

藻類学最前線



# 円石藻 *Braarudosphaera bigelowii* と ニトロプラスト研究のこれまで・これから

萩野 恭子<sup>1\*</sup><sup>1</sup> 高知大学海洋コア国際研究所 (〒 783-8502 高知県南国市物部乙 200)Kyoko Hagino<sup>1\*</sup>: Progresses in the studies of *Braarudosphaera bigelowii* and its nitroplast (UCYN-A) in the last quarter century. Jpn. J. Phycol. (Sôruï) 72: 175–182, November 10, 2024

Coale *et al.* (2024) showed that the nitrogen-fixing cyanobacterium UCYN-A, previously considered an endosymbiont of the marine phytoplankton *Braarudosphaera bigelowii* (Prymnesiophyceae), exhibits characteristics akin to an organelle. They concluded that UCYN-A within *B. bigelowii* is in the process of becoming a N<sub>2</sub>-fixing organelle, referred to as a nitroplast. *B. bigelowii* and UCYN-A have traditionally been investigated independently by researchers studying algae and nitrogen-fixing bacteria, respectively. This disciplinary divide has hindered a comprehensive understanding of *B. bigelowii* and its nitroplast. To facilitate a comprehensive understanding of *B. bigelowii*, this article provides an overview of the research history of both *B. bigelowii* and UCYN-A over the last two decades.

**Key Index Words:** *Braarudosphaera bigelowii*, coccolithophore, nitroplast, UCYN-A

<sup>1</sup> Marine Core Research Institute, Kochi University, Monobe B-200, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan

\* Author for correspondence: hagino@kochi-u.ac.jp

## はじめに

円石藻 *Braarudosphaera bigelowii* (Gran & Braarud) Deflandre とその細胞内に観察される窒素固定細菌 UCYN-A は、これまで共生関係にあると考えられていた (Hagino *et al.* 2013)。しかし、培養株が確立されて詳細な解析が行われた結果、UCYN-A は共生藻というよりオルガネラと呼ぶ方が相応しい状態であることが分かり、窒素固定オルガネラ『ニトロプラスト』という名称が提唱された (Coale *et al.* 2024)。一次共生由来のオルガネラとしては、約 20 億年前に真核生物の共通祖先に取り込まれた好気性細菌に由来するミトコンドリア (Feng *et al.* 1997)、約 15 億年前に藻類・植物の共通祖先に取り込まれたシアノバクテリアに起源をもつ葉緑体 (Yoon *et al.* 2004)、約 1.2 億年前に有殻アメーバ *Paulinella chromatophora* に取り込まれたシアノバクテリア由来の葉緑体 (Stephens *et al.* 2021) の 3 例に続いて、今回の *B. bigelowii* のニトロプラストが 4 例目である。そして、窒素を固定するオルガネラをもつ真核生物としては、この *B. bigelowii* が初めてである (Coale *et al.* 2024)。

*Braarudosphaera bigelowii* は長い化石記録をもつ、古生物学的に非常に興味深い種である (Young *et al.* 2024)。筆者はもともと地球科学 (微古生物学) を専門としており、円石藻化石の形態の多様化の過程の理解のために、現生円石藻の生物地理や形態多様性の研究、そして、培養や分子系統解析に取り組んできた。*B. bigelowii* はその研究対象の一つである。一方の *B. bigelowii* のニトロプラストの研究は、*B. bigelowii* 研

究とは全く別に、主に海洋環境科学や窒素固定細菌の研究者によって行われて来た。複数の分野で同時並行で研究が進められたため、直接研究に携わっていない人にとっては、研究の全容の把握が難しいのではないと思われる。本稿では *B. bigelowii* とニトロプラスト研究の包括的な理解を促進するため、円石藻の分類研究の概要とその背景を説明した上で、これまでの *B. bigelowii* とニトロプラスト研究の過程を紹介し、そして、今後の研究課題について述べる。

## 円石藻の分類と記載

円石藻とは、ハプト植物門プリムネシウム藻綱に属する海生の単細胞藻類の内、細胞表面の鱗片を石灰化する種群の総称である。円石藻の現生種の細胞の大きさは 2–20 μm 程度であるため、石灰質ナノプランクトンと呼ばれることもある。円石藻を表す分類群として、Subclass Calcihaptophycidae (石灰化ハプト藻亜綱) (de Vargas *et al.* 2007) が提唱されているが、分子系統樹における Calcihaptophycidae クレードの信頼度が低く、単系統性が十分に支持されていないためか、その使用は広がっていない。低い信頼度の原因としては、分子系統解析が培養株から得られた分子情報に依存していて、未培養の多くの系統が含まれていないため、分子系統解析が実際多様性を十分にカバーできていないためである可能性がある。

円石藻の分類は主に、細胞表面を覆う円石 (石灰質鱗片) の形態や、円石を構成する方解石の結晶の配列方位に基づいて行われている (Young *et al.* 2003)。分類や分布に関する研

究は、1960年代までは主に生物学系の研究者によって、海水中に含まれるプランクトンの顕微鏡観察に基づいて行われていた。おそらく、外洋の船上での顕微鏡観察には限界があり、かつ、固定して外洋から研究室に持ち帰ることができる海水量にも限度があったため、その研究は沿岸～近海の試料に限られていた。1960年代後半以降の円石藻の分類は、主に地球科学系の研究者によって、外洋水を濾過した後のフィルター試料（乾燥標本）上に保存された円石の形態に基づいて行われるようになった。試料の作成と保存が簡単で嵩張らないことから、外洋域での大規模な調査が可能になり、円石藻植物相の広域分布（e.g., McIntyre & Bé 1967, Okada & Honjo 1973）や季節変化（e.g., Okada & McIntyre 1979）も明らかになった。その一方で、フィルター試料上には有機質の鱗片などが保存されないため、円石をもたない（鱗片を石灰化・化石化しない）種群や生活相は完全に無視されるようになった。

円石の形態に基づいた分類には別の問題もある。円石の形態は生活環の複相世代（2n）と単相世代（n）で大きく変化するため、多くの種において、複相世代と単相世代がそれぞれ別種として記載されてきてしまった（Young *et al.* 2003）。円石藻の一般的な種は、複相世代にはヘテロコックリスと呼ばれる複雑な形のカルサイト結晶から構成された円石を形成し、単相世代にはホロコックリスと呼ばれるカルサイトの自形である菱面体結晶から成る円石を形成するか、もしくは、鱗片を石灰化しない。単相世代の細胞は、知られている限り

