

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（特設分野研究）

研究期間：2017～2020

課題番号：17KT0111

研究課題名（和文）藻類-原生動物の細胞内共生のインビトロ進化

研究課題名（英文）In-vitro evolution of endosymbiosis between an alga and a protozoan

研究代表者

中島 敏幸（Nakajima, Toshiyuki）

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：13年間培養した3種（藻類・細菌・繊毛虫）から成る実験生態系を用い、共生関係にない藻類と繊毛虫が細胞内共生を進化させる過程を解析した。特に、「生態系の成熟相における厳しい資源環境では、従属栄養生物（繊毛虫）と光栄養生物（藻類）との間で必須資源の交換（量と種類）が増し、第三種（細菌；外部資源）への栄養依存が弱まるように細胞内共生が進化する」という仮説を立て、両種の分離株を用いて検証した。その結果、本培養初期では細菌を捕食し生存していた繊毛虫は、緑藻類からアミノ酸・ビタミン・ヌクレオシド・糖を獲得することにより細菌（外部資源）への依存が減少したことが示された。この結果は上記の仮説を支持している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、13年に及ぶ実験生態系の長期培養系を解析し、従属栄養生物（繊毛虫）と光栄養生物（藻類）との間の細胞内共生の進化を実証的に解析したものであり、このような解析は国内外で他に例がない。従来の研究が共生をすでに進化させた生物を用いた解析であるのに対し、本研究ではモデル生態系の中で共生関係にない種間に共生が進化する過程を追跡するものである。「光照射下で自律的に存続する実験生態系モデル」は、そのツールとして有効であることを示した。このモデルは、進化を生態系過程との関わりにおいて理解する重要性の提起に加え、それを解析するツールとして他の研究者に影響を与えられよう。

研究成果の概要（英文）：Using a 13-year culture of an experimental ecosystem composed of three species (an alga, a bacterium, a ciliate), the evolutionary process of how an endosymbiotic association can evolve between unassociated alga and ciliate. Specifically, we tested the following, our original hypothesis using isolates of both species in the culture. "Endosymbiotic associations evolve between heterotrophic and photo-trophic organisms under resource-limited conditions produced in a mature-stage ecosystem, by which they raise exchanges of essential resources (quantity and quality) and reduce the dependency on the external sources such as bacteria for them." The results indicated that the ciliate, originally survived/reproduced by consuming the bacterium, received essential resources of amino acids, vitamins, nucleotides, and sugars and became less dependent on bacterial cells. These results support the above hypothesis.

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

(1)細胞内共生の進化は、生命システムが異種の異なる代謝システムを融合し新しいニッチを開拓していく生物の多様化の原動力の一つである。しかし、共生関係にない生物間がどのような機構により細胞内共生を進化させるかについてはほとんど分かっていない。当研究室では、この進化機構を明らかにするために、生産者として藻類 (*Micractinium* sp. Ehime; 以下“クロレラ”)、一次消費者・分解者として細菌 (*Escherichia coli*; 以下“大腸菌”)、二次消費者として繊毛虫 (*Tetrahymena thermophila*; 以下“テトラヒメナ”)の3種で構成される準閉鎖生態系モデル (以下“CETマイクロコズム”)が作成され、13年間培養が行われた (30°C, 12L:12D, 静置培養, 受け継ぎは数年に1回, 栄養源の無添加)。この長期培養系において、細胞内にクロレラを生きたまま保持したテトラヒメナが確認され、培養開始時点では共生関係にない両種間に細胞内共生の初期段階が進化することが発見された (Nakajima et al. 2009)。この培養系では、生態系の発展段階が成熟相 (構成種への資源供給がデトリタスの分解によるリサイクルモードになり構成種の利用可能な資源量が低下する)に移行しており、この条件下では資源交換を効率に行える共生関係が生存・繁殖に有利なためと考えられた。なお、「光栄養生物と従属栄養生物間の細胞内共生」の実験進化は、これまで国内外を含め本研究の報告者らによる研究が唯一のものである。

(2)13年間のCETマイクロコズム培養で定期的にサンプリングされた構成種は単離され保存された。クロレラとテトラヒメナ間の共生関係は、光栄養生物と従属栄養生物間の細胞内共生のモデルとして、さまざまな実験により解析された (Sano et al. 2009; Germond et al. 2013; Nakajima et al., 2013, 2015)。培養5年で分離されたクロレラと7年で分離したテトラヒメナが共培養 (無機塩培地, 大腸菌なし)されると、テトラヒメナは単独培養やクロレラ祖先株との共培養の場合よりも長期間生存した。この分離された (進化した)クロレラがテトラヒメナ (分離株及び祖先株)に及ぼす延命効果は、分離クロレラが祖先クロレラ株よりも主にグリセロールを細胞外に多く分泌することによると考えられた (Germond et al. 2013)。

