

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H01005

研究課題名(和文) Asgardアーキアは本当に真核生物の起源か？-世界初の培養株を用いた実態解明-

研究課題名(英文) Is the Asgard archaea the ancestor of eukaryotes?-Characterization of the first cultured archaeal strain-

研究代表者

井町 寛之 (Imachi, Hiroyuki)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭研究開発プログラム)・上席研究員

研究者番号：20361933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,400,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物の起源に関連する生物としてAsgardアーキアが注目されている。本研究では、世界で初めて培養に成功したAsgardアーキアMK-D1について、その詳細な細胞・生理・遺伝学的な特徴の解明を通じて、「Asgardアーキアが真核生物の起源と関係する原核生物であるのか」を明らかにすることを目的として研究を進めた。MK-D1は他のアーキアと同様な細胞膜脂質を持つ一方で、これまでの原核生物には見られない細胞形態を持つことや、他の微生物に依存した生育をすることなどが明らかとなった。得られたMK-D1の特徴およびこれまでの研究結果に基づいて、真核生物の誕生についての新しい進化説E3モデルを提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちヒトをはじめとする真核生物の起源は生物学における大きな謎であり、解明されていない重要な課題の一つである。最近の研究からAsgardと呼ばれるアーキア群から真核生物が誕生したことが示唆されたが、このアーキア群に属する培養株は存在しなかったため、アーキアから真核生物へどのように進化したのかは不明のままであった。そのような中、私たちは世界に先駆けてAsgardに属するアーキアMK-D1の培養に成功し、その細胞・生理・遺伝学的な特徴を明らかにした。得られた結果を基に、私たちの祖先となったアーキアの特徴を推定するとともに、真核生物誕生の新しいモデルを提案することで私たち真核生物の誕生の道筋を示した。

研究成果の概要(英文)：Asgard archaea have attracted attention as organisms related to the origin of eukaryotes. In this study, we investigated the first cultured Asgard archaeon MK-D1 with the aim of clarifying whether Asgard archaea are prokaryotes related to the origin of eukaryotes through detailed cell morphological, physiological, and genetic characterization of MK-D1. The archaeon has membrane lipids similar to those of other archaea, but has a cell morphology not observed in any previous prokaryotes and is completely dependent on other microorganisms for its growth. Based on the characteristics of MK-D1 and the results of previous studies on the origin of eukaryotes, we proposed a new model for eukaryogenesis, termed the Entangle-Engulf-Endogenize (E3) model.

