

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06769

研究課題名(和文) インビトロ合成生態系を用いた共生の起源と進化の解明

研究課題名(英文) Study of the origin and evolution of symbiosis using an in-vitro synthetic ecosystem

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：クロレラ・大腸菌・テトラヒメナから構成される合成生態系を作成し13年間の培養を行なった。解析の結果、以下が明らかになった。(i) クロレラには集塊を形成するタイプ(大腸菌と共生しやすい)とテトラヒメナに取り込まれやすい分散タイプが進化した。(ii) 細胞が長くなる非共生型の大腸菌が存在し、この形質の遺伝子を特定した。(iii) アミノ酸要求性の大腸菌がクロレラ集塊に入り込むことにより生存繁殖できること。(iv) 5, 6, 8, 13年培養のクロレラ分離株と祖先株の計28株の全ゲノム解読を行い、集塊形成に関与する可能性のある遺伝子群を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、実験合成生態系の13年間の長期培養を解析し光栄養生物(藻類)と従属栄養生物(細菌及び繊毛虫)との間の共生の進化過程をを実証的に解析したものである。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、本研究ではこのモデル生態系において構成種間に共生が起源し、進化する過程を追跡した。このモデルは、進化対象を切り取って解析するのではなく、分子、細胞、個体群、生態系過程全体を捉え、各階層間関係の中で構成種の進化を明らかにするという全く新しい手法である。この手法は還元主義的方法と全体論的方法を統合した検証可能な新しい進化研究手法となるだろう。

研究成果の概要(英文)：A synthetic ecosystem composed of *Chlorella* (*Micractinium* sp.), a bacterium (*E. coli*), and a ciliate (*Tetrahymena thermophila*) has been cultured for 13 years to understand the origin and evolution of symbioses. In analyzing the isolates and their co-cultures, we revealed the following processes and their mechanisms: (i) *Chlorella* evolved two different types: one forms cell aggregates incorporating *E. coli* cells, and the other enters *Tetrahymena* cells forming an endosymbiotic association. (ii) A filament-cell type of *E. coli* has evolved, not forming a symbiotic association with *Chlorella*. The gene that cause this phenotype was identified. (iii) *E. coli* isolates that require amino acids can survive and reproduce by being incorporated into a *Chlorella* cell aggregate. (iv) The whole genome sequences of the ancestral *Chlorella* and isolates from 5, 6, 8, and 13-year-old cultures were determined, and genes that can be possibly related to the cell-aggregation formation were identified.

研究分野：進化生態学, 理論生物学

キーワード：共生 実験進化 生態系 ゲノム クロレラ 大腸菌 テトラヒメナ

## 1. 研究開始当初の背景

微生物を用いて進化を実験的に解析する手法は、進化研究の重要な手法として用いられているが、従来の研究では、進化の諸条件を実験者が設定してコントロールする方法によって行われてきた。しかし、生物進化は生態系内の要素間の直接・間接の相互作用の結果生じる過程であり、進化の諸条件は生態系が生成している。本研究は、生態系は構成種が進化する諸条件を生成し、彼らの進化を制約し誘導するという視点から共生の進化にアプローチする。本研究の報告者は、クロレラ (*Micractinium* sp. Ehime)・大腸菌 (*Escherichia coli*)・テトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) の3種で構成された合成生態系“CET マイクロコズム”を約13年間培養し、個体群・群集動態(開始から3年間)及び分離株を用いた形質や相互作用(培養5、6年後)を解析した結果、共生関係になかった種間で共生が進化したことを明らかにした。

先行研究では、主に長期培養前半(～6年)からの分離株を用いて、上記の①～③について形質や種間相互作用を明らかにしたが、培養後半(6～13年)の進化過程は不明であり、DNAレベルの変化の実態については、大腸菌を除いて全培養過程で不明である(大腸菌は祖先株、6、8、13年目分離株各15株の全ゲノム解読が終了)。

