約に関与しているかもしれない。

以上のことから、光合成能を喪失した多様な真核生物の非光合成性葉緑体において、電子伝達系の縮退進化と酸化還元反応を伴う代謝との関連は、葉緑体の機能喪失の原理について提供できると考える。

第4章 非光合成性珪藻のクロロフィル中間産物の生産

4.1 概要

クロロフィルは光合成を行うために必要な光合成色素である。光合成能を喪失した非光合成性の植物・藻類には、クロロフィルが検出されていないため、クロロフィルの合成系は失われている。しかし、一部の非光合成性の植物・藻類では、クロロフィル合成遺伝子が葉緑体ゲノムに保存されている、あるいは発現していることが知られている。非光合成生物のクロロフィル合成を明らかにすることは、クロロフィル類の役割に関する新しい知見を得ることができる。本研究では、光合成能を喪失した珪藻 *Nithizha* sp. KQ18 がクロロフィル合成系の一部の遺伝子を残しており、クロロフィル合成中間体を生産していることを明らかにした。この非光合成珪藻の葉緑体ゲノムは、先行研究に用いられている非光合成珪藻の葉緑体ゲノムと同様に、ゲノム長およびタンパク質遺伝子数が減少していた。しかし、クロロフィル合成をつかさどる遺伝子の *chlI* 遺伝子を保持していた。そこで、クロロフィル合成に関わる遺伝子を、トランスクリプトーム解析によって網羅的に調べた。その結果、クロロフィル合成に関わる Mg-キラターゼ (*chlH*, *chlD*, *chlI*)、*por*、*chlG* が検索された。このことから、*Nithizha* sp. KQ18 では、一部のクロロフィル合成系路が保持されていることがわかった。そこで、高感度検出器を有する HPLC を用いて色素分析を行ったところ、未知のクロロフィルが検出された。未知のクロロフィルは、新奇クロロフィル Mg-Protoporphyrin IX dimethyl ester と同定された。このことは、葉緑体から光合成能が失われた後においても、クロロフィル類がなんらかの役割を果たしている可能性を示唆している。

4.2 背景

非光合成生物は、多くの場合、クロロフィル合成遺伝子を欠失している。一方

で、光合成能を失った陸上植物、クリプト藻類 *Cryptomonas paramecium*、サンゴに寄生するアピコンプレクサ生物の一部が、クロロフィル合成遺伝子を保持していることが知られている (Kwong et al., 2019 ; Wickett et al., 2011 ; Sharma and Dipen, 2012)。しかし、それら生物が合成するクロロフィル類 (クロロフィル、クロロフィル合成中間体) の検出は、試みられていない。そのため、クロロフィル合成遺伝子を保持している非光合成生物が、実際にクロロフィル類を合成しているかどうかについては明らかになっていない。本研究では、新たに確立された非光合成珪藻 *Nithizha* sp. KQ18 のゲノムデータおよびトランスクリプトームデータから、保持されているクロロフィルの生合成に関わる遺伝子を明らかにした。さらに、クロロフィル類が実際に合成されていることを HPLC による色素分析によって明らかにした。また、葉緑体ゲノムおよび葉緑体機能の解析からクロロフィルの合成系を推定した。

4.3 材料・方法

4.3.1 28S rRNA 遺伝子の系統解析

Nithizha sp. KQ18 の核コードの 28S rRNA 遺伝子配列を PCR とサンガー法で決定した。DNA は、Plant DNA Preparation Kit (Lena bioscience) を用いて抽出した。*Nithizha* sp. KQ18 の培養液を遠心分離し、上清を除いて細胞を回収した。Cell lysis solution を細胞ペレットに 100 μ l に加え、懸濁して 65°C で 30 分加熱した。加熱後、RNase を 2 μ l 加え 37°C で 20 分加熱した。次に、Protein precipitation solution を 50 μ l 加え、転倒混和後、氷上で 5 分間冷却した。冷却後、高速遠心分離 (12,000 \times g、5 分、4°C) を行い、上清を回収した後、2-プロパノールを 150 μ l 加え、高速冷却遠心分離 (12,000 \times g、1 分、4°C) し DNA を沈殿させた。DNA ペレットを 70% エタノールで洗浄し、送風乾燥後 TE 緩衝液に懸濁させた。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は LSU rRNA を特異的に増幅するプライマー (5'-

CCTTGGTCCGTGTTTCAAGA -3', 5'-ACCCGCTGAATTTAAGCATA -3') と Ex Taq® (TAKARA) を用いた (Scholin et al., 1994)。サンガーシーケンスは BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、製造者の指示に従い行った。得られた配列は、MAFFT (Katoh and Standley, 2013) を用いて、GenBank にある非光合成珪藻を含む珪藻類の配列データとアラインメントした。アラインメントが曖昧な部位は、BioEdit (Hall, 1999) を用いて手動で削除した。結果として得られた 116 の分類群と 511 サイトからなるデータセットについて、系統解析ソフト IQ-TREE 1.6.12 (Nguyen et al., 2015) を用いて、GTR + Γ + I モデル下で解析を行った。また、ブートストラップ確立を 100 回試行によって得た。

4.3.2 DNA・RNA 解析

上記と同様に Plant DNA Preparation Kit (Lena bioscience) を用いて全 DNA 抽出を行い、7.1 μ g 得た。この全 DNA を北海道システムサイエンス株式会社 (日本) に送り、製造者の指示に従い、TruSeq Nano DNA Library Prep Kit (Illumina) を用いて構築した 350-bp ライブラリーを用いて、Illumina HiSeq2500 プラットフォームを用いて 100bp ペアエンドシーケンシングを行った。アダプタートリミングおよび品質フィルタリングは、FASTX-Toolkit を用いて行った。長さの 75% 以上で 20 以上の品質スコアを持つリードは、品質フィルタリング後も保持され、4820 万のペアエンドリードが得られた。

RNA 抽出は TRIZOL® (Thermo Fisher Scientific) を用いた。植え継ぎ 2 日目の培養株を高速遠心分離機で回収し、細胞のペレットを得た。ペレットに TRIZOL を 1 ml 添加し懸濁した後、5 分間室温で静置し、0.2 ml のクロロホルムを加え、30 秒間激しく転倒混和を行い 5 分間静置した。次に高速冷却遠心分離 (12,000 rcf, 15 分間、4°C) し、水層を回収した。回収した水層に 0.5 ml の 2-プロパノールを加え、転倒混和後、室温で 10 分間静置した。再度高速冷却遠心分離 (12,000

rcf、15 分間、4°C) し、上清を破棄し、1 ml の 75%エタノールを加え RNA を洗浄した。その後、高速冷却遠心分離 (7,500 rcf、5 分間、4°C) し、70 µg の全 RNA を得た。この全 RNA をマクロジェン・ジャパン株式会社 (日本) に送り、製造者の指示に従い、TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit (ref) を用いて構築した cDNA ライブラリーを用いて、Illumina HiSeq2000 プラットフォームを用いて 100bp ペアエンドシーケンシングを行った。アダプタートリミングおよび品質フィルタリングは、FASTX-Toolkit を用いて行った。長さの 75%以上で 20 以上の品質スコアを持つリードは、品質フィルタリング後も保持され、4010 万のペアエンドリードが得られた。フィルタリングされたショートリードは、Trinity-v2.4.0 をデフォルト設定でアセンブルした。

4.3.3 葉緑体 DNA 配列の解析

光合成珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* (アクセッション番号: EF067920.1) の葉緑体に保存されているタンパク質配列をクエリとした相同性検索により、*Nithizha* sp. KQ18 のアッセンブルデータから葉緑体 DNA に由来する可能性の高い 1 つの AT リッチコンティグを検出した。コンティグ配列の両末端を架橋するプライマーを設計し、PCR とサンガーシーケンシングを用いてこのコンティグが環状であるかを確認した (Table 4-1)。PCR には Ex taq® (TAKARA) を使用し、PCR の条件として、初期熱変性に 96°C 2 分、熱変性に 98°C 10 秒、アニーリングは 50°C 20 秒、伸長反応は 72°C 2 分で行った。タンパク質をコードする遺伝子は、MFannot (Beck and Lang, 2010) を用いて同定した。同定されたアノテーションは、*Nithizha* sp. KQ18 の葉緑体エンコードされたタンパク質配列を GenBank non-redundant (nr) データベースと比較して blastP 解析し、検索されたタンパク質配列に報告されている機能を確認することで確認した。トランスファーRNA 遺伝子は、MFannot (Beck and Lang, 2010) および tRNAscan-SE (Lowe and Chan, 2016) を用いて同定した。

4.3.4 葉緑体タンパク質の系統解析

Nithizha sp. KQ18 の葉緑体にコードされたタンパク質配列の進化速度を検討するために、4種の非光合成珪藻 *Nithizha* spp.を含む38種の葉緑体ゲノムから、同じタンパク質の配列を GenBank で検索した。各タンパク質のホモログは、MAFFT (Kato and Standley, 2013) の L-INS-i オプションを用いてアラインメントした。アラインメントが曖昧な部位は、BioEdit (Hall, 1999) を用いて手動で削除した。アラインメント後の各タンパク質のデータセットを連結し、38 タクサと 14844 サイトからなる結果のデータセットを、系統解析ソフト IQ-TREE 1.6.12 (Nguyen et al., 2015) を用いて LG+C60+F-PMSF モデルの下でブートストラップ解析を 100 回行った。

4.3.5 クロロフィル類の HPLC 解析

Nithizha sp. KQ18 を、0.1% LB/IMK+0.1 mM Na₂SiO₃ · 9H₂O 培地 50 ml 入れた 225 cm² の組織培養フラスコで培養した。12 時間明 (50 μmol · m⁻² · s⁻¹)、12 時間暗の明暗周期下、22-23°C で 4 日間静置培養した。培養した細胞を全て回収し、ペレットを作成した。ペレットにアセトンを 25 μl 加え、氷水で冷やしながら 1 分間超音波破碎して色素を抽出した。試料を高速冷却遠心機 (12,000 rcf、15 分間、4°C) で粗雑物と液相に分離した。得られた液相を HPLC-PDA-FLD 装置でクロロフィル類の解析を行った。装置は島津株式会社 (日本) のクロマトグラフィーを用いた。装置は送液ポンプ LC-30AD、HPLC 脱気装置 DGU-20A3R/5R、カラムオーブン CTO-20AC、フォトダイオードアレイ検出器 SPD-M30A、蛍光検出器 RF-20A XS、HPLC 液クロマトシステムコントローラー CBM-20A で構成され、これら装置は HPLC 液クロマトシステムコントローラー CBM-20A を介して、パーソナルコンピュータにインストールされている HPLC ソフト LabSolution で制御されている。カラムは ZORBAX Eclipse plus C18 (4.6 x 30 mm、1.8 μm ;

Agilent co., led.) を用いて行い、移動相と Zapata et al., 2000 で使われている移動相を用いた。また、HPLC 解析のグラジエント比率は Zapata et al., 2000 を参考にして改変した (Table 4-2)。

