

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00613

研究課題名(和文) 共生クロレラを持つ原生生物による土壌結合元素の細胞内油滴顆粒への蓄積機構

研究課題名(英文) Mechanism of cesium accumulation in Paramecium bursaria

研究代表者

洲崎 敏伸 (Suzaki, Toshinobu)

神戸大学・理学研究科・准教授

研究者番号：00187692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：共生クロレラを持つ原生動物ミドリゾウリムシは、土壌結合性セシウムを土壌から解離させ、細胞内の油滴顆粒に高濃度に蓄積することを見出した。この方法は、福島県における放射性セシウムによる汚染土壌の処理に有効であると考えられた。本研究では、以下を実施した。1) 土壌懸濁液とミドリゾウリムシを混合した後に、ミドリゾウリムシのみを選択的に回収する方法を開発した。2) ミドリゾウリムシから油滴を単離し、そこに含まれるタンパク質組成を質量分析法により解析した。その結果、セシウム輸送に関与している可能のあるタンパク質を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セシウムの除去法に関する技術は既に多数報告されているが、それらのほとんどは可溶性のセシウムを対象にしたものである。従って、汚染土壌の現場処理法としてミドリゾウリムシを用いた本法は有用性が高く、独創的である。他の生物と比較してミドリゾウリムシがバイオレメディエーションのための生物として優れている理由は、この生物が、細胞口から細胞内に運び込んだ土壌粒子を細胞内でpH 3程度にまで強く酸性化する能力を有している点にある。ミドリゾウリムシは、セシウム以外にも各種重金属を取り込むという報告もあるので、この技術は、セシウムに限らず様々な有害金属(あるいは有用な金属)の除去法にも発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The protozoan *Paramecium bursaria* that contains intracellular symbiotic *Chlorella* was found to possess the ability to dissociated soil-bound cesium from contaminated soil and accumulate at high concentrations in intracellular oil droplet granules. This method was considered to be effective in treating contaminated soil with radioactive cesium in Fukushima Prefecture. In this study, we conducted the following. 1) A method was developed to selectively collect only *P. bursaria* after mixing the soil suspension with paramecia. 2) Oil droplets were isolated from *P. bursaria* and the protein composition contained therein was analyzed by mass spectrometry. As a result, proteins that may be involved in cesium transport were identified.

研究分野：細胞生物学

キーワード：放射性セシウム 除染 原生生物 油滴 細胞内共生 クロレラ ミドリゾウリムシ

1. 研究開始当初の背景

2011年の福島第一原子力発電所における事故によって、広範囲にわたり放射性Csが放出された。それにより汚染された土壌は主に土壌の表面近くに分布しているため、表土を削り取ることで除染が行われている。しかし、そのようにして排出された汚染土壌は膨大な量になっており、保管場所が大きな問題となっている。植物や藻類は、体内に可溶性のCsを取り込むことが知られており、その性質を利用して除染を行う様々な方法が提案されてきている。しかし、Csは土壌粒子に結合し、非置換態になりやすい性質を持っており、実際の汚染土壌においてもほとんどが土壌に結合した状態のままである。そのため、植物では土壌結合性のCsを直接取り込むことが出来ないということが問題になっている。

原生動物ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* は、細胞内に取り込んだ餌を、食胞に包むことで消化するが、この食胞内のpHは酸性であることが分かっている。土壌結合性Csは酸性条件下において解離するため、ミドリゾウリムシのような捕食性の原生生物を用いれば、Csを土壌から解離できるのではないかと考えた。ミドリゾウリムシは細胞内に数百もの単細胞緑藻類クロレラ(以下共生クロレラ)を共生させており、これらは相利共生関係にある。しかし、ミドリゾウリムシと共生クロレラの共生関係は絶対的なものではなく、両者は互いに単独で培養することが可能である。恒暗条件下での培養や除草剤を用いることで、ミドリゾウリムシから細胞内の共生クロレラを除去した、白化ミドリゾウリムシをつくることもできる。クロレラは一種の植物なので、ミドリゾウリムシによって食胞内で遊離したCsイオンは、細胞内の共生クロレラによって吸収されるという可能性が考えられた。

予備的な実験により、共生クロレラを持つ原生動物ミドリゾウリムシは、予想通り土壌結合性セシウムを土壌から解離させ、細胞内に高濃度に蓄積する能力を持っていることがわかった。しかし、なぜこれらの原生動物がセシウムを蓄積するのかという生物学的な機構はわかっていなかった。この生物の持つセシウム蓄積能力を利用することで、福島原発の周辺の土壌に結合している放射性セシウムを土壌から分離・回収することで、汚染土壌の減容化が図れると考えられた。