## 2. 研究の目的

### (1) 大腸菌の進化におけるフィラメント化の遺伝子の解析

これまでの研究により、クロレラ (*Micractinium* sp. Ehime) と大腸菌との細胞集塊形成による共生の進化において興味深い分離株が見つかった。その一つA10グループ(A10株はその一つで培養5年に分離)は栄養培地を用いた単独培養では正常細胞形態であるが、無機塩培地で集塊形成型のクロレラと共培養すると集塊の隙間に入り込み、成長過程でフィラメント化する。これにより集塊に強固にからみ、テトラヒメナの衝突によっても集塊から脱落しない効果があると仮説的に考えられる。

また、*E. coli*分離株の中には、単独培養においてフィラメント化するタイプCグループ(イソロイシン要求C6株はその一つで培養5年分離)が見つかった。これは集塊形成型のクロレラと共培養すると細胞が長いのでクロレラ集塊の隙間に入りにくく共生ができないと考えられる。このCグループはデトリタスを利用しフィラメント化により捕食を回避する戦略と考えられる。この仮説を図1にまとめた。クロレラ集塊に正常型細胞が入り込む形で共生が進化し、次の段階でA10グループのような集塊侵入前は正常サイズであるが侵入後にフィラメント化する戦略が進化した。一方、Cグループのようにクロレラと共生せず、フィラメント化する形で天敵(テトラヒメナ)からの捕食を回避する戦略も進化した。

上記の生態学的な進化過程において細菌のフィラメント化は重要な形質である。そこで、*E. coli* C6 と A10 の両株のフィラメント化に関わる遺伝子を全ゲノム配列結果から推測し、それぞれの遺伝子を形質導入法で野生型に戻した株の形質を調べることにより、両者の遺伝子の特定を試みた。

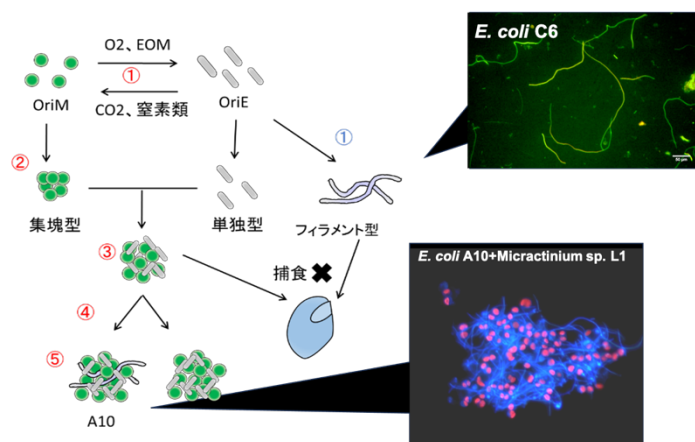


図1 大腸菌のフィラメント化の進化の仮説

①弱い相互作用, ①捕食回避; ②集塊型藻類の出現; ③C集塊への *E. coli* の参加; ④CE集塊の増加; ⑤藻類・細菌の共進化: 集塊形成率, 利益供与率の高い株が選択され共進化が進む

## (2) 共培養試験によるクロレラ分離株の形質の解析と種間関係の解析

上記の課題(1)における大腸菌 A10 株(5年分離)はアミノ酸要求性を示さないが、大腸菌個体群は13年の長期培養過程で経過年に対しアミノ酸要求性を示す分離株の割合が高まることになった。そこで、アミノ酸要求性もつ大腸菌はクロレラ集塊に入り込むことによりクロレラが分泌するアミノ酸を利用し、生存・繁殖しているという仮説を立て、13年培養の大腸菌株としてアミノ酸要求性がありかつ集塊型クロレラと共培養時にフィラメント化するものを選び、これと13年分離のクロレラ株で単独培養時に集塊形成するものとを共培養し、両者が集塊を形成し、この大腸菌株が内部で生存できるかを検証する。