研究分野：微生物生態学

キーワード：アーキア Asgardアーキア 真核生物の起源 嫌気性微生物 海底堆積物

## 1. 研究開始当初の背景

これまで真核生物の起源については様々な仮説が提案されてきたが、原核生物であるアーキア(古細菌)とバクテリア(真正細菌)の共生により真核生物が誕生したとされる説が広く受け入れられている。しかしながら、これまで原核生物から真核生物に移行する中間体が見つかっていなかったため、その仮説の検証は困難であった。そのような状況の中、スウェーデンの研究チームの「最も真核生物に近縁なアーキアの発見」という報告は、生物学界に大きな衝撃を与えた(Spang *et al.*, 2015. *Nature* 521: 173-179)。この論文では、メタゲノム解析により海底堆積物に生息するロキアーキオータと呼ばれる未培養アーキアのゲノムを解読し、分子系統解析からロキアーキオータが真核生物に最も近縁であることを示した。加えて驚くべきことに、このゲノムにはこれまで真核生物に特有とされてきた細胞骨格形成、小胞体輸送や食作用等に関わる分子をコードする遺伝子(例えばアクチンや低分子量 GTPase 等)が多数存在することであった。さらに同チームはメタゲノム解析によりロキアーキオータに近縁なアーキアの探索を行い、ロキアーキオータを含む Asgard アーキア群が真核生物に近縁であり、真核生物に特異的とされてきた遺伝子群を多数保有していることを示した(Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017. *Nature* 541: 353-358)。この2つの研究によって、Asgard アーキア群は真核生物の起源に関わる進化的に重要な生物群として考えられるようになった。しかしながら、ゲノム解析で得られたデータはあくまで間接的な推定に過ぎない。例えば、Asgard アーキアは真核生物細胞と同様に複雑な小器官を有しているのか、あるいは共生するバクテリア細胞を細胞内に取り込む食作用を有しているのか、といった本質的な問いに対してゲノム解析では決して答えることができない。つまり、培養株を使って Asgard アーキアが本当に“真核生物的な細胞”であるのかを直接的に検証することが必須といえる。そのため世界的な Asgard アーキア培養株の獲得競争が始まっている。そのような背景の中、我々は先の基盤研究(A)(課題番号 15H02419)を通じて、Asgard に属するアーキア培養株を獲得することに世界に先駆けて成功した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、世界初の Asgard アーキア MK-D1 株の培養に成功したアドバンテージを最大限に活かし、培養、顕微鏡観察やオミクス解析に基づいた細胞学・生理学・遺伝学的諸性質の直接検証によって、「Asgard アーキアが真の真核生物の起源と関係する原核生物なのか」を明らかにすることである。この世界初のアドバンテージを活かしながら、最新の質量分析計や電子顕微鏡等の技術を積極的に導入することで、Asgard アーキアの細胞構造や生理学的性質を決定するとともに、最終的には原核生物から真核生物が誕生した新しい進化シナリオを提案することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) MK-D1 株の培養方法

MK-D1 の培養は、カザミノ酸(0.05%、w/v)、20種類のアミノ酸(各 0.1 mM)および粉ミルク(0.1%、w/v、明治ほほえみ)を添加した嫌気培地を用いた。培養は 20°C の暗所で振盪せずに行った。嫌気培地の組成や作成方法は以前に報告に従って行った(Imachi *et al.*, 2023. *Nature Protocols*, 17: 2784-2814)。

### (2) 脂質分析

約 120 ml の MK-D1 培養液をクローンベンチ内で孔径 0.22  $\mu\text{m}$  のポリエタンスルホン酸フィルターを用いた濾過により 5 ml 程度まで濃縮を行った。濃縮した培養液は遠心分離操作によりさらに濃縮を行い、その後、無機嫌気培地で洗浄を行うことで、分析時に干渉する可能性のある物質の除去を行った。回収した細胞は既報の方法に準拠して脂質分析を実施した(Takano *et al.*, 2018. *Scientific Report*, 8, 14070)。

### (3) 電子顕微鏡

集束イオンビーム-走査型電子顕微鏡(Focused Ion Beam System-Scanning Electron Microscopy: FIB-SEM, Helios G4 UX, ThermoFisher Scientific)を用いた観察には 2.5% グルタルアルデヒド溶液で固定した MK-D1 培養物を用いた。クライオ電子顕微鏡の撮影は自然科学研究機構・生理学研究所に設置されている透過型クライオ電子顕微鏡(JEM2200FS, JEOL)を用いた。

### (4) ゲノム解析

MK-D1 培養系より抽出した DNA は Nextera Mate Pair Library Preparation kit (Illumina) を用いて、平均挿入サイズ 3,000 bp の mate-pair library を説明書に従って構築した。イルミナ MiSeq プラットフォーム(2×300bp)を用いてライブラリーシーケンスを行い、3,822,290 個のペアリードを得た。メイトペアリードは以下の手順で処理した: Trimomatic v.0.3363 (ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE-2.fa:2:30:10:8:true LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:20

