

博士論文

Rapaza viridis における
盗葉緑体制御メカニズムの解明

The mechanism of kleptoplast regulation in *Rapaza viridis*

2023 年 8 月

福井工業大学大学院

丸山 萌

Moe Maruyama

目次

第1章 序論	1
1-1. 葉緑体の進化過程と盗葉緑体现象の位置づけ	2
1-2. <i>Rapaza viridis</i> に関する先行研究	3
1-2-1. 原記載論文	4
1-2-2. 盗葉緑体现象の発見	5
1-2-2-1. 光学顕微鏡観察による知見	5
1-2-2-2. 葉緑体 DNA 塩基配列解析と葉緑体ゲノム解析からの知見	5
1-2-2-3. 盗葉緑体のドナーとなる生物捕食後の時系列観察からの知見	6
1-2-2-4. 細胞増殖とクロロフィル量の変化の関係	7
1-2-2-5. 盗葉緑体の光合成利用	8
1-2-2-6. 生活環	9
1-2-2-7. 核ゲノムにコードされる盗葉緑体移行タンパク質遺伝子とその起源	9
1-3. 従来考えられてきた葉緑体の進化過程の仮説と <i>Rapaza viridis</i> の盗葉緑体现象	10
1-4. 本研究の目的	11
第2章 盗葉緑体の形成過程で観察される細胞微細構造の変化	24
2-1. 背景	25
2-2. 実験方法	26
2-2-1. TEM 観察サンプルの作製と観察	26
2-2-2. FIB-SEM 観察用サンプルの作製	27
2-2-3. FIB-SEM 観察と 3D 構築	28
2-2-4. 光学顕微鏡観察	28

2-3. 結果	28
2-3-1. 葉緑体以外の細胞内容物分離時の細胞微細構造	28
2-3-2. 細分化時の盗葉緑体の立体構造	30
2-4. 考察	31
2-4-1. <i>Rapaza viridis</i> における葉緑体以外の細胞内容物の除去プロセスとその機構	31
2-4-2. <i>Rapaza viridis</i> における盗葉緑体の細分化	33
2-5. 結論	34
第3章 水平転移した葉緑体遺伝子の発現と盗葉緑体利用に関わる機能の推定	53
3-1. 背景	54
3-2. <i>Rapaza viridis</i> の TPT 様遺伝子群 (RvTPT1-4) の機能推定	55
3-2-1. 背景	55
3-2-2. 実験方法	56
3-2-2-1. RNAi による RvTPTs ノックダウン実験と培養	56
3-2-2-2. qPCR による RvTPTs の発現量の定量	59
3-2-2-3. RvTPTs ノックダウン細胞の蓄積多糖顆粒の定量	61
3-2-2-4. RvTPTs ノックダウン細胞の光合成活性測定	61
3-2-3. 結果	62
3-2-3-1. RvTPTs の発現量	62
3-2-3-2. RvTPTs ノックダウン細胞の多糖顆粒の蓄積	63
3-2-3-3. RvTPTs ノックダウン細胞の細胞増殖	63
3-2-3-4. RvTPTs ノックダウン細胞の光合成活性	63
3-2-3-5. RvTPTs ノックダウン細胞の長期培養	64

3-2-4. 考察	64
3-2-4-1. RvTPTs ノックダウン効率	64
3-2-4-2. RvTPTs の多糖顆粒の蓄積や光合成への関与	65
3-2-4-3. RvTPTs の細胞増殖や細胞生存期間への関与	66
3-3. <i>Rapaza viridis</i> の RbcS 様遺伝子 (RvRbcS) の機能推定	67
3-3-1. 背景	67
3-3-2. 実験方法と実験細胞	69
3-3-2-1. CRISPR/Cas9 システムを用いた RvRbcS ノックアウト実験から作出されたゲノム編集株	69
3-3-2-2. SDS-PAGE-ウエスタンブロッティングと Native-PAGE-ウエスタンブロッティング	69
3-3-2-3. RvRbcS ノックアウト細胞の免疫蛍光染色と観察	70
3-3-2-4. RvRbcS ゲノム編集細胞の培養	71
3-3-2-5. RvRbcS ノックアウト細胞の光合成活性測定	72
3-3-3. 結果	72
3-3-3-1. 野生株と RvRbcS ゲノム編集細胞の RvRbcS タンパク質のサイズ	72
3-3-3-2. 野生株と RvRbcS ゲノム編集細胞の RuBisCO 複合体のサイズ	73
3-3-3-3. 免疫蛍光染色によるピレノイド局在観察	74
3-3-3-4. RvRbcS ゲノム編集細胞の細胞増殖と細胞観察	75
3-3-3-5. RvRbcS ゲノム編集細胞の光合成活性	76
3-3-4. 考察	76
3-3-4-1. RvRbcS の N 末端 LC 領域の機能	76
3-3-4-2. RvRbcS と RuBisCO 複合体との関係	77
3-3-4-3. RvRbcS の細胞増殖への関与	78
3-3-4-4. RvRbcS の光合成や多糖顆粒蓄積への関与	78
3-3-4-5. RvRbcS の細胞生存期間への関与	80
3-4. 結論	83

第4章 水平転移した硝酸同化経路関連の遺伝子群の発現と機能解析	103
4-1. 背景	104
4-2. 実験方法と実験細胞	106
4-2-1. RvNaR 配列部分のゲノム DNA クローニング	106
4-2-2. 分子系統解析	106
4-2-3. RNAi による RvNaR ノックダウン実験	107
4-2-4. CRISPR/Cas9 システムを用いた RvNaR ノックアウト実験から作出されたゲノム編集株	109
4-2-5. 培養実験	109
4-2-6. 光学顕微鏡観察	110
4-2-7. qPCR による RvNaR の発現量の定量	110
4-3. 結果	111
4-3-1. <i>Rapaza viridis</i> の RvNaR の系統解析	111
4-3-2. <i>Rapaza viridis</i> の RvNaR ノックダウン実験	112
4-3-3. RvNaR ノックダウンとノックアウト細胞の硝酸培地での培養実験	112
4-3-2. RvNaR ノックアウト細胞のアンモニウム塩入り培地での培養実験	113
4-4. 考察	114
4-5. 結論	119
第5章	125
5-1. 総合考察	126
5-2. 今後の展望	137
引用文献	139
研究業績一覧	146
謝辞	149

第1章 序論

1-1. 葉緑体の進化過程と盗葉緑体现象の位置づけ

真核生物のもつ葉緑体は多様であり、様々な系統に散在している。それらの葉緑体の起源は真核生物とシアノバクテリアの一次共生と呼ばれる進化過程に由来する(ただし *Paulinella chromatophora* のものを除く) (Keeling 2010; Keeling 2013; Archibald 2015; Sibbald and Archibald 2020)。一次共生では、灰色植物、紅色植物(紅藻を含む)、綠色植物(緑藻と陸上植物を含む)が誕生し、現在これらはアーケプラスチダという一つの大系統に纏められている。一次共生が起こった後、その他の真核生物のいくつかの系統は緑藻または紅藻を摂取することによって新たに葉緑体を獲得したと考えられており、この進化過程は二次共生と呼ばれている。現在、緑藻由来の葉緑体をもつ真核生物にはユーグレナ藻、クロララクニオン藻が知られており、また、紅藻由来の葉緑体をもつ真核生物にはストラメノパイルの藻類(褐藻や珪藻、オクロ藻を含む)、アルベオラータの藻類(渦鞭毛藻など)、ハプト藻、およびクリプト藻が知られている (Archibald 2015; Gibbs 1981; Douglas 1994)。この二次共生により、葉緑体が多様な真核生物系統へと広がったことが考えられる。

二次共生による葉緑体の進化過程について、もっとも一般的に知られているのは細胞内共生関係を介した進化仮説である。井上(2007)では、(1)盗葉緑体の段階、(2)共生体として継続的に保持される段階、(3)共生体核の遺伝子が宿主核へ移行する段階、(4)葉緑体の成立段階 という進化の過程があったと推測されている。つまり、最初にまず細胞内共生関係が築かれ、その後に遺伝子の水平転移によって共生体核の遺伝子が宿主核へと移行し、これにより宿主が共生体を制御できるようになる段階が想定される。そしてここまですべて達成されることで、最後に共生体核が縮小・消失して、宿主自身の恒久的なオル

ガネラとしての葉緑体が成立したという考え方である。ここで言う「恒久的なオルガネラとなる」とは、共生体／葉緑体が宿主細胞内で増大、分割し(葉緑体分裂)、宿主細胞分裂によって娘細胞へと分配され、垂直伝播により確実に維持されるようになるということである(図 1-1)。この細胞内共生進化の仮説で初期段階(1)とされる盗葉緑体性生物とは、“他人の葉緑体”を“盗み”自身の一時的なオルガネラとして利用する生物である。盗葉緑体は恒久的には維持されないものであるため、必要に応じて、盗葉緑体のドナーとなる光合成細胞(盗葉緑体ドナー)から新鮮な盗葉緑体を獲得する必要がある。盗葉緑体性の渦鞭毛藻である *Nusuttodinium* 属には、獲得した盗葉緑体ドナー細胞質のうち、葉緑体のみを残して保持する *N. poecilochroum* や、葉緑体だけでなく、ドナーの細胞核を含むその他の細胞質も保持する *N. aeruginosum* などが知られており、それぞれ初期段階(1)の詳細な進化段階を代表していると考えられている。*Nusuttodinium* 属の研究からは、盗葉緑体ドナー核の保持が、葉緑体の機能を保つために重要な役割を果たすことが明らかとなっており(Onuma *et al.* 2020)、上述の「細胞内共生関係を介した恒久的な葉緑体進化」仮説に整合的な過程が認められる。このように盗葉緑体性生物は、恒久的な葉緑体進化過程を解明するための鍵となると考えられてきた。

1-2. *Rapaza viridis* に関する先行研究

Yamaguchi *et al.* (2012) では、*Rapaza viridis* は「ユーグレノイドの中の二次共生起源の藻類の系統である Euglenophyceae より早い段階で分岐した姉妹系統」にあたる新種として記載された。この原記載論文において、*R. viridis* は恒久的な葉緑体をもつ藻類でありながら、全く別系統の藻類である緑藻の

Tetraselmis sp.を偏食する混合栄養性の生物であるとされた。しかし、丸山修士論文(2018)では、*R. viridis* には独自の恒久的な葉緑体は存在せず、盗葉緑体现象を示す生物であるという新たな知見が得られた。以下、*R. viridis* の原記載論文と盗葉緑体现象について纏める。

1-2-1. 原記載論文

Rapaza viridis は単細胞の真核生物であり、最初の報告では、細胞内に“葉緑体”をもつユーグレノイドの新しい系統の光合成生物であり、かつ、ユーグレノイドの中では初の発見となる光合成をする傍ら捕食活動もおこなう混合栄養性であるとされた(Yamaguchi *et al.* 2012)。*R. viridis* は同所で単離された緑藻(クロロデンドロン藻)の *Tetraselmis* sp.を“餌”として与えない培養条件下では 35 日以上培養できないこと、光のない培養条件下では 1 週間以上培養できないこと(*Tetraselmis* sp.を与え続けていても同様)、かつ、その他の藻類捕食性のユーグレノイドとは異なり *R. viridis* 細胞内には常に葉緑体が存在していることが示された。これらの観察から、*R. viridis* は自身の葉緑体による光合成に加え、*Tetraselmis* sp.の捕食の両方を生存に必要とすると考えられた。さらに、SSU rRNA の分子系統解析や透過型電子顕微鏡(TEM)と走査型電子顕微鏡(SEM)による形態学的分類に基づいて、*R. viridis* は光独立栄養性のユーグレノイド(Euglenophyceae)の基部で分岐する姉妹系統であり(図 1-2)、進化的には、食作用をおこなう従属栄養性のユーグレノイドと Euglenophyceae の間に位置すると考えられた。ユーグレノイドの進化では、食作用をおこなう従属栄養性のユーグレノイドが二次共生により葉緑体を獲得したことで Euglenophyceae が進化したと考えられており(Leander *et al.* 2001a; Leander *et al.* 2001b; Leander 2004)、*R. viridis* はそ

の進化の中間過程を示す重要な存在であるとされた。

1-2-2. 盗葉緑体現象の発見

1-2-2-1. 光学顕微鏡観察による知見

丸山修士論文(2018)では, *Rapaza viridis* が *Tetraselmis* sp.を捕食した以降の細胞の経時的観察の結果, *R. viridis* では藻類捕食性ユーグレノイドで典型的に観察される「消化の進行を示す食胞」が細胞内に観察されなかった。すなわち, 藻類捕食性の原生生物では, 一般に, 食作用により餌藻類を食胞に取り込んだのち, 消化の進行に伴って, その餌の葉緑体の緑色が褐色に変化する様子と, クロロフィル蛍光が減衰する様子が観察される。これに対して *R. viridis* では, いずれの現象も観察されなかったことから, *R. viridis* が *Tetraselmis* sp.の葉緑体を一時的に細胞内に保持している可能性が考えられた。

1-2-2-2. 葉緑体 DNA 塩基配列解析と葉緑体ゲノム解析からの知見

丸山修士論文(2018)では, *Rapaza viridis* による *Tetraselmis* sp.葉緑体の保持の可能性を検証するために, 長期間 *Tetraselmis* sp.を捕食していない *R. viridis* の培養物(*R. viridis* は培養液中の *Tetraselmis* sp.をごく短時間で食べつくすため培養物には残らない)と *Tetraselmis* sp.の単藻培養物それぞれから, 葉緑体ゲノムの 16SrRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。Euglenophyceae の葉緑体の起源は, 緑色植物のうち Pyramimonadales の葉緑体であることが知られている(Ishida *et al.* 1997; Rogers *et al.* 2007; Turmel *et al.* 2009)。よって, もし *R. viridis* が自身の恒久的な葉緑体をもつのであれば, Euglenophyceae

や Pyramimonadales に近縁な配列が確認されると想定された。しかし, *R. viridis* と *Tetraselmis* sp.それぞれの培養物から同定された配列は完全に一致し, いずれも Chlorodendrophyceae (*Tetraselmis* が属する緑色植物内の系統クロロデンドロン藻)のものであり, *R. viridis* からは, Euglenophyceae と Pyramimonadales に類似した配列は確認されなかった(図 1-3)。また, Euglenophyceae の 16SrRNA が確認されなかったことが PCR によるアーティファクトでないことを考慮するために, 長期間 *Tetraselmis* sp.を捕食していない *R. viridis* の培養物と *Tetraselmis* sp.の単藻培養物それぞれについて生成した Illumina リードから全葉緑体ゲノムのアセンブルをおこなったが, ここでも *R. viridis* 細胞には *Tetraselmis* sp.の葉緑体ゲノム 1 種類しか含まれないことが確認された。よって, *R. viridis* がもつ葉緑体のすべてが *Tetraselmis* sp.から奪い取った盗葉緑体であると結論づけられた(Karnkowska *et al.*, 2023)。

1-2-2-3. 盗葉緑体のドナーとなる生物捕食後の時系列観察からの知見

丸山修士論文(2018)では, *Rapaza viridis* の盗葉緑体が形成される過程の光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡(TEM)による観察が以下のように報告された。すなわち, 食作用により取り込まれた *Tetraselmis* sp.細胞は, 約 30 分以内に葉緑体とその他の細胞質とに分別され(図 1-4 D-E), やがて葉緑体以外の細胞質は *R. viridis* 細胞内から排泄される(図 1-4 F)。さらに, この段階で *Tetraselmis* sp.の核も排除される(図 1-5)。こうして細胞内に残された「盗」葉緑体は, 捕食から約 6 時間後以降に細分化が進行する(図 1-4 A-L)。盗葉緑体の細分化が進行している *R. viridis* の TEM 観察では, 盗葉緑体が砂時計のようにくびれている様子が観察される(図 1-6)。この盗葉緑体には三重の包膜が観察される(図 1-7)。

新たに獲得した盗葉緑体の細分化は、捕食から約 12-18 時間後に活発に進行し、*R. viridis* 1 細胞あたり十数個の盗葉緑体が存在するようになる。捕食されたばかりの *Tetraselmis* sp.葉緑体内には、*Tetraselmis* sp.に特徴的な複数のスターチ粒とスターチ粒に囲まれた大きな 1 個ピレノイドが観察されるが、盗葉緑体の細分化の進行と並行してスターチ粒の消失と小さな複数個のピレノイドが観察されるようになる(図 1-4 M-O)。また、小さな複数個のピレノイドにはチラコイド貫入が認められ、これは *Euglenophyceae* の葉緑体の特徴とも共通する。このため、丸山修士論文(2018)では、Yamaguchi *et al.* (2012)で認められた *R. viridis* の「*Euglenophyceae* に特徴的なピレノイド構造」は、盗葉緑体形成の過程で、*Tetraselmis* sp.のピレノイド構造から漸移的に変化したものであると結論づけた。なお、盗葉緑体細分化の後期と並行して、*Rapaza viridis* の細胞分裂が進行することも報告された。

1-2-2-4. 細胞増殖とクロロフィル量の変化の関係

丸山修士論文(2018)において *R. viridis* のクロロフィル量の変動が調べられた結果、盗葉緑体細分化の進行時と細胞分裂の期間を通して、実験カルチャー内のクロロフィル総量は増加しないことが分かった。これに対して光独立栄養性の生物では、通常、細胞分裂期に先行して葉緑体が増大し葉緑体分裂が起こる。しかし、*R. viridis* では、細胞分裂に先んじて前述のとおり盗葉緑体の「細分化」が進行し、細胞分裂後も娘細胞において盗葉緑体の増大は観察されないとされた。実際、細胞あたりのクロロフィル量は *R. viridis* の細胞数増加とともに減少したため、細分化した盗葉緑体を娘細胞に単純に分配していることが考えられた(図 1-8)。

1-2-2-5. 盗葉緑体の光合成利用

丸山修士論文(2018)では, *Rapaza viridis* の明暗周期をつけた培養実験において, サイトゾルの多糖顆粒が, 明期に蓄積し暗期に消失する様子が観察され(図 1-9), 余剰の光合成産物がサイトゾルに多糖顆粒として蓄積され, 暗期には呼吸によりこれが消費されていることが考えられた。また, 明期に ^{13}C で同位体標識された重炭酸塩 ($\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$) を培地に添加し, 暗期になる前に *R. viridis* 細胞内に蓄積した多糖顆粒を精製して質量分析をおこなったところ, ^{13}C の有意な取込が認められた。一方, 継続的に暗所で培養した場合には, 多糖顆粒の蓄積は認められなかった(表 1-1)。この結果から *R. viridis* のサイトゾルに蓄積した多糖顆粒は, 培地中からの炭酸固定により生じた有機物を含むものであると考えられた。

また, 丸山(2018)では, 酸素発生を検出実験からも, *R. viridis* の盗葉緑体に光合成活性が認められた(図 1-10)。細胞あたりの光合成による最大酸素発生速度は, *Tetraselmis sp.*からの盗葉緑体獲得から日数が経過するごとに徐々に低下した。しかし, これを獲得した盗葉緑体の個数あたりの最大酸素発生速度として計算すると, 盗葉緑体の光合成活性は約2週間の間に上昇して停滞することが示唆された。これは, 細胞分裂によって娘細胞へ盗葉緑体が分配されることにより, 細胞あたりの光合成活性は低下するが, 盗葉緑体自体の機能は盗葉緑体獲得から約2週間は保持されると解釈された。また, 盗葉緑体の細分化が活発に進行するが細胞分裂が開始される前の段階では, 細胞あたりの光合成による最大酸素発生速度に上昇が確認された。ここでは, *Tetraselmis sp.*葉緑体を *R. viridis* 自身の生理に適するように最適化がおこなわれていることが予想された。

1-2-2-6. 生活環

以上の観察から、丸山修士論文(2018)では、*Rapaza viridis* について以下のような生活環が考えられた。(1) *Tetraselmis* sp.細胞全体が貪食される形で *R. viridis* 食胞内に取り込まれる、(2) 食胞内で *Tetraselmis* sp.の葉緑体のみが隔離され、その他の細胞質は細胞外に排泄される(*Tetraselmis* sp.核も排除される)、(3) 盗葉緑体が細分化される、(4) 細分化された盗葉緑体が娘細胞に分配される。その後、再び盗葉緑体を獲得できない場合には約 30 日後には死滅するため、*R. viridis* は定期的に新鮮な *Tetraselmis* sp.を捕食して盗葉緑体を補充する必要がある(図 1-11)。

1-2-2-7. 核ゲノムにコードされる盗葉緑体移行タンパク質遺伝子とその起源

Rapaza viridis の盗葉緑体は、その獲得の初期段階で葉緑体関連タンパク質の大半をコードする *Tetraselmis* sp.の核ゲノムが除去されてしまうにも関わらず、盗葉緑体の機能が一定の期間維持されることから、宿主である *R. viridis* 核ゲノムにコードされたタンパク質が盗葉緑体内部に輸送されて機能していることが予想された。Karnkowska *et al.* (2023)では、この可能性を検証するために、*R. viridis* のトランスクリプトームデータから盗葉緑体に輸送される可能性のあるタンパク質の遺伝子の推定をおこなった。ここでは、*R. viridis* の姉妹群である Euglenophyceae に特徴的なペプチド N 末端側に存在する葉緑体輸送配列(Durnford and Gray 2006; Novák Vanclová *et al.* 2020)に着目して、*R. viridis* 遺伝子の翻訳産物の N 末端側に相同性の認められる配列を探索した。その結果、*R. viridis* の核ゲノムコードタンパク質の中にも、Euglenophyceae の葉緑体タンパク質と類似した構造を持つものが存在していることが明らかになった。よ

って Karnkowska *et al.* (2023) では、このような特徴を持つタンパク質は、*R. viridis* 細胞内においては、盗葉緑体へと輸送される可能性を論じた。さらに、このように認識された *R. viridis* の推定盗葉緑体輸送タンパク質遺伝子それぞれについて、分子系統樹を作成してその進化的起源の推定を試みた結果、これらが、盗葉緑体ドナーである *Tetraselmis* sp. ではない他の多種多様な藻類を起源としていることが強く示唆された。それらの中には *Tetraselmis* sp. が属する緑色植物を起源とすると推定されるものの他に、これらとは全く異なる生物である紅藻の二次共生由来の葉緑体をもつ藻類(ストラメノパイル, クリプト藻, ハプト藻)を起源とすると推定されるものが 30% も認められた。このため Karnkowska *et al.* (2023) では、*R. viridis* とこれら遺伝子水平転移の起源となった各種藻類との間には、進化的な過去に盗葉緑体现象としての関係や捕食-被食関係があった可能性が論じられた。また、これらの中には、Euglenophyceae の遺伝子と分子系統的なクラスターを形成するタンパク質遺伝子も存在した。このように共有された葉緑体遺伝子については、*R. viridis* と Euglenophyceae が分岐する以前の進化的段階(共通祖先以前)において遺伝子水平転移が起きたと考えられた。

1-3. 従来考えられてきた葉緑体の進化過程の仮説と *Rapaza viridis* の盗葉緑体现象

1-1. で示したように、従来考えられてきた細胞内共生進化の仮説では、共生体核が消失する進化的段階より以前に、恒久的な細胞内共生関係が築かれ、これにより光独立栄養的な宿主がまず進化したと考えられる。したがって、恒久的な細胞内共生が成立した以降において、共生体核から宿主核への遺伝子水平転移が生じる(細胞内共生遺伝子水平転移)ことで宿主による葉緑体維持に必要な遺伝子の獲

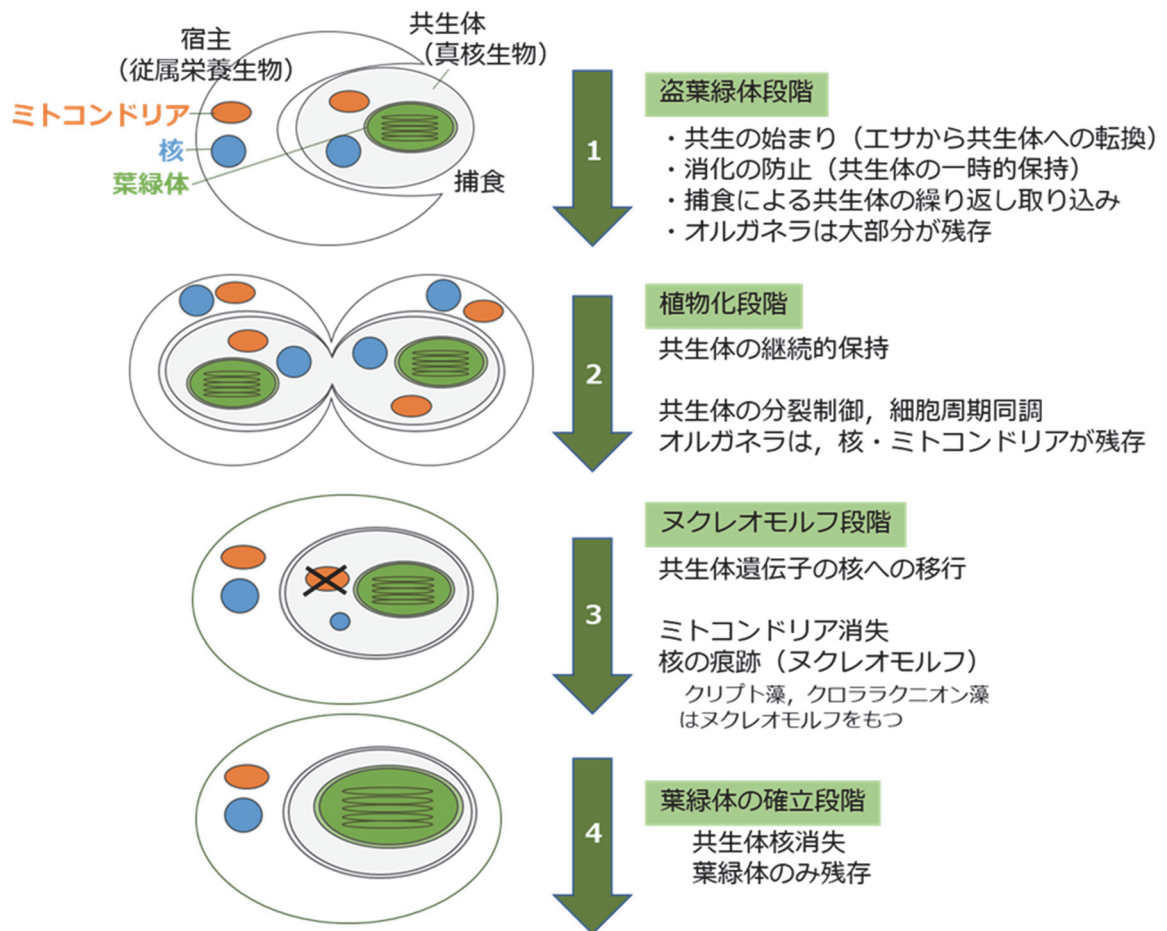
得が起きたと想定される。また、盗葉緑体现象においても、一般的に、盗葉緑体ドナーの核を保持する盗葉緑体性生物の方が、より光独立栄養的であるとされる (Johnson 2011; Onuma *et al.* 2020)。しかし、前述の通り、*Rapaza viridis* では、盗葉緑体ドナー細胞の核は *R. viridis* 細胞内に取り込まれて約 2 時間後には消失してしまう。しかも、盗葉緑体ドナー核が残存しないにもかかわらず、獲得した葉緑体の形態に変化が生じ、*R. viridis* の盗葉緑体には光合成活性が認められ *R. viridis* の光独立栄養を実現していると考えられる。さらに重要なことに、*R. viridis* の核ゲノムにコードされた推定盗葉緑体輸送タンパク質遺伝子群は、*Tetraselmis* sp. 以外の多様な藻類からの水平転移によって獲得されたものであることが示されており、これは従来の細胞内共生進化の仮説で想定される、葉緑体の起源生物からの細胞内共生遺伝子水平転移とは異なる現象を想定する必要があると思われた。

1-4. 本研究の目的

Rapaza viridis は、ユーグレノイドにおいて唯一発見されている盗葉緑体性生物であり、また、従来考えられてきた一般的な細胞内共生進化の仮説には当てはまらない例であると思われる。当研究室では、近年、*R. viridis* の遺伝子のノックダウンやノックアウトの実験系が確立され、盗葉緑体性生物において初めての遺伝子操作実験が可能となった (Kashiyama *et al.*, in prep.)。したがって、*R. viridis* のさらなる研究は、盗葉緑体现象や葉緑体進化の研究について従来とは異なる新たな視点からのアプローチを提供できる可能性が高いと考えられた。

そこで本研究は、“他人の葉緑体”を自身の一時的あるいは恒久的なオルガネラとするために必要と

される葉緑体の制御メカニズムの解明を目指し, *R. viridis* の盗葉緑体利用に関わる細胞プロセスと, これに関連するタンパク質因子群の機能について明らかにすることを目的とした。すなわち本研究では, 他の盗葉緑体性生物を対象とした従来の研究における一般的なアプローチであった細胞構造の観察実験に加えて, 世界初のアプローチ方法となる遺伝子操作実験を基盤とした生化学的なタンパク質の機能検証実験を試みた。

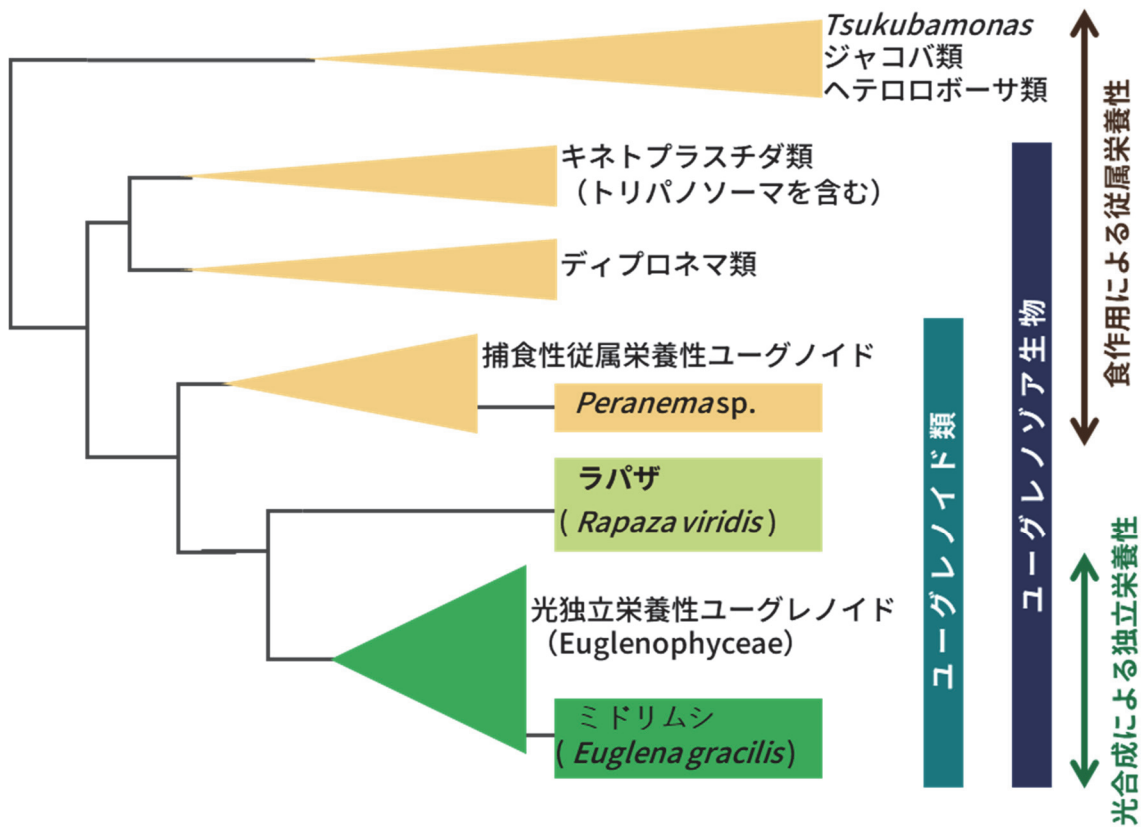


(井上 2007 「藻類 30 億年の自然史」をもとに作図)

図 1-1. 細胞内共生関係を介した二次共生による葉緑体の進化仮説

二次共生による葉緑体の進化過程では一般的に、細胞内共生関係を介した進化仮説が考えられている。この仮説での進化の過程では、まず内共生関係が築かれ、次に遺伝子の水平転移によって共生体核の遺伝子が宿主核へと移行することで宿主が葉緑体を制御できるようになり、その段階の後、共生体核が縮小・消失して、宿主自身のオルガネラとしての葉緑体が成立したと考えられている。

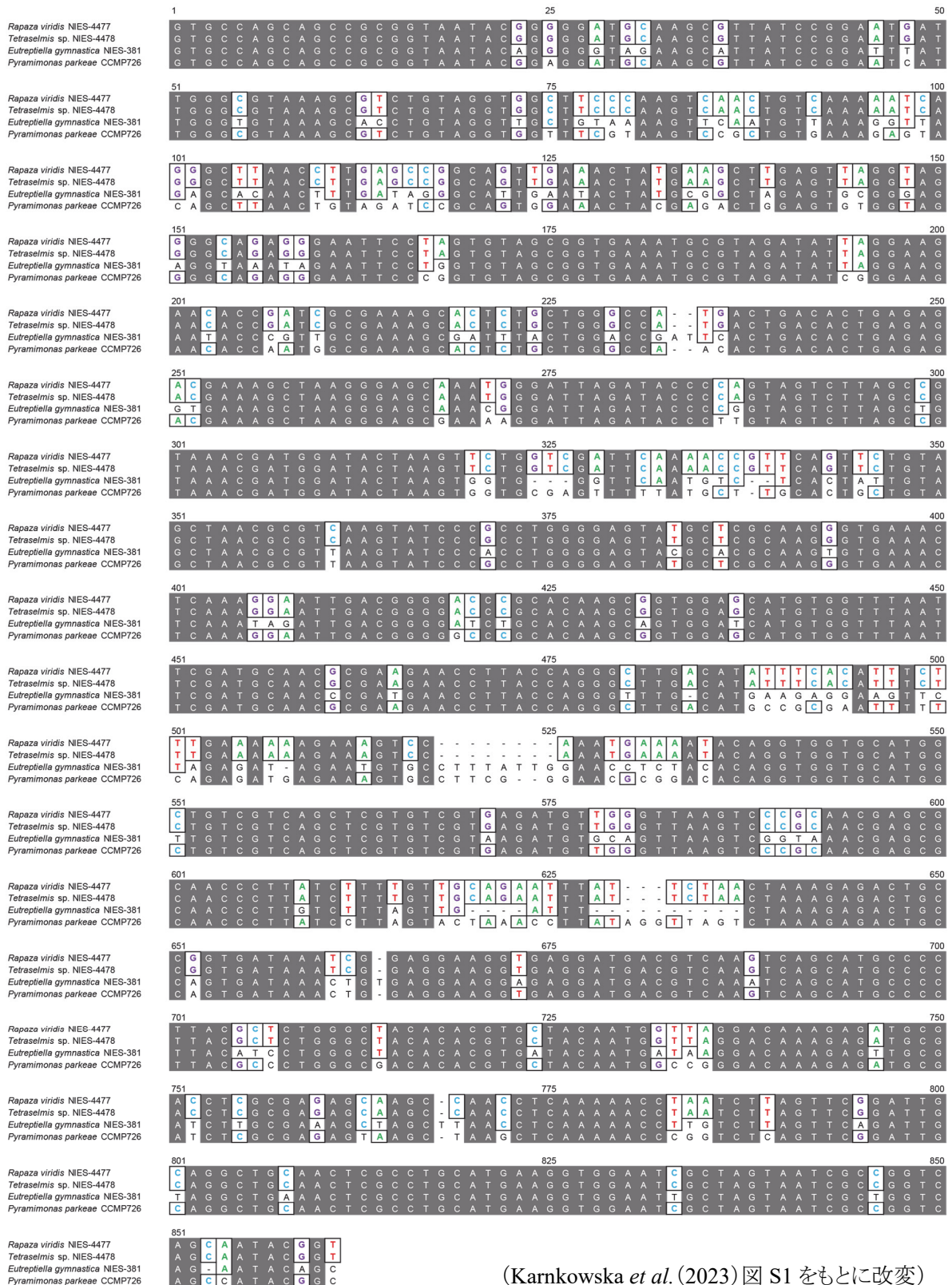
スーパーグループ「ディスコーバ」



(Yamaguchi *et al.* (2012) をもとに作図)

図 1-2. *Rapaza viridis* の SSU rRNA 分子系統樹

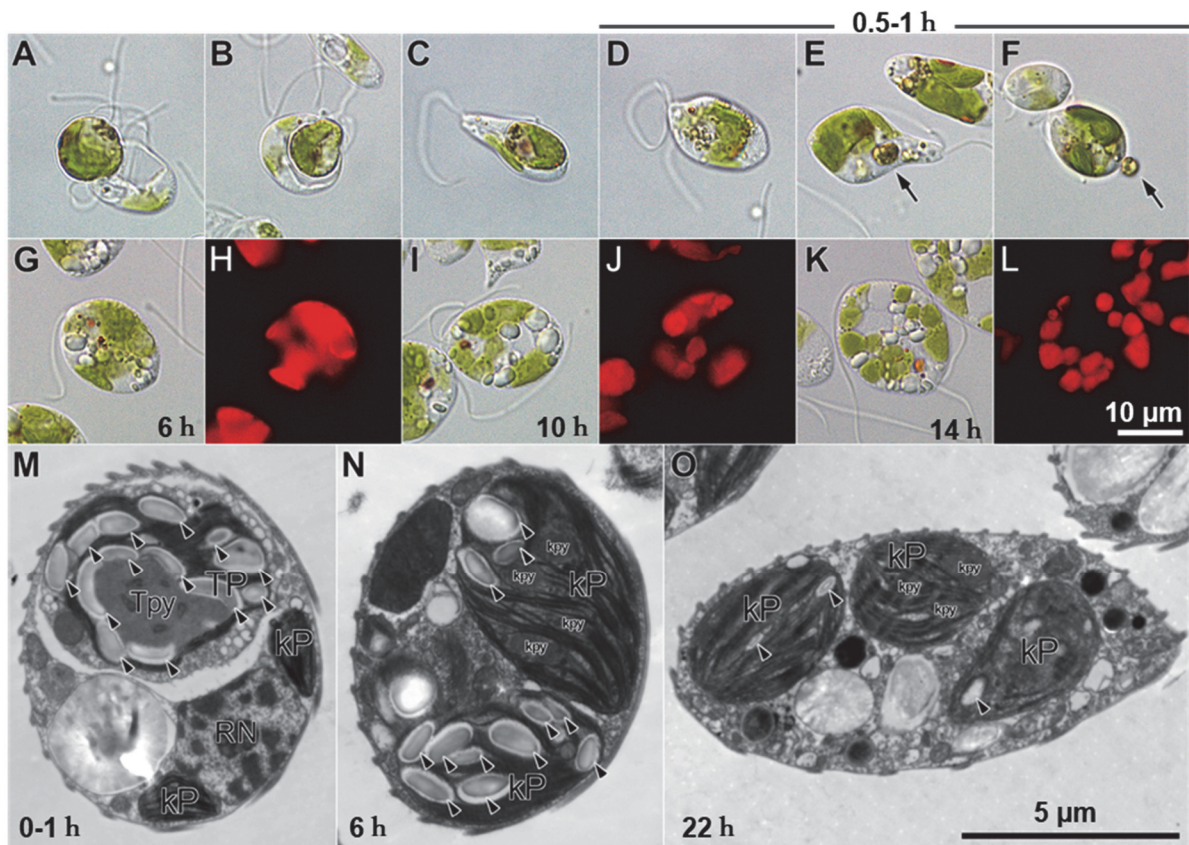
Rapaza viridis は光独立栄養性ユーグレノイドの根本で分岐した姉妹群であり、捕食性従属栄養性ユーグレノイドと光独立栄養性ユーグレノイドの間に位置する。



(Karnkowska *et al.* (2023) 図 S1 をもとに改変)

図 1-3. *Rapaza viridis* と *Tetraselmis* sp. の葉緑体ゲノムの部分 16SrRNA 遺伝子配列

GenBank データベースから Euglenophyceae (*Eutreptiella gymnastica* NIES-381 [GenBank: FJ719672.1]) と Pyramimonadales (*Pyramimonas parkeae* CCMP726 [GenBank: FN563104.1]) の代表的な配列を参考に作成。配列の網掛け部分は *R. viridis* 配列と一致する箇所を示す。



(Karnkowska *et al.* (2023) 図 1 をもとに改変)

図 1-4. 光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡(TEM)による, *Tetraselmis sp.*捕食後の *Rapaza viridis* の経時的観察

A-C: *R. viridis* が *Tetraselmis sp.*細胞を飲み込み, 食胞を形成している様子。D-F: 捕食から 0.5-1 時間後の様子。*R. viridis* は捕食した *Tetraselmis sp.*の葉緑体のみを残しそれ以外の細胞質(矢印)は排除する。G-L: *R. viridis* 細胞内に残された *Tetraselmis sp.*葉緑体が細分化される様子。(微分干渉観察画像 G: 捕食から 6 時間後, I: 10 時間後, K: 14 時間後と, 対応する蛍光観察画像; クロロフィル蛍光 H, J, L)。

M-O: 化学固定した *R. viridis* 細胞の TEM 観察。(M: 捕食から 0-1 時間後, N: 6 時間後, O: 22 時間後) M: *Tetraselmis sp.*葉緑体(TP)を含む細胞丸ごとが *R. viridis* に取り込まれた直後。*Tetraselmis sp.*の葉緑体は大きなピレノイド(Tpy)と多くのスターチ粒(矢印)を含む。*Tetraselmis sp.*の細胞は *R. viridis* の食胞内に収まっている。*R. viridis* の核(RN)と, 古い盗葉緑体(kleptoplast;kP)も観察される。N,O: 細分化された葉緑体は徐々に *R. viridis* 型葉緑体(kP)の特徴的を示していく。葉緑体内のスターチ粒の減少(矢印)とチラコイド貫入ピレノイドを含む複数の小さなピレノイドが形成される。白色のスケールバー(A-L): 10 μm , 黒色のスケールバー(M-O): 5 μm 。

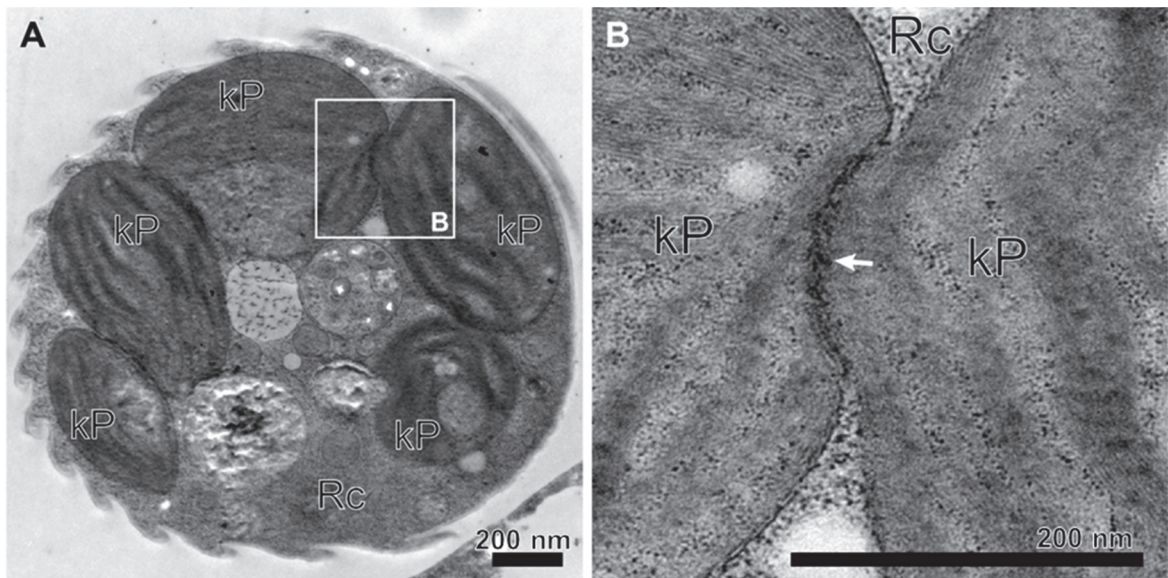


(Karnkowska *et al.* (2023) 図 S3 をもとに改変)

図 1-5. 捕食から約 2 時間後の *Rapaza viridis* の生細胞核染色

A: 明視野画像 **B:** 対応する蛍光画像。SYBR-Green 染色した核酸からの緑色蛍光は、*R. viridis* の核のみが存在し、摂取した *Tetraselmis sp.* の核はないことを示しており、*Tetraselmis sp.* の核は摂取後すぐに排除されることが示唆される。

緑色蛍光: SYBR-Green 蛍光, 赤色蛍光: クロロフィル蛍光, スケールバー: 10 µm



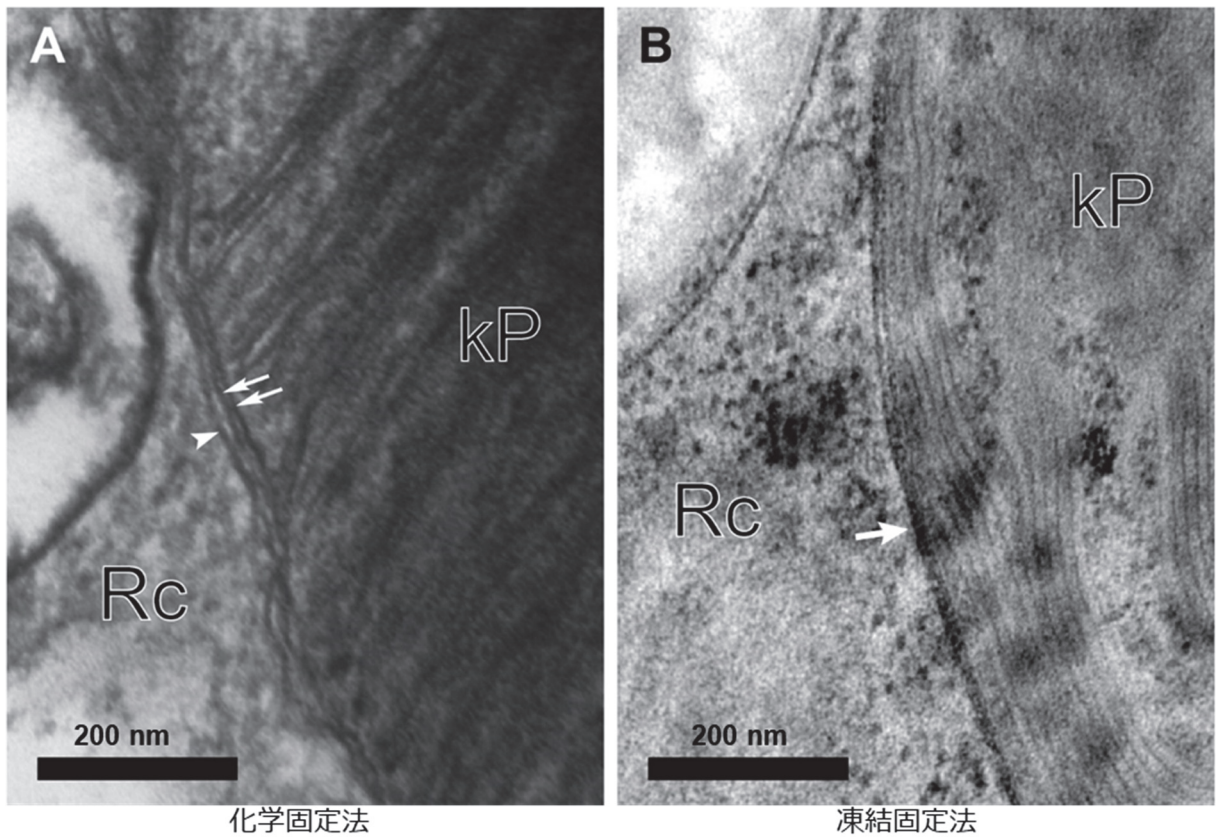
(Karnkowska *et al.* (2023) 図 S4 をもとに改変)