## (3) 全ゲノム DNA 配列の決定と共生の起源の解析

クロレラ祖先株といくつかの代表的な分離株の全ゲノム DNA の解読を行う。これにより、これまで形質のみの違いをもとに理解した進化過程を DNA レベルで理解するこれらの情報を参考にし、本研究で見出された株の変異箇所に関わる遺伝子を同定し、共生の進化の初期段階に関わるクロレラの突然変異を明らかにすることを目指す。

## (4) 主要分離株の外部機関への寄託

CET マイクロコズムの13年間の培養で用いた祖先株およびこの培養系から分離されたクロレラ、大腸菌、テトラヒメナの特徴的な形質を進化させた株を当研究室から保存・分譲を業務とする外部機関に寄託した。これにより、他の研究者が本研究の仮説の検証、結果の追試、更なる解析が可能になる。また、本研究とは異なる視点での研究材料として活用が可能になる。

## 3. 研究の方法

### (1) 大腸菌の進化におけるフィラメント化の遺伝子の解析

(i) 単独培養でフィラメント化する分離株 *E. coli* C6: 分裂時の細胞中央の狭窄に関与する Z リング (FtsZ タンパク質繊維が集まってできる) のアンカー機能を持つタンパク質 ZipA が知られている。全ゲノム解読した先行研究から C6 株 *zipA* の 55 番目が停止コドンに変化していたため、これをコードする遺伝子 *zipA* をフィラメント化の原因遺伝子の候補とした。

(ii) 単独培養では正常サイズだが集塊形成型クロレラと共培養するとフィラメント化する大腸菌 *E. coli* 分離株 A10 (培養5年) の原因遺伝子を *cpdA* とした (A10 株はこの遺伝子に非同義変異を持つ)。これは c-AMP 分解酵素の遺伝子であるが、先行論文によると、c-AMP 濃度が高くなることにより大腸菌がフィラメント化する。

P1 ファージを用いた形質導入により C6 および A10 の遺伝子 *zipA* と *cpdA* のそれぞれを野生型配列に置き換えた株、C6\_KAK914 と A10\_KAK918 を作成した。これらを用いて、以下の実験で原因遺伝子の検証を行なった。

(i) 大腸菌分離株 C6 とその形質導入株 (C6\_KAK914) をそれぞれ栄養培地で単独培養し、細胞長を計測することで、*zipA* が細胞フィラメント化に及ぼす効果を調べた。また、それぞれをクロレラ *Micractinium* L1 (6年分離) と無機塩培地で共培養した場合でも細胞長を計測した。

(ii) A10 株およびその形質導入株 (A10\_KAK918) を用い、それぞれ集塊形成能を持つクロレラ *Micractinium* L1 と無機塩培地で共培養し、大腸菌細胞長を計測して *cpdA* が細胞フィラメント化に及ぼす効果を調べた。

なお、形質導入実験は国立遺伝学研究所の秋山光太郎研究員および仁木宏典教授の協力を得て行なった。

### (2) 共培養試験によるクロレラ分離株の形質の解析と種間関係の解析

以下の分離株を用いて共培養実験を行い検証した。

大腸菌については、13年培養後に分離の大腸菌の1つ、13-3株を用いた。これは Cysteine 要求性があり、集塊型クロレラと共培養時にフィラメント化することがわかっている。

クロレラについては、13年培養で分離したクロレラの2株、Y1-14とY1-27を用いた。いずれも単独培養時に集塊を形成する。比較対象として、長期培養に使用したクロレラ祖先株 (OriM) を用いた。また、上記の3つのクロレラ株は無機塩培地で増殖させた後の培養濾液を高速アミノ酸分析機で分析しアミノ酸の含有を解析した。

#### (3) 全ゲノム DNA 配列の決定と共生の起源の解析

大腸菌との共生が推察される集塊形成型のクロレラ株、テトラヒメナとの共生が推察される分散型のクロレラ株の中から代表株を選定し、それらの全ゲノム DNA を次世代シーケンサー (DNBSEQ) で解読し、配列の解析を行った。ゲノム DNA 抽出および配列の解析は、それぞれ、長浜バイオ大学の保科亮助教および小倉淳教授の協力をえて行なった。シーケンシングはBGI ジャパン (株) に委託した。配列をもとに、集塊形成することに関与する遺伝子群の特定や、テトラヒメナに延命効果をもたらす遺伝子の推定を行った。

