

## 単細胞紅藻シアニジウム類の多様性と重金属耐性

兼崎 友

東京農業大学生物資源ゲノム解析センター

〒156-8502 東京都世田谷区桜ヶ丘 1-1-1

Yu Kanesaki

Isolation and characterization of heavy metal-tolerant Cyanidiales

Key words: *Primitive red algae*, *Cyanidiales*, *Heavy metal stress*

NODAI Genome Research Center, Tokyo University of Agriculture,

1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya, Tokyo, 156-8502, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.8c2.00121

### 1. はじめに

紅藻とは紅色植物門に属する真核藻類であり、特に我々の生活と馴染み深いのはアサクサノリやテングサなどの海水性の多細胞紅藻である。これら海水性の多細胞紅藻は、光合成色素としてクロロフィル a やフィコシアニンの他に赤色色素であるフィコエリスリンを含んでいるため、紅色を呈する。一方、世界中の火山性の温泉地帯など、高温、硫酸酸性、高重金属イオンの複合的な環境ストレス下には、淡水性の単細胞紅藻が棲息している。これらの単細胞紅藻は極限環境紅藻とも呼ばれ、イデユコゴメ綱 (*Cyanidiophyceae*) という分類群に属する。イデユコゴメ綱には、*Cyanidioschyzon* (以下シゾン)、*Cyanidium* (以下シアニジウム)、*Galdieria* (以下ガルデリア) の3属が知られており、紅藻と言いながらフィコエリスリンを持たないため緑色を示す。真核藻類の中で最も高温環境で棲息可能で、かつ強酸、重金属耐性を持つイデユコゴメ綱は、環境ストレス耐性機構の研究材料として大きな可能性が期待されるが、その詳細な分子機構は未だによくわかっていない。今のところ、遺伝子破壊などの分子生物学的ツールが整備されているモデル生物はシゾンのみであり、シアニジウムやガルデリアのような非モデル極限環境紅藻についての生理学的情報、分子生物学的情報は極めて限られている。しかし生態分布からはシゾンよりもシアニジウムやガルデリアのほうが世界中の火山帯の高温酸性環境から広く見つかっており、このような非モデル極限環境紅藻についてもさらに研究がおこなわれるべきと考える。本稿では、我々が新規単離したシアニジウムの特徴やその有用形質について紹介したい。

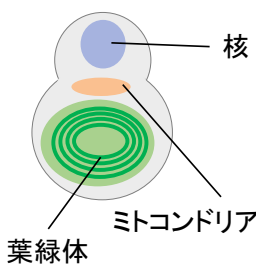
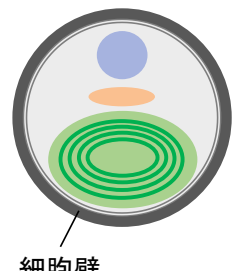
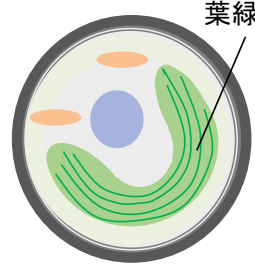
### 2. シアニジウム類の重金属耐性

シアニジウムの重金属耐性についてはいくつか詳細な報告例があり、特にアルミニウムに対する耐性が非常に高く、生育速度は半減するものの 200 mM のアルミニウム条件下でも棲息できるという報告がある (Yoshimura et al. 1999)。同様に、亜鉛や銅、ニッケル、マンガン、

Kanesaki Y.-1

クロムについても 10 mM 程度までは生育可能と報告されている。またこのような特定の重金属ストレス条件下では、重金属を細胞内に多量に蓄積することも知られている (Nagasaka et al. 2004)。これについて、シアニジウムの細胞内で重金属を蓄積している場所として Electron-dense body という構造体があるということが報告されている (Nagasaka et al. 2002)。重金属の種類によるが、植物は mM オーダーの重金属ストレスを受けると深刻な生育阻害を起こす。例えば、酸性土壌では  $\mu\text{M}$  オーダーのアルミニウムイオンにより植物の根の伸長は速やかに阻害される。また緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* でも 100  $\mu\text{M}$  の銅やクロムは生育を大きく阻害することが知られる (Nowtica et al. 2016)。これらと比べると、シアニジウムの重金属耐性の高さは異常とも言え、この機構を解明できればバイオレメディエーションやバイオマス物質生産の分野への貢献が期待できる。しかし、これまでに世界中の硫酸酸性温泉からシアニジウムが見つかったものの、より高濃度の重金属に耐性を持つような種の探索や、重金属耐性や重金属応答に関わる遺伝子レベルでの研究はおこなわれてこなかった。