(3)しかし、上述の“延命するテトラヒメナ”を細胞内・外のクロレラと共に同じ組成の新しい無機塩培地に植え継ぐとテトラヒメナの数には維持されず、減少しやがて死滅することが明らかになった (植え継ぎ前の延命はテトラヒメナ細胞中に存在した必須成分を消費して増殖していたと考えられる)。このことは、クロレラ-テトラヒメナ共生系におけるテトラヒメナはすべての必須資源 (必須アミノ酸やビタミンなど)をクロレラから得ておらず、CETマイクロコズムにおいてはエサとして捕食した大腸菌に含有される不足の必須資源をいわばサプリメントとして取り入れて存続していたことを示唆している。このような、共生系の維持に必要な共生系外部に存在する必須資源をその共生系の“必須外部資源”と呼ぶことにする。

本研究に先立つ予備調査によると、共培養系を植え継ぐ際に、*T. thermophila*の文献上の必須アミノ酸11種とチアミンを添加した場合には延命効果が見られた。しかし、何が共生系内部で交換され、何がテトラヒメナにとっての必須外部資源かは不明である。また、この共生系の培養期間が中盤 (5~7年)から後半 (8~13年)に移行するにつれ、テトラヒメナが要求する必須外部資源が変化 (減少)しているかについても不明である。

## 2. 研究の目的

これまでの報告者らの研究および細胞内共生に関する多くの既存研究から、細胞内

共生の進化には、少なくとも以下の二側面の形質変化が重要である。(A) 物理的近接性として宿主細胞(本実験ではテトラヒメナ)内における共生体(クロレラ)の滞在期間(頻度)を高める形質変化(相互作用の密接化)、(B) それぞれに必須な資源が共生系内部で交換され、外部資源に依存する度合いを減少させる形質変化(外部資源への依存度の低化)。本研究では(B)に焦点をあて、CETマイクロコズム内で進化したクロレラとテトラヒメナの細胞内共生において、テトラヒメナにとっての必須資源の視点から、クロレラ-テトラヒメナ間の細胞内共生進化における資源交換の変化を明らかにすることを目的とした。具体的には、(1)テトラヒメナ分離株単独培養における増殖に必要な資源の特定、(2)クロレラ分離株とテトラヒメナ分離株の共培養系におけるテトラヒメナの増殖に必要な資源(外部資源)の特定を行い(B)に関する解析を行なった。

### 3. 研究の方法

培養5年目以降のCETマイクロコズム長期培養におけるクロレラとテトラヒメナの細胞内共生関係を解析するために、以下の解析を行った。

#### (1) テトラヒメナの栄養要求性(単独培養条件)の解析

培養7年目に分離したテトラヒメナ分離株(TC-20;細胞内のクロレラは除去されて保存されている)。これをクロレラが存在しない環境で増殖できる資源(アミノ酸、ビタミン、ヌクレオシド、グルコース)を特定するために、様々な組み合わせで無機塩培地に資源を添加し、テトラヒメナ(TC-20)の培養を行った。特に、テトラヒメナが増殖できる最小限の組み合わせの特定に注目した。

#### (2) テトラヒメナの必須外部資源(クロレラとの共培養条件)の解析(①クロレラ祖先株、②クロレラ5年分離株、③クロレラ13年分離株での比較)

クロレラ祖先株(oriM)、5年分離株(SC10-2)、3年分離株(A1-2, A1-3)をそれぞれテトラヒメナ7年分離株(TC-20)と混合し共培養を行い、35日目(クロレラを細胞内に持つテトラヒメナ個体の集団中の割合が増加し共生が構築される日数)に、その培養液をアミノ酸4種類(アルギニン、ヒスチジン、メチオニン、トリプトファン)とチアミンを組み合わせで添加した無機塩培地に植え継ぎ、テトラヒメナとクロレラの個体数変動とテトラヒメナの動態を確認した。

### 4. 研究成果

(1) テトラヒメナ分離株(TC-20)の単独培養には必須アミノ酸11種と非必須と予測された4種のアミノ酸(アスパラギン酸、アラニン、グルタミン酸、グリシン)のいずれか1種、ビタミンは2種(チアミンとピリドキサーール)、ヌクレオシドはいずれか1種、グルコースが必要であった。