4.3.6 *Nitzschia* sp. KQ18 の Mg- Protoporphyrin IX dimethyl ester

定常期に達した *Nitzschia* sp. KQ18 を 12 時間毎に明暗が切り替わる培養庫で 5 日間 0.1% LB-IMK+Si (0.1 mM) 下で培養した。培養した株を再度植え継ぎ、同条件で培養した。培養した株を 50ml の 0.1% LB-IMK+si (0.1 mM) が入った 175 cm² の細胞培養用フラスコに植え継ぎ 4 日間培養した。この培養した株を 3 時間置きに回収した (本研究では 0 時、3 時、6 時、9 時、12 時、15 時、18 時、21 時にサンプリングをしている)。回収は、培養フラスコの底面に付着している細胞をスクレーパーでそぎ落とし、スイングローターの高速遠心分離機を用いて 2000 rpm、5 分間遠心分離することで細胞を回収した。回収した細胞をマイクロチューブに移し替え、遠心機とマイクロピペットで水分を除去した。水分を除去した直後に、アセトン (高速液体クロマトグラフ用、和光純薬株式会社) を 50 μ l 添加し、氷水で冷やしながら、超音波破碎を 1 分間行った。この試料を高速遠心分離機にかけ、粗雑物を落とし、上清を回収した。この作業をもう一度行った。得られた上清を HPLC-FLD (島津、日本) で分析した。装置は送液ポンプ LC-10vp、HPLC 脱気装置 DGU-14A、カラムオープン CTO-10Avp、蛍光検出器 RF-10XL、HPLC 液クロマトシステムコントローラー SCL-10Avp で構成され、これら装置は HPLC 液クロマトシステムコントローラー SCL-10Avp を介して、パーソナルコンピューターにインストールされている HPLC ソフト Class-vp で制御されている。HPLC のカラムと移動相は、Zapata et al. (2002) に従い C8 カラム (150 mm \times 4.6 mm、3.5 μ m ; waters co., ltd.) を用いて、移動相は Methanol: Acetonitrile: 0.25 M Pyridine solution pH 5.0 (50: 25: 25 v; v; v) と Methanol: acetonitrile: acetone (20: 60: 20 v: v: v) を用いた。Mg-Protoporphyrin IX と

Protoporphyrin IX、Mg-protoporphyrin IX 13-methyl ester、Mg-protoporphyrin dimethyl ester の標品は民秋均教授（立命館大学）、木下雄介助教（立命館大学）、柏山祐一郎教授（福井工業大学）らによって合成されたものを提供いただいた。

4.4 結果および考察

4.4.1 *Nitzschia* sp. KQ18 の分子系統解析

LSU 遺伝子配列に基づく分子系統解析では *Nitzschia* sp. KQ18 が *Nitzschia* 属に帰属することが示唆され、既知の非光合成性珪藻の系統とは異なる系統を示した (Fig. 4-1)。しかし、LSU rRNA 遺伝子の系統解析では系統樹のブートストラップ値が非常に低いため、他の非光合成性珪藻と単系統でないこと強く支持する結果とはいえなかった。そこで、Approximately unbiased (AU) 検定を用いて検討した。AU 検定は、「非光合成性珪藻は単系統である」という代替仮説のもと、検定を行った。AU 検定の結果、5%の基準 (p 値 : 7.04E-06) で代替仮説が棄却され、非光合成性珪藻は LSU 遺伝子系統において単系統ではないことが示唆された (Table 4-3)。また、ミトコンドリアゲノム配列に基づく分子系統解析を行ったところ、*Nitzschia* sp. KQ18 は光合成性、非光合成性の両方を含む *Nitzschia* 属とブートストラップ値 100 で支持される単系統群を形成した (Fig. 4-2)。一方、その他の非光合成性珪藻類は単系統群を形成し、光合成性 *Nitzschia* 属と単系統群を形成した。すなわち、KQ18 株は既知の非光合成性珪藻と単系統群を形成しないことが示唆された (Fig. 4-2)。上記と同様に AU 検定を行ったところ、使用した非光合成性珪藻がすべて単系統的であるという系統樹は棄却された (p 値 : 8.58E-41 ; Table 4-3)。これまで、非光合成性珪藻の単系統性に関する議論が続いていたが (Kamikawa et al. 2015、Onyshchenko et al., 2019)、本研究によって、非光合成性珪藻類は多系統であり、光合成性 *Nitzschia* から非光合成性 *Nitzschia* への進化が複数回独立して起きていることが示された。

4.4.3 *Nitzschia* sp. KQ18 の非光合成性葉緑体ゲノム

Nithizha sp. KQ18 の DNA データに対し、*Nithizha* 属の近縁種で珪藻類のモデル生物としても知られる *Phaeodactylum tricornutum* の葉緑体ゲノム配列を用いて、相同性検索し、候補配列を割り出し、葉緑体ゲノムを決定した。PCR とサンガーシークエンスで、ギャップを埋め、長さ 65,640 bp の環状ゲノムであることを明らかにした (Fig. 4-3)。不等毛藻類葉緑体ゲノムは、一般的に rRNA オペロンの 2 つの逆反復配列 (IR) 領域とそれらに挟まれた 2 つのシングルコピー領域 (SSC および LSC) からなる 4 分構造をとる (Han et al., 2019)。しかし、本種は rRNA オペロンをもたず、上述の構造をとっていないことがわかった。AT 含量は 70.9%、タンパク質遺伝子が 69 個、Transfer RNA が 27 個、リボソーム RNA が 3 個検出できた (Table 4-4)。葉緑体ゲノムに含まれるタンパク質遺伝子は翻訳に関わる 40 の *rpl* や *rps* 遺伝子、転写に関わる 5 つの *rpo* 遺伝子で構成され、クロロフィル合成、チアゾール合成、鉄硫黄クラスター合成に関わる遺伝子、シヤペロンタンパク質遺伝子が検出できた。*Nithizha* sp. KQ18 と既報の非光合成珪藻の葉緑体ゲノムサイズを比較したところ、タンパク質遺伝子が他の非光合成珪藻 (58-62 個 ; Kamikawa et al., 2018) より約 10 個多くコードされているにも関わらず、ゲノムサイズが一番小さいことが分かった (Fig. 4-4)。これは、IR 領域が無いことによるものと考えられた。

葉緑体ゲノムが、より多くのタンパク質遺伝子を保持することは、葉緑体ゲノムの縮退進化が、他の非光合成珪藻より進んでいない可能性を示唆した。そこで、葉緑体ゲノムに保持されている 38 個のタンパク質のアミノ酸配列を用いて、光合成性および非光合成性珪藻の葉緑体にコードされているタンパク質と進化速度を比較した。具体的には分子系統樹を作成し、その枝長を比較した。その結果、*Nithizha* sp. KQ18 の葉緑体ゲノムの枝長は、光合成性珪藻のタンパク質の進化速度よりは長いものの、既報の非光合成珪藻の枝長と比べ 1/4-1/3 程度であった。このことは、*Nithizha* sp. KQ18 の葉緑体ゲノムにコードされているタンパク質の

進化速度が、他の非光合成珪藻に比べ 1/4-1/3 程度小さく、葉緑体ゲノムの縮退進化が、他の非光合成珪藻より進んでいないことを示していた (Fig. 4-5)。

Nithizha sp. KQ18 の葉緑体ゲノムには、光化学系に関わる遺伝子 (*psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbB* など)、シトクロム関連遺伝子 (*petA*, *petB* など)、炭酸固定 (*rbcL*, *rbcS*) が喪失していた。一方で、クロロフィル合成遺伝子 (*chlI*)、チアゾール遺伝子 (*thiG*, *thiS*)、フェレドキシン (*petF*) を保持していた。これらは他の非光合成珪藻の葉緑体ゲノム (Kamikawa et al., 2018) には検出されていない遺伝子であり、このことから縮退進化が進んでいないことを伺うことができる。

4.4.4 *Nitzschia* sp. KQ18 の非光合成性葉緑体機能の推定

Nithizha sp. KQ18 の非光合成性葉緑体が保持している機能を明らかにするために、トランスクリプトーム解析を行ったところ、解糖系、鉄硫黄クラスター合成、アミノ酸合成、クロロフィル・ヘム合成、リボフラビン合成、チアゾール合成に関わる遺伝子が検出された。このことから光合成性葉緑体がこれらの代謝機能を保持しているものと考えられた (Fig. 4-3)。一方で、光合成電子伝達系や炭酸固定、カロテノイド合成、非メバロン酸経路の代謝系に関わる遺伝子が欠失していた。これらの代謝機能がすでに失われていると考えられた。注目すべきは、光合成能を失った非光合成葉緑体においてクロロフィル合成に関わる遺伝子を保持していることである。Mg-キラターゼ (*chlI*, *chlH*, *chlD*)、Mg-protoporphyrin IX methyltransferase (*chlM*)、protochlorophyllide reductase (*por*)、chlorophyll synthase (*chlG*) が DNA データおよびトランスクリプトームデータから検出され、クロロフィル類を合成している可能性が示唆された (Alison and Witty, 2002 ; Fig. 4-6)。

4.4.5 非光合成生物のクロロフィル合成

アセトンを用いて *Nithizha* sp. KQ18 の水溶性、脂溶性物質を全て抽出し、HPLC

分析を行ったところ、クロロフィル類に由来すると思われる 2 つの蛍光物質が検出された (Fig. 4-7a)。高感度の検出器を用いた HPLC 解析から、2 つの蛍光物質が 417 nm、548 nm、586 nm に吸収を持つ物質 (物質 A) と 399 nm、506 nm、537 nm、571 nm に吸収を持つ物質 (物質 B) であることが示された (Fig. 4-7b)。吸収スペクトルの特徴から、物質 A はクロロフィル合成中間体の Mg-Protoporphyrin 様 (Granick, 1948、Alison and Witty, 2002) であることが示唆された (Fig. 4-7b)。また、物質 B は吸収ピークが Protoporphyrin IX と類似していることが示唆された (Fig. 4-7b)。そこで、Mg-Protoporphyrin IX と Protoporphyrin IX、Mg-protoporphyrin IX 13-methyl ester の標品と HPLC の保持時間を比較した。物質 B は保持時間と吸収スペクトルが一致したため、Protoporphyrin IX と同定した。一方、物質 A は、クロロフィル合成過程で生産される Mg-Protoporphyrin IX、Mg-Protoporphyrin IX 13-methyl ester と吸収スペクトルは類似していたが、保持時間が異なっていた。保持時間から Mg-Protoporphyrin IX 13-methyl ester より少し疎水性が強いと考えられるため、C17³ に付加されるメチル基より極性が低いもしくは C13³ のカルボキシル基にメチル基以外のアルコールが付加された構造と推定した。クロロフィル合成過程において、クロリン環にアルコールを付加する酵素として知られているのは *chlM* のみである (Meinecke et al., 2010) ことから、*chlM* が、クロリン環の置換箇所を正常に認識していないと考えた。そこで、Mg-Protoporphyrin IX の C17³ のカルボン酸がメチル化された Mg-protoporphyrin dimethyl ester 標品を HPLC で分析し、保持時間、吸収スペクトルを比較したところ、物質 A と一致したことから、物質 A を Mg-protoporphyrin dimethyl ester と同定した (Fig. 4-7b)。これらのことから、*Nithizha* sp. KQ18 のクロロフィル合成は Mg-Protoporphyrin か Mg-protoporphyrin IX 13-methyl ester で代謝系が途切れていることが示唆された (Meinecke et al., 2010 ; Alison and Witty, 2002 ; Fig. 4-6)。Mg-Protoporphyrin IX dimethyl ester は新奇クロロフィル合成中間体色素であり、Mg-Protoporphyrin または Mg-protoporphyrin IX 13-methyl ester から生産されたク

クロフィル合成中間体である可能性が高い。

Nithizha sp. KQ18 の Mg-protoporphyrin dimethyl ester は、光条件、細胞をサンプリングする時間で、HPLC の蛍光検出器から出てくる Mg-protoporphyrin dimethyl ester の蛍光量が異なり、時には検出されなかった（データは出していない）。そこで、12 時間明期：12 時間暗期の明暗周期下で培養し、明暗周期の各時間の細胞の色素分析をしたところ、明期から暗期にかけて特異的に増加していることがわかった（Fig. 4-8）。明条件もしくは暗条件のみ培養した *Nithizha* sp. KQ18 のアセトン抽出物からは不規則に検出され、さらに検出量がかなり低いことから、Mg-protoporphyrin dimethyl ester の合成は概日周期もしくは明暗の時間で制御されている可能性が高いことが明らかになった（Fig. 4-8）。先行研究では、*P. tricornutum* のクロフィル合成が夜間に行われていることが示めされていることから（Hunsperger et al., 2016）、*Nithizha* sp. KQ18 のクロフィル合成のタイミングは光合成能を保持していた時のものを引き継いでいる可能性がある。