表 1 単細胞紅藻シアニジウム類の 3 属の特徴

属名	<i>Cyanidioschyzon</i> (シゾン)	<i>Cyanidium</i> (シアニジウム)	<i>Galdieria</i> (ガルデリア)
棲息環境	高温(40 – 55°C)、強酸性(pH 0.5 – 5.0)、高濃度金属イオン		
細胞壁	なし	あり	あり
分裂様式	等分裂	内生孢子(4)	内生孢子(4-32)
栄養的分類	完全光独立栄養性	完全光独立栄養性	光独立栄養性 従属栄養性
ゲノム情報、 遺伝子組換え	完全ゲノム情報 組換え可能	ドラフトゲノム情報 組換え不可	ドラフトゲノム情報 組換え不可
細胞の模式図			

### 3. 新規単離したシアニジウムの重金属耐性試験

山口大学の三角修己博士により箱根温泉大涌谷から採取されたバイオマットを元に、我々は重金属や pH などの強いストレス条件を付与した状態で培養をおこなうことで、コンタミした微生物群を排除し単細胞紅藻のシングルコロニーを得ることができた。顕微鏡による形態観察と 18S *rRNA* と *rbcL* 遺伝子の配列を元にした分子系統解析の結果、これらの株を *Cyanidium* sp. N3110 株, *Galdieria sulphuraria* SG 株と名付けた。これらの株について、液体静

Kanesaki Y.-2

置培養による様々な重金属イオン存在下での培養試験をおこなったところ、100 mM アルミニウムや 500 mM マグネシウム存在下でも生育可能であった。また 3 属間の比較から、*Cyanidium* sp. N3110 株はマンガン、*Galdieria sulphuraria* SG 株は鉄に対して特に強い耐性を示すという特徴を見出した。マンガンについては、シズンは 10 mM、*G. sulphuraria* SG 株は 1 mM まで生育可能であったのに対し、N3110 株は 100 mM のマンガン存在下でも生育可能であった。液体通気培養系でも同様の結果が得られたことから、極めて高いマンガン耐性を持つシアニジウムの新規単離株の取得に成功した。箱根大涌谷の温泉は低濃度のマンガンイオンも含む鉱泉であるが、同じバイオマットから単離された単細胞紅藻でも大きく異なる重金属ストレス耐性を示すことは、将来的な有用藻類の探索を考える上でも興味深い。このシアニジウム新規単離株について、次世代シーケンサー PacBio RSII 及び MiSeq を用いて全ゲノム解析を実施し、ミトコンドリアゲノムと葉緑体ゲノムの完全配列、及び、核ゲノムのドラフト配列を得た。この塩基配列情報とデータベースを参考に、遺伝子領域の推定と機能アノテーションをおこない、トランスクリプトーム解析用の遺伝子配列リストを整備し、100 mM のマンガン添加した際の遺伝子発現変動プロファイルを取得したところ、複数の重金属トランスポーターの発現変動を観測できた。これらのうち、マンガン添加により転写産物量が最も抑制された putative zinc transporter の遺伝子は、通常時の亜鉛イオンやマンガンイオンの取り込みに関わることが予想されたので、酵母のオーソログ遺伝子破壊株を用いた機能相補実験をおこなった。その結果、このトランスポーターは亜鉛イオンとマンガンイオンの両方の取り込みが可能であることがわかった。また、このトランスポーターを単細胞紅藻シズンで強制発現させた株でもマンガンイオンの細胞内取り込み量が顕著に増加した。これらの結果と過去の知見から、シアニジウムは高マンガンストレス下で細胞質への過剰なマンガンの流入を防ぐことと、Electron-dense body のような細胞内の局所に金属を貯めこむことの、少なくとも 2 つのメカニズムで耐性を獲得している可能性が示唆された。以上のように、新規単離した非モデル生物であっても次世代シーケンサーの使用により容易に有用遺伝子の絞込みまで進めるようになったことは極めて重要な進歩である。

#### 4. イデユコゴメ綱の単細胞紅藻のゲノム解読状況

シズンについては、1998 年にミトコンドリアゲノム、2003 年に葉緑体ゲノムが解読された (Ohta et al. 1998; 2003)。2004 年には核ゲノムが 99.98% 解読され (Matsuzaki et al. 2004)、2007 年には 1 つもギャップの無い 100% 完全ゲノム解読が達成されている (Nozaki et al. 2007)。これは全真核生物で初の快挙であった。ガルデリアについても、ミトコンドリアと葉緑体の完全ゲノム配列、及び、核のドラフトゲノム配列が報告されている (Barbier et al. 2005; Schönknecht et al. 2013)。ガルデリアのゲノムからは、水平伝搬により獲得された古細菌由来の遺伝子が見つかったと報告されており、非常に興味深い。シアニジウムについては *Cyanidium caldarium* RK-1 株の葉緑体ゲノムのみが解読されていた。我々が新たに *Cyanidium* sp. N3110 株のミトコンドリアと葉緑体の完全ゲノム、及び、核のドラフトゲノム情報を解読したことで、イデユコゴメ綱 3 属のゲノム情報が揃ったことになる。しかし、次のイデユコゴメ綱の分子系統の項でも述べるが、イデユコゴメ綱は従来考えられていた以上に多様性を持つ生物群である

