

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23117009

研究課題名(和文)オルガネラの人工修飾と創成の技術基盤

研究課題名(英文)Technical basis for artificial modification and transplantation of organelles

研究代表者

洲崎 敏伸(Suzaki, Toshinobu)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00187692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 70,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミドリゾウリムシは細胞内に共生クロレラを持つ。3-D電顕解析により、ホスト細胞のミトコンドリアがクロレラの定着に重要であることがわかった。プロテオーム・トランスクリプトーム解析により、クロレラ包膜のタンパク質を網羅的に解析した。さらに、この生物が放射性セシウムを蓄積する能力を持つことを見出した。嫌気性原虫Entamoeba属はミトソーム(DNAを失ったミトコンドリア)をもつ。赤痢アメーバから単離したミトソームを同一種に、またE. nuttalliとE. invadensに移植することができた。一部の移植されたミトソームでは、レシピエント由来のミトソームタンパク質が共局在した。

研究成果の概要(英文)：A green ciliate *Paramecium bursaria* harbors several hundred *Chlorella* cells in its cytoplasm. An electron microscopic approach with 3-D reconstruction showed that mitochondria in the host's cytoplasm provide a structural scaffold for symbiotic *Chlorella* to be anchored in the host's cytoplasm. Proteome and de novo transcriptome sequencing analyses were carried out to identify proteins in the peri-algal membrane fraction. As a distinctive aspect of the unicellular Matryoshka-type protists, *P. bursaria* was also found to accumulate soil-bound radioactive cesium. Anaerobic protozoan *Entamoeba* species have mitosomes that are mitochondrion-derived organelles lacking DNA. Mitosomes isolated from *E. histolytica* were transplanted successfully into *E. histolytica*, *E. nuttalli* and *E. invadens*. Co-localization of mitochondrial proteins from donor and recipient was observed in single mitosomes of some transplanted cells.

研究分野：細胞生物学、原生生物学

キーワード：細胞内共生 原生生物 ミトコンドリア マイクロインジェクション オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

細胞内共生由来のオルガネラ系では、共生体 DNA の多くは核ゲノムに移行しており、共生体 DNA と宿主細胞の DNA との間に緊密な遺伝情報の補完がなされている。このことが、ある共生体を他の宿主に移植することが困難な大きな理由である。従って、オルガネラの人為的な創出を可能とするためには、共生体の遺伝子が共生体自身と核ゲノムとに分散して存在することのない系を選択するのが、最も簡単な方法と言える。たとえば、クロレラを一種のオルガネラとして細胞内共生させている原生動物では、細胞内共生関係が樹立して間もないために、共生体が他の複数の宿主生物へと自然界でも移行することが可能であることが最近の研究で示された (Hayakawa & Suzaki, Jpn. J. Protozool., 44:39-40, 2011)。また、マイトソーム (ミトコンドリア関連オルガネラ) のように、ホストの核ゲノムへ全ての共生体遺伝子の移行が完了してしまったと考えられる系も存在する (Mi-ichi et al., Proc Natl Acad Sci USA 106:21731, 2009) ことが知られていた。

2. 研究の目的

本研究では、共生体によって駆動される真核生物の進化の基本原則を解明するという本研究領域の全体構想の中で、オルガネラの創成と進化の理解に根ざしたオルガネラの人為的操作を通して有用生物を創出することを目的として研究を実施した。具体的には、上述のような研究の背景に基づき、細胞内共生進化の両極に位置しているクロレラ共生系とマイトソーム系を用いて、細胞内共生を可能とする必要不可欠な因子を探索することを目指した。

