

## 論文内容の要旨

論文題目    Molecular identification of rickettsial endosymbionts  
                 in the photosynthetic eukaryotes and  
                 horizontal transfers of the rickettsial genes to *Volvox carteri*

(植物細胞内共生リケッチアの分子同定とリケッチア遺伝子のボルボックスへの水平伝播)

氏名   川船   かおる

### 1. 研究背景

細胞内共生とは、ある生物と細胞内の別の生物が長期間共存している状態である。細胞内共生に伴って生じる、共生体からホストゲノムへの遺伝子水平伝播は、ホストと共生体双方のゲノム進化に影響を与えることが知られている。真核生物細胞の二重膜オルガネラであるミトコンドリアと葉緑体はバクテリアの細胞内共生が起源であるとされ、オルガネラ化に伴って生じた共生体からホスト核ゲノムへの遺伝子水平伝播によって、共生体のホストへの依存が強くなったと考えられている。ミトコンドリアの祖先は、偏性細胞内共生性のバクテリアからなるリケッチア目 (アルファプロテオバクテリア綱) に近縁であったと考えられている[1]。

リケッチア目に含まれるリケッチア科のバクテリアは主に節足動物細胞を宿主とし、ダニ類の吸血を介してヒトへ感染する種を含む。一方近年、非節足動物であるヒドラや繊毛虫の細胞内からも本科バクテリアが発見されている[2-5]。これらのバクテリアは系統的に病原性リケッチアとは異なる「ヒドラグループ」に位置することが報告されている[6]。

ボルボックス目の緑藻では複数の株において、細胞内共生バクテリアが透過型電子顕微鏡観察により報告されていたものの未同定であった[7-10] (図 1)。私はこれまでの研究において、単細胞緑藻 *Carteria cerasiformis*、群体性緑藻 *Pleodorina japonica* から、細胞内共生バクテリア由来であると考えられる 16S ribosomal (r)RNA 遺伝子配列を決定し、系統解析により配列がリケッチア科ヒドラグループに位置することを明らかにした (川船 2011 修士論文)。しかし、純粋培養されていないバクテリアの分子同定を実施するためには、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 等により、系統樹上のヒドラグループに位置する 16S rRNA 配列をもつバクテリアが宿主緑藻細胞内に存在することを示す必要があった。また、モデル生物であり核ゲノム配列が解読されている[11]、群体性緑藻 *Volvox carteri* から報告された細胞内バクテリアは未同定であった[7,12]。

したがって、私は博士課程の本研究では、*C. cerasiformis*、*P. japonica*に加え、新たに *V. carteri* から取得したバクテリア 16S rRNA 遺伝子配列を用いて、系統解析と FISH による細胞内共生バクテリアの分子同定を実施し、ボルボックス目緑藻 3 種の細胞内バクテリアがリケッチア科ヒドラグループに属することを示した。また、*V. carteri* の核ゲノム配列から検出されたリケッチア遺伝子類似配列の詳細を得るため、緑藻細胞内共生リケッチアのドラフトゲノム配列を構築し、*V. carteri* 核ゲノム配列に対するリケッチア遺伝子類似配列の網羅的探索と解析を実施した。

## 2. 緑藻細胞内バクテリアの分子同定と

### *V. carteri* 各系統における細胞内バクテリアの有無の調査

細胞内バクテリアの存在が報告されている *V. carteri* UTEX 2180 株から得られたバクテリア 16S rRNA 遺伝子配列は、系統解析の結果、他 2 種の緑藻から得られたバクテリア配列と同様に、リケッチア科ヒドラグループ内に位置した (図 2)。16S rRNA 配列上の、リケッチア科ヒドラグループの緑藻細胞内バクテリアを含むクレードに特異的な領域をターゲットとする蛍光オリゴプローブを設計し (図 2)、*C. cerasiformis*、*P. japonica* および *V. carteri* UTEX 2180 株に対して FISH を行った。その結果、緑藻細胞内にヒドラグループの 16S rRNA が存在することを示した (図 3)。

*V. carteri* には多くの系統保存株が存在し、遺伝的にも多様である。そのため本研究では、世界各地のコレクションから入手した *V. carteri* 計 13 株に対し、DAPI 染色、及びヒドラグループ特異的プライマーを用いたゲノム PCR を実施し、リケッチアの有無を調査した。その結果リケッチアが検出されたのは UTEX 2180 株のみであった。*C. cerasiformis* と近縁種でも同様に、10 株中 1 株のみから細胞内共生リケッチアが検出されている (川船 2011 修士論文)。これらの結果は、ホスト緑藻の系統が分岐した後、リケッチアがそれぞれ独立して共生したことを示唆した。

