

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32659

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657165

研究課題名(和文)真核生物の食作用の起源

研究課題名(英文)Origin of phagocytosis in eukaryotic cells

研究代表者

山岸 明彦 (Yamagishi, Akihiko)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：50158086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物は古細菌を宿主として、真正細菌が細胞内共生して誕生したと考えられている。真核生物細胞は原核生物とは異なった特徴を多く持つが、それらの特徴が何に由来するか多くの未解決の問題がある。真核生物の食作用の起源が、古細菌における細胞骨格関連タンパク質にあるのではないかと、分子系統解析結果があるが、これまで原核生物における食作用は見いだされていない。我々は古細菌 *Thermoplasma acidophilum* の超薄切片電子顕微鏡によって、食作用の可能性のある画像を得た。電子顕微鏡連続切片観察、共焦点顕微鏡観察を行う事から、*T. acidophilum* が食作用を持つ可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Eukaryotic cell has been originated by the endosymbiosis of eubacteria forming organelle in an archaeobacterial host cell. Though the eukaryotic cells have characteristics unique to eukaryotes, the origin of these unique characteristics has not been elucidated. Phylogenetic analysis revealed that the origin of the phagocytosis is related to the homolog of cytoskeleton found in archaeobacteria. However, phagocytosis has never been found in prokaryotic cells. We have recently observed the characteristics suggesting the possible phagocytosis in cellular structure of an archaeon *Thermoplasma acidophilum*. In this work we have constructed 3D structures of the cells from continuous micrographs of ultrathin sections and analyzed the structure with confocal laser microscope, suggesting the phagocytosis in the archaeon.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：Thermoplasma T. acidophilum 食作用 真核生物 古細菌 細胞共生説 電子顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 真核生物は古細菌を宿主として、真正細菌(プロテオバクテリア)が細胞内共生して誕生したと理解されている(Margulis, et al. 1997)。しかし、宿主となった古細菌の種類、プロテオバクテリア以外の細菌の寄与など、多くの未解決の問題がある。真核生物の特徴を説明するためのいくつかの仮説が提唱されている(例えば Yutin et al. 2009, 山岸 2009 参照)。何れの仮説にせよ、真核生物の様々な特徴は、細菌が古細菌に由来を見つけないことが可能なはずであるが、未だに真核生物の様々な特徴の起源が不明である。

(2) 我々は以前、古細菌の一種 *Thermoplasma acidophilum* に真核生物アクチンの祖先 Ta0583 を発見して報告した(Hara et al. 2005, 亀井と山岸 2008)。また真核生物の食作用に關与する真核生物タンパク質 Arp2 と Arp3 がアクチンホモログであり、これらも Ta0583 と系統樹上近い関係にあることが報告された(Yutin et al. 2009)。われわれは、最近 *T. acidophilum* の食作用と思われる超薄切片電子顕微鏡画像を得ることに成功した。本研究計画では、電子顕微鏡連続切片法、蛍光顕微鏡を用いて、*T. acidophilum* の食作用の観察を行った。

### [参考文献]

1. Margulis, L. et al. 1997, *Five Kingdoms*. W.H. Freeman & Company
2. Yutin, M. Y. ., et al. *Biology Direct* 2009, **4**, 9 (2009).
3. 山岸明彦. 蛋白質核酸酵素 **54**, 108-113 (2009)
4. Hara, F. et al.. *J. Bacteriol.* **189**, 2039-2045 (2007)
5. 亀井綾美、山岸明彦.蛋白質核酸酵素 **53**, 1759-1764 (2008)

## 2. 研究の目的

(1) 真核生物の食作用の起源が、古細菌における細胞骨格関連タンパク質にあるのではないかという、分子系統解析結果があるが、これまで原核生物における食作用は見いだされていない。我々は古細菌 *Thermoplasma acidophilum* の超薄切片電子顕微鏡によって、食作用の可能性のある画像を得た。電子顕微鏡連続切片観察、共焦点顕微鏡観察を行う事から、*T. acidophilum* が食作用を持つかどうか、關与するタンパク質に關して明らかにする事を目的とした。

(2) 真核生物は、原核生物(細菌と古細菌)に比べて、細胞の体積が約 1000 倍、ゲノムが約 1000 倍であり、核、ミトコンドリア、葉緑体、ゴルジ体、液胞等のオルガネラや細胞内膜系を持っている。これらの内、ミトコンドリアや葉緑体の起源は明らかであるが、その他の細胞内膜系の起源や、様々な特徴的

機構(食作用、細胞運動等)の起源は不明である。

申請者は最近、古細菌 *T. acidophilum* の超薄切片電子顕微鏡観察を行っている過程で、奇妙な構造を発見した。その構造は、細胞内部にさらに別の細胞が入っている様に見える。超薄切片では断面を観察するため、一枚の画像からその立体構造を推定することは容易ではない。しかし、多くの切片の観察から、こうした構造が多数観察されること、取り囲む過程の時系列とみることも可能な形態の画像が観察されること、内部に見られる構造の膜が消失しているものが有ること、が明らかとなった。これらの画像を総合的に判断するなら、細胞内部に別の細胞が入り込んでおり、中には消化されているものもあるかも知れないと推定された。しかし、これらの写真は、細胞断面の寄せ集めにすぎない。そこで、実際に食作用が起きていることを確認するために、1)連続切片による立体画像を得て、細胞構造を明らかに示すこと、2)蛍光顕微鏡を用いて、他の創造物を取り込んでいることを明らかにする実験をおこなった。