(1) 原生動物や無脊椎動物の細胞内にクロレラが共生する場合、細胞内共生クロレラは、宿主細胞により供給された一層の膜 (PV 膜) で覆われている。PV 膜は、宿主と共生体との間での様々な物質輸送や情報伝達に関与していると考えられている。そこで、様々な共生クロレラを包む PV 膜を単離精製し、膜の透過性及び PV 膜に含まれるタンパク質成分の比較検討を行うこととした。さらに本研究では、共生藻類が光合成を行い糖を産生するのに至適であるミドリゾウリムシ体内での共生環境を試験管内で再現し、必須な因子を同定すると共に、その検討過程で得られた知見を応用し、共生クロレラおよびホストの原生動物細胞を麦芽糖産生工場として利用する可能性について検討することとした。

(2) また、分担研究においては、人為的操作による新たな共生関係を構築する試みとして、オルガネラの機能不全による疾病の治療法の創出などの医学的側面への応用も視野に入れたオルガネラのマイクロインジェクションによる異種移植実験を行い、異種移植の互換性を決定する根本的な因子の同定

を行うことを目標とした。これらの研究を総合することで、オルガネラの細胞内における共生・定着にかかわる必須因子を同定することが本研究課題の目的である。

3. 研究の方法

(1) 本研究課題では、細胞内共生クロレラに関する体系的な知見を得る目的で、細胞内共生クロレラをもつミドリアメーバ (*Mayorella* sp.)、ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*)、ミドリラッパムシ (*Stentor* sp.)、ミドリヒドラ (*Hydra viridis*) などを含む多種のクロレラ共生生物を用いて、以下の実験を行った。1) 系統の異なるこれらの緑色原生動物および緑色無脊椎動物の細胞内から単離したクロレラを、白化したクロレラ共生生物に与え、クロレラが再共生するかどうかを検証した。2) 単離したクロレラを白化したクロレラ共生生物や、もともとクロレラを共生させていない原生動物やヒドラにマイクロインジェクションし、再共生が成立するかを検証した。3) クロレラ共生細胞を透過型電子顕微鏡により観察し、細胞内共生クロレラと、それを包含する PV 膜の微細構造的特徴を調べた。4) 細胞内共生中のクロレラから PV 膜を単離し、含まれるタンパク質を解析した。ここでは、クロレラが産生したマルトースをホストの細胞内へと輸送するための輸送体、マルトースの分解酵素、ホストからクロレラへのアミノ酸の輸送体、PV 膜内部を低 pH に維持するためのプロトンポンプなどが存在することが予想された。

(2) 分担研究では、赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) を中心に、オルガネラの同種間および異種間の移植実験を実施した。赤痢アメーバのマイトソームは、ミトコンドリアと比べて小型でオルガネラ DNA が消失していることから、単純化したミトコンドリアのモデルとして扱った。移植方法としては、細胞質成分の混入を抑えるためにマイクロインジェクション法を採用し、条件検討を行った。マイトソームのドナーとして、ヘマグルチニン (HA) タグが融合したマイトソームタンパク質を発現する赤痢アメーバ株を使用した。レシピエントには、新たに作出した Myc タグ融合マイトソームタンパク質を発現する株を含む同種 5 株と *E. invadens* および *E. nuttalli* を使用した。*E. nuttalli* の標準株は小型であるため、新規の株分離を行い、レシピエントに適した株を検索した。また、*E. nuttalli* ではマイトソームに関連する生物学的情報が乏しかったため、標準株の全ゲノム解析を行うと共に、分子細胞生物学的解析を行った。オルガネラの移植後、その成否の判断は、免疫蛍光抗体法によって行った。レシピエント間での移植成功率を比較し、経時的なドナー由来マイトソームの変化を観察した。

4. 研究成果

(1) クロレラ共生系に関する研究成果

細胞内共生クロレラをもつミドリアメーバ・ミドリゾウリムシ・ミドリラッパムシ・ミドリヒドラなどを含む多種のクロレラ共生生物を日本国内から探索した。これまでに約 20 種類のクロレラ共生生物を確認し、上記 4 種については実験室内での株化に成功した。