では全て鞭毛をもつ運動性細胞であるが、複相世代の細胞は、運動性的場合と非運動性的場合がある。ヘテロコックリスとホロコックリスの両方の円石をもつ、核相変化の途中の個体の発見や、分子情報の一致に基づいて同種であることが確かめられた場合には、分類が見直されて1つの種名に統合されてきた（e.g., Geisen *et al.* 2002, Triantaphyllou *et al.* 2003, Keuter *et al.* 2019）。しかしながら、大半の種は生活環が不明なままであり、今でもそれぞれ別種として記載されている可能性が高い。

### *Braarudosphaera bigelowii* 研究小史

*Braarudosphaera bigelowii* は正五角形の石灰質鱗片ペンタリス12枚をもつ状態で（図1a）、北米大陸東岸のメイン湾の表層水中から発見・記載された（Gran & Braarud 1935）。ペンタリスは *Braarudosphaera* 科に特徴的な石灰質鱗片で、その構造はヘテロコックリスとホロコックリスのどちらとも違っている。そのため、ペンタリスの形状に基づいて核相を推定することはできない。しかし、*B. bigelowii* のペンタリスをもつ細胞は、鞭毛をもたない非運動性細胞であることから（Hagino *et al.* 2016）、複相世代である可能性が高い。

細胞の死後、ペンタリスは海底堆積物中で化石として保存される。化石記録に基づいて、*B. bigelowii* の出現は白亜紀後期のセノマニアン期（約1億年前～9300万年前）と推定されている（Young *et al.* 2024）。*B. bigelowii* のペンタリスを構

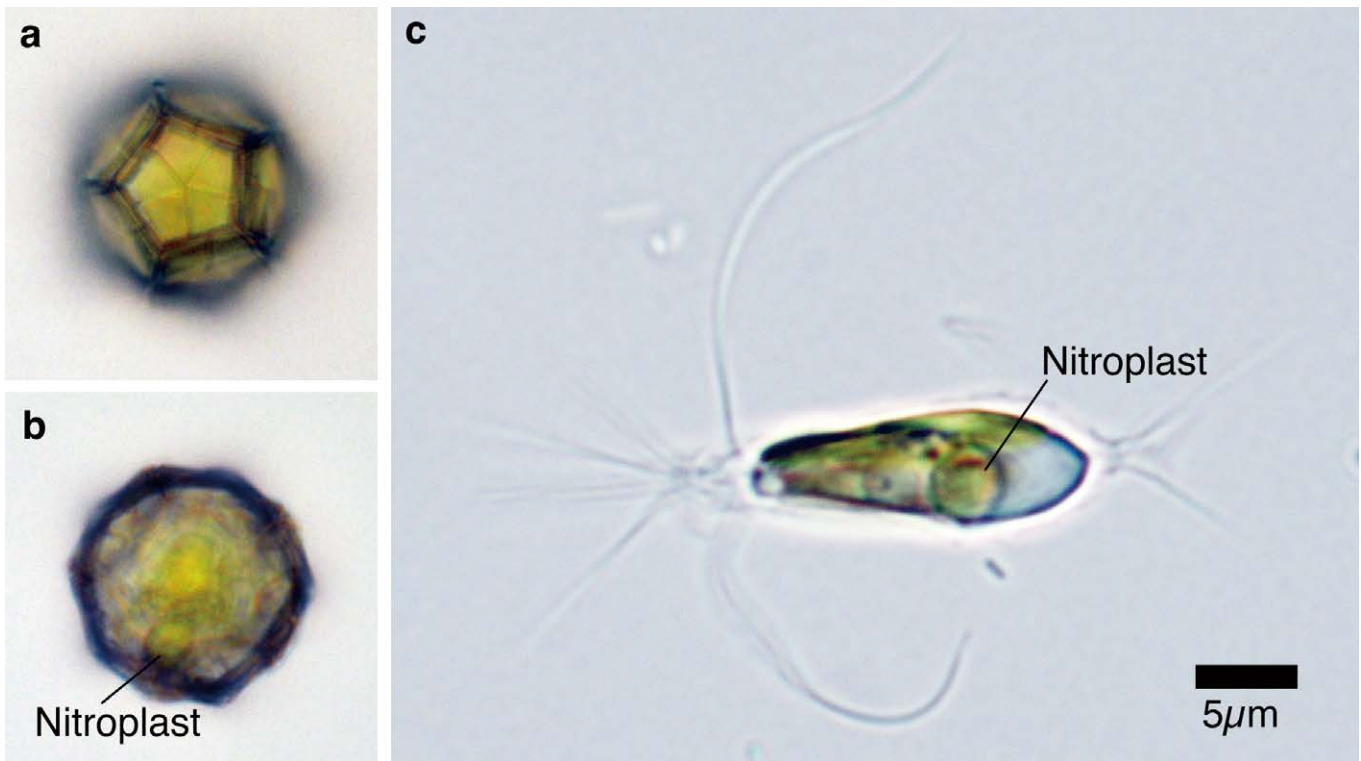


図1. *Braarudosphaera bigelowii* の光学顕微鏡像。a, b. 非運動性細胞, c. 運動性細胞。

Fig. 1. Light microscopic images of *Braarudosphaera bigelowii*. a, b. Nonmotile phase cell., c. Motile phase cell.