## 3. 細胞内共生リケッチアからボルボックスへの遺伝子水平伝播の発見と解析

前章でリケッチアを持たないことが判明した 12 株の *V. carteri* のうち、EVE 株はゲノム配列が公開されている [11]。予備的に EVE ゲノムに対する BLASTN 検索を実施した結果、核ゲノム Scaffold 6 上に緑藻細胞内リケッチア 16S rRNA 遺伝子配列に類似した配列を発見した。EVE ゲノム上にリケッチア遺伝子類似配列が他にも存在するか網羅的に調査するためには、細胞内共生リケッチアのゲノム配列が必要であったが、ヒドラグループのバクテリアの全ゲノム配列は公開されていなかった。よって本研究では、新規に構築した緑藻細胞内リケッチアのドラフトゲノム配列を用いて、*V. carteri* EVE 株ゲノム配列に対するリケッチア遺伝子類似配列の網羅的探索を実施した。

細胞内共生リケッチアのゲノムを解読するためには、ホスト細胞を分画し、リケッチアを単離する必要がある。リケッチアホストの緑藻のうち、単細胞性の *C. cerasiformis* は細胞分画が比較的容易であると考えられた。そこで、*C. cerasiformis* ホスト細胞を破碎、遠心分画によりホストオルガネラを除去し、細胞内リケッチアを濃縮した。リケッチアから抽出した DNA は、高速シーケンサ illumina GAIIx により解読し、アセンブルを行った。結果、約 1.3 Mbp の配列 (5 kbp 以上の長さを持つ 80 コンティグに由来) を決定し、MiGAP を用いた機械的アノテーションにより原核生物性の 1246 CDS、3 rRNA、34 tRNA を同定した。

本研究で構築した *C. cerasiformis* 細胞内共生リケッチアのドラフトゲノム配列をクエリとして、BLASTN による相同性検索を *V. carteri* EVE 株ゲノム配列に対し実施した。その結果、EVE 核ゲノム Scaffold 6 上にリケッチア 4 遺伝子 (16S rRNA・*murB*・*ddlB*・*ftsQ*) に類似した配列を発見した (図 4)。これらの遺伝子類似配列がホストゲノムのミスアセンブリによるものではないことを確認するため、EVE 株から抽出した DNA を用いてゲノム PCR を行い、産物をダイレクトシーケンスで解読した。その結果決定した約 9 kbp の領域 (図 4、黒矢印) は、EVE 公開ゲノム配列と

一致した。9 kbp の領域中には4種類のリケッチア遺伝子類似配列の他、*V. carteri* に特異的と考えられる3種類の配列 (図4、multicopy region A・B、*Jordan*) が存在していた。従って、4種類のリケッチア遺伝子類似配列がEVE株の核ゲノム上に存在することは確実である。

さらに、前章でリケッチアを持たないことが判明した *V. carteri* 12株について、リケッチア4遺伝子に類似する配列の有無をゲノムPCRにより調査した。その結果、9株からリケッチア遺伝子類似配列を得た (図5)。よって、現在リケッチアを持たない *V. carteri* 9株では、リケッチアから緑藻細胞に遺伝子水平伝播が生じたと考えられ、かつて細胞内にリケッチアが共生していた可能性が示唆された。

*V. carteri* 9株から発見されたリケッチア遺伝子類似配列は、緑藻細胞内リケッチアと同様にリケッチア科ヒドラグループに含まれることが、16S rRNA 遺伝子と *murB*・*ddlB* 配列それぞれを用いた系統解析により判明した。さらに6株の *murB*・*ddlB* 配列は系統解析の結果、現在 *V. carteri* 細胞内に存在するリケッチアよりも、*P. japonica* の細胞内リケッチアに近縁であった (図6)。よって、*V. carteri* には最低でも2系統のリケッチアが共生していたことが示唆される (図7)。