(2) それぞれのクロレラ株と共培養したテトラヒメナ(TC20)の増殖結果は以下のとおりであった。①クロレラ祖先株との共培養では、必須アミノ酸4種類とチアミンの添加ではテトラヒメナ(TC-20)の増殖はみられなかった(図1a)。②クロレラ5年分離株(SC10-2)とTC-20との共培養では上記の必須アミノ酸の内4種類(アルギニン、ヒスチジン、メチオニン、トリプトファン)とチアミンが必須であった(図1b)。③クロレラ13年分離株(A1-2, A1-3)との共培養ではチアミンのみが外部資源として必要であった(図1c, d)。

(1)の実験(TC-20単独培養時)で添加したピリドキサーールとヌクレオシドは(2)の実験(クロレラ分離株との共培養時)では添加せずとも増殖する(外部資源として必要ない)ことから、クロレラ分離株(5年、13年)から受け取っていると考えられる。

アミノ酸に関しては、培養5年のクロレラからは必須アミノ酸11種類の内添加した4種類以外のアミノ酸が宿主に供与されると推測される。さらに、培養13年のクロレラからは必要なアミノ酸の全てが宿主に供与されていると推測される。

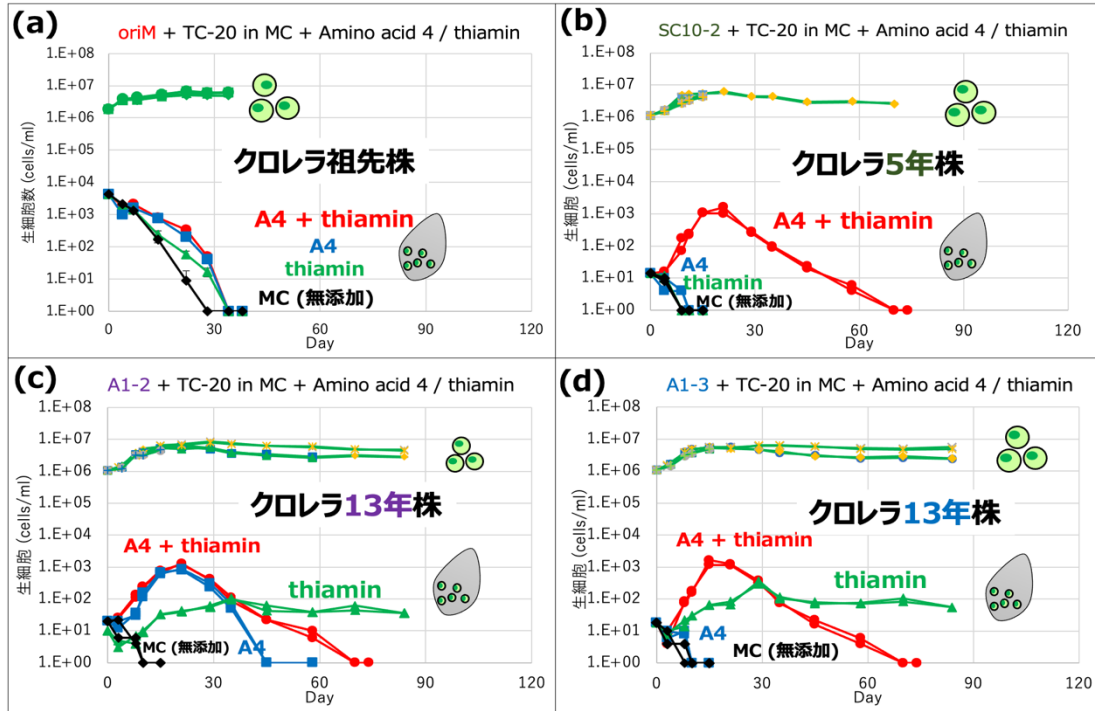


図1 4つの外部資源の添加条件下（無添加，4種アミノ酸，4種アミノ酸+チアミン，チアミン）で各種クロレラ株をテトラヒメナ（TC20）と共培養した個体数の経時変化。

これらの結果に基づき，以下のような細胞内共生の進化のシナリオ（仮説）が考えられる（図2）．培養開始時（0年）では，テトラヒメナは必須資源の全てを細菌（大腸菌）食により得ていた．その後，利用可能な細菌量の低下に伴い（先行研究により示されている；Nakajima et al. 2009），クロレラを取り込み保持しやすい形質のテ

