

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07520

研究課題名(和文)人工生態系を用いた共生の進化の実験的解析

研究課題名(英文) Experimental analysis of the evolution of symbiosis using an artificial ecosystem

研究代表者

中島 敏幸 (Toshiyuki, Nakajima)

愛媛大学・理工学研究科(理学系)・教授

研究者番号：70314945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：生物進化は生態系の中で起こる。私たちは、生態系内の構成種間の相互作用や物質・エネルギー流の制約のもとで構成種がどのような機構で進化するかを調べるために、3種の微生物(藻類・大腸菌・原生動物)からなるフラスコサイズの生態系を作成し、約13年間培養した。本研究に先立ち、藻類・細菌間の共生と藻類・原生動物間の細胞内共生のそれぞれの初期段階が進化していることが示唆されていた。本研究では、特に藻類・細菌間の共生の進化の仕組みに焦点を当て、両種の生理・形態的形質、生態的相互作用、大腸菌のゲノムDNAの変化のそれぞれの側面から解析した。その結果、両種が共生関係を進化させ、多様な変異体が共存することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物を用いて実験個体群や群集を作り、それを長期に培養し進化過程を明らかにする手法(実験進化)がある。しかし、従来の方法は着目する個体群のみを培養系に入れ、外部から資源を供給する形で行われてきた。本研究では、光照射のみで構成種が維持される自律型のモデル生態系を独自に開発した。これは、生態系から生物種を切り出さずに、生態系における生物進化を解析する全く新しい手法である。この培養系を13年間という長期に培養し、共生の進化の共存の仕組みを明らかにした。自然生態系は生物が互いに相互作用して進化した結果できた系あることから、本成果は、生物の共存の仕組みを進化の視点から理解することに大きく寄与する。

研究成果の概要(英文)：Living systems evolve in ecosystems, not in isolation. Before the present research, we synthesized an experimental ecosystem in a flask using three microbial species (an alga, *E. coli*, a protozoan), and cultivated them for ca. 13 years, in order to understand a possible mechanism of the evolution of component species under the restriction of matter/energy flow in an ecosystem. A previous research suggested that a primary stage of symbiotic associations between the alga and *E. coli*, and between the alga and the protozoan evolved in this long-term culture. In the present study, using algal and *E. coli* isolates obtained from 6, 8, 12-year cultures, we investigated their physiological and morphological traits, ecological interactions between them, and the whole-genome DNA sequences of *E. coli* isolates. The results indicated that the two species evolved some symbiotic associations, and that a variety of different genetic types coexisted in the experimental ecosystem.

研究分野：生態進化学

キーワード：共生の進化 実験進化 藻類 大腸菌 原生動物

1 . 研究開始当初の背景

生態系は多様な生物種や非生物的環境から構成されており、そこには様々な生物的・非生物的相互作用が存在する。様々な生物的相互作用の中でも、とくに共生は生物が新たな代謝能力や環境への適応能力を獲得できる重要な相互作用である。しかし、共生が進化する生態系には多様な相互作用が直接的また間接的に絡んでいるため、共生の進化過程は複雑であり解析が難しい。

そこで、モデル生態系を用いる実験進化という手法が有効になる。本研究室ではクロレラに近縁の藻類 (*Micractinium* sp. Ehime : 単一のクローン)、大腸菌 (*Escherichia coli* : 単一のクローン)、繊毛虫 (*Tetrahymena thermophila* : 2 つの接合型の混合個体群) の 3 種で構成される人工生態系 (CET マイクロコズム) を長期培養し、藻類、大腸菌、繊毛虫の形質の変化を解析してきた。その培養過程で、CET マイクロコズム中に藻類と大腸菌から成る集塊 (CE 集塊と呼ぶ) や藻類を取り込んでいる繊毛虫 (C テトラ) が観察されるようになった。これらは、二種間の共生だと考えられた。また、細胞が伸長した大腸菌も観察されるようになった。

本研究に先立って、これらの共生関係を精査するためにいくつかの解析を行い、以下の成果が得られている。培養 6 年のマイクロコズムの CE 集塊から藻類と大腸菌のそれぞれ 30 株が単離され、形態的特徴や生化学的性質について調査された。これらの中から代表的な藻類分離株と大腸菌分離株との共培養を様々な組み合わせで行い、両種が細胞集塊 (CE 集塊) を形成する組み合わせを明らかにした。さらに、CE 集塊を形成した場合、藻類と大腸菌のそれぞれの利益を調べた結果、藻類と大腸菌のいずれにおいても生存率が高まるということが示唆された。培養 6 年の大腸菌の分離株には、単独培養時の細胞形態は野生型 (大腸菌祖先株) と同じだが、細胞集塊を形成するタイプの藻類分離株 (L1 株) と共培養すると集塊内部で細胞がフィラメント状に伸長する大腸菌分離株 (A10) が存在することが明らかになった。さらに、藻類とは共生しない (CE 集塊を作らない) タイプと推定される変異株のグループ (C 株グループ) も見つかった。このグループの株は、上記の A10 とは異なり、単独培養でも細胞がフィラメント状に伸長する特徴を持ち、さらに増殖にイソロイシンを要求することが明らかになった。さらに本研究の開始直前に、上記の 6 年目の 30 の大腸菌分離株の一部の株 (上記の A10 と C グループの株として C6) の全ゲノム DNA 配列を決定し、形質と遺伝子との関係を解析した。その結果、A10 と C6 では DNA の変異箇所が異なり、細胞のフィラメント化に関与する遺伝子や、その機構も異なることが明らかになった。

