

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07513

研究課題名(和文) 繊毛虫のミドリゾウリムシを用いた細胞内共生の成立・維持機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the establishment and maintenance mechanism of endosymbiosis using the ciliate *Paramecium bursaria*

研究代表者

児玉 有紀 (Kodama, Yuuki)

島根大学・学術研究院農生命科学系・准教授

研究者番号：80582478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアや葉緑体を生み出した細胞内共生は現在でも多くの生物同士で見られ、真核細胞の進化や多様化の原動力となっている。しかし細胞内共生の成立や維持の機構はほとんど明らかにされていない。この謎を解明するためのモデル生物が繊毛虫のミドリゾウリムシと共生クロレラである。クロレラは宿主ミトコンドリアと共生胞膜との接着によって細胞表層直下に固定されている。共生の成立や維持における宿主ミトコンドリアの機能を調べるために、抗ミドリゾウリムシミトコンドリアモノクローナル抗体を作製した。その抗体を使用して、クロレラ除去株と保持株の抗原の局在性を蛍光抗体法で比較した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は分子生物学的、細胞生物学的および物理学的な手法であるラマン分光法など、多岐にわたる研究手法を用いて細胞内共生の成立および維持機構を解明することを目的としており、ミドリゾウリムシとクロレラの共生系のみで可能な新規性とオリジナリティーの高い試みである。申請者らの研究は、細胞内共生の成立に普遍的な現象の解明、藻類との細胞内共生が進行中の他の生物の維持によって保証される生態系の維持と環境保全、細胞内共生による真核細胞の進化と多様性のメカニズムの解明等にも繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Endosymbiosis that created mitochondria and chloroplasts is still ongoing among many organisms, and is a driving force for eukaryotic cell evolution and diversification. However, the mechanism of establishment and maintenance of the endosymbiosis is not well known. The model organisms to elucidate these problems are the ciliate *Paramecium bursaria* and the symbiotic *Chlorella* spp. Symbiotic *Chlorella* sp. is localized beneath the host cell cortex by adhesion between the host mitochondria and the perialgal vacuole (i.e., symbiosome) membrane. In order to investigate the function of the host mitochondria in establishing and maintaining endosymbiosis, we produced anti-*P. bursaria* mitochondria monoclonal antibodies. Using the antibody, the localization of the antigens of both symbiotic algae-removed and -bearing *P. bursaria* strains was compared by using an indirect immunofluorescent microscopy.

研究分野：進化生物学

キーワード：ミドリゾウリムシ クロレラ 細胞内共生 進化 ミトコンドリア モノクローナル抗体 蛍光抗体法
原生生物

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアや葉緑体を生み出した細胞内共生は現在でも多くの生物同士で見られ、新たな機能と構造の獲得による真核細胞の進化や多様性の原動力となっている。しかし、細胞内共生の成立および維持機構はほとんど明らかにされていない。その最も大きな原因は、ほとんどの細胞内共生生物においては、互いの存在が生存に不可欠なまでに宿主と共生体の一体化が進み、再共生の誘導実験が困難なためである。この問題点を解決できるのが、織毛虫のミドリゾウリムシである。ミドリゾウリムシは細胞内に約 700 個の共生クロレラを保持しており、クロレラは 1 細胞ずつ宿主の食胞膜由来の perialgal vacuole (PV) 膜と呼ばれる共生胞に包まれている。この PV 膜には宿主のリソソームが融合しない。ミドリゾウリムシとクロレラは相利共生の関係にあるが、まだ互いの存在が生存に必須なまでに共生関係は進んでおらず、それぞれ単独で生存することが可能である。これは、両者の関係が真核細胞同士の細胞内共生である二次共生の初期段階にあることを示している。それだけではなく、この系では、混合するだけで大量の細胞に容易に二次共生を誘導することが可能である。これらの理由から、ミドリゾウリムシは二次共生成立のメカニズム解明のモデル材料になると 50 年以上前から考えられてきた。しかし、クロレラ除去細胞にミドリゾウリムシから単離した共生クロレラを与えると、短時間で大量のクロレラが食胞に取り込まれるため、時間経過に伴うクロレラの運命の追跡が困難で、この材料を使った二次共生の研究は約 50 年間ほとんど進展していなかった。この状態を打破するために、申請者はクロレラ除去細胞に共生クロレラをパルス的に与え、チェイスする方法を初めてこの系に導入し、二次共生の同調誘導の最適条件を確立した (Kodama and Fujishima, 2005)。この方法は、ミドリゾウリムシの食胞に取り込まれたクロレラの運命を経時的に追跡することを可能にした。その結果、予想外のクロレラの再共生過程が明らかになっただけでなく、二次共生成立に必須な 4 つのプロセスの存在とそれらに関する現象を明らかにすることができ、二次共生成立の分子機構解明の突破口が開かれた (Kodama and Fujishima, 2009; 2016)。その後、各プロセスに関する細胞生物学的な事象を明らかにしてきた。さらに、クロレラとの共生前後のミドリゾウリムシのトランスクリプトーム解析を行い、共生によって発現が変化するミドリゾウリムシの遺伝子を初めて明らかにした。発現が変化する遺伝子数は 6,698 で、その中には、リボソームタンパク質遺伝子やストレスタンパク質遺伝子や、抗酸化作用をもつグルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子などが含まれていた (Kodama et al., 2014)。さらに、50 年以上前にミドリゾウリムシから単離した共生クロレラ (*Chlorella variabilis*, NC64A 株、全ゲノム解読済) も、クロレラ除去細胞への共生能力を維持していることを明らかにし、再共生によって共生能力が回復することを明らかにした (Kodama and Fujishima, 2016)。