図 1-6. 盗葉緑体細分化進行時の盗葉緑体くびれ構造

A: 急速凍結法と凍結置換法で固定した細胞では、砂時計のような形の収縮構造が観察された。

B: 収縮構造内部は典型的な高濃度染色であった(矢印)。スケールバー: 200 nm

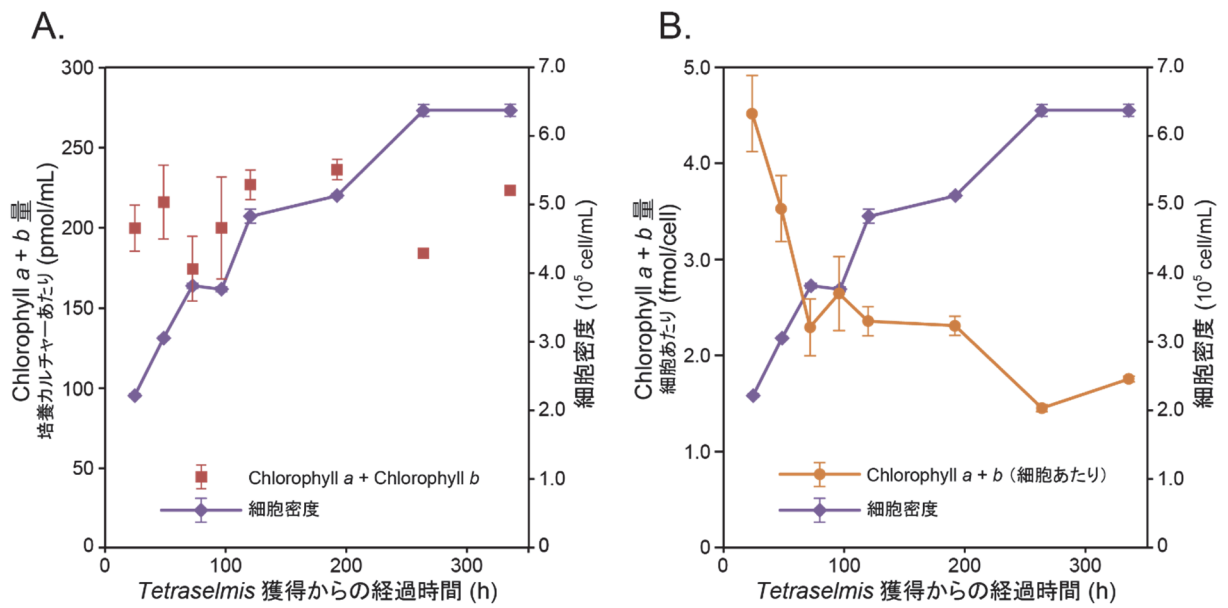
kP: 盗葉緑体, Rc: *Rapaza viridis* サイトゾル



(Karnkowska *et al.* (2023) 図 S5 をもとに改変)

図 1-7. 盗葉緑体細分化時の盗葉緑体包膜

A: 化学固定法で作製した試料。葉緑体には3重の包膜が観察された。内側の2つの膜(矢印)は *Tetraselmis* sp.の葉緑体2重膜に、最外膜(矢尻)は *Rapaza viridis* 食胞膜に由来すると推察される。**B:** 凍結固定法で作製した試料。葉緑体包膜は密接している(矢印)。
 スケールバー:200 nm, kP:盗葉緑体, Rc:*Rapaza viridis* サイトゾル



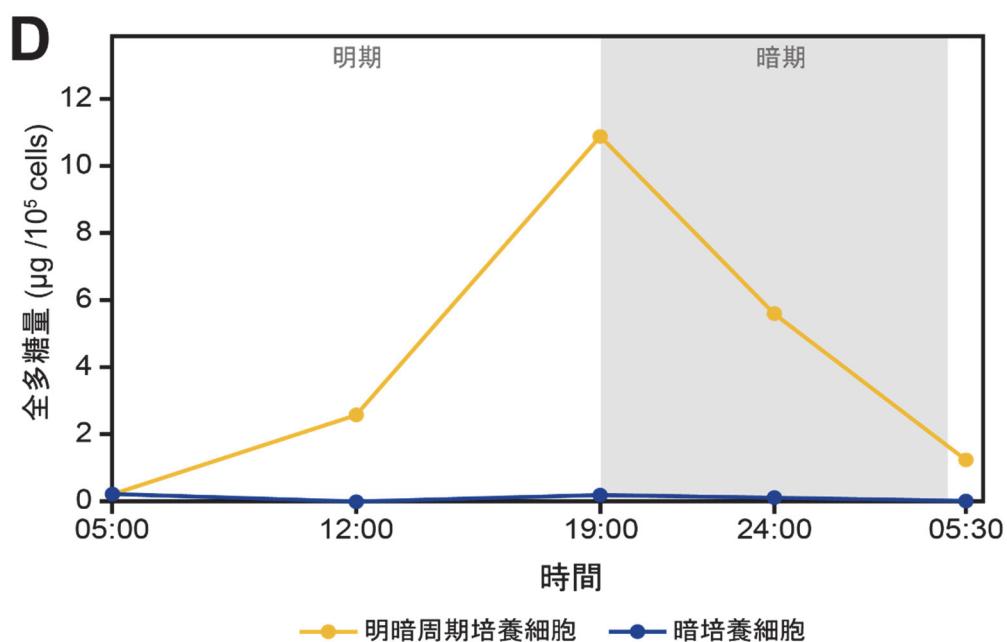
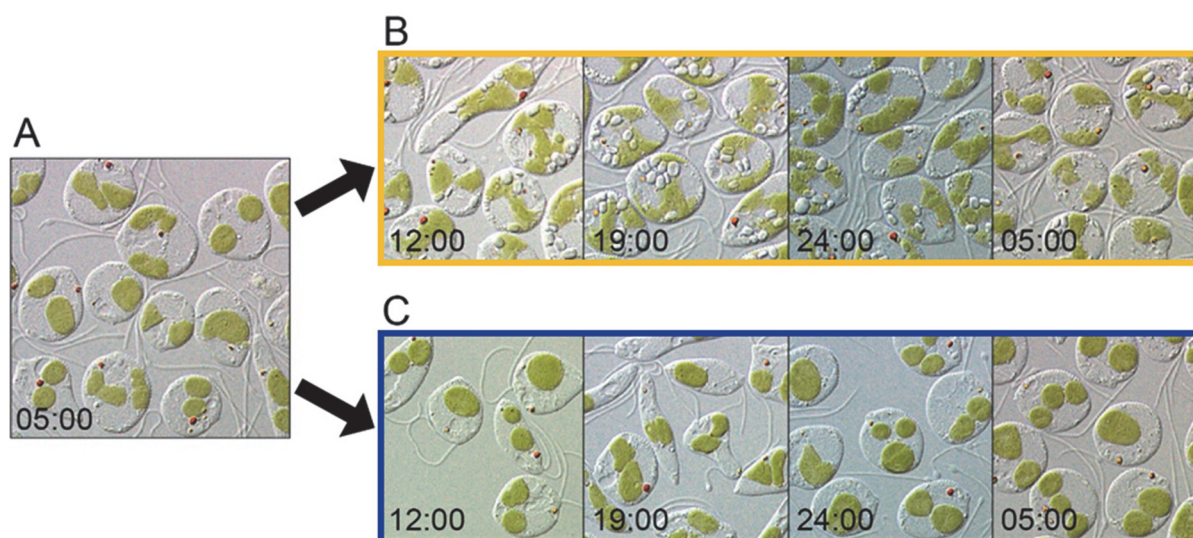
(Karnkowska *et al.* (2023) 図 S6 をもとに改変)

図 1-8. *Tetraselmlis* sp.捕食後の *Rapaza viridis* の培養カルチャー内の細胞密度の変化とクロロフィル総量の比較

A: *R. viridis* 細胞密度の変化と培養液あたりのクロロフィル *a+b* 量の変化。

B: *R. viridis* 細胞密度の変化と細胞あたりのクロロフィル *a+b* 量の変化。

細胞密度は *Tetraselmlis* sp.捕食後に増加したが、培養液中のクロロフィル *a+b* 量は増加しなかった。細胞あたりのクロロフィル *a+b* 量は *R. viridis* の細胞分裂の進行に伴って減少し、盗葉緑体において新しくクロロフィルは生成されないことが示された。値は平均値±標準誤差で示す(n=3)。



(Karnkowska *et al.* (2023) 図 3, S7 をもとに改変)

図 1-9. 明暗周期培養における *Rapaza viridis* のサイトゾル多糖顆粒の蓄積変動

A: 05:00 の明期開始直前の細胞では多糖顆粒はほとんど観察されない。

B: 明期で 16 時間 (05:00-19:00), その後暗期で 8 時間 (19:00-05:00) 培養した細胞。

C: 暗所で 24 時間培養した細胞。D: 多糖顆粒の定量 (全糖量換算)。

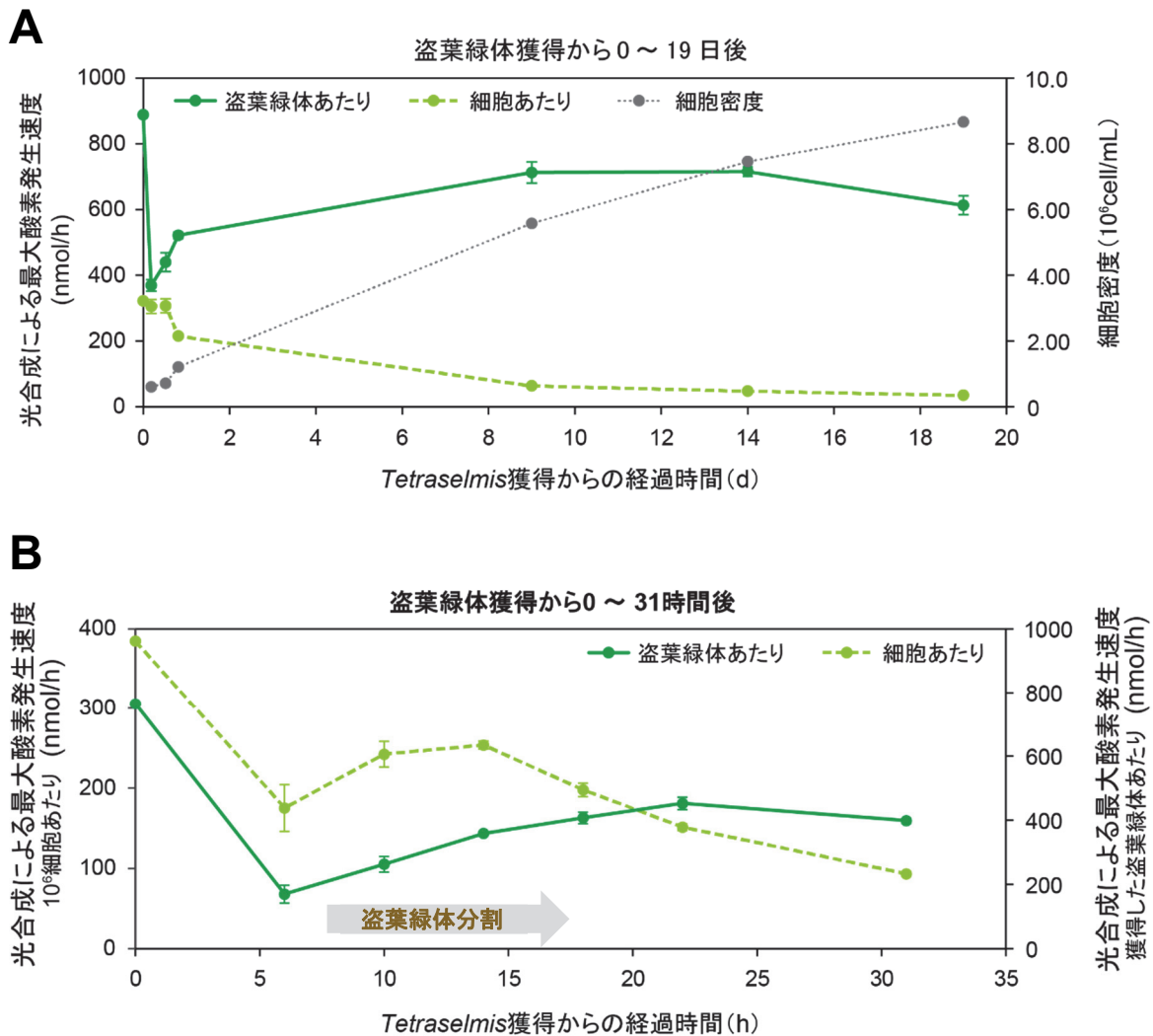
サイトゾルの多糖顆粒の蓄積は明所でのみ観察されることから, *R. viridis* は光合成産物を日中に多糖顆粒としてサイトゾルに蓄積し, 夜間に呼吸で消費していると推測された。

表 1-1. ^{13}C ラベリング実験における *Rapaza viridis* 細胞から精製した多糖顆粒の ^{13}C 同位体の組成

このラベリング実験により、*R. viridis* による無機炭素の取り込みと固定化が明確に示された。その結果、培養期間中に形成された多糖顆粒を構成する炭素の 48%は、培地から細胞外に取り込まれた無機炭素に由来することが明らかとなった。

(Karnkowska *et al.* (2023) 表 S1 をもとに改変)

サンプル	$\delta^{13}\text{C}$ value
同位体ラベル実験の精製多糖顆粒の同位体組成	33
コントロール実験の精製多糖顆粒の同位体組成	-22
実験に使用した培地の同位体組成	91



(丸山修士論文(2018)をもとに改変)

図 1-10. *Rapaza viridis* の光合成活性(光合成による酸素発生速度)

A: *Tetraselmis* sp.獲得から0～19日間に於ける光合成による最大酸素発生速度の変化。細胞あたりでは *Tetraselmis* sp.獲得から日数が経過するごとに光合成活性が低下するが、獲得した盗葉緑体あたりでは約2週間の間に上昇と停滞が認められる。細胞分裂によって娘細胞へ盗葉緑体が分配されることにより、細胞あたりの光合成活性は低下するが、盗葉緑体自体の機能は盗葉緑体獲得から約2週間は保持されることが示唆される。**B:** *Tetraselmis* sp.捕食から0～31時間における光合成による最大酸素発生速度の変化。盗葉緑体の細分化が進行する時間帯では細胞あたりの光合成による最大酸素発生速度に上昇が確認され、*Tetraselmis* sp.葉緑体を *R. viridis* 自身の生理に適するように最適化をおこなっていることが示唆される。0時間は、獲得前の *Tetraselmis* sp.と *R. viridis* の光合成活性を合わせた値とした。値は平均値±標準誤差で示す (n=3, 0hのみ n=1)。

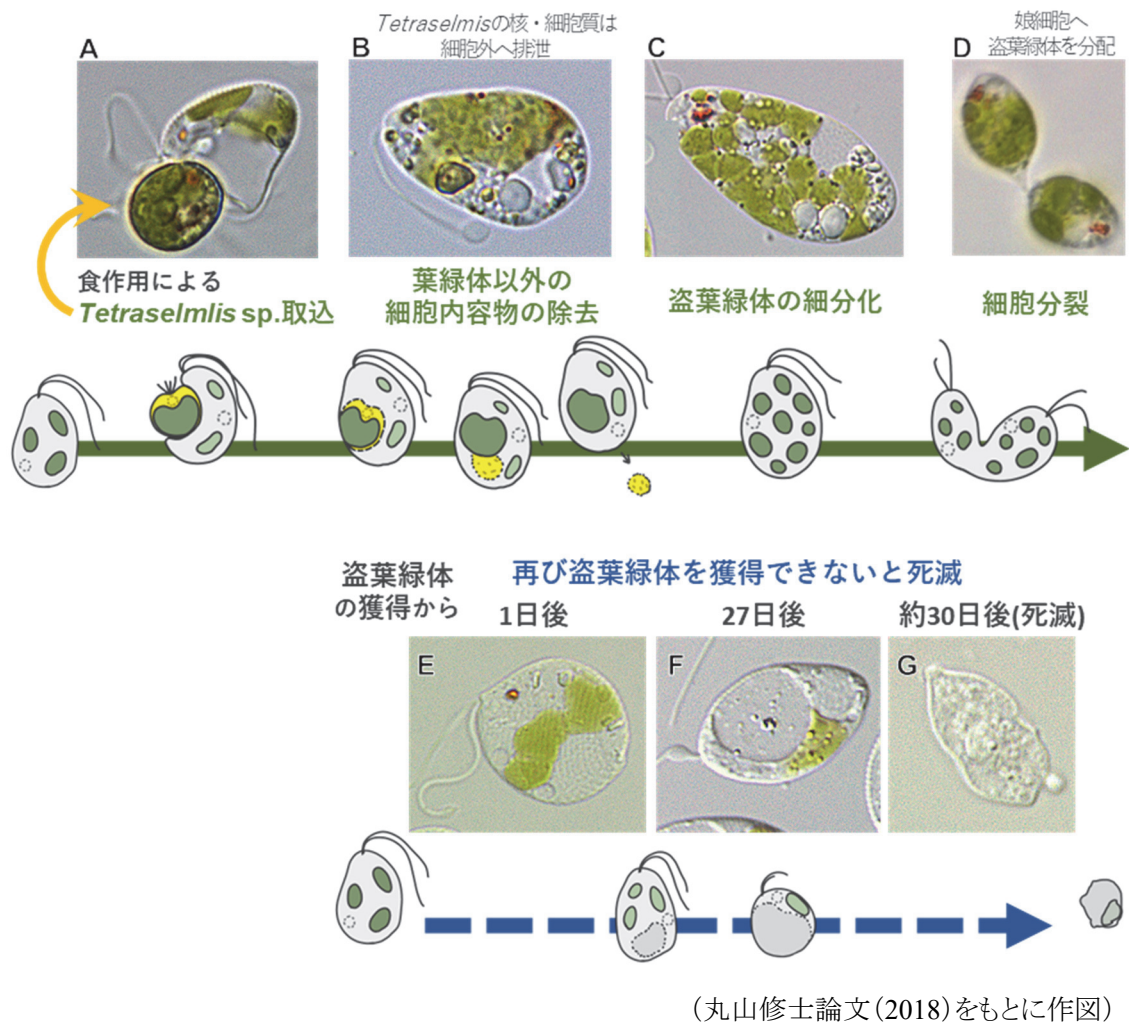


図 1-11. *Rapaza viridis* の生活環

盗葉緑体は一時的にしか機能しないため、*Tetraselmis* sp.細胞を定期的に捕食することで、新鮮な盗葉緑体を定期的に獲得する必要がある。**A**:*R. viridis* は *Tetraselmis* sp.の細胞を丸のみする形で捕食する。**B**:捕食した *Tetraselmis* sp.の葉緑体とその他の細胞質とを分離し、葉緑体だけを残す。**(B-4: *Tetraselmis* sp.の葉緑体以外の細胞内容物は排泄される)** **C**:獲得された盗葉緑体は *R. viridis* 細胞内で細分化される。**D**:細分化され数が増えた盗葉緑体断片は娘細胞に分配される。この時の前後とも盗葉緑体量は増大しない。**E-G**:再び盗葉緑体を獲得できないと死滅する。死滅が近づくにつれ、細胞内には液胞が発達する。

第 2 章

盗葉緑体の形成過程で観察される細胞微細構造の変化

2-1. 背景

Tetraselmis sp.を捕食した *Rapaza viridis* の細胞内では、捕食後約 20 時間の間に、細胞微細構造のダイナミックな変化が起こることが光学顕微鏡や透過型電子顕微鏡(TEM)による経時的な観察から明らかになっている(丸山修士論文 2018)。捕食後間もない段階で、*Tetraselmis* sp.の核は、*R. viridis* 細胞内から除去されるため、この葉緑体の形態変化には、*R. viridis* による機構が関連していることが示唆される。捕食後の *R. viridis* で観察される細胞内構造の一連の変化について、まず *Tetraselmis* sp.細胞全体を貪食して包膜(食胞膜)内に取り込まれ、その後、取り込みから約 30 分から 6 時間後が経過した段階で、*Tetraselmis* sp.の細胞核と葉緑体以外の細胞質が、包膜の内部で葉緑体と分離されて、エキソサイトーシスにより細胞外へ排泄される。この際、葉緑体のみが *R. viridis* 細胞内に残される。その後、この葉緑体は複数個に細分化され、*R. viridis* 自身の細胞分裂によって娘細胞へと分配される。したがって、盗葉緑体の形成過程は、(1)獲得した盗葉緑体ドナーの葉緑体以外の細胞内容物を除去する段階と、(2)盗葉緑体を細分化する段階の 2 つの段階に分けることができる。先行研究では、*R. viridis* に取り込まれた後の *Tetraselmis* sp.葉緑体に着目し、葉緑体から盗葉緑体となる際の葉緑体の形態変化、特に(2)の段階について、TEM を用いた観察をおこなった(丸山修士論文 2018)。

本章では、『(1)獲得した盗葉緑体ドナーの葉緑体以外の細胞内容物の除去段階』に着目し、TEM による経時的な細胞微細構造観察をおこなった。また、『(2)盗葉緑体の細分化段階』についても新たに連続切片観察による 3D 構造の構築をおこなうことで、*R. viridis* による盗葉緑体の形成機構について、より詳細な記載を行うことを目的とした。

2-2. 実験方法

2-2-1. TEM 観察サンプルの作製と観察

IMK 培地で培養した *Rapaza viridis* (約 20 日間飢餓状態) と IMK 培地で培養した *Tetraselmis* sp. が約 1:1 の細胞数比になるように、それぞれの細胞を新鮮な培地中に懸濁・混合し、貪食を促した。培養は、温度 20°C、明暗周期 (明期 14 時間: 暗期 10 時間)、光強度は約 100-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の条件でおこなった。その後、経過時間ごとに細胞試料を回収し、凍結置換固定をおこなった後、TEM 観察用の樹脂サンプルを作製し、超薄切片を作製、TEM 観察をおこなった。細胞回収は、捕食 2~4 時間後、15~17 時間後におこなった。凍結置換固定には、試料急速凍結装置 (VFZ-1, Vacuum Device) を使用し、メンブレンフィルターにのせた細胞濃縮液を銅ブロック上に液体窒素中で強くプレスさせることで、試料を急速凍結させた。メンブレンフィルター上に形成された細胞凍結片を 1% OsO_4 0.5% glutaraldehyde in acetone 固定液へ移し、-80°C で 3 日間インキュベートした。インキュベート後、-20°C で 1 時間、さらに 4°C で 30 分間インキュベートし、その後室温 20°C に戻した。室温でメンブレンから剥がれ落ちた細胞凍結片を遠心分離で回収し、100% Acetone で洗浄した。洗浄後、以下の樹脂置換作業をおこなった。Spurr 樹脂 (Polysciences, Inc.) を用い、樹脂 50% (Acetone 50%), 75% (Acetone 25%), 100% の試薬を用い、この順番でそれぞれ 1 時間ずつ置換した。100% 樹脂への置換操作は 3 回繰り返した。樹脂置換後、70°C で 8 時間加熱し、樹脂を硬化させた。ダイヤモンドナイフを使用して作製した超薄切片を、3 倍希釈の EM ステイナー (Nisshin EM, Ltd.) とクエン酸鉛 (Reynolds 1963) で染色したのち、透過型電子顕微鏡 (Hitachi H7100, Hitachi Ltd) を用いて観察をおこなった。

2-2-2. FIB-SEM 観察用サンプルの作製

IMK 培地で培養した *Rapaza viridis* に *Tetraselmis* sp. を与え、温度 20°C、明暗周期 (明期 14 時間: 暗期 10 時間)、光強度は約 100-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の条件で培養をおこなった。その後 18~19 時間経過した細胞 (葉緑体細分化が活発に進行している細胞) を回収し、タンニン酸を用いた凍結置換固定をおこない、その後 FIB-SEM 観察用の樹脂サンプルを作製した。凍結置換固定は、メンブレンフィルターにのせた細胞濃縮液を銅ブロック上に液体窒素中で強くプレスさせることで、試料を急速凍結させた。メンブレンフィルターにできた細胞凍結片を 2% OsO_4 0.1% glutaraldehyde in acetone 固定液に移し 4 日間 -70°C でインキュベートした。なお、この際、5 mL の固定液に対して細胞凍結片を 5 枚入れた。-70°C でのインキュベート期間には、毎日 1 回試料を震盪させて固定液の浸透を促した。-70°C でのインキュベートの完了後、-20°C で 1 時間インキュベートしたのち 4°C で 30 分間インキュベートした。室温 20°C でメンブレンから剥がれ落ちた細胞凍結片を遠心分離で回収し、1% Tannic acid in acetone で氷上インキュベートしたのち再び回収し、100% Acetone で洗浄した。1% OsO_4 in Acetone で氷上インキュベートを 1 時間おこなったのち、細胞凍結片を回収し 100% Acetone で洗浄した。その後、樹脂置換作業をおこなった。Spurr 樹脂 (Polysciences, Inc.) を用い、樹脂置換は 4 段階で徐々に樹脂濃度をあげた。樹脂 25% (Acetone 75%)、60% (Acetone 40%)、80% (Acetone 20%)、100% の試薬を用い、この順番でそれぞれ 1 時間ずつ置換させた。100% 樹脂置換は 2 回繰り返した。樹脂置換完了後、70°C で 8 時間加熱し、樹脂を硬化させた。

2-2-3. FIB-SEM 観察と 3D 構築

試料の観察は、洲崎敏伸先生(神戸大学)のご協力のもと、FIB-SEM(日本エフイー・アイ株式会社)を用いた観察を同社に委託した。観察条件は次の通りである: SEM: 2keV 0.4nA, contrast inversed, FIB: 30kV 5nA~100um width 100nm pitch slice, Pixel Size: 3712 x 1572(No.1-19 : 3708x1489), Slice No25~ are preferred。取得した連続切片の SEM 画像から、ソフトウェア Amira (FEI Visualization Science Group) を用いて 3D 構築をおこなった。

2-2-4. 光学顕微鏡観察

Rapaza viridis に対し、1:1 の細胞数比になるよう *Tetraselmis* sp. を混合して食食を促し、15 時間後に細胞を遠心分離で回収し観察をおこなった。この実験では IMK 培地を用い、温度 20°C、明暗周期(明期 14 時間:暗期 10 時間)、光強度は約 100-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で培養した。細胞観察には、CCD カメラ (FX630, Olympus) を搭載した倒立顕微鏡 (IX71, Olympus) を用いた。細胞を 2 枚のカバーガラスに挟み込み、細胞の遊泳運動を制限・制止させた状態で観察をおこなった。

2-3. 結果

2-3-1. 葉緑体以外の細胞内容物分離時の細胞微細構造

Tetraselmis sp. 獲得直後~獲得から約 4 時間後の *R. viridis* 細胞の光学顕微鏡観察では、*R. viridis* サイトゾルに複数個の黄土色の構造が特徴的に観察された(図 2-1:A)。この黄土色の構造は、自由生活

状態の *Tetraselmis* sp. でも対応すると考えられる構造が観察され、サイトゾル染色試薬で染色されず、サイトゾルではないことが確認されている(丸山 2018)。この細胞段階における TEM 観察では、*R. viridis* に取り込まれた直後と思われる *Tetraselmis* sp. 細胞が一重の包膜に包まれた様子が観察され(図 2-1:B, B-2-1)、その包膜内には葉緑体と緑藻に特徴的な板状クリステ形状のミトコンドリアを含む細胞質が観察された(図 2-1:B-2-1, B-2-2)。また、*R. viridis* 細胞のサイトゾルには、楕円体状の包膜構造(図 2-1:B-3, B-3-1, B-3-2, 図 2-2:A-2, B-1)と、細かな泡構造と小さな膜構造を内包する包膜構造(図 2-2:B-3)が特徴的に観察された。

これらのうち前者は、外側に二重包膜がある構造で(図 2-1:B-3-2, 図 2-2:A-2, B-1)、その内部にさらにいくつかの膜構造を含んだ。また、この楕円体包膜構造の一部には包膜構造が認められず泡状に観察される液-液相分離構造(油滴の可能性も含む)(図 2-2:A-2)が存在した。また、この楕円体構造と接している部分の葉緑体包膜がわずかに窪んでいる様子やチラコイド膜が窪みに沿ってゆがんでいる様子も観察された(図 2-1:B-3-1)。この観察では、楕円体構造の包膜と葉緑体の包膜がつながっているか、あるいは独立しているかなどの、両者の関係性については明らかにできなかった。後者は、一重包膜から成る構造であり(図 2-2:B-3)、泡状に観察される液-液相分離構造と、電子密度が非常に高い塊状の構造を内包する一重膜構造を複数含んでいた。この一重膜構造内部に認められた高電子密度構造は直径 250~500 nm 程度と大きさにばらつきがあり、かつ、これらの中でも小さなものほどより高い電子密度を示した。また、液-液相分離構造は直径 85~220 nm 程度と比較的小さかった。

Tetraselmis sp. 獲得から約 15~17 時間後の *R. viridis* 細胞の光学顕微鏡観察では、獲得直後~獲

得から約 4 時間後では観察された黄土色の構造は観察されなかった(図 2-3:A)。TEM 観察においては、*R. viridis* サイトゾルに認められた楕円体の包膜構造は観察されたが(図 2-6)、小さな膜構造を内包する包膜構造(図 2-2:B-3)は観察されなくなった。これに代わって、この *Tetraselmis* sp.獲得から約 15~17 時間後の細胞段階では、盗葉緑体の外縁部に複数個の膜構造が密に存在する様子(図 2-3:B-1, B-2, B-1-1, B-2-1)と、盗葉緑体内部に液-液相分離構造(図 2-5)が多く観察された。これらの構造は *Tetraselmis* sp. 獲得直後~獲得から約 4 時間後の観察においても認められたが(図 2-2:A, A-1, B), 獲得から約 15~17 時間後には、これらの構造がより目立って観察されるようになった。また、なかにはこの構造の内部に、板状クリステ形状の *Tetraselmis* sp.のミトコンドリアが含まれるものも観察された(図 2-4)。また、13 枚の連続切片観察(図 2-5)では、盗葉緑体の内部にも液-液相分離構造が形成されている様子が観察された。

2-3-2. 細分化時の盗葉緑体の立体構造

FIB-SEM による連続切片観察から構築した盗葉緑体細分化時の *R. viridis* 細胞の立体構造からは、1 つの葉緑体の複数箇所にくびれ構造が生じた複雑な葉緑体が観察された。また、盗葉緑体から分離されたと予測される膜構造はいびつな立体構造をとることが分かった(図 2-7)。

2-4. 考察

2-4-1. *Rapaza viridis* における葉緑体以外の細胞内容物の除去プロセスとその機構

光学顕微鏡観察では, *Tetraselmis* sp.獲得直後～獲得から約 4 時間後の *R. viridis* 細胞において, *Tetraselmis* sp.細胞質由来と考えられる黄土色の物質塊が葉緑体から分離され, その後エキソサイトーシスによりより排泄される様子が観察された。この黄土色の構造の排泄には, 該当する細胞段階 (*Tetraselmis* sp.獲得直後～獲得から約 4 時間後)の試料の TEM 観察で特徴的に観察される *R. viridis* のサイトゾルに形成された小さな膜構造を内包する一重包膜からなる構造(図 2-2:B-3)が関係することが考えられた。この一重包膜構造の内部には, さらに小さな包膜に内包された複数個の塊状構造が認められた。塊状構造は, その大きさと電子密度に多様性が認められた。この塊状構造を内包する包膜については, 類似する構造が盗葉緑体性渦鞭毛藻の *Dinophysis caudata* においても観察されている (Kim *et al.* 2012)。Kim *et al.* (2012)では, この構造は食胞であり, 内包された構造の電子密度の差異はそれぞれ消化段階が異なることによると述べられている。ただし, *R. viridis* で観察されたような入れ子状に包膜に内包されている様子は, 酵母や動物の細胞で認められるオートファジーの後期過程において液胞内に取り込まれたオートファゴソームとも類似性が認められる。このため, この構造の理解にはさらなる詳細な時系列観察実験などが必要であると考えられる。

Tetraselmis sp.獲得から約 15~17 時間後の *R. viridis* 細胞(盗葉緑体の細分化が進行する細胞段階)では, 光学顕微鏡観察においては黄土色構造の排泄のピークが過ぎて, 葉緑体以外の細胞内容物がさらに除去されていく様子は認められなかった。しかし, TEM 観察においては, この段階で *R. viridis* サ

イトゾルに楕円体構造(図 2-6)が観察され、盗葉緑体には複数個の膜構造(図 2-3:B-1, B-2, B-1-1, B-2-1)や液-液相分離構造(図 2-5)が観察された。よってこれらの構造の存在は、葉緑体以外の *Tetraselmis* の細胞内容物の除去がこの段階でも継続していることを示唆する。

陸上植物の研究では、葉緑体構成物質の分解に機能するユニークなオートファジープロセスが存在することが明らかにされている。シロイヌナズナでは、RuBisCO-containing body (RCB) が関連するプロセスや Autophagy related gene8-interacting protein (ATI) が関連するプロセスが知られている (Michaeli *et al.* 2014; Izumi *et al.* 2019)。RCB 小胞が関連するプロセスでは、RuBisCO を含む葉緑体ストロマ成分が包まれた RCB 小胞が形成された後、オートファジー膜につつまれ、オートファゴソームとなり最終的に分解される。オートファジー膜に包まれるまでのプロセスはまだ明らかにされていないが、RCB 小胞は葉緑体包膜の一部が突出する形で形成されると想定されている (Izumi *et al.* 2019)。また、ATI が関連するプロセスでは、葉緑体内部や周縁部に ATI タンパク質が発現し、この ATI を含む小胞が葉緑体ストロマや葉緑体包膜、チラコイドを内包する形でサイトゾルへと輸送され、最終的にオートファジーによって分解される (Izumi *et al.* 2019)。両者では、輸送する物質が異なり、小胞の大きさも前者(直径 0.5~1 μm)よりも後者(直径 50~100 nm)の方が小さい(Otegui 2018)。また、この他にもオートファジーを伴わない葉緑体構成物質の分解プロセス(Chloroplast vesiculation pathway; CV pathway)も知られており (Marisa 2018; Izumi *et al.* 2019)、陸上植物においては、葉緑体に関わる選択的な除去機構には様々なプロセスが存在していることが知られている。

本章において、*R. viridis* サイトゾルに形成される楕円体構造が、盗葉緑体から突出する形態をとつ

た点からは(図 2-6), 植物で認められる RCB が関連するプロセスや CV が関連するプロセスとの類似性が認められる。また, *R. viridis* 葉緑体内に観察された泡状の液-液相分離構造(図 2-5)は電子密度が非常に低かったが, 類似した構造がシロイヌナズナでも観察されている。このシロイヌナズナの研究では ATI を金コロイドで標識し TEM 観察がおこなわれたが, ATI が局在する位置に, 葉緑体内部に粒状の電子密度が非常に低い区画が観察されている(Michaeli *et al.* 2014)。

本章の微細構造観察からは, *R. viridis* における *Tetraselmis* 細胞の葉緑体以外の構成要素の除去が選択的であり, かつ徹底的に進行することが明らかとなった。*R. viridis* には, 光学顕微鏡で認識できる排泄機構だけではなく, TEM レベルの微細構造観察では, 陸上植物の葉緑体の部分的分解機構に形態的に類似する複雑な除去機構が機能することが示唆される。

2-4-2. *Rapaza viridis* における盗葉緑体の細分化

FIB-SEM による連続切片観察から構築した盗葉緑体細分化時の *R. viridis* 細胞の立体構造(図 2-7)からは, *R. viridis* では, 一般的な葉緑体の分裂時に観察される均等な 2 分割(Miyagishima *et al.* 2011)ではなく, 複数の分割プロセスが同時並行で進行していることが考えられる。また, 盗葉緑体細分化時のクロロフィル蛍光観察からも, 1 つの盗葉緑体が多分割されることが示唆された(図 2-8)。1 つの葉緑体が複数個に分割される例は, *Nicotiana tabacum* L. BY2 cells(タバコ BY2 細胞株)で知られているが, この場合には, くびり切りによる葉緑体の分割は複数同時には進行せず, 1 カ所ずつくびりきりが起こり, それを繰り返されることによって複数個に分割される(Momoyama *et al.* 2003)。

R. viridis の姉妹群である *Euglena gracilis* でも複雑な分岐構造をとる葉緑体が観察されている (Pellegrini 1980)。Pellegrini (1980) では、連続切片をつかった 3D 構築により、*E. gracilis* の葉緑体構造が詳細に観察された結果、*E. gracilis* は円盤状の葉緑体やくびれ構造をもつ分岐した葉緑体をもつことや、細胞分裂の前には葉緑体体積と分岐構造が増えることが明らかにされた。Euglenophyceae での葉緑体分裂機構はまだ不明な点が多く、*E. gracilis* において分岐した 1 つの葉緑体が、その後実際に複数個に分割されているかどうかは解明されていない。しかしながら、その他の研究では、*E. gracilis* では葉緑体が分裂するだけでなく融合することによって細胞あたりの葉緑体数が一定に保たれるよう調整されていることが推測されている (長船 2006) など、高い構造的可塑性が示唆されているため、葉緑体分裂時に均等な 2 分割を必ずしも必要としない可能性がある。このように、複雑な葉緑体の分割機構は *R. viridis* と Euglenophyceae に共通する「曖昧さ」をもつ現象である可能性も示唆された。

2-5. 結論

盗葉緑体の形成過程であると考えられる、(1) 獲得した盗葉緑体ドナーの葉緑体以外の細胞内容物の除去段階、(2) 盗葉緑体の細分化段階に着目し、細胞微細構造の変化を観察した。

(1) の段階では、光学顕微鏡観察下において *Tetraselmis* sp. 細胞質由来と考えられる葉緑体以外の黄土色の構造が排泄される様子が観察されるが、その排泄が終わった (2) の段階でも、微細構造観察レベルにおいては葉緑体以外の細胞内容物の除去が引き続き進行していることが示された。葉緑体以外の細胞内容物の除去に関与すると考えられる構造について、(1) の段階において特徴的に観察された

Rapaza viridis サイトゾルに形成される一重包膜から成る小さな膜構造を内包する包膜構造が、黄土色の構造の排泄に関連することが示唆された。(1)と(2)の段階の両方で、*R. viridis* サイトゾルに楕円体包膜構造が観察された。また、(2)の段階では特に、盗葉緑体外縁部に複数個の膜構造が密に存在する様子や、盗葉緑体内部に泡状の液-液相分離構造が観察された。本章の微細構造観察からは、*R. viridis* における *Tetraselmis* 細胞の葉緑体以外の除去が選択的であり、かつ徹底的に進行することが明らかにされ、*R. viridis* には、複雑な除去機構が機能することが示唆された。

(2)の段階の、細分化が進行している盗葉緑体の立体構造観察からは、盗葉緑体の複数箇所にくびれ構造が観察され、細分化段階の盗葉緑体が複雑な立体構造をとることが示された。したがって、盗葉緑体は *R. viridis* 包膜によってくびり切られる形で不均等に多分割される可能性が示唆された。

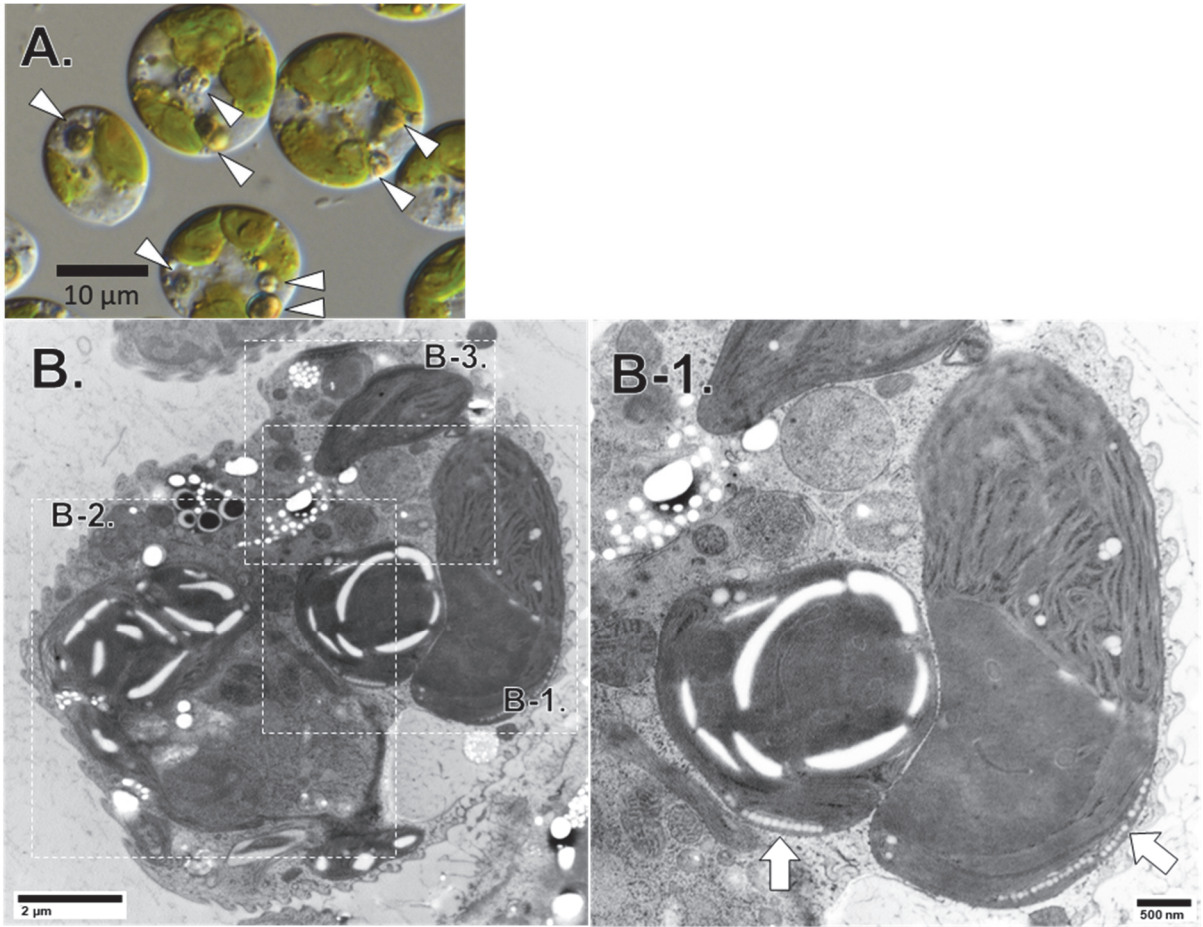


図 2-1. *Tetraselmis sp.*を与えてから 2~4 時間後 (推定:*Tetraselmis sp.*捕食直後~4 時間後)の *Rapaza viridis* の TEM 画像 (1)

A: 光学顕微鏡観察画像。*R. viridis* 細胞内には *Tetraselmis sp.*の葉緑体の他に, 複数個の黄土色の構造が観察された(矢尻)。 **B:** TEM 観察画像。*R. viridis* 細胞の全体像。 **B-1:** B の拡大画像。*R. viridis* に取り込まれた *Tetraselmis sp.*細胞の葉緑体。葉緑体には *Tetraselmis sp.*に特徴的な連なった眼点が観察された(白矢印)。

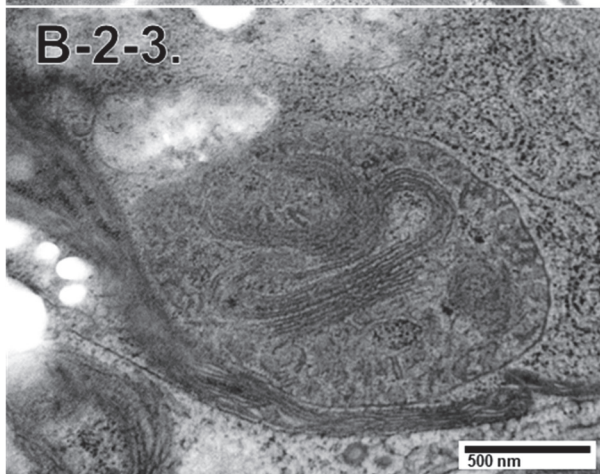
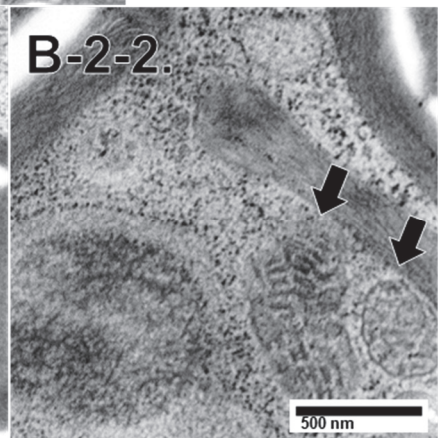
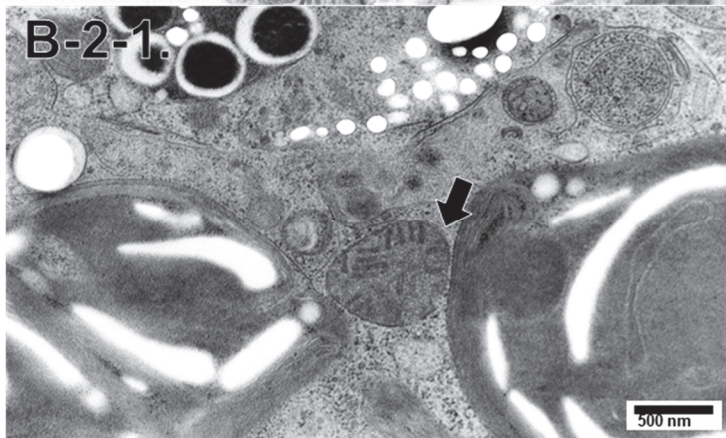
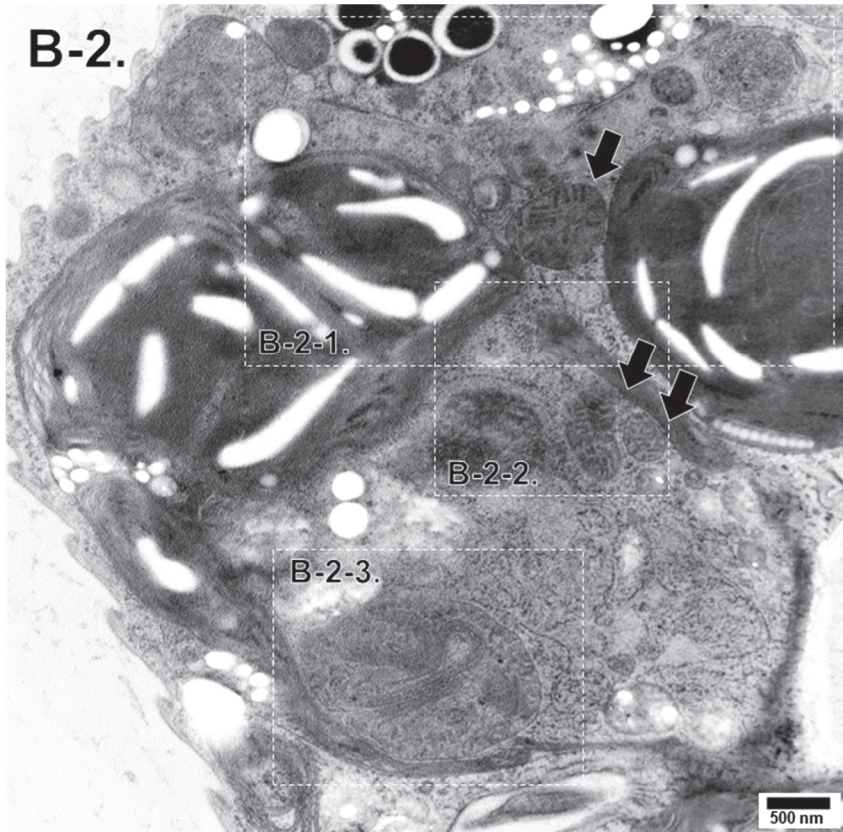