本研究の結果は、光合成能を二次的に失った非光合成生物の一部の生物においても、一部のクロフィル合成遺伝子が保持され、クロフィル合成中間体の合成が行われていることを示している。さらに、光合成能を喪失した非光合成生物がクロフィル合成中間体を持つことは不利益であるため（Kashiyama and Tamiaki 2014）、おそらく、光合成以外の機能を担っている可能性が示唆される。

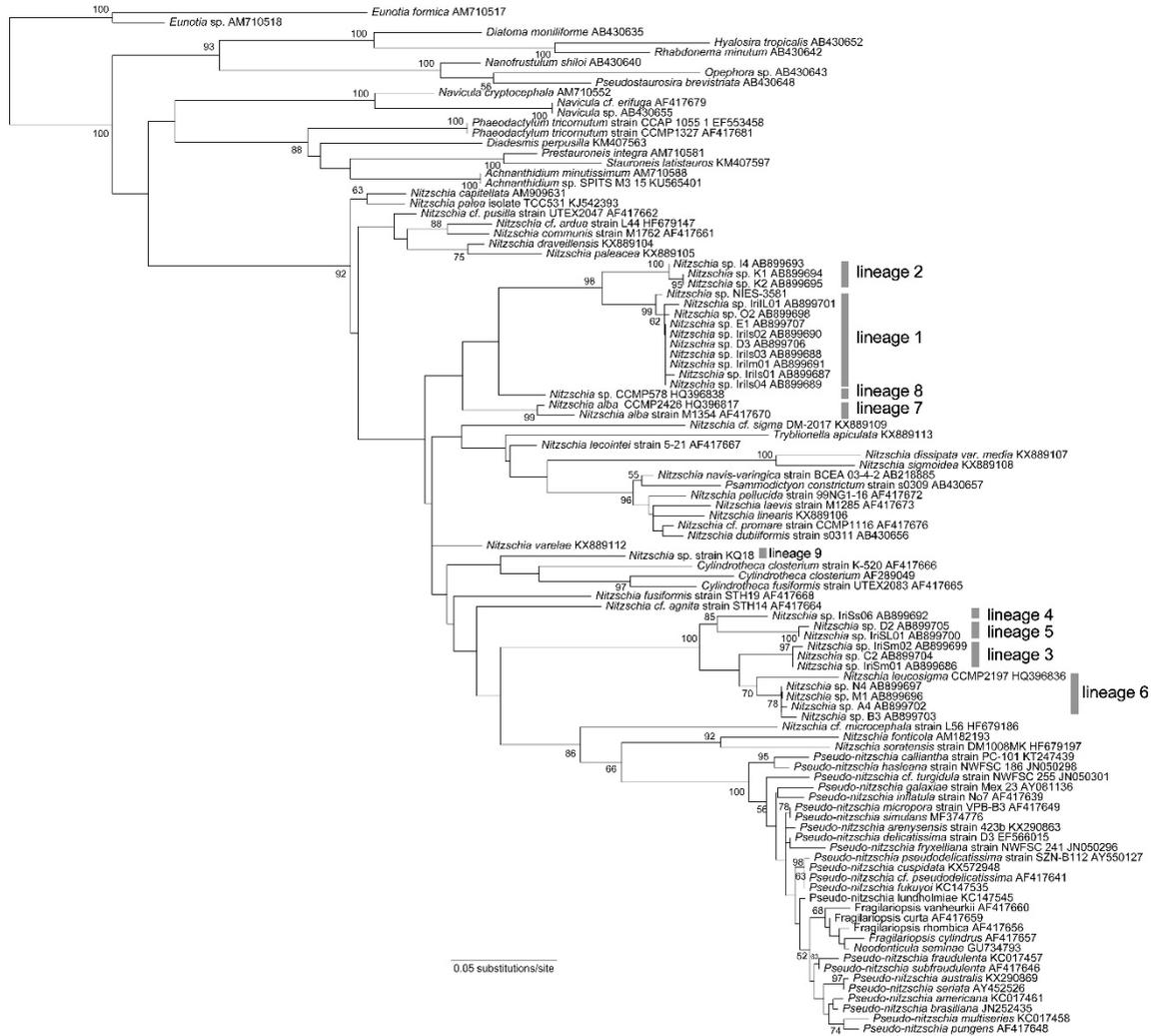


Fig. 4-1 : LSU rDNA 遺伝子配列に基づく最尤系統樹。102 タクサと 523 サイトで構成されたデータセットと IQ-TREE 1.6.12 を用いて GTR+G+I モデルで解析した。灰色の線は非光合成性珪藻の系統を示す (Kamikawa et al., 2015)。

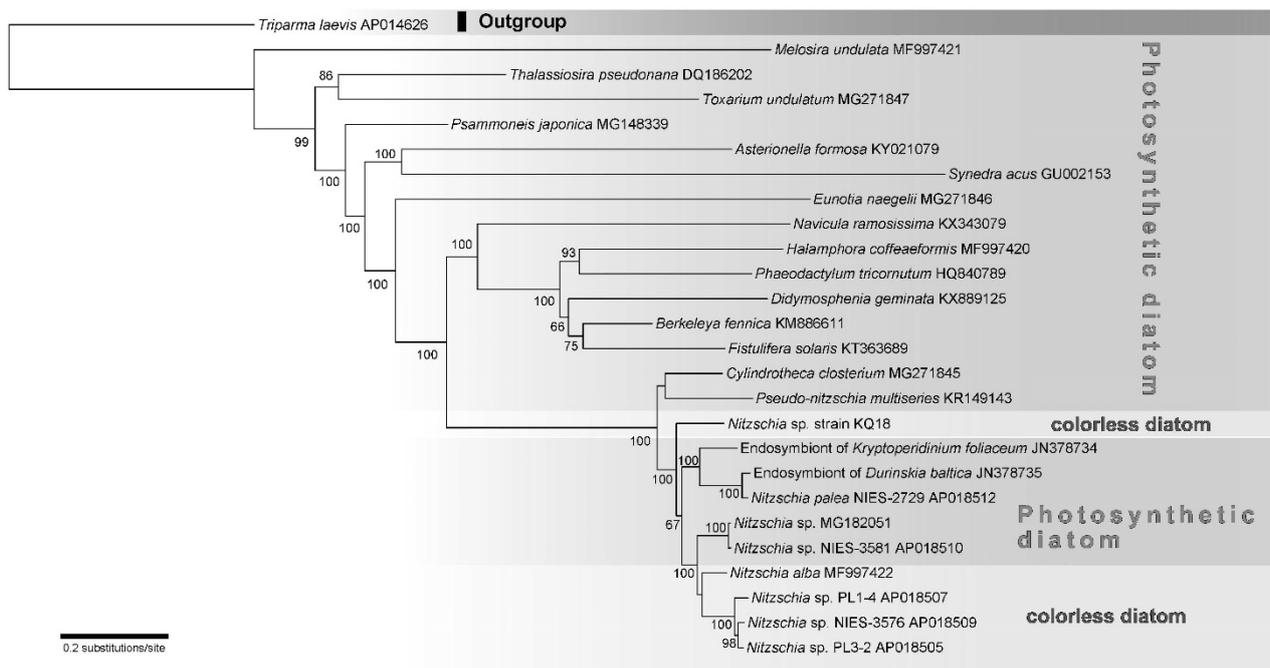


Fig. 4-2 : ミトコンドリアタンパク質のデータセットを用いた最尤系統樹。35 個タンパク質配列を結合した、26 タクサと 7210 サイトによる解析。IQ-TREE 1.6.12 を用いて LG+C60+F+Γ-PMSF モデルで解析した。ブートストラップ値は ≥ 50 を示す。

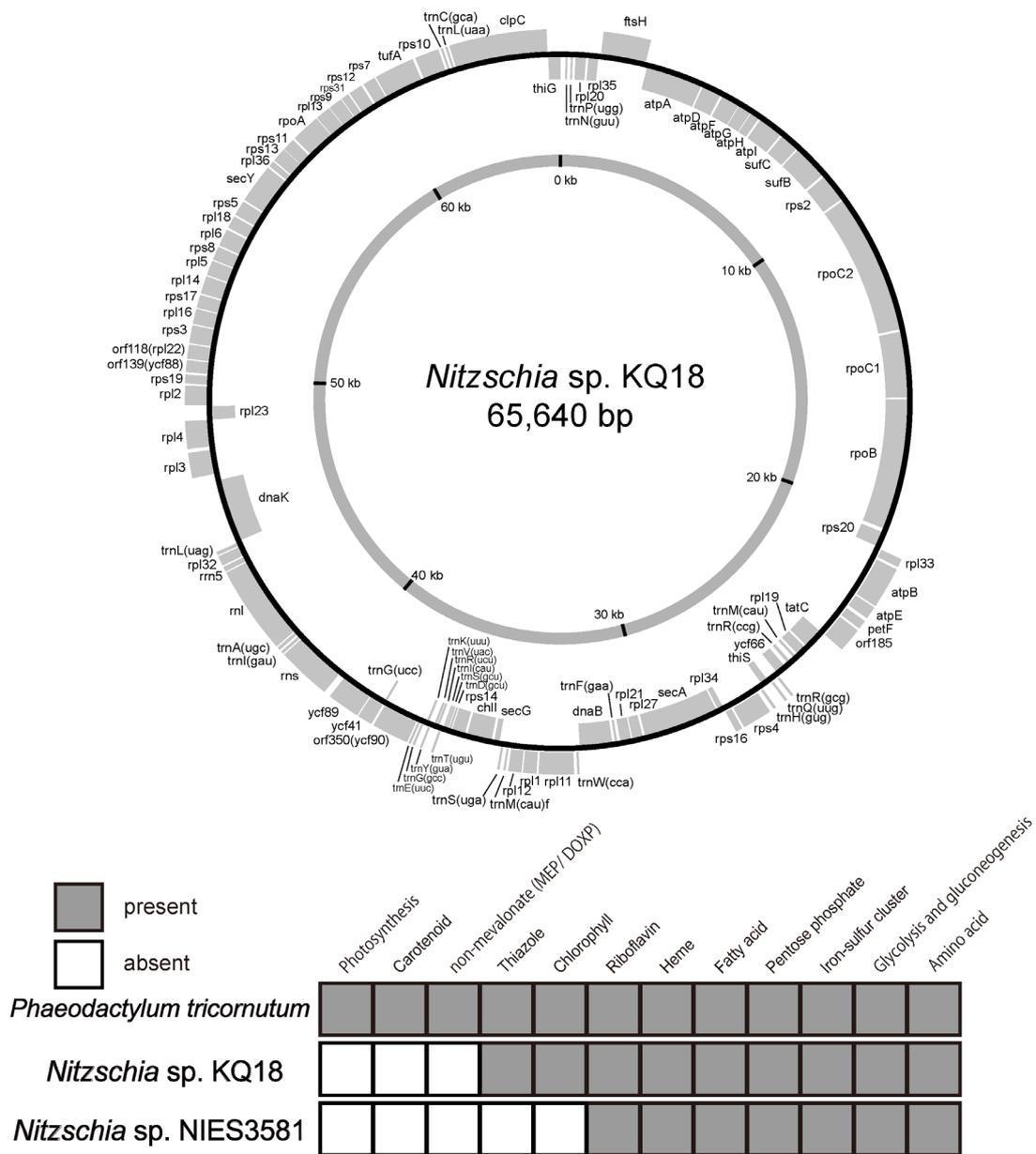


Fig. 4-3 : 非光合成性葉緑体ゲノムマップと葉緑体機能の推定。A : *Nitzschia* sp. KQ18 の葉緑体ゲノム。灰色の箱はタンパク質遺伝子、灰色の線は tRNA 遺伝子を示す。B : 光合成性珪藻と非光合成性珪藻種の葉緑体の機能推定 (Kamikawa et al., 2018)。灰色は検出され、白色は検出されていない。