これらの緑色生物から単離したクロレラを、白化したクロレラ共生生物に与え、再共生の有無を検証した。その結果、同じ種間でも再共生しないものや、異種間で再共生するものが存在することが判明した。

クロレラ共生細胞を超高圧透過型電子顕微鏡により観察し、電子線トモグラフィーによる詳細な形態観察を行った。その結果、細胞内共生クロレラと、それを包含する PV 膜に、いくつかの興味深い微細構造的特徴を見出した。すなわち、

細胞内共生中のクロレラから PV 膜を単離し、含まれるタンパク質を解析した。その結果、いくつかの特徴的なタンパク質のバンドを検出できた。PV 膜に存在するタンパク質の特徴とコードする遺伝子を同定する目的で、トランスクリプトーム解析を実施中し、さらに得られたデータベースを基に PV 膜に特異的に存在するタンパク質の特徴とコードする遺伝子を質量分析法により同定した。その結果、クロレラが産生したマルトースをホストの細胞内へと輸送するための輸送体、ホストからクロレラへのアミノ酸の輸送体、PV 膜内部を低 pH に維持するための V-type ATPase を含む、多くのタンパク質が同定された。

水中や土壌中に生息する微生物が、環境浄化に大きな役割を果たしていることはよく知られている。その中でも、細胞内に他の生物を共生させている、いわゆるマトリョーシカ型の真核微生物が、複数の生物の持つ能力を共有することで大きな環境浄化作用を示していることが本研究からわかってきた。そこで、土壌環境からのセシウム除去にミドリゾウリムシを用いることを試みた。土壌粒子に結合したセシウムは低 pH 環境で可溶化されやすいことが知られている。また、植物や藻類は可溶化したセシウムを体内に蓄積する能力が高いことも知られている。ミドリゾウリムシは、土壌粒子を体内に取り込み、食胞内で pH2 程度にまで酸性化することも知られている。そこで、土壌結合性のセシウムをミドリゾウリムシに与えたところ、4 日間で約 300 倍の濃縮率で体内に取り込むことが確認された。共生クロレラを持たない系統のミドリゾウリムシでは、セシウムの取り込みは認められなかった。STEM を用いた X 線元素マッピングを行ったところ、取り込まれたセシウムのシグナルは、ミドリゾウリムシやクロレラの細胞内に存在する lipid droplets に認められた。このように、ミドリゾウリムシ

は、セシウム汚染土壌からのセシウムの回収に利用できることがわかった。さらに、走電性を利用してミドリゾウリムシのみを簡単に回収できることもわかった。これらの結果を基に、マトリョーシカ型生物によるセシウムの除去法についての特許を出願した(図 1)。

ミドリゾウリムシを用いたセシウム汚染土壌の新規処理法開発

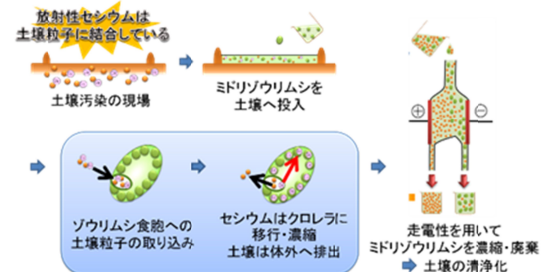


図 1.マトリョーシカ生物を用いた土壌からの放射性セシウムの除去法

(2) マイトソーム共生系に関する研究成果

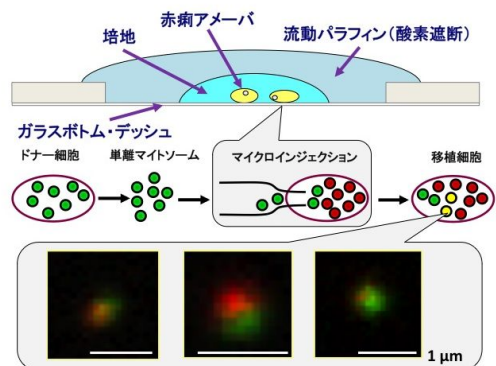
マイクロインジェクションを効率よく実施できる条件(インジェクションキャピラリー径やインジェクション圧、温度、嫌気条件の保持法などの至適条件)を決定した。また、移植に用いるマイトソームの単離法についても検討し、マイトソーム画分の細胞毒性を抑え、適切に濃縮することができた。