MINLEN:100)を使用してアダプターおよび低品質配列を除去し、NextClip v.1.3.165 でリンカー配列を除去した。SPAdes v.3.1.166 を用い、複数の k-mer サイズ (21、33、55、77、99) で de novo アセンブリを行った結果、500 bp 以上の長さのコンティグが 3,487 本、合計 14.68 Mb となった。ソフトウェア MyCC はデフォルトパラメータで使用した。配列の不均一性により、断片化したコンティグや冗長なコンティグが発生することがあるため、曖昧なコンティグ (配列カバー率 < 5 または長さ < 1kb) および冗長なコンティグはピニングから除外された。その結果、MK-D1 (4.46 Mb)、*Halodesulfobivrio* sp. MK-HDV (4.13 Mb) および *Methanogenium* sp. MK-MG (2.33 Mb) に関連するゲノムを回収することに成功した。各ピンのスキヤフォールドは、SSPACE v.3.068 を使用して、イルミナリードの mate-paired 情報を用いて構築した。MK-D1 の完全なゲノム配列を得るため、サンガーシーケンサーを用いてギャップを埋めた。

#### (5) プロテオーム解析

大量培養した MK-D1 は脂質分析と同様の手法で細胞を濃縮した。回収した細胞は既報に準じてサンプル調整を行い (Kawai *et al.*, 2022. *Microorganisms* 10, 1288)、Orbitrap Fusion Tribrid 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific) を用いて分析を行った。

### 4. 研究成果

先の基盤研究 (A) (課題番号 15H02419) において、生物進化の観点から重要と考えられている Asgard アーキアを世界で初めて分離・培養することに成功し、この分離した MK-D1 は水素や蟻酸を利用する他の微生物と種間電子伝達を介した共生をしながらアミノ酸やペプチドを分解する嫌気性の極小の球菌であることなどの特徴の一部を明らかにしていた。

まず、本基盤研究 (A) ではアーキアから真核生物へと至る細胞の進化過程を推定するための重要な情報となる細胞膜の膜脂質分析を行うこととした。真核生物とバクテリアの細胞膜脂質型はエステル型、アーキアのそれはエーテル型と明瞭に異なることが知られている。もし Asgard アーキア群が真核生物の起源に近いのであれば、エステル型の脂質骨格を持つことが予想され、他のアーキアと同じであればエーテル型である。どちらの脂質型であったとしても細胞の進化を考える上で重要な知見となる。分析した結果、MK-D1 はこれまでに知られているアーキアと同様にイソプレノイドを含むことがわかり、エーテル型脂質を持つことが強く示唆された。現存する真核生物の細胞膜は脂肪酸がエステル結合したエステル脂質であることを考えると、アーキアが真核生物へと進化していく過程で、細胞膜脂質がエーテル型からエステル型へと切り替わったと推定することができる。

続いて、MK-D1 の詳細な細胞構造やその内部を詳しく観察するために FIB-SEM およびクライオ電子顕微鏡を用いた観察を行った。FIB-SEM で繰り返し観察を行った結果、MK-D1 は直径 550 nm の直径を持つ小さな球菌であることや増殖時には細胞同士が集まった凝集体を形成して生育することが明らかとなった。さらに増殖後期になると細胞形態を大きく変化させて触手のような長く分岐を有する突起構造を細胞外部に形成することや、細胞外に膜小胞を放出することも判明した。クライオトモグラフィーにより細胞内部を調べた結果、小器官のような構造物は見当たらず、他のアーキアと同様に MK-D1 の細胞内部は単純な構造であった。この観察結果は多くの研究者が予測していた「Asgard アーキアは真核生物と同様に核や小器官を有する複雑な細胞である」ことを裏切るものであった。この観察結果から、細胞内小器官はアーキアがミトコンドリアの祖先バクテリアと一体化した後に生まれたことが示唆された。