図 2-1. *Tetraselmis sp.*を与えてから 2~4 時間後(推定:*Tetraselmis sp.*捕食直後~4 時間後)の *Rapaza viridis* の TEM 画像(1)

B-2:B の拡大画像。*R. viridis* 細胞内に取り込まれた *Tetraselmis sp.*細胞。**B-2-1,2,3**:B-2 の拡大画像。**B-2-1,2**:板状クリステ形状のミトコンドリア(黒矢印)が観察された。**B-2-3**:*Tetraselmis sp.*のサイトゾルには、連なった膜を内包する一重膜構造が観察された。

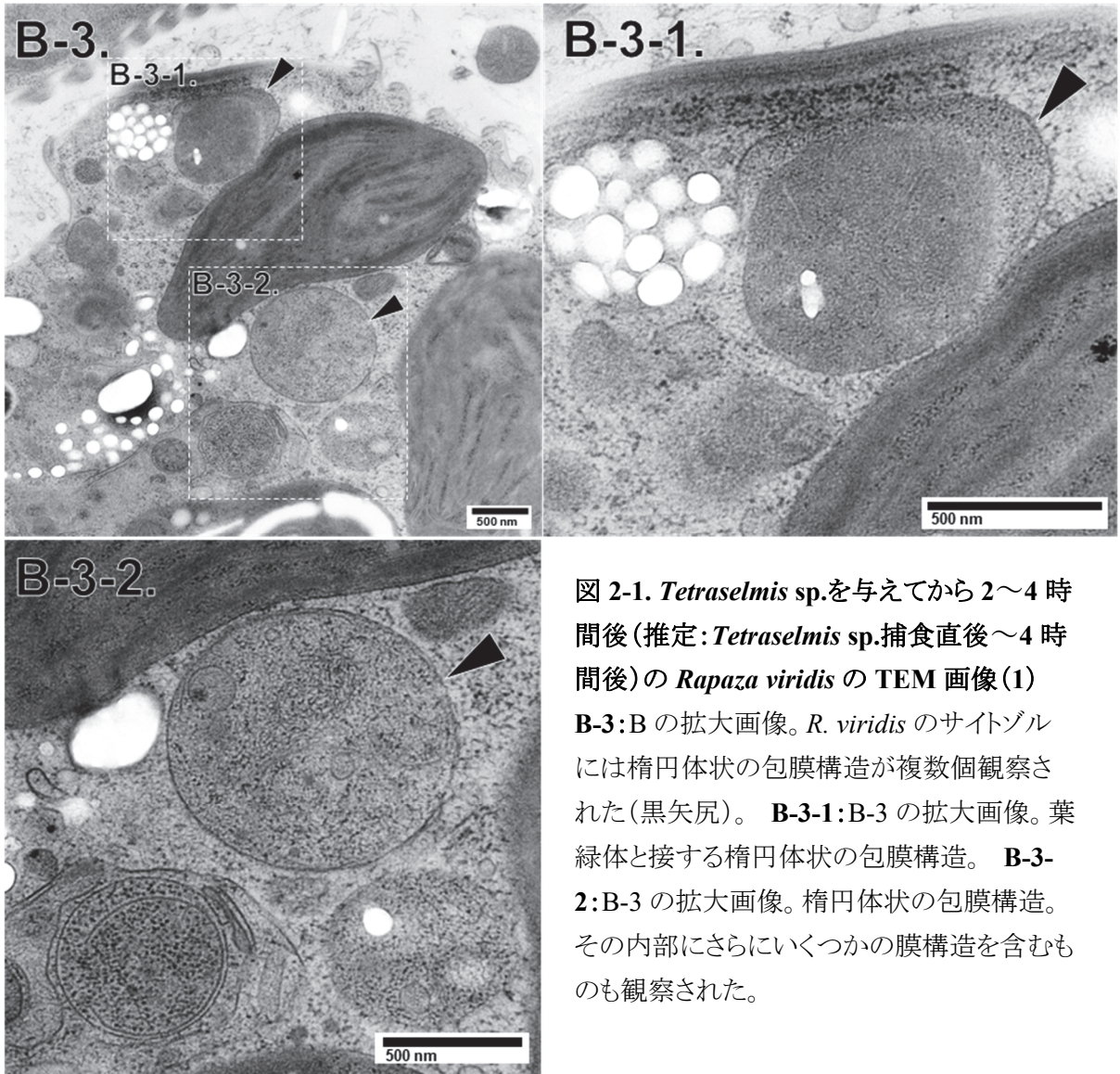


図 2-1. *Tetraselmis sp.*を与えてから 2~4 時間後(推定:*Tetraselmis sp.*捕食直後~4 時間後)の *Rapaza viridis* の TEM 画像(1)
B-3:B の拡大画像。*R. viridis* のサイトゾルには楕円体状の包膜構造が複数個観察された(黒矢尻)。**B-3-1**:B-3 の拡大画像。葉緑体と接する楕円体状の包膜構造。**B-3-2**:B-3 の拡大画像。楕円体状の包膜構造。その内部にさらにいくつかの膜構造を含むものも観察された。

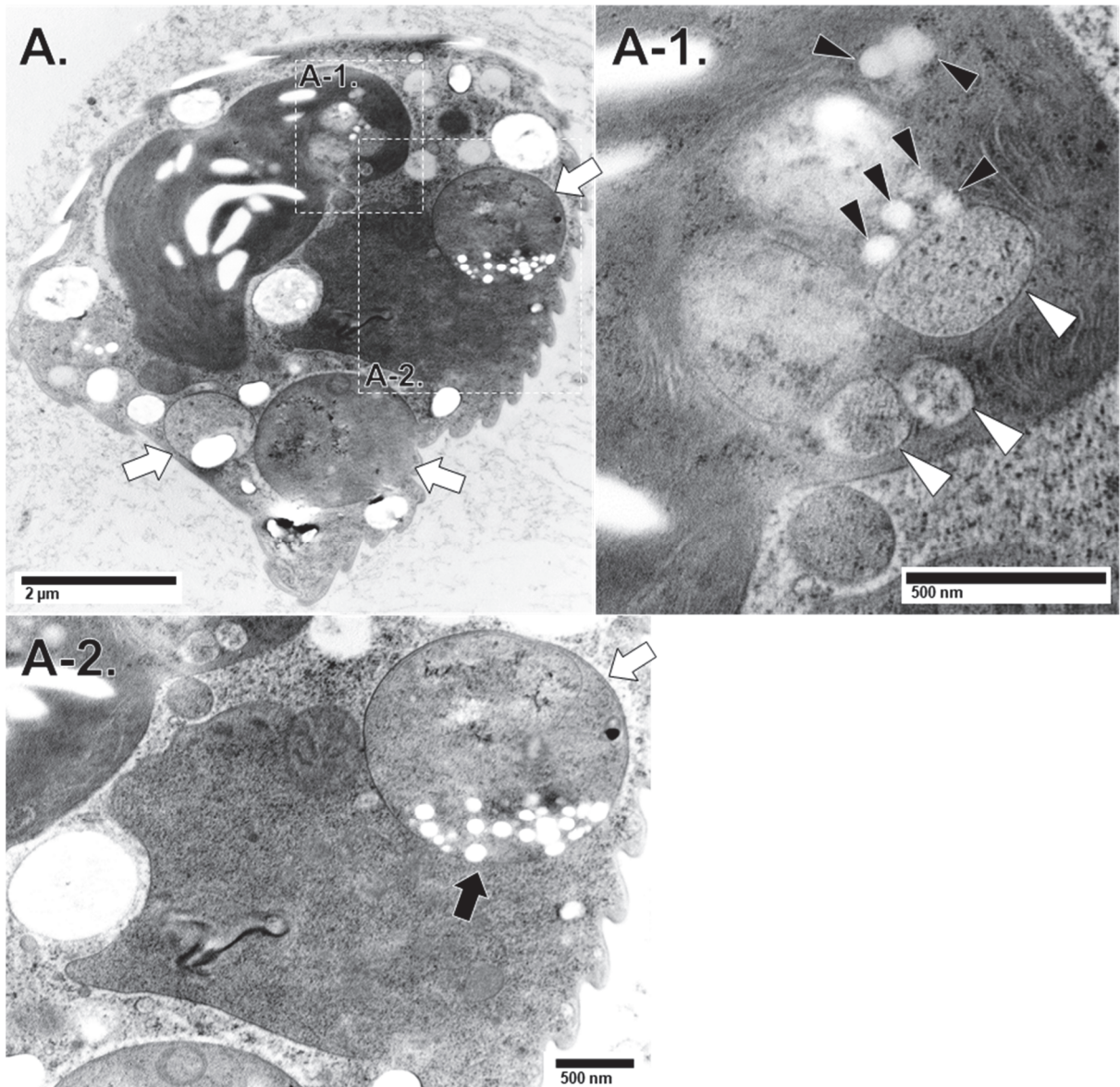


図 2-2. *Tetraselmis sp.*を与えてから 2～4 時間後(推定:*Tetraselmis sp.*捕食直後～4 時間後)の *Rapaza viridis* の TEM 画像(2)

A: TEM 観察画像。 *R. viridis* 細胞の全体像。 *R. viridis* のサイトゾルには複数個の楕円体状の包膜構造が観察された(白矢印)。**A-1:** A の拡大画像。葉緑体内に複数の大小さまざまな膜構造(白矢尻)と、包膜構造が認められず泡状に観察される液-液相分離構造(黒矢尻)が観察された。**A-2:** A の拡大画像。楕円体状の包膜構造の一部に泡状に観察される液-液相分離構造をもつものも観察された(黒矢印)。

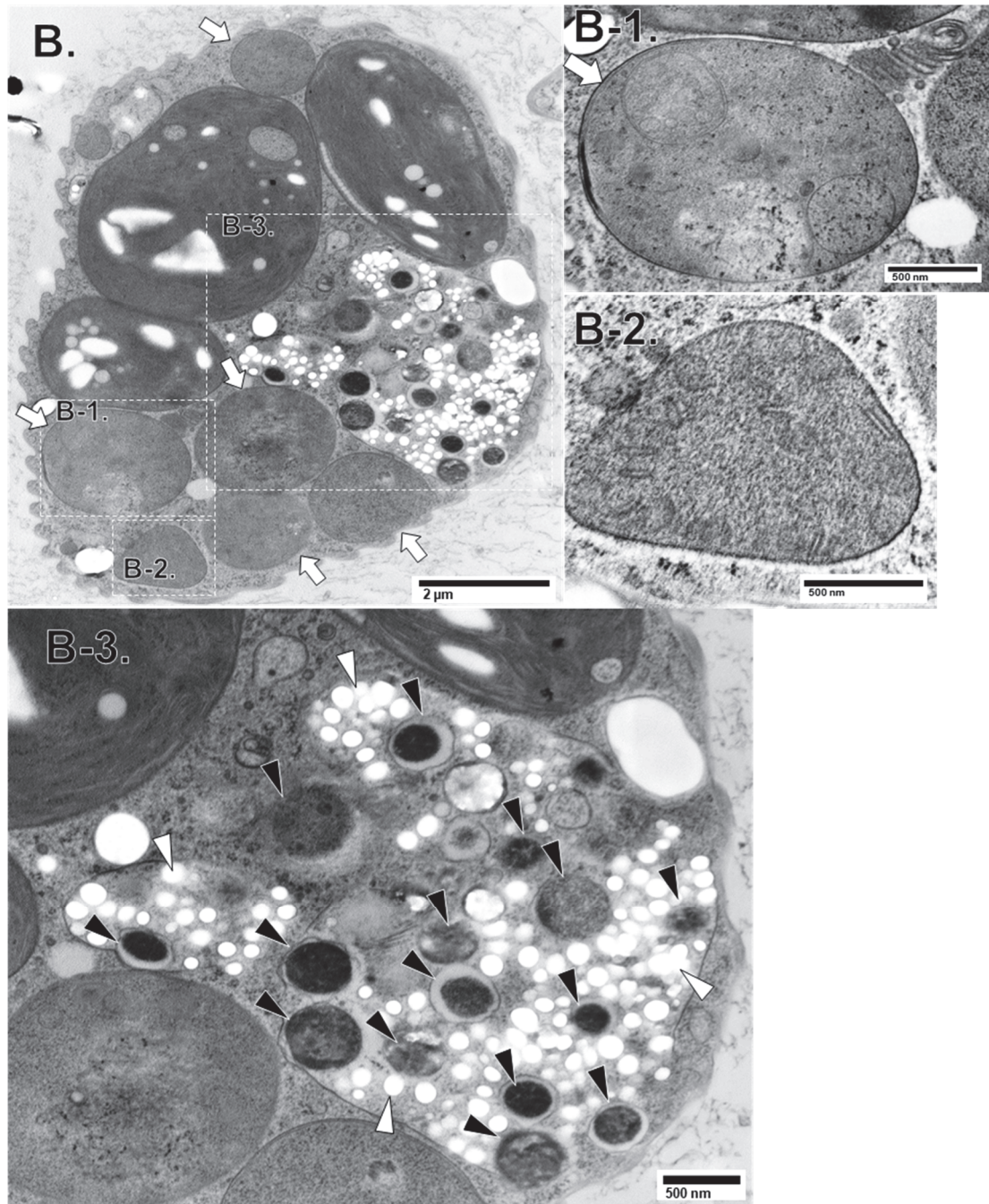


図 2-2. *Tetraselmis* sp.を与えてから 2~4 時間後(推定:*Tetraselmis* sp.捕食直後~4 時間後)の *Rapaza viridis* の TEM 画像 (3)

R. viridis のサイトゾルには複数個の楕円体状の包膜構造が観察された(白矢印)。 **B**: TEM 観察画像。*R. viridis* 細胞の全体像。 **B-1**: **B** の拡大画像。楕円体状の包膜構造。その内部にさらにいくつかの膜構造を含むものも観察された。 **B-2**: **B** の拡大画像。*R. viridis* の盤状クリステ形状のミトコンドリアが観察された。 **B-3**: **B** の拡大画像。*R. viridis* のサイトゾルには、一重包膜から成る構造も観察された。この内部には泡状に観察される液-液相分離構造(白矢尻)と、電子密度が非常に高い塊状の構造(黒矢尻)を内包する一重膜構造を複数含んでいた。

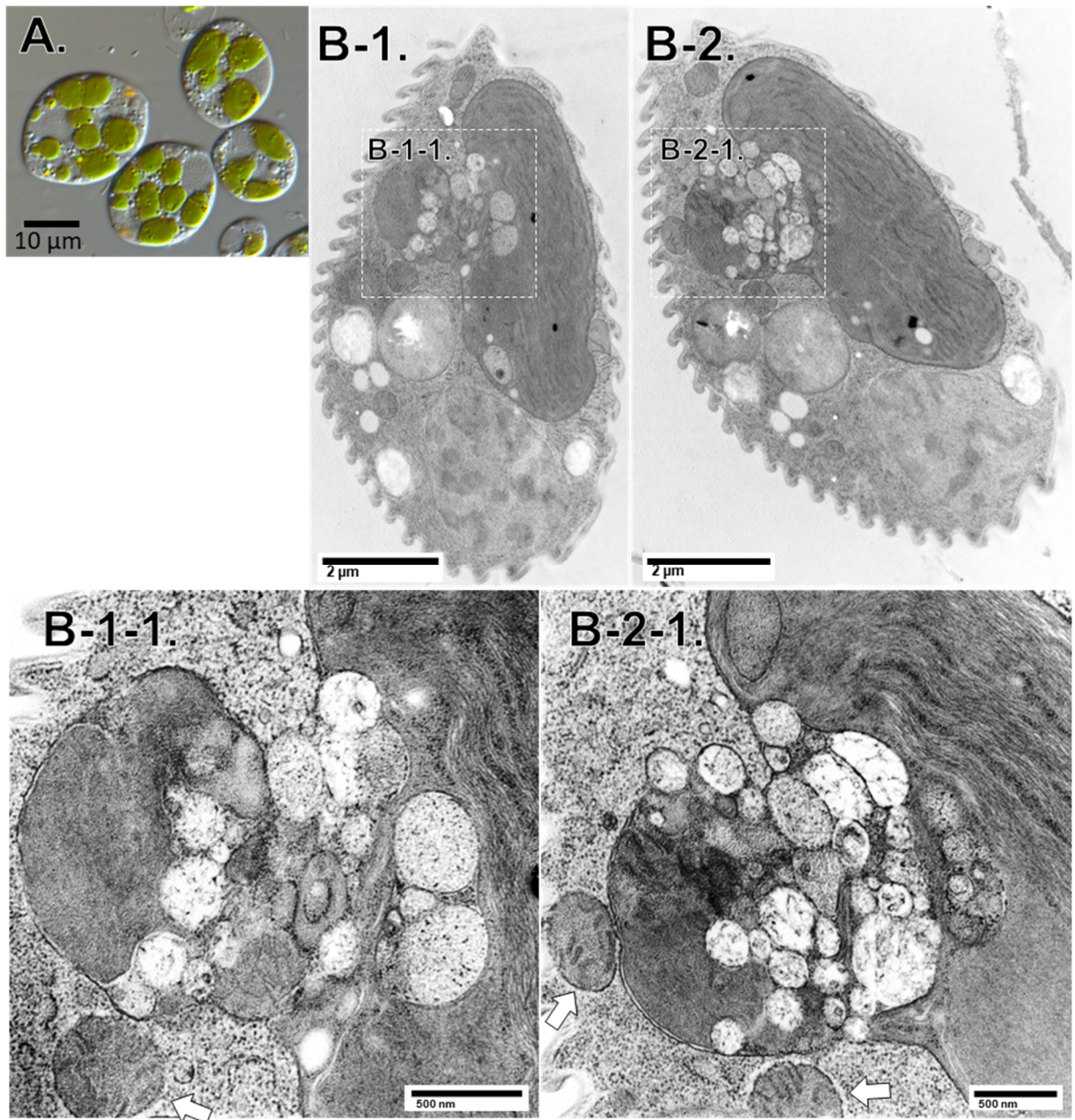
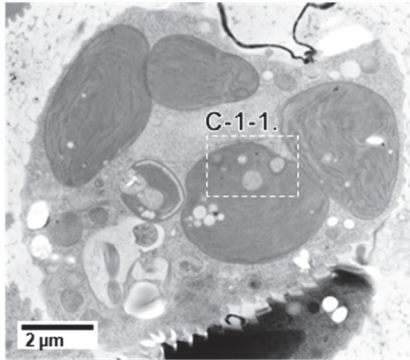


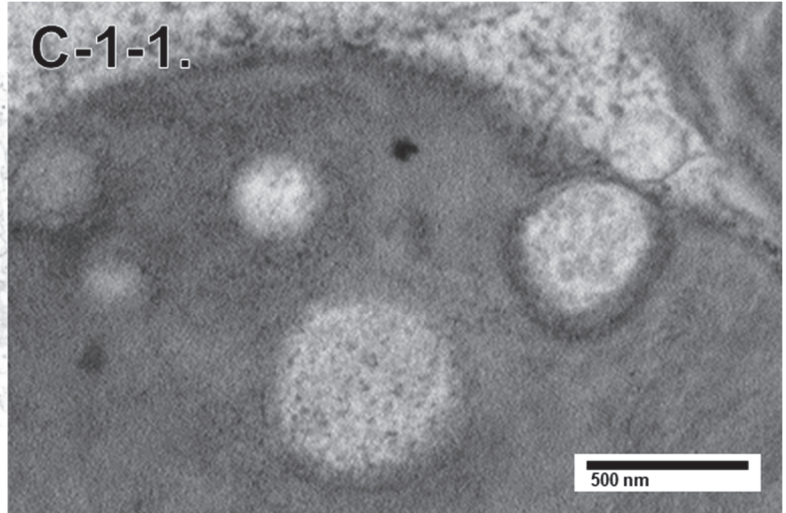
図 2-3. *Tetraselmis* sp.を与えてから 15～17 時間後(推定:*Tetraselmis* sp.捕食から 15～17 時間後)の *Rapaza viridis* の TEM 画像

A: 光学顕微鏡観察画像。*R. viridis* 細胞では, 盗葉緑体の細分化が進行している。 B, C: TEM 観察画像。*R. viridis* 細胞の全体像。 B-1-1, B-2-1:それぞれ, B-1, B-2 拡大画像。盗葉緑体外縁部に複数の大小さまざまな膜構造が観察された。近くにはミトコンドリアが観察された(白矢印)。

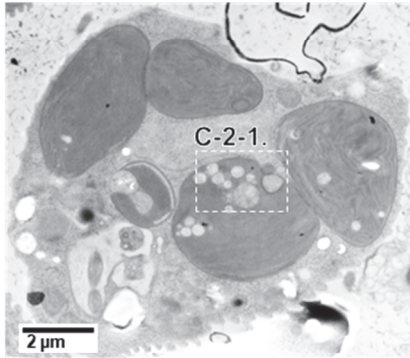
C-1.



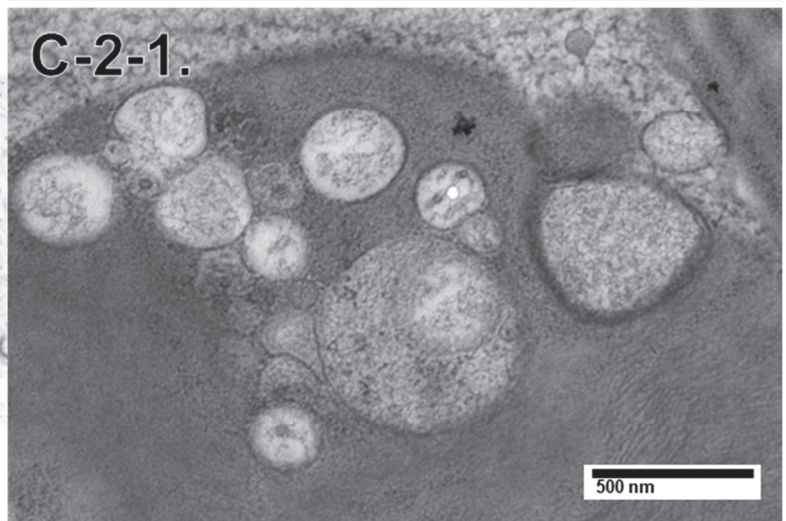
C-1-1.



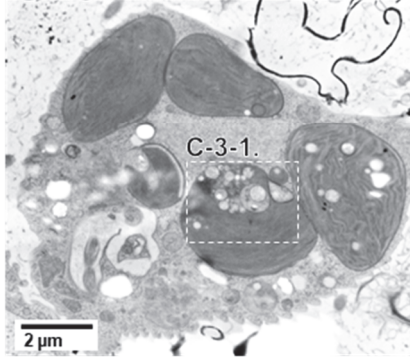
C-2.



C-2-1.



C-3.



C-3-1.

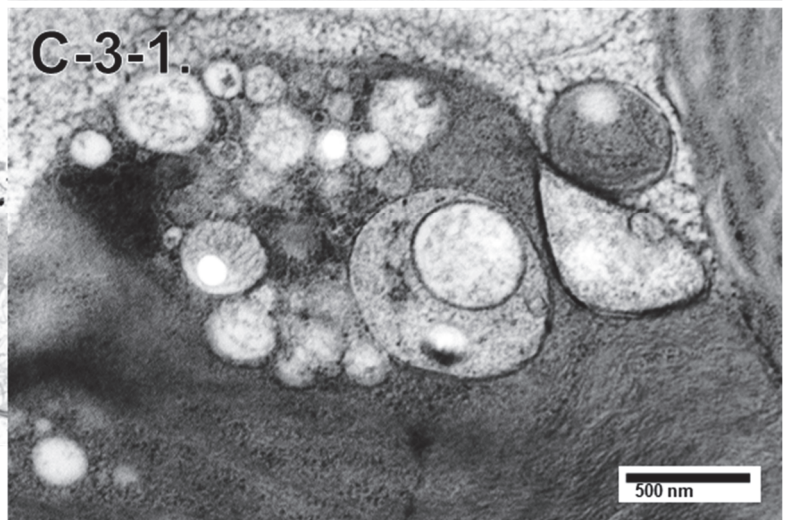


図 2-3. *Tetraselmis* sp.を与えてから 15~17 時間後(推定: *Tetraselmis* sp.捕食から 15~17 時間後)の *Rapaza viridis* の TEM 画像

C-1-1, C-2-1, C-3-1:それぞれ, C-1, C-2, C-3 の拡大画像。盗葉緑体外縁部に複数個の膜構造が密に存在する様子が観察された。

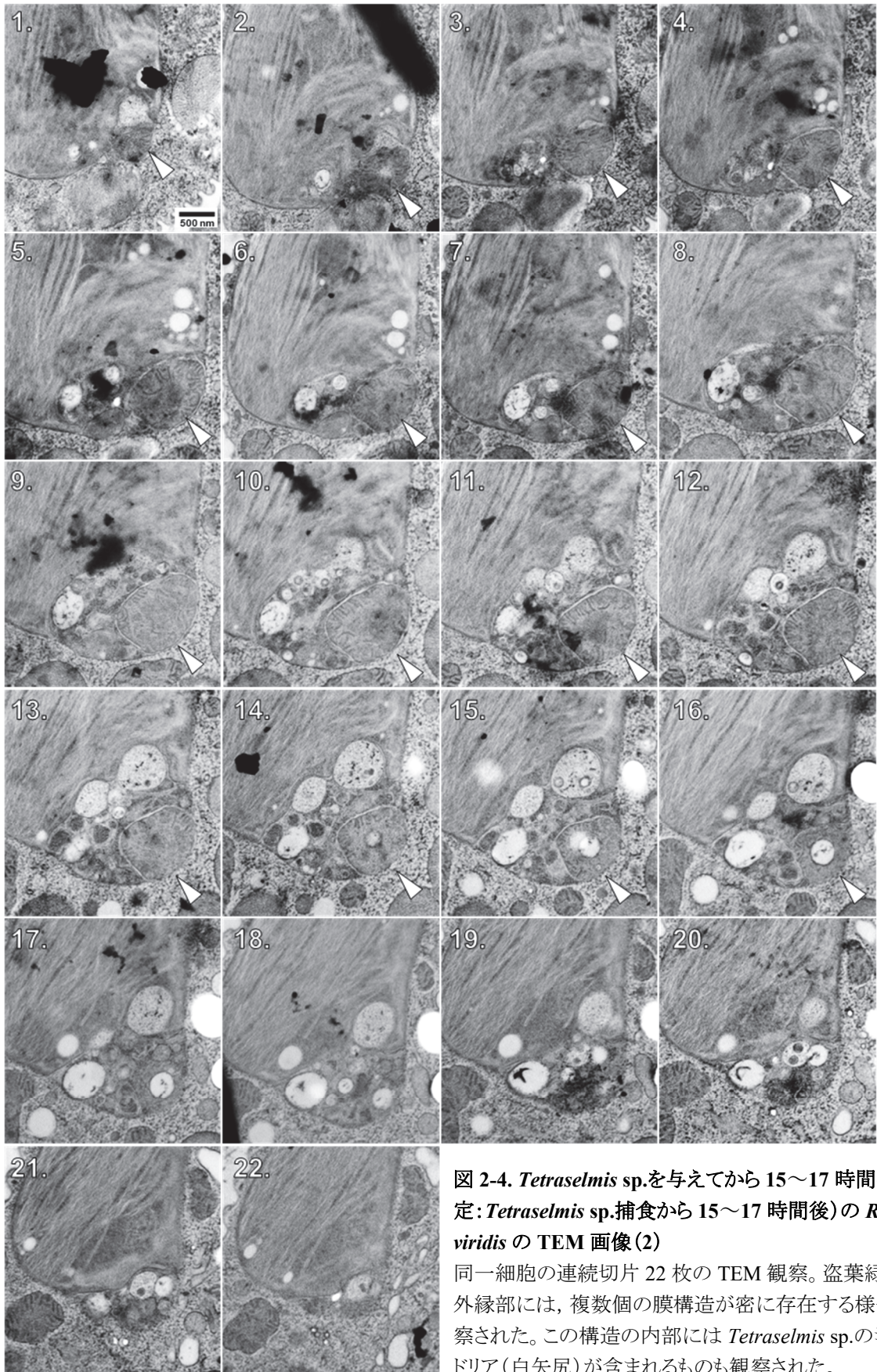


図 2-4. *Tetraselmis* sp.を与えてから 15~17 時間後 (推定: *Tetraselmis* sp.捕食から 15~17 時間後) の *Rapaza viridis* の TEM 画像 (2)

同一細胞の連続切片 22 枚の TEM 観察。盗葉緑体の外縁部には、複数個の膜構造が密に存在する様子が観察された。この構造の内部には *Tetraselmis* sp.のミトコンドリア (白矢尻) が含まれるものも観察された。

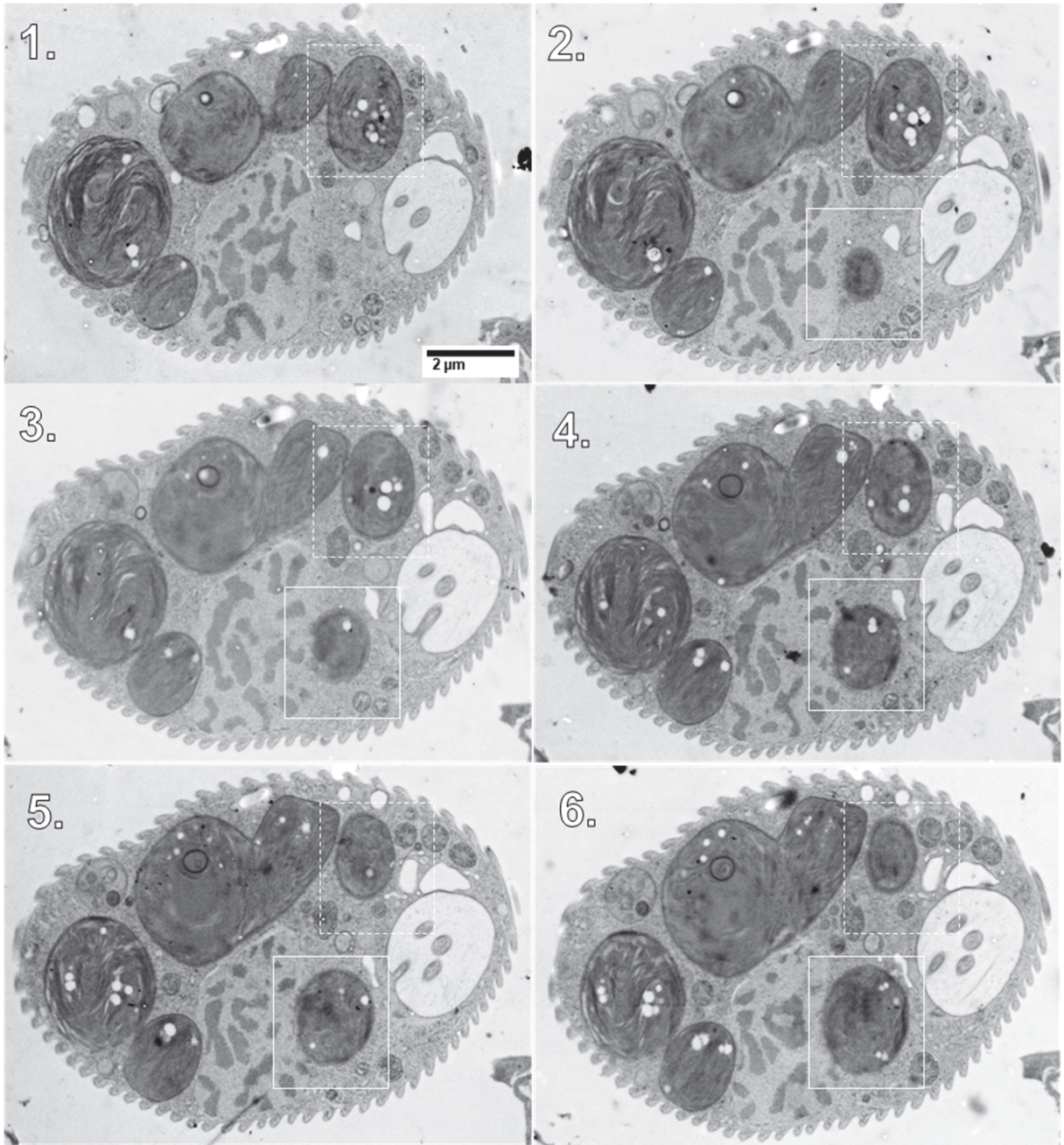


図 2-5. *Tetraselmis* sp.を与えてから 15~17 時間後(推定:*Tetraselmis* sp.捕食から 15~17 時間後)の *Rapaza viridis* の TEM 画像(3)

同一細胞の連続切片 13 枚の TEM 観察。点線と実線で囲った盗葉緑体からは, 泡状に観察される液-液相分離構造が盗葉緑体の外縁だけでなく内部にも形成されている様子が観察された。

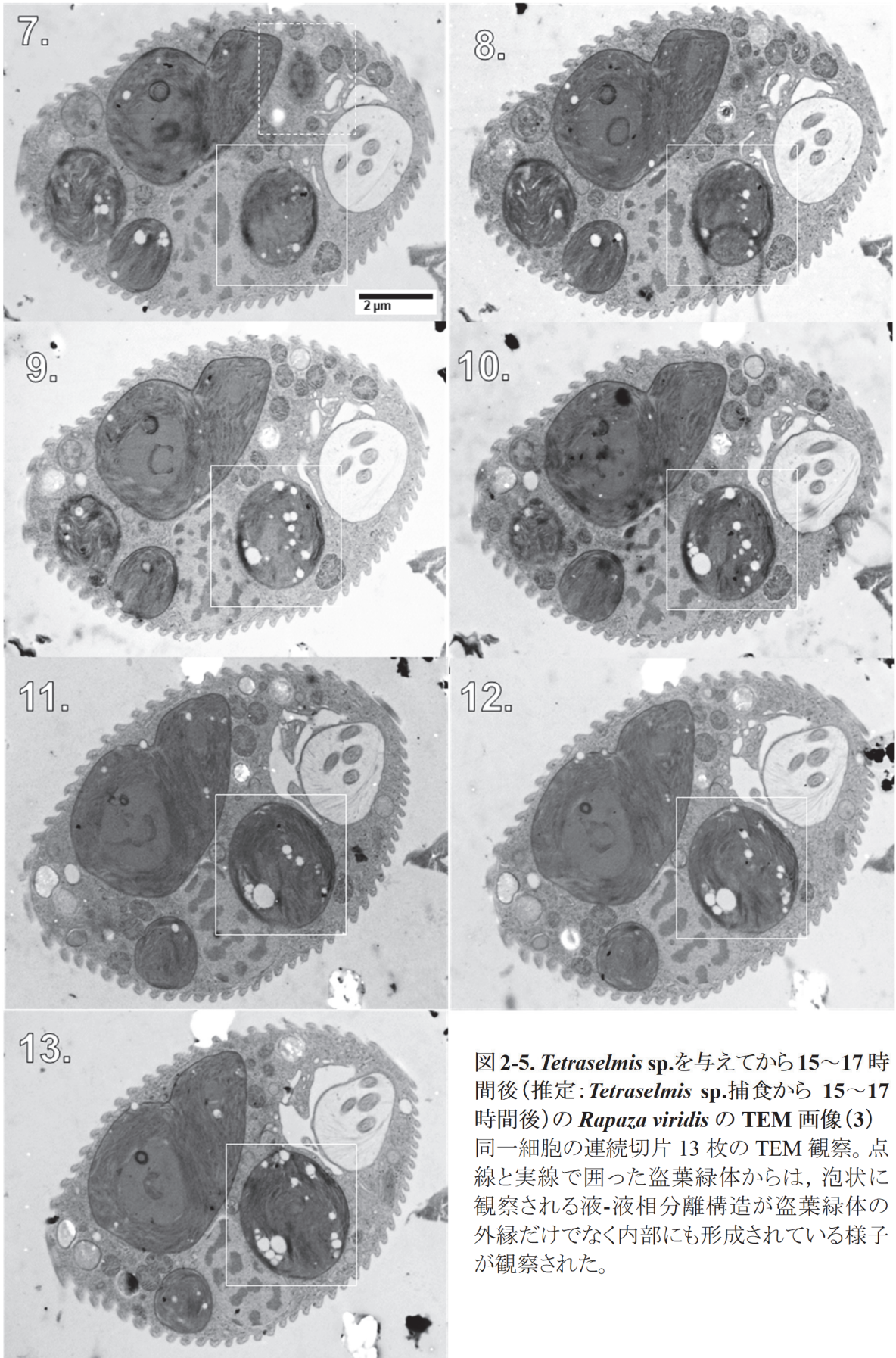


図2-5. *Tetraselmis* sp.を与えてから15~17時間後(推定:*Tetraselmis* sp.捕食から15~17時間後)の*Rapaza viridis*のTEM画像(3) 同一細胞の連続切片13枚のTEM観察。点線と実線で囲った盗葉緑体からは、泡状に観察される液-液相分離構造が盗葉緑体の外縁だけでなく内部にも形成されている様子が観察された。

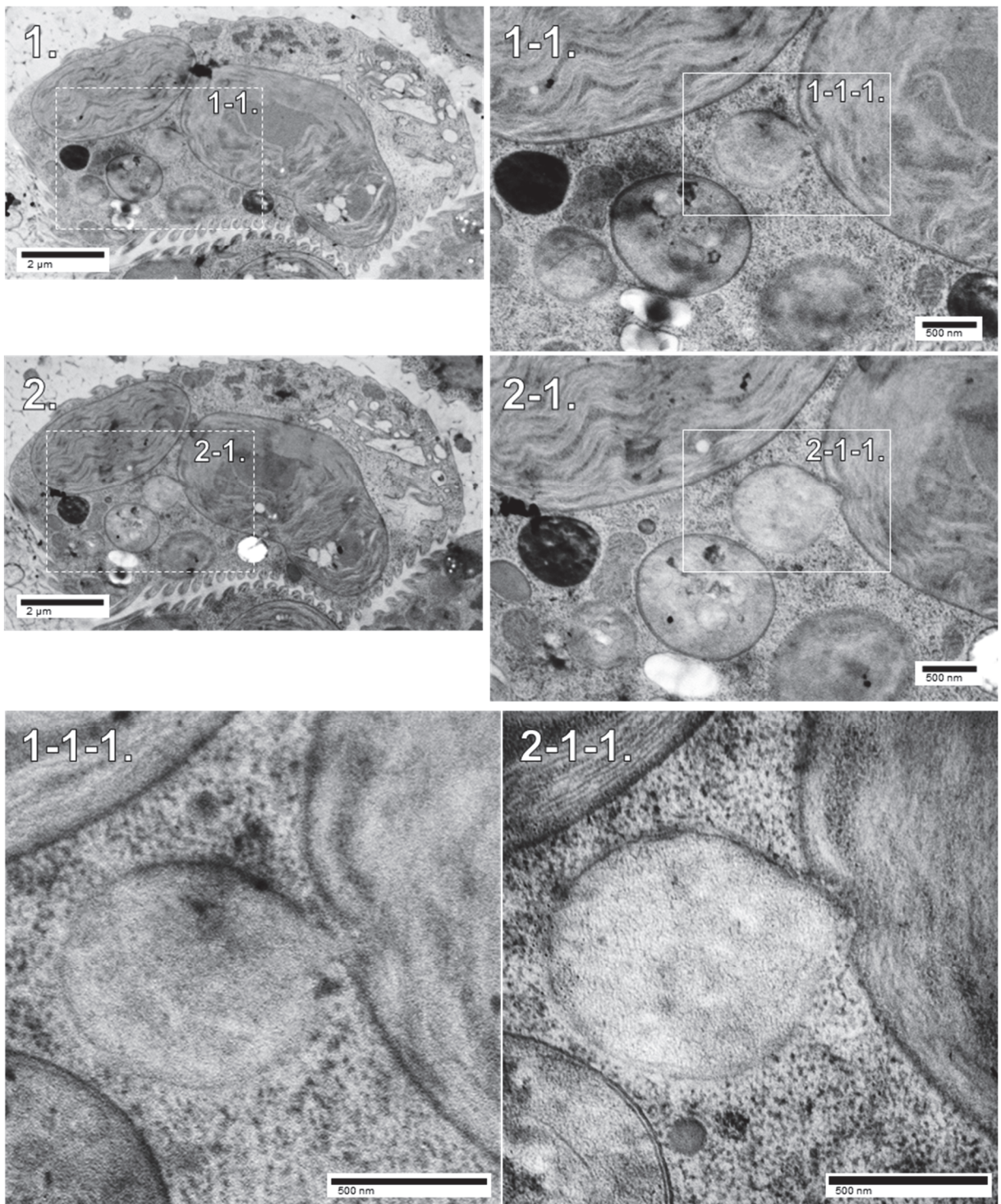


図 2-6. *Tetraselmis* sp.を与えてから 15~17 時間後 (推定:*Tetraselmis* sp.捕食から 15~17 時間後)の *Rapaza viridis* の TEM 画像 (4)

同一細胞の連続切片 5 枚の TEM 観察画像とそれぞれの拡大画像。1-1, 2-1:それぞれ 1, 2 の拡大画像。1-1-1, 2-1-1:それぞれ 1-1, 2-1 の拡大画像。*R. viridis* 細胞内には、楕円体状の包膜構造が複数個観察された。盗葉緑体と楕円体構造が接している箇所では、盗葉緑体はくぼんでおり、楕円体構造はそのくぼみに収まるように変形していた。

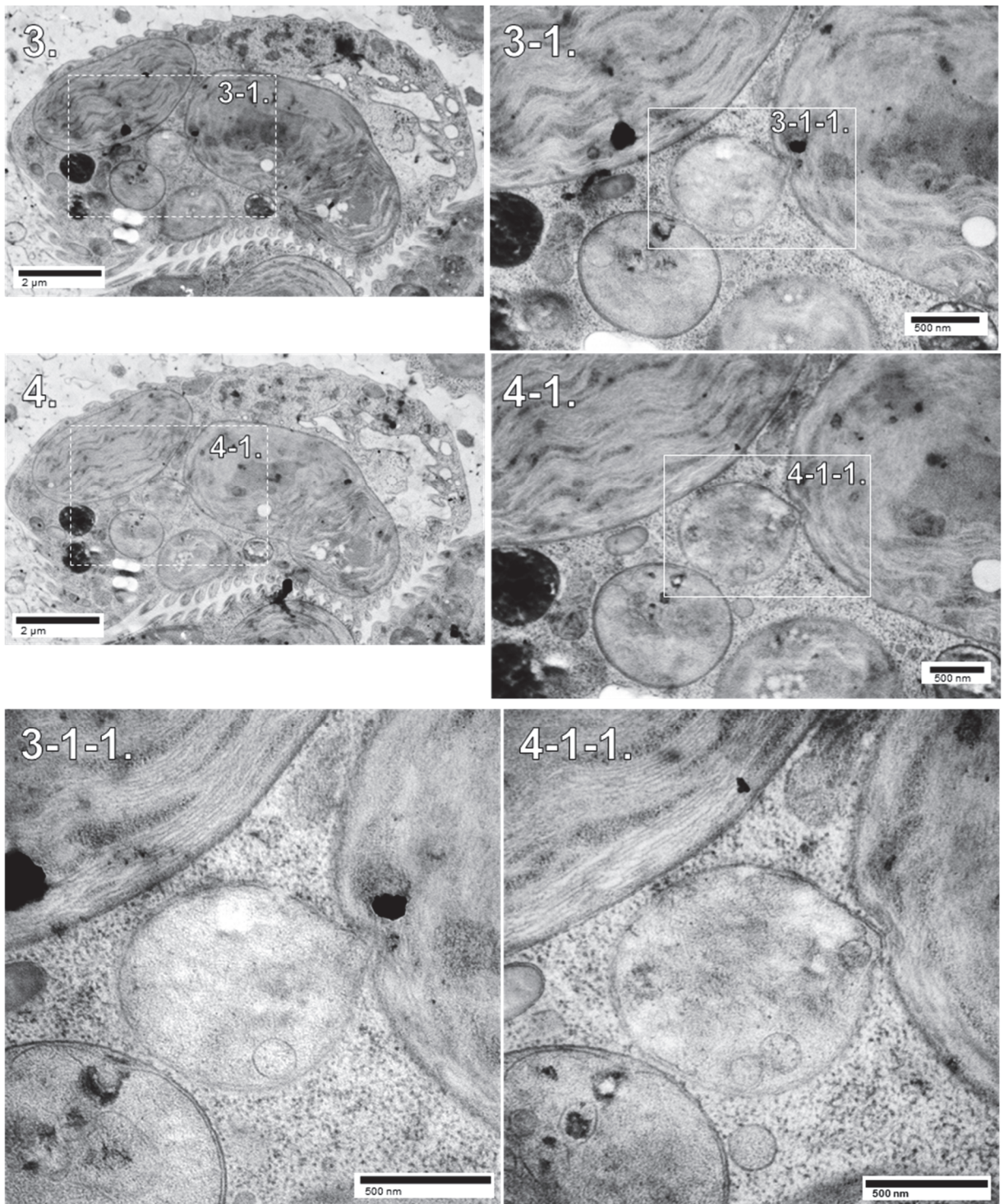


図 2-6. *Tetraselmis* sp.を与えてから 15~17 時間後 (推定:*Tetraselmis* sp.捕食から 15~17 時間後)の *Rapaza viridis* の TEM 画像 (4)

1-5: 同一細胞の連続切片 5 枚の TEM 観察画像とそれぞれの拡大画像。3-1, 4-1: それぞれ 3, 4 の拡大画像。3-1-1, 4-1-1: それぞれ 3-1, 4-1 の拡大画像。 *R. viridis* 細胞内には、楕円体状の包膜構造が複数個観察された。盗葉緑体と楕円体構造が接している箇所では、盗葉緑体はくぼんでおり、楕円体構造はそのくぼみに収まるように変形していた。

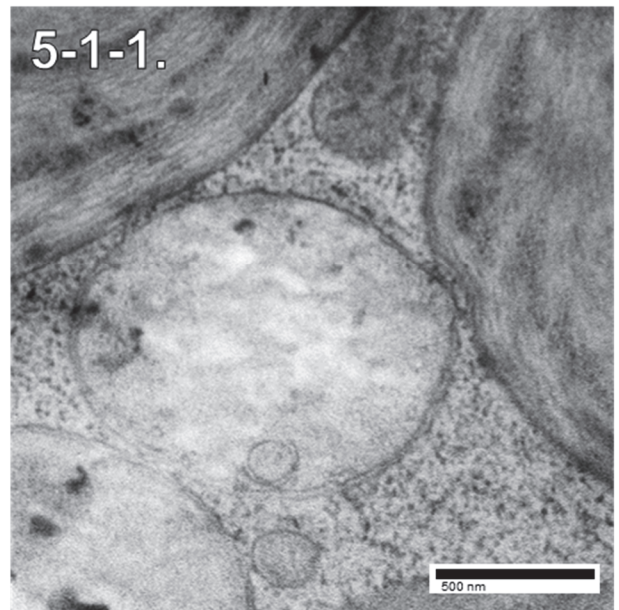
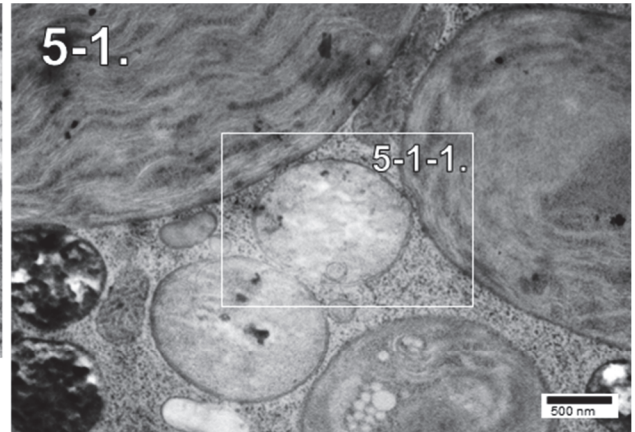
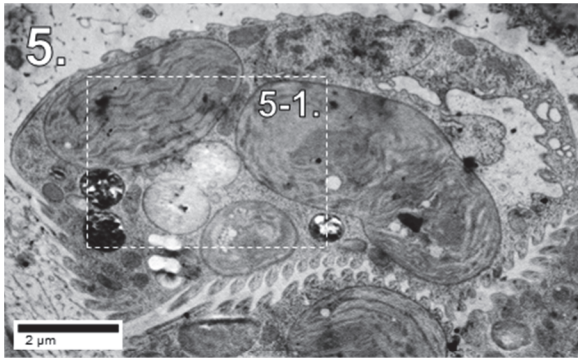


図 2-6. *Tetraselmis sp.*を与えてから 15~17 時間後(推定:*Tetraselmis sp.*捕食から 15~17 時間後)の *Rapaza viridis* の TEM 画像 (4)

1-5: 同一細胞の連続切片 5 枚の TEM 観察画像とそれぞれの拡大画像。5-1:5 の拡大画像。5-1-1:5-1 の拡大画像。*R. viridis* 細胞内には、楕円体状の包膜構造が複数個観察された。盗葉緑体と楕円体構造が接している箇所では、盗葉緑体はくぼんでおり、楕円体構造はそのくぼみに収まるように変形していた。

A.