#### 4. 総合考察

本研究では分子同定により、緑藻ボルボックス目における細胞内共生リケッチア科バクテリアの存在を示した。これは非捕食性光合成生物の細胞内からリケッチア目のバクテリアを発見した初の例である。さらに、リケッチア科ヒドラグループにおける細胞内共生バクテリアの宿主生物は、緑藻以外は捕食を行う従属栄養性生物であるため[2-5]、緑藻の細胞内リケッチアは捕食されることにより他の生物に伝播している可能性がある。また *V. carteri* では、リケッチアを持たない複数の株でリケッチア遺伝子の水平伝播を明らかにし、UTEX 2180株と系統的に異なる *V. carteri* の様々な株の祖先で過去にリケッチアが共生していた可能性を示した。従ってリケッチアは、緑藻ボルボックス目の細胞に頻繁に共生する一方、共生後に消失する場合も多いと推測される。本研究で *V. carteri* において発見された過去のリケッチアとの細胞内共生関係は、*Carteria* や *Pleodorina* を含む他のボルボックス目でも同様に生じていた可能性がある。今後、利用できる緑藻核ゲノムデータは増大していくと予想されるため、それらを用いたリケッチアとの比較ゲノム解析を行い、ボルボックス目全体におけるリケッチアとの隠れた共生関係を解明することが望まれる。

#### 引用文献

1. Ferla et al. 2013 PLOS ONE 8: e83383.
2. Vannini et al. 2005 Microbiol Ecol 49: 434-442.
3. Fraune & Bosch 2007 Proc Nat Acad Sci 104: 13146-13151.
4. Sun et al. 2009 Appl Environ Microbiol 75: 7445-7452.
5. Schrällhammer et al. 2013 PLOS ONE 8: e72581.
6. Weinert et al. 2009 BMC Biol 7: 6-20.
7. Kochert & Olson 1970 Trans Am Microsc Soc 89: 475-478.
8. Nozaki et al. 1989 Phycologia 28: 252-267.
9. Nozaki & Kuroiwa 1992 Phycologia 31: 529-541.
10. Nozaki et al. 1994 Phycologia 33: 239-247.
11. Prochnik et al. 2010 Science 329: 223-226.
12. Lee & Kochert 1976 J Phycol 12: 194-197.

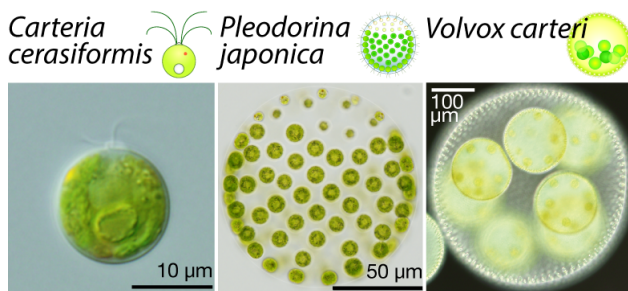


図1 細胞内細菌の存在が報告されていた3種の緑藻。

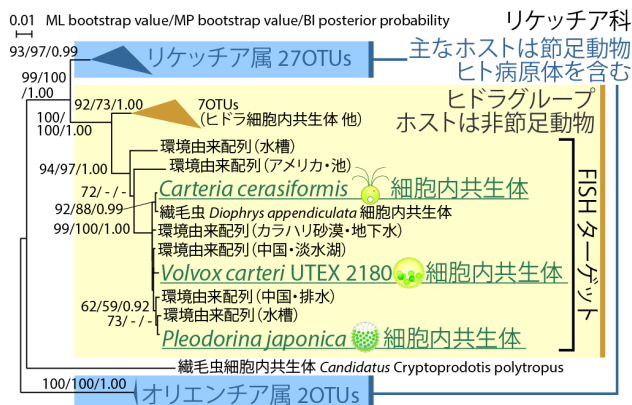


図2 最尤法によるリケッチア科 16S rRNA 遺伝子配列の系統解析結果。本研究で新たに決定した *V. carteri* 由来配列を含め、3種の緑藻由来の細菌配列(下線)はヒドラグループに位置した。*C. cerasiformis*、*P. japonica* 由来の細菌配列は、川船 2011 修士論文に基づく。