マイトソーム移植後の 3 種 7 株全てのレシピエント細胞において、ドナー由来マイトソームのシグナルが観察された。同種異株間の移植成功率は、同一株間移植と同程度であり、また、*E. nuttalli* を用いた異種間移植においても有意な差は認められなかった。*E. invadens* を用いた移植実験は条件が異なるため、単純な比較は難しいものの、顕著な差はなかった。赤痢アメーバでは、移植後に分裂時の画像を取得できた。*E. invadens* でも、移植後に lag-phase が長くなるものの、その後は移植していない細胞と同様の増殖曲線を示した。

レシピエント細胞内のドナー由来マイトソームは、その検出数が経時的に減少した。しかし、レシピエントとして autophagy-related protein 8 (Atg8) の発現抑制株を用いても、その移植成功率は対照株と比べて有意差がなかった。従って、ドナー由来マイトソームが自食作用による積極的な排除を受けていないことが示唆された。

Myc タグが融合したマイトソームタンパク質を発現する株をレシピエントとした場合、ドナー由来マイトソームと Myc タグタンパク質のシグナルが共局在する観察像が得られた(図 2)。これらの結果から、移植後のマイトソームは機能的であり、融合によるタンパク質の交換やドナー由来マイトソームによるレシピエントタンパク質の取り込みが行われている可能性が示された。

解読した *E. nuttalli* のゲノムデータと公開されている *E. invadens* のゲノムデータの解析から、同属間ではマイトソームタンパク質の



緑色はHAタグ標識ミトソーム(ドナー由来)を、赤色はMycタグ標識ミトソーム(レシピエント由来)を示す。移植実験より、ドナー由来ミトソームに対して、レシピエント由来ミトソームが融合する、或いは新規に発現した蛋白質が輸送される可能性を示した。

図 2. 移植細胞におけるドナー由来ミトソームとレシピエント由来タンパク質の共局在

相同性が高く、ミトソーム移植に対する許容性は高いと考えられた。また、異種間移植の技術基盤確立の一環として、増殖速度の異なる *E. nuttalli* 3 株間で、ミトソームの比較解析を行った。増殖速度は細胞容積と負の相関を示す一方で、ミトソーム密度とは正の相関を示した。さらに、トランスクリプトーム解析を行った結果、増殖速度の速い株ではミトソームの硫酸活性化経路に関わる遺伝子群の発現が、他の 2 株と比較して高いことが判明した。特に、本経路の律速酵素の発現量が 3 倍高かった。レシピエント株の選定のための有益な情報を得ることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 24 件)

Tachibana H, Yanagi T, Feng M, Bandara KBAT, Kobayashi S, Cheng X, Hirayama K, Rajapakse RPVJ. Isolation and molecular characterization of *Entamoeba nuttalli* strains showing novel isoenzyme patterns from wild toque macaques in Sri Lanka. *J Euk Microbiol* 63: 171-180, 2016
DOI: 10.1111/jeu.12265

Maekawa S, Kobayashi Y, Morita M, Suzaki T. Tight binding of NAP-22 with acidic membrane lipids. *Neurosci Lett.* 600: 244-8, 2015
DOI: 10.1016/j.neulet.2015.06.025

Kato K, Yahata K, Dhoubhadel BG, Fujii Y, Tachibana H. Novel hemagglutinating, hemolytic and cytotoxic activities of the intermediate subunit of *Entamoeba histolytica* lectin. *Sci Rep* 5: 13901, 2015
DOI: 10.1038/srep13901

Deng Y, Ran W, Man S, Li X, Gao H, Tang W, Tachibana H, Cheng X. Artemether exhibits amoebicidal activity against *Acanthamoeba castellanii* through inhibition

of the serine biosynthesis pathway.