成するカルサイトは、他の円石藻の石灰質鱗片と比べて相対的に多くの Mg を含有することが知られている。その Mg を含む微量元素組成は、石灰化時の周囲の海水の微量元素組成を反映している可能性が高いため、*B. bigelowii* の化石は古海洋環境解析のための材料としても期待されている (Hagino *et al.* 2016, 萩野ら 2017)。なお、一般的な円石藻の化石が沿岸～外洋のさまざまな水深の堆積物中から見つかるのと異なり、*B. bigelowii* のペンタリス化石の分布は、通常は水深 70 m 以浅の大陸棚上部の堆積物に限られている (e.g., Takayama 1967, Tanaka 1991)。そのため以前は、「*B. bigelowii* は実は円石藻ではなく、生活環に海底での休眠相をもつ渦鞭毛藻ではないか？」との疑念をもたれていた (e.g., Siesser 1993)。

地球と生命の進化の包括的な理解を目的として、2003 年～2008 年に北海道大学にて、「21 世紀 COE プログラム 新・自然史科学創成」が行われた。このプログラムにおける若手研究プロジェクトの 1 テーマとして、筆者は生物系の研究者の協力のもと、*B. bigelowii* の分子系統解析を試みた。そして、単離された *B. bigelowii* の非運動性細胞 2 細胞から 18S rDNA 塩基配列が取得され、*B. bigelowii* がハプト藻 (円石藻) であることが確かめられた (Takano *et al.* 2006)。この結果により、*B. bigelowii* の渦鞭毛藻疑惑は払拭された訳だが、*B. bigelowii* の非運動性細胞が海水中から見つかる期間が 1 年のうち数日～1 週間程度と極めて短く (Hagino-Tomioka *et al.* 2019)、ハプトネマによる基底への付着行動が観察され (Hagino *et al.* 2016)、なおかつ、生きた *B. bigelowii* の非運動性細胞が海底堆積物中から見つかったこともあるため (Kim *et al.* 2016)、*B. bigelowii* の「非運動性細胞は底生である」という可能性はまだ残されている。

Takano *et al.* (2006) によってシーケンスされた、大きさが異なる *B. bigelowii* の 2 細胞の 18S rDNA 塩基配列からは、10 塩基の置換と 6 塩基の挿入もしくは欠損が確認された。現生の *B. bigelowii* のペンタリスの大きさの頻度分布は多峰性であることは以前から報告されていたため (萩野 1997, Hagino *et al.* 2005)、大きさと 18S rDNA 塩基配列の多様性の関係を調べる目的で、筆者は *B. bigelowii* の多様性の研究を継続して行うこととなった。そしてその結果、*B. bigelowii* はペンタリスの大きさに基づいて Small Form, Intermediate Form-A, Intermediate Form-B, Large form の 4 つのサイズグループに、18S rDNA 塩基配列に基づいて Genotypes I-V に分類できることがわかり、Intermediate Form-A の個体からは Genotypes I-II, Intermediate Form-B の個体からは Genotype III, Large Form の個体からは Genotypes IV-V の配列のみが得られた。その結果に基づいて「現生 *B. bigelowii* はペンタリスの大きさと 18S rDNA 遺伝子型によって区別できる複数の隠蔽種から構成された複合種である」と結論づけた (Hagino *et al.* 2009)。なお、現生の *B. bigelowii* のホロタイプは Intermediate form-B の範囲に含まれるため、Intermediate Form-B が *B. bigelowii sensu stricto* (s.s.) に相当し、その他のサイズグループは *B. bigelowii* の近縁別種 (隠蔽種) と推定さ

れた (Hagino *et al.* 2009, Takano *et al.* 2006)。また、Small Form の分子情報は未だ得られていない。

上述の *B. bigelowii* 多様性研究に用いる試料の採取のために、筆者は共同研究者の協力のもと、2006–2007 年に日本各地で海水試料の採取を行った (Hagino *et al.* 2009)。その内、2007 年の土佐湾の海水試料からは比較的多くの *B. bigelowii* (非運動性細胞) が見つかり、分子情報取得や培養実験のための個体を採取したあとでも、*B. bigelowii* の細胞にいくらかの余裕があった。そのような状況の中で、北海道大学の堀口健雄先生の「ちょっと切ってみようか」という発案のもと、*B. bigelowii* (非運動性細胞) の TEM 観察が試みられた。その結果、細胞内からグラム陰性細菌に似た三重膜構造に包まれた未知の小体が発見された。その小体のより詳細な研究のために、筆者は *B. bigelowii* の単離細胞の観察と培養実験に本格的に取り組むことになった。その後、Medline *et al.* (2008) によって *Chrysochromulina parkeae* の 18S rDNA 塩基配列が GenBank に公開され、それが *B. bigelowii* の配列に極めて近かったことから、*C. parkeae* が *B. bigelowii* の運動性細胞 (図 1c) であることが明らかになり、*B. bigelowii* の運動性細胞も培養実験の対象となった。さらに Thompson *et al.* (2012) によって、Unicellular Cyanobacterium group A (UCYN-A) の共生宿主の 18S rDNA 遺伝子塩基配列が、*B. bigelowii* と *C. parkeae* に近縁であるとの報告がなされた。そして、筆者が非運動性の単離細胞から取得した 16S rDNA 塩基配列が UCYN-A のクレードに含まれることが分かったため、*B. bigelowii* 細胞内から発見された「グラム陰性細菌に似た三重膜構造に包まれた未知の小体」と UCYN-A が同一であるという推定に基づき、「*B. bigelowii* は細胞内に窒素固定細菌 UCYN-A を共生藻としてもつ」という結論に至った (Hagino *et al.* 2013)。

## UCYN-A 研究小史

UCYN-A の研究は、海洋における窒素循環の研究に端を発する。窒素は大気の 78% を占めるありふれた存在であり、かつ、核酸やタンパク質形成などの生命活動に欠かせない重要な元素である。しかし、大気中の窒素分子は非常に安定で、真核生物はそれを直接利用することができない。そのため真核生物は、窒素固定細菌などによって作られた反応性の高い窒素化合物 (アンモニア等) を摂取して利用している。海洋の生態系と窒素循環を理解するためには、海洋における窒素固定者に関する理解が必要である。しかしながら、海中の「目に見えない微生物」の把握は容易ではない (小池 2010)。

20 世紀終盤の遺伝子解析技術の進歩により、環境 DNA 試料に基づいた群集解析が可能になり、海水試料中の *nifH* 遺伝子 (窒素固定を触媒する酵素であるニトロゲナーゼの遺伝子) 断片の解析が行われるようになった。そして、未知のシアノバクテリアに由来する *nifH* 塩基配列群が豊富に見つかり、それらのシアノバクテリアの系統は UCYN-A と UCYN-B と名付けられた (Zehr *et al.* 1998)。その後、UCYN-B は近縁種が特定され (Zehr *et al.* 2001)、さらに培養株が確立されて

