

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19434

研究課題名(和文)真核生物におけるピノサイトーシスメカニズムの保存性と多様性の解明

研究課題名(英文) Diversity and evolution of eukaryotic pinocytosis

研究代表者

矢吹 彬憲 (YABUKI, Akinori)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・地球環境部門(海洋生物環境影響研究センター)・研究員

研究者番号：20711104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：外界に存在する栄養を微細な小胞形成を介して獲得する飲作用(ピノサイトーシス)について、真核微生物を対象にその多様性と進化に関する理解を推し進めた。具体的には、これまで飲作用のみによる栄養獲得で増殖する浸透栄養性の真核微生物はわずかな系統でのみ認識されていたが、本研究の成果により、真核生物ドメイン内の様々な系統に幅広く含まれることが確認された。特にケルコゾア門やディプロネマ綱などの分類群では一般的な特徴であることも確認された。その一方で、飲作用のメカニズムは必ずしも一様ではなく、グループや種レベルで小胞形成プロセスや増殖に際しての依存度に違いがあることも確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題によってもたらされた知見は、未だ謎が多い真核細胞の成立とその初期進化過程を理解する上で極めて重要な意味を持つ。また多くの系統で浸透栄養に依存した原生生物が認識された事実は、水圏生態系の構造やエネルギーの流れをより正確に理解する上でも重要かつ新たな意味を持つ。飲作用における小胞形成過程に共通性及び系統ごとの特殊性が確認されたことは、真核細胞機能の多様性とその進化の複雑性を示している。そこからは真核生物初期進化をより詳細に理解するための発展的基礎研究の道が拓けただけでなく、細胞機能に着目した生理医学的研究の基盤情報としての価値も期待される。

研究成果の概要(英文)：The diversity and evolution of pinocytosis that is a biological function to absorb the nutrients via small vesicle formation from outside have been studied focusing microbial eukaryotes. Although little was known about the diversity of microbial eukaryotes that can survive relying on pinocytosis only, we showed that it is common in various eukaryotic lineages, especially in Cercozoa and Diplonemea. On the other hand, the process and places of the vesicle formation in the cells and the dependence on pinocytosis for the growth are different even between closely related species. Our achievements totally contributed to estimate the ancestral state of nutrient acquisition of the eukaryotes and its diversification process: the pinocytosis itself has been equipped at the very early stage of eukaryotic evolution (at the emergence of eukaryotic cell, probably) and the places of the small vesicle formation has been diversified lineages by lineages.

研究分野：微生物学

キーワード：真核微生物 飲作用 吸収栄養 微細構造 多様性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

浸透栄養とは、細胞表面から外界に存在する栄養物を微細な小胞形成を介して直接吸収する栄養獲得様式である。その微細な小胞形成を伴う栄養摂取運動はピノサイトーシス(飲作用)と呼ばれ、細胞全体のダイナミックな捕食運動であるファゴサイトーシス(食作用)とは区別されている。これまでピノサイトーシスは、真核生物ドメイン内の幾つかの系統で確認されていることから、真核生物における原始的な特徴の一つであると漠然と考えられてきた。しかし、実際に様々な系統においてピノサイトーシスのメカニズムを明らかにし、比較を行った研究は存在しない。また申請者は、これまでの研究の中で新たに複数の系統においてピノサイトーシスが起きていることを発見した。それらの生物の中には、明瞭な細胞膜修飾構造を有する真核微生物や発達した細胞骨格により細胞膜全体が裏打ちされている生物も含まれている。つまり、細胞のボディプランが大きく異なる真核微生物間で全く同じピノサイトーシスのメカニズムが存在するとは考え難い状況であり、そこにはピノサイトーシスを駆動するメカニズムに保存性と多様性が存在すると想定されていた。

2. 研究の目的

(1) 浸透栄養性真核微生物の多様性とピノサイトーシスメカニズムの保存性・多様性の解明

研究代表者が新たに確立した浸透栄養性生物を優先的・選択的に増殖させる培養方法(Yabuki et al. 2016)を用いて、これまでにピノサイトーシスの存在が報告されていない系統も含め多様な“浸透栄養性真核微生物”の培養株を確立する。得られた培養株を透過型電子顕微鏡下で詳細に観察し、ピノサイトーシス時の細胞挙動を微細構造レベルで把握し、形態レベルでの保存性と多様性を明らかにする。

(2) 祖先真核細胞におけるピノサイトーシス像の理解と発展的研究遂行のための基盤形成

現存する生物におけるピノサイトーシスメカニズムの保存性から、祖先真核生物が有していた栄養摂取様式を類推する。またピノサイトーシス時の細胞内挙動が大きく異なっていた生物2種(あるいは3種)を系統的な隔たりも考慮しながら選定し、それぞれ次世代シーケンサー解析を行う。得られた分子情報をもとに、真核微生物の初期分岐関係やそれに応じたピノサイトーシス様式の多様化プロセスに関する理解を進める。