2. 研究の目的

本研究は分子生物学的、細胞生物学的および物理学的な手法であるラマン分光法など、多岐にわたる研究手法を用いて細胞内共生の成立および維持機構を解明することを目的としており、ミドリゾウリムシとクロレラの共生系のみで可能な新規性とオリジナリティーの高い試みである。申請者らの研究は、細胞内共生の成立に普遍的な現象の解明、藻類との細胞内共生が進行中の他の生物の維持によって保証される生態系の維持と環境保全、細胞内共生による真核細胞の進化と多様性のメカニズムの解明等にも繋がると期待される。本研究が進めば、真核細胞の進化の過程で起こった非光合成生物に光合成能力を獲得させる技術の開発や、細胞内共生することによって適応可能なストレス条件下でも生育できる生物の作製など、任意の細胞の組み合わせによる細胞内共生の人為的な誘導技術の開発も可能になることが期待される。

3. 研究の方法

クロレラとの共生・非共生宿主細胞、宿主と共生前後のクロレラ、さらにクロレラの再共生成立に必須な前述の 4 つの各プロセスの宿主細胞とクロレラを材料として、トランスクリプトーム解析とプロテオーム解析を行い、細胞内共生の成立に関連する遺伝子と遺伝子産物を網羅的に解析する。次に、重要な機能が予測されるタンパク質については抗体を作製して、共生成立過程での抗原の消長と細胞内局在性をイムノプロット、間接蛍光抗体法、免疫電子顕微鏡法で調べる。さらに、細胞内共生の成立に必須であると予測された遺伝子については、RNAi や定量 PCR でそれらの機能を明らかにする。また、食胞膜と PV 膜を単離し、ラマンスペクトルを測定する。測定結果を非拘束 MCR 法によって成分分析し、食胞膜と PV 膜の成分の差異を明らかにする。

4. 研究成果

平成 29 年度は以下の結果を得た。

- (1) 前述のトランスクリプトーム解析の結果から得られた、共生クロレラの有無で発現が変化する宿主遺伝子の部分塩基配列を使って合成ペプチドを作製し、それを抗原にした抗血清を使用して、ミドリゾウリムシの白色株と緑色株の抗原の細胞内局在性を間接蛍光抗体法で比較した。
- (2) クロレラとの共生・非共生宿主細胞、宿主と共生前後のクロレラ、さらにクロレラの再共生成立に必須な前述の 4 つの各プロセスの宿主細胞とクロレラを材料として、トランスクリプトーム解析を行った。

(3) ミドリゾウリムシにエサのバクテリアを与え、各時間に食胞膜のラマンスペクトルを測定した。

平成 30 年度は以下の結果を得た。

(1) ミドリゾウリムシのミトコンドリアに対するモノクローナル抗体を用いて、共生クロレラの有無によるミトコンドリア数の変化を調べた。その結果、クロレラを除去したミドリゾウリムシと比較して、クロレラを持つミドリゾウリムシのミトコンドリア数は減少していることが明らかになった。