#### (4) 主要分離株の外部機関への寄託

クロレラ、大腸菌及びテトラヒメナの分離株の中で、今後の研究において重要な役割を持つ株を選定し寄託受入可能な機関を探した。

### 4. 研究成果

#### (1) 大腸菌の進化におけるフィラメント化の遺伝子の解析

(i) 大腸菌分離株 C6 とその *zipA* 導入株 (C6\_KAK914) を栄養培地で培養し、72 時間後に細胞長を計測した。その結果を図 2 に示す。C6 と C6\_KAK914 の平均細胞長はそれぞれ  $24.5 \pm 2.8 \mu\text{m}$ ,  $4.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$  であった ( $n=3$ )。頻度分布と

写真が示すように、導入株は細胞長が祖先株のような正常サイズの細胞がほとんどであった。

この結果から、C6 のフィラメント化は主に *zipA* の変異が原因であることが示された。無機塩培地でクロレラ L1 と共培養した場合は、いずれの株も集塊共生は示さなかったが、増殖した細胞の分布を計測したところ、平均細胞長はそれぞれ  $16.95 \mu\text{m}$ ,  $8.89 \mu\text{m}$  ( $n=3$  の平均) であり、*zipA* の復帰した C6\_KAK914 は細胞長が短くなった (図には示していない)。しかし、C6\_KAK914 は祖先株より長いものが多かったのは、クロレラとの共培養という貧栄養環境では *zipA* 遺伝子以外の変異遺伝子の効果も細胞長に影響を及ぼす可能性を示唆している。

#### (ii) A10 株およびその *cpdA* 導入株

(A10\_KAK918) を用い、それぞれ集塊形成能を持つクロレラ *Microactinium* L1 (6年分離) と無機塩培地で共培養し、大腸菌細胞長を計測することで細胞形態の変化を調査した。共培養 30 日後の結果を図 3 に示す。*cpdA* 導入株もクロレラ集塊に入り込みフィラメント化したことを示している。この結果は、A10 株のフィラメント化には *cpdA* の変異は関与していないか、それ単独では起きないことを示している。

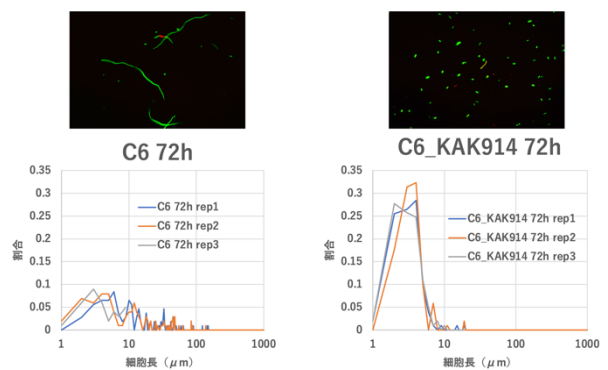


図 2 大腸菌 C6 と C6\_KAK914 の細胞長分布 (栄養培地での単独培養 : 72 時間後)

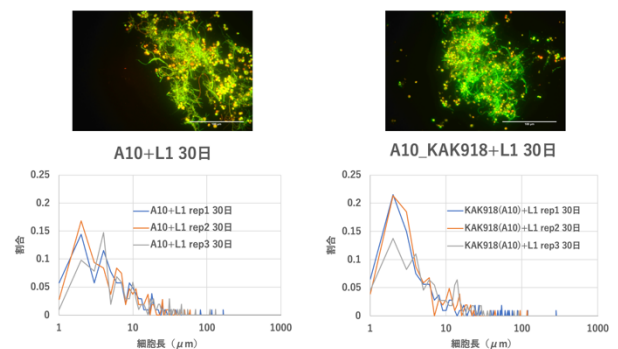


図 3 大腸菌 A10 と A10\_KAK918 の細胞長分布 (無機塩培地でのクロレラ L1 との共培養 : 30 日後)