ことが複数の研究グループから指摘されてきており (Alberto et al. 2000; Ciniglia et al. 2004; Yoon et al. 2006; Toplin et al. 2008; Skorupa et al. 2013), その進化系統の理解にはさらなるゲノム情報の蓄積が必要だと考えられる。

## 5. イデユコゴメ綱の系統分類に関する問題

シズンは光独立栄養で強固な細胞壁を持たず、等分裂で増殖する。シアニジウムは光独立栄養であるが強固な細胞壁を持ち、4個の内生胞子を作り増殖する。シズンとシアニジウムの葉緑体は楕円形である。ガルデリアは外来炭素源による従属栄養増殖も可能で、強固な細胞壁を持ち、4-32個の内生胞子を作り増殖する。葉緑体は湾曲した不定形である。

初期のイデユコゴメ綱の系統分類は、細胞形態や葉緑体形態、分裂様式の違いなどを元に分類されたため、近年の分子系統解析の結果との間で一部混乱が生じている。分子系統樹についてはいくつもの報告例があるが、共通しているのはガルデリアには熱水の周辺でよく見られる種(Type-A; *G. sulphuraria*, *G. daedala*, *G. partita*)と岩石の割れ目などの光が当たらず比較的乾燥した環境を好む種(Type-B; *G. phlegrea*)の主要な2群、それに加えて *G. maxima* という分子系統樹の上ではシズンに近い例外的な種がいるという点である (Ciniglia et al. 2004; Yoon et al. 2006; Toplin et al. 2008; Skorupa et al. 2013)。このシズンに近い系統群の混乱については、単離・無菌化された株が限られていることもあり、未だによく分かっていない。またシアニジウムにも高温環境型と中温環境型の2群が知られており、分子系統樹においてもこの2群の分岐はかなり早くに生じていることから、シアニジウムもかなり広い多様性をもつ属であると考えられている。今回我々が単離した *Cyanidium* sp. N3110 株は、楕円形の葉緑体と4つの内生胞子というシアニジウムの形態的特徴を満たしていたが、分子系統解析の結果からは他のシアニジウムよりも、シズンや *G. maxima* に近いクレードに含まれた。このことからイデユコゴメ綱内の多様性は、分類体系や進化も含めて再考する必要があると思われる。

## 6. 今後の展開

4万種以上いると言われる真核藻類の中で、バイオマス物質生産に適した可能性を持つ藻類は無数にいるはずと思われるが、それらの探索や有用物質生産能の調査はまだ不十分である。特にシアニジウム類のような極限環境藻類については、農作物や飲料水と競合しない水資源に棲息することから大きな可能性が期待できる。一方で次世代シーケンサーの技術的進歩により、新規単離した非モデル生物系のゲノム解析、トランスクリプトーム解析などはかくも容易になった。そしてオミクス解析の結果と生理学的実験を組み合わせれば、非モデル生物からの新規有用遺伝子の探索も非常に高速化できる時代になった。非モデル系の実験材料の場合、遺伝子組換えなどの実験系が確立していないことが唯一のネックであり、組換え可能な近縁モデル生物種での機能証明などが必要となる。単細胞紅藻の場合は、真核藻類の中で最も分子生物学的実験ツールが整備されているシズンがモデル生物となっているため、比較検証がおこないやすい。今後、多数の紅藻のゲノム情報整備が進むと考えられるが、これにより比較ゲノムや生理機能の進化的な考察もさらに進むものと考えられる。

## 謝辞

本稿で紹介した研究内容について、東京農業大学細胞ゲノム生物学研究室の重信直人氏、小田しおり氏、斎藤夏穂氏、渡辺智先生、吉川博文先生、及び、東京農業大学植物生産化学研究室の齋藤彰宏先生、樋口恭子先生による支援に感謝いたします。本研究は科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業(CREST)「藻類・水圏微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」の助成を受けておこなわれました。また本研究について貴重なコメントを頂戴しました山口大学の三角修己先生、国立遺伝学研究所の宮城島進也先生、藤原崇之先生、廣岡俊亮博士、日本女子大の黒岩常祥先生に心より感謝申し上げます。