次に、培養できた MK-D1 の完全長ゲノムを決定して、リボソームタンパク質配列に基づく分子系統解析を行った。その結果、MK-D1 は真核生物群と姉妹群を形成したことから、「MK-D1 は培養された原核生物として真核生物に最も近縁な生物である」ことが示された。加えて、MK-D1 のゲノムにも真核生物に特有とされてきたアクチン、ユビキチンや小胞体輸送関連の遺伝子が多数存在しており、RNA 発現解析からそれらの遺伝子群が実際に細胞内で発現していることも確認した。さらに MK-D1 株のゲノムを詳細に解析したところ、自身の細胞を作るために必要なアミノ酸、ビタミン類やヌクレオチドを自身では合成できないことが示唆された。この結果は、MK-D1 がエネルギー源であるアミノ酸の利用を他の微生物との共生に依存しているだけでなく、自分自身の細胞合成や生育に必須となる物質も他の微生物からの供給に依存していることを示唆していた。さらに、MK-D1 を含めた Asgard アーキアにおける比較ゲノム解析を行ったところ、Asgard アーキアは、アミノ酸からのエネルギー獲得に関連する遺伝子が保存されていることが明らかとなった。この比較ゲノム解析の結果から、Asgard アーキアの祖先となるアーキアはアミノ酸を利用して生育していたことが強く示唆された。従って、真核生物の祖先となるアーキアはアミノ酸をエネルギー源として利用して生育していたと考えることができる。

ここまでの研究で明らかになった本研究で明らかになった MK-D1 の細胞形態・生理・遺伝学的な特徴とこれまでの真核生物の起源に関連する研究結果に基づいて、真核生物の誕生についての新しい進化説“Entangle-Engulf-Endogenize (E<sup>3</sup>) model”を提案した。今から約 25 億年前、シアノバクテリアの登場により地球に酸素が増えてくる大酸化イベントが始まった。真核生物の祖先となるアーキアは、彼らにとって毒である酸素を解毒してもらうためにミトコンドリアの祖先となるバクテリア細胞と共生した。そして、そのアーキアは MK-D1 で観察されたような長い触手や小胞を使ってミトコンドリアの祖先を取り込んだことで最初の真核生物細胞が生まれたという仮説である。

ここまでで一旦論文としてまとめて投稿した。プレプリント論文として公開した論文は Science 誌が選ぶ 2019 年の革新的な十大科学ニュースに選ばれた。また査読を経て正式に出版された論文は Nature 誌に掲載され、国内外の多くのメディアで紹介された。

本研究の2年度目はパートナー微生物が変わった際に MK-D1 の代謝が変化するかを調べるための準備として、新たな2者共生培養系の構築をおこなった。当時、私たちは MK-D1 の2つの培養系を維持していた。1つは水素資化性メタン生成アーキア *Methanogenium* sp. MK-MG との純粋な共生培養系、もう1つは *Methanogenium* sp. MK-MG に加えて硫酸還元細菌 *Halodesulfobivrio* sp. MK-HDV の3者培養系である。この3者培養系から MK-MG 株のみを排除すれば、MK-D1 と硫酸還元細菌あるいはメタン生成アーキアがパートナーとなった時の代謝変化を調べることが可能となる。そこで3者培養系を硫酸還元細菌の増殖を促進し、メタン生成アーキアの増殖を抑制する条件で培養をおこなった。MK-D1 の増殖を定量 PCR で確認後に iTAG 解析を行いながら培養を進めた結果、MK-D1 と *Halodesulfobivrio* sp. MK-HDV の純粋な共生系を確立することに成功した。この培養系の確立と並行して MK-D1 のタンパク質の発現を解析するために MK-D1 の大量培養を繰返し行った。定量 PCR により MK-D1 の増殖確認後、大量培養した菌体はメンブレンフィルターと遠心分離による濃縮を行い、その後-80°Cで保存した。回収した菌体はその品質を確認するために iTAG 解析を行った。

最終年度は MK-D1 のタンパク質発現を調べるために、超高分解能フーリエ変換型質量分析計を用いてプロテオーム解析を行なった。その結果、アクチンが2番目に発現量の多いタンパク質であることが判明した。最近、他の研究チームから報告された Asgard アーキア2番目の培養株である *Candidatus Lokiarchaeum ossiferum* の電子顕微鏡観察の結果 (Rodrigues-Oliveira *et al.*, 2022, Nature) を考慮すると、MK-D1 株の細胞内や突起内部にアクチンフィラメントが多数存在することは間違いないであろう。このプロテオーム解析と並行して、細胞内でのアクチンの局在を調べるために、免疫染色を行なった。抗体として、真核生物のアクチンフィラメントの検出に広く使われているファロイジン、SiR-Actin や Lifeact を用いたが、明瞭なシグナルを検出することはできなかった。このことから、一般的に使われている真核生物用のアクチンフィラメント抗体では Asgard アーキアが持つアクチンフィラメントは検出できない可能性が示唆された。