(2) 共培養試験によるクロレラ分離株の形質の解析と種間関係の解析

培養8年, 13年藻類分離株の培養濾液からCysteinを含む多種類のアミノ酸が検出されY1-27及びY1-14からもCysteinの含有が確認された。また, 共培養実験の結果から, 大腸菌13-3はOriMとの共培養では数が減少するが, Y1-27あるいはY-14との共培養では安定した数を維持した。45日目の顕微鏡観察ではクロレラと13-3が集塊形成していることが示された。また, OriMとの共培養ではこのような集塊は観察されなかった。

(3) 全ゲノムDNA配列の決定と共生の起源の解析

表1に全ゲノムDNA配列を行なった株のリスト(それぞれの分離時までの培養年数, ストレプトマイシン耐性能, 増殖率, 集塊形成率)を示す。集塊形成率は程度に応じて3つのグループに分けた: 低(青): 0-30%; 中(黄): 31-60%; 高(橙): 61-100%。祖先株に対し, ほとんどの株は増殖率(無機塩培地での単独培養の結果)が低下している。また, 同じ培養年で見ると, 集塊形成率が高いほど増殖率は低い傾向が見られる。これは, 集塊形成による高密度化で種内競争が強まる負の効果が現れていると解釈できる。もし大腸菌が集塊内に入れば, クロレラ代謝物(死細胞を含む)の分解産物(CO<sub>2</sub>, 無機塩, その他化合物)の供給により, 集塊形成に参加しているクロレラ細胞の生存率や増殖率は, 集塊非形成状態よりも高いと考えられる。

これらの全ゲノムDNA配列をもとに, それぞれの株について祖先株から変異を起こした遺伝子を特定した。また, 集塊形成率の値の高い株に共通の遺伝子変異を特定した。詳細は, 現在解析中である。

(4) 主要分離株の外部機関への寄託

【クロレラ】祖先株および5~13年培養後に分離した以下の主要9株(表1赤表示)を独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンターに寄託した。【大腸菌】祖先株(国立遺伝学研究所保存ME7767株)から進化した6, 8, 13年培養後に分離した主要株(各年15株, 計45株)を国立遺伝学研究所ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)「大腸菌」に寄託した。【テトラヒメナ】祖先株(接合型の異なる2クローン)とCETマイクロコズム7~8年培養後に分離した11株を山口大学共同獣医学部ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)「ゾウリムシ」に寄託した。