3. 研究の方法

(1) 浸透栄養性真核微生物の網羅的探索と培養株確立

所属研究機関で実施した研究航海、および自身で計画・実施した海岸・湖沼におけるサンプリング、研究協力関係にある複数の水族館でのサンプリングを通じて、水や堆積物、大型生物由来の分泌粘液物の収集を行った。採集試料は、8-20°Cの範囲で、Hemi 培地を用いて培養した。培養試料を倒立顕微鏡下で観察し、マイクロキャピラリー法により単細胞単離を行い培養株として確立した。

(2) 浸透栄養性真核微生物の系統的多様性の把握とその分類学的研究の実施

確立した培養株を光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。培養株より抽出したDNAを用いて18S rRNA 遺伝子配列を決定した。得られた情報を精査し、各培養株の新規性を評価し、必要に応じて分類学的な処置を施した。

(3) ピノサイトーシスメカニズムの多様化プロセスの把握

把握した培養株の系統的多様性にもとづいて真核生物ドメイン内の浸透栄養性原生生物の多様性と系統的分布を評価した。さらに微細構造の多様性にもとづきピノサイトーシスメカニズムの多様性を把握すべく、詳細な微細構造比較を実施した。系統的独立性が確認された4株において次世代シーケンサー解析を実施し、各生物の系統的位置をより詳細に推定するとともにピノサイトーシスメカニズムの違いと多様化プロセスを把握に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) 浸透栄養性真核微生物の網羅的探索と培養株確立

研究助成期間中に新たに45株の浸透栄養性原生生物の培養株を確立することに成功した。また、その過程では更に効率的に新規浸透栄養性原生生物を探索することが可能となる新規培養方法や、一部の海洋生物由来の粘液物には多数の浸透栄養性原生生物が含まれることを発見した。

(2) 浸透栄養性真核微生物の系統的多様性の把握とその分類学的研究の実施

本研究課題の成果として、これまでに6新属10新種を報告することに成功した。特にディプロネマ綱については本課題によりその浸透栄養性種の多様性が大きく進んだ(Tashyreva et al. 2018a, b, Prokopchuk et al. 2019)。またケルコゾア門についても、これまで環境DNAでのみ認識されていた系統を新規浸透栄養性生物として同定することに成功した(図1)。

(3) ピノサイトーシスメカニズムの多様化プロセスの把握

複数の新規生物を対象に次世代シーケンサー解析を実施し、浸透栄養性成物の系統的分布のより詳細な理解を進めた。細胞腹側の捕食口からのピノサイトーシスが確認されている *O. amphinema* については次世代配列解析を報告することに成功し (Yabuki et al. 2018) 実際の分子メカニズムを理解するための端緒をえた (図 2)。さらに複数種においても次世代シーケンサー解析を実施し、データ整理を進めている。ピノサイトーシスメカニズムについては、蛍光試薬を用いた解析を実施、近縁種においても小胞形成の場所に違いがあることを見出した。

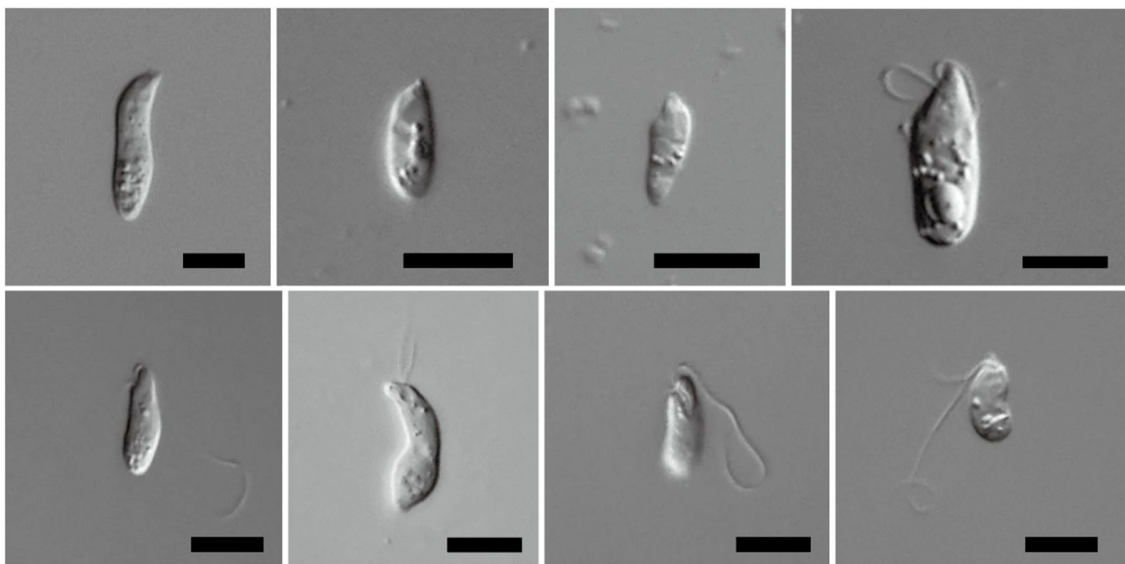


図 1. 詳細な観察を行った新規浸透栄養性原生生物の一部 (スケールバー = 10 μm)