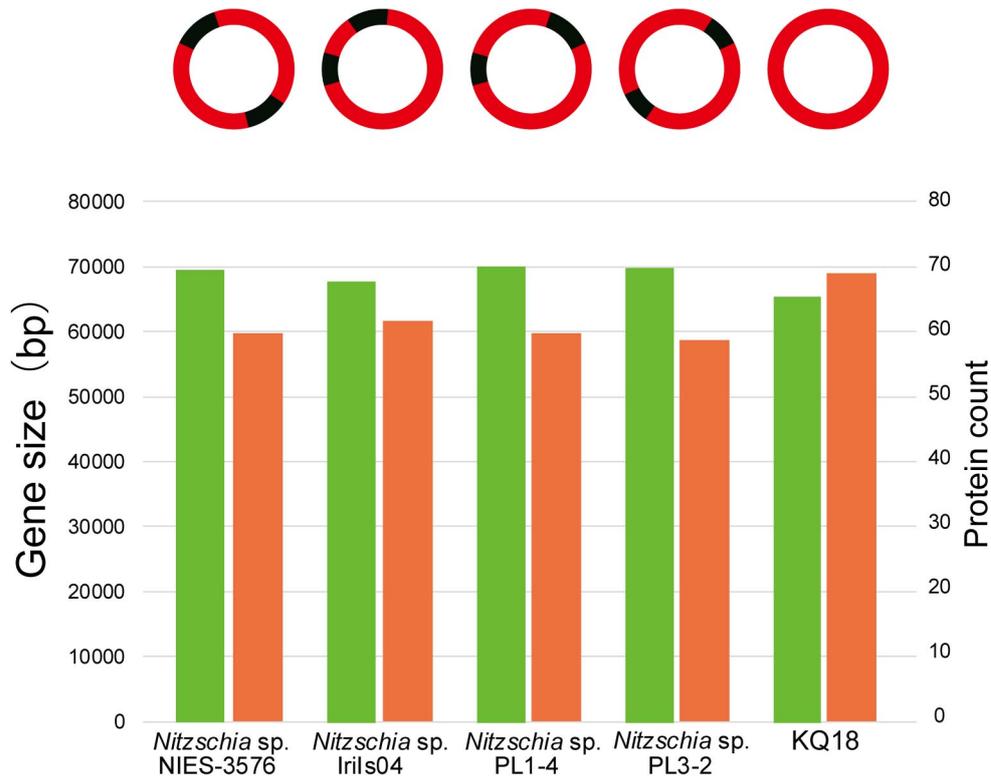


Fig. 4-4 : 非光合成性珪藻の非光合成性葉緑体ゲノムの比較。緑色のバーはゲノム長、オレンジのバーはタンパク質遺伝子の数を示す。グラフ上のリングは非光合成性葉緑体ゲノムの構造を簡略化した。赤は小さなシングルコピーと大きなシングルコピー領域を示す。黒は IR 領域を示す。

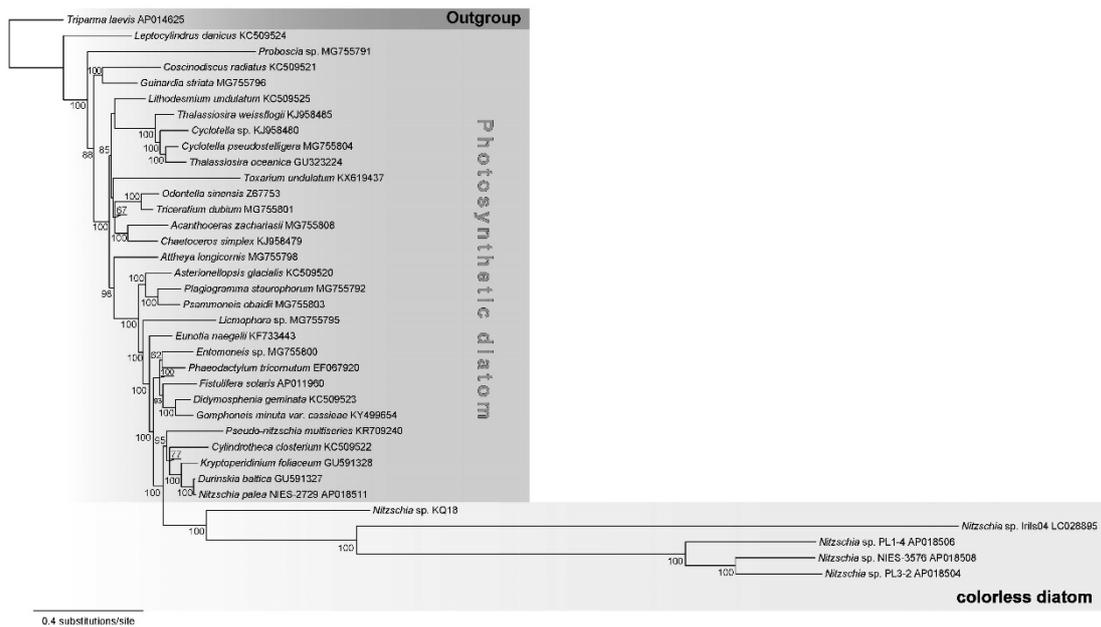


Fig. 4-5 : 葉緑体タンパク質のデータセットを用いた最尤分子系統樹。38 タンパク質配列を結合した、44 タクサと 6,660 サイトの解析。IQ-TREE 1.6.12 を用いて LG+C60+F+Γ-PMSF モデルで解析した。ブートストラップ値は ≥ 50 を示す。

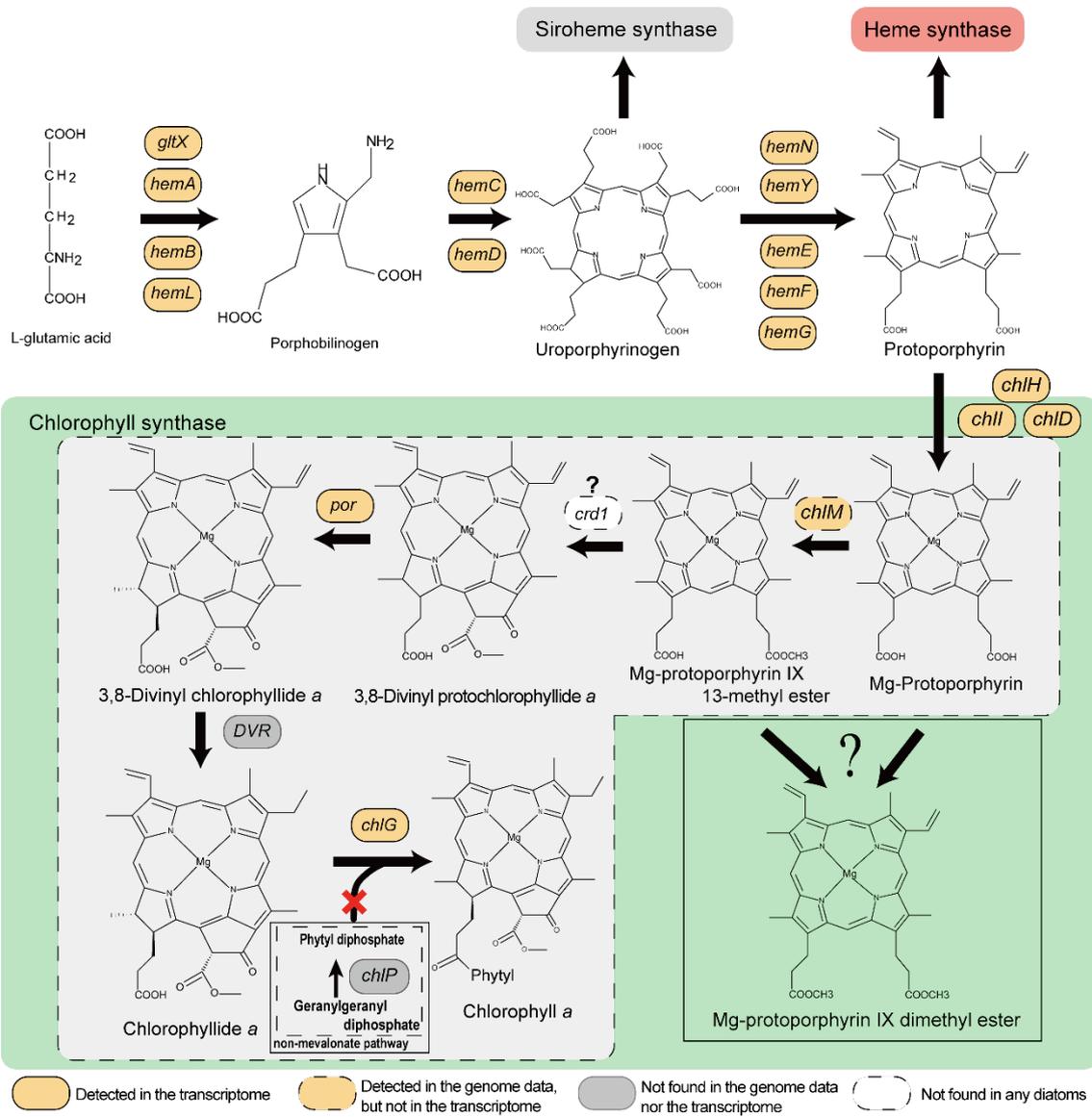


Fig. 4-6 : *Nitzschia* sp. KQ18 のクロロフィル合成経路。実線で囲まれたオレンジ色の円はトランスクリプトームデータから検出された。破線で囲まれたオレンジ色はゲノムデータから検出されたが、トランスクリプトームデータからは検出されなかった。実線で囲まれた灰色の円はトランスクリプトームデータ、ゲノムデータともに検出されなかった。破線の円は珪藻では検出されていない。
chlD: magnesium chelatase subunit D、*chlG*: chlorophyll/bacteriochlorophyll a synthase、
chlH: magnesium chelatase subunit H、*chlI*: magnesium chelatase subunit I、*chlM*: magnesium-protoporphyrin O-methyltransferase、*chlP*: geranylgeranyl

diphosphate/geranylgeranyl-bacteriochlorophyllide a reductase, *crdI* : magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester (oxidative) cyclase, *DVR* : divinyl chlorophyllide a δ -vinyl-reductase, *gltX* : glutamyl-tRNA synthetase, *hemA* : glutamyl-tRNA reductase, *hemB* : porphobilinogen synthase, *hemC* : porphobilinogen deaminase, *hemD* : uroporphyrinogen-III synthase, *hemE* : uroporphyrinogen decarboxylase, *hemF* : coproporphyrinogen III oxidase, *hemG* : menaquinone-dependent protoporphyrinogen oxidase, *hemL* : glutamate-1-semialdehyde-2,1-aminomutase, *hemN* : coproporphyrinogen dehydrogenase, *hemY* : protoporphyrinogen/coproporphyrinogen III oxidase, *por* : protochlorophyllide reductase