(2) ミドリゾウリムシのリソソーム酵素の一種である酸性フォスファターゼに対するポリクローナル抗体を用いて、クロレラの再共生過程における酸性フォスファターゼの局在性や量的な変化を調べた。

(3) 共生クロレラの有無による捕食者への影響を調べるために、ゾウリムシの捕食者として肉食性繊毛虫のディレプタスを採集し、培養法の検討を行った。

(4) ラマン分光法で観察するために適切な食胞膜と PV 膜の観察法を検討した。

令和元年度は以下の結果を得た。

(1) 飛行時間型二次イオン質量分析法 (TOF-SIMS : Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry) を用いて、宿主食胞膜と PV 膜と共生クロレラをそれぞれ解析し、PV 膜の成分解析に初めて成功した。また、ラマンスペクトル解析ソフト「HAMAND」を用いた解析の結果、食胞膜由来である可能性のあるスペクトルを得ることができた。

(2) 共生クロレラは宿主ミトコンドリアと PV 膜との接着によって細胞表層直下に固定されている。抗ミドリゾウリムシミトコンドリアモノクローナル抗体を用いた、間接蛍光抗体法の結果、共生クロレラ保持株 (緑色株) と比較して、クロレラ除去株 (白色株) のミトコンドリア数が多いことが分かった。緑色株のミトコンドリアはクロレラを取り囲むようにして存在しており、ミトコンドリア選択的蛍光色素の Mito Tracker® Green FM を使った観察からも同様の結果が得られた。

(3) ミドリゾウリムシのトランスクリプトームデータから、共生クロレラの有無で発現が変化する宿主遺伝子の部分塩基配列を使って合成ペプチドを作製し、それを抗原にした抗血清を 5 種類作成した。その抗血清を使用してミドリゾウリムシの白色株と緑色株の抗原の細胞内局在性を間接蛍光抗体法で比較した。その結果、食胞膜のみを認識し、PV 膜には抗原が存在しない抗血清が得られた。

(4) ゾウリムシ属が持つ外敵からの防御器官であるトリコシストとクロレラとの関連性の解明を目的とし、ミドリゾウリムシを数日間飢餓状態にして、日数経過に伴うクロレラとトリコシストの数や局在性の変化を観察した。白色細胞の飢餓培養時は、初めは細胞全体に存在していたトリコシストが日数に従って減少した。一方で緑色細胞の飢餓培養時は、日数に従って初めにクロレラがあった所にトリコシストが再生し増加した。つまり、ミドリゾウリムシは恒明条件下では、クロレラの方が優先して細胞内に留まるが、恒暗条件下で餌のない飢餓状態が継続すると、まずはクロレラを先に消化して栄養源とし、次にトリコシストを細胞内に増やすように働くことが初めて示唆された。

<引用文献>

Kodama, Y. and Fujishima, M.: Symbiotic *Chlorella* sp. of the ciliate *Paramecium bursaria* do not prevent acidification and lysosomal fusion of the host digestive vacuoles during infection. *Protoplasma* 225, 191-203, 2005.

Kodama, Y. and Fujishima M.: Infection process of symbiotic *Chlorella* species to *Paramecium bursaria*. In: *Endosymbionts in Paramecium*, Microbiology Monographs 12, (Fujishima, M. ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 31-55, ISBN; 978-3-540-92676-4, 2009.

Kodama, Y. and Fujishima, M.: *Paramecium* as a Model Organism for Studies on Primary and Secondary Endosymbioses. In: *Biocommunication of Ciliates*, (Guenther, W. and Nowacki, M. eds). Springer International Publishing Switzerland, pp 277-304, ISBN; 978-3-319-32209-4, 2016.

Kodama, Y., Suzuki, H., Dohra, H., Sugii, M., Kitazume, T., Yamaguchi, K., Shigenobu, M. and Fujishima, M. (YK and HS, equal contributors): Comparison of gene expression of *Paramecium bursaria* with and without *Chlorella variabilis* symbionts. *BMC Genomics* 15:183, doi: 10.1186/1471-2164-15-183, 2014.