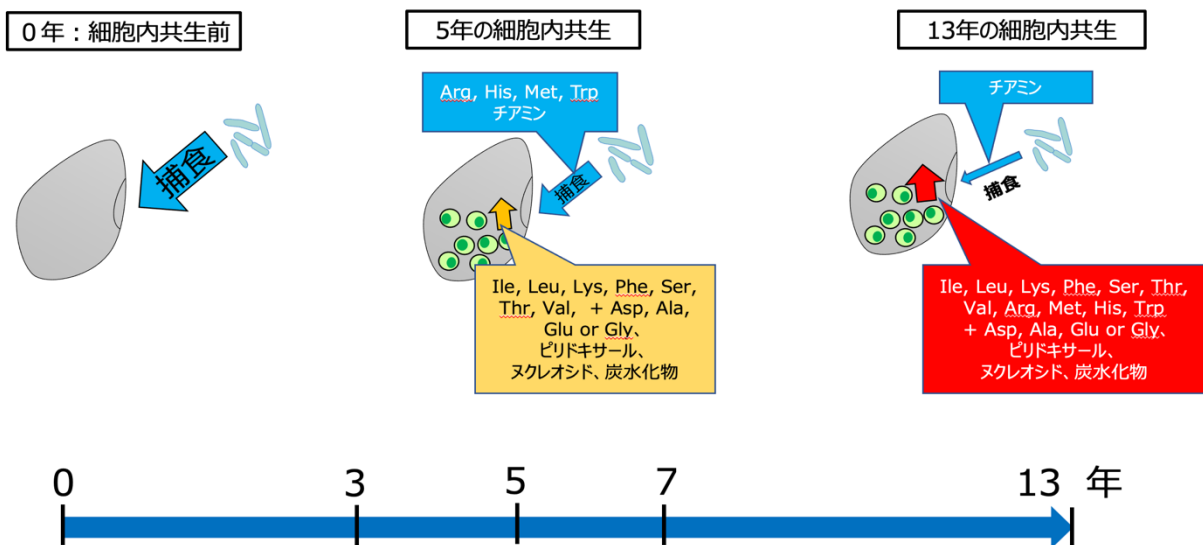


図2 CET マイクロコズムにおけるクロレラ-テトラヒメナ細胞内共生における資源交換の進化

トラヒメナが選択的に有利となった。この状況では、テトラヒメナは多くの必須資源を内生クロレラより得ていたが、その時点でのクロレラからは得られない必須資源として4つのアミノ酸があった。さらに、培養年の経過に伴い内生クロレラは全ての必須アミノ酸を宿主に提供するように進化した。この結果は、物理的攪乱のない準閉鎖系の生態系が成熟層で維持される場合では、光栄養生物と従属栄養生物の間でより効率の良い資源交換が進化することを示唆している (Nakajima, 2021)。

今後の課題として、上記のシナリオの検証として、それぞれの分離クロレラ株の分泌物の詳細な解析が必要である。また、このような栄養交換がクロレラにとっても有利となるような進化的メカニズムを明らかにする必要がある。

#### <引用文献>

Nakajima, T., Sano, A., Matsuoka, H., 2009. Auto-/heterotrophic endosymbiosis evolves in a mature stage of ecosystem development in a microcosm composed of an alga, a bacterium and a ciliate. *Biosystems* 96 (2), 127-135.

Sano, A., Watanabe, M., Nakajima, T., 2009. Adaptive characteristics of a ciliate *Tetrahymena thermophila* in endosymbiotic association with a green alga *Chlorella vulgaris* derived in a long-term microcosm culture. *Symbiosis* 47, 151-160.

Germond, A., Kunihiro, T., Inouhe, M., Nakajima, T., 2013. Physiological changes of a green alga (*Micractinium* sp.) involved in an early-stage of association with *Tetrahymena thermophila* during 5-year microcosm culture. *Biosystems* 114, 164-171. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2008.12.006>.

Nakajima, T., Matsubara, T., Ohta, Y., Miyake, D., 2013. Exploitation or cooperation? Evolution of a host (ciliate)-benefiting alga in a long-term experimental microcosm culture. *Biosystems* 113 (3), 127-139. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2013.05.012>.

Nakajima, T., Fujikawa, Y., Matsubara, T., Karita, M., Sano, A., 2015. Differentiation of a free-living alga into forms with ecto- and endosymbiotic associations with heterotrophic organisms in a 5-year microcosm culture. *Biosystems* 131, 9-21. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2015.03.005>.

Nakajima, T. 2021. Symbiogenesis is driven through hierarchical reorganization of an ecosystem under closed or semi-closed conditions. *Biosystems* 205 104427.

## 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 0件/うちオープンアクセス 2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) 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) 10.1016/j.pbiomolbio.2017.09.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima, T.	4. 巻 205
2. 論文標題 Symbiogenesis is driven through hierarchical reorganization of an ecosystem under closed or semi-closed conditions.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosystems	6. 最初と最後の頁 104427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biosystems.2021.104427	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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

1. 発表者名 安部雄一, 藤井陽介, 松浦正幸, 坪井睦枝, 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界
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界
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-細菌の共生の進化と多様化
3. 学会等名 日本ゲノム微生物学界
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------