2 . 研究の目的

上記 (1) で述べたように、CET マイクロコズムの培養は、これまで 13 年まで続いており、定期的に CET マイクロコズムの一部が凍結保存されている。培養 13 年の CET マイクロコズムは培養 6 年の CET マイクロコズムよりも共生関係が進化していると考えられる。しかし、培養 6 年を超えた培養時期にマイクロコズムから分離した株に関する解析はまだ行われていない。本研究では、2 つの共生関係のうち、藻類と大腸菌の共生関係の進化に焦点を当て、これまでの知見を基礎に、培養 6 年から 13 年におよぶ長いタイムスケールにおいて両種の生理・形態的特徴や DNA のレベルでの変化、両種の相互作用の変化等を解析し、成熟相にある生態系の物質・エネルギー流が構成種の進化 (とくに共生進化) に及ぼす影響、さらに、構成種の進化が生態系の特性をどのように変化させるかという一般的な問題に対する答えを探る。

3. 研究の方法

培養 6 年以降のマイクロコズムにおける藻類と大腸菌の共生関係を解析するために、以下の解析を行った。(i) 培養 8 年および培養 13 年のそれぞれのマイクロコズムから分離し純化した各 50 株の大腸菌の形質の解析を行った。とくに、培養 6 年の分離株から見つかった増殖が遅く細胞が伸長する形質、クエン酸の代謝能が存在するのか、藻類との種間関係によって進化すると考えられる新たな要求性や代謝能が存在するのかに注目した。(ii) 分離株の形質と DNA の関係を明らかにするため、培養 6 年・8 年・13 年の大腸菌分離株を培養期間ごとに 15 株ずつ全ゲノム DNA の配列を決定し、形質と遺伝子との関係の解析を行った。(iii) 細胞外共生と考えられる CE 集塊の藻類と大腸菌の相互作用を解析するために、藻類分離株と大腸菌分離株を共培養したときの利益を解析した。さらに、単独培養では祖先株と同じ細胞長であるが、集塊形成型藻類と共培養すると細胞が伸長（フィラメント化）し集塊内部に貫入する大腸菌分離株（A10）がどのような条件で細胞が伸長するかについて解析を行った。

4. 研究成果

上記の解析の結果、以下の成果が得られた。

(i) 培養 6 年の分離株で見つかった増殖が遅く細胞が伸長しイソロイシン要求性を持つ大腸菌分離株は、培養 6 年のマイクロコズムサンプルを塗布したシャーレの情報から大腸菌全体の 80%も割合を占めていたが、内容 8 年及び 13 年では単独培養で細胞が伸長する株は見られなかった。また、培養 8 年および培養 13 年の大腸菌分離株には藻類との種間関係によって進化すると考えられるチロシンやシステイン要求性という新たなアミノ酸要求性が確認された。

増殖が遅く細胞が伸長する大腸菌分離株は繊毛虫に捕食されず、共生せずとも死骸だけで生きていけるため、きわめて死亡率が低く、培養 6 年のマイクロコズム内に優先していたと考えられる。しかし、培養 6 年と培養 8 年の間にマイクロコズム内で藻類との種間関係によって進化すると考えられるチロシン要求性が進化し、マイクロコズム内に共生する生物が多くなり、共生しなければ、生きていけないような環境になったと考えられる。

(ii) 分離株の形質と DNA の関係を明らかにするため、培養 6 年・8 年・13 年の大腸菌分離株を培養期間ごとに 15 株ずつ全ゲノム DNA の配列を決定し、遺伝子レベルの変異の情報を得た。それらのデータから系統樹を作成した。その系統樹ではアミノ酸要求性や形態的特徴がクレードごとにまとまっており、形質と遺伝子に関係があると考えられる。