*Crocospaera watsonii* と名付けられたが、UCYN-A の正体は長らく不明のままであった。

生物種の特定ができない状態で、UCYN-A の研究は進められた。その過程で、UCYN-A の様々な特性が明らかになった。海水中からは UCYN-A の *nifH* 遺伝子断片が大量に見つかるにも関わらず、他のシアノバクテリアと異なり、UCYN-A は（自家蛍光がないため）蛍光顕微鏡下で視認できない。また、他の単細胞の窒素固定細菌は、酸素によって不活性化するニトロゲナーゼ（窒素固定を触媒する酵素）を守るために、光合成の光化学系 II (PS II) によって酸素が発生する日中を避けて、夜間のみ窒素固定を行うのが一般的なのだが、UCYN-A は日中に窒素固定を行うことが明らかになった (Church *et al.* 2005, Zehr *et al.* 2016)。

見えない UCYN-A を特定するために、フローサイトメーターで細胞の単離が行われ、UCYN-A (A1) のゲノムが完全に解読された。その結果、一般的な窒素固定細菌のゲノムが 3 Mbp 超であるのと比べて、UCYN-A のゲノムは 1.44 Mbp とかなり小さいことや、光合成の光化学系 I (PS I) 遺伝子を完全な形で保持しているにも関わらず、光化学系 II (PS II) 遺伝子を欠損し、その他にも、RuBisCO や TCA サイクル等さまざまな重要な代謝経路の遺伝子を失っていることが明らかになった (Tripp *et al.* 2010, Zehr *et al.* 2008)。これらの結果は、UCYN-A は単独では決して生存することができず、失った機能を補完できる他の生物と共生していることを示していた。

ゲノムが解読されたことにより、UCYN-A に特異的な蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) プローブがデザインされ、ようやく UCYN-A の存在が蛍光顕微鏡下で視認できるようになった (Thompson *et al.* 2012, Krupke *et al.* 2013)。そして、フローサイトメーターで単離された UCYN-A 細胞と共に見つかる真核生物細胞の 18S rDNA 塩基配列が決定され、得られた配列が、*B. bigelowii* (と *C. parkeae* として登録された配列) に近縁であることが明らかになった (Thompson *et al.* 2012)。さらに、HISH-SIMS を用いた観察の結果、UCYN-A が *B. bigelowii* (に近縁な細胞) に窒素を供給し、その代わりに炭素を受け取る共生関係にある様子が観察された。ただし、HISH-SIMS の特性上、UCYN-A が *B. bigelowii* (に近縁な細胞) の細胞内にあるのか、それとも細胞表面に付着しているのかは特定できなかった (Thompson *et al.* 2012)。その後、*B. bigelowii* の研究により、UCYN-A が細胞内共生であることが確かめられた (Hagino *et al.* 2013)。

*B. bigelowii* と UCYN-A の共生関係は約 9100 万年前、*B. bigelowii* の出現 (白亜紀セノマニアン期: 約 1 億年前 ~ 9300 万年前) (Young *et al.* 2003) からわずかに数百万年以内に確立し、その後の *B. bigelowii* の多様化に従って、UCYN-A も多様化してきたと考えられている。(Cornejo-Castillo *et al.* 2016)。UCYN-A は *nifH* 塩基配列に基づいて UCYN-A1 ~ A6 の 6 グループに分類されており、その系統によって大きさや分布傾向が異なる (e.g., Cabello *et al.* 2016, Turk-Kubo *et al.* 2017)。外洋から豊富に産出する UCYN-A1 は直径が 1  $\mu\text{m}$  以下と非

常に小さい一方で、沿岸からの報告が多い UCYN-A2 は、直径が 2.5  $\mu\text{m}$  以上と比較的大きい。その他の系統は中間的な大きさで (Cabello *et al.* 2016, Cornejo-Castillo *et al.* 2019)、UCYN-A3 は外洋から、UCYN-A4 は沿岸からの報告例が多い (Turk-Kubo *et al.* 2017)。UCYN-A の体積は、それぞれの宿主細胞の体積と直線的な相関関係がある。これは、他のオルガネラと細胞の大きさの関係においても見られる傾向であり、細胞内におけるオルガネラが使用できる資源量の制約を反映するものであると考えられている (Cornejo-Castillo *et al.* 2024)。

### ***Braarudosphaera bigelowii* の培養株確立への試み**

ハプト藻は複相世代 (運動性もしくは非運動性細胞) と単相世代 (運動性細胞) の両方において、無性的に分裂増殖する (Young *et al.* 2003, Thierstein & Young 2004)。そのため *B. bigelowii* の場合も、おそらく複相世代と考えられる非運動性細胞と、単相世代と考えられる運動性細胞の両方の培養が可能な筈である。筆者が 2006 年に培養実験を開始した当時は、*B. bigelowii* の運動性細胞の形は分かっていたため、研究対象は非運動性細胞のみであった。過去 18 年にわたり、かなりの数の非運動性細胞を単離し、条件などを変えて培養を試みているが、現在でも非運動性細胞の安定的な培養には成功していない。運動性細胞については、*C. parkeae* として、1989 年 7 月の青森県浅虫港の海水から培養株が確立されていたことがある。その培養株にはクロロフィル *a* の自家蛍光が無い原核生物が細胞内に共生し、その原核生物が *C. parkeae* の細胞分裂に同調的に分裂し、分裂後の *C. parkeae* の娘細胞に 1 つずつ受け継がれることが報告されている (河地・井上 1995)。しかし、株が 1 年ほどで死滅したため、その原核生物の分子情報は取得されなかった (Suzuki *et al.* 2021)。

*Chrysochromulina parkeae* の 18S rRNA 塩基配列が 2008 年に GenBank に公表され、それが *B. bigelowii* とほぼ一致することが分かって以来、筆者は運動性細胞の培養も試みるようになった。そして Thompson *et al.* (2012) が UCYN-A の共生宿主が *B. bigelowii* (と *C. parkeae*) の近縁種であると報告して以降は、国内外の多くの研究者が運動性細胞の培養を試みたと聞いている。その中で、Suzuki *et al.* (2021) により、2015 年と 2017 年に高知県池ノ浦港の海水から 2 株が確立された。そのうち 1 つは、単離の時点で UCYN-A を保持していたが、培養のごく初期に細胞内から UCYN-A が消失した。もう一株も UCYN-A をもっていないが、その株の場合は、単離の時点で UCYN-A を保持していたか否かも不明である。Suzuki *et al.* (2021) は UCYN-A 欠損株のトランスクリプトーム解析を行い、培養株がアンモニア以外の窒素化合物の取り込みに関する遺伝子の発現を欠いていることを報告した。また、RNA-Seq データの解析を行い、UCYN-A から *B. bigelowii* の核への遺伝子転移が確認できないことを報告した。これらの結果に基づいて Suzuki *et al.* (2021) は、*B. bigelowii* と UCYN-A の共生関係は不安定で、培養環境においては UCYN-A を欠損しう