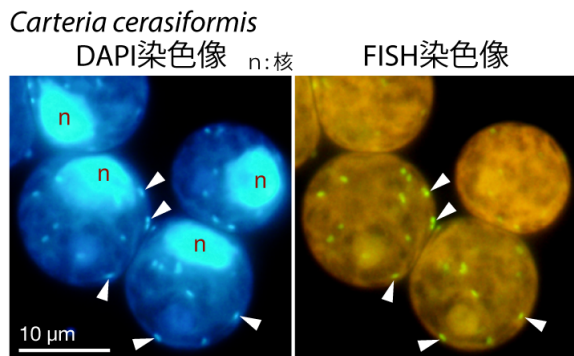


図3 緑藻から得られたリケッチア 16S rRNA に特異的な配列をターゲットとした FISH。細菌 DNA 蛍光(左図△)と FISH シグナル(右図△)が一致し、細胞内におけるリケッチアの存在を示した。

*Volvox carteri* EVE 核ゲノム Scaffold 6 (一部)

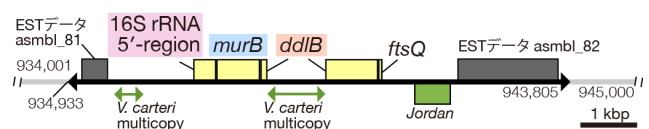


図4 *V. carteri* EVE 株の公開ゲノムデータ上のリケッチア遺伝子類似配列(黄色四角)。黒矢印↔は本研究で PCR・シーケンスにより配列の連続性を確認した領域を示す。ゲノム PCR(図5)のターゲットとした遺伝子類似配列(16S rRNA 5'-region・*murB*・*ddlB*)は配列名に色をつけて示した。

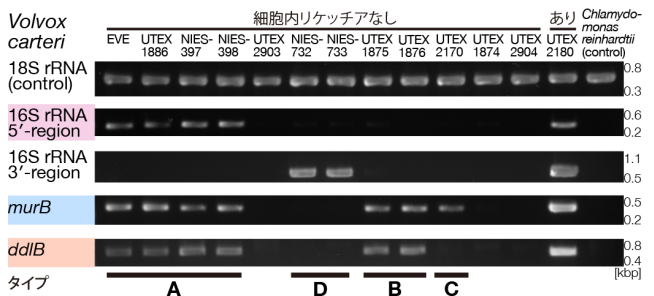


図5 *V. carteri* 各株のリケッチア遺伝子類似配列ゲノム PCR 結果。

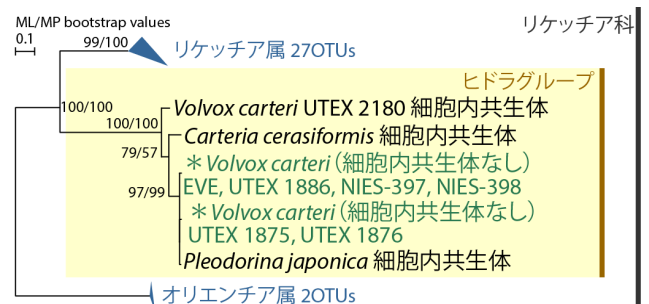


図6 リケッチア遺伝子 *murB*・*ddlB* と類似配列の、最尤法による系統解析結果(2遺伝子結合、アミノ酸配列を使用)。リケッチアを持たない *V. carteri* から得られた遺伝子類似配列(\*)はリケッチア科ヒドラグループに位置し、更に *P. japonica* 細胞内リケッチアに近縁であった。図中に含まれていない UTEX 2170 株由来の *murB* 類似配列は、UTEX 1875・UTEX 1876 株の配列と一致した。

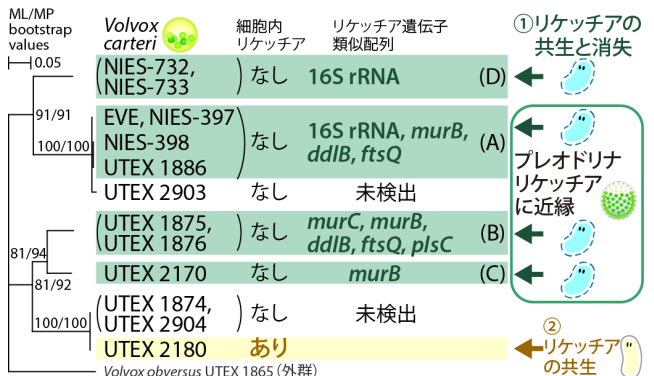


図7 使用した *V. carteri* 株の系統関係(ITS2 配列、最尤法による)と、細胞内リケッチアの有無、および本研究で検出されたリケッチア遺伝子類似配列。遺伝子名横の(A)-(D)は図5のタイプ A-D に対応する。