(iii) 細胞外共生と考えられる CE 集塊の藻類と大腸菌の相互作用を解析するために、藻類分離株と大腸菌分離株の共培養したときの利益を調べたところ、CE 集塊のサイズが大きくなることが分かった。集塊のサイズが大きくなれば、光が当たりにくいや排泄物がたまりやすいなどのデメリットが考えられるが、そのデメリットを考慮しても、集塊を作り大腸菌と物理的に接近した方が、メリットが大きいと考えられる。さらに、藻類分離株（単独でも細胞集塊を形成する L1 株）と共培養すると細胞が伸長する大腸菌分離株（A10 株）がどのような条件で細胞伸長するかを解析した結果、細胞伸長は飢餓でも、また藻類の培養液中でも伸長しないことが分かった。これらのことから、藻類細胞との物理的接触に伴い藻類から受ける何らかの物質や微環境が細胞伸長に関与している可能性が示唆された。

これらの結果から、培養 6 年段階では分解者と生産者の利益関係が物理的的近接性によって強まるといった共生関係と考えられるが、CE 集塊に参加できる形態の大腸菌がアミノ酸要求性を持つことから、培養 8 年 13 年以降は共生相手に依存するような共生関係が進化していると考えられる。

上記のように、藻類と大腸菌は様々な形質に分化し、大腸菌については全ゲノム DNA の解読により DNA レベルでそれが裏付けられた。これらの変異は、両種間の共生を可能にするものが多いが、一方で、デトリタス食に専門化したと考えられる大腸菌株（6年培養の C グループと 13年培養から分離されたその子孫と考えられる 1 株（13-25 株））も存在し、ニッチの多様化も明らかになった。これらの変化は、進化前（培養開始時）の生態系とはエネルギー・物質流の経路は明らかに変化し、より多様な経路が生態系レベルで進化したと結論される。このことは、生態系が成熟相段階で進化すると、共生関係の進化を含む多様なエネルギー・物質流の経路が形成されるという一般仮説を裏付けた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Toshiyuki Nakajima	4. 巻 -
2. 論文標題 Unification of Epistemic and Ontic Concepts of Information, Probability, and Entropy, Using Cognizers-System Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Entropy	6. 最初と最後の頁 1, 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) http://doi.org/10.3390/e21020216	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Toshiyuki Nakajima	4. 巻 131
2. 論文標題 Ecological extension of the theory of evolution by natural selection from a perspective of Western and Eastern holistic philosophy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Progress in Biophysics and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 298-311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.09.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 安部雄一, 坪井睦枝, 松浦正幸, 松本沙千, 堀澤栄, 佐久間洋, 中島敏幸
2. 発表標題 長期培養モデル生態系における藻類・細菌間共生の進化
3. 学会等名 日本原生生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田達也, 佐古壮一郎, 西窪健太, 中島敏幸
2. 発表標題 緑藻 - 繊毛虫の細胞内共生の進化における共生系内の資源交換と系外から取り込む資源の変化: 3種モデル生態系を用いた解析
3. 学会等名 日本原生生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安部雄一, 坪井睦枝, 松浦正幸, 藤川佳之, 松本沙千, 堀澤栄, 佐久間洋, 中島敏幸
2. 発表標題 合成生態系における藻類・細菌間の種間関係の進化と大腸菌の全ゲノム解析
3. 学会等名 日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島敏幸, 安部雄一, 坪井睦枝, 松浦正幸, 松本沙千, 堀澤栄, 佐久間洋
2. 発表標題 藻類・細菌・織毛虫からなる合成生態系を用いた進化の解析: 大腸菌の進化と種間関係
3. 学会等名 日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiyuki Nakajima
2. 発表標題 volution of Symbiotic Associations in a Synthetic Microbial Ecosystem
3. 学会等名 American Society for Microbiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中島敏幸, 藤井陽介, 松浦正幸, 松本沙
2. 発表標題 藻類・細菌・織毛虫からなる人工生態系における細菌の適応放散と生存/繁殖戦略
3. 学会等名 日本進化学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中島敏幸
2. 発表標題 ダーウィンモデルの限界を超えて：適応進化の包括的モデルの展望
3. 学会等名 生物学基礎論研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 西窪健太、中島敏幸
2. 発表標題 実験培養系における藻類・繊毛虫細胞内共生の進化とこの共生系の安定に必要な系外の資源
3. 学会等名 日本原生生物学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中島敏幸，佐野明子，松原俊行，藤川佳之，大西陽一郎，松田達也
2. 発表標題 緑藻・大腸菌・テトラヒメナの3種からなる実験生態系の長期培養における緑藻-テトラヒメナの細胞内共生の進化と生態系過程
3. 学会等名 共生起源研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安部雄一，藤井陽介、堀澤栄，佐久間洋，中島敏幸
2. 発表標題 合成生態系を用いた藻類-細菌の集塊形成による共生の進化
3. 学会等名 日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中島敏幸 (門脇・立木編)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 京都大学学術出版会	5. 総ページ数 432
3. 書名 遺伝子・多様性・循環の科学: 生態学の領域融合へ 10章: 生態系とダーウィンマシン	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----