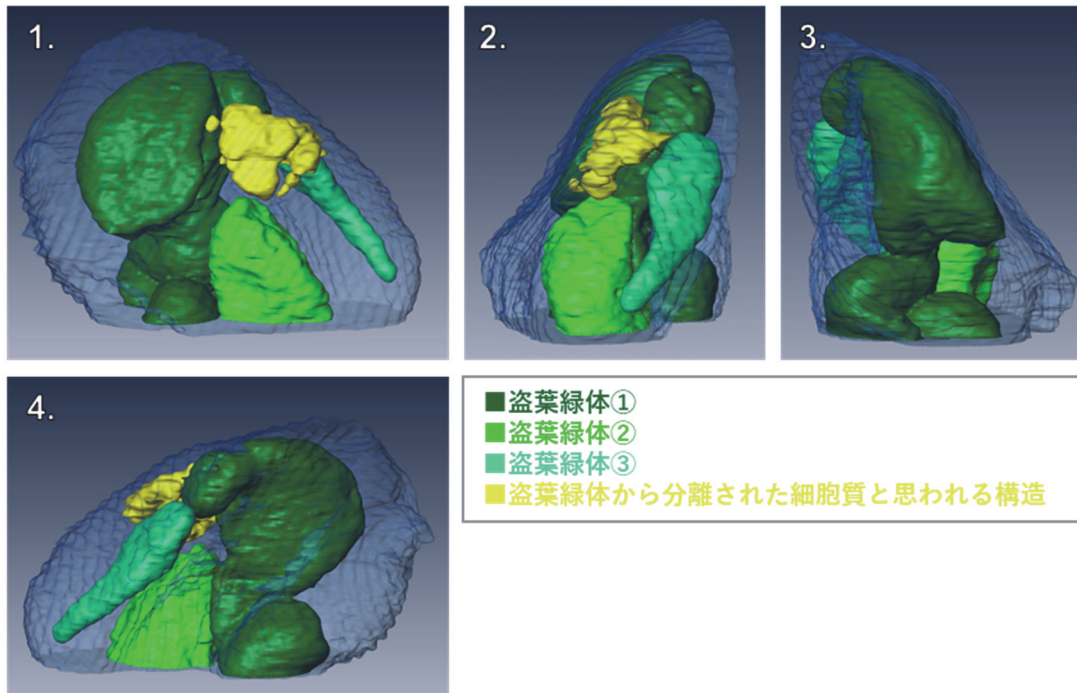


図 2-7. FIB-SEM による盗葉緑体細分化時の *Rapaza viridis* 細胞の 3D 構造
A: 88 枚の切片から作製した 3D 画像。1-4: 前後左右の観察画像。

B.

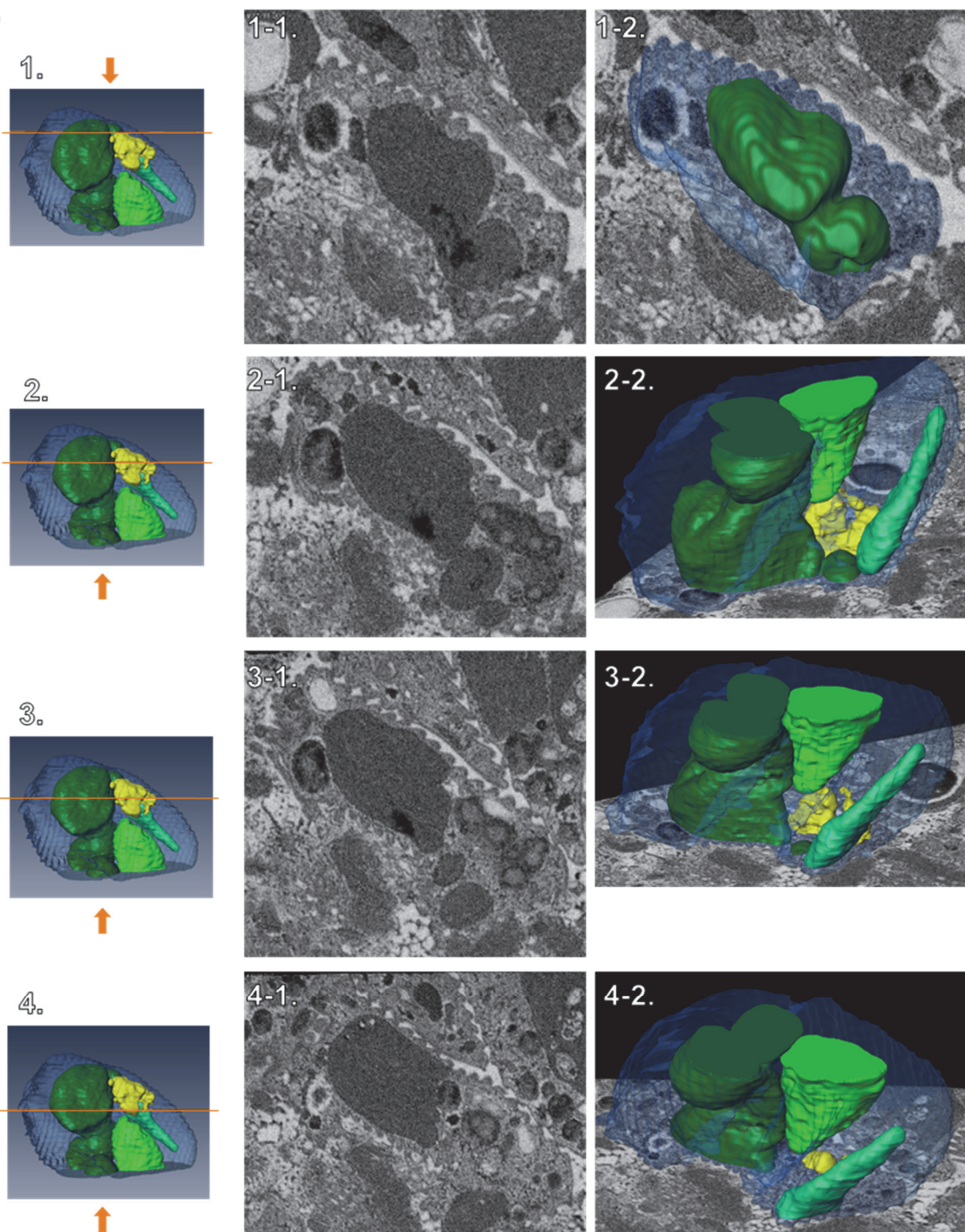


図 2-7. FIB-SEM による盗葉緑体細分化時の *Rapaza viridis* 細胞の 3D 構造
B: 3D 作製に用いた切片の SEM 画像(1-1, 2-1, 3-1, 4-1)と切片位置に対応する 3D 画像(1-2, 2-2, 3-2, 4-2)。オレンジ色の矢印は 3D 構造の観察方向を示す。

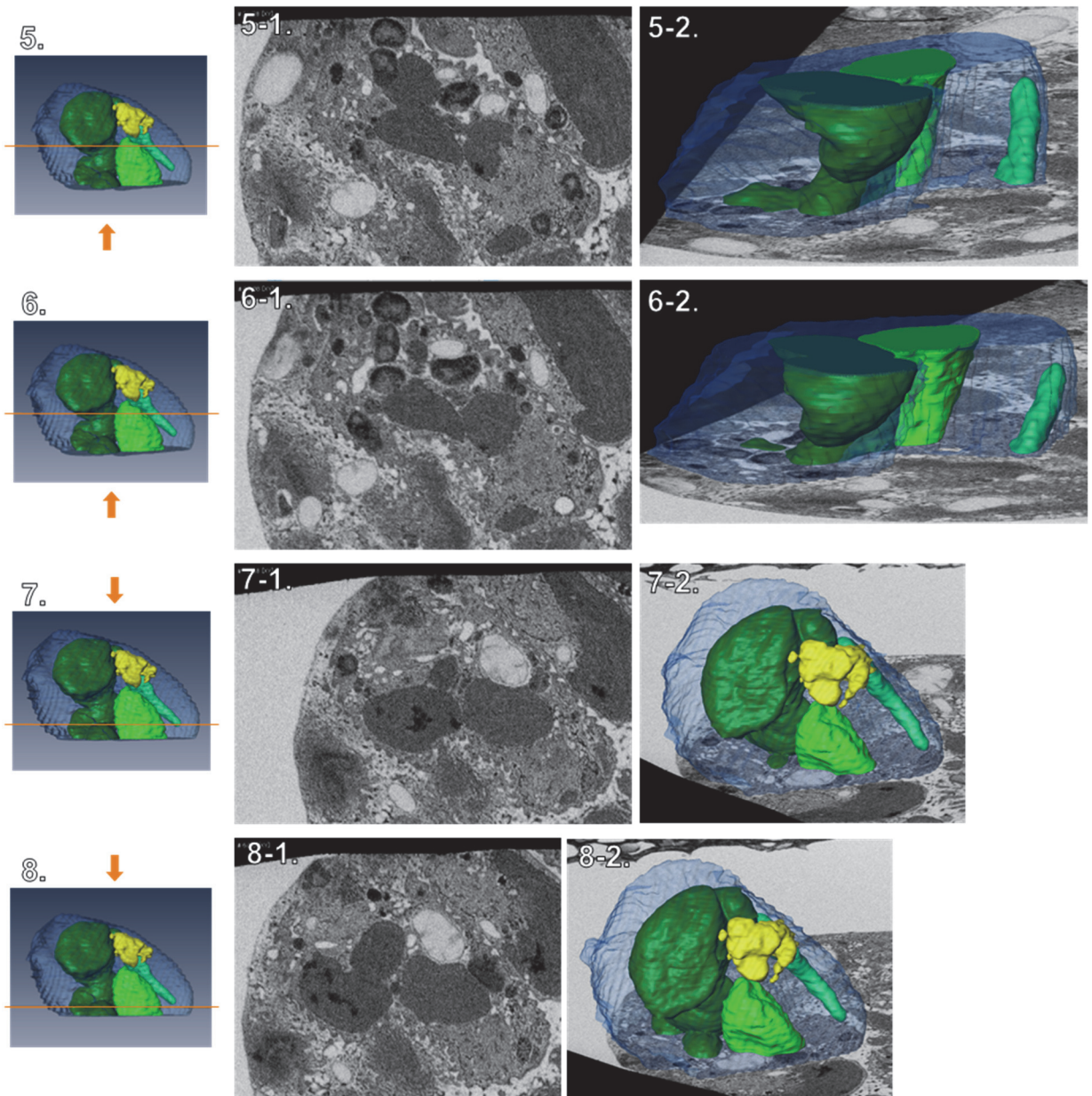


図 2-7. FIB-SEM による盗葉緑体細分化時の *Rapaza viridis* 細胞の 3D 構造
B: 3D 作製に用いた切片の SEM 画像 (1-1, 2-1, 3-1, 4-1) と切片位置に対応する 3D 画像 (1-2, 2-2, 3-2, 4-2)。オレンジ色の矢印は 3D 構造の観察方向を示す。

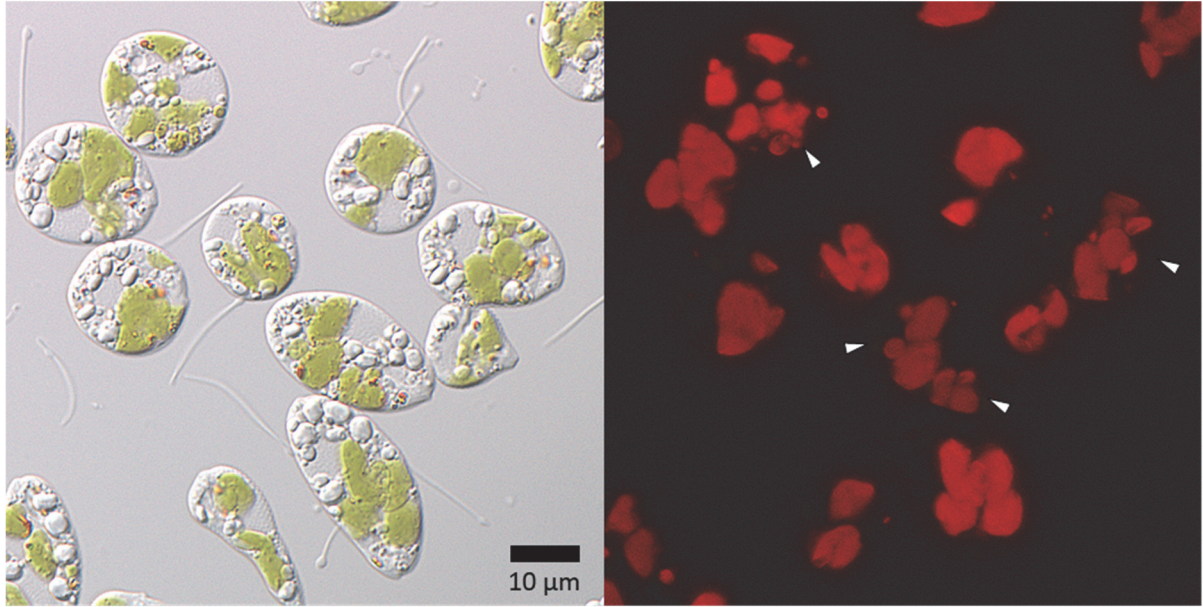


図 2-8. 盗葉緑体細分化時の *Rapaza viridis* 盗葉緑体のクロロフィル蛍光

Tetraselmis sp.の獲得から15時間が経過した *R. viridis*。クロロフィル蛍光からは盗葉緑体の形が分かりやすく観察される。大小さまざまな葉緑体が観察された。盗葉緑体が不均等に分割される様子を示すと推測される(矢印)。

第3章

水平転移した葉緑体遺伝子の発現と盗葉緑体利用に関わる機能の推定

3-1. 背景

Rapaza viridis の盗葉緑体现象においては、葉緑体のドナーである *Tetraselmis* sp. の核は *R. viridis* 細胞内に残されない。一方、*R. viridis* の核ゲノムコード遺伝子の中には、姉妹系統にある光合成性のユーグレノイド生物群 *Euglenophyceae* に認められる葉緑体輸送配列と類似する特徴的を有するタンパク質遺伝子が多数存在することが明らかになり、その中には明確な葉緑体に関連する因子も存在した。

本章の研究に先立ち、Karnkowska *et al.* (2023) に公表した定性的解析データとは独立に、定量的なトランスクリプトームデータが生成された (Kashiyama *et al.*, in prep.)。前者では *Euglenophyceae* の特徴的な輸送配列との類似性に着目した遺伝子探索がなされた。ここでは *R. viridis* と *Euglenophyceae* との姉妹系統関係が強く意識されていたが、しかし実際には前者は後者の系統内に属するわけではないので、輸送配列の特徴が *Euglenophyceae* とは少し異なる特徴を持つ *R. viridis* の遺伝子が存在すれば、それらは必然的に排除されてしまう (False negative の可能性)。そこで本章の研究では、敢えて潜在的な輸送配列の有無は考慮せず、まずアノテーションベースで葉緑体に関連する機能を持つと予測される遺伝子を選択し、これらの中から転写量の特に高かった配列に着目した。その結果、*R. viridis* には、核ゲノムコードのきわめて発現量の高い、アミノ酸配列レベルで相同性のある葉緑体関連遺伝子が多数存在していることが分かった。それらほとんどの翻訳産物の N 末端には、輸送配列として機能する可能性がある 100-250 アミノ酸残基程度の低複雑性 (low complexity) 領域 (N 末端 LC 領域) が存在しており、そのいくつかは実際に Karnkowska *et al.* (2023) で考慮した *Euglenophyceae* 型の二分割シグナルの特徴を有していた (Kashiyama *et al.*, in prep.)。

本章では、N 末端 LC 領域を有してかつ葉緑体関連の機能が予測された *R. viridis* 核ゲノムコードの高発現遺伝子について、Karnkowska *et al.* (2023)での定義とは独立に、盗葉緑体への輸送と局在発現を仮定した「盗葉緑体遺伝子候補」とする。そしてこの葉緑体関連遺伝子のうち、本章では特に、トリオースリン酸／リン酸輸送体 (triose-phosphate/phosphate translocator; TPT)に相同性の高い4つの遺伝子 *RvTPT1-4* (*Rapaza viridis* TPT-like 1~4 genes)と、リブローズビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ (RuBisCO) の小サブユニット (RuBisCO small subunit; RbcS) に相同性の高い遺伝子 *RvRbcS* (*Rapaza viridis* RbcS-like gene)に着目し、RNA 干渉 (RNAi) によるノックダウン実験と、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集株を用いた実験によって、これら遺伝子の機能を検証した。

3-2. *Rapaza viridis* の TPT 様遺伝子群 (*RvTPT1-4*) の機能推定

3-2-1. 背景

トリオースリン酸／リン酸輸送体 (triose-phosphate/phosphate translocator; TPT) は、葉緑体包膜に局在してトリオースリン酸と無機リン酸イオンを交換輸送するアンチポーターとして知られている (Lee *et al.* 2017)。炭酸固定に働くカルビン・ベンソン回路では、光合成産物としてのトリオースリン酸が葉緑体ストロマで生成される。植物では、この生成されたトリオースリン酸のサイトゾルへの輸送には、葉緑体包膜に局在する複数の TPT が機能する (Flugge *et al.* 1991) (図 1-1)。光独立栄養性の生物にとって二酸化炭素の固定による炭素源の獲得は必須であるため、TPT の機能は決定的に重要である。

機能的な盗葉緑体をもつ *Rapaza viridis* においても、光独立栄養性の生物と同様に葉緑体からの光

合成産物の取り出しが必要であると推測された。実際に盗葉緑体から *R. viridis* サイトゾルへの光合成産物の輸送がなされていることが立証され(丸山修士論文 2018), *R. viridis* においても TPT が存在して機能している可能性が示唆された。上述の定量的トランスクリプトームデータ(Kashiyama *et al.*, in prep.)から予想された *R. viridis* 核ゲノムコードの盗葉緑体遺伝子候補の中から, TPT に相同性が認められた 6 種類の遺伝子(RvTPTs)について機能検証をおこなった。ここでは, 発現量が高く主要な RvTPTs と考えられる RvTPT1, RvTPT2, RvTPT3, および RvTPT4 の 4 遺伝子に着目し, RNAi による RvTPT1-4 の全遺伝子同時ノックダウン細胞(RvTPTs-kd 細胞)を作出した。このノックダウン細胞の培養観察実験や, 蓄積多糖顆粒の定量, および光合成活性の測定をおこない, これら TPT 様遺伝子の機能の検証を試みた。

3-2-2. 実験方法

3-2-2-1. RNAi による RvTPTs ノックダウン実験と培養

RNAi によるノックダウン実験では, RvTPT1, RvTPT2, RvTPT3, および RvTPT4 それぞれの部分配列の dsRNA を合成し, 合成した全ての dsRNA を一度に細胞内にエレクトロポレーションにより導入した。この実験は, 従来, *Euglena gracilis* の研究のために設計された方法(Iseki *et al.* 2002; Nakazawa *et al.* 2015)を改変したものである。まず, 上記の各 TPT 遺伝子それぞれの cDNA から, PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を用いて, プライマー(T7_RvTPT1_60Fw および T7_RvTPT1_506Rv, T7_RvTPT2_349Fw および T7_RvTPT2_944Rv, T7_RvTPT3_119Fw および T7_RvTPT3_621 Rv, T7_RvTPT4_479Fw および T7_RvTPT4_1024Rv; 以下の表 3-1 に示す)の 5'末端に T7 RNA ポリメラーゼプロモーター配列を

付加した PCR 増幅をおこなった。PCR 産物は Wizard SV Minicolumns(プロメガ)を用いて精製した。この PCR 産物を鋳型として、MEGAscript RNAi キット(Thermo Fisher Scientific)を用いた転写反応をおこない、部分的な各 *TPT* 遺伝子配列を含む二本鎖 RNA(dsRNA)を合成・精製した。*Rapaza viridis* 細胞内への dsRNA の導入のためのエレクトロポレーション実験には、*Tetraselmis sp.*を摂取させてから 8 日目の *R. viridis* 野生株を使用した。遠心分離により 8×10^6 細胞を回収し、エレクトロポレーションバッファーで細胞を 3 回洗浄した。その後、400 μL のエレクトロポレーションバッファーに細胞を再懸濁し、dsRNA 水溶液を添加した後、氷水で容器を冷却して細胞の運動を鎮めた。全量をキュベット電極へ移し、直ちに電圧を印加して(エレクトロポレーション)dsRNA を細胞内に導入させた。エレクトロポレーション条件を以下の表 3-2 にまとめる。また、dsRNA をエレクトロポレーションバッファーに添加しない条件で同様の操作をおこなうことで作出された細胞を、ブランク細胞(エレクトロポレーションのストレスに晒された野生株)とした。1 回目のエレクトロポレーション実験後、速やかに新鮮な培地に細胞を懸濁させ、一晩暗所で培養したのち、全ての細胞を再び遠心分離により回収し、2 回目のエレクトロポレーション法による dsRNA の導入実験をおこない(これを「ノックダウン実験 0 日後」とした)、再び新鮮な培地に懸濁させて一晩暗所で培養した。その翌日に、全ての細胞を再び遠心分離により回収し、新しい培地に懸濁させると同時に、*R. viridis* の細胞数の 3 倍量の *Tetraselmis sp.*細胞を懸濁させて摂食させた(ノックダウン実験 1 日後)。なお、*R. viridis* は *Tetraselmis sp.*を与えた直後から捕食を開始するため、この日を「盗葉緑体獲得 0 日後」とした。その後は、静置培養に替えて振とう培養をおこなった(振とう:75 rpm)。培養実験には IMK 培地を用い、温度 20°C、明暗周期(明期 14 時間:暗期 10 時間)、光強度は約 100-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で培養し

た。また、細胞密度の計測には粒子計数分析装置(CDA-1000, Sysmex)を用いた。

表 3-1 dsRNA 合成に使用したプライマー

T7_RvTPT1	T7_RvTPT1_60Fw CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAAAAGCCAAAGGATACCAAAG T7_RvTPT1_506Rv CTAATACGACTCACTATAGGGAGACCTCCAATTACGGGGATAAGG
T7_RvTPT2	T7_RvTPT2_349Fw CTAATACGACTCACTATAGGGAGAAACCAACAACCACAAGCAGGAG T7_RvTPT2_944Rv CTAATACGACTCACTATAGGGAGACCAAAGCAAAGACGGAAGAGG
T7_RvTPT3	T7_RvTPT3_119Fw CTAATACGACTCACTATAGGGAGACTCTCCGCTCCTCTGAAACTCT T7_RvTPT3_621Rv CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTCCTCTTTGGTCGTCTTTGGT
T7_RvTPT4	T7_RvTPT4_479Fw CTAATACGACTCACTATAGGGAGATTTCTTTCTGGCGTCTTCTACCA T7_RvTPT4_1024Rv CTAATACGACTCACTATAGGGAGATTTCTTTCTGGCGTCTTCTACCA

表 3-2 エレクトロポレーション条件

バッファー	500 mM Trehalose in sterilize seawater
細胞密度	8×10^6 細胞 / 400 μ L バッファー
dsRNA	RvTPT1-4 をそれぞれ 30 μ g (dsRNA 増量時: RvTPT2 のみ 60 μ g)/1 回の導入
電圧	(50 μ F・450 kV) \times 1回の導入

3-2-2-2. qPCR による RvTPTs の発現量の定量

RvTPTs ノックダウン細胞とブランク細胞をそれぞれ遠心分離によりペレット化して回収し、ISOGEN II (NIPPON GENE)を用いて total RNA を抽出し、そこから PrimeScript RT Reagent Kit (TaKaRa) を用いて逆転写することにより cDNA を取得した。各 RvTPTs および α -tubulin 遺伝子の転写量を、表 3-3 に示したプライマーと KAPA SYBR Fast Universal (NIPPON Genetics)を用いてリアルタイム PCR システム (LightCycler 96 system, NIPPON Genetics) により分析した。

表 3-3 qPCR に使用したプライマー

α -tubulin	q-EgRvAtub_1221Fw GTACGTGGGAGAGGGTATGG q-EgRvAtub_1351Rv TTCCTCGACATCCTCCTCA
RvTPT1	q2-RvTPT1_775Fw GGTACATTTGTGACTGAAGACGA q2-RvTPT1_873Rv AAGGTAGAACAACAGTCCAGCAG
RvTPT2	q3-RvTPT2_1209Fw TGGAGACTGATGGACTAAAGGAG q3-RvTPT2_1299Rv AGAGGAAGGGAGAAAATGAAGG
RvTPT3	q3-RvTPT3_1225Fw GTGATTGTTGGGTGTGGGTCTT q3-RvTPT3_1333Rv GGTTATCCATCGATGATGGAGTACAGG
RvTPT4	q3-RvTPT4_1109Fw GCTGCTAAGGGACAGGAGAAC q3-RvTPT4_1212Rv CAGGCAAGAGAAAGAGTCAAGG
RvTPT5	q-RvTPT5_60Fw ACAGTGGCAGAAGAGGACAGA q-RvTPT5_152Rv AGCCAATACCAGCAACAATCAC
RvTPT6	q-RvTPT6_126Fw TCAGCATGTAGCCTCTCTAATTGT q-RvTPT6_241Rv TGTGATGTAGGGAAGTGTGTGTT

3-2-2-3. RvTPTs ノックダウン細胞の蓄積多糖顆粒の定量

RvTPTs 4 遺伝子同時ノックダウンをおこなった細胞(ノックダウン効率の低い RvTPT2 についてのみ dsRNA を 2 倍量の 30 μg に増やした実験)について、フェノール硫酸法を用いた蓄積多糖顆粒の定量実験をおこなった。盗葉緑体獲得 4~5 日後の RvTPTs ノックダウン細胞とブランク細胞をそれぞれ遠心分離してペレット化して回収し、液体窒素で瞬間凍結させた(-80°Cで保管)。凍結ペレットにアセトンを 1 mL 加えて解凍し、ボルテックス攪拌と超音波破碎を各 1 分ずつおこなった。遠心分離して上清アセトンを破棄後、再びアセトンを 1 mL 加えて、もう一度ボルテックス攪拌および超音波破碎をおこなった。再び遠心分離により上清を破棄して沈殿物のみを回収し、1% SDS 水溶液 1 mL に懸濁させ、1 分間ボルテックス攪拌をした後、沸騰水中で 30 分間加熱した。その後、遠心分離により回収した沈殿物を超純水(MilliQ 水)で洗浄したのち、1N NaOH 200 μL に懸濁・溶解させた。これに 5% フェノール溶液 200 μL を混合した後、濃硫酸 1 mL を加えて転倒混和でよく混合し、30°Cで 30 分間 インキュベーションした後、分光光度計を用いて溶液の 480 nm の 吸光度を測定した。

3-2-2-4. RvTPTs ノックダウン細胞の光合成活性測定

光合成活性の測定には、RvTPTs 4 遺伝子同時ノックダウンをおこなった細胞(ノックダウン効率の低い RvTPT2 についてのみ dsRNA を 2 倍量の 30 μg に増やした実験)を用いた。盗葉緑体獲得 4~5 日後の細胞について、 2×10^6 細胞を遠心分離で回収し、新鮮な IMK 培地 2 mL に再懸濁させたサンプルに対し、酸素発生の測定をおこなった。また、測定の際には測定サンプル中の二酸化炭素濃度不足を懸

念し、重炭酸ナトリウムを懸濁液に添加した(1M 重炭酸ナトリウム水溶液を 10 μ L)。酸素発生の測定には Hansatech 社の温度制御付液相酸素測定装置(OXYT-1)を使用した。盗葉緑体あたりの光合成活性の算出について、*R. viridis* のクロロフィル量は細胞増殖の際にも増加せず、大きな減少もしないことから(丸山修士論文 2018)、実験カルチャー内の盗葉緑体量は変動しないと考えられるため、獲得時からの細胞増殖率をもとに、実験カルチャー内の盗葉緑体量あたりの光合成活性算出し、盗葉緑体あたりの光合成活性とした。

3-2-3. 結果

3-2-3-1. *RvTPTs* の発現量

ブランク細胞(野生株)における *RvTPTs* の転写量は、*RvTPT1* が最も高く、次に *RvTPT2* と *RvTPT4* が同程度、*RvTPT3* が最も低かった。*RvTPTs* ノックダウン(*RvTPTs-kd*)細胞作出実験において、4種類の *RvTPTs* の部分配列を有する dsRNA を作製し、それぞれ同量(30 ng)の dsRNA を細胞内に導入させた場合、*RvTPT2* の転写量の低下率(ノックダウン効率)が最も低く、ノックダウン細胞での *RvTPT2* 発現量はブランク細胞の 48~94%であった(図 3-2 A)。さらに、*RvTPT2* のみ dsRNA を倍量にして実験をおこなった場合も、*RvTPT2-kd* の効率が最も低く *RvTPT2* 発現量はブランク細胞の 64~84%であった(図 3-2 B)。

3-2-3-2. *RvTPTs* ノックダウン細胞の多糖顆粒の蓄積

明暗周期のついた条件で培養をおこなった結果、ブランク細胞(野生株)では、明期において *R. viridis* 細胞のサイトゾルに多糖顆粒が蓄積し、暗期に減少する様子が観察された。一方、*RvTPTs-kd* 細胞の同様な明暗周期培養では、多糖顆粒の蓄積は認められるものの、ブランク細胞と比較してその絶対量は明確に少なかった(図 3-3 A)。細胞あたりの多糖顆粒蓄積量(全糖量換算)の変動は、顕微鏡下での細胞形態の変化と整合的に、ブランク細胞では明暗周期に対応して明確に変動したのに対し、*RvTPTs-kd* 細胞ではその変動は相対的に小さかった(図 3-3 B)。

3-2-3-3. *RvTPTs* ノックダウン細胞の細胞増殖

Tetraselmis sp. 摂取後の *R. viridis* 細胞の増殖率について、ブランク細胞(野生株)では摂取してから 9 日後には、摂取時の細胞密度の 12 倍に増殖したのに対し、*RvTPTs-kd* 細胞では 10 倍に細胞増殖した(図 3-4)。一方、*Tetraselmis sp.* の摂取から 4 日後までの細胞増殖率は、ブランク細胞と *RvTPTs-kd* 細胞の間で有意な差は認められなかった。

3-2-3-4. *RvTPTs* ノックダウン細胞の光合成活性

RvTPTs のノックダウン実験から 9, 10, 12 日後(盗葉緑体獲得から 8, 9, 11 日後)の全ての測定において、*RvTPTs-kd* 細胞における細胞あたりの光合成による酸素発生速度および盗葉緑体あたりの光合成による酸素発生速度は、ブランク細胞(野生株)よりも有意に低い値となった。また、ノックダウン実験か

ら9日後よりも10, 12日後において, ブランク細胞と *RvTPTs-kd* 細胞の酸素発生速度の差が拡大する傾向が認められた(図 3-5)。

3-2-3-5. *RvTPTs* ノックダウン細胞の長期培養

ノックダウン実験から10日後には, ブランク細胞(野生株)では多糖顆粒を多く蓄積するとともに, 発達した液胞が観察された(図 3-6)。*Rapaza viridis* は通常, 培養期間が長くなり死滅期に近づくにつれて, 細胞内に液胞の蓄積を発達させていく(丸山 2018)。一方, *RvTPTs-kd* 細胞の観察では, 多糖顆粒の蓄積は比較的少ないものの, 細胞内に液胞は観察されなかった。また, ノックダウン実験から20日後のブランク細胞では, 培養液中の細胞の3分の1ほどが多糖顆粒を蓄積した状態の死細胞になっており, 生残していた細胞には大きな液胞の発達と多糖顆粒の蓄積が観察された。一方, *RvTPTs-kd* 細胞では, 死細胞はほとんど観察されず, 液胞発達の程度は10日後のブランク細胞と同程度であり, また, この時点でも多糖顆粒の蓄積はほとんど観察されなかった。

3-2-4. 考察

3-2-4-1. *RvTPTs* ノックダウン効率

RvTPT1-4 の中で *RvTPT2* はノックダウンの効率が低く, RNAi による発現抑制が効きにくいことが考えられた。現在, 当研究室では *RvTPT2* のゲノム編集による1遺伝子ノックアウト細胞(*RvTPT2-KO*)の作出に成功しているが(unpublished data), *RvTPT1-4* それぞれの1遺伝子ノックアウト株の中で, *RvTPT2-*

KO株が約1週間の培養で最も細胞増殖率が低い結果となった(図3-7)。したがって、主要なRvTPT1-4の中でもRvTPT2は特に重要な役割を担っている可能性が示唆された。また、導入するdsRNA量をRvTPT2についてのみ倍量させた実験では、RvTPT2以外の3遺伝子のノックダウン効率に違いが生じた。このことから、数種類の遺伝子を同時にノックダウンする場合には、dsRNAの相対量の変化によるRNAi効率の低下を生じ得ることが分かった。また、RvTPT1-4遺伝子同時ノックダウンをおこなった場合には、本来は発現量の低いRvTPT5とRvTPT6の発現量が増える傾向が認められた(図3-8)。これは、抑制された4つのTPTの発現量を相補するように、残り2つのRvTPTsの発現量が増えたと解釈でき、このように、RvTPTsのいずれかの発現が抑制されると、その他RvTPTsの発現量に補完的な影響を与える可能性が考えられた。これらの結果から、*R. viridis*の盗葉緑体利用において、RvTPTsの十分な発現量が維持されるためのフィードバック機構の存在が示唆された。

3-2-4-2. RvTPTsの多糖顆粒の蓄積や光合成への関与

ブランク細胞(野生株)と比較し、RvTPTs-kd細胞では多糖顆粒の蓄積が明確に少なかった(図3-3)。これは、ノックダウンによりRvTPTsの機能が抑制されたことで、葉緑体からサイトゾルへの光合成産物(トリオースリン酸)の輸送が抑制されたためであると考えられた。TPTはトリオースリン酸(グリセルアルデヒド3-リン酸あるいはジヒドロキシアセトンリン酸)の前駆体である3-ホスホグリセリン酸の葉緑体への取り込みにも関与することが分かっている(すなわち還元力の葉緑体外への輸送)(Lee *et al.* 2017)。したがって、TPTsの機能抑制はカルビン・ベンソン回路の反応低下、すなわち光合成電子伝達系から供給されてくる

NADPH の NADP^+ への再酸化効率の低下を引き起こし、これによる光合成電子伝達系の「電子の目詰まり」が生じることで、*RvTPTs-kd* 細胞における光合成酸素発生速度の低下(図 3-5)につながったと考えられた。

3-2-4-3. *RvTPTs* の細胞増殖や細胞生存期間への関与

ブランク細胞(野生株)と *RvTPTs-kd* 細胞の細胞増殖率は、*Tetraselmis sp.* 摂取から 4 日後以降に差が生じ、*RvTPTs-kd* 細胞で低い値となった(図 3-4)。したがって、細胞増殖に *RvTPTs-kd* による影響が現れるのは、ノックダウン実験 5 日後以降、もしくは *Tetraselmis sp.* の摂取後 4 日後以降であることが示唆される。また、*RvTPTs* のノックダウンによって細胞増殖が抑制されたことが示唆される。

当初、主要な *RvTPTs* をノックダウンすると、盗葉緑体から光合成産物を取り出す輸送体が失われることで細胞が死滅することが予想された。しかし、*RvTPTs-kd* 細胞はノックダウン実験から 20 日経過後も生存しておりその時点での細胞形態は、むしろ培養期間の浅い野生株細胞の形態に近く(図 3-6)、当初の予想とは異なり、ブランク細胞よりも *RvTPTs-kd* 細胞の方が、生存期間が長い結果となった。この要因として、*RvTPTs* の機能が抑制されたことにより、カルビン・ベンソン回路の反応低下が生じ、光合成電子伝達系の「電子の目詰まり」による光阻害を回避する応答として、光合成の初期反応過程において非光化学的消光(Non-photochemical quenching; NPQ)のようなエネルギークエンチング機構の活性化した可能性が考えられる。NPQ とは、吸収した光エネルギーが光合成の生化学反応に使われずに、積極的に熱として捨てられる仕組みの総称である(Niyogi and Truong 2013)。NPQ が機能した結果、光化学系 II な

ど光損傷を受けやすい複合体が、結果的により良く守られることになり、光化学系の損傷やクロロフィルの損耗が低減されたと予想された。*R. viridis* は盗葉緑体のクロロフィルを新たに生合成できないことが示されている(丸山修士論文 2018)ため、光合成電子伝達系の因子群の損耗の低減が、結果としてノックダウン細胞の生存期間を延ばすことにつながったと考えられた。

3-3. *Rapaza viridis* の *RbcS* 様遺伝子 (*RvRbcS*) の機能推定

3-3-1. 背景

リブローズビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ (ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase; RuBisCO) 小サブユニット (RuBisCO small subunit; *RbcS*) は、カルビン・ベンソン回路において炭酸固定を触媒する酵素複合体 RuBisCO を構成するサブユニットである。RuBisCO は *RbcS* と RuBisCO large subunit (*RbcL*) の 2 種類のサブユニットそれぞれ 8 個から構成される 16 量体である。多くの藻類細胞では、葉緑体内に RuBisCO を主要な構成因子とするピレノイドと呼ばれる相分離構造を有している。*R. viridis* の盗葉緑体のピレノイドについては、盗葉緑体形成時に *Tetraselmis sp.* の緑藻型のピレノイド形態から、*R. viridis* の Euglenophyceae 型ピレノイド形態へと変化することが明らかになっている (Yamaguchi *et al.* 2012; 丸山修士論文 2018)。盗葉緑体のドナーである *Tetraselmis sp.* では、*RbcL* は葉緑体ゲノムにコードされており、一方で *RbcS* は核ゲノムにコードされている。そのため、盗葉緑体形成時に *Tetraselmis sp.* の核が *R. viridis* 細胞から排除された後には、*Tetraselmis sp.* 核ゲノムコードの *RbcS* タンパク質の供給は不可能になるはずである。*RbcS* の供給停止は、通常、RuBisCO 複合体の消滅と、そ

の消滅による炭酸固定経路の機能不全に繋がると予想されるが、この予想に反して、*R. viridis* は盗葉緑体を光合成に利用し炭酸固定をおこなうことがわかっている(丸山修士論文 2018)。

さらに興味深いことに、*R. viridis* の核ゲノムにコードされた盗葉緑体遺伝子候補の中に *RbcS* 様の遺伝子 (*RvRbcS*) の存在が認められた。*RvRbcS* は 4 つの *RbcS* 機能ドメインが縦列にリピートした構造をとっている。またこれら機能ドメインの N 末端側と C 末端側の両方には、比較的大きな LC 領域が存在していた(図 3-9)。このうち、N 末端側 LC 領域は、盗葉緑体への輸送シグナルとして機能することが予想された。一方、C 末端側 LC 領域は、特定のアミノ酸の繰り返し配列を多く含む(SYGQ リッチである)ことから、この領域の構造どうしが分子間で相互作用することで、液-液相分離に関わることが予想された(Murray *et al.* 2017; 吉澤 2021)。液-液相分離は膜構造をもたないオルガネロイドの形成機構に関わることが知られている。ピレノイドも膜構造をもたないオルガネロイドであるため、*R. viridis* で観察された盗葉緑体形成時初期におけるピレノイドの形態変化には、*RvRbcS* の C 末端側 LC 領域が関与している可能性が考えられた(図 3-10)。

本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウト実験から作出された *RvRbcS* ゲノム編集株を用いて、ウェスタンブロットニングや免疫染色蛍光顕微鏡観察、培養実験、光合成活性測定をおこない、*RvRbcS* の機能の検証を試みた。ここではまず、作業仮説として、*RvRbcS* の C 末端側 LC 領域が盗葉緑体形成時のピレノイド形態変化に関わっていることを想定した。

3-3-2. 実験方法と実験細胞

3-3-2-1. CRISPR/Cas9 システムを用いた *RvRbcS* ノックアウト実験から作出されたゲノム編集株

CRISPR/Cas9 システムを用いた *RvRbcS* ノックアウト実験により、作出された 3 種類の *RvRbcS* ゲノム編集株を *RvRbcS* 機能検証実験に用いた(図 3-11)。*RvRbcS* の完全破壊株を *RvRbcS*-KO 株, N 末端側 LC 領域だけを削除させた株を *RvRbcS*- Δ N 株, C 末端側 LC 領域だけを削除させた株を *RvRbcS*- Δ C 株とした。

3-3-2-2. SDS-PAGE-ウエスタンブロットティングと Blue native-PAGE-ウエスタンブロットティング

SDS-PAGE-ウエスタンブロットティングサンプルは、*R. viridis* 細胞数の 3 倍量の *Tetraselmis sp.*を与え IMK 培地で培養した。なお、*R. viridis* は *Tetraselmis sp.*を与えた直後から捕食を開始するため、この日を「盗葉緑体獲得 0 日後」とした。野生株について盗葉緑体獲得 22 時間後と 15 日後の細胞を回収してペレット化し、液体窒素凍結した。*RvRbcS* ゲノム編集株の実験でも同様に *R. viridis* の細胞数の 3 倍量の *Tetraselmis sp.*を与え IMK 培地で培養し、盗葉緑体獲得 7 日後と 16 日後の細胞回収をおこない、コントロール実験として野生株も同様に細胞回収をおこなった。*Tetraselmis sp.*も IMK 培地で *R. viridis* と同様な条件で培養をおこない、盗葉緑体獲得約 2 週間後の細胞を回収した。Blue native-PAGE-ウエスタンブロットティングサンプルは、*R. viridis* の細胞数の 3 倍量の *Tetraselmis sp.*を与え IMK 培地で培養した。野生株は、盗葉緑体獲得 10 日後と 17 日後に細胞を回収してペレット化し、液体窒素凍結した。*RvRbcS*-KO 株は、盗葉緑体獲得 10 日後に細胞回収した。*Tetraselmis sp.*も IMK 培地で *R. viridis* と同様な条件

で培養をおこない、盗葉緑体獲得約 1 週間後の細胞を回収した。なお、SDS-PAGE-ウエスタンブロッティングは、共同研究者の中澤昌美先生(大阪公立大学)に、Blue native-PAGE-ウエスタンブロッティングは蘆田弘樹先生(神戸大学)それぞれのご協力の下に実施された。SDS-PAGE-ウエスタンブロッティングでは、抗 RvRbcS 抗体(ユーロフィンカスタム抗体)で検出をおこなった。Blue native-PAGE-ウエスタンブロッティングでは、抗植物 RbcL 抗体(抗ホウレンソウ RbcL 抗体)で検出をおこなった。