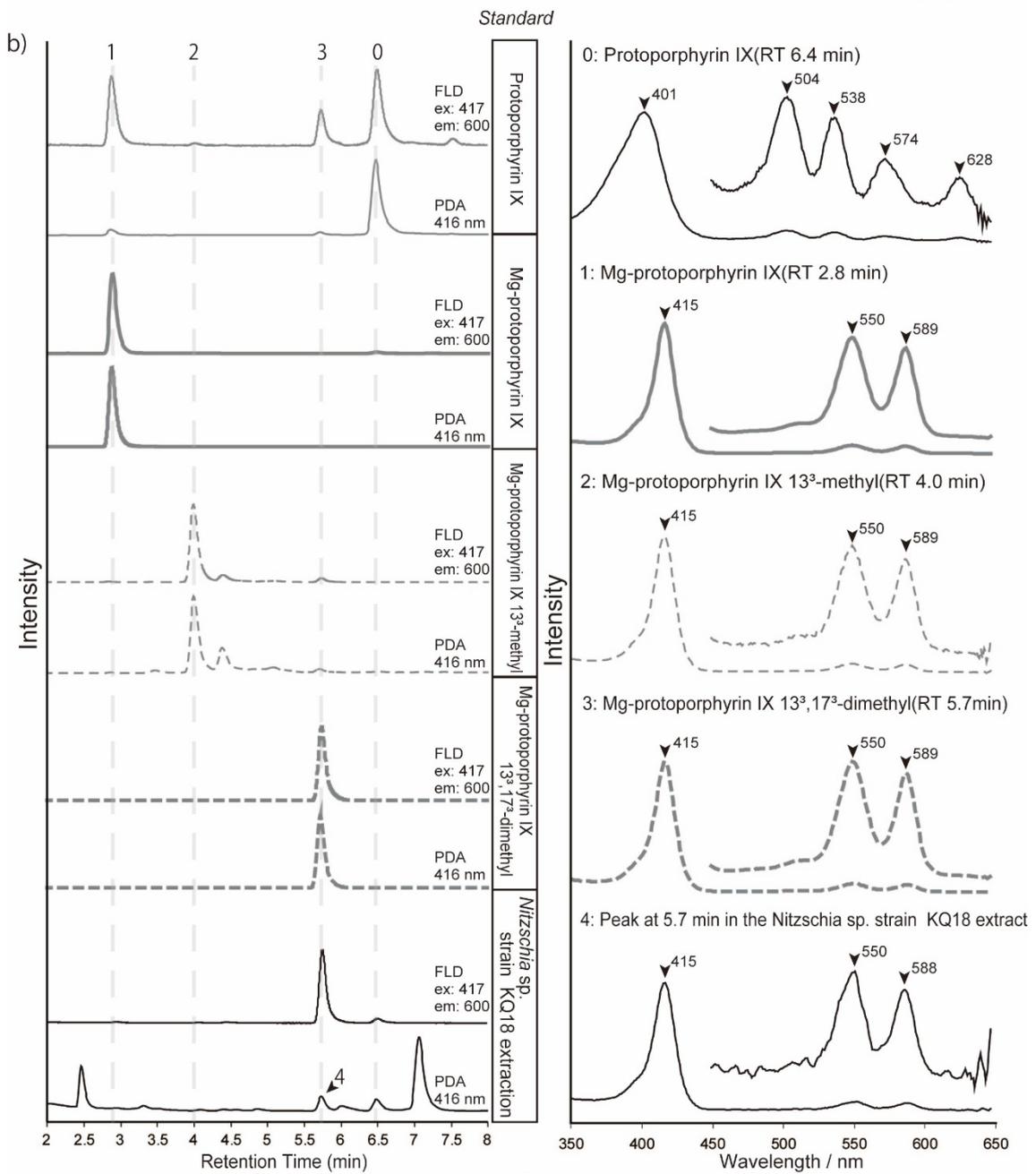
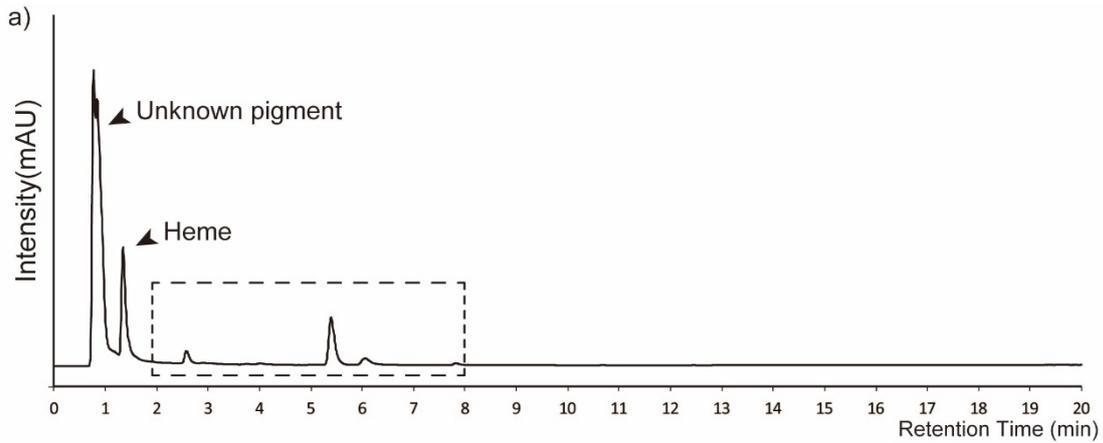


Fig. 4-7 : *Nitzschia* sp. KQ18 のクロロフィル類の HPLC 解析結果。

a : *Nitzschia* sp. KQ18。破線の囲いは b のクロマトグラム範囲。b : クロロフィル類標品と *Nitzschia* sp. KQ18 の抽出物のクロマトグラムと吸収スペクトル。0 : Protoporphyrin IX (RT : 6.4)、1 : Mg-protoporphyrin IX (RT : 2.8)、2 : Mg-protoporphyrin monomethyl (RT : 4.0)、3 : Mg-protoporphyrin dimethyl ester (RT : 5.7)、4 : 5.7 分に検出された *Nitzschia* sp. KQ18 の色素吸収スペクトル。

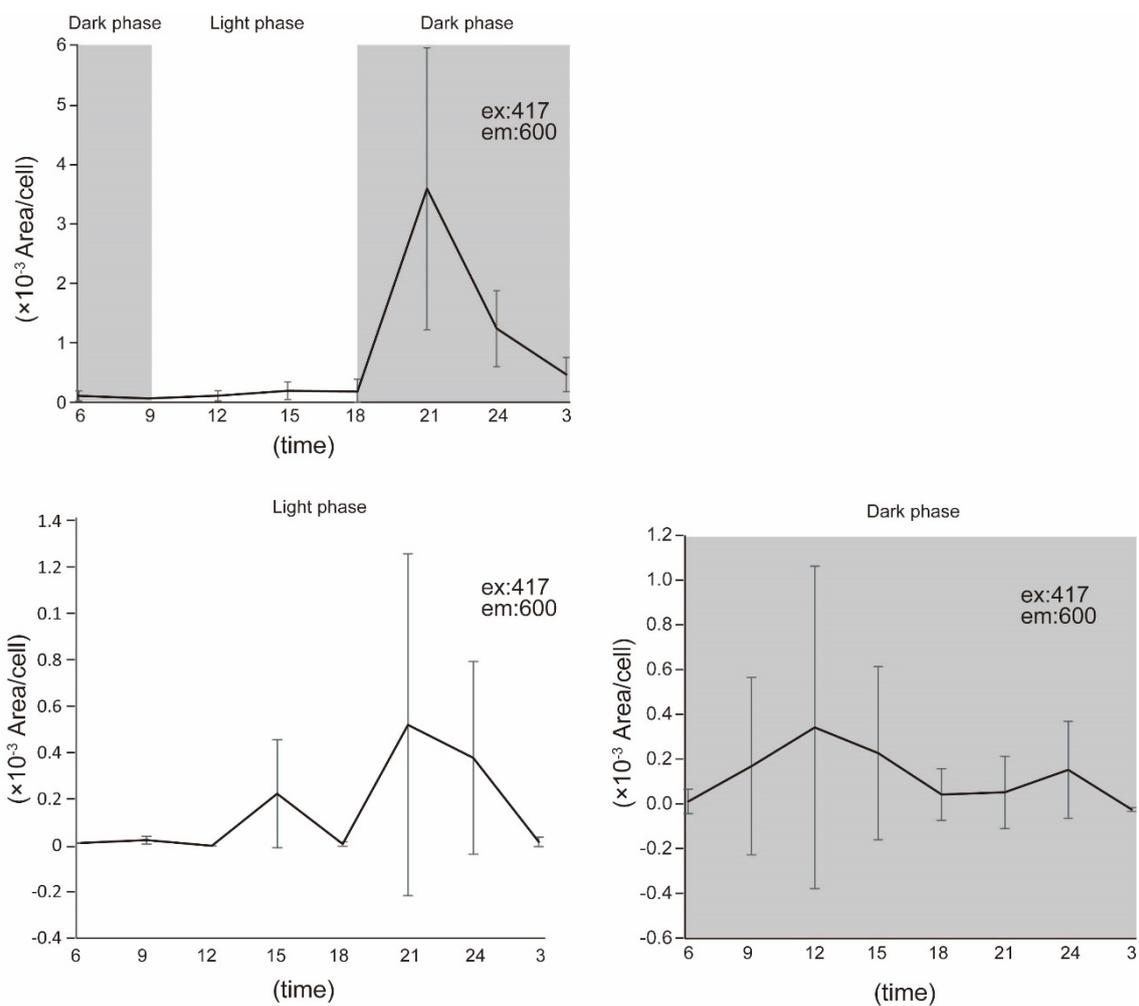


Fig. 4-8 : 明暗周期下における Mg-protoporphyrin dimethyl ester 量の変動。白い領域は明期を示す。灰色の領域は暗期を示す。蛍光検出は励起波長 417 nm、蛍光波長 600 nm で測定した。エラーバーは標準偏差を示す。これらの実験は全て 4 回に分けて行っている。

Table 4-1 葉緑体ゲノムの PCR に用いたプライマー

標的	プライマー名	プライマー配列 (5' -3')
葉緑体ゲノム	KQ_PL_Forward_outside	GAGAAGAGTTAGAAGGACTTCCAG
葉緑体ゲノム	KQ_PL_Reverse_outside	GCTCCCTCAAAGTTATTTTCGAG
葉緑体ゲノム	KQ_PL_Forward_5_end	GTTACTTAGTCCTTGCCCAGAGC
葉緑体ゲノム	KQ_PL_Reverse_3_end	CTAGTTTCGTCCTCAGTAGCTCAG
ミトコンドリア	KQ_Mt_Forward_outside	GCTAAATCAACAGAACCTCCAG
ミトコンドリア	KQ_Mt_Reverse_outside	GTGAAAGAGTAGTGTCCTAACC
ミトコンドリア	KQ_Mt_Forward_5end	CTCTATTATAGATCGAAAATTTTGG
ミトコンドリア	KQ_Mt_Reverse3end	CCTATTATAGATCGAAAAAATGG

Table 4-2 waters 社の HPLC 装置のグラジエント比率		
Time	A: Methanol: Acetonitrile: 0.25 M Pyridine solution pH 5.0 (50: 25: 25 v; v; v)	B: Methanol: acetonitrile: acetone (20: 60: 20 v: v: v)
0	100	0
22	60	40
28	5	95
38	5	95
40	100	0
島津社の HPLC 装置のグラジエント比率		
Time	A: Methanol: Acetonitrile: 0.25 M Pyridine solution pH 5.0 (50: 25: 25 v; v; v)	B: Methanol: acetonitrile: acetone (20: 60: 20 v: v: v)
0.5	70	30
5.5	5	95
7	5	95
7.1	100	0
20	100	0

Table 4-3 : *Nitzschia* sp. KQ18 の葉緑体ゲノム

ゲノムサイズ (kb)	65640
非コード領域 (%)	7.2
A+T 含量 (%)	70.9
タンパク質遺伝子	
ATP 合成	8
翻訳	40
転写	4
クロロフィル合成	1
チアゾール合成	2
シャペロンタンパク質	2
鉄硫黄クラスター	2
他遺伝子 (<i>ycf</i> 、 <i>ftsH</i> 、 <i>clpC</i> 、 <i>petF</i> 、 <i>orf</i>)	9
合計	69
tRNA	27
rRNA	3

Table 4-4 : Approximately unbiased 検定				
系統樹	遺伝子	lnL	Δ lnL	p 値
最も確からしい分子系統樹	LSU rRNA	-7276.17	-	-
仮想の分子系統樹	LSU rRNA	-11901.53	4625.4	7.04E-06
最も確からしい分子系統樹	ミトコンドリア	-160729.08	-	-
仮想の分子系統樹	ミトコンドリア	-162057.61	1331.9	8.58E-41