2. 研究の目的

ミドリゾウリムシのセシウム蓄積に関して生物学的に見て興味深いのは、取り込まれたセシウムがミドリゾウリムシの細胞質中にある油滴に最終的に蓄積しているということである。そこで本研究では、セシウム蓄積に関わる共生クロレラの関与とその生物学的意義について解析し、本技術の生物学的基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

研究に用いたミドリゾウリムシ(PcKb1株)は神戸大学の圃場から採取した。PcKb1株を10 µg/ml シクロヘキシミドを含む培地で培養することにより、共生クロレラを持たない白化株を作った。共生クロレラを持つミドリゾウリムシも持たない白化ミドリゾウリムシも、クロロゴニウム培地(0.04% yeast extract182, 0.0008% sodium acetate, in Volvic)を培養液とし、明暗サイクル12時間、20 °Cの条件下でクロロゴニウム(*Chlorogonium capillatum*)を唯一の餌とした無菌2者培養を行った。

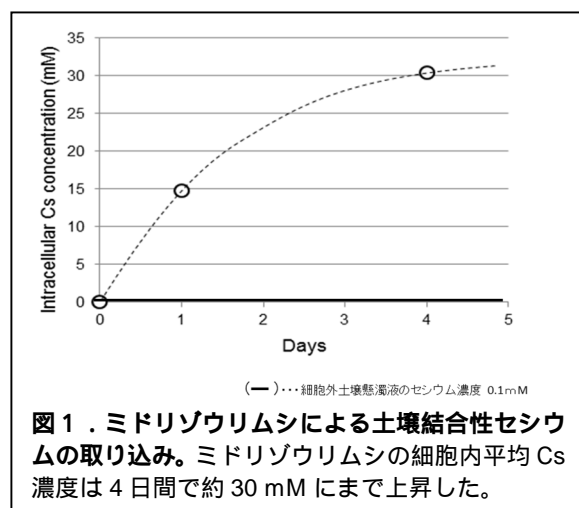
セシウムの細胞内蓄積の可視化には、エネルギー分散型X線分析機器(JEOL, JED-2300)を用いた。

質量分析では、SDS-PAGEによって得られたタンパク質バンドを切り出し、Orbitrapを用いて質量分析を行った。解析にはミドリゾウリムシのトランスクリプトームデータから繊毛虫コドン(ユニバーサルコドンのうちUAAとUAGがグルタミンとして翻訳される)を元に作製した予想タンパク質配列データを用い、これを質量分析の参照配列とした。得られたデータをNCBIのBLAST検索によってタンパク質の同定を行った。

4. 研究成果

ミドリゾウリムシのセシウム蓄積について

ミドリゾウリムシを24時間、CsCl水溶液中に置き、ICP発光分光分析法により細胞内平均Cs濃度を調べた結果、水溶液の1mMに比べて、8倍の約8mMまで上昇した。このことから、ミドリゾウリムシは可溶性セシウムを細胞内に蓄積することが分かった。一方、クロレラを取り除いた白化ミドリゾウリムシでも同様の実験を行ったが、Csの蓄積はまったく見られなかった。



次に、土壌粒子のモデルとして用いる kaolin をミドリゾウリムシが取り込むかを調べた。培養したミドリゾウリムシを回収した後、濃縮、洗浄して得た細胞懸濁液 50 ml をファルコンチューブに入れ、kaolin を 1 g 加え 30 min ローテーションした後、光学顕微鏡によって観察した。その結果、kaolin が細胞内に取り込まれることが確認できた。一度取り込まれた土壌は約 30 分で細胞外へ排出された。さらに、Cs を吸着させた kaolin をミドリゾウリムシに与えた。これも同様に ICP 発光分光分析により細胞内平均 Cs 濃度を調べた。すると、4 日間で外液中の塩化セシウム濃度である 0.1 mM に比べて 300 倍となる、約 30 mM にまで細胞内の平均セシウム濃度は上昇した(図 1)。この結果より、ミドリゾウリムシは土壌に結合したセシウムを土壌から解離させ、セシウムのみを細胞内に蓄積していることがわかった。

分離装置を用いた細胞の回収

土壌懸濁液にミドリゾウリムシを混入した後、ミドリゾウリムシのみを走電性を利用して回収する方法も本研究において開発した(図 2)。電極間距離を 5cm とした分離装置を用いて検証した結果、9V の直流電圧をかけることで 90%以上のミドリゾウリムシをマイナス極に回収することに成功した。