3-3-2-3. RvRbcS ノックアウト細胞の免疫蛍光染色と観察

Rapaza viridis の野生株, RvRbcS-KO 細胞におけるピレノイド局在を調べるため、抗 RbcL 抗体を用いて免疫蛍光染色をおこなった。まず、細胞懸濁液 100 μ L に対し、10%PFA 細胞固定液 500 μ L を加え、室温 20°C で 30 分間振とうしながらインキュベートした。以下の表 3-4 に細胞化学固定液の組成を示す。PBS(-)を tween20 が 0.1%濃度となるよう調製したバッファー (PBS(-)tween0.1%) で、細胞を 3 回洗浄したのち、トライトン液(表 3-5)を細胞ペレットに加え、室温 20°C で1時間振とうしながらインキュベートすることで透過処理をおこなった。PBS(-)tween0.1%で細胞を 3 回洗浄したのち、ブロッキング液(表 3-5)を細胞ペレットに加え、室温 20°C で 30 分間振とうしながらインキュベートすることでブロッキング処理をおこなった。ブロッキング処理後、細胞ペレットに一次抗体液(表 3-5)を加え、4°Cで一晩インキュベートすることで一次抗体処理をおこなった。一次抗体処理後、細胞を PBS(-)tween0.1%で 3 回洗浄した後、細胞ペレットに二次抗体液(表 3-5)を加え、室温 20°C で 1.5 時間振とうしながらインキュベートすることで二次抗体処

理をおこなった。細胞を PBS(-)tween0.1%で 3 回洗浄後, IX73 (Olympus)を用いて蛍光顕微鏡観察をおこなった。

表 3-4 10%PFA 細胞固定液の組成

0.5M PIPES(pH6.8)	100 μ L
10% Paraformaldehyde	300 μ L
50 mM EGTA	100 μ L
2M MgSO ₄	2.5 μ L
Milli-Q 水で 1 mL にメスアップ	

表 3-5 免疫蛍光染色に使用した試薬

トライトン液(透過処理)	0.05% TritonX-100 in PBS(-) t 0.1%
ブロッキング液	2% BSA in PBS(-) t 0.1% BSA: Albumin,Bovine Serum,FractionV Medified Cohn, ph5.2(牛血清アルブミン)
一次抗体液	抗ホウレンソウ RbcL rabbit 抗体を PBS(-) t 0.1%で 10000 倍希釈
二次抗体液	抗 rabbit goat 抗体を PBS(-) t 0.1%で 2000 倍希釈 抗 rabbit 抗体:Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit

3-3-2-4. RvRbcS ゲノム編集細胞の培養

新しい IMK 培地に懸濁させると同時に, *Rapaza viridis* 細胞数の 3 倍量の *Tetraselmis sp.*細胞を懸濁させて摂食させた。なお, *R. viridis* は *Tetraselmis sp.*を与えた直後から捕食を開始するため, この日

を「盗葉緑体獲得0日後」とした。また、培養実験は、温度 20°C、明暗周期(明期 14 時間:暗期 10 時間)、光強度は約 100-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ でおこなった。細胞数のカウントには粒子計数分析装置(CDA-1000, Sysmex)を用いた。

3-3-2-5. RvRbcS ノックアウト細胞の光合成活性測定

盗葉緑体獲得 8 日後の *Rapaza viridis* 2×10^6 細胞を遠心分離で回収し、新鮮な IMK 培地 2 mL に再懸濁させたサンプルに対し、酸素発生の測定をおこなった。また、測定の際には測定サンプル中の二酸化炭素濃度不足を懸念し、重炭酸ナトリウムを添加した(1M 重炭酸ナトリウム水溶液を 10 μL)。酸素発生の測定には Hansatech 社の温度制御付液相酸素測定装置(OXYT-1)を使用した。盗葉緑体あたりの光合成活性の算出について、*R. viridis* のクロロフィル量は細胞増殖の際にも増加せず、大きな減少もしないことから(丸山修士論文 2018)、実験カルチャー内の盗葉緑体量は変動しないと考えられるため、獲得時からの細胞増殖率をもとに、実験カルチャー内の盗葉緑体量あたりの光合成活性算出し、盗葉緑体あたりの光合成活性とした。

3-3-3. 結果

3-3-3-1. 野生株と RvRbcS ゲノム編集細胞の RvRbcS タンパク質のサイズ

まず、盗葉緑体獲得から 22 時間後と 15 日後の *R. viridis* 野生株細胞、および negative control として *Tetraselmis* sp.細胞について、それぞれ lysate を SDS-PAGE で分離し、ウエスタンブロッティングで抗

RvRbcS ペプチド抗体を用いた検出を試みた。その結果、盗葉緑体獲得から 22 時間後の細胞からは、105 kDa の位置にシグナルが検出された。また、15 日後のサンプルでは、89.6 kDa の位置にシグナルが検出された(図 3-12 A)。前者の 105 kDa のシグナルは、*RvRbcS* の翻訳産物の全長に対応する分子量サイズ(104.54 kDa)に相当した。また、後者の 89.6 kDa のシグナルは、翻訳産物の全長から N 末端側 LC 領域が除去されたペプチドの分子量サイズ(87.13 kDa)に相当した(図 3-12 B)。

次に、盗葉緑体獲得から 7 日後と 16 日後の野生株および各種 *RvRbcS* ゲノム編集株細胞、および negative control として *Tetraselmis sp.*細胞について、それぞれ lysate を SDS-PAGE で分離し、ウェスタンブロットティングで抗 *RvRbcS* ペプチド抗体を用いた検出を試みた。その結果、盗葉緑体獲得から 7 日後および 16 日後の野生株細胞では、88.4 kDa および 67.5 kDa の位置にシグナルが検出された。しかし、*RvRbcS*- Δ C 株細胞では 67.5kDa の位置のみにシグナルが検出された。また、*RvRbcS*-KO 株と *RvRbcS*- Δ N 株では、野生株で認められた両方のシグナルが検出されなかった(図 3-13 A)。88.4kDa のシグナルは、翻訳産物の全長から N 末端側 LC 領域が除去されたペプチドの分子量サイズ(87.13 kDa)に相当した。一方、67.5kDa のシグナルは、翻訳産物の全長から N 末端側 LC 領域と C 末端側 LC 領域の両方が除去されたペプチドの分子量サイズ(59.19 kDa)よりやや大きなサイズであった(図 3-13 B)。

3-3-3-2. 野生株と *RvRbcS* ゲノム編集細胞の RuBisCO 複合体のサイズ

盗葉緑体獲得から 10 日後と 17 日後の *R. viridis* *RvRbcS*-KO 株および野生株細胞、および *Tetraselmis sp.* , および positive control としてタバコ葉細胞について、それぞれ lysate を Blue native-

PAGE で分離し、ウェスタンブロッティングで抗ホウレンソウ RbcL 抗体を用いて RuBisCO 複合体の検出を試みた。その結果、盗葉緑体獲得から 10 日後の *RvRbcS-KO* 株では、*Tetraselmis sp.* およびタバコ葉と同程度のサイズのシグナルが検出され、これが RuBisCO の L8S8 複合体に相当すると考えられた。これに対して、野生株では、上述の RuBisCO の L8S8 複合体のシグナルに加えて、これよりもサイズが大きいことが示唆される 2 種類のシグナルが検出された(図 3-14 A)。また、野生株においては、全タンパク質量あたりの含 RbcL 複合体(上記3つのシグナルに相当)のそれぞれの量について、盗葉緑体獲得から 10 日後と比較し、17 日後では著しい現象が示された。

3-3-3-2. 免疫蛍光染色によるピレノイド局在観察

盗葉緑体獲得から 11 日後、6 時間未満(盗葉緑体の細分化が始まる前の段階)、18.5 時間後(盗葉緑体の細分化が進行している段階)の *R. viridis* *RvRbcS-KO* 株および野生株の細胞固定細胞について、抗ホウレンソウ RbcL 抗体を用いた免疫染色蛍光顕微鏡観察を試みた。その結果、野生株細胞と *RvRbcS-KO* 株細胞のいずれの段階においても、葉緑体内部に RbcL の蛍光シグナルの同様な局在が観察され、両株の間で顕著な差異は認められなかった(図 3-15)。この蛍光シグナルの局在は、透過型電子顕微鏡で報告されている *Rapaza* 型ピレノイドの葉緑体内部での分布や形状と整合的なものであった。したがって、*RvRbcS* のノックアウトに伴うピレノイドの形態変化を示す十分な根拠は得られなかった。

3-3-3-3. *RvRbcS* ゲノム編集細胞の細胞増殖と細胞観察

野生株および *RvRbcS* ゲノム編集株 (*RvRbcS*-KO 株, *RvRbcS*- Δ N, および *RvRbcS*- Δ C 株) のバッチカルチャーについて、盗葉緑体獲得以降の細胞密度の時系列変化を調べた。その結果、3種類の *RvRbcS* ゲノム編集株は、野生株と比較して、それぞれ細胞増殖が低い水準に停滞した(野生株の 1/2-1/3 程度)(図 3-16 A)。また、野生株, *RvRbcS*-KO 株, および *RvRbcS*- Δ N 株については、盗葉緑体獲得 12 日後を境に細胞密度が低下したのに対し、*RvRbcS*- Δ C 株では細胞密度は 16 日後まで減少することなく停滞した。この時系列変化と合わせて微分干渉顕微鏡での細胞形態の観察を実施したところ、野生株では細胞内に明瞭な多糖顆粒の蓄積が観察されたのに対し、3種類の *RvRbcS* ゲノム編集株では、いずれも明瞭な多糖顆粒の蓄積は観察されなかった(図 3-16 B)。ただし、盗葉緑体獲得時 (*Tetraselmis* sp. を与えて 2 日後) の観察時のみ、3種類の *RvRbcS* ゲノム編集株においても多糖顆粒の蓄積が観察された。これら細胞は、いずれも、培養液中の *Tetraselmis* sp. を食べつくそうとしている状況で、*R. viridis* 細胞には取り込んだばかりと思われる *Tetraselmis* sp. の葉緑体が観察された。

微分干渉顕微鏡での細胞形態の観察では、野生株と3種類の *RvRbcS* ゲノム編集株細胞において、細胞内の液胞の発達にも違いが観察された。*RvRbcS*-KO 株および *RvRbcS*- Δ N 株では、*Tetraselmis* sp. を与えてから盗葉緑体獲得 12 日後には液胞の形成が明瞭に観察され、盗葉緑体獲得 16 日後には液胞がさらに発達した。盗葉緑体獲得 16 日後には野生株にも液胞の形成が観察され、盗葉緑体獲得 22 日後には *RvRbcS*- Δ C 株でも液胞の形成が観察された。

加えて、野生株と3種類の *RvRbcS* ゲノム編集株細胞それぞれの生存期間にも違いが生じた。

RvRbcS-KO 株と RvRbcS-ΔN 株では、盗葉緑体獲得 22 日後には半数が死細胞となり、野生株と比較して生存期間が短くなる結果となった。さらに、盗葉緑体獲得 33 日後には、野生株の半数以上が死細胞となった。一方で、RvRbcS-ΔC 株では、盗葉緑体獲得 33 日後の時点で、死細胞は散見されるものの、ほとんどの細胞は液胞を大きく発達させた生きた細胞であった。このように、RvRbcS-ΔC 株細胞の生存期間は、野生株と比較してむしろ長くなる結果となった。

3-3-3-4. RvRbcS ゲノム編集細胞の光合成活性

RvRbcS ゲノム編集株の細胞あたりの呼吸速度(酸素消費速度)は、野生株よりも低い値となった(図 3-17 A)。光合成による酸素発生速度は、RvRbcS-ΔC 株が野生株よりも高い値となった。RvRbcS-ΔN 株と RvRbcS-KO 株はそれらよりも低い値となり、RvRbcS-ΔN 株が最も低かった(図 3-17 B)。一方、盗葉緑体あたりの光合成による酸素発生速度は、野生株が最も高い値となり、RvRbcS ゲノム編集株はいずれも、野生株の 3 分の 1 以下の低い値となった(図 3-17)。

3-3-4. 考察

3-3-4-1. RvRbcS の N 末端 LC 領域の機能

Rapaza viridis の野生株細胞に対する抗 RvRbcS ペプチド抗体を用いた SDS-PAGE-ウェスタンブロットティングによる検出では、盗葉緑体獲得直後(22 時間後)には N 末端側 LC 領域を含めた RvRbcS ペプチド全長のシグナルが検出された一方、盗葉緑体獲得から十分な時間が経ち、盗葉緑体が成熟した

状態にあると考えられた 15 日後には、N 末端側 LC 領域を除いたサイズの *RvRbcS* ペプチドのシグナルのみが検出された(図 3-12: A)。このため、この N 末端側 LC 領域は、盗葉緑体への輸送シグナルとして機能し、輸送後に盗葉緑体内部で除去されること(一般的な葉緑体輸送シグナルと同様)が示された。さらに、予測 *RbcS* 機能ドメインの 4 回リピート構造は、縦列に繋がった 4 量体のまま盗葉緑体内部に存在していることが示唆され、C 末端 LC 領域は除去されないことが示された(図 3-12: B)。さらに、C 末端 LC ドメインを欠損させた *RvRbcS-ΔC* 株においても、*RvRbcS* ペプチドが盗葉緑体へ輸送されて N 末端配列が除去されることが示唆された(図 3-13: A, B)。また一方、*RvRbcS-KO* 株と *RvRbcS-ΔN* 株では、*RvRbcS* ペプチドが細胞内に蓄積されないことが示された(図 3-13: A)。前者は遺伝子の完全破壊株であるのでこの結果は当然であるが、後者については、盗葉緑体への輸送がおこなわれないことで機能の発現がなされず、翻訳物が不要なペプチドとして直ちに分解されているものと考えられた。

3-3-4-1. *RvRbcS* と *RuBisCO* 複合体との関係

Blue native PAGE-ウエスタンブロットティングによる抗ホウレンソウ *RbcL* 抗体を用いた *RuBisCO* 複合体の検出では、*RvRbcS-KO* 株の *RuBisCO* 複合体は、*Tetraselmis sp.* の *RuBisCO* L8S8 複合体の状態と比較して、サイズの変化が無いことが示された(図 3-14: A)。一方で、野生株では、*Tetraselmis sp.* の *RuBisCO* L8S8 複合体とは明らかに異なる、*RbcL* を含む 2 種類の複合体が形成されていることが示され、*RvRbcS* の存在が *RuBisCO* 複合体の構成を変化させていることを強く示唆した。すなわち、野生株の結果からは、既存の *Tetraselmis sp.* の *RuBisCO* L8S8 複合体に対して *R. viridis* の *RvRbcS* が付加するよ

うな複合体を形成する可能性と, *RvRbcS* が既存の RuBisCO L8S8 複合体を構成していた *Tetraselmis* sp. の RbcS と置き換わって, 新たに RuBisCO のキメラ複合体を形成する可能性が考えられた(図 3-14: B)。

3-3-4-2. *RvRbcS* の細胞増殖への関与

ゲノム編集ノックアウト実験からは, *RvRbcS* の欠損により, 細胞の増殖が抑制された。*RvRbcS*-KO 株細胞の増殖パターンは, 窒素欠乏状態で培養された *R. viridis* 野生株細胞や, 後述の *RvNaR*-KO 株(培地からの硝酸イオンの同化に関わる因子の欠損株)細胞の増殖パターンと類似しており(第 4 章参照), いずれの細胞が 2 回分裂したのちに増殖が停滞した(図 3-16: A)。この細胞停滞の要因として, 光合成炭素代謝と窒素代謝のクロストーク(佐藤ら 2013; 日本光合成学会 2021)が挙げられる。*RvRbcS* の欠損により RuBisCO が正常に機能しないことで, 炭酸固定速度が低下し, その結果, 窒素代謝にも影響があらわれ, これらの総合的な帰結としてアミノ酸合成が抑制された可能性がある。結果として, 細胞増殖に必要な核酸の合成やタンパク質の合成が抑制されて, 細胞増殖の低い水準での停滞につながったことが考えられた。

3-3-4-3. *RvRbcS* の光合成や多糖顆粒蓄積への関与

3 種類の *RvRbcS* ゲノム編集株では, 酸素発生速度から判断される盗葉緑体あたりの光合成速度が野生株より有意に低く(図 3-17), サイトゾルへの多糖顆粒の蓄積もほぼ認められなかった(図 3-16: B)。

Blue native PAGE-ウエスタンブロッティングの結果から, *RvRbcS* が盗葉緑体における RuBisCO 複合体の

存在形態に対して重大な関与を示すことが分かったため(図 3-14), この光合成速度の抑制は RuBisCO による二酸化炭素の固定反応が主な原因であると考えられた。すなわち, *RvRbcS* を欠いた盗葉緑体の RuBisCO 複合体が光合成の律速となったためであると考えられ, したがって盗葉緑体における RuBisCO の正常な機能の維持には *RvRbcS* の供給が不可欠であると示唆された。

一般的に, 植物での光—光合成曲線では, 陽性植物では呼吸量, 最大酸素発生量がともに高く, 光補償点が高く, 一方で, 陰性植物では呼吸量, 最大酸素発生量ともに低く, 光補償点が低い。また, 陽性植物の葉緑体に比べて, 陰性植物の葉緑体のほうが酵素量(光合成の反応を触媒する酵素タンパク質量)/クロロフィル量の比率が低い(日本光合成学会 2021)。ここでは, 葉緑体内部の酵素量の多くが, 代謝回転速度が特異的に低いゆえに大量に存在していることが知られる RuBisCO で占められることが重要である。

ところで, 本研究で得られた光—光合成曲線からは, *R. viridis* 野生株の盗葉緑体は陽性植物の葉緑体と似た傾向(呼吸量, 最大酸素発生量がともに高く, 光補償点が高い)を示し, 一方で各種の *RvRbcS* ゲノム編集株の盗葉緑体では, 陰性植物の葉緑体と似た傾向(呼吸量, 最大酸素発生量ともに低く, 光補償点が低い)を示した(図 3-17: A-1, B-1)。したがって, *RvRbcS* ゲノム編集株では, 見かけ上の酵素量が低い状態にあること, つまり, *RvRbcS* 欠損により有効に機能する RuBisCO の量が減少し, これにより見かけ上の酵素量/クロロフィル量比の低下が起きている可能性が考えられた。すなわち, 各種の *RvRbcS* ゲノム編集株における盗葉緑体の光合成能力は, 陰性植物と同様に, 最大の光合成速度は低い, 光補償点も低くなるため弱い光でも効率的に光合成できる状態にあると考えられ, 実際に, より

弱光で酸素発生が認められた。

しかしそれにも関わらず、各種の *RvRbcS* ゲノム編集株では、サイトゾルへの多糖顆粒の蓄積が認められず(図 3-16: B), 盗葉緑体から *R. viridis* 細胞質側に光合成産物があまり供給されていないことが示唆された。このように炭酸固定が正常に機能しない場合には、クロロフィルが吸収する光のエネルギーが炭酸固定に利用できる量を上回ると考えられる。このような状況では、本来、過剰な光励起エネルギーの供給や光合成電子伝達系での過剰な還元力生成などにより、活性酸素種の生成につながり、光化学系反応中心の損傷(光阻害)が起きうる(高橋 2013)。したがって、盗葉緑体化した後の葉緑体においても、光阻害に対処する非光化学的消光などの機構が存在していることが示唆される。

3-3-4-4. *RvRbcS* の細胞生存期間への関与

盗葉緑体獲得後の各種の *RvRbcS* ゲノム編集株細胞について、野生株細胞と比較して、*RvRbcS*- Δ N 株と *RvRbcS*-KO 株細胞では生存期間が短くなり、一方で *RvRbcS*- Δ C 株細胞では生存期間が長くなった(図 3-16: B)。*RvRbcS*- Δ N 株と *RvRbcS*-KO 株細胞では、盗葉緑体の獲得から 12 日後には細胞内で液胞の発達が観察され、16 日後には生きた細胞の密度が減少した。*R. viridis* 細胞における液胞の発達について、盗葉緑体の光合成能力の低下により、十分な光合成産物とエネルギーを得ることができない場合に発達すると考えられている(丸山 2018)。*RvRbcS*- Δ N 株と *RvRbcS*-KO 株細胞では、液胞が発達した 12 日後の段階で、RuBisCO の機能が低下したことにより、生存のための十分なエネルギーの供給が不足した状態であったと考えられる。

Blue native PAGE-ウエスタンブロッティングの結果から、盗葉緑体獲得から 10 日後の *R. viridis* 細胞には、*Tetraselmis* sp. の RbcS と RbcL から構成される *Tetraselmis* 型の RuBisCO 複合体が残存していることが示唆された(図 3-14)。したがって、*RvRbcS-ΔN* 株と *RvRbcS-KO* 株では、盗葉緑体獲得から 10 日以降にそれまで維持・利用されてきた *Tetraselmis* 型の RuBisCO 複合体が喪失すること(*Tetraselmis* sp. の RbcS が盗葉緑体化後に供給されなくなることによる)に伴って盗葉緑体の光合成能力が不足するようになり、その後に細胞死が進行したと考えられる。

一方、生存期間が相対的に長くなった *RvRbcS-ΔC* 株細胞では、野生株細胞と比較して、他のゲノム編集株のような光合成活性の低下は、少なくとも細胞あたりの酸素発生速度の変化としては認められなかった。これは *RvRbcS* の RbcS 機能ドメインが、RuBisCO の機能が少なくとも部分的に維持され続けることを示すと考えられる。この場合、2 つの *RvRbcS* の縦列に繋がった 4 量体 RbcS が、*Tetraselmis* 型の RuBisCO L8S8 複合体の 8 つの *Tetraselmis* sp. の RbcS を置換して 8 つの RbcL (葉緑体ゲノムに遺伝子がコードされている)とキメラ複合体を形成している可能性が考えられる。これは、炭酸固定反応の触媒になうサブユニットである RbcL の活性を維持し続けていることをもともと素直に説明するものであるが、今回の研究では残念ながらこれを証明する証拠は得られなかった。ただし、野生株と遜色のない酸素発生速度に対して、光合成産物の供給低下を示唆する多糖顆粒の蓄積や細胞増殖の抑制が起きたことは、光合成の初期反応過程から供給される還元力やエネルギーが炭酸固定に反映されていないことを意味する。

RuBisCO には、二酸化炭素と基質分子を反応させるカルボキシラーゼ活性に加えて、分子酸素と基

質分子を反応させてしまう高いオキシゲナーゼ活性を有することが知られている(後者によりエネルギーが消費される現象は光呼吸と呼ばれる)。このオキシゲナーゼ活性は基本的に光合成における負の側面であるため、光合成生物はピレノイドの形成や炭酸脱水素酵素の共発現などにより光呼吸を極力回避する戦略をとっていると考えられている。したがって、*RvRbcS-ΔC* 株細胞では、酸素発生速度が直接的に示す光合成電子伝達系から供給される還元力を、C 末端側 LC 領域を欠く *RvRbcS-RbcL* キメラ複合体において主にオキシゲナーゼ活性により消費されている可能性が考えられる。このため、*RuBisCO* 複合体がそもそも機能しなくなり還元力の消費がおこらない「電子の目詰まり」による光化学系複合体の光阻害の亢進が予想される *RvRbcS-ΔN* 株と *RvRbcS-KO* 株細胞の場合とは対照的に、*RvRbcS-ΔC* 株細胞では効率的な還元力の消費が光損傷を抑制することで、盗葉緑体の光合成能力がより長期間維持されているのかもしれない。

ところで、野生株よりも細胞分裂回数の少なかった *RvRbcS-ΔC* 株細胞の方が *R. viridis* 野生株細胞と比較して、1 細胞あたりが有している盗葉緑体のサイズ(盗葉緑体量)が大きいと考えられる。これは、*R. viridis* ではクロロフィルの新規合成が起こらず、(盗)葉緑体の実質的な「量」が盗葉緑体獲得後に増大しないためである(丸山修士論文 2018)。このため、*RuBisCO* 複合体のオキシゲナーゼ活性が維持されて光損傷が抑制された *RvRbcS-ΔC* 株細胞では、カルボキシラーゼ活性により同様に光損傷が抑制されていると考えられる野生株細胞と比べてよりサイズの大きな盗葉緑体を有することにより、細胞あたりで盗葉緑体から得られる生存のためのエネルギーを相対的に長い期間獲得し続けることが可能であったために、寿命が長くなったと考えられた。

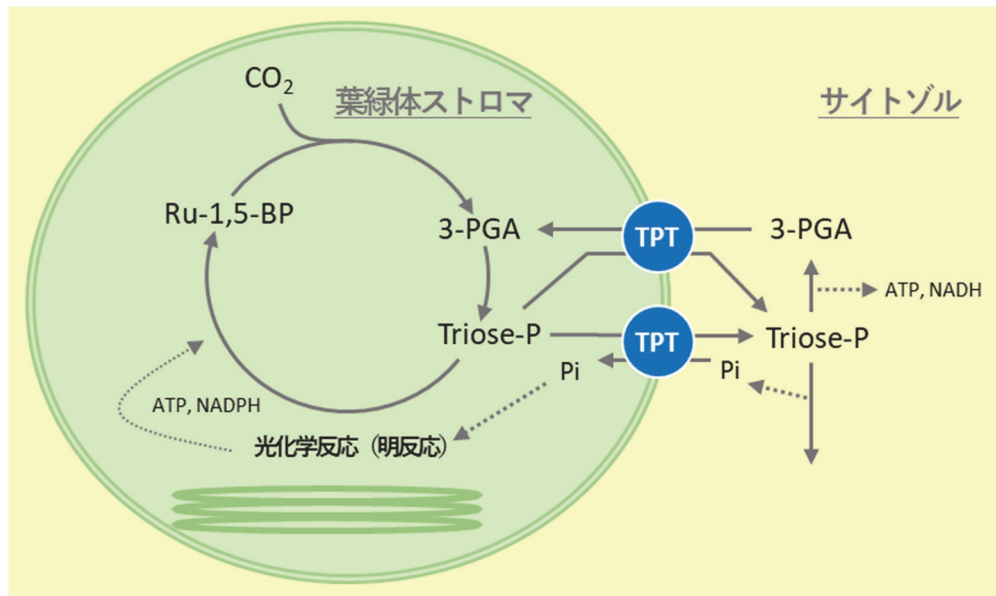
3-4. 結論

遺伝子水平転移由来と考えられた *Rapaza viridis* 核ゲノムにコードの葉緑体機能関連遺伝子のうち、トリオースリン酸/リン酸輸送体様遺伝子群 (RvTPTs) と RuBisCO 小サブユニット様遺伝子 (RvRbcS) について、その翻訳産物が実際に盗葉緑体内部へ輸送されて機能していることが示された。まず、RvTPT1-4 の4遺伝子同時ノックダウン細胞 (RvTPTs-kd 細胞) では、*R. viridis* サイトゾルの多糖顆粒蓄積が明確に抑制されたため、これら RvTPT 群がその他の光独立栄養性の生物の TPT と同様に、光合成産物をサイトゾルに運び出す機能を有していることが示唆された。また、RvTPTs-kd 細胞では、細胞増殖および光合成活性もやや抑制され、RvTPT1-4 の機能抑制は細胞増殖や光合成活性にも影響を与えることが示された。

次に、3 種の RvRbcS ゲノム編集株 (完全破壊株; RvRbcS-KO 株, N 末端側 LC 領域欠損株; RvRbcS-ΔN 株, C 末端側 LC 領域欠損株; RvRbcS-ΔC 株) を作製して RvRbcS タンパク質の機能検証をおこなった。まず、抗 RvRbcS ペプチド抗体を用いた SDS PAGE-ウエスタンブロットティングからは、RvRbcS の N 末端側 LC 領域が盗葉緑体への輸送シグナルとして機能することが示唆された。また、抗ホウレンソウ RbcL 抗体を用いた Blue native PAGE-ウエスタンブロットティングからは、RvRbcS-KO 株では *Tetraselmis* sp. の RuBisCO と同様なタンパク質複合体のシグナルが検出されたのに対し、野生株ではそれよりもサイズが大きいと考えられる 2 種類の含 RbcL 複合体のシグナルが検出された。この結果から、RvRbcS が、獲得した盗葉緑体の RuBisCO 複合体の構成変化に関与することが考えられた。すなわち、*Tetraselmis* sp. の RuBisCO L8S8 複合体と RvRbcS の複合体が形成される可能性、および *Tetraselmis* sp.

の RbcS を *RvRbcS* が置換して新たな RuBisCO キメラ複合体が形成される可能性が考えられた。

細胞形態および光合成活性に *RvRbcS* が与える影響については, *RvRbcS-KO* 株と *RvRbcS-ΔN* 株では細胞の増殖が抑制され, かつ盗葉緑体あたりの光合成速度の低下が示された。対して *RvRbcS-ΔC* 株では細胞増殖は抑制されたものの, 光合成速度は野生株と同程度であった。本研究では当初, *RvRbcS* の C 末端 LC 領域が盗葉緑体形成時のピレノイドの形態変化に関わっているという作業仮説仮説を立てていたが, 免疫蛍光染色によるピレノイド局在の顕微鏡観察実験からは, *RvRbcS* がピレノイドの形態変化に関わる積極的な証拠は示されなかった。以上の結果から, *RvRbcS* は RuBisCO 複合体の構成変化に関与すること, また, C 末端側 LC 領域を除く *RvRbcS* の機能ドメインは RuBisCO の機能(活性)維持に関与すること, そして, RuBisCO のカルボキシラーゼ反応活性の維持には, *RvRbcS* の C 末端側 LC 領域が関与する可能性が考えられた。



(Lee *et al.* 2017 をもとに作図)

図 3-1. TPT の機能

トリオースリン酸／リン酸輸送体 (triose-phosphate/phosphate translocator; TPT) は、葉緑体包膜に局在し、トリオースリン酸 (Triose-P) と無機リン酸イオンを交換輸送するアンチポーターである。3-PGA: 3-ホスホグリセリン酸

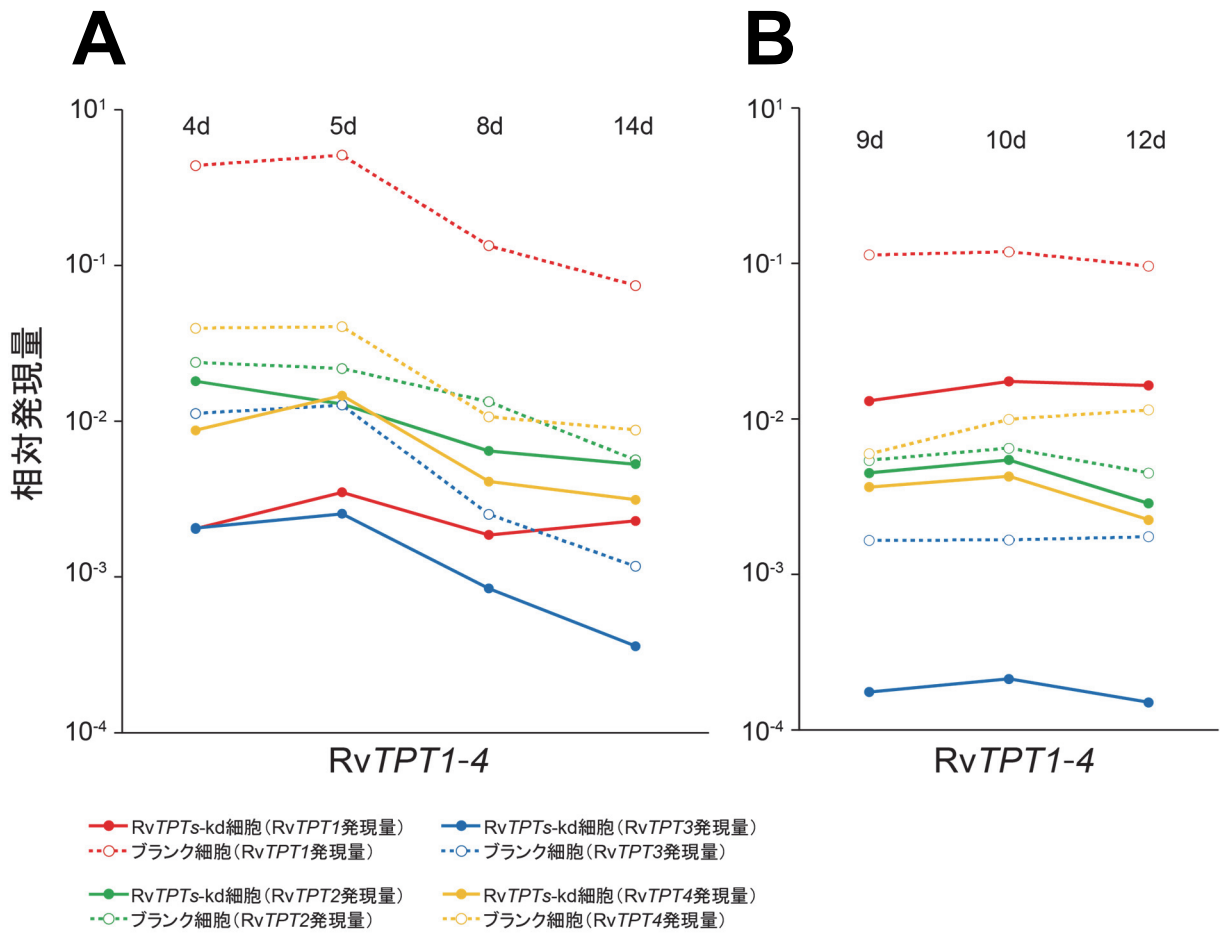
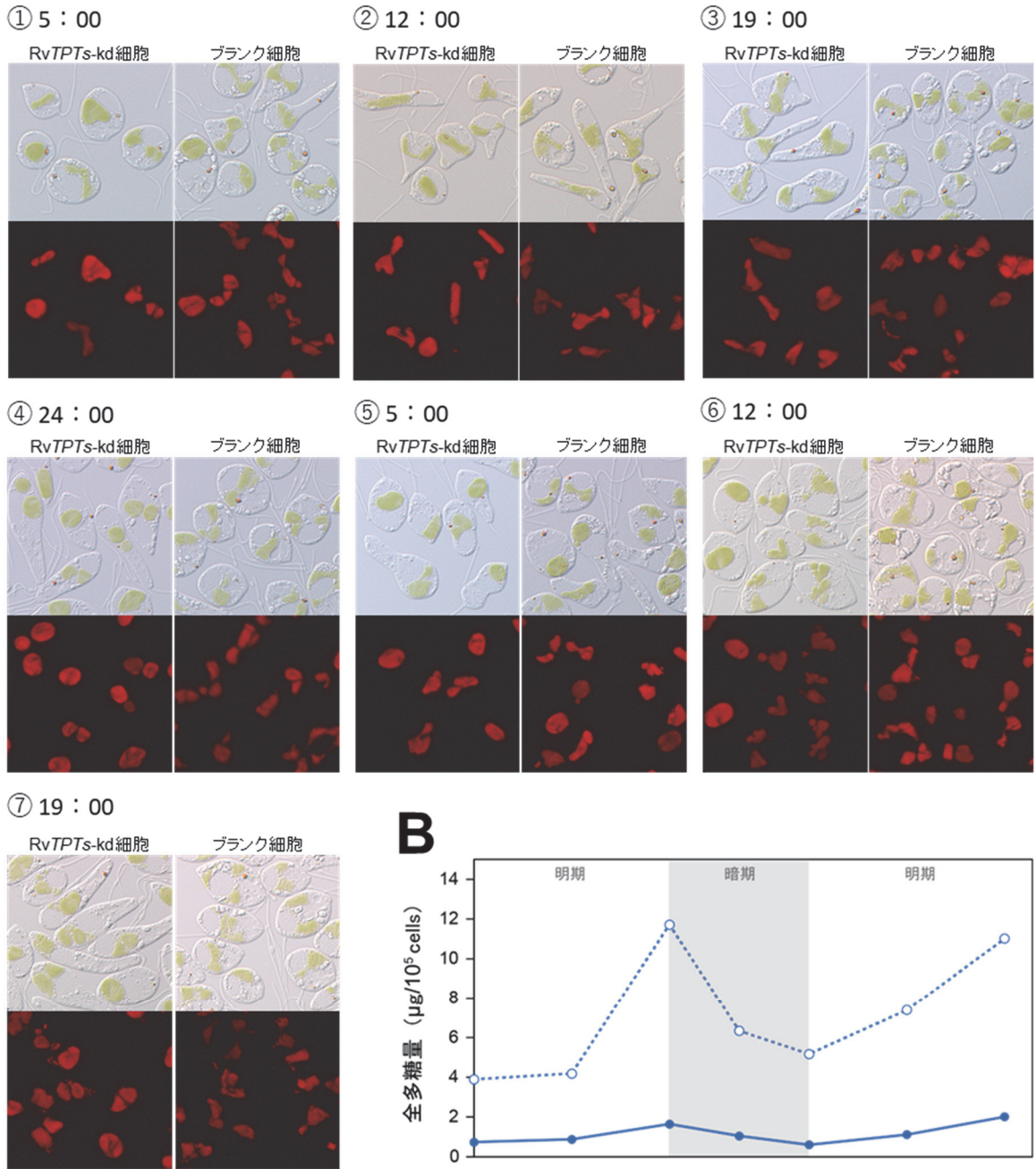


図 3-2. qPCR による RvTPTs 発現量の定量

α -tubulin 転写レベルでノーマライズした *TPT1-4* それぞれの転写量。横軸は、2 回目のノックダウン実験からの経過日数を示す。破線: RvTPT1-4 の全遺伝子同時ノックダウン細胞 (RvTPTs-kd 細胞)。実線: ノックダウン実験のコントロールとした野生株 (ブランク細胞)。

A: RNAi に使用した dsRNA 量は 1 倍量 (30 μ g), **B:** RvTPT2 のみ 2 倍量 (60 μ g) の dsRNA を使用した。

A



B

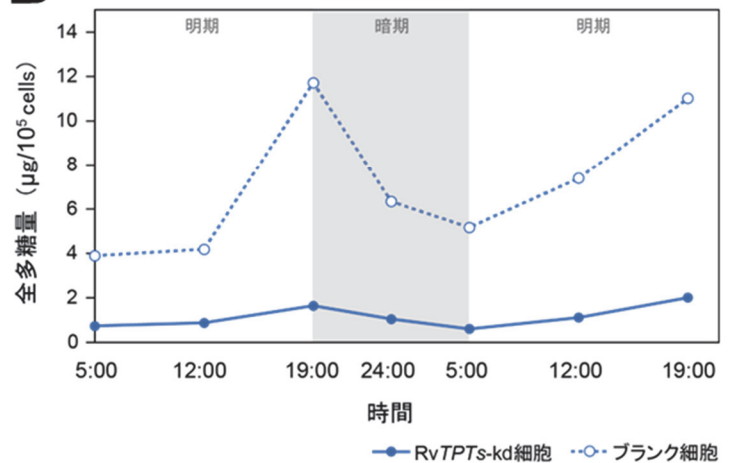


図 3-3. 細胞形態の観察と細胞あたりの全多糖量の変動

A:細胞形態の観察。明視野と対応するクロロフィル蛍光画像を示す。ブランク細胞(野生株)では明暗周期に合わせて多糖顆粒の大きさや数が増減した。対して *RvTPTs-kd* 細胞ではブランク細胞のような明瞭な多糖顆粒の蓄積変動は観察されなかった。**B:**蓄積多糖顆粒の定量。ブランク細胞では明暗周期に合わせて細胞あたりの全多糖量が増減した。対して *RvTPTs-kd* 細胞ではブランク細胞のような明瞭な全多糖量の変動は認められなかった。

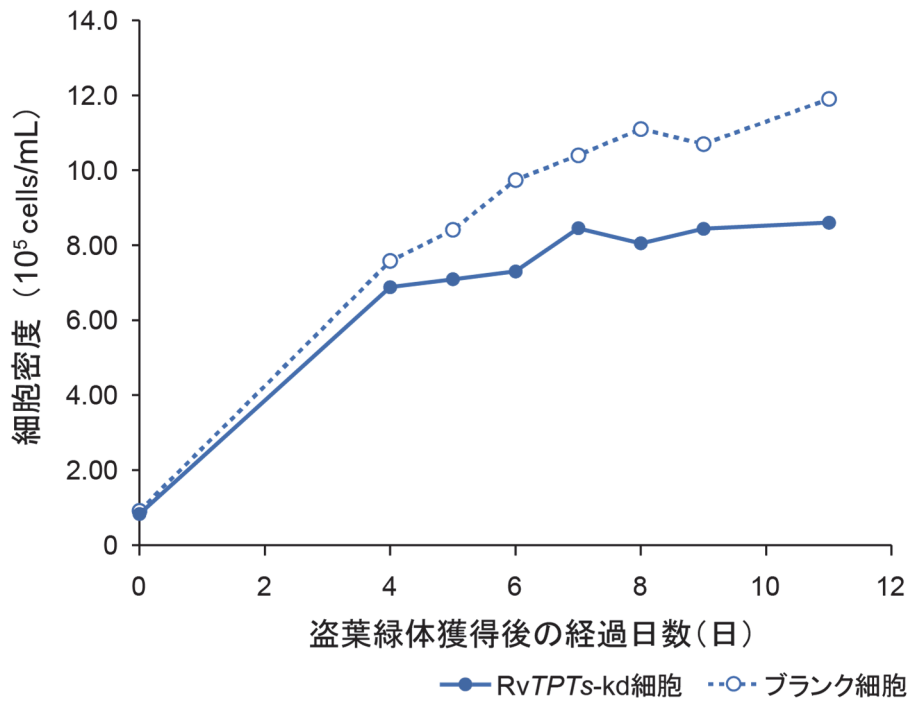


図 3-4. RvTPTs-kd の細胞増殖

RvTPTs ノックダウン後に *Tetraselmis* sp.を与え、その後の *Rapaza viridis* 細胞増殖を調べた。*Tetraselmis* sp.を与える前(0 日後)から 4 日間の細胞増殖率は、ブランク細胞(野生株)と RvTPTs-kd 細胞ともに 8.3 倍であった。11 日間の細胞増殖率はブランク細胞で 13 倍, RvTPTs-kd 細胞で 10 倍であった。

A

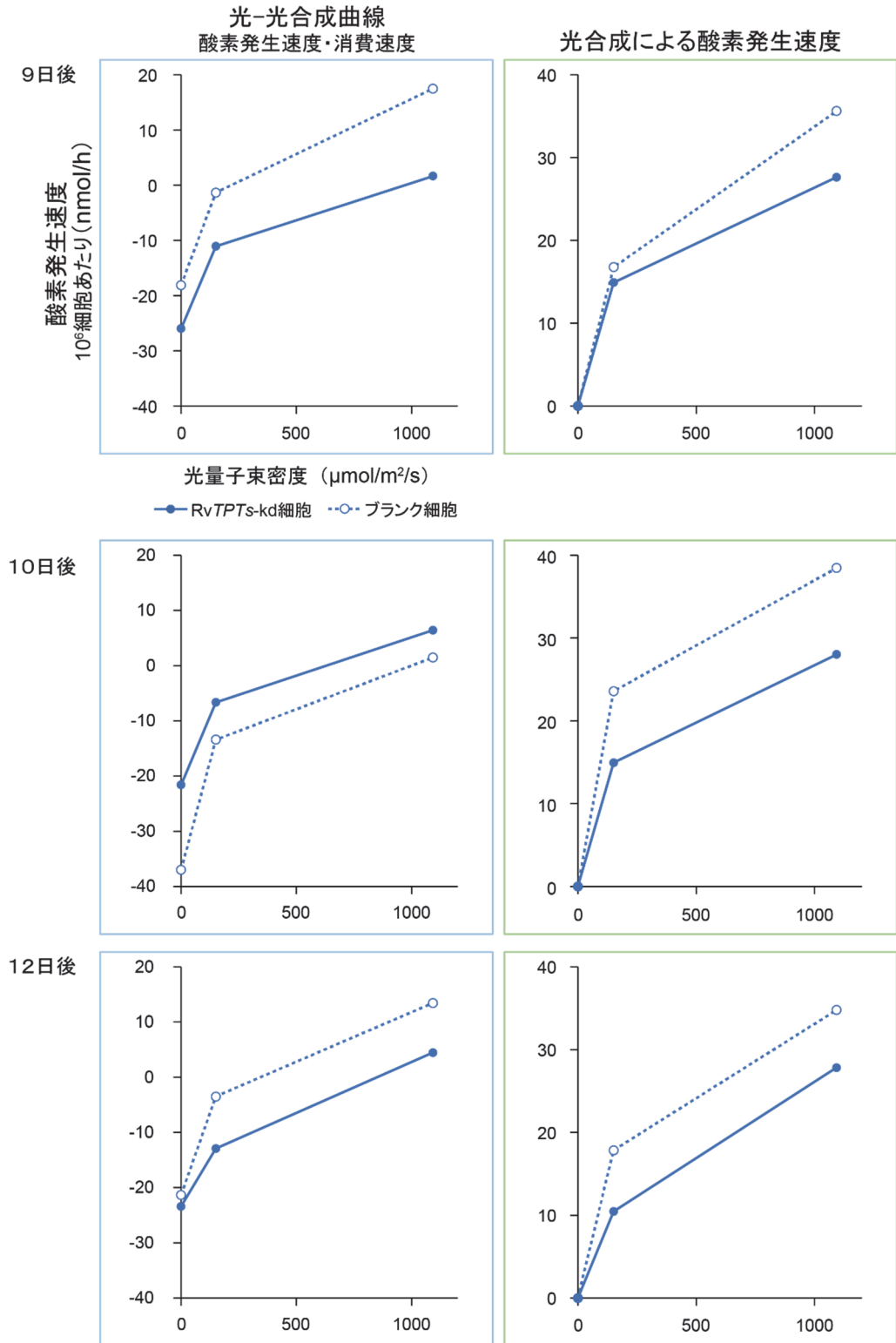


図 3-5. RvTPTs-kd の酸素発生速度

A: 細胞あたりの光合成活性。光合成による酸素発生速度は、酸素発生速度から酸素消費速度を差し引いて算出した。細胞あたりの光合成による酸素発生速度は、RvTPTs のノックダウンから 9, 10, 12 日後 (盗葉緑体獲得から 8, 9, 11 日後) いずれも RvTPTs-kd 細胞はブランク細胞 (野生株) よりも低い値となった。