表1 全ゲノムDNA配列を決定した株のリスト

全ゲノムを解析した株(培養年別) 赤字は寄託株

株名	分離時培養年	Str耐性	増殖率MC	集塊形成率MC 単独培養
<b>OriM</b>	祖先株	r	0.66 ± 0.03(n=4) <sup>a</sup> 0.57 ± 0.14(n=3) <sup>b</sup>	6.4 ± 1.0 (n=4) <sup>a</sup>
<b>SC9-1</b>	5	s	0.95 ± 0.02(n=4) <sup>a</sup>	10.2 ± 1.7 (n=4) <sup>a</sup>
<b>SC10-2</b>	5	s	0.60 ± 0.01(n=4) <sup>a</sup>	8.8 ± 0.3 (n=4) <sup>a</sup>
<b>SC10-1</b>	5	r	0.60 ± 0.02(n=4) <sup>a</sup>	80.0 ± 2.9 (n=4) <sup>a</sup>
<b>FC10-3</b>	5	r	0.62 ± 0.02(n=4) <sup>a</sup>	55.0 ± 4.1 (n=4) <sup>a</sup>
<b>L1</b>	6	nd	0.38 ± 0.03 (n=3) <sup>b</sup>	70.86 ± 4.94 <sup>a</sup>
<b>L3</b>	6	nd	0.48 ± 0.06 (n=3) <sup>b</sup>	30.51 ± 7.09 <sup>a</sup>
株名	分離時培養年	Str	増殖率MC (n=2)	集塊形成率MC (n=1)
<b>Y5-4</b>	8	r	0.378 ± 0.057 <sup>c</sup>	41.2% <sup>c</sup>
<b>Y5-5</b>	8	s	0.091 ± 0.011 <sup>c</sup>	9.1% <sup>c</sup>
<b>Y5-8</b>	8	r	0.339 ± 0.125 <sup>c</sup>	2.2% <sup>c</sup>
<b>Y5-17</b>	8	r	0.472 ± 0.142 <sup>c</sup>	5.6% <sup>c</sup>
<b>Y5-20</b>	8	r	0.090 ± 0.013 <sup>c</sup>	56.9% <sup>c</sup>
<b>Y5-21</b>	8	s	0.239 ± 0.078 <sup>c</sup>	85.6% <sup>c</sup>
<b>Y5-27</b>	8	r	0.145 ± 0.063 <sup>c</sup>	44.6% <sup>c</sup>
<b>Y5-45</b>	8	r	0.071 ± 0.007 <sup>c</sup>	46.0% <sup>c</sup>
<b>Y5-46</b>	8	s	0.166 ± 0.051 <sup>c</sup>	2.3% <sup>c</sup>
株名	分離時培養年	Str	増殖率MC (n=2)	集塊形成率MC (n=1)
<b>A1-1</b>	13	r	0.336 ± 0.074 <sup>d</sup>	7.1% <sup>d</sup>
<b>A1-2</b>	13	r	0.333 ± 0.044(n=2) <sup>d</sup>	6.1% (n=1) <sup>d</sup>
<b>A1-3</b>	13	r	0.383 ± 0.203(n=2) <sup>d</sup>	7.4% (n=1) <sup>d</sup>
<b>A1-4</b>	13	s	0.175 ± 0.068 <sup>d</sup>	70.0% <sup>d</sup>
<b>A1-7</b>	13	r	0.482 ± 0.087 <sup>d</sup>	16.6% <sup>d</sup>
<b>A1-8</b>	13	r	0.396 ± 0.075 <sup>d</sup>	8.7% <sup>d</sup>
<b>A1-17</b>	13	r	0.074 ± 0.172 <sup>d</sup>	49.2% <sup>d</sup>
<b>A1-18</b>	13	r	0.483 ± 0.092 <sup>d</sup>	8.9% <sup>d</sup>
<b>Y1-3</b>	13	r	0.428 ± 0.082 <sup>d</sup>	5.4% <sup>d</sup>
<b>Y1-4</b>	13	nd	0.168 ± 0.008(n=3) <sup>d</sup>	61.4% ± 7.7(n=4) <sup>d</sup>
<b>Y1-14</b>	13	r	0.173 ± 0.026 <sup>d</sup>	93.4% <sup>d</sup>
<b>Y1-27</b>	13	r	0.217 ± 0.081 <sup>d</sup>	93.9% <sup>d</sup>



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Toshiyuki Nakajima	4. 巻 205
2. 論文標題 Symbiogenesis is driven through hierarchical reorganization of an ecosystem under closed or semi-closed conditions. BioSystems, 205	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5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米田 侑生, 松田 達也, 佐古 壮一郎, 中島 敏幸
2. 発表標題 3種マイクロコズムにおける藻類と繊毛虫の細胞内共生進化: 共生系外部に依存する必須資源の減少
3. 学会等名 第54回 日本原生生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中田 章太, 安部 雄一, 西山 竜太郎, 藤井 大将, 中島 敏幸
2. 発表標題 3種マイクロコズムの長期培養における藻類と細菌の共生の進化
3. 学会等名 第54回 日本原生生物学会大会
4. 発表年 2021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会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本彩加、佐野明子、佐藤康、中島敏幸
2. 発表標題 光条件が藻類と繊毛虫の細胞内共生の進化と安定性に及ぼす影響:実験進化によるアプローチ
3. 学会等名 日本原生生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島敏幸
2. 発表標題 生命システムとして生態系とその進化
3. 学会等名 生物学基礎論研究会（招待講演）
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------