

令和 6 年 9 月 2 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15148

研究課題名（和文）細胞内共生藻の光合成産物供給が宿主の性質に与える影響の解析

研究課題名（英文）The effects of photosynthetic product supply from endosymbiotic algae on host characteristics

研究代表者

柴田 あいか（Shibata, Aika）

筑波大学・下田臨海実験センター・研究員

研究者番号：50822847

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）：ミドリゾウリムシ共生藻の一つである*Chlorella variabilis*にエレクトロポレーション法を用いて物質導入を試みた。薬剤耐性入りのプラスミドを一過的に導入することに成功したが、永続的に形質転換する条件を見つけるに至らなかった。また、タンパク質RNA複合体を導入しCRISPR/CAS9によるゲノム編集の条件検討を行った。

また、ミドリゾウリムシの光運動反応を観察し、共生藻を持つときにのみミドリゾウリムシは青色光から緑色光に反応して遊泳速度を低下させることを観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミドリゾウリムシとその共生藻は、魅力的な共生系の研究材料であるが、遺伝子導入系がなく分子生物学的解析が遅れているという点が研究の障壁となっている。そこで、研究ツールを増やし実用段階にしようと試みた。これらの実用化まで至らなかったが、今後検討すべき課題が明らかになった。

ミドリゾウリムシの光反応については以前から研究されてきたが、今回新たに遊泳速度の低下と細胞の運動停止について詳細に観察を行った。これにより明瞭で定量可能な光反応が観察されたため、ゾウリムシの光受容体研究や運動メカニズムの研究の一つの足掛かりになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We attempted to introduce substances into *Chlorella variabilis* cells, one of the symbiotic algae of *Paramecium bursaria*, using electroporation method. Although we succeeded in transiently introducing a plasmid containing a drug resistance genes, we could not obtain permanently transformed cells. We also introduced protein-RNA complexes and examined the conditions for genome editing by CRISPR/Cas9.

We also observed the photoreaction of *P. bursaria*. *P. bursaria* with symbiotic algae responded to blue to green light and decreased their swimming speed, which was not observed in *P. bursaria* without symbiotic algae.

研究分野：細胞生物学

キーワード：共生 ゾウリムシ 緑藻 光運動反応

1. 研究開始当初の背景

ミドリゾウリムシの細胞内に共生する共生藻は、光合成産物の一部を宿主に供給するという性質を持っているが、宿主の増殖に共生藻は必須ではない。しかし、宿主であるミドリゾウリムシは共生藻の有無によって性質を変えることから、この共生関係において光合成産物はエネルギー源としてではなく宿主と共生藻の間でのコミュニケーション物質として働いていると予想される。そこで、光合成産物を放出しない共生藻変異株を作出し宿主に再度共生させ、その増殖や行動、遺伝子発現を解析することで、共生関係における光合成産物の役割を明らかにする。

2. 研究の目的

真核光合成生物は葉緑体から光合成産物を受け取ることで生長する。しかし、葉緑体が成立する過程において、いつ、どのように光合成産物の供給機構が獲得されたのか明らかにされていない。そこで、光合成共生体を持つ現存の共生生物の光合成産物供給を調べることで、その発達過程を予想する。

細胞内に共生藻をもつゾウリムシであるミドリゾウリムシを材料として使用し実験を行う。ミドリゾウリムシは共生藻を除去することが可能であり、共生藻を失ったミドリゾウリムシは運動などの性質が変化することが知られている。ミドリゾウリムシ共生藻を単離し光合成産物放出能欠損変異株を作出した後、宿主に入れ戻しその時のミドリゾウリムシの性質を調べること、ミドリゾウリムシの共生関係において光合成産物の供給がどのような役割を持つのかを知る。

3. 研究の方法

ミドリゾウリムシの共生関係においてマルトースは、共生藻から宿主へ送られる唯一の有機物である。そのため、マルトースの放出を停止することは光合成産物の供給の停止を意味する。そこで本研究においては、マルトースを放出しない共生藻株を作出し、その変異株を宿主に再共生させた時におこる共生関係の変化について調べるために以下の方法を用いた。

非共生型緑藻のいくつかの種では形質転換法が開発されており CRISPER/Cas9 によるゲノム編集も報告されている。しかし、ミドリゾウリムシの共生藻 *C. variabilis* では未だ形質転換法もゲノム編集法も確立されていない。そこで、共生藻を形質転換し CRISPER/Cas9 によるゲノム編集を試みた。また同時に、遺伝子導入を伴わないリコンビナント Cas9 タンパク質と gRNA の複合体の細胞質導入によるゲノム編集を試みた。葉緑体から細胞質へマルトースを輸送する輸送体 (MEX) と、マルトースを生成する α -アミラーゼを標的遺伝子として破壊し、マルトースを放出しない共生藻株を作出することを目指した。

ミドリゾウリムシは共生藻の有無によって宿主の光反応運動が変化する。この現象には共生藻の光合成産物がシグナルとして関与していると予想される。そこで、ミドリゾウリムシと共生藻を除去したミドリゾウリムシの光運動反応を様々な光条件下で比較した。

4. 研究成果

エレクトロポレーション法を用いた共生クロレラへの物質導入の検討では、蛍光物質 (FITC-デキストラン) の導入や線状化したプラスミドを導入することで Paromomycin に対する一過的な耐性を持たせることに成功したが、薬剤耐性は継代培養とともに失われ永続的に形質転換した共生藻株を得ることはできなかった。PCR で確認したところ薬剤耐性遺伝子が細胞の増殖にともなって複製されていないことが確認された。

次に DNA の導入が困難なことからリコンビナント Cas9 タンパク質/ガイド RNA 複合体を導入することによるゲノム編集実験系の構築を試みた。Adenine phosphoribosyltransferase 遺伝子をターゲットとし、ノックアウト株を 2-Fluoroadenine によって選抜する方法を試したが、ノックアウト株を得るには至らず薬剤選抜の方法に改良が必要であると考えられた。

また同時に、ミドリゾウリムシ宿主の光運動反応を共生クロレラが制御するメカニズムについて明らかにするため、ミドリゾウリムシの光運動反応を観察した。共生クロレラを持つときのみミドリゾウリムシは青色から緑色の光に反応して遊泳速度の低下を示した。この反応が起こるときの繊毛の動きを観察し、また宿主の持つ光受容体様遺伝子のノックダウンを試みたがこの反応の詳細を解析するには至っていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 柴田あいか	4. 巻 55
2. 論文標題 ミドリゾウリムシとその共生藻における光合成産物輸送と光運動反応について	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 57-60
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柴田あいか、野間泉、松川将之、高橋文雄、笠原賢洋
2. 発表標題 共生藻によるミドリゾウリムシ光運動反応制御
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Aika Shibata, Izumi Noma, Masayuki Matsukawa, Fumio Takahashi, Masahiro Kasahara
2. 発表標題 Symbiotic chlorella controls swimming speed of the host cell in the photo-accumulation response of Paramecium bursaria
3. 学会等名 The 4th Asian Congress of Protistology（国際学会）
4. 発表年 2021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
---------	---------