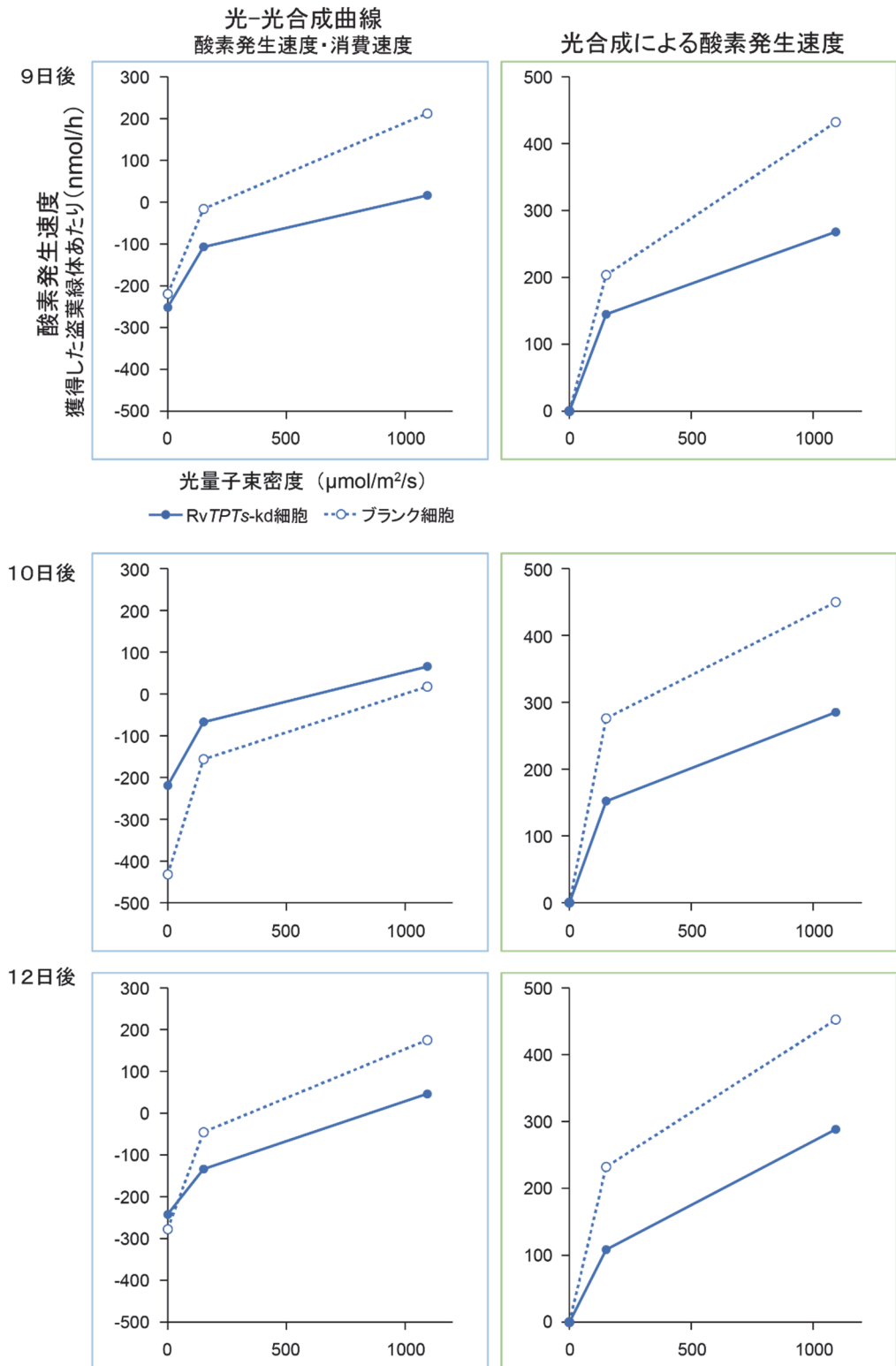
B

図 3-5. RvTPTs-kd の酸素発生速度

B: 盗葉緑体あたりの光合成活性。光合成による酸素発生速度は、酸素発生速度から酸素消費速度を差し引いて算出した。盗葉緑体あたりの光合成による酸素発生速度は、RvTPTs のノックダウンから 9, 10, 12 日後(盗葉緑体獲得から 8, 9, 11 日後)いずれも RvTPTs-kd 細胞はブランク細胞(野生株)よりも低い値となった。

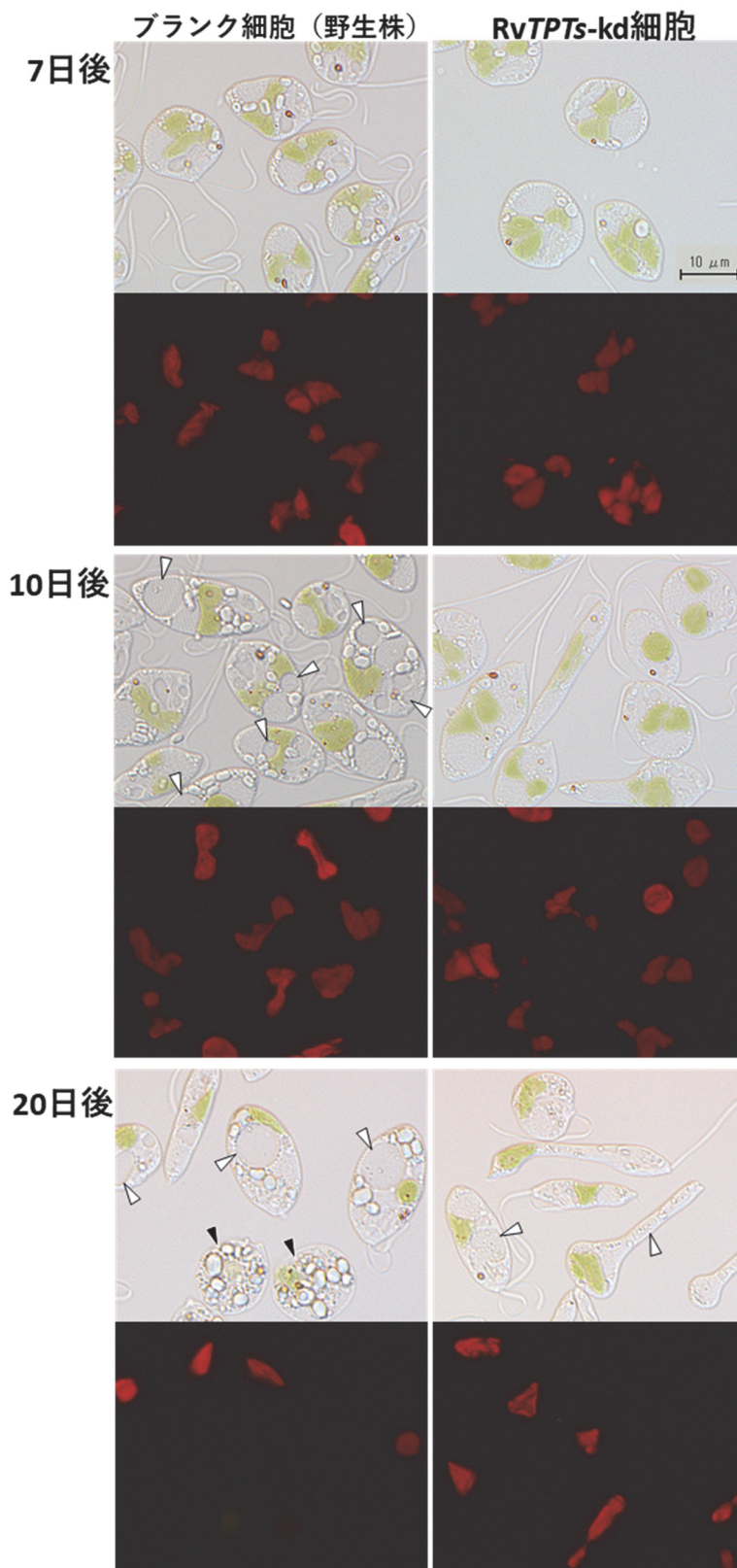


図 3-6. RvTPTs-kd 細胞の長期培養

RvTPTs-kd 細胞のほうが生存期間が長い結果となった。ブランク細胞 (野生株) と RvTPTs-kd 細胞の細胞観察。液胞 (白矢尻), 死細胞 (黒矢尻)。明視野画像と対応するクロロフィル蛍光を示す。

2 回目のノックダウン実験から 20 日後の観察について, ブランク細胞では, 培養液の 3 分の 1 ほどが死細胞だった。生細胞には大きな液胞の発達が観察された。また, 死細胞にも生細胞にも多糖顆粒の蓄積があった。一方, RvTPTs-kd 細胞では, 死細胞はほとんど観察されなかった。RvTPTs-kd 細胞の液胞発達の程度は 10 日後でのブランク細胞と同程度となった。

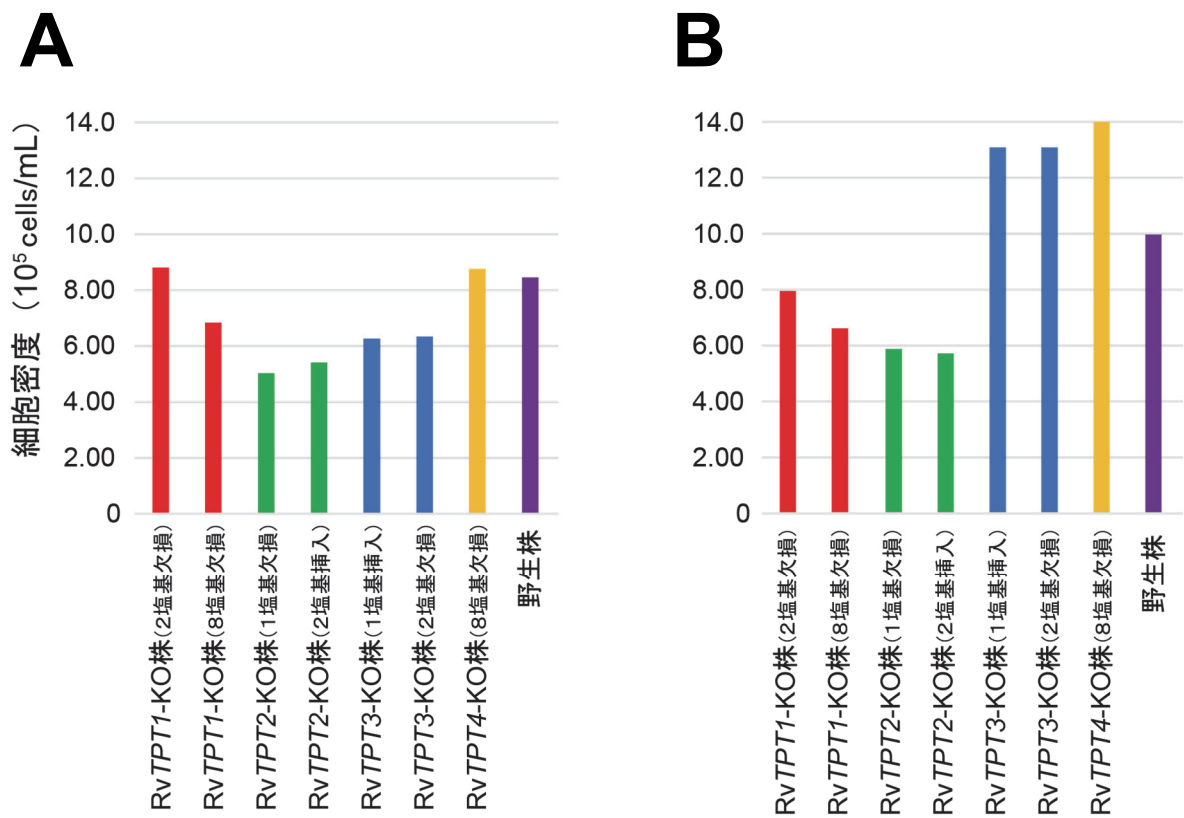
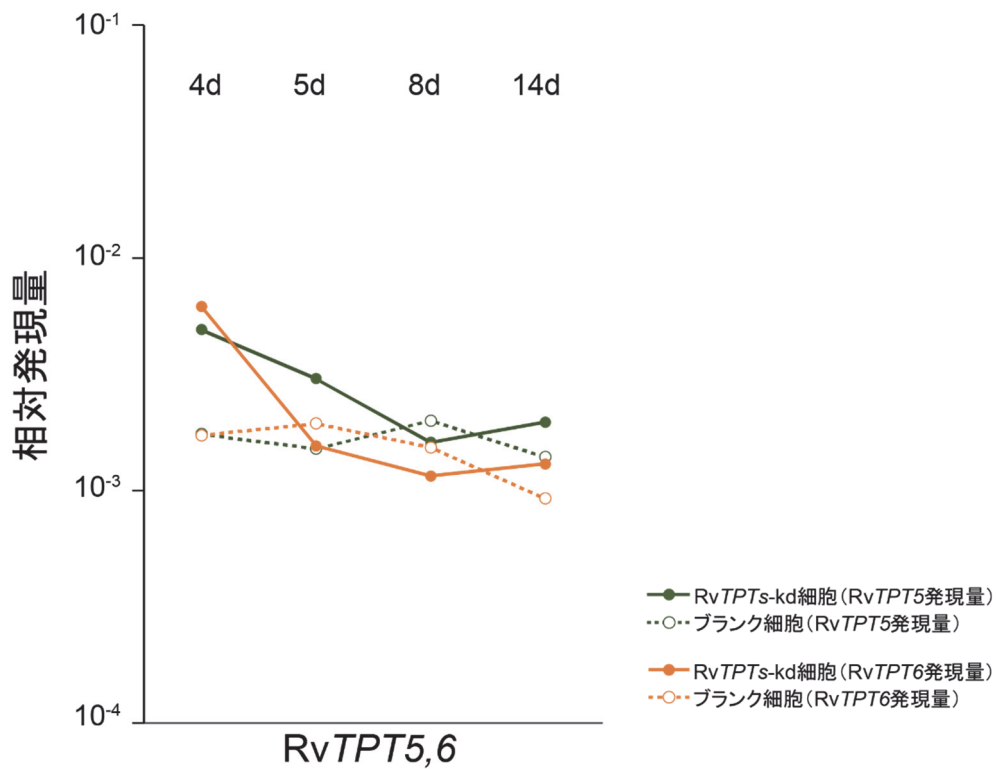


図 3-7. RvTPT-KO 株の細胞密度

A: 盗葉緑体獲得から 7 日後の *Rapaza viridis* 細胞密度 **B:** 盗葉緑体獲得から 8 日後の細胞密度。A と B は独立した実験系。培養開始時に *R. viridis* 細胞数の 3 倍量の *Tetraselmis* sp. を与えた。それぞれの RvTPT ノックアウト株は単離培養されたクローン株。



RvTPTs-kd細胞とブランク細胞のTPT発現量の比較

(kd細胞での発現量/ブランク細胞での発現量)

	4d	5d	8d	14d
RvTPT5	280%	200%	81%	140%
RvTPT6	360%	80%	75%	140%

図 3-8. RvTPT1-4 の同時ノックダウンによる RvTPT5,6 の発現量変化

α -tubulin 転写量でノーマライズした RvTPT5, 6 それぞれの転写量。横軸は、2 回目のノックダウン実験からの経過日数を示す。破線: RvTPT1-4 の全遺伝子同時ノックダウン細胞 (RvTPTs-kd 細胞)。実線: ノックダウン実験のコントロールとした野生株 (ブランク細胞)。

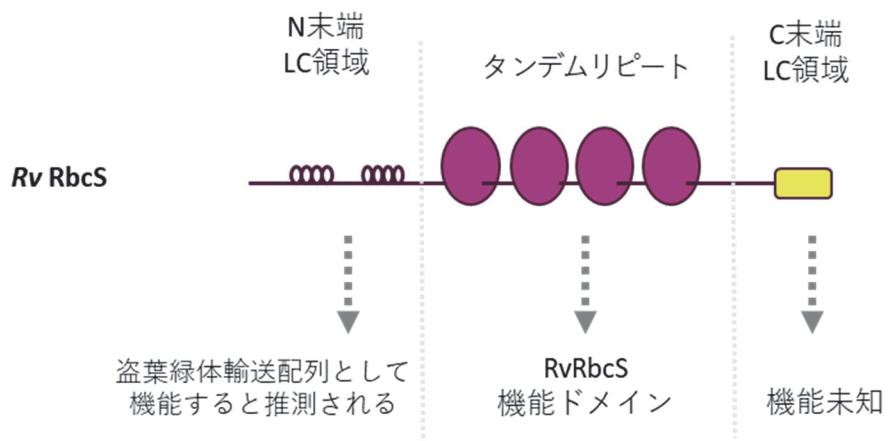


図 3-9. RvRbcS 構造の概念図

RvRbcS は 4 つの機能ドメインがタンデムにリピートした構造をとる。N 末端と C 末端の両方には低複雑性 (low complexity; LC) 領域が存在した。

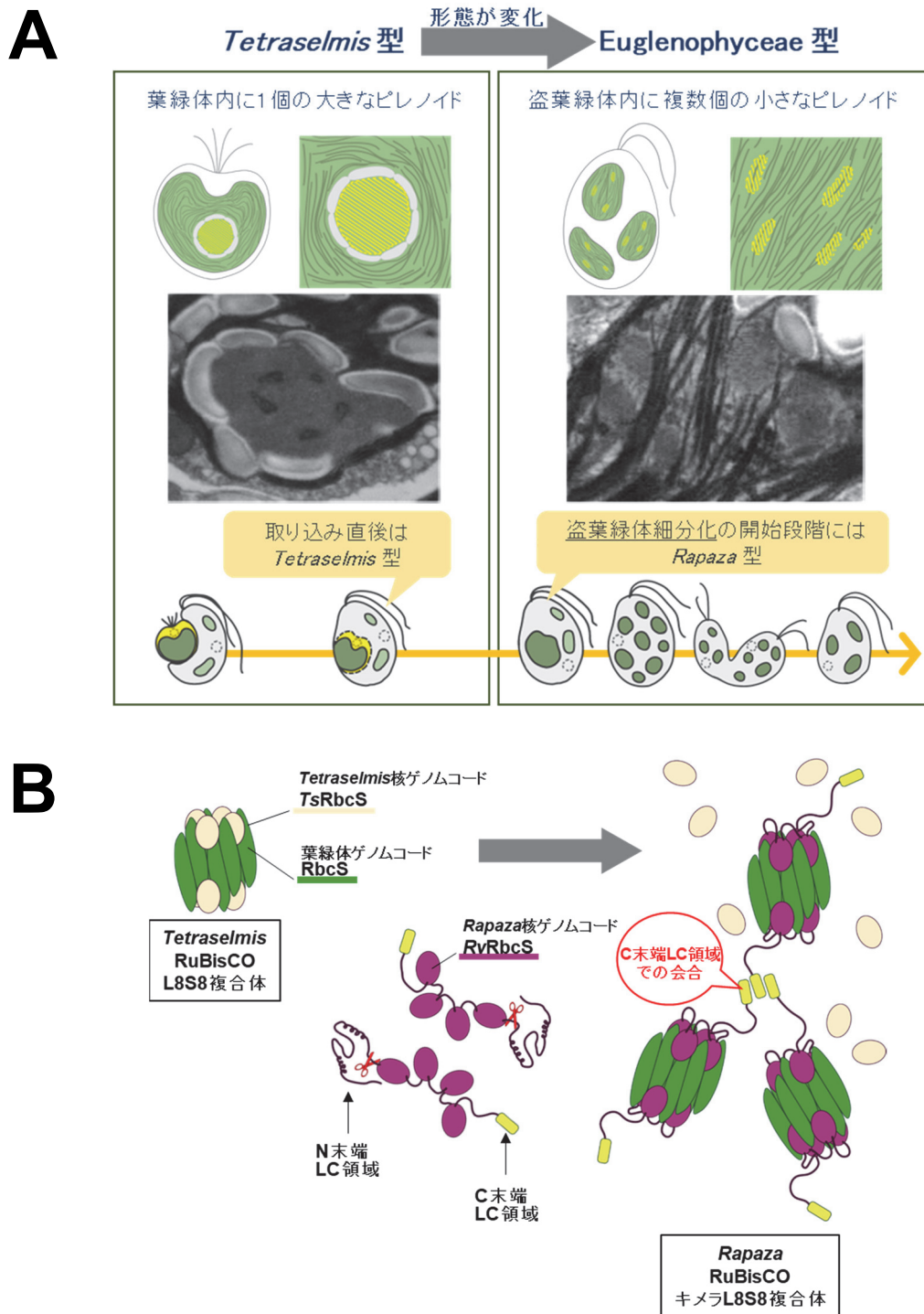


図 3-10. *RvRbcS* 機能についての作業仮説

A: *Rapaza viridis* の盗葉緑体形成時におけるピレノイド構造の変化。盗葉緑体形成時には、*Tetraselmis* sp.の緑藻型のピレノイド形態から、Euglenophyceae 型のピレノイド形態へ変化する様子が観察される (Yamaguchi *et al.* 2012; 丸山 2018; Karnkowska *et al.* 2023)。**B:** *RvRbcS* 機能についての作業仮説。*RvRbcS* の C 末端配列は特定のアミノ酸を多く含む SYGQ リッチであることから液-液相分離に関与することが考えられた。盗葉緑体形成時におけるピレノイド形態の変化には、*RvRbcS* の C 末端領域が関与することが予測された。

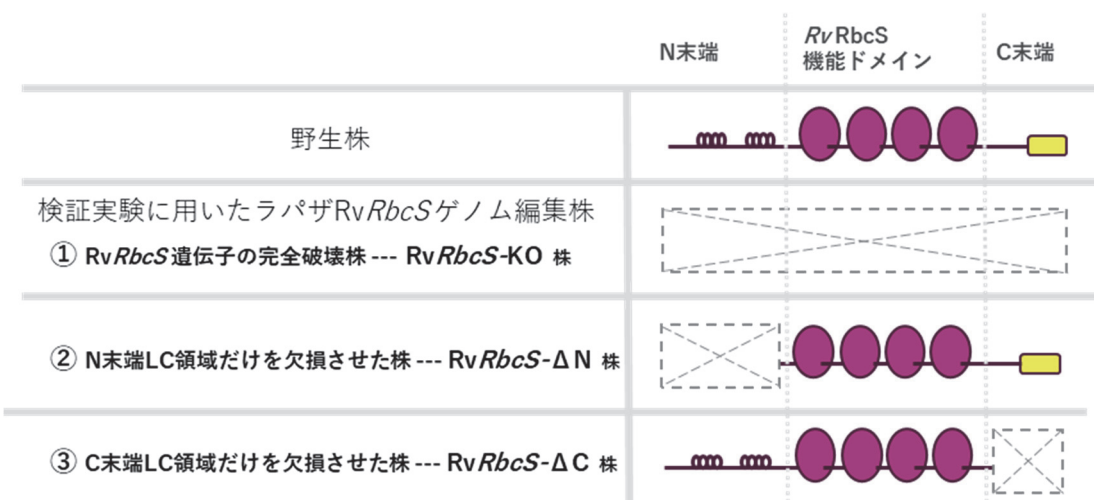


図 3-11. *RvRbcS* 検証実験に使用したゲノム編集株の構造

CRISPR/Cas9 システムによるノックアウト実験から得られた 3 種類の *RvRbcS* ゲノム編集株の予想される *RvRbcS* ペプチド分子の構造の概念図。

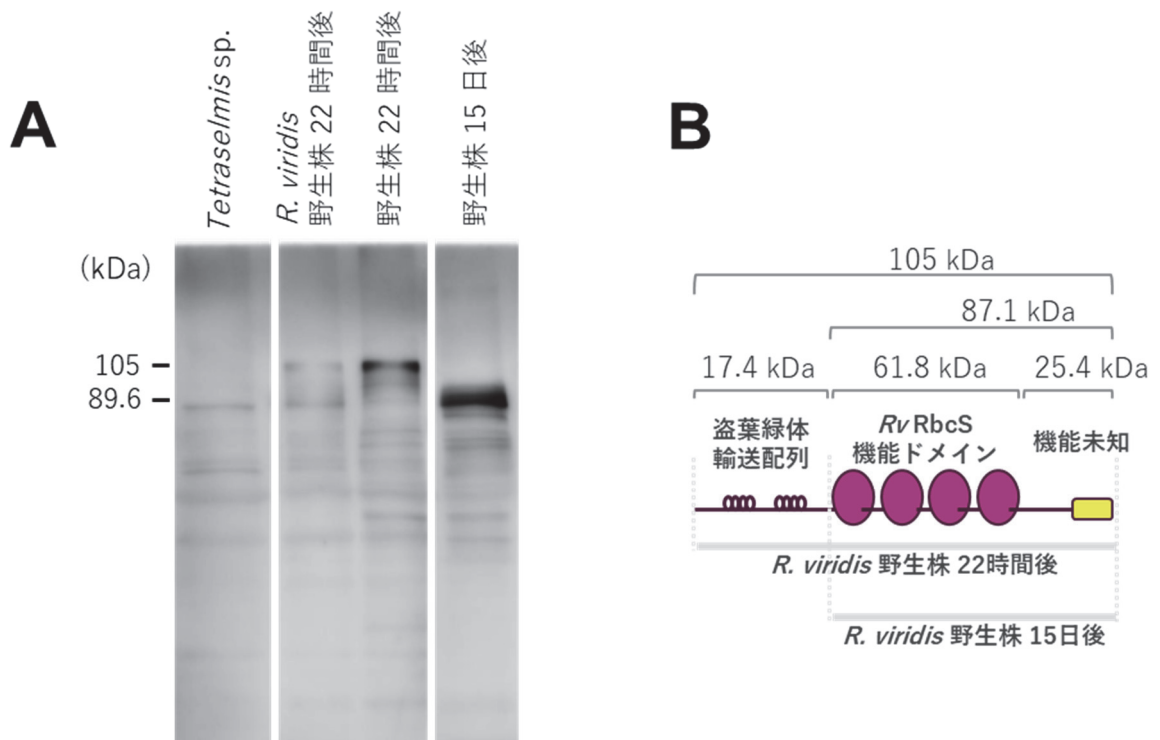


図 3-12. *Tetraselmis* sp.を捕食してから 22 時間後と 15 日後の *Rapaza viridis* の SDS-PAGE-ウエスタンブロッティング (抗 *RvRbcS* 抗体で検出)

A:ウエスタンブロッティングの結果。*Tetraselmis* sp.獲得から 22 時間後の *R. viridis* 野生株で検出された分子量サイズは 105 kDa, 15 日後は 89.6 kDa となった。 **B:**各細胞サンプルで予想される *RvRbcS* 分子構造の概念図と予測されるペプチドのサイズ。

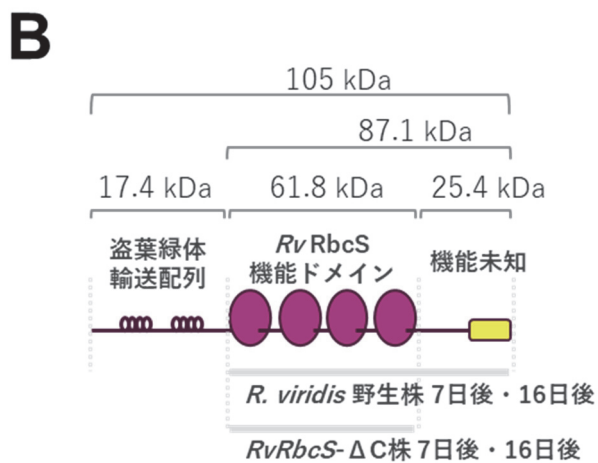
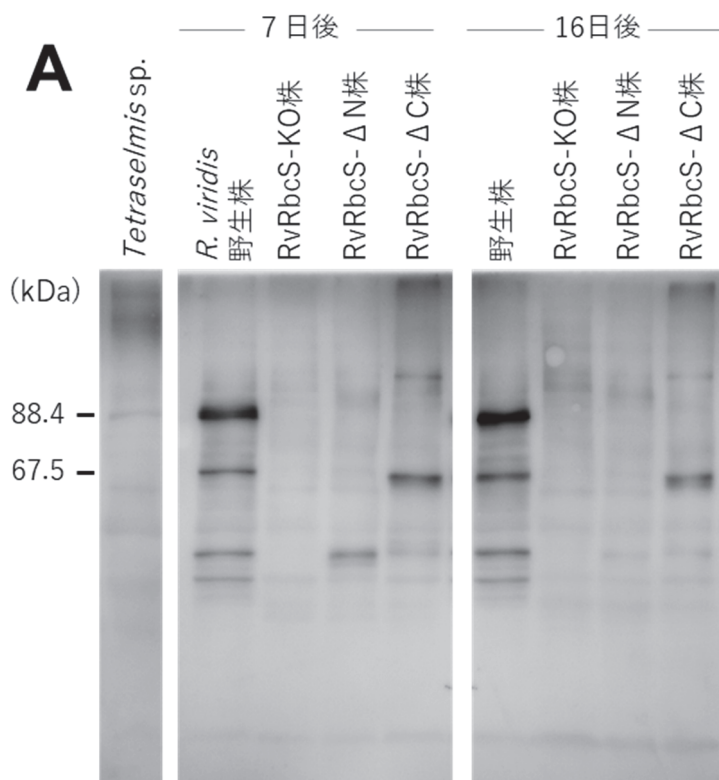


図 3-13. :盗葉緑体獲得から 7 日後と 16 日後の *RvRbcS* ゲノム編集株の SDS-PAGE-ウエスタンブロットティング (抗 *RvRbcS* 抗体で検出)。

A:ウエスタンブロットティングの結果。野生株では、N 末端程度分短いサイズと N 末端と C 末端分短いサイズが検出された。 *RvRbcS*- Δ C 株では N 末端と C 末端分短いサイズが検出され、 *RvRbcS*-KO 株と *RvRbcS*- Δ N 株では *RvRbcS* のバンドは検出されなかった。 **B:**各細胞サンプルで予想される *RvRbcS* 分子構造の概念図と予測されるペプチドのサイズ。

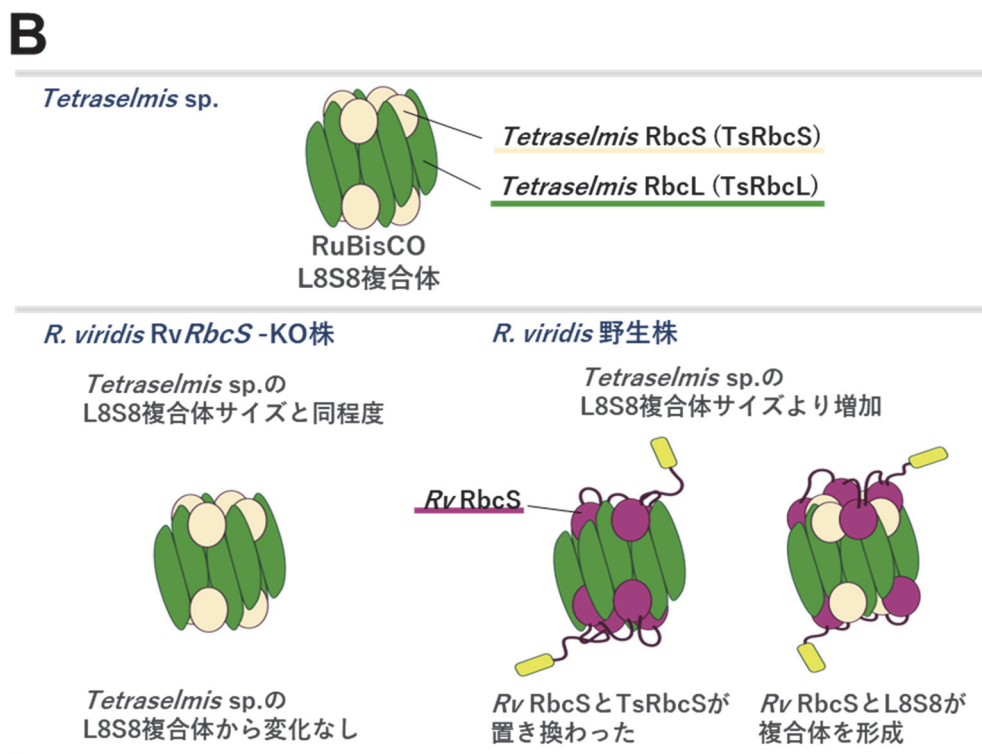
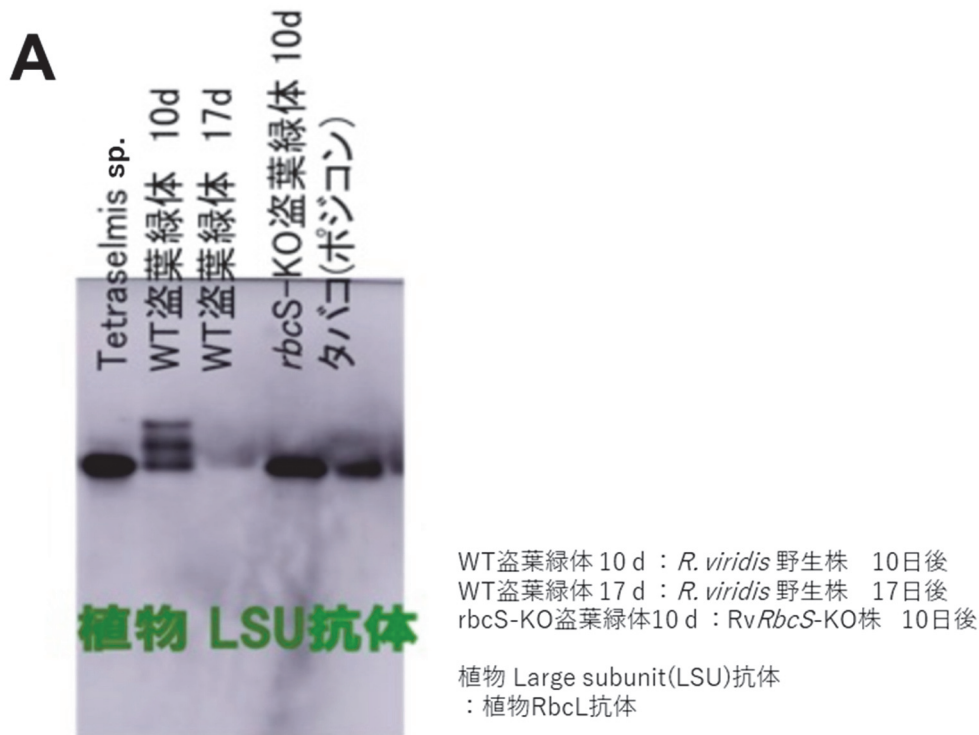


図 3-14. :Blue native PAGE-ウエスタンブロットニングによる RuBisCO 複合体の検出(抗植物 RbcL 抗体で検出)。A:ウエスタンブロットニングの結果。RvRbcS-KO 株では *Tetraselmis* sp.と同程度のサイズの分子種が検出された。対して野生株では *Tetraselmis* sp.と RvRbcS-KO 株よりもサイズが増加した分子種が 2 種類検出された。B: 予想される RuBisCO 複合体のイメージ図。

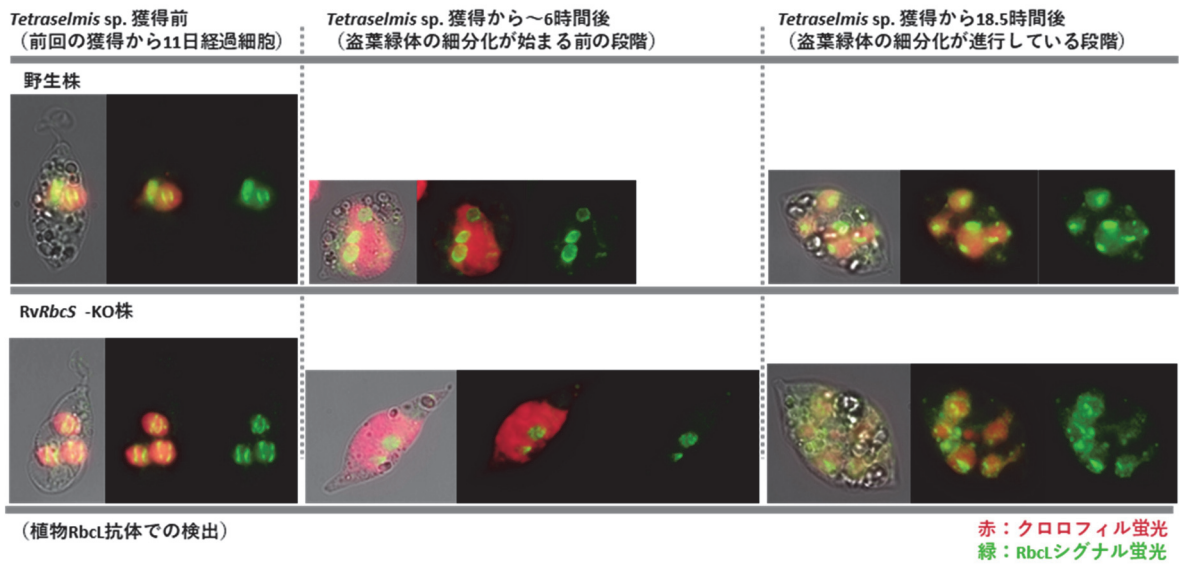


図 3-15. 免疫蛍光染色による *RvRbcS* タンパク質の局在の観察

野生株と *RvRbcS*-KO 株ともに, *Rapaza viridis* 型のピレノイド局在と似た, RbcL のシグナル蛍光が観察され, 野生株と *RvRbcS*-KO 株とで大きな差は認められなかった。

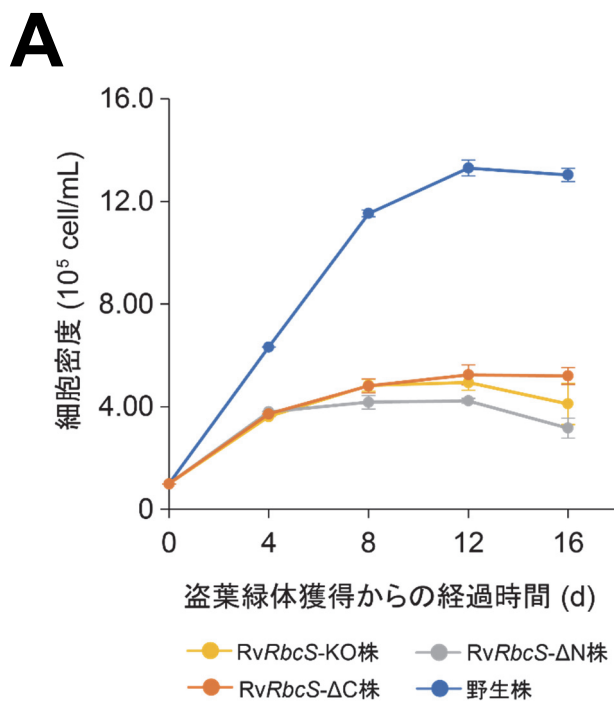
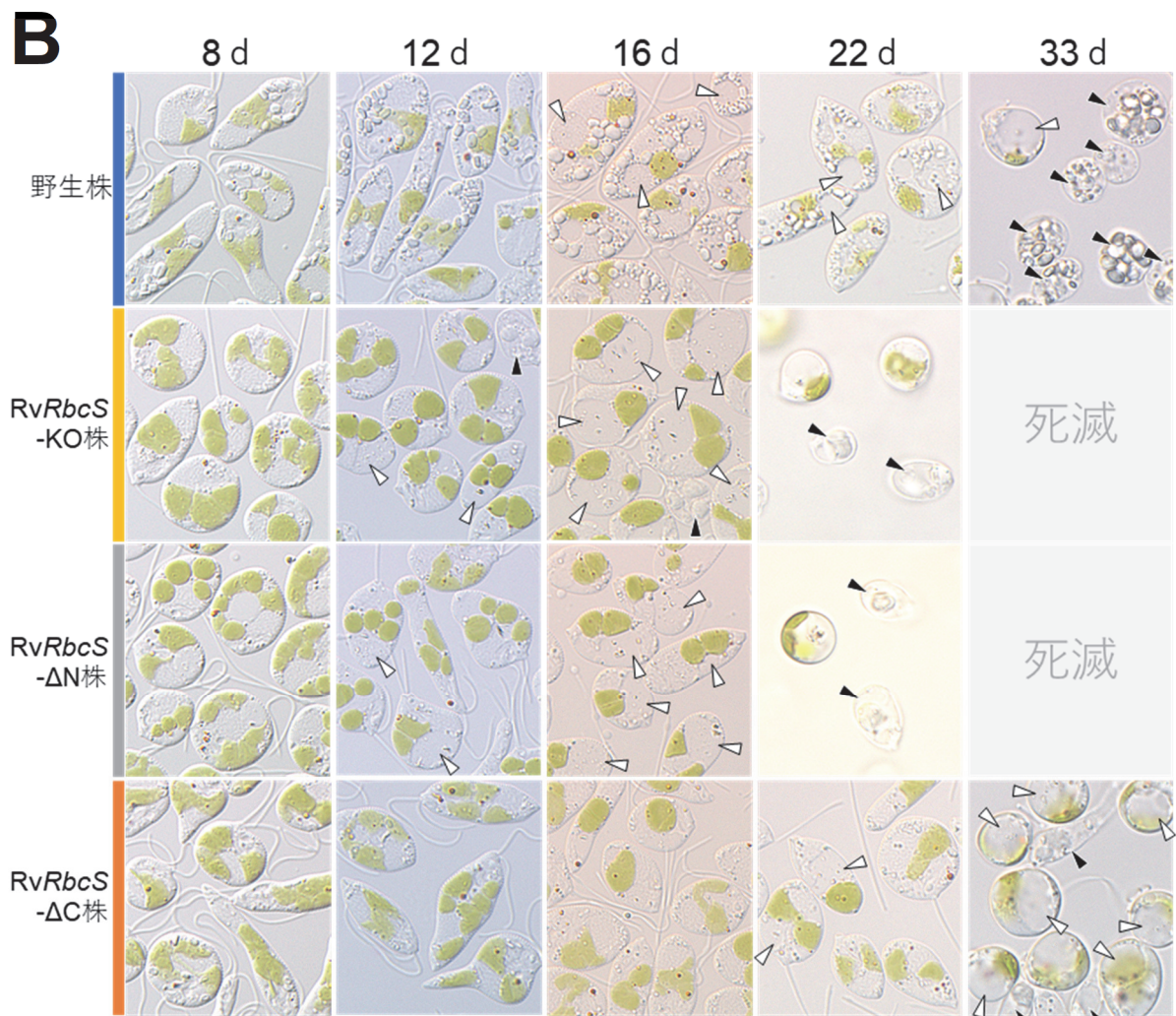


図 3-16. :RvRbcS ゲノム編集株の細胞増殖の時系列変化と形態の変化

A:細胞増殖の時系列変化。RvRbcS のゲノム編集株 3 種類は、野生株の 1/2-1/3 ほどの細胞増殖が低い水準に停滞した。また、野生株、RvRbcS-KO 株、RvRbcS-ΔN 株については、*Tetraselmis* sp. 獲得 12 日後を境に細胞密度が低下したのに対し、RvRbcS-ΔC 株は停滞した。値は平均値±標準誤差で示す (n=3; 4d のみ n=1)。**B:**形態の変化。野生株では細胞内に明瞭な多糖顆粒の蓄積が観察されたのに対し、3 種類の RvRbcS ゲノム編集株では、明瞭な多糖顆粒の蓄積は観察されなかった。また、RvRbcS-KO 株、RvRbcS-ΔN 株は野生株よりも生存期間が短く、RvRbcS-ΔC 株は長い結果となった。液胞 (白矢尻)、死細胞 (黒矢尻)。



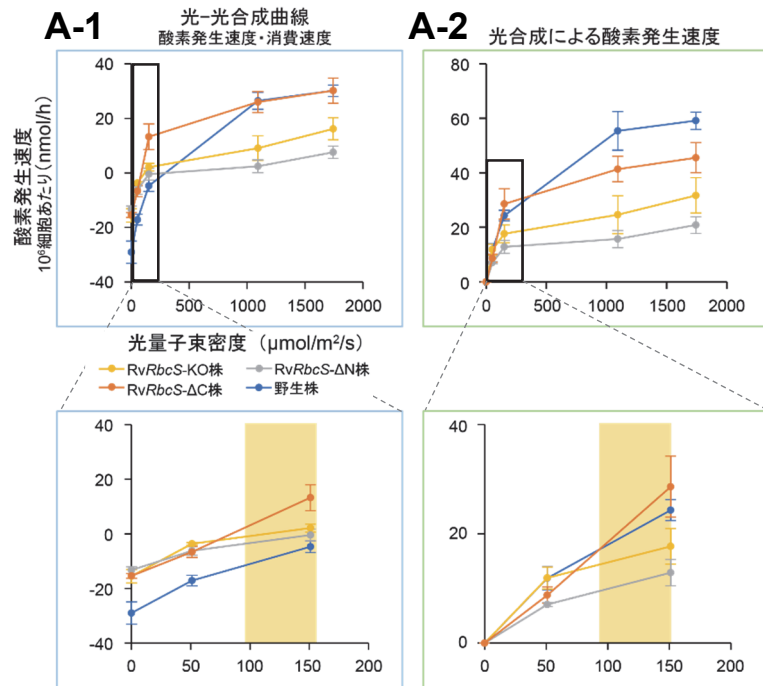
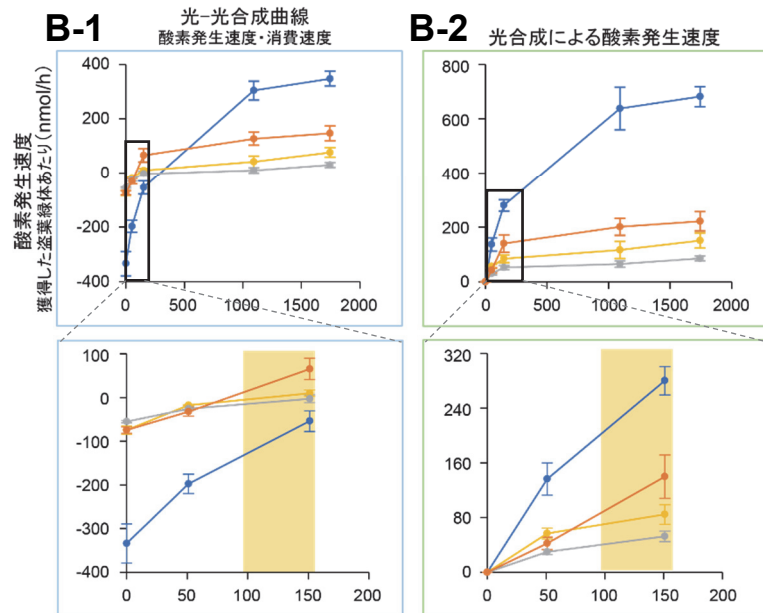
A**B**

図 3-17. :RvRbcS-KO 株の光合成活性

A:細胞あたりの光合成活性。**A-1:**細胞あたりの酸素発生速度・消費速度。RvRbcS ゲノム編集株の呼吸速度は野生株よりも低い値となった。**A-2:**細胞あたりの光合成による酸素発生速度。光合成による酸素発生速度は、酸素発生速度から酸素消費速度を差し引いて算出した。培養時の光強度では、RvRbcS-ΔC 株は野生株と同程度の光合成による酸素発生速度となった。**B:**盗葉緑体あたりの光合成活性。**B-1:**盗葉緑体あたりの酸素発生速度・消費速度。RvRbcS ゲノム編集株の呼吸速度は野生株よりも低い値となった。**B-2:**盗葉緑体あたりの光合成による酸素発生速度。培養時の光強度では、RvRbcSゲノム編集株3種類の光合成による酸素発生速度は、野生株よりも有意に低い値となった。培養庫の光強度:約 100-150 μmol/m²/s(黄色ハイライト)。値は平均値±標準誤差で示す(n=3)。

第 4 章

水平転移した硝酸同化経路関連の遺伝子群の発現と機能解析

4-1. 背景

第3章では, *Rapaza viridis* 核ゲノムコードのトリオースリン酸/リン酸輸送体様遺伝子群と RuBisCO 小サブユニット様遺伝子の機能検証をおこない, *R. viridis* の盗葉緑体において, これらのタンパク質が, それぞれ, 光合成産物のサイトゾルへの取り出し, RuBisCO の機能(活性)維持に関与することを示した。したがって, *R. viridis* では, 遺伝子の水平転移由来と考えられる葉緑体関連遺伝子が機能することにより, 光独立栄養性の生物と同様な, 炭酸固定による炭素源の獲得を可能としていることを明らかにした。