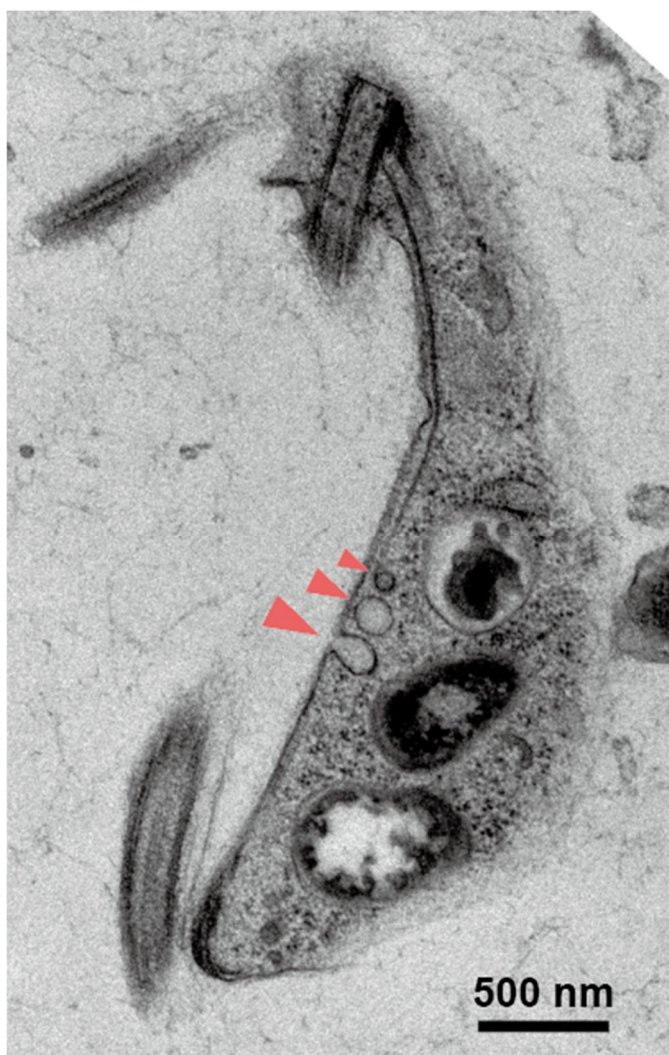


図 2. 新たに記載した *O. amphinema* の透過型電子顕微鏡写真 (矢頭: 飲作用を担う微小胞)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Prokopchuk Galina, Tashyreva Daria, Yabuki Akinori, Horak Ales, Masarova Petra, Lukes Julius	4. 巻 -
2. 論文標題 Morphological, Ultrastructural, Motility and Evolutionary Characterization of Two New Hemistasiidae Species	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protist	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.protis.2019.04.001	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 該当する

1. 著者名 Yabuki Akinori, Gyaltshen Yangtsho, Heiss Aaron A., Fujikura Katsunori, Kim Eunsoo	4. 巻 8
2. 論文標題 Ophirina amphinema n. gen., n. sp., a New Deeply Branching Discobid with Phylogenetic Affinity to Jakobids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-34504-6	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 Tashyreva Daria, Prokopchuk Galina, Yabuki Akinori, Kaur Binnypreet, Faktorova Drahomira, Votycka Jan, Kusaka Chiho, Fujikura Katsunori, Shiratori Takashi, Ishida Ken-Ichiro, Horak Ales, Lukes Julius	4. 巻 169
2. 論文標題 Phylogeny and Morphology of New Diplonemids from Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PROTIST	6. 最初と最後の頁 158 ~ 179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.protis.2018.02.001	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 該当する

1. 著者名 Tashyreva Daria, Prokopchuk Galina, Votycka Jan, Yabuki Akinori, Horak Ales, Lukes Julius	4. 巻 9
2. 論文標題 Life Cycle, Ultrastructure, and Phylogeny of New Diplonemids and Their Endosymbiotic Bacteria	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e02447 ~ 17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.02447-17	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 矢吹 彬憲, 伊左治 雄太, 菅 寿美, 伊東 薫, 中村 多実子, 大河内 直彦, 藤倉 克則
2. 発表標題 原生生物嗅覚学はじめました。
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 矢吹彬憲、白鳥峻志、藤井千早、藤倉克則
2. 発表標題 吸収栄養性ケルコゾア生物の驚くべき多様性
3. 学会等名 日本微生物生態学会第32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Shiratori, Akinori Yabuki, Euki Yazaki, Yuki Nishimura, Moriya Ohkuma, Katsunori Fujikura, Tetsuo Hashimoto, Yuji Inagaki, Ken-ichiro Ishida
2. 発表標題 Orphan protistology, accelerating in JAPAN
3. 学会等名 第2回日韓合同原生生物学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	石田 健一郎 (Ishida Ken-ichiro) (30282198)	筑波大学・生命環境系・教授 (12102)	