4.6 結論

光合成は、光合成色素クロロフィルを用いて光エネルギーを集光し、光合成電子伝達系で行われることが知られている。近年の研究から、光合成能を二次的に喪失した生物が報告され、非光合成生物はクロロフィルを喪失していることが示唆されている (Wickett et al., 2011 ; Kamikawa et al., 2015)。一方、非光合成性葉緑体における機能や進化に関しては段階的に明らかになってきたが、光合成電子伝達系やクロロフィルの喪失のタイミングは明らかにされていない (Hadariová et al., 2018 ; Wicke et al., 2016 ; Barrett et al., 2014)。

本研究で得られた結果は、光合成性珪藻が複数回独立して光合成能を喪失している証拠を示し、同属内でも葉緑体ゲノムの組成が大きく異なることを示した。また、クロロフィル合成遺伝子を持つ光合成能を喪失した非光合成生物が、未熟もしくは完璧にクロロフィル類を合成している可能性を示した (Fig. 4-6, Fig. 4-7)。

本研究は、クロロフィル合成は光合成性生物と同様に、概日周期でクロロフィル合成がコントロールされている可能性が示唆された。実際に、葉緑体ゲノムに *chlI* 遺伝子を持つクリプト藻類 *Cryptomonas paramecium* の抽出物からクロロフィル合成中間体 Mg-protoporphyrin IX 13-methyl ester が検出された (データは公開していない)。したがって、他にもトランスクリプトーム解析でクロロフィル合成遺伝子が検出されている寄生性陸上植物 *Phelipanche aegyptiaca* (Wickett et al., 2011) はクロロフィル類を生産している可能性が示唆される。光合成能を持たない生物がクロロフィル類を持つことは、生物の生存に対してとても不利だと考えられるため、非光合成生物のクロロフィル類は光合成以外の機能に利用されている可能性が示唆された。しかし、クロロフィル類の重要性を示すための生化学的研究が進んでいないため、クロロフィル類が非光合成性葉緑体においてどのような役割を持っているかは不明である。

第5章 総合討論

本研究では第2章から第4章にかけて、非光合成生物のゲノム解析を行い、光合成能を喪失した各種の葉緑体ゲノム、機能について明らかにした。

第2章は *rbcL* 遺伝子を持つと思われていた *P. danica* の葉緑体機能とゲノムについて明らかにした。ゲノム解析の結果、*P. danica* は *rbcL* 遺伝子を全ゲノムから欠如していることが示され、先行研究の報告 (Sekiguchi et al., 2002) は誤報である可能性を示した。そして、*P. danica* の葉緑体ゲノムの組成は株間で異なることを示し、さらに葉緑体-鉄硫黄クラスター合成の *suf* 遺伝子を欠如していた。*P. danica* の葉緑体機能は、葉緑体-鉄硫黄クラスターを必要としない、NADPH を用いた酸化還元反応を必要とする代謝系 (ヘム合成、解糖系、ペントースリン酸経路) が残されていた。これらは、アピコンプレクサで提唱されている葉緑体の維持、葉緑体ゲノムの喪失に対する進化的制約と矛盾しするため、非光合成生物の葉緑体喪失進化の過程において、*suf* 遺伝子は必ずしも葉緑体喪失の進化的制約と結びつかないことを示した。

第3章は非光合成性緑藻 *Chlamydomonas* NrCl902 株のプラストキノンの役割と光合成電子伝達系の喪失について議論した。*Chlamydomonas* NrCl902 株のトランスクリプトームデータから、光合成能を喪失後もプラストキノンを利用している可能性が示唆された。*Chlamydomonas* NrCl902 株の抽出物を解析したところ、プラストキノールを合成していることが示され、ノックダウン実験から生育するためには欠かすことができない物質であることが示された。一方で、*Chlamydomonas* NrCl902 株は光合成電子伝達系の一部 (カロテノイド合成、PTOX、NDH2) を保持するため、プラストキノンはいこれらの電子伝達系に利用されている可能性が考えられるが、生化学的研究が進んでいないため、プラストキノンの詳細な役割について調べる必要がある。また、他の非光合成生物が持つ遺伝子と比較したところ、光合成性物は光合成能の喪失に伴い、光合成電子伝達系を段階的に無くしていくことを明らかにした。

第 4 章は非光合成性珪藻からクロロフィル類（クロロフィル、クロロフィル合成中間体）は非光合成生物において光合成以外の役割を担っている可能性を示した。本章では新規珪藻 *Nitzschia* sp. KQ18 を新たに単離した。本珪藻は非光合成性 *Nitzschia* 属の新規系統であることが分子系統解析から示し、光合成性 *Nitzschia* から非光合成性 *Nitzschia* への進化が複数回独立して起きていることを明らかにした。さらに、非光合成性 *Nitzschia* の種間で葉緑体ゲノム組成が異なることが示され、同種間において異なる進化していることが明らかになってきた。一方で、*Nitzschia* sp. KQ18 はクロロフィル合成に関する遺伝子をいくつか有していた。そのため、HPLC 分析を行ったところ、新奇クロロフィル合成中間体が検出された。このクロロフィル合成中間体は概日周期で管理されている可能性が示され、おそらく光合成以外に寄与、もしくは光合成能喪失過程で新しく他の葉緑体機能の役割を担っている可能性が示唆された。

今まで、非光合成性生物の研究は一属一種のゲノム解析が主流であり、ゲノムや葉緑体機能の比較は異なる系統に属する非光合成性生物間で行われている。本研究で、異なる非光合成生物の葉緑体ゲノムまたは機能を解析したところ、同属内で異なることが明らかになった（第 2 章、第 3 章）。*Pteridomonas* spp. の葉緑体葉緑体ゲノムは種間で遺伝子の組成わずかに異なり、遺伝子喪失の欠如の様式が異なっていた。さらに、*Nitzschia* sp. KQ18 は同属内でも、葉緑体ゲノムの遺伝子数、葉緑体機能ともに、他の非光合成性 *Nitzschia* 株より多く保持していた。一方で、*Pteridomonas* spp. はアピコンプレクサで提唱されたゲノム喪失の制約と矛盾する結果が得られた。したがって、非光合成性葉緑体ゲノムの組成は同属間でも異なるため、今までの比較方法ではゲノム喪失に関しては議論できないと思われる。これらの結果は、非光合成性葉緑体ゲノムにおける遺伝子の喪失に対して、普遍的な制約は存在しないことを示唆する。

非光合成性葉緑体の機能に関する研究において、プラストキノン、クロロフィル類をもつ、もしくは葉緑体ゲノムを維持しながら葉緑体-鉄硫黄クラスターを

完全に喪失した非光合成性葉緑体は報告が無かった。そこで、本研究から光合成能を喪失して間もない生物は、一部の光化学系以外の光合成電子伝達系を有し、元々光合成で用いられていた電子受容体もしくは電子供給体を必要とすることが明らかになった。第3章から、NDH2、PTOX、プラストキノン合成の遺伝子を持つ非光合成生物は、プラストキノンを介した酸化還元反応を行っている可能性が示された。しかし、これらの遺伝子を持つ生物は、様々な系統で点在し分布している。一方で、第4章は光合成能を喪失した非光合成性 *Nitzschia* sp. KQ18 からクロロフィル合成中間体が検出された。今まで、クロロフィル類は一般的に光合成の反応しか用いられていないと思われていたが、光合成以外の葉緑体機能に用いられている可能性が示された。クロロフィル合成遺伝子を持つすべての非光合成生物は、おそらくクロロフィル類を合成し、光合成以外の機能に利用していると考えられる。これらの結果に関して注意することは、プラストキノンやクロロフィル類などに対して詳細な生化学的研究を行っていないことである。そのため、可能性として、クロロフィル類やプラストキノンは上述以外の酸化還元反応に必要な機能に使われているかもしれないため、これらの検証は、今後追及していく必要がある。

本研究により、生物学的背景または生物の系統ごとの異なる進化過程を経て、葉緑体機能が喪失していることを明らかにした。非光合成生物の生活様式は、寄生性、吸収栄養性、バクテリア捕食性など、生物によって異なることが知られている (Olefeld et al., 2018 ; Donaher et al., 2009 ; Záhonová et al., 2016 ; Koning and Keeling, 2006 ; Sekiguchi et al., 2002)。おそらく、同種間でも異なる環境で生活している非光合成性生物は生活様式が異なり、さらに獲得もしくは必要とする栄養などが異なると考えられ、非光合成性生物は環境から獲得しやすい栄養の代謝は喪失し、必要とする代謝のみ維持していると思われる。そのため、非光合成生物は、異なる系統、同属同種内の葉緑体機能やゲノムに残す遺伝子が異なることと思われる。今後、非光合成性葉緑体の喪失進化を議論するには、同属同種の個

体間のゲノム解析、さらにその生物の環境を踏まえ議論すべきである。

参考文献

Alboresi A, Dall'Osto L, Aprile A, Carillo P, Roncaglia E, Cattivelli L, Bassi R. Reactive oxygen species and transcript analysis upon excess light treatment in wild-type *Arabidopsis thaliana* vs a photosensitive mutant lacking zeaxanthin and lutein. *BMC Plant Biol.* 2011;11:62

Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., ... & Cárdenas, P. (2019). Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 4-119.

Archibald JM. Genomic perspectives on the birth and spread of plastids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:10147-53

Asmail SR, Smith DR. Retention, erosion, and loss of the carotenoid biosynthetic pathway in the nonphotosynthetic green algal genus *Polytomella*. *New Phytol.* 2016;209:899-903

Balconi E, Pennati A, Crobu D, Pandini V, Cerutti R, Zanetti G, et al. The ferredoxin-NADP⁺ reductase/ferredoxin electron transfer system of *Plasmodium falciparum*. *FEBS J.* 2009;276:3825-36

Balk, J., and Schaedler, T. A. (2014) . Iron Cofactor Assembly in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 125–153. doi:10.1146/annurev-arplant-050213-035759.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al. (2012) . SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. doi:10.1089/cmb.2012.0021.

Barbrook, A. C., Howe, C. J., and Purton, S. (2006) . Why are plastid genomes retained in non-photosynthetic organisms? *Trends Plant Sci.* 11, 101–108. doi:10.1016/j.tplants.2005.12.004.

Barrett, C. F., Freudenstein, J. V., Li, J., Mayfield-Jones, D. R., Perez, L., Pires, J. C., & Santos, C. (2014). Investigating the path of plastid genome degradation in an early-

transitional clade of heterotrophic orchids, and implications for heterotrophic angiosperms. *Molecular Biology and Evolution*, 31(12), 3095-3112.

Bock, R., and Khan, M. S. (2004). Taming plastids for a green future. *Trends Biotechnol.* 22, 311–318. doi:10.1016/j.tibtech.2004.03.005.

Brocks, J. J., Logan, G. A., Buick, R., & Summons, R. E. (1999). Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *science*, 285(5430), 1033-1036.

Burki, F., Roger, A. J., Brown, M. W., & Simpson, A. G. (2020). The new tree of eukaryotes. *Trends in ecology & evolution*, 35(1), 43-55.

Cao, M., Yuan, X. L., and Bi, G. (2016). Complete sequence and analysis of plastid genomes of *Pseudo-nitzschia multiseriata* (Bacillariophyta). *Mitochondrial DNA* 27, 2897–2898. doi:10.3109/19401736.2015.1060428.

Carol P, Stevenson D, Bisanz C, Breitenbach J, Sandmann G, Mache R, et al. Mutations in the *Arabidopsis* gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell*. 1999;11:57–68

Chen, M., Schliep, M., Willows, R. D., Cai, Z. L., Neilan, B. A., & Scheer, H. (2010). A red-shifted chlorophyll. *Science*, 329(5997), 1318-1319.

Cheng Z, Sattler S, Maeda H, Sakuragi Y, Bryant DA, DellaPenna D. Highly divergent methyltransferases catalyze a conserved reaction in tocopherol and plastoquinone synthesis in cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes. *Plant Cell*. 2003;15:2343-56

Choquet, Y., and Vallon, O. (2000). Synthesis, assembly and degradation of thylakoid membrane proteins. *Biochimie* 82, 615–634. doi:10.1016/S0300-9084 (00) 00609-X.