Antimicrob Agents Chemother 59:

4680-4688, 2015

DOI: 10.1128/AAC.04758-14

Song C, Suzaki T. Improved preservation of organelles in *Paramecium bursaria* by freeze-substitution with glutaraldehyde and osmium tetroxide. *J. Electr. Microsc. Technol. Med. Biol.*, 27: 1-8, 2013

Tachibana H, Yanagi T, Lama C, Pandey K, Feng M, Kobayashi S, Sherchand JB.

Prevalence of *Entamoeba nuttalli* infection in wild rhesus macaques in Nepal and characterization of the parasite isolates. *Parasitol Int* 62: 230-235, 2013

DOI: 10.1016/j.parint.2013.01.004

Sugiura M, Tanaka Y, Suzaki T, Harumoto T.

Alternative gene expression in type I and type II cells may enable further nuclear changes during conjugation of *Blepharisma japonicum*. *Protist*, 163: 204-216, 2012
DOI: 10.1016/j.protis.2011.07.007

Maruyama S, Suzaki T, Weber APM,

Archibald JM, Nozaki H

Eukaryote-to-eukaryote gene transfer gives rise to genome mosaicism in euglenoids. *BMC Evolutionary Biology*, 11: 105, 2011

DOI: 10.1186/1471-2148-11-105

[学会発表](計 136 件)

風間 真、荻原早苗、牧内貴志、橘 裕司. 寄生性アメーバにおけるオルガネラの種内及び種間移植実験. 第 85 回日本寄生虫学会大会. 2016 年 3 月 19-20 日, 宮崎市民センター(宮崎県・宮崎市)

風間 真、荻原早苗、牧内貴志、橘 裕司. 嫌気性アメーバにおけるオルガネラ移植系の構築. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会. 2015 年 12 月 1-4 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

Islam MDS, Yoshimura C, Suzaki T New bioremediation technique for radioactive cesium-contaminated soil using *Paramecium bursaria*. VII European Congress of Protistology, 2015.9.8, セビリア(スペイン)

風間 真、荻原早苗、吉田和弘、牧内貴志、野崎智義、橘 裕司. 嫌気性原虫におけるオルガネラ移植法確立を目指したマイクロインジェクション法の検討. 第 84 回日本寄生虫学会大会. 2015 年 3 月 21-22 日, 杏林大学三鷹キャンパス(東京都・三鷹市)

Song C, Jung H, Hyun J, Suzaki T. Improved preservation of organelles in *Paramecium bursaria* by freeze-substitution with glutaraldehyde and osmium tetroxide.

Annual Meeting of the Korean Society of Microscopy, 2013.6.13, ソウル(韓国)

Suzaki T, Song C. Intracellular symbiosis of

Chlorella in *Paramecium bursaria* with possible involvement of mitochondrial dynamics. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2011.5.31, 名古屋市 (愛知県)

〔図書〕(計6件)

Fukuda Y, Suzuki T. Springer, Marine Protists, 2015, 648 (23-45)
Tachibana H, Takekoshi M. Springer, Cell Engineering 7: Antibody Expression and Production, 2011, 345 (165-178)

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称：セシウム汚染土壌粒子を含む土壌または水系の処理法
発明者：洲崎 敏伸・吉村 知里
権利者：同上
種類：特許
番号：特許願 2012-252102
出願年月日：2012年11月16日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/suzakilab/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

洲崎 敏伸 (SUZAKI, Toshinobu)
神戸大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：00187692

(2)研究分担者

橘 裕司 (TACHIBANA, Hiroshi)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：10147168

(3)連携研究者

吉村 知里 (YOSHIMURA, Chisato)
神戸大学・環境保全推進センター・助教
研究者番号：60362761