以上、本研究課題において、生物進化において重要な Asgard アーキアの世界初の培養株について世界に先駆けて論文成果として報告し、真核生物誕生の新しいモデルを提案した。今後、培養株 MK-D1 を用いて、なぜ海底に住むアーキアが真核生物の祖先となったのかを明らかにするために詳細な調査を進めていく予定である。加えて、真核生物に最も近縁と予測されている Heimadallarchaeota 系統に属する新しい Asgard アーキア培養株の獲得およびその性質を解明して、真核生物誕生プロセスのより精緻な描写を行うことを目指す予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 Urai Atsushi, Takano Yoshinori, Imachi Hiroyuki, Ishii Shun'ichi, Matsui Yohei, Ogawara Miyuki, Tasumi Eiji, Miyairi Yosuke, Ogawa Nanako O., Yoshimura Toshihiro, Inagaki Fumio, Yokoyama Yusuke, Kawano Kenjiro, Murai Daisuke, Park Ho-Dong, Ohkouchi Naohiko	4. 巻 5
2. 論文標題 Origin of Deep Methane Associated with a Unique Community of Microorganisms in an Organic- and Iodine-Rich Aquifer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Earth and Space Chemistry	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsearthspacechem.0c00204	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 -

1. 著者名 井町寛之、延優	4. 巻 38
2. 論文標題 真核生物の起源アーキア：培養と新しい真核生物誕生モデルの提案	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1496~1500
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 無
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 -

1. 著者名 井町寛之、延優	4. 巻 78
2. 論文標題 難培養性アーキアからみえてきた真核生物細胞の起源	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー (B&I)	6. 最初と最後の頁 332~334
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 無
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 -

1. 著者名 Imachi Hiroyuki, Nobu Masaru K. et al.	4. 巻 577
2. 論文標題 Isolation of an archaeon at the prokaryote-eukaryote interface	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 519~525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-019-1916-6	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井町寛之、延優
2. 発表標題 真核生物の誕生のカギを握るアーキア：培養と新しい真核生物誕生モデルの提案
3. 学会等名 第7回日本細胞外小胞学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Imachi Hiroyuki、Nobu K. Masaru
2. 発表標題 An archaeon at the prokaryote-eukaryote interface: isolation and a new eukaryogenesis model.
3. 学会等名 Thermal Biology Institute of Montana State University seminar（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井町寛之
2. 発表標題 私たち真核生物の祖先？－Part I. 海底から培養したアーキアとその生理学的特徴－
3. 学会等名 第3回 ExCELLSシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 延優
2. 発表標題 私たち真核生物の祖先？－Part II. 祖先アーキアのゲノムと新しい進化説－
3. 学会等名 第3回 ExCELLSシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井町寛之
2. 発表標題 私たち真核生物はどのようにして生まれたのか？
3. 学会等名 静岡県立沼津東高等学校・科学講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Imachi Hiroyuki、Nobu Masaru K.
2. 発表標題 An archaeon at the prokaryote-eukaryote interface: isolation and a new theory for eukaryogenesis
3. 学会等名 The Origin of Eukaryote（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019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	延 優  (Nobu Masaru)  (40805644)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員   (82626)	
研究分担者	高野 淑識  (Takano Yoshinori)  (80399815)	国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋機能利用部門(生物地球化学センター)・センター長代理   (82706)	
研究分担者	諸野 祐樹  (Morono Yuki)  (30421845)	国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(高知コア研究所)・主任研究員   (82706)	

6. 研究組織（つづき）

	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	玉木 秀幸  (Tamaki Hideyuki)  (00421842)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究 グループ長    (82626)	

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			
ドイツ	ハインリッヒ・ハイネ大学			