Cornic G, Baker NR. Electron transport in leaves: a physiological perspective. Eaton-Rye JJ, Tripathy BC, Sharkey TD, Editors. *Photosynthesis*. Springer; 2012. p. 591-605

Couturier, J., Touraine, B., Briat, J. F., Gaymard, F., and Rouhier, N. (2013). The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: current knowledge and open questions.

Frontiers Plant Sci. 4, 259. doi:10.3389/fpls.2013.00259.

de Koning, A. P., and Keeling, P. J. (2006) . The complete plastid genome sequence of the parasitic green alga *Helicosporidium* sp. is highly reduced and structured. BMC Biol. 4, 12. doi:10.1186/1741-7007-4-12.

Dekker, J. P., & Boekema, E. J. (2005). Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1706(1-2), 12-39.

DellaPenna, D., and Pogson, B. J. (2006) . VITAMIN SYNTHESIS IN PLANTS: Tocopherols and Carotenoids. Annu. Rev. Plant Biol. 57, 711–738. doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144301.

Donaher, N., Tanifuji, G., Onodera, N. T., Malfatti, S. A., Chain, P. S. G., Hara, Y., et al. (2009) . The Complete Plastid Genome Sequence of the Secondarily Nonphotosynthetic Alga *Cryptomonas paramecium*: Reduction, Compaction, and Accelerated Evolutionary Rate. Genome Biol. Evol. 1, 439–448. doi:10.1093/gbe/evp047.

Dorrell RG, Azuma T, Nomura M, Audren de Kerdrel G, Paoli L, Yang S, et al., Principles of plastid reductive evolution illuminated by nonphotosynthetic chrysophytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116:6914-23

Durrant, J. R., Klug, D. R., Kwa, S. L., Van Grondelle, R., Porter, G., & Dekker, J. P. (1995). A multimer model for P680, the primary electron donor of photosystem II. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92(11), 4798-4802.

Eckford-Soper, L., & Daugbjerg, N. (2016). The ichthyotoxic genus *Pseudochattonella* (Dictyochophyceae): Distribution, toxicity, enumeration, ecological impact, succession and life history—A review. Harmful algae, 58, 51-58.

Fig. ueroa-Martinez, F., Nedelcu, A. M., Smith, D. R., and Reyes-Prieto, A. (2015) . When the lights go out: the evolutionary fate of free-living colorless green algae. New Phytol. 206, 972–982. doi:10.1111/nph.13279.

Fukasawa, Y., Tsuji, J., Fu, S. C., Tomii, K., Horton, P., and Imai, K. (2015). MitoFates: Improved prediction of mitochondrial targeting sequences and their cleavage sites. *Mol. Cell. Proteomics* 14, 1113–1126. doi:10.1074/mcp.M114.043083.

Gawryluk RMR, Tikhonenkov DV, Hehenberger E, Husnik F, Mylnikov AP, Keeling PJ. Non-photosynthetic predators are sister to red algae. *Nature* 2019;572:240-3

Gisselberg, J. E., Dellibovi-Ragheb, T. A., Matthews, K. A., Bosch, G., & Prigge, S. T. (2013). The suf iron-sulfur cluster synthesis pathway is required for apicoplast maintenance in malaria parasites. *PLoS Pathog*, 9(9), e1003655.

Gould, S. B., Waller, R. F., & McFadden, G. I. (2008). Plastid evolution. *Annual review of plant biology*, 59.

Granick, S. (1948). Magnesium protoporphyrin as a precursor of chlorophyll in *Chlorella*. *Journal of Biological Chemistry*, 175(1), 333-342.

Gruber, A., Rocap, G., Kroth, P. G., Armbrust, E. V., and Mock, T. (2015). Plastid proteome prediction for diatoms and other algae with secondary plastids of the red lineage. *Plant J.* 81, 519–528. doi:10.1111/tpj.12734.

Hadariová, L., Vesteg, M., Hampl, V., & Krajčovič, J. (2018). Reductive evolution of chloroplasts in non-photosynthetic plants, algae and protists. *Current genetics*, 64(2), 365-387.

Hadariová, L., Vesteg, M., Hampl, V., and Krajčovič, J. (2018). Reductive evolution of chloroplasts in non-photosynthetic plants, algae and protists. *Curr. Genet.* 64, 365–387. doi:10.1007/s00294-017-0761-0.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.

Han, K. Y., Maciszewski, K., Graf, L., Yang, J. H., Andersen, R. A., Karnkowska, A., et al. (2019). Dictyochophyceae plastid genomes reveal unusual variability in their organization. *J. Phycol.* 55, 1166–1180. doi:10.1111/jpy.12904.

Hiltunen, H. M., Illarionov, B., Hedtke, B., Fischer, M., and Grimm, B. (2012) . Arabidopsis RIBA proteins: Two out of three isoforms have lost their bifunctional activity in riboflavin biosynthesis. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 14086–14105. doi:10.3390/ijms131114086.

Hohmann-Marriott MF, Blankenship RE. The photosynthetic world. In: Eaton-Rye JJ, Tripathy BC, Sharkey TD, Editors. *Photosynthesis*. Springer; 2012. p. 3-32

Hörtensteiner, S., and Kräutler, B. (2011) . Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 977–988. doi:10.1016/j.bbabi.2010.12.007.

Hunsperger, H. M., Ford, C. J., Miller, J. S., & Cattolico, R. A. (2016). Differential regulation of duplicate light-dependent protochlorophyllide oxidoreductases in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *PloS one*, 11(7), e0158614.

Ishikita, H., Saenger, W., Biesiadka, J., Loll, B., & Knapp, E. W. (2006). How photosynthetic reaction centers control oxidation power in chlorophyll pairs P680, P700, and P870. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(26), 9855-9860.

Janouškovec J, Gavelis GS, Burki F, Dinh D, Bachvaroff TR, Gornik SG, et al. (2017) Major transitions in dinoflagellate evolution unveiled by phylotranscriptomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:E171-80

Janouškovec J, Paskerova GG, Miroljubova TS, Mikhailov KV, Birley T, Aleoshin VV, et al. (2019) Apicomplexan-like parasites are polyphyletic and widely but selectively dependent on cryptic plastid organelles. *eLife*. 8:e49662

Janouškovec, J., Sobotka, R., Lai, D.-H., Flegontov, P., Koník, P., Komenda, J., et al. (2013) Split photosystem protein, linear-mapping topology, and growth of structural complexity in the plastid genome of *Chromera velia*. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2447–2462. doi.org/10.1093/molbev/mst144

Janouškovec, J., Tikhonenkov, D. V, Burki, F., Howe, A. T., Kolísko, M., Mylnikov, A. P., et al. (2015) . Factors mediating plastid dependency and the origins of parasitism in Apicomplexan and their close relatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 10200–10207.

doi:10.1073/pnas.1423790112.

Kamikawa, R., Azuma, T., Ishii, K., Matsuno, Y., and Miyashita, H. (2018) . Diversity of organellar genomes in non-photosynthetic diatoms. *Protist* 169, 351–361. doi:10.1016/j.protis.2018.04.009.

Kamikawa, R., Moog, D., Zauner, S., Tanifuji, G., Ishida, K.-I., Miyashita, H., et al. (2017) . A non-photosynthetic diatom reveals early steps of reductive evolution in plastids. *Mol. Biol. Evol.* 34, 2355–2366. doi:10.1093/molbev/msx172.

Kamikawa, R., Tanifuji, G., Ishikawa, S. A., Ishii, K. I., Matsuno, Y., Onodera, N. T., ... & Inagaki, Y. (2015). Proposal of a twin arginine translocator system-mediated constraint against loss of ATP synthase genes from nonphotosynthetic plastid genomes. *Molecular biology and evolution*, 32(10), 2598-2604.

Kamikawa, R., Yubuki, N., Yoshida, M., Taira, M., Nakamura, N., Ishida, K. ichiro, et al. (2015) . Multiple losses of photosynthesis in *Nitzschia* (Bacillariophyceae) . *Phycol. Res.* 63, 19–28. doi:10.1111/pre.12072.

Karlusich, J. J. P., & Carrillo, N. (2017). Evolution of the acceptor side of photosystem I: ferredoxin, flavodoxin, and ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase. *Photosynthesis research*, 134(3), 235-250.

Karnkowska, A., Bennett, M. S., and Triemer, R. E. (2018) . Dynamic evolution of inverted repeats in Euglenophyta plastid genomes. *Sci. Rep.* 8, 16071. doi:10.1038/s41598-018-34457-w.

Kashiyama, Y., & Tamiaki, H. (2014). Risk management by organisms of the phototoxicity of chlorophylls. *Chemistry Letters*, 43(2), 148-156.

Katoh, K., and Standley, D. M. (2013) . MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780. doi:10.1093/molbev/mst010.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., et al.

(2012) . Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649. doi:10.1093/bioinformatics/bts199.

Keeling, P. J. (2013). The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. *Annual review of plant biology*, 64, 583-607.

Keeling, P. J. (2010) . The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Phil. Trans. R. Soc. B* 365, 729–748. doi:10.1098/rstb.2009.0103.

Keeling, P. J., Burki, F., Wilcox, H. M., Allam, B., Allen, E. E., Amaral-Zettler, L. A., et al. (2014) . The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP) : Illuminating the functional diversity of eukaryotic life in the oceans through transcriptome sequencing. *PLoS Biol.* 12. doi:10.1371/journal.pbio.1001889.

Kleffmann, T., Russenberger, D., von Zychlinski, A., Christopher, W., Sjölander, K., Gruissem, W., et al. (2004) . The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Curr. Biol.* 14, 354–362. doi:10.1016/j.cub.2004.02.039.

Köhler, S., Delwiche, C. F., Denny, P. W., Tilney, L. G., Webster, P., Wilson, R. J. M., et al. (1997) . A plastid of probable green algal origin in apicomplexans parasites. *Science* 275, 1485–1489. doi:10.1126/science.275.5305.1485.

Kreimer G. The green algal eyespot apparatus: a primordial visual system and more? *Curr Genet.* 2009;55:19-43

Krissansen-Totton, J., Arney, G. N., & Catling, D. C. (2018). Constraining the climate and ocean pH of the early Earth with a geological carbon cycle model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(16), 4105-4110.

Kwong, W. K., Del Campo, J., Mathur, V., Vermeij, M. J., & Keeling, P. J. (2019). A widespread coral-infecting apicomplexan with chlorophyll biosynthesis genes. *Nature*, 568(7750), 103-107.

- La Roche J, Boyd PW, McKay RML, Geider RJ, Flavodoxin as an in situ marker for iron stress in phytoplankton. *Nature* 1996;382:802-5
- Lange H, Kaut A, Kispal G, Lill R. A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:1050–5
- Lauritis, J. A., Commbs, J., & Volcani, B. E. (1968). Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms. *Archiv für Mikrobiologie*, 62(1), 1-16.
- Li, C. W., & Volcani, B. E. (1987). Four new apochlorotic diatoms. *British Phycological Journal*, 22(4), 375-382.
- Li, X. P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A. R., Rosenquist, M., Jansson, S., & Niyogi, K. K. (2000). A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature*, 403(6768), 391-395.
- Lill, R. (2009) . Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* 460, 831–838. doi:10.1038/nature08301.
- Liu, C., Shi, L., Zhu, Y., Chen, H., Zhang, J., Lin, X., et al. (2012) . CpGAVAS, an integrated web server for the annotation, visualization, analysis, and GenBank submission of completely sequenced chloroplast genome sequences. *BMC Genomics* 13, 715. doi:10.1186/1471-2164-13-715.
- Lowe, T. M., and Chan, P. P. (2016) . tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. *Nucl. Acids Res.* 44, W54–W57. doi:10.1093/nar/gkw413.
- Maciszewski, K., and Karnkowska, A. (2019) . Should I stay or should I go? Retention and loss of components in vestigial endosymbiotic organelles. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 58–59, 33–39. doi:10.1016/j.gde.2019.07.013.
- Marin, B., Palm, A., Klingberg, M., and Melkonian, M. (2003) . Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing Euglenophytes based on SSU rDNA Sequence Comparisons and Synapomorphic Signatures in the SSU rRNA Secondary Structure.