Kodama, Y. and Fujishima, M.: Differences in infectivity of endosymbiotic *Chlorella variabilis* that are cultivated outside the host *Paramecium bursaria* for 50 years and that are immediately isolated from the host cells after 1 year endosymbiosis. *Biology Open* 5, 55-61, 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Aoyagi Satoka, Kodama Yuuki, Passarelli Melissa K., Vorng Jean-Luc, Kawashima Tomoko, Yoshikiyo Keisuke, Yamamoto Tatsuyuki, Gilmore Ian S.	4. 巻 91
2. 論文標題 OrbiSIMS Imaging Identifies Molecular Constituents of the Perialgal Vacuole Membrane of <i>Paramecium bursaria</i> with Symbiotic <i>Chlorella variabilis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 14545 ~ 14551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b03571	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 児玉有紀	4. 巻 2
2. 論文標題 総説 ミドリゾウリムシとクロレラを用いた二次共生の成立および維持機構の解明の研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 和文誌原生生物	6. 最初と最後の頁 15-24
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 -

1. 著者名 Kawai Shion, Araki Sotaro, Kodama Yuuki	4. 巻 71(1)
2. 論文標題 No mutual symbiosis following infection of algae-free <i>Paramecium bursaria</i> with symbiotic algae from <i>Mayorella viridis</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Symbiosis	6. 最初と最後の頁 47-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13199-017-0517-0	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 加藤香穂、児玉有紀
2. 発表標題 繊毛虫ミドリゾウリムシ (<i>Paramecium bursaria</i>) の共生クロレラを包むPV膜の性質に関する研究
3. 学会等名 生物系三学会中国四国支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚越亮允、児玉有紀
2. 発表標題 Paramecium属が持つ結晶様構造の形成と維持について
3. 学会等名 生物系三学会中国四国支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 優介、大沼 亮、廣岡 俊亮、広瀬 侑、重信 秀治、児玉 有紀、藤島 政博、宮城島 進也
2. 発表標題 非光合成性の単細胞生物内に共生する藻類の窒素利用様式の解析
3. 学会等名 日本植物学会第 83 回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomomi Akiyama, Naoya Miyauchi, Akiko Itakura, Yuuki Kodama, Takayuki Yamagishi and Satoka Aoyagi
2. 発表標題 Data analysis of complementary chemical imaging data sets
3. 学会等名 22st International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚越亮允、児玉有紀
2. 発表標題 ミドリゾウリムシの細胞内共生による細胞内環境の違いについて
3. 学会等名 生物系三学会中国四国支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中佑夏、児玉有紀
2. 発表標題 ミドリゾウリムシと酵母の共生について
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 塚越亮允、児玉有紀
2. 発表標題 繊毛虫ミドリゾウリムシにおける結晶構造の維持機構
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 Satoka Aoyagi, Yuuki Kodama, Takayuki Yamagishi, Tomoko Kawashima
2. 発表標題 Evaluation of Paramecium bursaria with symbiotic Chlorella variabilis using TOF-SIMS with Ar cluster ion beam
3. 学会等名 21st International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry-SIMS21 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤島 政博、児玉 有紀
2. 発表標題 共生藻の有無で発現が変化するミドリゾウリムシ遺伝子産物の細胞内局在性
3. 学会等名 日本動物学会 第88回 富山大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 児玉 有紀
2. 発表標題 ミドリムシではありません、ミドリゾウリムシです
3. 学会等名 日本動物学会 第88回 富山大会シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 児玉 有紀
2. 発表標題 ミドリゾウリムシを用いた二次共生の成立機構の研究
3. 学会等名 第50回日本原生生物学会大会 平成29年度日本原生生物学会賞受賞者講演
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>島根大学生物資源科学部児玉研究室のホームページ https://sites.google.com/view/yuuki-kodama/home</p> <p>技術コミュニティラボ第8回ミーティング「ミドリゾウリムシの特徴と応用の可能性」 http://www.crc.shimane-u.ac.jp/r-kikaku/lab/report/meeting8/m011002.htm</p> <p>Vol. 43 広報しまだい <特集3> SDGs達成を目指す取り組み https://www.shimane-u.ac.jp/_files/00185516/kouhoushimadai43.pdf</p> <p>児玉有紀准教授に「生物資源科学部研究表彰」が授与されました https://www.life.shimane-u.ac.jp/docs/2019020400040/</p> <p>生物科学科の児玉有紀准教授が日本原生生物学会の学会賞を最年少で受賞しました http://www.shimane-u.ac.jp/docs/2017120100068/</p>

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