ところで, 光独立栄養性の生物では, 炭酸固定による有機炭素の獲得に加えて, 無機態窒素の同化による有機態窒素の獲得が同様に重要であり, 植物や藻類の葉緑体はこの過程にも深く関与している。窒素同化は最終的にアンモニウムイオン(NH_4^+)と有機酸が化合することによりおこなわれる。水圏環境では, 一部の富栄養環境を除いて, 独立栄養性の生物が利用できる無機態窒素は硝酸イオン(NO_3^-)に限定されるため, 硝酸イオンを利用する生化学的プロセスは, 海洋の光合成生物などでは特に重要である (Gruber 2008)。したがって, ほとんどの光独立栄養性の生物は, 硝酸イオンを二段階の還元反応を経てアンモニウムイオンに変換して利用する硝酸同化経路を有している。一般に, 植物や藻類では, まずサイトゾルに局在する硝酸還元酵素が硝酸イオンを亜硝酸イオン(NO_2^-)に還元し, 葉緑体ストロマに局在する亜硝酸還元酵素が亜硝酸イオンをアンモニウムイオンに還元する (Guerrero *et al.* 1981; Fernández and Galván 2008; Sanz-Luque *et al.* 2015)。一方, 従属栄養性の生物は外部から摂取する有機態窒素を利用することができるため, 無機態窒素の積極的な利用を必要とせず, 実際, 窒素同化経路など無機態窒素同化に関連する遺伝子群を欠いている。したがって, 葉緑体を獲得して従属栄養性の生物から光合成に

よる独立栄養性の生物に進化するためには、無機窒素同化のための代謝経路の確立が必要であったと考えられる。

本章では、*R. viridis* の無機態窒素の利用について検討した。*R. viridis* は従属栄養性の鞭毛虫の系統に属しており、近縁な藻類食鞭毛虫 *Peranema trichophorum* のような、食作用性従属細胞から進化したと想定される。しかし、*R. viridis* は盗葉緑体から供給される光合成産物を利用するため、一次的に供給される炭水化物から二次的にアミノ酸やその誘導体(核酸など)を生合成するために、無機態窒素も利用している可能性が高いと考えられた。実際、*R. viridis* 細胞は、盗葉緑体獲得後の約 1 週間に細胞分裂を繰り返しながら増殖が、細胞分裂はアンモニウムイオンや硝酸イオンなどの無機態窒素を含む培地でのみ観察される。このことから *R. viridis* は光合成による有機炭素の供給に加えて、無機窒素の同化利用が細胞の増殖に必須であることが示唆された。

そこで *R. viridis* のトランスクリプトームとドラフトゲノムのデータから窒素代謝関連の遺伝子を探索すると、従属栄養性の生物には通常存在しない硝酸還元酵素(Nitrate reductase; NaR)の遺伝子に高い相同性を示す遺伝子 *RvNaR* (*Rapaza viridis* NaR-like gene) の存在が明らかになった。アミノ酸配列に基づく分子系統解析の結果、*RvNaR* は全く系統関係の異なる生物からの遺伝子水平転移によって獲得されたものであることが示唆された。本章では、RNAi による遺伝子ノックダウン実験、および CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集実験から作出された *RvNaR* のノックアウト株についての培養・観察実験などを通して、野生株との表現型の比較を行うことで、その翻訳産物 *RvNaR* の機能検証をおこなった。

4-2. 実験方法

4-2-1. *RvNaR* 配列部分のゲノム DNA クローニング

RvNaR をコードする領域のゲノム DNA の塩基配列を, DNA-seq データベース (Kashiyama *et al.*, in prep.) に対して BLASTN 検索したところ, 5'-spliced leader 配列と 3'-poly(A) 配列を除いた mRNA の全配列を含む単一のコンティグが確認された。cDNA の配列に基づいて設計したプライマーを用いてゲノム DNA を PCR 増幅し, サンガー法によるシーケンシングにより塩基配列を確認・決定した。

4-2-2. 分子系統解析

RvNaR の翻訳ペプチド配列をクエリーとし, NCBI nr データベースおよび The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (Keeling *et al.* 2014) に対して BLASTP 検索することで系統解析用の配列データセットを構築した。さらに, 葉緑体ドナーの *Tetraselmis* sp. および *Rapaza viridis* の近縁種である *Eutreptiella* のホモログを RNA-seq データベースから取得し, データセットに追加した。配列データセットは MAFFT パッケージ v7.490 (Katoh *et al.* 2019) により標準パラメータの MAFFT アルゴリズムを用いて整列させ, trimAl 1.2rev57 (Capella-Gutierrez *et al.* 2009) によりトリミングをおこなった。極端に短い配列や明らかに相同性に問題が認められた配列を手動で除外した結果, 250 の OTU (Operational Taxonomic Unit) について, 611 のアミノ酸部位が残った。ML ツリー構築には IQ-TREE ソフトウェア v2.0.3 (Trifinopoulos *et al.* 2016) を使用し, LG+R8 モデルを採用し, ノンパラメトリックブートストラップ (100 複製) を計算した。こうして機械的に構築された系統樹について, *R. viridis* の配列とデータベース内の他の生物の配列との関係を調べるために, 手作業で系統樹をチェックした。なお, この分子系統解析は, 共同

研究者の谷藤吾朗博士(国立科学博物館)のご協力の下に実施された。

4-2-3. RNAi による RvNaR ノックダウン実験

RNAi による RvNaR のノックダウン実験には, *E. gracilis* の実験系として設計された方法 (Iseki *et al.* 2002; Nakazawa *et al.* 2015) を, *R. viridis* に適するよう以下のように改変した手法を用いた。まず, RvNaR 部分配列を PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を用いて 5'末端に T7 RNA ポリメラーゼプロモーター配列を付加する形で cDNA から PCR 増幅し(プライマー:T7_RvNaR_27Fw および T7_RvNaR_564Rv;表 4-1), PCR 産物は Wizard SV Minicolumns (プロメガ)を用いて精製された。次に, MEGAscript RNAi キット(Thermo Fisher Scientific)を用いて, 部分的な RvNaR 配列を含む二本鎖 RNA (dsRNA)を合成および精製した。*Rapaza viridis* 細胞内への dsRNA の導入には電ポレーション法を用いた。この実験には, 盗葉緑体ドナーとして *Tetraselmis sp.*を摂取させてから 6 日後の *R. viridis* 野生株を使用した。遠心分離により 8×10^6 細胞を回収し, 電ポレーションバッファー(表 4-2)で細胞を 3 回洗浄した。その後, 400 μ L の電ポレーションバッファーに細胞を再懸濁し, dsRNA 水溶液を添加した後, 氷水で容器を冷却して細胞の運動を鎮めた。全量をキューベット電極へ移し, 直ちに電圧を印加して(電ポレーション) dsRNA を細胞内に導入させた。電ポレーション条件を以下の表 4-2 にまとめる。また, dsRNA を電ポレーションバッファーに添加しない条件で同様の操作をおこなうことで作出された細胞を, ブランク細胞(電ポレーションのストレスに晒された野生株)とした。1 回目の電ポレーション実験後, 速やかに新鮮な培地に細胞を懸濁させ, 一晩暗所で培養したのち, 全ての細胞を

再び遠心分離により回収し、2 回目のエレクトロポレーション法による dsRNA の導入実験をおこない(これを「ノックダウン実験 0 日後」とした)、再び新鮮な培地に懸濁させて一晩暗所で培養した。その翌日に、全ての細胞を再び遠心分離により回収し、新しい培地に懸濁させると同時に、*R. viridis* の細胞数の 3 倍量の *Tetraselmis* sp.細胞を懸濁させて摂食させた(ノックダウン実験 1 日後)。なお、*R. viridis* は *Tetraselmis* sp.を与えた直後から捕食を開始するため、この日を「盗葉緑体獲得 0 日後」とした)。その翌日、細胞を再びすべて回収し、それぞれの実験培地に再懸濁させた(ノックダウン実験 2 日後;盗葉緑体獲得 1 日後)。

表 4-1 dsRNA 合成に使用したプライマー

T7_RvNaR	T7_RvNaR_27Fw CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTTAGCCCAAAGAAGCTTACCC
	T7_RvNaR_564Rv CTAATACGACTCACTATAGGGAGAAATGTCCCTGACTCGAACACCT

表 4-2 エレクトロポレーション条件

バッファー	500 mM Trehalose in sterilize seawater
細胞濃度	8×10 ⁶ 細胞 / 400 μL バッファー
dsRNA	RvNaR dsRNA 15 μg/1 回の導入
電圧	(50 μF・450 kV)×1 回の導入

4-2-4. CRISPR/Cas9 システムを用いた *RvNaR* ノックアウト実験から作出されたゲノム編集株

CRISPR/Cas9 システムを用いた *RvNaR* ノックアウト実験により, NHEJ エラーによる 3 種類の遺伝子破壊株が作出された。これらの遺伝子破壊株では, 遺伝子配列のうち *NaR* の機能ドメインをコードする領域の内部において, それぞれ, 1 塩基欠損, 1 塩基挿入, および 11 塩基挿入が起きたことで下流にフレームシフトが生じ, それらの翻訳産物の機能が失われていることが示唆された(図 4-1)。よって, 以下, これらの細胞を *RvNaR*-KO 細胞と呼ぶ。

4-2-5. 培養実験

Rapaza viridis と *Tetraselmis* sp. の維持培養には IMK 培地を使用した。IMK 培地には 2.4 mM の硝酸と 0.050 mM のアンモニウムを含まれる。維持培養は, 温度 20°C, 明暗周期(明期 14 時間:暗期 10 時間), 光強度は約 100-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ でおこなった。培養実験には 4 種類の実験培地を使用した。それぞれ, 無機窒素源として硝酸のみを含む培地(硝酸培地), アンモニアのみを含む培地(アンモニア培地), 無機窒素源を含まない培地(窒素フリー培地), 1/4 硝酸培地である。これらの実験培地は硝酸塩を成分から除いた f/2 培地をベースとした。その上で, 硝酸培地は終濃度 2.4 mM となるよう硝酸ナトリウムを, アンモニウム培地は終濃度 0.6 mM となるよう塩化アンモニウムを, 1/4 硝酸培地は終濃度 0.6 mM となるよう硝酸ナトリウムをそれぞれ添加した。窒素フリー培地は, 硝酸ナトリウムも塩化アンモニウムも添加しない上述のベース培地である。アンモニウム培地については, アンモニアによる細胞毒性を考慮し, 通常の f/2 培地における硝酸イオンの 1/4 のモル濃度となるよう調整された。またアンモニア培地を用いた

実験では、対照実験区として等モル濃度の 1/4 硝酸イオンを含む培地(1/4 硝酸培地)を使用した。培養実験開始時には、*R. viridis* 細胞数の 3 倍量の *Tetraselmis sp.* を与え盗葉緑体を獲得させた。なお、*R. viridis* は *Tetraselmis sp.* を与えた直後から捕食を開始するため、この日を「盗葉緑体獲得 0 日後」とした。培養液中のすべての *Tetraselmis sp.* が *R. viridis* に取り込まれたことを顕微鏡で確認した後に、それぞれの実験培地に移した。この操作によって、盗葉緑体の獲得段階で培地の違いが影響する可能性を排除した。培養実験は、温度 20°C、明暗周期(明期 14 時間:暗期 10 時間)、光強度は約 100-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ でおこなった。また、細胞数のカウントには粒子計数分析装置(CDA-1000, Sysmex)を用いた。

4-2-6. 光学顕微鏡観察

細胞観察には、CCD カメラ(FX630, Olympus)を搭載した倒立顕微鏡(IX71, Olympus)を用いた。細胞を 2 枚のカバーガラスに挟み込み、細胞の遊泳運動を制限・制止させた状態で観察をおこなった。

4-2-7. qPCR による *RvNaR* の発現量の定量

RvNaR ノックダウン細胞ととブランク細胞をそれぞれ遠心分離によりペレット化して回収し、ISOGEN II(NIPPON GENE)を用いて total RNA を抽出し、そこから PrimeScript RT Reagent Kit (TaKaRa) を用いて逆転写することにより cDNA を取得した。各 *RvNaR* および α -tubulin 遺伝子の転写量を、表 4-3 に示したプライマーと KAPA SYBR Fast Universal(NIPPON Genetics)を用いてリアルタイム PCR システム(LightCycler 96 system, NIPPON Genetics) により分析した。

表 4-3 qPCR に使用したプライマー

α -tubulin	q-EgRvAtub_1221Fw GTACGTGGGAGAGGGTATGG q-EgRvAtub_1351Rv TTCCTCGACATCCTCCTCA
<i>RvNaR</i>	q-RvNaR_673Fw AAATCTATGAGCCCTACTGACGA q-RvNaR_782Rv CCGATAAATCCAGGGATAAGAAG

4-3. 結果

4-3-1. *Rapaza viridis* の *RvNaR* の系統解析

真核生物の既知の NaR のアミノ酸配列に関して分子系統解析をおこなった結果、*R. viridis* の配列については、他のいかなる生物群の配列とも有意な姉妹系統関係が示されなかった(図 4-1)。一方、先行研究において 18S rDNA 配列に基づいた系統解析から *R. viridis* の姉妹系統関係にあるとされたユーグレナ藻の NaR については、紅色植物と単一のクレードを形成することが示された。しかし、*R. viridis* の NaR は、このクレードには含まれなかった。ハプト藻や渦鞭毛藻、クリプト藻などの二次植物の系統については、それぞれ NaR の単系統性が明確に指示された。また、クリプト藻の NaR は紅色植物-ユーグレナ藻クレードのそれらと単一のクレードを形成する可能性が示された。一方、緑色植物(ストレプト植物および緑藻綱)と二次植物であるオクロ藻については、それぞれ、NaR の単系統性は支持されなかった。今回の解析では、系統樹の基部に近いノードのブートストラップ値は軒並み低いため、*R. viridis* の NaR の起源は明確にされなかった。

4-3-2. *Rapaza viridis* の RvNaR ノックダウンとノックアウト実験

RvNaR に関する RNAi 実験を行った細胞について、qPCR により RvNaR の転写量を調べた結果、野生株における発現量の約 1000 分の 1 の有意に低い値をとり、培養開始から 4 日後から 12 日後まで、この低い水準が保たれた(図 4-2)。以下、この細胞を RvNaR-kd 細胞と呼ぶ。

また、RvNaR の CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集実験では、1 種類の gRNA を作用させた 1 箇所の Can9 切断部位に対する NHEJ エラーによって、3 種類の遺伝子破壊株が得られた。すなわち、遺伝子配列のうち NaR 機能ドメインをコードする領域の内部において、それぞれ、1 塩基欠損、1 塩基挿入、および 11 塩基挿入が起きたことで下流にフレームシフトが生じ、それらの翻訳産物の機能が失われていることが示された(図 4-3)。以下、これらの細胞を RvNaR-KO 細胞と呼ぶ。

4-3-3. RvNaR ノックダウンとノックアウト細胞の硝酸培地での培養実験

RvNaR-kd 細胞, RvNaR-KO 細胞, ならびに, RNAi 実験におけるブランクのエレクトロポレーション処理をおこなった細胞(以下, ブランク細胞)および, 野生株細胞(RvNaR-KO 株のコントロール細胞)について, 無機態窒素源として硝酸イオンのみを含む培地(硝酸培地)および対照実験として無機態窒素源を含まない培地(窒素フリー培地)での培養実験をおこなった。その結果, 硝酸培地培養において, 野生株では高い細胞増殖が認められたのに対し, RvNaR-kd と RvNaR-KO 細胞では活発な細胞増殖が起こらず, 細胞密度が低い水準に保たれた(図 4-4:A, F)。窒素フリー培地では, 野生株細胞, RvNaR-kd

細胞, および *RvNaR-KO* 細胞のすべてにおいて同様に, 細胞密度が低い水準に保たれた(図 4-4:A, F)。すなわち, 硝酸培地では, 野生株は初期細胞密度から 22 倍まで増殖し, 約 5 回の細胞分裂があったことが示唆された。一方, 硝酸培地における *RvNaR-kd* 細胞と *RvNaR-KO* 細胞, および窒素フリー培地における野生株細胞と *RvNaR-kd* 細胞, および *RvNaR-KO* 細胞では, それぞれ, 初期細胞密度から約 4 倍まで増殖し, 約 2 回の細胞分裂があったことが示唆された。

また, これらの細胞の光学顕微鏡観察では, 窒素フリー培地において, 野生株細胞, *RvNaR-kd* 細胞, および *RvNaR-KO* 細胞のすべてにおいて同様に, サイトゾルへの多糖顆粒の蓄積が明瞭に認められた(図 4-4:C, E, H, J)。一方, 硝酸培地においては, 野生株細胞のサイトゾルへの多糖顆粒の蓄積は窒素フリー培地のそれと比較して有意に少なかった(図 4-4:D, I)。これに対して, *RvNaR-kd* 細胞と *RvNaR-KO* 細胞では, 窒素フリー培地と同程度の多糖顆粒の蓄積が認められた(図 4-4:B, G)。

4-3-2. *RvNaR* ノックアウト細胞のアンモニウム塩入り培地での培養実験

RvNaR-KO 細胞について, アンモニウムイオンのみを含む培地(アンモニウム培地)と, 対照実験としてアンモニウム培地のアンモニウムイオンと同モル量の硝酸イオンを含む培地(1/4 硝酸培地)での培養実験をおこなった。その結果, *RvNaR-KO* 細胞について, 1/4 硝酸培地では細胞増殖が低い水準に保たれるのに対し, アンモニウム培地では高い細胞増殖が認められた(図 4-5:A)。

また, これらの細胞の光学顕微鏡観察では, 1/4 硝酸培地で培養した *RvNaR-KO* 細胞においては明瞭な多糖顆粒の蓄積が認められた(図 4-5:C)のに対し, アンモニウム培地で培養した *RvNaR-KO* 細

胞においては非常に少ない多糖顆粒の蓄積が認められた(図 4-5:E)。1/4 硝酸培地で培養した野生株細胞と比較して、アンモニウム培地で培養した野生株細胞と *RvNaR-KO* 細胞では、ともに多糖顆粒が小さく数が少なかった(図 4-5:D, E)。

4-4. 考察

以前の研究から、*Rapaza viridis* は、生存生育のために必要な有機態炭素を盗葉緑体の光合成により獲得していることが示されていた(丸山修士論文 2018)。ここで利用される盗葉緑体は *R. viridis* が盗葉緑体ドナーである *Tetraselmis sp.*を食作用により細胞内に取り込むことで獲得されるが、*Tetraselmis sp.*の核と葉緑体以外の細胞質は、摂取後に早い段階で除去される(2章)。さらに、*R. viridis* がその他の細胞を餌(栄養源)として食作用により取り込む例は報告されておらず、浸透栄養により有機物を得て従属栄養的に活動するといった知見もなく、そのような培養実験の試みも全て成功していない。このように *R. viridis* は炭素源を光合成から供給され得る一次的な有機炭素である炭水化物にほぼ完全に依存していると考えられるので、その他の生元素、特に窒素に関しても、培地から得られる無機窒素に依存していると考えられた。実際、*R. viridis* 細胞は、従来、潜在的な窒素源としてアンモニウムイオンおよび/または硝酸イオンなどの無機窒素種を含む海洋性微細藻類培地である IMK 培地で維持されてきた。

本章の研究から、有機態窒素に関しても、硝酸イオンあるいはアンモニウムイオンの無機態窒素を同化しており、これによりアミノ酸を生合成して細胞増殖を可能にしていることが強く示唆された。野生株では、培地中に窒素源がない場合には有意な細胞増殖は起こらなかったが、硝酸イオンやアンモニウム

イオンを含む培地では、有意な細胞増殖が認められた(図 4-4: A, F, 図 4-5: A)。このような無機態窒素欠乏下では、*R. viridis* 細胞のサイトゾルに多糖顆粒の蓄積が促進された(図 4-4: E, J)。これは、窒素欠乏条件下で光独立培養をおこなった際のユーグレナ藻 *Euglena gracilis* で認められるパラミロン(多糖)顆粒の蓄積亢進現象と酷似している(Coleman *et al.* 1988)。*E. gracilis* の場合では、無機態窒素の供給が無いためにアミノ酸合成が阻害された結果、余剰となった光合成産物が多糖顆粒として蓄積したと考察されている(Coleman *et al.* 1988)。また、無機態窒素欠乏下においても、*R. viridis* は約 2 回の細胞分裂をしたが(図 4-4: A, F, 図 4-5: A)、緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* では、窒素欠乏条件下において生じた細胞分裂は、細胞内に蓄積していた有機窒素を利用して進行したものであるとされている(Schmollinger *et al.* 2014)。

特に、*R. viridis* による硝酸同化に関しては、*R. viridis* が独自の硝酸還元酵素(RvNaR)を機能させることで、従属栄養性の生物の系統には通常認められないこの代謝を実現していることが示された。*R. viridis* の核ゲノムにコードされた RvNaR 遺伝子をノックダウンないしノックアウトした細胞では、硝酸イオンが存在する培養条件下においても、無機態窒素が含まれない培養条件下と同様に細胞の増殖が抑制され(図 4-4: A, F, 図 4-5: A)、かつ、サイトゾルへの多糖顆粒の蓄積が促進された(図 4-4: B, G, 図 4-5: C)。したがってこの遺伝子の翻訳産物である RvNaR は *R. viridis* において硝酸還元を担う酵素として実際に機能していると考えられた。また、RvNaR のアミノ酸配列には、盗葉緑体標的配列(Karnkowska *et al.* 2023)が含まれていないことから、植物や他の藻類同様に、RvNaR は *R. viridis* サイトゾルで局在発現し、硝酸の亜硝酸への還元を触媒していると考えられる。

これまで他の生物で報告されている盗葉緑体现象のうち、硝酸イオンの利用については、宿主生物のゲノム DNA に硝酸還元酵素遺伝子が存在するという明確な根拠は報告されていない。盗葉緑体现象を示す繊毛虫 *Mesodinium rubrum* は、クリプト藻を盗葉緑体ドナーとし、そのドナーの細胞質(核やヌクレオモルフを含む)を保持している(Wisecaver and Hackett 2010; Kim *et al.*2012)。したがって、この繊毛虫について報告された硝酸同化作用(Tong *et al.* 2015)は、盗葉緑体ドナーのサイトゾルに発現しているクリプト藻の硝酸還元酵素の活性によるものである可能性が高いと考えられる。ただし、硝酸イオンを細胞内に取り込むためには、硝酸イオントランスポーターが宿主の細胞膜に発現している必要がある。一方、*R. viridis* や渦鞭毛藻の *Dinophysis* 属による盗葉緑体现象では、取り込んだ藻類細胞のうち葉緑体のみが保持され、盗葉緑体ドナーの核や他の細胞質は保持されない(Wisecaver and Hackett 2010; Kim *et al.*2012)。このうち、*Dinophysis spp.*では培地中の硝酸イオンの同化が認められないことが報告されている(García-Portela *et al.* 2020; Hattenrath-lehmann *et al.* 2021)。*Dinophysis acuminata* の場合、盗葉緑体による光合成により有機炭素が供給され、培地中のアンモニウムイオンの同化により有機態窒素が生合成される。

条件著しい細胞増殖が認められており、光合成により得た有機炭素と釣り合いをとるために、無機態窒素の同化が必要であると想定された(Hattenrath-lehmann *et al.* 2021)。しかし、*Dinophysis spp.*では硝酸還元酵素の明確な証拠は見つかっていない(García-Portela *et al.* 2020; Hattenrath-lehmann *et al.* 2021)。

無機窒素源として硝酸イオンを利用できることは、有機体窒素を含む有機物を外部から獲得する必

要性から解放され、より独立栄養的な盗葉緑体现象が実現できるため、海洋などの生物密度が低く溶存有機物も少ない環境では、*R. viridis* にとって生態学的に有利であると考えられる。実際の海洋表層環境では、ほとんどの場合、利用可能な唯一の主要な無機窒素源は硝酸イオンであり、アンモニウムイオンが実験培養環境下のように十分な濃度で存在することは稀である (Gruber 2008)。また、高濃度のアンモニウムイオンは細胞毒性を示し、実際、標準的な海産性藻類の培地の硝酸イオンと等モル量のアンモニウムイオンを含む合成培地では、*R. viridis* 細胞の増殖が著しく阻害される。このことは、*R. viridis* がアンモニウムイオンの補助的な利用可能性を維持しながらも (アンモニウムイオン細胞膜トランスポーターの存在が示唆される)、硝酸イオンの利用を中心とした窒素代謝を発達させていることを示唆する。硝酸同化経路は海洋性の光独立栄養性の生物ではごく一般的であるが、盗葉緑体性生物を含む従属栄養性の生物において、その存在が分子生物学的ならびに生化学的な実験によって確認されたのは、今回の *R. viridis* が初めての例となる。

盗葉緑体现象を示す *R. viridis* が有する *RvNaR* 遺伝子の起源には、盗葉緑体ドナーである *Tetraselmis* sp.からの遺伝子の水平転移が 1 つの仮説として考えられた。本章の研究におけるアミノ酸配列の分子系統樹では、基部に近いノードのブートストラップ値が軒並み低かったため、*RvNaR* と盗葉緑体ドナー *Tetraselmis* sp., および *Tetraselmis* 属の *NaR* との系統関係を統計学的に検証することはできなかった。ただし、これらの配列は大きく異なっており、少なくともごく最近の水平転移による可能性は低いと考えられる。一方、*R. viridis* の姉妹系統である *Euglenophyceae* の *NaR* は、すべての紅藻類と強いつながりをもつ単系統クレードが形成された (図 4-2)。この結果からは、*Euglenophyceae* が生物学的には系統の

かけ離れた紅藻類からの遺伝子水平転移によって *NaR* を獲得したことが強く示唆される。しかし、興味深いことに、*RvNaR* はこのクレードには含まれなかった。このことから、*R. viridis* による *RvNaR* の獲得は、Euglenophyceae による *NaR* の獲得とは独立な進化的イベントであり、Euglenophyceae とは異なる系統の何らかの生物から遺伝子水平転移によるものであったことが分かった。*RvNaR* の獲得は、*R. viridis* が盗葉緑体性の光独立栄養性の生物に進化するための重要な要因であったと考えられる。

硝酸同化経路が正しく機能するためには、*NaR* だけでなく、他の様々な機構が必要である。光合成細胞は、硝酸イオンを細胞内に取り込むため、細胞膜に硝酸イオントランスポーター (nitrate transporter; NRT) を発現させている (Fernández and Galván 2008)。NRT については、*R. viridis* において、トランスクリプトームデータから探索された硝酸トランスポーターに高い相同性を示す遺伝子の翻訳産物が、実際に NRT として機能することが明らかにされた (大橋卒業論文 2022)。また、他には、*NaR* によって生成される亜硝酸イオンを還元する亜硝酸還元酵素や、亜硝酸イオンを亜硝酸還元酵素の局在箇所 (通常は葉緑体ストロマ) へ運ぶ膜輸送体、また、有害な亜硝酸イオンやアンモニウムイオンの蓄積を防ぐフィードバック制御機構など、他の様々な機能因子が必要であると考えられる (Stitt and Krapp 1999; Galván and Fernández 2001)。*R. viridis* においてもこれらの機構が存在することが示唆されるが、存在はまだ明らかにされていない。このような無機態窒素代謝の全体像についての知見を得ることは、盗葉緑体现象に至った *R. viridis* の進化の過程を理解するために重要であると考えられる。

4-5. 結論

Rapaza viridis の核ゲノムにコードされている硝酸還元酵素様遺伝子 *RvNaR* は、実際に *R. viridis* の硝酸同化において必要な機能を果たしていることが示された。本章の研究は、盗葉緑体性生物ならびに従属栄養性の生物の系統に属する真の葉緑体を有しない生物において、硝酸同化経路の存在が分子生物学および生化学的に示された初めての例である。また、*RvNaR* は、*R. viridis* の姉妹系統である Euglenophyceae の有する *NaR* とは起源が明確に異なり、独立の遺伝子水平転移によって獲得されたものであることが示された。硝酸イオンを利用できることは光合成に依存した生理を示す生物にとって生態学的に有利であり、*RvNaR* の獲得は、*R. viridis* が盗葉緑体を利用した光独立栄養性の生物へと進化するために重要な要素のひとつであったと考えられた。

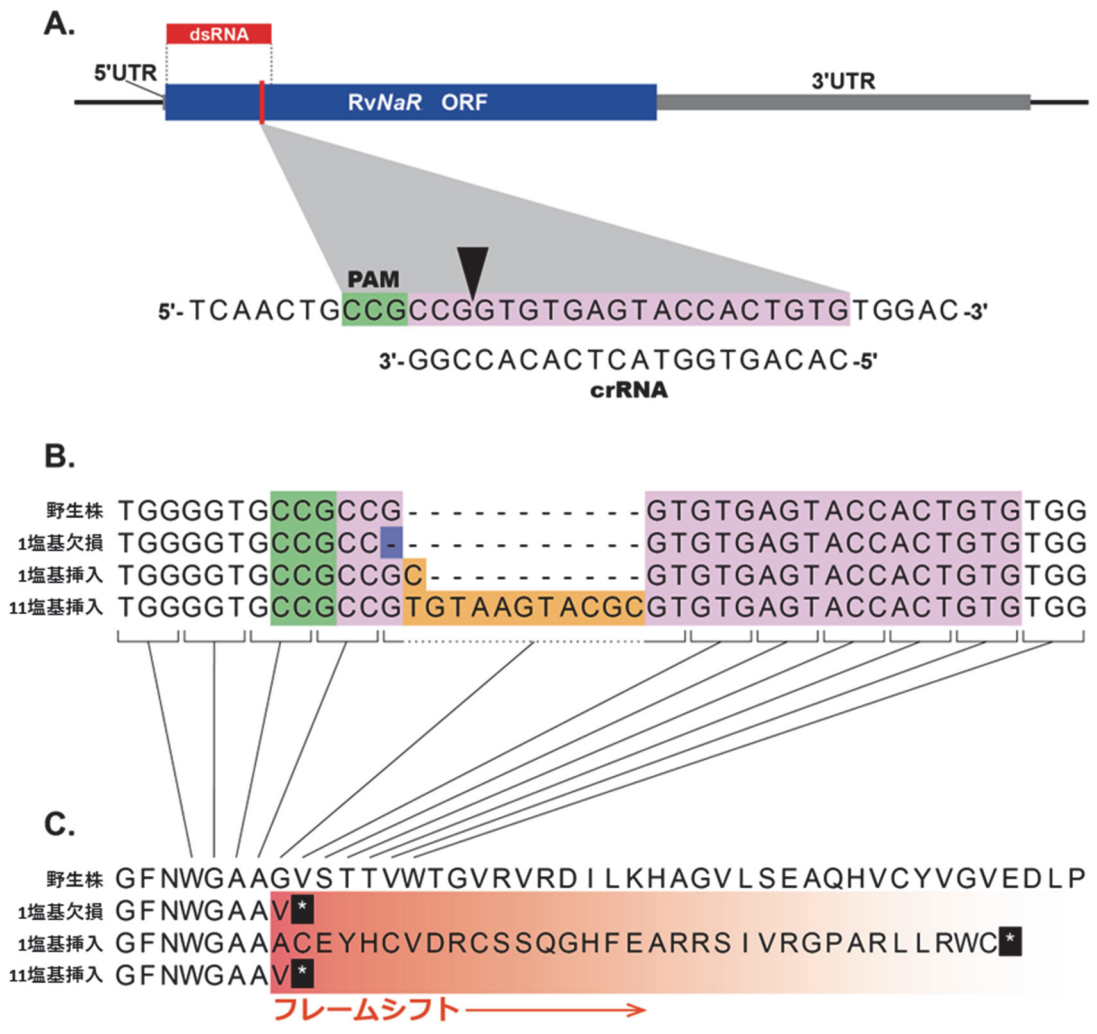


図 4-1. *RvNaR* のゲノム編集

A:ゲノム編集のターゲット(ピンク色のハイライト箇所)位置および PAM 配列(緑色のハイライト箇所)位置を示す *RvNaR* の模式図。矢尻は Cas9 切断部位を示す。B:野生株と3種類の *RvNaR*-KO 株の DNA 配列の比較。削除された塩基対は紫色で、挿入された塩基対はオレンジ色で示す。C:野生株および *RvNaR*-KO 株で予測されるアミノ酸配列。アスタリスク(*)は、*RvNaR*-KO 株でのストップコドンによる翻訳終了を示す。

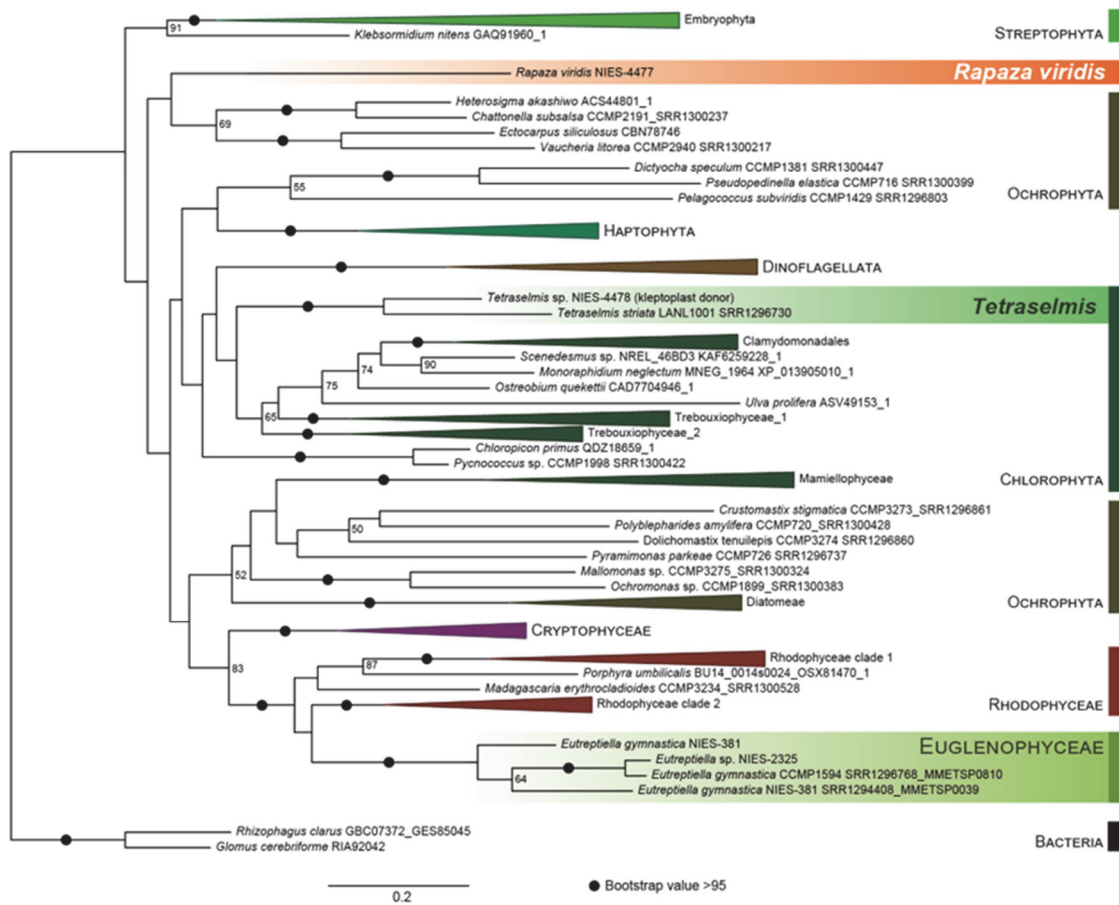


図 4-2. *RvNaR* の系統関係

硝酸還元酵素の系統は、*Rapaza viridis* のホモログと *R. viridis* の姉妹群である Euglenophyceae のホモログは独立した進化起源(すなわち、独立した遺伝子の水平転移による獲得)を示唆するものであった。IQ-TREE で 100 回ブートストラップして推定した NaR の最尤法系統樹。黒丸(●)は、ブートストラップによる支持率が 95%以上、50%以下は表記なし。

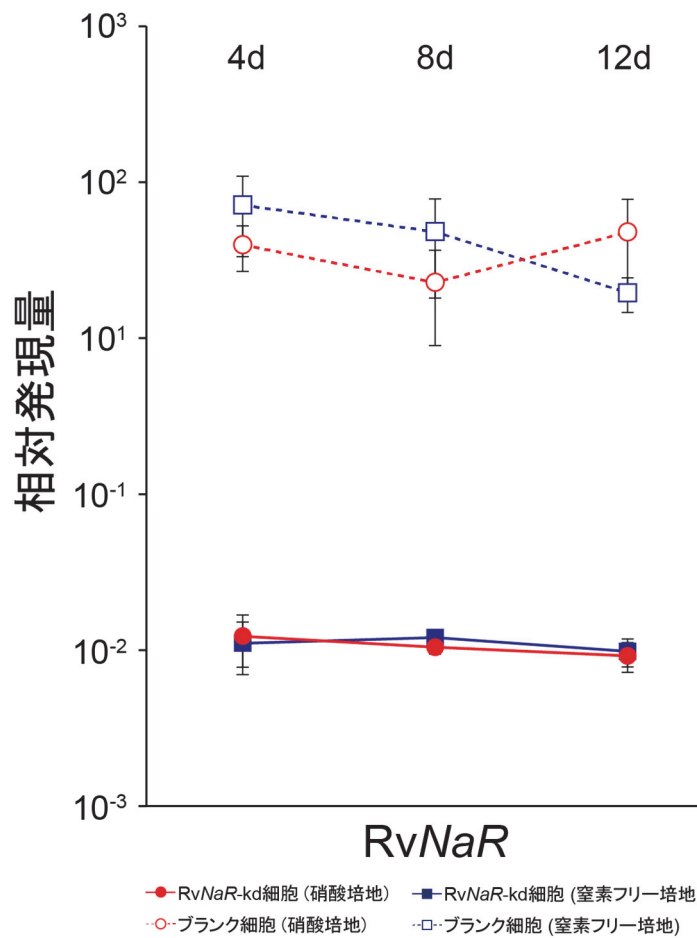


図 4-3. qPCR による RvNaR の転写レベルの定量評価

α -tubulin 転写レベルでノーマライズした値を示す。RvNaR-kd 細胞の培養全体における RvNaR 発現は、ブランク細胞における発現の約 1/1000 に低下していることがわかる。値は平均値±標準誤差で示す(n=3)。

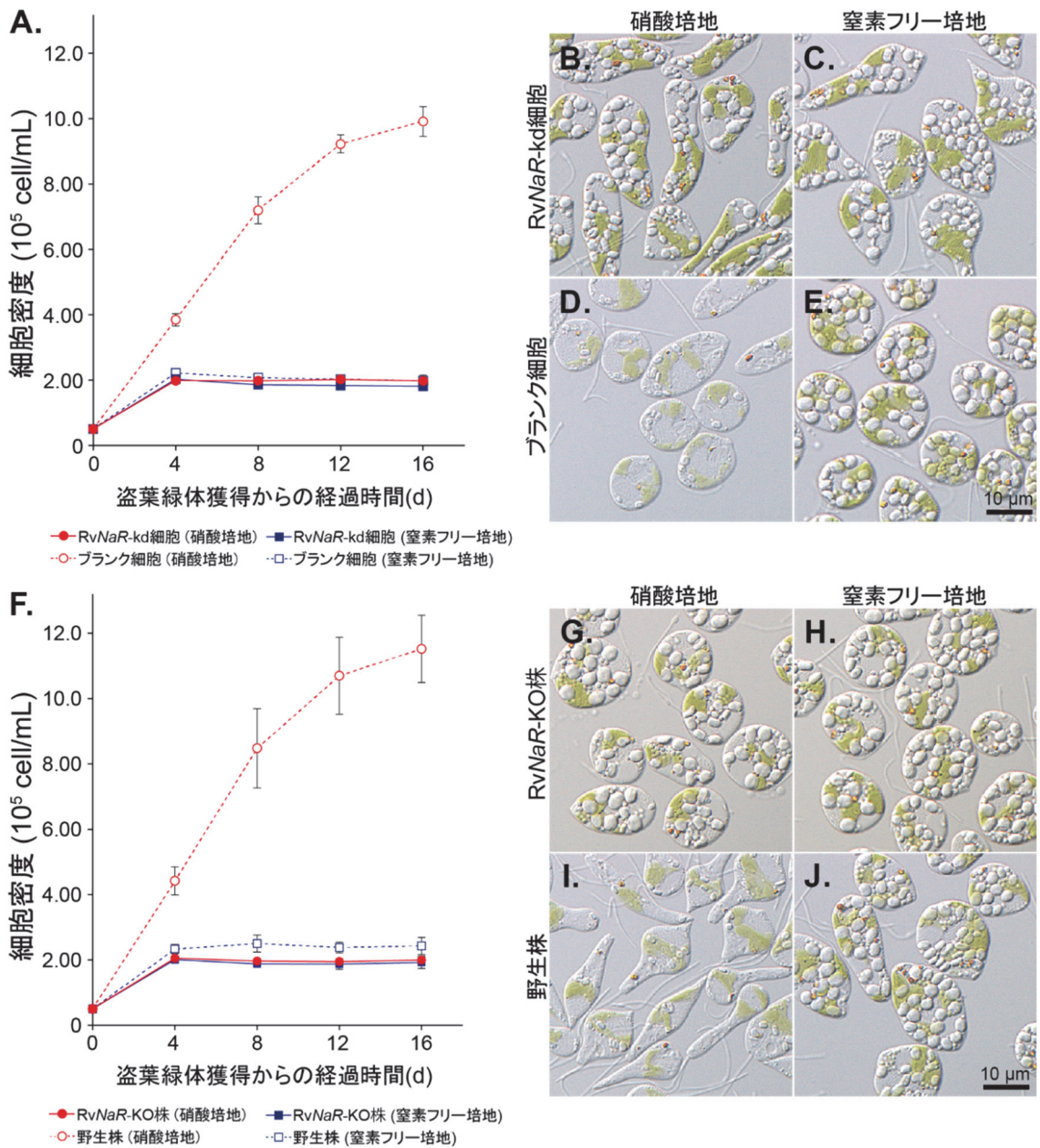


図 4-4. *RvNaR-kd* 細胞・*RvNaR-KO* 細胞の硝酸培地または窒素フリー培地培養における細胞の増殖率と細胞形態の比較

A: *RvNaR-kd* 細胞とノックアウト実験のコントロールとした野生株(ブランク細胞)の各培地培養での細胞増殖曲線。硝酸培地で培養したブランク細胞でのみ有意な増殖が認められた。**B-E:**盗葉緑体獲得から 8 日後の細胞についての光学顕微鏡観察による微分干渉コントラスト(DIC)画像。硝酸培地培養のブランク細胞を除いた 3 種類の細胞には著しい多糖顆粒の蓄積が認められた。

F: *RvNaR-KO* 細胞と野生株の各培地培養での細胞増殖曲線。硝酸培地で培養した野生株でのみ有意な増殖が認められた。**G-J:**盗葉緑体獲得から 8 日後の細胞についての光学顕微鏡観察による微分干渉コントラスト(DIC)画像。硝酸培地培養の野生株を除いた 3 種類の細胞には著しい多糖顆粒の蓄積が認められた。値は平均値±標準誤差で示す(n=3)。

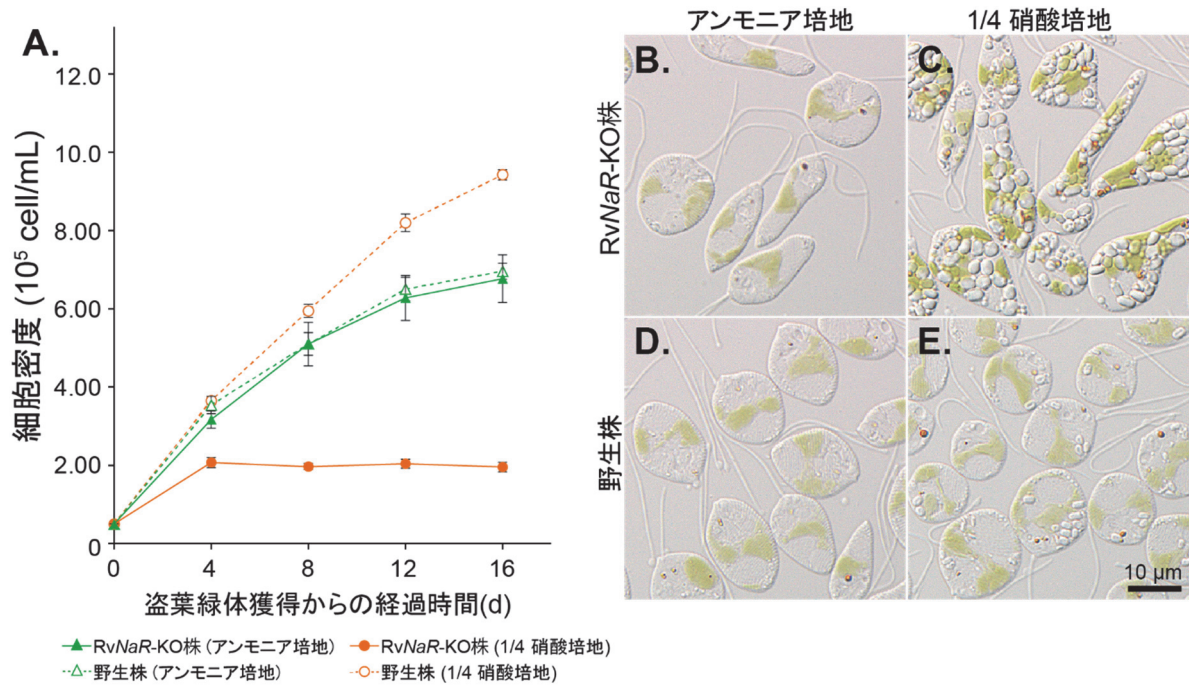


図 4-5. *RvNaR-KO* 細胞のアンモニア培地または硝酸培地における細胞の増殖率と細胞形態の比較 A: *RvNaR-KO* 細胞と野生株の各培地培養での細胞増殖曲線。 *RvNaR-KO* 細胞も野生株もアンモニア培地では同様に有意な細胞増殖を示した。 B-E: 盗葉緑体獲得から 8 日後の細胞についての光学顕微鏡観察による微分干渉コントラスト(DIC)画像。 *RvNaR-KO* 株の 1/4 硝酸培地でのみ、著しい多糖顆粒の蓄積が観察された。値は平均値±標準誤差で示す

第5章

5-1. 総合考察

総合考察では、従来研究されてきた他の生物による盗葉緑体现象との比較から *Rapaza viridis* の盗葉緑体现象の特徴について議論する。さらに、盗葉緑体现象に必要な普遍的な要因について考察する。