るとの結論に達した。なお、この研究では *B. bigelowii* の培養に ESM 培地が用いられた。

筆者は Coale *et al.* (2024) に使用された *B. bigelowii* (18S rDNA genotype III, UCYN-A2) を、2018 年に長崎県平戸市古江港の海水から単離して培養した。培養株は現時点 (2024 年 9 月) でも UCYN-A2 を細胞内に維持している。この株の確立と維持には、F/2 培地に GJE (ところてん抽出液) (Nishimura *et al.* 2020) を最終濃度 1% で添加した培地を用いている。同株は 2020 年から継続して、国立環境研究所の微生物系統保存施設において、ESM 培地を用いて UCYN-A を保持した状態で維持されている。このことは、ESM 培地が、必ずしも *B. bigelowii* の UCYN-A の維持に不適ではないということを示している。現時点では、培養環境下における UCYN-A の維持の可否を決める外的要因は特定できていない。

## ニトロプラストの提唱

細胞内共生はさまざまな真核生物から報告されているが、その関係が共生なのか、それともオルガネラ化して真核生物と細胞小器官の関係になっているのか、その線引きは容易では無い。オルガネラ化の基準として一般的に挙げられるのは、細胞周期の同期 (分裂後の両娘細胞への共生体の移動)、並びに、内部共生体から宿主核への遺伝子の移行と、移行後の遺伝子にコードされたタンパク質の共生体への輸送である (Gruber 2019)。Coale *et al.* (2024) は *B. bigelowii* と UCYN-A の関係が単なる共生なのか、それともオルガネラ化しているのかを調べるため、以下の研究を行った。

まず、*B. bigelowii* と UCYN-A の細胞周期が同期しているか否かを確認するために、培養株の軟 X 線トモグラフィ観察が行われた。その結果、以下の観察結果が得られた: UCYN-A が窒素を固定している日中は、*B. bigelowii* の細胞内におけるオルガネラの基本配置にあまり変化は無く、UCYN-A はミトコンドリアネットワークに取り囲まれている。このことは、窒素固定に必要な大量の ATP が、*B. bigelowii* のミトコンドリアから UCYN-A に供給されていることを示唆している。*B. bigelowii* の細胞分裂は暗黒下で行われ、それはミトコンドリアと UCYN-A の複製から始まる。複製されたミトコンドリアが UCYN-A から離れて 2 つに別れ、核と葉緑体の間に移動した後に、UCYN-A が分裂する。そして、葉緑体、核の順で複製・分裂した後に、*B. bigelowii* の細胞質分裂が始まり、*B. bigelowii* の 2 つの娘細胞には、分裂した UCYN-A は必ず 1 つずつ受け継がれる。このように、UCYN-A の分裂は *B. bigelowii* の細胞周期に組み込まれている様子が観察され、UCYN-A の分裂が *B. bigelowii* に制御されていることが示唆された。

UCYN-A プロテオームにおける *B. bigelowii* 核ゲノムの寄与を検証するために、Coale *et al.* (2024) は *B. bigelowii* 培養株全体と、*B. bigelowii* から分離した UCYN-A 試料のプロテオーム解析を行った。その結果、Suzuki *et al.* (2021) に示されたとおり、UCYN-A から *B. bigelowii* 核への遺伝子の転移

が生じていないにも関わらず、UCYN-A プロテオームから多数の *B. bigelowii* 核コードタンパク質が確認された。それらの *B. bigelowii* 核コードタンパク質中には、ゲノム縮小の過程で UCYN-A から失われたタンパク質と同じ機能を担うものが含まれていた。そして、UCYN-A ゲノムにコードされるタンパク質のみでは不完全な代謝経路を *B. bigelowii* から輸送されたタンパク質が補い、UCYN-A にてモザイク状の代謝経路が構築されていることが推定された。これらの結果は、UCYN-A におけるタンパク質翻訳の制御が宿主である *B. bigelowii* に移っていることを示唆している。以上のように、*B. bigelowii* が UCYN-A プロテオームで重要な役割を担っていることが推察され、かつ、*B. bigelowii* と UCYN-A の細胞周期が同期していることから、UCYN-A は共生藻というよりは窒素固定オルガネラ『ニトロプラスト』と呼ぶに相応しい段階であると、Coale *et al.* (2024) は結論づけた。

## 今後の課題と展望

培養株は確立されたが、*B. bigelowii* とニトロプラストには多くの謎と課題が残されている。Suzuki *et al.* (2021) によって報告されたとおり、*B. bigelowii* は培養環境下ではニトロプラストを欠損することがある。筆者の経験に過ぎないが、海水中から単離した直後の *B. bigelowii* は、ニトロプラストをもっているのが普通である (図 1b, c に見られるように、ニトロプラストは光学顕微鏡下で視認できる)。しかしながら、自然環境下において、全ての *B. bigelowii* がニトロプラストを維持しているのか否かは確かめられていない。この点は、早急に確認されるべきであろう。そして、培養株を用いたニトロプラスト維持 (と欠損) のシステムの解明は、オルガネラ化の基礎研究の上で重要であることはもちろん、後に述べるニトロプラストの生物学利用の上でも必要である。

*Braarudosphaera bigelowii* とニトロプラストについては、その両方から複数の遺伝子型が報告され、どちらにおいても遺伝子型間で細胞の大きさに違いがあることが知られている (Hagino *et al.* 2009, Cornejo-Castillo *et al.* 2019, Cornejo-Castillo *et al.* 2024)。*B. bigelowii* s.s. (Intermediate Form-B, 18S rDNA Genotype III) については、ニトロプラストが UCYN-A2 型であることが分かっているが、その他の宿主とニトロプラストの遺伝子型の対応関係は依然として不明である。また、異なった遺伝子型間で、ニトロプラストのオルガネラ化の進行が同程度なのか否かも確かめられていない。*B. bigelowii* の多様化プロセスと、ニトロプラストのオルガネラ化の進行状況の違いを調べるためには、他の遺伝子型の培養株を確立する必要がある。特に、外洋における窒素固定のかなりの部分を担っている UCYN-A1 宿主の培養株の確立は、*B. bigelowii* の多様性研究のみならず、海洋における *B. bigelowii* 複合種群の窒素固定量と環境因子の関係を、実験環境下で再現・検証するためにも必要である。