## 引用文献

- Alberto, P., Ciniglia, C., Pinto, G. & Pollio, A. 2000. The taxonomic position of *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* and *Galdieria*: an update. *Hydrobiologia*. 43: 137–143.
- Barbier, G., Oesterhelt, C., Larson, M.D., Halgren, R.G., Wilkerson, C., Garavito, R.M., Benning, C., & Weber, A.P. 2005. Comparative genomics of two closely related unicellular thermo-acidophilic red algae, *Galdieria sulphuraria* and *Cyanidioschyzon merolae*, reveals the molecular basis of the metabolic flexibility of *Galdieria sulphuraria* and significant differences in carbohydrate metabolism of both algae. *Plant Physiol.* 137: 460–474.
- Ciniglia, C., Yoon, H.S., Pollio, A., Pinto, G., & Bhattacharya, D. 2004. Hidden biodiversity of the extremophilic Cyanidiales red algae. *Mol. Ecol.* 13: 1827–1838.
- Matsuzaki, M., Misumi, O., Shin-I, T., Maruyama, S., Takahara, M., Miyagishima, SY., Mori, T., Nishida, K., Yagisawa, F., Nishida, K., Yoshida, Y., Nishimura, Y., Nakao, S., Kobayashi, T., Momoyama, Y., Higashiyama, T., Minoda, A., Sano, M., Nomoto, H., Oishi, K., Hayashi, H., Ohta, F., Nishizaka, S., Haga, S., Miura, S., Morishita, T., Kabeya, Y., Terasawa, K., Suzuki, Y., Ishii, Y., Asakawa, S., Takano, H., Ohta, N., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Shimizu, N., Sugano, S., Sato, N., Nozaki, H., Ogasawara, N., Kohara, Y., & Kuroiwa, T. 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature*. 428: 653–657.
- Nagasaka, S., Nishizawa, N.K., Mori, S., & Yoshimura, E.Y. 2004. Metal metabolism in the red alga *Cyanidium caldarium* and its relationship to metal tolerance. *Biometals*. 17: 177–181.
- Nagasaka, S., Nishizawa, N.K., Negishi, T., Satake, K., Mori, S., & Yoshimura, E. 2002. Novel iron-storage particles may play a role in aluminum tolerance of *Cyanidium caldarium*. *Planta*. 215: 399–404.
- Nowicka, B., Pluciński, B., Kuczyńska, P., & Kruk, J. 2016. Physiological characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* acclimated to chronic stress induced by Ag, Cd, Cr, Cu and Hg ions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 130: 133–145.
- Nozaki, H., Takano, H., Misumi, O., Terasawa, K., Matsuzaki, M., Maruyama, S., Nishida, K., Yagisawa, F., Yoshida, Y., Fujiwara, T., Takio, S., Tamura, K., Chung, S.J., Nakamura, S., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Sato, N., & Kuroiwa, T. 2007. A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic

- features in the hot-spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *BMC Biol.* 5: 28.
- Ohta, N., Matsuzaki, M., Misumi, O., Miyagishima, S.Y., Nozaki, H., Tanaka, K., Shin-I, T., Kohara, Y., & Kuroiwa, T. 2003. Complete sequence and analysis of the plastid genome of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *DNA Res.* 10: 67–77.
- Ohta, N., Sato, N., & Kuroiwa T. 1998. Structure and organization of the mitochondrial genome of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* deduced from the complete nucleotide sequence. *Nucleic Acids Res.* 26: 5190–5198.
- Schönknecht, G., Chen, W.H., Ternes, C.M., Barbier, G.G., Shrestha, R.P., Stanke, M., Bräutigam, A., Baker, B.J., Banfield, J.F., Garavito, R.M., Carr, K., Wilkerson, C., Rensing, S.A., Gagneul, D., Dickenson, N.E., Oesterhelt, C., Lercher, M.J., & Weber, A.P. 2013. Gene transfer from bacteria and archaea facilitated evolution of an extremophilic eukaryote. *Science* 339: 1207–1210.
- Skorupa, D.J., Reeb, V., Castenholz, R.W., Bhattacharya, D., & McDermott, T.R. 2013. Cyanidiales diversity in Yellowstone National Park. *Lett. Appl. Microbiol.* 57: 459–466.
- Toplin, J.A., Norris, T.B., Lehr, C.R., McDermott, T.R., & Castenholz, R.W. 2008. Biogeographic and phylogenetic diversity of thermoacidophilic cyanidiales in Yellowstone National Park, Japan, and New Zealand. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2822–2833.
- Yoon, H.S., Ciniglia, C., Wu, M., Comeron, J.M., Pinto, G., Pollio, A., & Bhattacharya, D. 2006. Establishment of endolithic populations of extremophilic Cyanidiales (Rhodophyta). *BMC Evol. Biol.* 6: 78.
- Yoshimura, E., Nagasaka, S., Sato, Y., Satake, K. & Mori, S. 1999. Extraordinary high aluminium tolerance of the acidophilic thermophilic alga, *Cyanidium caldarium*. *Soil. Sci. Plant Nutr.* 45: 721–724.