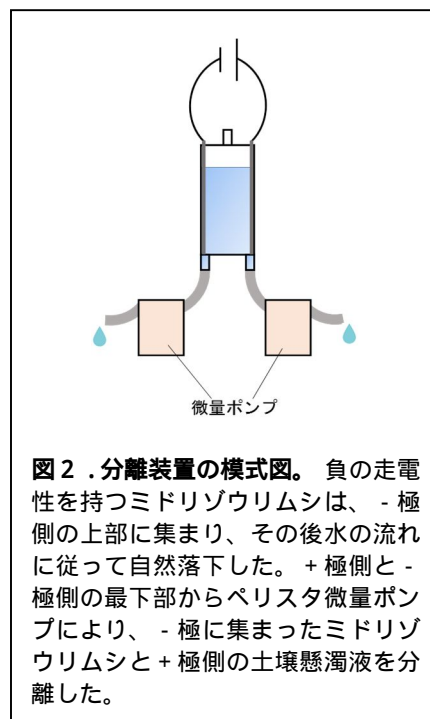


図 2 . 分離装置の模式図。負の走電性を持つミドリゾウリムシは、- 極側の上部に集まり、その後水の流れに従って自然落下した。+ 極側と - 極側の最下部からペリスタ微量ポンプにより、- 極に集まったミドリゾウリムシと + 極側の土壌懸濁液を分離した。

エネルギー分散型 X 線分析機器を用いた Cs 元素の分析

ミドリゾウリムシの細胞内における Cs 元素の局在を調べたところ、細胞内にまばらに存在する油滴に特に強いシグナルが観察された。セシウムを含む油滴は、細胞質基質内と同様に、クロレラ内にも見られた。細胞質内の油滴・クロレラ内の油滴・細胞質基質の輝度値を定量化して比較したところ、有意に差があることが確認できた。

油滴の単離と含有タンパク質の同定

ミドリゾウリムシ懸濁液を遠心(4,400 rpm, 5 min)し、ペレットを再度遠心(2,000 rpm, 5 min)した後、蒸留水で再懸濁した後に遠心(4,400 rpm, 5 min)し、上清を油滴サンプルとして回収した。回収したサンプルは 0.22 μm のフィルター付きエッペンチューブに入れ心(15,000rpm, 5 min)を繰り返し、油滴の洗浄を行った。その後、SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE によって確認できた特異的なバンドについて質量分析を行った。得られた総データ数は 21 個であった。そのうち Mascot score が 200 以上として検出された候補タンパク質の数は、4 個であった。それらの全てに対して BLAST 検索を行い、これらのタンパク質に類似性の高い既知タンパク質を NSBI から取得できる全タンパク質を参照配列として検索した。その中には、「CorA-like divalent cation transporter superfamily」と同定されたタンパク質が含まれていたこのタンパク質膜を通過する金属イオンの輸送に関連することが知られており、ほとんどの細菌および一部の真核生物が持っているとされている。Thermotoga maritima 由来の CorA Co2+ 輸送体および Zn2+ 輸送体や、Salmonella typhimurium ZntB を含む、多機能なファミリーである (Vladimir et al., 2006)。ミドリゾウリムシの油滴表面にも同様なタンパク質が存在し、Cs の蓄積に関わっていることが示唆された。