*Braarudosphaera bigelowii* (非運動性細胞) の各遺伝子型のペンタリスの大きさ (Hagino *et al.* 2009) から計算できる細

胞の直径と、FISH 観察で測定された UCYN-A 群の宿主細胞（おそらく運動性細胞）の大きさの測定結果（Cornejo-Castillo *et al.* 2024）を比較して推察するならば、UCYN-A1 の宿主は *B. bigelowii* Small Form である可能性が高く、UCYN-A3 と UCYN-A4 の宿主は Intermediate Form-A（18S rDNA Genotype I もしくは II）の可能性が高い。ここで特に興味深いのは、外洋から豊富に産出する UCYN-A1 の宿主である *B. bigelowii* の非運動性細胞（ペンタリス有り）が底生である可能性が残されていることや、ペンタリス化石が外洋の堆積物からは全くと言ってよいほど産出しないことを考えると、外洋に豊富な UCYN-A1 の宿主は、生活環を通じてペンタリスを形成しない可能性もある。もしそうなら、ペンタリスをもつ Small Form は、UCYN-A1 の宿主の候補から除外される。しかしながら、外洋の堆積物から *B. bigelowii* s.s.（UCYN-A2 宿主）のペンタリスが見つからないにも関わらず、UCYN-A2 の *nifH* 塩基配列は、比率は低くとも様々な外洋水試料から報告されている（*e.g.*, Martínez-Pérez *et al.* 2016, Turk-Kubo *et al.* 2017）。その事実を踏まえると、「*B. bigelowii* は外洋にいるときは石灰化しない」という別の可能性も考えることができる。

多くの円石藻の単相世代に特徴的なホロコッコリスをもつ細胞は、沿岸や近海の海水からの産出は稀で、主に外洋の貧栄養水塊から多く産出する（Kleijne 1991, 1993）。もし *B. bigelowii* にも同じ傾向があり、外洋では専らペンタリスをもたない運動性細胞（おそらく単相世代）の形で分布し、ペンタリスを有する非運動性細胞相（おそらく複相世代）の分布が沿岸に限られるのであれば、外洋堆積物からの *B. bigelowii* のペンタリス不産出と、外洋水からの UCYN-A2 の *nifH* 塩基配列の産出という矛盾した観察結果を、同時に説明することができる。そして、同様のことが UCYN-A1 宿主にも起こっているのかもしれない。外洋の海水から豊富に見つかる UCYN-A1 は、その宿主の 18S rDNA 塩基配列が Thompson *et al.* (2012) によって既に取得されている。そのため、Small Form の 18S rDNA 塩基配列が取得され、それが UCYN-A1 の宿主と一致するか否かを確認するか、もしくは、UCYN-A1 宿主の運動性細胞の培養株を取得した上で、核相変化を誘導して非運動性細胞をつくることができれば、上記の仮説の正否が確認できる。

培養環境下における円石藻の複相から単相への変化については、様々な種で報告されているが（*e.g.*, Parke & Adams 1960, Houdan *et al.* 2004）、単相から複相への変化の報告は、Noël *et al.* (2004) のみである。筆者は *B. bigelowii*（18S rDNA Genotype III）の運動性細胞から非運動性細胞への変化を複数回目撃したことがあるが、変化は稀で、必ずしも意図した条件では起こらず、その再現性には問題がある。そして、得られた非運動性細胞の維持と培養には常に失敗している。非運動性細胞への相転換の条件が特定できれば、外洋堆積物中におけるペンタリス不在の理由が確かめられる可能性がある。そして、ペンタリスをもつ非運動性細胞の安定培養が実現すれば、ペンタリスの微量元素組成から石灰化時の海水の

微量元素組成を推定するための換算式の樹立が可能になり、*Braarudosphaera* 化石の微量元素組成に基づいた、白亜紀～現在までの古海洋環境解析に道が開かれる。

*Braarudosphaera bigelowii* は窒素固定能をもつ事が確認された初めての真核生物である。現代農業は工業生産された窒素肥料に大きく依存しているが、窒素肥料の作成過程では大量の温室効果ガスが放出され、環境負荷が非常に大きいという問題がある。そのため、窒素肥料に頼らない農業の実現のために、トウモロコシや麦など、マメ科以外の食用作物への窒素固定能の付加が求められている。しかしながら、酸素によって失活するニトロゲナーゼを、酸素発生型の植物細胞の内部で維持する仕組みや、窒素固定能（ニトロプラスト）の次世代への継承システムの構築など、その実現には様々な壁があるとされてきた。その点、Coale *et al.* (2024) で確立された *B. bigelowii* 培養株は、細胞内に世代を超えてニトロプラストを維持しており、窒素固定作物の創出研究において壁となっている問題を、既に乗り越えた存在である。今後 *B. bigelowii* とニトロプラストの研究が進展し、ニトロプラスト維持のメカニズムが解明されることにより、窒素固定作物の創出の実現に近づくのではないかと期待されている（Liu *et al.* 2024）。

## 謝辞

*Braarudosphaera bigelowii* とニトロプラストの研究は、北海道大学「21 世紀 COE プログラム新・自然史科学創成」における若手研究プロジェクトに端を発する。同プログラムにて *B. bigelowii* 研究の機会をくださった故・岡田尚武教授（拠点リーダー）並びに、研究の支援と指導をしてくださった堀口健雄教授と研究室の皆様、そして、お世話になった COE プログラムの全ての関係者の方々に、心よりのお礼を申し上げます。COE プログラム終了後は、岡山大学惑星物質研究所、高知大学理工学部地球環境防災学科、高知大学海洋コア国際研究所にて、*B. bigelowii* の研究を継続することができた。培養株確立の為の貴重な助言を、国立環境研究所の河地正伸博士と Mary-Helene Noël 博士、ならびに、筑波大学の石田健一郎教授と高知大学の足立真佐雄教授と両研究室のスタッフと学生の皆様から頂いた。サンプリング並びに培養株の確立と維持は、主に家族の協力のもとで、自宅の研究室で行った。培養株の研究は、科学研究費補助金（課題番号 17K05694 と 24K09574）と、カリフォルニア大学サンタクルズ校 Jonathan P. Zehr 教授から高知大学への受託研究による支援の下で行った。本稿の執筆にあたり、2 名の査読者の方々と編集委員の大沼亮博士からは、多くの建設的なご助言を頂いた。ご指導・協力・援助して下さった全ての皆様に深く感謝申し上げます。

## 引用文献

Cabello, A. M., Cornejo-Castillo, F. M., Raho, N. *et al.* 2016. Global distribution and vertical patterns of a prymnesiophyte-cyanobacteria obligate symbiosis. *ISME J.* 10: 693–706.