第2章では、*R. viridis* の盗葉緑体形成過程における細胞微細構造の変化の観察をおこない、取込んだ盗葉緑体ドナーである *Tetraselmis* sp. の細胞のうち葉緑体のみを、取込時に形成した包膜に保持し、その他の細胞内容物は、*R. viridis* サイトゾルに形成される包膜構造や、盗葉緑体外縁部に形成される複数の膜構造、そして盗葉緑体内部に形成される液-液相分離構造などが関連する複数のプロセスによって、選択的で徹底的に除去されることが示唆された。*R. viridis* と似た選択的な除去プロセスが盗葉緑体性の渦鞭毛藻である *Nusuttodinium* spp. においても観察されている。*Nusuttodinium* spp. の盗葉緑体ドナーであるクリプト藻の摂取時には、まず、盗葉緑体ドナーの細胞外被は *Nusuttodinium* 細胞内には取り込まれず、核と細胞質(細胞内容物)が宿主包膜内に取り込まれるとされている(Larsen 1988; Onuma *et al.* 2013)。摂取の際、*R. viridis* では盗葉緑体ドナーの *Tetraselmis* sp. 細胞を丸のみする形で *R. viridis* 由来の包膜に取り込まれるため、盗葉緑体ドナーの細胞壁と細胞膜ごと包膜に取り込まれる点が *Nusuttodinium* spp. と異なる。*R. viridis* の包膜に取り込まれた *Tetraselmis* の細胞壁と細胞膜について、細胞壁は摂取の過程か包膜に取り込まれた後に排出されることが分かっており、また、*Tetraselmis* sp. の細胞膜は、取込1時間以内の *R. viridis* 細胞では、透過型電子顕微鏡で観察されるが(Yamaguchi *et al.* 2012)、取込12~18時間後(盗葉緑体の細分化時の段階)の *R. viridis* 細胞では観察されないため(丸山修士論文 2018)、消化もしくは排泄されるものと考えられる。*N. poecilochroum* では、摂取されたクリプ

ト藻の細胞内容物のうち葉緑体のみが *N. poecilochroum* 由来の包膜内に残され、その他の細胞質は消化胞へと移され除去されると考えられている (Onuma *et al.* 2013)。また, *N. aeruginosum* では, 盗葉緑体ドナーの葉緑体, ヌクレオモルフ, ミトコンドリア, サイトゾルは残され, エジェクトソーム (射出装置; クリプト藻に特有) のみが消化されることが分かっている。したがって, *N. aeruginosum* では, 不要なオルガネラのみを選択的に排除するような, *N. poecilochroum* に比べてより高度な選択的除去機構の存在が示唆されている (Onuma and Horighchi 2013)。

一方, 別系統の盗葉緑体性の渦鞭毛藻である *Dinophysis caudata* の盗葉緑体ドナーである繊毛虫 *Mesodinium rubrum* の摂取時には, *Nusuttodinium spp.* と同様, 盗葉緑体ドナーの細胞外被は *D. caudata* 細胞内には取り込まれず, 細胞内容物のみが摂取される。なお, *M. rubrum* も盗葉緑体性生物であり, この繊毛虫はクリプト藻 *Teleaulax sp.* から, 盗葉緑体を獲得する。ミゾサイトーシスにより *D. caudata* 由来の包膜に取り込まれた細胞内容物は, このうち葉緑体のみが *D. caudata* 由来の包膜からサイトゾルへと移され, 包膜に残された細胞内容物はその後, この包膜内で消化されることが報告されている (Kim *et al.* 2012)。サイトゾルへ隔離された葉緑体には, *Teleaulax sp.* の本来の葉緑体包膜 (二重包膜) が観察されているため, *D. caudata* のサイトゾル中に盗葉緑体が直接分離されていることが示唆される (Wisecaver and Hackett 2010; Kim *et al.* 2012; Bodyl 2018)。したがって, 盗葉緑体が宿主細胞由来の包膜内に隔離される *R. viridis* や *Nusttodinium spp.* と, 盗葉緑体が宿主細胞のサイトゾルに保持される *D. caudata* では, 摂取された葉緑体ドナー細胞の構成要素の選択的除去/保持の機構が全く異なると考えられる (図 5-1)。

R. viridis では, 光学顕微鏡による明視野観察のレベルでは葉緑体以外の細胞質の積極的な除去

が完了しているように認められる段階以降でも、透過型電子顕微鏡による微細構造観察のレベルでは、盗葉緑体の縁辺部で除去プロセスが引き続き進行していることが明らかにされ、葉緑体以外の細胞質の排除が選択的であつて徹底的であることが示唆される。*R. viridis* と *N. poecilochroum* では、宿主細胞由来の包膜と、保持された葉緑体の二重包膜が密接した微細構造が観察されており、その膜の密接には、葉緑体ドナー細胞の細胞質が高度に選択的に除去されることも関係していると考えられる。また、*R. viridis* と *N. poecilochroum* の両者では、盗葉緑体形成過程において、盗葉緑体の形態変化が観察され、これは葉緑体包膜に密接した宿主包膜が関係している可能性が示唆される。*R. viridis* では、獲得した盗葉緑体が細分化され、その後、明暗周期をつけた培養においては、明期に盗葉緑体が細胞膜内側（厳密には細胞膜直下に存在するペリクル内側）に引き伸ばされたような形態に変化する（丸山 2018）。また、*N. poecilochroum* では、盗葉緑体形成時に、盗葉緑体が伸長し、*N. poecilochroum* 細胞周縁に配置される（Onuma and Horighchi, 2013）。一方、*D. acuminata* では、葉緑体は *D. acuminata* のサイトゾル中に存在し、宿主細胞由来の包膜には包まれていないとされているが、盗葉緑体の形態が引き伸ばされ、ピレノイドの配置が変化する様子が観察されている（Kim *et al.* 2012）。これら 3 種の生物による盗葉緑体現象は、いずれも盗葉緑体ドナーの核を保持せず盗葉緑体形成時に除去してしまうタイプであり、獲得した盗葉緑体の体積が増大されることはない。それぞれの生物における盗葉緑体の形態変化の機構はまだ不明であるが、盗葉緑体の体積を増大させることができない盗葉緑体性生物ならではの、盗葉緑体を効率的に利用するための機構が存在することが示唆される。

R. viridis で観察された盗葉緑体の細分化については、*R. viridis* 由来の包膜（盗葉緑体最外包膜）

ごと不均等に多分割されていることが示され、これは盗葉緑体最外包膜の外部からの *R. viridis* 由来の作用によって進行している可能性が考えられる。細胞内共生を経由するオルガネラの進化過程では、共生体を細胞内に継続的に保持するために、共生体の分裂と宿主の分裂が同調する必要があり、そのためには、共生体の分裂が宿主によって制御される必要があったと考えられている(井上 2007)。また、実際に、一次植物では、葉緑体の分裂時の均等な二分分裂は、シアノバクテリア由来の分裂機構と、宿主が付け加えた機構が協調して起こることが明らかにされている(Miyagishima *et al.* 2011)。しかし、盗葉緑体ドナー核を保持せず、共生体のように盗葉緑体の体積を増大させることができない *R. viridis* では、葉緑体分裂を精密に制御するよりも、獲得した盗葉緑体を多分割させて、新鮮な盗葉緑体をより多くの娘細胞へと分配するほうが進化的に有利であった可能性が考えられた(図 5-2)。

3 章では、*R. viridis* において、遺伝子水平転移により核ゲノムに獲得した葉緑体関連遺伝子が盗葉緑体内部に輸送発現されて機能していることを明らかにした。盗葉緑体性生物の核ゲノムに存在する葉緑体関連遺伝子について遺伝子操作実験をおこない、実際に盗葉緑体機能への関与を示したのは本研究が初めてである。そして、本研究および先行研究(丸山修士論文 2018)の結果から、*R. viridis* による盗葉緑体現象は細胞内共生進化の仮説に想定された過程である「共生体細胞核(ないしその遺伝子)の保持」を伴っていないにもかかわらず、*R. viridis* は盗葉緑体を自身の光合成オルガネラとして比較的効率よく利用している分子生物学的な基盤を一部明らかにすることができた。

現在、一般的に考えられている恒久的な葉緑体の進化過程に関する仮説は、細胞内共生を介する進化仮説であり、そこでは葉緑体の機能維持のためには共生体あるいは盗葉緑体ドナーの核を保持して

機能させ続けることが重要であるとされる。盗葉緑体ドナーの核を保持する *N. aeruginosum* における盗葉緑体の維持期間は 1 か月以上であるのに対し、盗葉緑体ドナー核を保持しないタイプの近縁種 *N. poecilochroum* では、盗葉緑体の維持期間は約 1 週間と比較的短いことが分かっている (Onuma *et al.* 2020)。 *N. aeruginosum* は自身の細胞分裂の際に盗葉緑体体積を増大させ、分裂させた後に娘細胞へと分配するが、盗葉緑体ドナーの核は複製されずに片方のみの娘細胞へと引き継がれる。核を引き継いだ一方の娘細胞は、再び葉緑体を増大させることができるが、もう一方の核を持たない娘細胞の盗葉緑体は増大されず、細胞分裂のたびに盗葉緑体は小さくなっていくことから、盗葉緑体ドナーの核が盗葉緑体の維持や増大に関わっていることが示唆されている (Onuma *et al.* 2020)。また、盗葉緑体ドナー核を引き継がなかった *N. aeruginosum* は強光を受けると細胞死するため、盗葉緑体ドナー核が光合成の酸化ストレスへの対処にも機能することが示されている (Onuma *et al.* 2020)。

一方、*D. acuminata* では、盗葉緑体ドナー核は保持されないが、盗葉緑体の保持期間は約 1 カ月間と比較的長い。また、*D. acuminata* の核ゲノムには、葉緑体関連遺伝子が存在することが明らかとなっている。Wisecaver and Hackett (2010) では、5 つの葉緑体関連遺伝子が同定されており、その遺伝子のうち 4 つの起源は、盗葉緑体ドナー以外のものであるため、遺伝子の水平転移によって獲得されたと考えられている。*D. acuminata* では、盗葉緑体からの光合成産物の輸送や光化学系の保護や安定化に関係する水平転移遺伝子が盗葉緑体利用に関与することが示唆されている (Wisecaver and Hackett 2010; Hongo *et al.* 2019)。ただし、これらが実際に機能発現しているかについては、未だに生化学的に検証されていない。

一方、本研究では *R. viridis* の核ゲノムに存在する多数の葉緑体関連遺伝子のうち、*RvTPT* と *RvRbcS* が実際に盗葉緑体包膜ならびに内部に輸送されて発現し、盗葉緑体の機能維持に必要な機能を担っていることが検証された。このことは、同様な葉緑体関連の機能ドメインが N 末端 LC 領域と共にコードされている他の様々な *R. viridis* の核ゲノム遺伝子群も、同様に盗葉緑体に輸送されて機能発現していることを強く示唆する。中でも、*R. viridis* のゲノムおよび定量トランスクリプトームデータからは、発現量は様々であるが、光合成において不可欠な光化学系 II やシトクロム *b₆f* 複合体、光化学系 I、さらには葉緑体型 ATP 合成酵素を構成する非葉緑体ゲノムコードサブユニット群のほとんどが存在していることが分かっている (Kashiyama *et al.*, in prep.)。したがって、*R. viridis* の盗葉緑体现象では、過去の遺伝子水平転移イベントの蓄積から、盗葉緑体を自らの光合成オルガネラとして維持し続けるための遺伝的素地が、かなりの程度既に整っているものと考えられる。

さらに、*R. viridis* の硝酸還元酵素様遺伝子についても、実際に硝酸同化経路において機能していることを明らかにしたが、これは同時に、*R. viridis* では硝酸同化経路に関連する他のタンパク質因子群も存在・発現していることを必然的に意味する。特に重要なことは、この代謝経路では最終的に亜硝酸イオンが盗葉緑体内部に輸送されて、盗葉緑体内部への局在が予測される亜硝酸還元酵素が機能して有機態窒素が獲得されていることをも強く示唆している点である。硝酸同化経路は、細胞内の複数のコンパートメントを跨いで機能する。さらに、中間および最終代謝産物である、それぞれ亜硝酸イオンとアンモニウムイオンは細胞毒性が高く、植物などにはこれらの蓄積を防ぐために精密なフィードバック機構が存在していることが知られている (Yanagisawa 2014)。したがって、*R. viridis* においてもそのような機構が存在

している蓋然性は高い。加えて, *R. viridis* は従属栄養性の生物の系統に属し, 硝酸同化経路は複数の異なる起源の水平転移遺伝子群から構成される。このため, *R. viridis* は無機窒素を利用できる生物に進化するための進化的プロセスの研究における, 今後の格好の研究材料になると考えられる。さらに, 硝酸同化を可能とし, 食作用をおこなう生物であるにもかかわらず高度に独立栄養的に振舞う *R. viridis* は(丸山修士論文 2018), 細胞全体として植物的な代謝を可能にしているとみなせる(図 5-3)。したがって, *R. viridis* は既知のいずれの共生藻を持つ細胞や盗葉緑体性生物と比べても, 恒久的な葉緑体をもつ光合成生物に進化的に近い一時的な葉緑体をもつ生物であるといえるだろう。

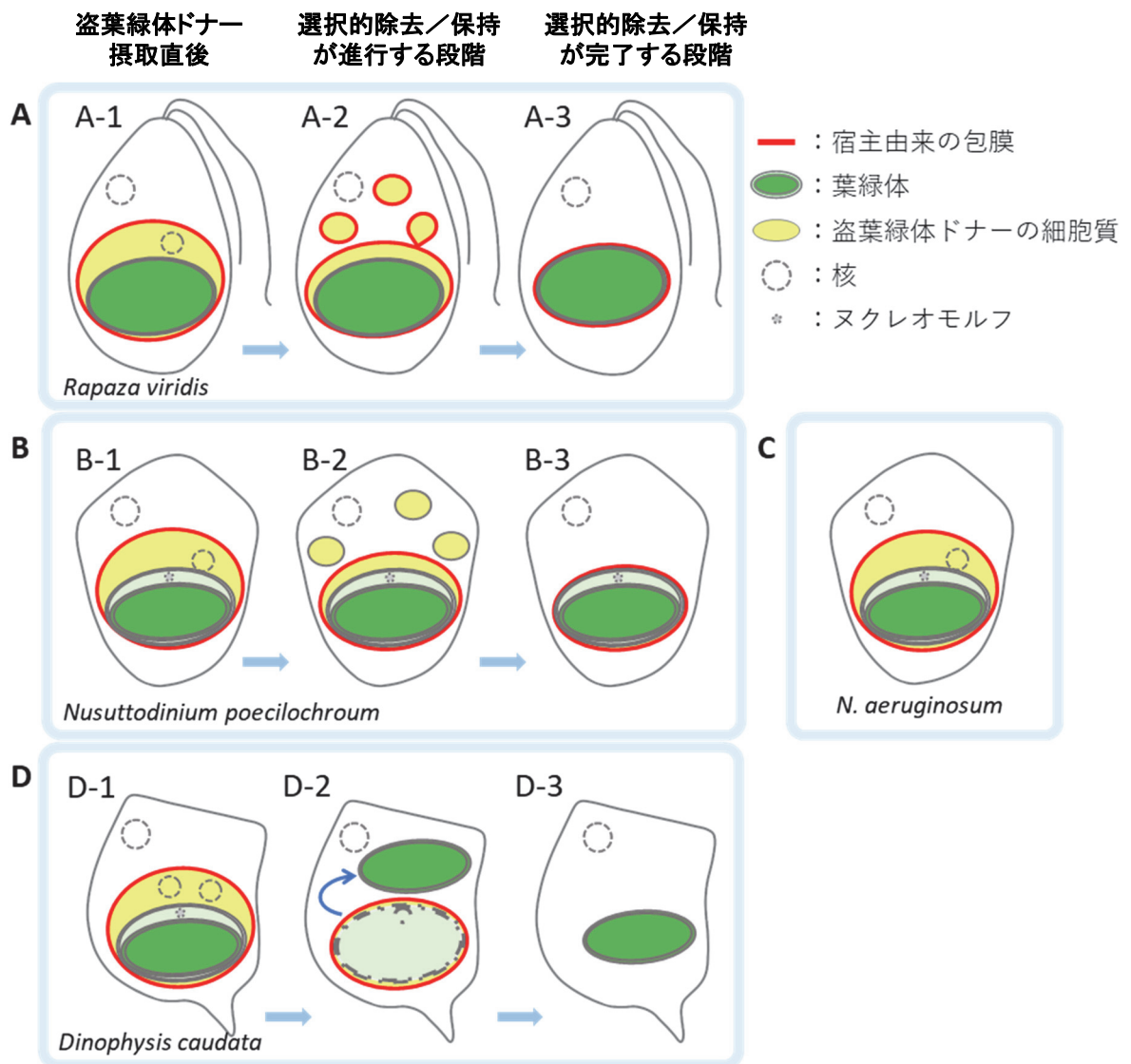
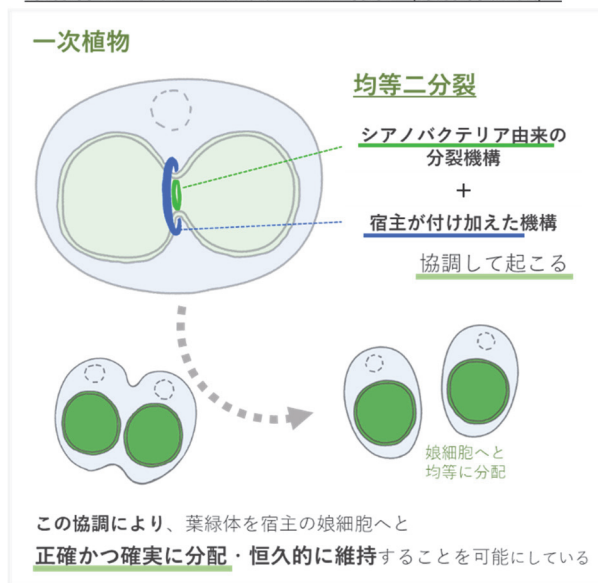


図 5-1. 盗葉緑体性生物盗葉緑体性生物盗葉緑体性生物による, 盗葉緑体ドナー細胞内容物の選択的除去/保持についての予想される概念図

A:*Rapaza viridis* **A-1:** *R. viridis* 由来の包膜内には, 盗葉緑体ドナーである *Tetraselmis* sp. の細胞膜, 核と細胞質が含まれる。**A-2:** *R. viridis* では, 盗葉緑体ドナー細胞内容物を含有する包膜構造が特徴的に観察される(2 章)。この包膜構造が選択的除去に関連することが考えられる。**A-3:** 選択的除去が完了すると, *R. viridis* 包膜内に葉緑体のみが保持される。**B:** *Nusuttodinium poecilochroum* **B-1:** *N. poecilochroum* 由来の包膜内には, 盗葉緑体ドナーであるクリプト藻の核と細胞質が含まれる。また, クリプト藻の葉緑体内にはヌクレオモルフが含まれる。**B-2:** 盗葉緑体ドナー細胞を獲得して数時間後の選択的保持/除去が進行する段階。*N. poecilochroum* では, この段階において, 盗葉緑体ドナー細胞内容物を含有する包膜構造が特徴的に観察され, この包膜構造が選択的除去に関連することが考えられる (Onuma and Horiguchi 2013)。**B-3:** 選択的除去が完了すると, *N. poecilochroum* 包膜内に葉緑体のみが保持される。なお, ヌクレオモルフも残存するが, これはヌクレオモルフが葉緑体ピレノイドに埋没する構造をとるために残存している可能性も考えられている (Onuma and Horiguchi 2013)**C:** *N. aeruginosum* **C-1:** *N. aeruginosum* では獲得した盗葉緑体ドナー細胞内容物のうち, エジェクトソーム(クリプト藻の細胞の表面や貫入部分に存在する射出装置)のみが除去され, その他細胞質と核は *N. aeruginosum* 包膜内に保持される。**D:** *Dinophysis caudata* **D-1:** *D. caudata* 由来の包膜内には, 盗葉緑体ドナーである繊毛虫の核と, この繊毛虫の盗葉緑体ドナーであるクリプト藻の細胞質と核が含まれる。また, クリプト藻の葉緑体内にはヌクレオモルフが含まれる。**D-2:** 盗葉緑体ドナー細胞を獲得して数時間後の選択的保持/除去が進行する段階。*D. caudata* では, 盗葉緑体獲得時に形成された包膜内から, 葉緑体のみが, *D. caudata* サイトゾルへと分離される。この包膜内に残された盗葉緑体ドナーの細胞質や核は除去される (Kim et al. 2012)。**D-3:** 選択的除去が完了後は, *D. caudata* サイトゾルに葉緑体のみが保持される。

葉緑体は均等な2分裂により増殖（葉緑体分裂）



ラバザにおける盗葉緑体の細分化

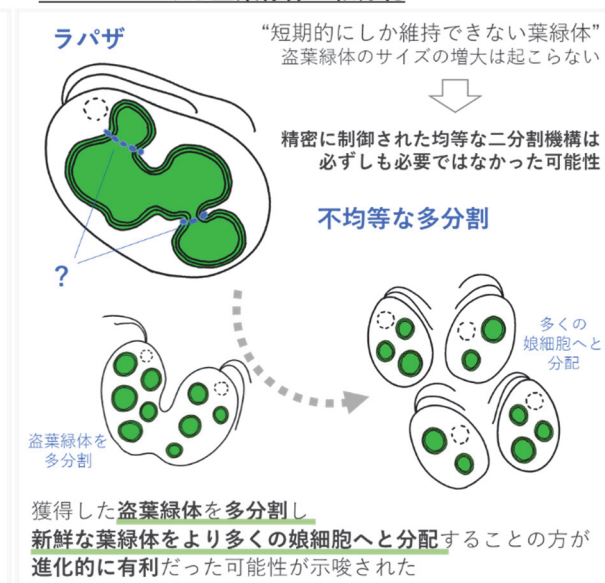


図 5-2. 植物や藻類における葉緑体分裂と *Rapaza viridis* による盗葉緑体の細分化

植物や藻類の葉緑体は、通常、均等な二分裂によって増殖する。一次植物では、この均等な二分裂が、シアノバクテリア由来の分裂機構と、宿主が付け加えた機構が協調して起こることが明らかにされている。一方、*R. viridis* の盗葉緑体は一時的な葉緑体であり、増殖と呼べるようなサイズの増大は起こらない。そのため、*R. viridis* の盗葉緑体には、精密に制御された均等な二分割機構は必ずしも必要ではなく、これよりも、獲得した盗葉緑体を多分割し、新鮮な盗葉緑体をより多くの娘細胞へと分配することのほうが、進化的に有利であった可能性が考えられる。

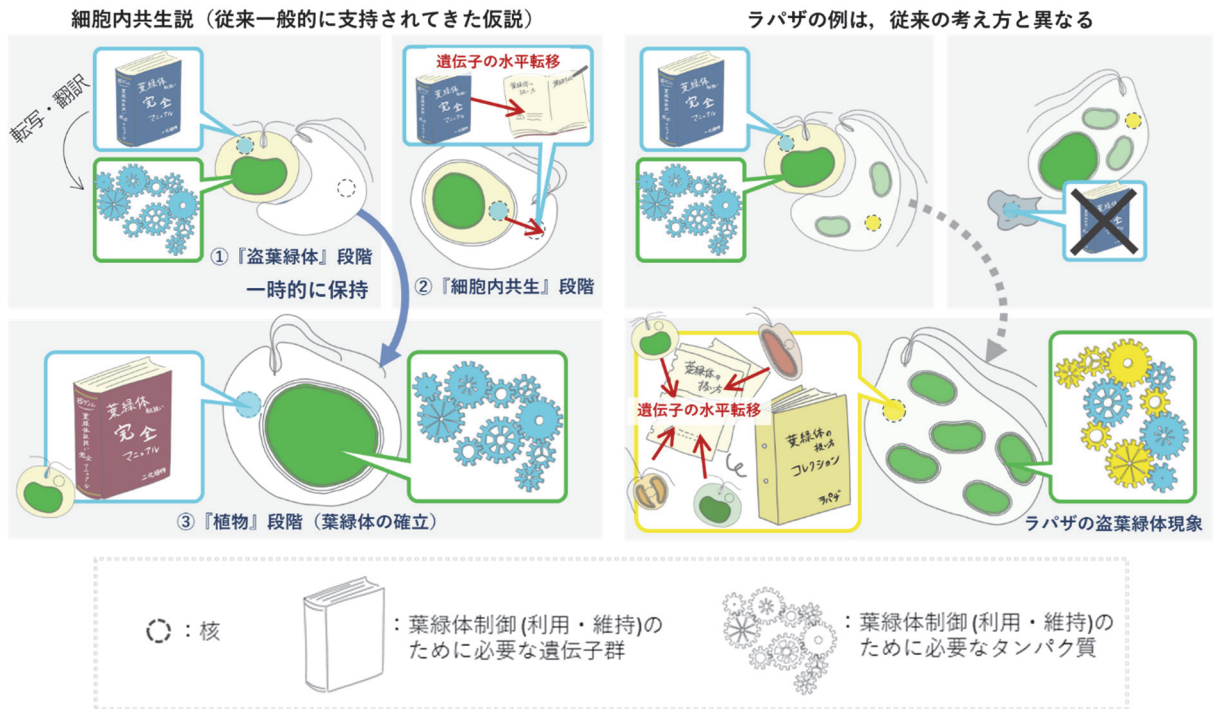


図 5-3. 細胞内共生進化仮説と *Rapaza viridis* における盗葉緑体現象

細胞内共生進化仮説では、共生体核の消失の前に内共生関係が築かれると考えられる。そして内共生関係の間に共生体核から宿主核への遺伝子の水平転移が生じ、葉緑体の維持に必要な遺伝子が宿主によって獲得される。*R. viridis* では盗葉緑体ドナーの核が盗葉緑体形成初期に排除されるが、それに関わらず、*R. viridis* の盗葉緑体は生存と生育のために機能することが示されており、*R. viridis* の盗葉緑体現象では、すでに細胞全体として植物的な代謝を獲得しているといえる。本研究の結果から、*R. viridis* による盗葉緑体の制御には、様々な藻類から水平転移により獲得した葉緑体関連遺伝子が実際に機能していることが示された。

5-2. 今後の展望

Rapaza viridis の盗葉緑体現象には、その他の生物による盗葉緑体現象と共通する特徴が幾つか認められた。このように、異なる系統の生物で共通する機構は、それぞれ独立に盗葉緑体現象を進化させてきた過程での収斂進化によるものであると考えるのが妥当である。したがって、これら共通機構は“他人の葉緑体”を自身のオルガネラとして利用する上で必要な普遍的要素を示唆するものである。もし、*R. viridis* が従来知られてきた盗葉緑体性生物とは異なる進化の過程を経てきたのであれば、この収斂現象の重要性はなおさらである。今後、様々な盗葉緑体性生物との比較研究を進め、収斂的共通項を理解・整理することで、一時的／恒久的な葉緑体利用のために必要なメカニズムの理解をより深化できることが期待される。

さらに、*R. viridis* の盗葉緑体現象は、恒久的な葉緑体をもつ姉妹群 *Euglenophyceae* とも多くの共通点が認められるが、進化的に近縁なこれらの共通点は、収斂ではなく進化的に相同である可能性が高いと思われる。例えば、分子生物学的な特徴として、多くの起源が共通する葉緑体／盗葉緑体関連遺伝子の存在や、これら核ゲノムコードタンパク質の葉緑体／盗葉緑体への輸送ターゲティング機構などが挙げられる。また、葉緑体／盗葉緑体の形態的特徴、例えば三重包膜や分裂／細分化の様式についても共有性が見出される。したがって、*Euglenophyceae* の中でも知見の集積が豊富で、かつ、実験細胞としても扱いが容易な *Euglena gracilis* などとの比較研究を進めることで、*R. viridis* の盗葉緑体制御メカニズムやその進化過程を解明していくことができると期待される。

最後に、盗葉緑体現象を理解するにあたっては、その盗葉緑体性生物が実際に生息する環境につ

いて考慮する必要がある。例えば、本研究において、*R. viridis* の生存期間や細胞増殖が培養培地条件によって変動したことから、*R. viridis* の盗葉緑体利用に環境の影響が大いに関わってくる事が分かる。現在、当研究室では、*R. viridis* の大量培養系が確立され、遺伝子ノックアウトによるゲノム編集も確立された。従来研究で知られている盗葉緑体性の生物の大量培養は難しく、ゲノム編集など遺伝子操作が可能な実験系も *R. viridis* 以外ではこれまで例はなく、*R. viridis* はモデル生物になり得ると考えられ、実験環境での研究がより発展していこう。したがって、より一層、*R. viridis* の天然環境における生態、すなわち実際の生育環境での生活様式についての考慮は重要であると考えられる。このことは、恒久的な葉緑体の進化解明の鍵としての盗葉緑体性生物の理解だけではなく、盗葉緑体性生物ならではの生存戦略や、他人の葉緑体を利用した生存様式の多様性の理解のためにも不可欠であると考えられる。

引用文献

- Almagro Armenteros, J. J., Salvatore, M., Emanuelsson, O., Winther, O., von Heijne, G., Elofsson, A., Nielsen, H. (2019) Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Sci Alliance*. 2: e201900429.
- Archibald, J. M. (2015) Genomic perspectives on the birth and spread of plastids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112: 10147–10153.
- Bodył, A. (2018) Did some red alga-derived plastids evolve *via* kleptoplastidy? A hypothesis. *Biol. Rev.* 93: 201-222.
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., Gabaldón, T. (2009) trimAl: a tool for automated alignment trimming. *Bioinformatics*. 25: 1972-1973.
- Coleman, L. W., Risen, B. H., Schwartzbach, S. D. (1988) Environmental control of carbohydrate and lipid synthesis in *Euglena*. *Plant Cell Physiol*. 29: 423-432.
- Douglas, S. E. (1994) Chloroplasts origins and evolution, p. 91-118. In D. A. Bryant (ed.), *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Durnford, D. G., Gray, M. W. (2006) Analysis of *Euglena gracilis* plastid-targeted proteins reveals different classes of transit sequences. *Eukaryot. Cell* 5: 2079–2091.
- Fernandez, E., Galvan, A. (2008) Nitrate assimilation in *Chlamydomonas*. *Eukaryot Cell*. 7: 555-559.
- Flügge, U-I., Weber, A., Fischer, K., Lottspeich, F., Eckerskorn, C., Waegemann, K., Soll, J. (1991) The major chloroplast envelope polypeptide is the phosphate translocator and not the protein import receptor. *Nature*. 353:364–367.
- Galván, A., Fernández, E. (2001) Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. *Cell Mol Life Sci*. 58: 225-233.
- García-Portela, M., Reguera, B., Gago, J., Le Gac, M. L., Rodríguez, F. (2020) Uptake of inorganic and organic nitrogen sources by *Dinophysis acuminata* and *D. acuta*. *Microorganisms*. 8: 187.
- Gibbs, S. P. (1981) The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 361: 193–208.

Gruber, N. (2008) in Nitrogen in the Marine Environment, D. G. Capone, D. Bronk, M. Mulholland, E. J. Carpenter, Eds. (Academic Press, ed. 2), pp. 1–15.

Gruber, N. (2008) “The marine nitrogen cycle: overview and challenges,” in Nitrogen in the Marine Environment, eds D. G. C. Apone, D. A. Bronk, M. R. Mulholland, and E. J. Carpenter, pp. 1-50. San Diego: Academic Press.

Guerrero, M. G., Vega, J. M., Losada, M. (1981) The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annu Rev Plant. Physiol.* 32: 169-204.

Hattenrath-Lehmann, T. K., Nanjappa, D., Zhang, H., Yu, L., Goleski, J. A., Lin, S., Gobler, C. J. (2021) Transcriptomic and isotopic data reveal central role of ammonium in facilitating the growth of the mixotrophic dinoflagellate, *Dinophysis acuminata*. *Harmful Algae.* 104: 102031.

Hongo, Y., Yabuki, A., Fujikura, K., Nagai, S. (2019) Genes functioned in kleptoplastids of *Dinophysis* are derived from haptophytes rather than from cryptophytes. *Sci Rep.* 9: 9009.

Iseki, M., Matsunaga, S., Murakami, A., Ohno, K., Shiga, K., Yoshida, C., Sugai, M., Takahashi, T., Hori, T., Watanabe, M. (2002) A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. *Nature.* 415: 1047-1051.

Ishida, K., Cao Y., Hasegawa, M., Okada, N., Hara, Y. (1997) The origin of chlorarachniophyte plastids, as inferred from phylogenetic comparisons of amino acid sequences of EF-Tu. *J Mol Evol*, 45: 682-687.

Izumi, M., Nakamura, S., and Li, N. (2019) Autophagic turnover of chloroplasts: its roles and regulatory mechanisms in response to sugar starvation. *Front. Plant Sci.* 10: 280.

Johnson, M. D. (2011) The acquisition of phototrophy: adaptive strategies of hosting endosymbionts and organelles. *Photosynth Res.* 107: 117–32.

Karnkowska, A., Yubuki, N., Maruyama, M., Yamaguchi, A., Kashiyama, Y., Suzaki, T., Keeling, P. J., Hampl, V., Leander, B. S. (2023) Euglenozoan kleptoplasty illuminates the early evolution of photoendosymbiosis. *PNAS.* 120: e2220100120.

Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K. D. (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform.* 20: 1160-1166.

Keeling, P. J. (2010) The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365: 729–748.

Keeling, P. J. (2013) The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 583–607.

Keeling, P. J., Burki, F., Wilcox, H. M., Allam, B., Allen, E. E., Amaral-Zettler, L. A. (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: e1001889.

Kim, M., Nam, S. W., Shin, W., Coats, D. W., Park, M. G. (2012) *Dinophysis caudata* (Dinophyceae) sequesters and retains plastids from the mixotrophic ciliate prey *Mesodinium rubrum*. *J. Phycol.* 48: 569-79.

Larsen, J. (1988) An ultrastructural study of *Amphidinium poecilochroum* (Dinophyceae), a phagotrophic dinoflagellate feeding on small species of cryptophytes. *Phycologia.* 27: 366–377.

Leander, B. S., Triemer, R. E., Farmer, M. A. (2001a) Character evolution in heterotrophic euglenids. *Eur J Protistol.* 37: 337-356.

Leander, B. S. (2004) Did trypanosomatid parasites have Phototrophic ancestors? *Trends Microbiol.* 12: 251-258.

Leander, B. S., Witek, R. P., Farmer, M. A. (2001b) Trends in the evolution of the euglenid pellicle. *Evolution.* 55: 2115-2135.

Lee, Y., Nishizawa, T., Takemoto, M., Kumazaki, K., Yamashita, K., Hirata, K., Minoda, A., Nagatoishi, S., Tsumoto, K., Ishitani, R., Nureki, O. (2017) Structure of the triose-phosphate/phosphate translocator reveals the basis of substrate specificity. *Nat. Plants.* 3: 825–832.

Michaeli, S., Honig, A., Levanony, H., Peled-Zehavi, H., Galili, G. (2014) Arabidopsis ATG8-INTERACTINGPROTEIN1 is involved in autophagy-dependent vesicular trafficking of plastid proteins to the vacuole. *Plant Cell.* 26: 4084–4101.

- Miyagishima, S. Y., Nakanishi, H., Kabeya, Y. (2011) Structure, regulation, and evolution of the plastid division machinery. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 291: 115–153.
- Momoyama, Y., Miyazawa, Y., Miyagishima, S. Y., Mori, T., Misumi, O., Kuroiwa, H., Tsuneyoshi, K. (2003) The division of pleomorphic plastids with multiple FtsZ rings in tobacco BY-2 cells. *Eur J Cell Biol.* 82: 323–332.
- Murray, D. T., Kato, M., Lin, Y., Thurber, K. R., Hung, I., McKnight, S. L., Tycko, R. (2017) Structure of FUS protein fibrils and its relevance to self-assembly and phase separation of low-complexity domains. *Cell.* 171: 615–627.e16.
- Naito, Y., Hino, K., Bono, H., Ui-Tei, K. (2015) CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics.* 31: 1120-1123.
- Nakazawa, M., Andoh, H., Koyama, K., Watanabe, Y., Nakai, T., Ueda, M., Sakamoto, T., Inui, H., Nakano, Y., Miyatake, K. (2015) Alteration of wax ester content and composition in *Euglena gracilis* with gene silencing of 3-ketoacyl-CoA thiolase isozymes. *Lipids.* 50: 483-492.
- Niyogi, K. K., Truong, T. B. (2013) Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16: 307–314.
- Novák Vanclová, A. M. G., Zoltner, M., Kelly, S., Soukal, P., Záhonová, K., Füssy, Z., Ebenezer, T. E., Lacová Dobáková, E., Eliáš, M., Lukeš, J., Field, M. C., Hampl, V. (2020) Metabolic quirks and the colourful history of the *Euglena gracilis* secondary plastid. *New Phytol.* 225: 1578–1592.
- Onuma, R., Hirooka, S., Kanasaki, Y., Fujiwara, T., Yoshikawa, H., Miyagishima, S. Y. (2020) Changes in the transcriptome, ploidy, and optimal light intensity of a cryptomonad upon integration into a kleptoplastic dinoflagellate. *ISME J.* 14: 2407–2423.
- Onuma, R., Horiguchi, T. (2013) Morphological transition in kleptochloroplasts after ingestion in the dinoflagellates *Amphidinium poecilochroum* and *Gymnodinium aeruginosum* (Dinophyceae). *Protist* 164: 622–642.

Onuma, R., Horiguchi, T. (2015) Kleptochloroplast enlargement, karyoklepty and the distribution of the cryptomonad nucleus in *Nusuttodinium* (= *Gymnodinium*) *aeruginosum* (*Dinophyceae*). *Protist* 166: 177–195.

Otegui, M. S. (2018) Vacuolar degradation of chloroplast components: autophagy and beyond. *J. Exp. Bot.* 69:741–50.

Pellegrini, M. (1980) Three-dimensional reconstruction of organelles in *Euglena gracilis* Z. I. Qualitative and quantitative changes of chloroplasts and mitochondrial reticulum in synchronous photoautotrophic culture. *Journal of Cell Science.* 43: 137–166.

Rogers, M. B., Gilson, P. R., Su, V., McFadden, G. I., Keeling, P. J. (2007) The complete chloroplast genome of the chlorarachniophyte *Bigeloviella natan*: evidence for independent origins of chlorarachniophyte and euglenid secondary endosymbionts. *Mol Biol Evol.* 24: 54–62.

Sanz-Luque, E., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, A., Galvan, A., Fernandez, E. (2015) Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Front. Plant Sci.* 6: 899.

Sanz-Luque, E., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, A., Galvan, A., Fernandez, E. (2015) Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Front Plant Sci.* 6: 899.

Schmollinger, S., Mühlhaus, T., Boyle, N. R., Blaby, I. K., Casero, D., Mettler, T. et al. (2014) Nitrogen-sparing mechanisms in *Chlamydomonas* affect the transcriptome, the proteome, and photosynthetic metabolism. *Plant Cell.* 26: 1410–1435.

Sibbald, S. J., Archibald, J. M. (2020) Genomic insights into plastid evolution. *Genome Biol. Evol.* 12: 978–990.

Stitt, M., Krapp, A. (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell Environ.* 22: 583–621.

Tong, M., Smith, J. L., Kulis, D. M., Anderson D. M. (2015) Role of dissolved nitrate and phosphate in isolates of *Mesodinium rubrum* and toxin-producing *Dinophysis acuminata*. *Aquat Microb Ecol.* 75: 169–185.

Trifinopoulos, J., Nguyen, L. T., von Haeseler, A., Minh, B. Q. (2016) W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucl Acids Res.* 44: W232-W235.

Turmel, M., Gagnon, M. C., O'Kelly, C. J., Otis, C., Lemieux, C. (2009) The chloroplast genomes of the green algae *Pyramimona*, *Monomasti*, and *Pycnococcus* shed new light on the evolutionary history of prasinophytes and the origin of the secondary chloroplasts of euglenids. *Mol Biol Evol*, 26: 631-648.

Wisecaver, J. H., Hackett, J. D. (2010) Transcriptome analysis reveals nuclear-encoded proteins for the maintenance of temporary plastids in the dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *BMC Genom.* 11: 366.

Yamaguchi, A., Yubuki, N., Leander, B. S. (2012) Morphostasis in a novel eukaryote illuminates the evolutionary transition from phagotrophy to phototrophy: description of *Rapaza viridis* n. gen. et sp. (Euglenozoa, Euglenida). *BMC Evol Biol.* 12: 29.

Yanagisawa, S. (2014) Transcription factors involved in controlling the expression of nitrate reductase genes in higher plants. *Plant Science.* 229: 167-171

井上 勲 (2007) 藻類 30 億年の自然史 第 2 版 東海大学出版会

大橋 遊歩 (2023) 福井工業大学大学院 令和 4 年度修士論文

佐藤 長緒, 山口 淳二 (2013) C/N バランス調節による植物の代謝・成長戦略 *化学と生物* 51: 36-45.

高橋 俊一 (2013) 過剰な光エネルギーで起こる光阻害とその防御について *光合成研究* 23: 57-63.

長船哲齊 (2006) 単細胞藻類の同調細胞集団におけるミトコンドリア, 葉緑体, ピレノイドの動態 *Plant Morphology* 18: 35-45.

日本光合成学会 (2021) 光合成 朝倉書店

丸山 萌 (2018) “混合栄養性 “ユーグレノイド *Rapaza viridis* の有する葉緑体に関する研究 福井工業大学大学院 平成 29 年度修士論文

吉澤 拓也 (2021) FUS の相分離制御の構造生物学的解析 *日本結晶学会誌* 第 63 巻 第 2 号

—研究業績一覽—

主論文に関する研究業績

【原著論文】

1. Anna Karnkowska, Naoji Yubuki, Moe Maruyama, Aika Yamaguchi, Yuichiro Kashiya, Toshinobu Suzaki, Patrick J Keeling, Vladimir Hampl, Brian S Leander, “Euglenozoan kleptoplasty illuminates the early evolution of photoendosymbiosis”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 120: e2220100120, March 21, 2023. Published online, March 16, 2023.
2. Moe Maruyama, Tsuyoshi Kagamoto, Yuga Matsumoto, Ryo Onuma, Shin-ya Miyagishima, Goro Tanifuji, Masami Nakazawa, Yuichiro Kashiya, “Horizontally Acquired Nitrate Reductase Realized Kleptoplastic Photoautotrophy of *Rapaza viridis*”. *Plant and Cell Physiology*. Published online, May 22, 2023.

【国際学会発表】

1. Moe Maruyama
“Chloroplast division of *Tetraselmis* sp. in the food vacuole of mixotrophic algae *Rapaza viridis*”
Annual meeting of the International Society of Protistologists (The MOSCOW FORUM "PROTIST 2016")
June 2016, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.
2. Moe Maruyama
“An obligate kleptoplastic phototrophy of a euglenoid *Rapaza viridis*”
15th International Congress of Protistology (ICOP 2017)
August 2017, Prague, Czech Republic.

【国内学会発表】

1. 丸山萌(福井工大工)、小林滉宜(静大理)、栗井光一郎(静大理)、岡島圭佑(基生研)、皆川純(基生研)、谷藤吾朗(国立科博)、洲崎敏伸(神戸大理)、柏山祐一郎(福井工大工)
「盗葉緑体の分割と利用:盗葉緑体性ユーグレノイド *Rapaza viridis* による光合成」
第9回 日本光合成学会 年会およびシンポジウム 東北大学 2018年5月
2. 丸山萌(福井工大工)、小林滉宜(静大理)、栗井光一郎(静大理)、洲崎敏伸(神戸大理)、柏山祐一郎(福井工大工)
「*Rapaza viridis* による盗葉緑体の利用と制御」
日本共生生物学会 第2回大会 兵庫県神戸市 2018年11月

3. 丸山萌 (福井工大工)、大沼亮 (遺伝研)、宮城島進也 (遺伝研)、洲崎敏伸 (神戸大理)、柏山祐一郎 (福井工大工)
「盗葉緑体を能動的に搾取する *Rapaza viridis* の分子メカニズム」
日本植物学会 第 83 回大会 東北大学 2019 年 9 月
4. 丸山萌 (福井工大工)、白崎透 (福井工大工)、伊阪俊貴 (福井工大工)、大沼亮 (遺伝研)、宮城島進也 (遺伝研)、栗井光一郎 (静大理)、洲崎敏伸 (神戸大理)、柏山祐一郎 (福井工大工)
「*Rapaza viridis* における盗葉緑体の制御メカニズム」
日本藻類学会 第 44 回大会 鹿児島大学 2020 年 3 月
5. 丸山萌 (福井工大工)
「盗葉緑体生物の Nitrate reductase 様遺伝子の機能検証」
第 12 回 日本光合成学会 年会およびシンポジウム オンライン開催 2022 年 5 月
6. 丸山萌 (福井工大工)、加賀本剛 (福井工大工)、中澤昌美 (大阪公大農)、蘆田弘樹 (神戸大人間)、栗井光一郎 (静大理)、柏山 祐一郎 (福井工大工)
「*Rapaza viridis* の盗葉緑体獲得過程におけるピレノイドの再構成メカニズム」
日本植物学会 第 86 回大会 京都府立大学 2022 年 9 月
7. 丸山萌 (福井工大工)
「ユーグレノイド類ラパザにおける盗葉緑体現象」
第 47 回 寄生虫学会 原生生物学・共生生物学談話会コラボセミナー 石川県金沢市とオンラインによるハイブリット開催 2023 年 3 月

謝 辞

本論文の完成にあたり、多くの方々に支えられ、ご指導いただきましたことを心より感謝申し上げます。

指導教員の柏山 祐一郎 教授には、学部3年次から9年間にわたり、多大なるご指導を賜りました。心より感謝申し上げます。柏山 教授との出会いのおかげで、見ることのできる世界が大きく大きく広がりました。研究とは何か、学問とは何か、教えていただいたたくさんの方のことをこれからも大切にしていきます。

副査の矢部 希見子 教授、小松 節子 教授には、本論文をご精読、貴重なコメントをいただきましたこと、心より感謝申し上げます。大学生活においても、いつも優しく声をかけていただき、心の癒し、研究のやる気につながっておりました。

本研究を進めるにあたり、透過型電子顕微鏡観察につきましては、神戸大学 洲崎 敏伸 博士にサンプル作製から観察まで、細やかなご教授をいただきました。また、ウエスタンブロットング実験につきましては、大阪公立大学 中澤 昌美 博士、神戸大学 蘆田 弘樹 博士にご協力をいただきました。光合成活性測定につきましては、静岡大学 粟井 光一郎 博士にご協力をいただきました。皆様に心より感謝申し上げます。

論文の執筆にあたり、国立科学博物館 谷藤 吾朗 博士、神戸大学 大沼 亮 博士、国立遺伝学研究所 宮城島 進也 博士に、実験のご協力、ディスカッション、ご助言をいただきました。心より感謝申し上げます。

Rapaza viridis 研究において、ワルシャワ大学 Anna Karnkowska 博士、ブリティッシュコロンビア大学 雪吹 直史 博士、北海道大学 山口 愛果 博士にご協力いただきました。心より感謝申し上げます。

また、共に研究に励んできました、柏山研究室の皆様にも心より感謝申し上げます。

ここには書ききれなかった、研究を通じてお会いすることのできたすべての皆様、大学生活を共に過ごすことのできた皆様、応援をくださいました皆様にも心より感謝を申し上げます。

最後に、心配をたくさんかけてしまいましたが、いつも支えてくれた家族にも心より感謝を申し上げます。