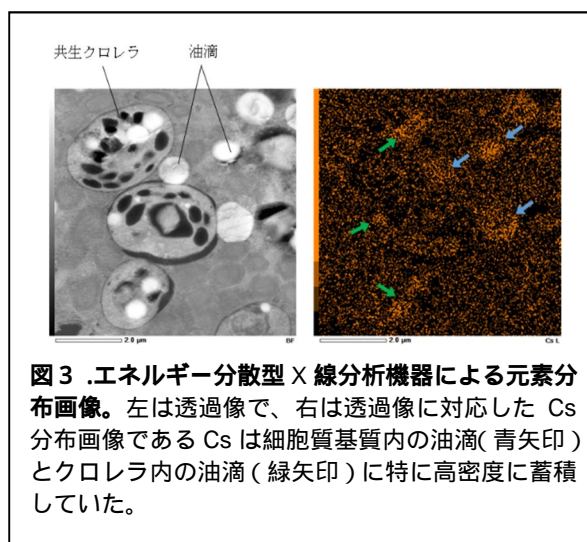


図 3 . エネルギー分散型 X 線分析機器による元素分布画像。左は透過像で、右は透過像に対応した Cs 分布画像である Cs は細胞質基質内の油滴(青矢印)とクロレラ内の油滴(緑矢印)に特に高密度に蓄積していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Rina Higuchi, Chihong Song, Ryo Hoshina and Toshinobu Suzuki	4. 巻 66
2. 論文標題 Endosymbiosis-related changes in ultrastructure and chemical composition of <i>Chlorella variabilis</i> (Archaeplastida, Chlorophyta) cell wall in <i>Paramecium bursaria</i> (Ciliophora, Oligohymenophorea)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Eur. J. Protistol.	6. 最初と最後の頁 149-155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejop.2018.09.003	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 Yusuke Takeichi, Tatsuya Uebi, Naoyuki Miyazaki, Kazuyoshi Murata, Kouji Yasuyama, Kanako Inoue, Toshinobu Suzuki, Hideo Kubo, Naoko Kajimura, Jo Takano, Toshiaki Omori, Ryoichi Yoshimura, Yasuhisa Endo, Masaru K. Hojo, Eichi Takaya, Satoshi Kurihara, Kenta Tatsuta, Koichi Ozaki and Mamiko Ozaki.	4. 巻 19 September 2018
2. 論文標題 Putative neural network within an olfactory sensory unit for nestmate and non-nestmate discrimination in the Japanese carpenter ant: The ultra-structures and mathematical simulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front. Cell. Neurosci.	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2018.00310	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 Leonardo Puppulin, Shigekuni Hosogi, Hongxin Sun, Kazuhiko Matsuo, Toshio Inui, Yasuaki Kumamoto, Toshinobu Suzuki, Hideo Tanaka and Yoshinori Marunaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Bioconjugation strategy for cell surface labelling with gold nanostructures designed for highly localized pH measurement.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-07726-5	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 該当する

1. 著者名 Chihong Song, Kazuyoshi Murata and Toshinobu Suzaki	4. 巻 7
2. 論文標題 Intracellular symbiosis of algae with possible involvement of mitochondrial dynamics	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Repots	6. 最初と最後の頁 1221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-01331-0	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 Daiki Hayashi, Keiko Yagi, Chihong Song, Shuji Ueda, Minoru Yamanoue, Matthew Topham, Toshinobu Suzaki, Naoaki Saito, Noriaki Emoto and Yasuhito Shirai	4. 巻 7
2. 論文標題 Diacylglycerol kinase alpha is involved in the vitamin E-induced amelioration of diabetic nephropathy in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Repots	6. 最初と最後の頁 2597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-02354-3	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 該当する

1. 著者名 Bhadra, M., Kobayashi, M., Higuchi, R., Chen, L. and Suzaki, T.	4. 巻 3
2. 論文標題 Major vault protein of the protozoan <i>Raphidiophrys contractilis</i> has a binding property to 1,3-glucan and is involved in food capturing	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int. J. New Tech. Res.	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

1. 著者名 Ryo Hoshina, Mayumi Kobayashi, Toshinobu Suzaki, Yasushi Kusuoka	4. 巻 66
2. 論文標題 <i>Brandtia ciliaticola</i> gen. et sp. nov. (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae) a common symbiotic green coccoid among various ciliate species	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Phycol. Res.	6. 最初と最後の頁 76-81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pre.12194	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 Yoshimura, C., Kobayashi, M., Khan, S.M.M.K., Islam, M.D.S., Matsubara, S., Chen, L., Higuchi, R. and Suzuki, T.	4. 巻 3
2. 論文標題 Development of a compact, highly-sensitive and low-cost biological monitoring method using protozoa for detecting toxicants in aquatic environment	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int. J. Environ. Agr. Res.	6. 最初と最後の頁 41-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.25125/agriculture-journal-IJOEAR-JUL-2017-7	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 該当する