- Church, M. J., Short, C. M., Jenkins, B. D., Karl, D. M. & Zehr, J. P. 2005. Temporal patterns of nitrogenase gene (*nifH*) expression in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5362–5370.
- Coale, T. H., Loconte, V., Turk-Kubo, K. A. *et al.* 2024. Nitrogen-fixing organelle in a marine alga. *Science* 384: 217–222.
- Cornejo-Castillo, F. M., Cabello, A. M., Salazar, G. *et al.* 2016. Cyanobacterial symbionts diverged in the late Cretaceous towards lineage-specific nitrogen fixation factories in single-celled phytoplankton. *Nat. Commun.* 7: 11071. doi.org/10.1038/ncomms11071
- Cornejo-Castillo, F. M., Inomura, K., Zehr, J. P. & Follows, M. J. 2024. Metabolic trade-offs constrain the cell size ratio in a nitrogen-fixing symbiosis. *Cell* 187: 1762–1768.
- Cornejo-Castillo, F. M., Muñoz-Marín, M. D. C., Turk-Kubo, K. A. *et al.* 2019. UCYN-A3, a newly characterized open ocean sublineage of the symbiotic N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium *Candidatus Atelocyanobacterium thalassa*. *Environ. Microbiol.* 21: 111–124.
- de Vargas, C., Aubry, M. P., Probert, I. & Young, J. R. 2007. Origin and evolution of coccolithophores: From coastal hunters to oceanic farmers. In: Falkowski, P. G. & Knoll, A. H. (eds.) *Evolution of Primary Producers in the Sea*. pp. 251–285. Elsevier Academic Press, New York.
- Feng, D.-F., Cho, G. & Doolittle, R. F. 1997. Determining divergence times with a protein clock: Update and reevaluation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 13028–13033.
- Geisen, M., Billard, C., Broerse, A. T. C., Cros, L., Probert, I. & Young, J. R. 2002. Life-cycle associations involving pairs of holococcolithophorid species: intraspecific variation or cryptic speciation? *Eur. J. Phycol.* 37: 531–550.
- Gran, H. H. & Braarud, T. 1935. A quantitative study of the phytoplankton in the Bay of Fundy and the Gulf of Maine (including observations on hydrography, chemistry and turbidity). *J. Biol. Board Can.* 1: 279–467.
- Gruber, A. 2019. What's in a name? How organelles of endosymbiotic origin can be distinguished from endosymbionts. *Microb. Cell* 6: 123–133.
- 萩野恭子 1997. 東北日本太平洋沿岸海域における現生石灰質ナノプラクトン群集の分布. *化石* 63: 1–19.
- Hagino, K., Okada, H. & Matsuoka, H. 2005. Coccolithophore assemblages and morphotypes of *Emiliania huxleyi* in the boundary zone between the cold Oyashio and warm Kuroshio currents off the coast of Japan. *Mar. Micropaleontol.* 55: 19–47.
- Hagino, K., Onuma, R., Kawachi, M. & Horiguchi, T. 2013. Discovery of an endosymbiotic nitrogen-fixing cyanobacterium UCYN-A in *Braarudosphaera bigelowii* (Prymnesiophyceae). *PLoS One* 8: e81749.
- 萩野恭子・大沼亮・高野義人・富岡尚敬・堀口健雄 2017. 円石藻 *Braarudosphaera bigelowii* 研究のこれまで・これから. *月刊海洋号外* 60: 115–124.
- Hagino, K., Takano, Y. & Horiguchi, T. 2009. Pseudo-cryptic speciation in *Braarudosphaera bigelowii* (Gran and Braarud) Deflandre. *Mar. Micropaleontol.* 72: 210–221.
- Hagino, K., Tomioka, N., Young, J. R., Takano, Y., Onuma, R. & Horiguchi, T. 2016. Extracellular calcification of *Braarudosphaera bigelowii* deduced from electron microscopic observations of cell surface structure and elemental composition of pentaliths. *Mar. Micropaleontol.* 125: 85–94.
- Hagino-Tomioka, K., Tomioka, N. & Tomioka, N. 2019. Seasonal succession of living coccolithophores in coastal waters in the Tomari Port, Tottori, Japan. *J. Nannoplankton Res. Special Issue* 4: 1–15.
- Houdan, A., Billard, C., Marie, D. *et al.* 2004. Holococcolithophore-heterococcolithophore (Haptophyta) life cycles: flow cytometric analysis of relative ploidy levels. *Syst. Biodivers.* 1: 453–465.
- 河地正伸・井上勲 1995. *Chrysochromulina parkeae* (ハプト藻綱) の細胞構造と細胞内共生体の観察. *藻類* 43: 79.
- Keuter, S., Young, J. R. & Frada, M. J. 2019. Life cycle association of the coccolithophore *Syracosphaera gaarderae* comb. nov. (ex *Alveosphaera bimurata*): Taxonomy, ecology and evolutionary implications. *Mar. Micropaleontol.* 148: 58–64.
- Kim, J.-H., Kim, J. H., Wang, P., Park, B. S. & Han, M.-S. 2016. An improved quantitative real-time PCR assay for the enumeration of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) cysts using a DNA debris removal method and a cyst-based standard curve. *PLoS One.* 11: e0145712. doi.org/10.1371/journal.pone.0145712
- Kleijne, A. 1991. Holococcolithophorids from the Indian Ocean, Red Sea, Mediterranean Sea and North Atlantic Ocean. *Mar. Micropaleontol.* 17: 1–76.
- Kleijne, A. 1993. Morphology, taxonomy and distribution of extant coccolithophorids (Calcareous nannoplankton) Annelies Kleijne. Amsterdam, Netherland.
- 小池勲 2010. 沿岸域および海洋における窒素の付加とその循環: 地球環境 15: 179–187.
- Krupke, A., Musat, N., LaRoche, J. *et al.* 2013. In situ identification and N<sub>2</sub> and C fixation rates of uncultivated cyanobacteria populations. *Syst. Appl. Microbiol.* 36: 259–271.
- Liu, F., Fernie, A. R. & Zhang, Y. 2024. Can a nitrogen-fixing organelle be engineered within plants?. *Trends Plant Sci.* doi.org/10.1016/j.tplants.2024.07.001
- Martínez-Pérez, C., Mohr, W., Löscher, C. R. *et al.* 2016. The small unicellular diazotrophic symbiont, UCYN-A, is a key player in the marine nitrogen cycle. *Nat. Microbiol.* 1: 1–7. doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.163
- McIntyre, A. & Bé, A. W. H. 1967. Modern Coccolithophoridae of the Atlantic Ocean - I. Placoliths and Cyrtholiths. *Deep-Sea Res. Oceanogr.* 14: 561–597.
- Medlin, L. K., Sáez, A. G. & Young, J. R. 2008. A molecular clock for coccolithophores and implications for selectivity of phytoplankton extinctions across the K/T boundary. *Mar. Micropaleontol.* 67: 69–86.
- Nishimura, T., Uchida, H., Noguchi, R. *et al.* 2020. Abundance of the benthic dino agellate *Prorocentrum* and the diversity, distribution, and diarrhetic shellfish toxin production of *Prorocentrum lima* complex and *P. caipirignum* in Japan. *Harmful Algae* 96: 101687.
- Noël, M.-H., Kawachi, M. & Inouye, I. 2004. Induced dimorphic life cycle of a coccolithophorid, *Calyptrosphaera sphaeroidea*. *J. Phycol.* 40: 112–129.
- Okada, H. & Honjo, S. 1973. The distribution of oceanic coccolithophorids in the Pacific. *Deep-Sea Res.* 20: 355–374.
- Okada, H. & McIntyre, A. 1979. Seasonal distribution of modern coccolithophores in the Western North Atlantic Ocean. *Mar. Biol.* 54: 319–328.
- Parke, M. & Adams, I. 1960. The motile (*Crystallolithus hyalinus* Gaarder & Markali) and non-motile phases in the life history of *Coccolithus pelagicus* (Wallich) Schiller. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 39: 263–274.
- Siesser, W. G. 1993. Calcareous nannoplankton, In: Lipps, J. H. (ed.). *Fossil Prokaryotes and Protists*. pp. 169–201. Blackwell Scientific Publications, Boston.
- Stephens, T. G., Gabr, A., Calatrava, V., Grossman, A. R. & Bhattacharya, D. 2021. Why is primary endosymbiosis so rare? *New Phytol.* 231: 1693–1699.