Protist 154, 99–145.

Meinecke, L., Alawady, A., Schroda, M., Willows, R., Kobayashi, M. C., Niyogi, K. K. et al., (2010). Chlorophyll-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* that accumulate magnesium protoporphyrin IX. *Plant molecular biology*, 72(6), 643-658.

Mulo, P., & Medina, M. (2017). Interaction and electron transfer between ferredoxin–NADP⁺ oxidoreductase and its partners: structural, functional, and physiological implications. *Photosynthesis research*, 134(3), 265-280.

Nawrocki WJ, Tourasse NJ, Taly A, Rappaport F, Wollman FA. The plastid terminal oxidase: its elusive function points to multiple contributions to plastid physiology. *Annu Rev Plant Biol.* 2015;66:49-74

Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., and Minh, B. Q. (2015) . IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32, 268–274. doi:10.1093/molbev/msu300.

Niyogi KK. Safety valves for photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol.* 2000;3:455-60

Nosek, J., Novotna, M., Hlavatovicova, Z., Ussery, D. W., Fajkus, J., and Tomaska, L. (2004) . Complete DNA sequence of the linear mitochondrial genome of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Mol. Genet. Genomics* 272, 173–180. doi:10.1007/s00438-004-1046-0.

Oborník, M., and Green, B. R. (2005) . Mosaic origin of the heme biosynthesis pathway in photosynthetic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 22, 2343–2353. doi:10.1093/molbev/msi230.

Oborník, M., & Lukeš, J. (2015). The organellar genomes of *Chromera* and *Vitrella*, the phototrophic relatives of apicomplexan parasites. *Annual review of microbiology*, 69, 129-144.

Onyshchenko, A., Ruck, E. C., Nakov, T., & Alverson, A. J. (2019) . A single loss of photosynthesis in the diatom order Bacillariales (Bacillariophyta) . *Am. J. Bot.*, 106

(4) , 560-572. doi: 10.1002/ajb2.1267

P Razquin P, Fillat MF, Schmitz S, Stricker O, Böhme H, Gómez-Moreno C, et al. Expression of ferredoxin–NADP⁺ reductase in heterocysts from *Anabaena* sp. *Biochem J.* 1996;316:157-60

Peltier G, Aro EM, Shikanai T. NDH-1 and NDH-2 plastoquinone reductases in oxygenic photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol.* 2015;67:55-80

Peltier G, Cournac L. Chlororespiration. *Annu Rev Plant Biol.* 2002;53:523-50

Pombert JF, Blouin NA, Lane C, Boucias D, Keeling PJ. A lack of parasitic reduction in the obligate parasitic green alga *Helicosporidium*. *PLoS Genet.* 2014;10:e1004355

Przybyla-Toscano, J., Roland, M., Gaymard, F., Couturier, J., and Rouhier, N. (2018) . Roles and maturation of iron–sulfur proteins in plastids. *J. Biol. Inorg. Chem.* 23, 545–566. doi:10.1007/s00775-018-1532-1.

Puthiyaveetil S, Ibrahim IM, Allen JF. Oxidation-reduction signalling components in regulatory pathways of state transitions and photosystem stoichiometry adjustment in chloroplasts. *Plant Cell Environ.* 2012;35:347-59

Ralph SA, van Dooren GG, Waller RF, Crawford MJ, Fraunholz MJ, Foth BJ, et al. (2004). Tropical infectious diseases: Metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nature Rev Microbiol.* 2:203-16

Ravin NV, Gruzdev EV, Beletsky AV, Mazur AM, Prokhortchouk EB, Filyushin MA, et al. (2016) The loss of photosynthetic pathways in the plastid and nuclear genomes of the non-photosynthetic mycoheterotrophic eudicot *Monotropa hypopitys*. *BMC Plant Biol.* 16:238

Rochaix, J. D. (2011). Regulation of photosynthetic electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(3), 375-383.

Röhrich RC, Englert N, Troschke K, Reichenberg A, Hintz M, Seeber F, et al. (2005) Reconstitution of an apicoplast-localised electron transfer pathway involved in the

isoprenoid biosynthesis of *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett.* 579:6433-8

Salomaki, E. D., and Kolisko, M. (2019) . There is treasure everywhere: Reductive plastid evolution in apicomplexa in light of their close relatives. *Biomolecules* 9. doi:10.3390/biom9080378.

Salomaki, E. D., Nickles, K. R., and Lane, C. E. (2015). The ghost plastid of *Choreocolax polysiphoniae*. *J. Phycol.* 51, 217-221. doi.org/10.1111/jpy.12283

Seeber F, Soldati-Favre D. Metabolic pathways in the apicoplast of apicomplexa. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2010;281:161-228

Sekiguchi, H., Moriya, M., Nakayama, T., and Inouye, I. (2002) . Vestigial chloroplasts in heterotrophic stramenopiles *Pteridomonas danica* and *Ciliophrys infusionum* (Dictyochophyceae) . *Protist* 153, 157–167. doi: 10.1078/1434-4610-00094

Severgnini, M., Lazzari, B., Capra, E., Chessa, S., Luini, M., Bordoni, R., et al. (2018) . Genome sequencing of *Prototheca zopfii* genotypes 1 and 2 provides evidence of a severe reduction in organellar genomes. *Sci. Rep.* 8, 14637. doi:10.1038/s41598-018-32992-0.

Sharma, B. C., & Dipen, G. (2012). Analysis of the Cryptophyta chloroplast genome reveals presence of additional genes and absence of introns in their genome. In *Biological Forum* (Vol. 4, No. 2, pp. 1-7). Satya Prakashan.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.

Shikanai T. Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches. *Annu Rev Plant Biol.* 2007;58:199-217

Sibbald SJ, Archibald JM. Genomic insights into plastid evolution. *Genome Biol Evol* 2020;12:evaa096

Smith DR, Lee RW. A plastid without a genome: evidence from the nonphotosynthetic green algal genus *Polytomella*. *Plant physiology* 2014;164:1812-9

Smith, Alison, and Michael Witty, eds. Heme, chlorophyll, and bilins: methods and protocols. Springer Science & Business Media, 2002.

Stern D. The *Chlamydomonas* Sourcebook: Organellar and Metabolic Processes. Academic Press; 2009

Strassert, J. F., Jamy, M., Mylnikov, A. P., Tikhonenkov, D. V., & Burki, F. (2019). New phylogenomic analysis of the enigmatic phylum *Telonemia* further resolves the eukaryote tree of life. *Molecular biology and evolution*, 36(4), 757-765.

Suzuki, S., Endoh, R., Manabe, R. I., Ohkuma, M., and Hirakawa, Y. (2018) . Multiple losses of photosynthesis and convergent reductive genome evolution in the colourless green algae *Prototheca*. *Sci. Rep.* 8, 940. doi:10.1038/s41598-017-18378-8.

Takahashi, M., & Ichimura, S. E. (1970). Photosynthetic properties and growth of photosynthetic sulfur bacteria in lakes. *Limnology and Oceanography*, 15(6), 929-944.

Tanifuji, G., Kamikawa, R., Moore, C. E., Mills, T., Onodera, N. T., Kashiwama, Y., et al. (2020) . Comparative plastid genomics of *Cryptomonas* species reveals fine-scale genomic responses to loss of photosynthesis. *Genome Biol. Evol.*, 12 (2) , 3926-3937. doi: 10.1093/gbe/evaa001

Terashima, M., Specht, M., and Hippler, M. (2011) . The chloroplast proteome: A survey from the *Chlamydomonas reinhardtii* perspective with a focus on distinctive features. *Curr. Genet.* 57, 151–168. doi:10.1007/s00294-011-0339-1.

Tonhosolo R, D’Alexandri FL, de Rosso VV, Gazarini ML, Matsumura MY, Peres VJ, et al. Carotenoid biosynthesis in intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* 2008;284:9974-85

Turmel, M., Otis, C., and Lemieux, C. (2017) . Divergent copies of the large inverted repeat in the chloroplast genomes of ulvophycean green algae. *Sci. Rep.* 7, 1–15. doi:10.1038/s41598-017-01144-1.

Ward, L. M., Rasmussen, B., & Fischer, W. W. (2019). Primary productivity was limited

by electron donors prior to the advent of oxygenic photosynthesis. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 124(2), 211-226.

Wick, R. R., Schultz, M. B., Zobel, J., and Holt, K. E. (2015) . Bandage: Interactive visualization of de novo genome assemblies. *Bioinformatics* 31, 3350–3352. doi:10.1093/bioinformatics/btv383.

Wicke, S., Müller, K. F., de Pamphilis, C. W., Quandt, D., Wickett, N. J., Zhang, Y., et al. (2013) . Mechanisms of functional and physical genome reduction in photosynthetic and nonphotosynthetic parasitic plants of the broomrape family. *Plant Cell* 25, 3711–3725. doi.org/10.1105/tpc.113.113373.

Wicke, S., Müller, K. F., DePamphilis, C. W., Quandt, D., Bellot, S., & Schneeweiss, G. M. (2016). Mechanistic model of evolutionary rate variation en route to a nonphotosynthetic lifestyle in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(32), 9045-9050.

Wickett, N. J., Honaas, L. A., Wafula, E. K., Das, M., Huang, K., Wu, B., ... & Depamphilis, C. W. (2011). Transcriptomes of the parasitic plant family Orobanchaceae reveal surprising conservation of chlorophyll synthesis. *Current Biology*, 21(24), 2098-2104.

Wostrikoff, K., Girard-Bascou, J., Wollman, F. A., and Choquet, Y. (2004) . Biogenesis of PSI involves a cascade of translational autoregulation in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *EMBO J.* 23, 2696–2705. doi:10.1038/sj.emboj.7600266.

Yabuki, A., and Tame, A. (2015) . Phylogeny and reclassification of *Hemistasia phaeocysticola* (Scherffel) Elbrächter & Schnepf, 1996. *J. Eukaryot. Microbiol.* 62, 426–429. doi:10.1111/jeu.12191.

Yasuno, R., and Wada, H. (2002) . The biosynthetic pathway for lipoic acid is present in plastids and mitochondria in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 517, 110–114. doi:10.1016/S0014-5793 (02) 02589-9.

Yoshida K, Hisabori T. Distinct electron transfer from ferredoxin–thioredoxin reductase to multiple thioredoxin isoforms in chloroplasts. *Biochem J.* 2017;474:1347-60

Záhonová, K., Füßy, Z., Oborník, M., Eliáš, M., and Yurchenko, V. (2016) . RuBisCO in non-photosynthetic alga *Euglena longa*: Divergent features, transcriptomic analysis and regulation of complex formation. *PLoS ONE* 11, e0158790. doi:10.1371/journal.pone.0158790.

陳 俊峰 2018 完全従属栄養性緑藻類の葉緑体に関する研究 京都大学大学院人間・環境学研究科 修士論文

謝辞

本研究を行うにあたり、培養株を提供していただいた海洋研究開発機構の矢吹 彬憲 博士、慶応義塾大学 仲田崇志特任講師（現在：横浜国立大学 非常勤教員）に感謝申し上げます。また、*Pteridomonas danica* の単離および葉緑体 DNA データを提供していただきましたパリ南大学の雪吹 直治博士と Anna Karnkowska 博士に感謝申し上げます。クロロフィル合成中間体の標品を提供していただきました民秋均教授（立命館大学）、木下雄介助教（立命館大学）、柏山 祐一郎教授（福井工業大学）に感謝申し上げます。最後に、本学の宮下英明教授、神川龍馬助教（現在：京都大学農学研究科准教）には懇切丁寧な研究指導を頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。