1. 著者名 Kurita, Y., Baba, K., Ohnishi, M., Matsubara, R., Kosuge, K., Anegawa, A., Shichijo, C., Ishizaki, K., Kaneko, Y., Hayashi, M., Suzuki, T., Fukaki, H., Mimura, T.	4. 巻 58
2. 論文標題 Inositol hexakis phosphate is the seasonal phosphorus reservoir in the deciduous woody plant <i>Populus alba</i> L.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 1477-1485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcx106	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 Tomonori Tokunaga, Yuri Fujiwara, Mai Matsushita, Sanae Horie, Toshinobu Suzuki, Seiichi Osaki, Tetsuaki Matsuhisa and Etsuko Suzuki	4. 巻 39
2. 論文標題 Glomerular Hypertrophy and Hyperfiltration in Obesity-Related Diabetic (ob/ob) Mouse	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Analytical and Quantitative Cytopathology and Histopathology	6. 最初と最後の頁 223-230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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17件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Sakie Otani, Kento Nagao, Mikihiro Arikawa and Toshinobu Suzuki.
2. 発表標題 Structure and function of the scale of <i>Raphidiophrys contractilis</i> .
3. 学会等名 Joint Meeting of the Japan Society of Protistology and the Korean Society of Protozoologists (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Munehiro Karasawa, Mayumi Kobayashi, Toshinobu Suzaki.
2. 発表標題 Major vault protein, a protein for prey recognition in <i>Raphidiophrys contractilis</i>
3. 学会等名 Joint Meeting of the Japan Society of Protistology and the Korean Society of Protozoologists (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 洲崎 敏伸, 大谷 咲会, 長尾 賢杜, 有川 幹彦
2. 発表標題 太陽虫 <i>Raphidiophrys contractilis</i> のケイ酸質被殻の機能
3. 学会等名 第51回日本原生生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 洲崎敏伸, 長尾賢杜
2. 発表標題 有中心粒太陽虫ハリタイヨウチュウの細胞外被殻の構造と形成機構
3. 学会等名 第88回日本動物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林真弓, Bhadra, M., 洲崎敏伸
2. 発表標題 ハリタイヨウチュウにおける細胞小器官キネトシストの微細立体構造の決定と構成分子の同定に向けて
3. 学会等名 第88回日本動物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 樋口里樹, 洲崎敏伸
2. 発表標題 ミドリゾウリムシと共生クロレラを用いた細胞内共生構築に関わる分子機構の探索
3. 学会等名 第88回日本動物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 丸山 萌, 小林 滉宜, 粟井光一郎, 洲崎 敏伸, 柏山 祐一郎
2. 発表標題 盗葉緑体の使用期限: <i>Rapaza viridis</i> の光合成活性
3. 学会等名 第1回日本共生生物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 唐澤宗宏, Mousumi BHADRA, 小林真弓, 洲崎敏伸
2. 発表標題 ハリタイヨウチュウの捕食に関わるMVP
3. 学会等名 第1回日本共生生物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 陳 林, 千原あかね, 小林真弓, 長尾賢杜, 洲崎敏伸
2. 発表標題 <i>Raphidiophrys contractilis</i> の持つケイ酸質被殻の形成機構
3. 学会等名 第1回日本共生生物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Islam, MD Shafiqul., 吉村知里, 小林真弓, 陳 林, 樋口里樹, 洲崎敏伸
2. 発表標題 A new, compact, highly sensitive and low cost biological monitoring device using protozoa to detect toxic substances in water
3. 学会等名 第1回日本共生生物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 樋口里樹, 洲崎敏伸
2. 発表標題 Chlorella variabilisの細胞表層タンパク質の細胞内共生に伴う変化
3. 学会等名 第1回日本共生生物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林真弓., ソンチホン, 村田和義, 洲崎敏伸
2. 発表標題 原生生物Raphidiophrys contractilisの細胞小器官キネトシストの微細構造と分子構成
3. 学会等名 生理研ワークショップ「クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の高分解能単粒子構造解析」
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 丸山萌, 小林滉宜, 粟井光一郎, 谷藤吾朗, 洲崎敏伸, 柏山祐一郎
2. 発表標題 盗葉緑体の一生: Rapaza viridisが示唆するオルガネラ獲得進化の側面
3. 学会等名 第42回日本藻類学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshinobu Suzaki and Chihong Song
2. 発表標題 Structural and molecular basis for the interaction between endosymbiotic green algae and host protozoans
3. 学会等名 5th International Symposium on Plant Signaling and Behavior (PSB2017) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Moe Maruyama, Goro Tanifuji, Yuki Yazaki, Koichiro Awai, Toshinobu Suzaki and Yuichiro Kashiya
2. 発表標題 An obligate kleptoplastic phototrophy of a euglenoid <i>Rapaza viridis</i>
3. 学会等名 15th International Congress of Protistology (ICOP 2017) ligate kleptoplastic phototrophy of a euglenoid <i>Rapaza viridis</i> (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hoshina, R., Kobayashi, M., Suzaki, T. and Kusuoka, Y.
2. 発表標題 Study on <i>Cyclotrichium</i> -like ciliate with sequestered diatom chloroplasts
3. 学会等名 15th International Congress of Protistology (ICOP 2017) ligate kleptoplastic phototrophy of a euglenoid <i>Rapaza viridis</i> (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hoshina, R., Kobayashi, M., Suzaki, T. and Kusuoka, Y.
2. 発表標題 Chlorob' (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae) a common symbiotic green coccoid of various ciliate species
3. 学会等名 The Asian Pacific Phycological Forum (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 水棲生物の飼育装置	発明者 洲崎敏伸、小林真 弓、吉田恵史郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-049441	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	吉村 知里 (Yoshimura Chisato) (60362761)	神戸大学・環境保全推進センター・助教 (14501)	