- Suzuki, S., Kawachi, M., Tsukakoshi, C. *et al.* 2021. Unstable relationship between *Braarudosphaera bigelowii* (= *Chrysochromulina parkeae*) and its nitrogen-fixing endosymbiont. *Front. Plant Sci.* 12: 749895.
- Takano, Y., Hagino, K., Tanaka, Y., Horiguchi, T. & Okada, H. 2006. Phylogenetic affinities of an enigmatic nannoplankton, *Braarudosphaera bigelowii* based on the SSU rDNA sequences. *Mar. Micropaleontol.* 60: 145–156.
- Takayama, T. 1967. First report on nannoplankton of the Upper Tertiary and Quaternary of the southern Kwanto region, Japan. *Jahrbuch der Geologischen Bundesanstalt. Wien.* 110: 169–198.
- Tanaka, Y. 1991. Calcareous nannoplankton thanatocoenoses in surface sediments from seas around Japan. *Sci. Rep. Tohoku Univ. Sec. Ser. (Geology)* 61: 127–198.
- Thierstein, H. R. & Young, J. R. 2004. Coccolithophores – From molecular processes to global impact. Springer Berlin Heidelberg, New York.
- Thompson, A. W., Foster, R. A., Krupke, A. *et al.* 2012. Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga. *Science* 337: 1546–1550.
- Triantaphyllou, M., Dimiza, M. D. & Dermitzakis, M. 2003. A new coccolithophore life-cycle association: *Syracosphaera halldalii* (Heterococcolithophore) and *Calyptrolithina divergens* var. *tuberosa* (Holococcolithophore). *Gaia* 11: 77–80.
- Tripp, H. J., Bench, S. R., Turk, K. A. *et al.* 2010. Metabolic streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium. *Nature* 464: 90–94.
- Turk-Kubo, K. A., Farnelid, H. M., Shilova, I. N., Henke, B. & Zehr, J. P. 2017. Distinct ecological niches of marine symbiotic N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium *Candidatus Atelocyanobacterium thalassa* sublineages. *J. Phycol.* 53: 451–461.
- Yoon, H. S., Hackett, J. D., Ciniglia, C., Pinto, G. & Bhattacharya, D. 2004. A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 21: 809–2013.
- Young, J. R., Geisen, M., Cros, L., Kleijne, A., Probert, I. & Ostergaard, J. B. 2003. A guide to extant coccolithophore taxonomy. *J. Nannoplankton Res., Special Issue.* 1: 132 p.
- Young, J. R., Bown, P. R. & Lees J. A. 2024. Nannotax3 (2024年8月5日閲覧) <http://www.mikrotax.org/Nannotax3>.
- Zehr, J. P., Bench, S. R., Carter, B. J. *et al.* 2008. Globally distributed uncultivated oceanic N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria lack oxygenic Photosystem II. *Science* 322: 1110–1112.
- Zehr, J. P., Mellon, M. T. & Zani, S. 1998. New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (*nifH*) genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3444–3450.
- Zehr, J. P., Shilova, I. N., Farnelid, H. M., Muñoz-Marín, M. D. C. & Turk-Kubo, K. A. 2016. Unusual marine unicellular symbiosis with the nitrogen-fixing cyanobacterium UCYN-A. *Nat. Microbiol.* 2: 16214. doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.214
- Zehr, J. P., Waterbury, J. B., Turner, P. J. *et al.* 2001. Unicellular cyanobacteria fix N<sub>2</sub> in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature* 412: 635–638.

(2024年8月9日受付, 2024年10月4日受理)

通信担当編集委員: 大沼 亮