## 3. 研究の方法

### (1) 電子顕微鏡連続超薄切片観察

古細菌 *Thermoplasma acidophilum* を培養、集菌、固定し、超薄切片の作製(Yasuda et al. 1995)を行った。連続切片として電子顕微鏡観察を行った。連続切片画像をソフトウェア Delta Viewer を用いて 3D 画像とした。

### (2) 共焦点蛍光顕微鏡を用いた観察

共焦点顕微鏡を用いて、食作用の観察をおこなった。*Thermus thermophilus* の培養細胞から抽出した脂質(Shimada et al 2011)あるいは、DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholine)でリポソームを作製し、リポソーム内に赤色蛍光色素(量子ドット)を取り込ませた(Shimada and Yamagishi 2011)。

*T. acidophilum* の培養細胞を液体培地に植菌し、量子ドットを取り込ませたりポソームを添加、56 (*T. acidophilum* の至適生育温度)で3日保温した。培養菌液に SYBR Green I (緑色蛍光)を添加し 56 で5分間染色した。染色後、溶液と等量の 1.5%アガロースを混合しスライドガラスに塗布した。プレパラートを共焦点レーザー顕微鏡(Olympus Fluoview FV1000)で観察を行った。

### [参考文献]

1. Yasuda, M., et al. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3482-3485 (1995)
2. Shimada, H., et al. 2002, *J. Bacteriol.* **184**, 556-563 (2002)
3. Shimada, H. and Yamagishi, A.. *Biochemistry*, **50**, 4114-4120 (2011)
4. Hara, F. et al.. *J. Bacteriol.* **189**, 2039-2045 (2007)

#### 4. 研究成果

##### (1)透過型顕微鏡による 3D 構造の観察

*T. acidophilum*の特徴の1つとして巨大細胞の存在が挙げられる。以前、弘前大学の高橋元教授との共同研究により、本研究室では走査電子顕微鏡により、巨大細胞と思われる細胞の写真の撮影に成功していた。今回、透過型電子顕微鏡を用いて、巨大細胞と思われる像を捉えることができた。以前の、走査型電子顕微鏡による観察からは巨大細胞は中身の詰まった細胞構造であると推定していた。しかし今回の透過型電子顕微鏡による細胞像から巨大細胞内部に多数の液胞状の構造が観察された。つまり、いままで細胞が細胞同士吸着して、巨大細胞を形作ると推定していたが、別の方法によって形成されることが考えられた。

とりわけ、こうした細胞の液胞内に他の細胞を包み込むような細胞像が得られた。中には、内部の細胞にはっきりとした細胞膜を観察することができない像もある。このような構造はサーモプラズマが真核生物の行なうような食作用を行なっている可能性が考えられる。

そこで、菌体の連続切片を作製して観察を行なった。

##### 球形細胞の観察

まず三次元構造を形成するにあたり、基本である球体の細胞像を構築することにした。この立体画像構築にあたり、安田らが観察した H051 株の SEM (走査型電子顕微鏡) 写真による細胞像を参考にした。この SEM 写真で観察した H051 細胞体は球体であった。観察された直径 1 $\mu$ m の細胞体を中心に周りの特徴ある形状の細胞体を手がかりに細胞像を集め、Delta Viewer に取り込み、コントラストの調整、SEM 写真を参考にした位置合わせの後三次元の構築をした。切片自身 ultra microtome での切削時に厚さを設定できるがエポキシ樹脂自身水分を吸うため空気中の湿度などで樹脂の膨張率が常に変化する。そのため、機械に切削の細かい厚さを指定したとしてもその値の切片が得られるとは限らない。そのため、厚さは通例切片に光を当て、切片からの反射によられる色の波長により判断する。また、連続切片から構築する細胞構造を SEM により観察された球形細胞像と比較することにより 3D 構築の奥行きを設定する指標とした。この連続切片では厚さは 90~150nm と推定された。電子顕微鏡画像は静止画に変換した後、Image J に取り込み pixel で長さを測った。Delta Viewer で Scale images の Z (Depth) Scale Factor を 2.5 に設定することから最適な 3D 画像を得ることができた。

##### 細胞を包み込む細胞の観察

ついで、液胞内で他の細胞を包み込むような細胞体が含まれた連続切片群の写真をも

とに 3D 画像を作成した。その結果、球形の細胞が、他の細胞体により囲まれていると思われる構造が観察された。

##### (2)共焦点レーザー顕微鏡による観察

蛍光色素を含むリポソームを *T. acidophilum* 培養液中に添加し、保温の後、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。

まず、リポソームの作成を行った。リポソームは、*Thermus thermophilus* の培養細胞から抽出した脂質あるいは、DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholine) で作製した (Shimada et al 2011)。ついで、リポソーム内に赤色蛍光色素 (量子ドット) を取り込ませた (Shimada and Yamagishi 2011)。

*T. acidophilum* の培養細胞を液体培地に接種し、量子ドットを取り込ませたりポソームを添加、56 (*T. acidophilum* の至適生育温度) で 3 日保温した。培養菌液を採集し、SYBR Green I を添加して 56 で 5 分間染色した。染色後、溶液と等量の 1.5% アガロースを混合しスライドガラスに塗布した。プレパラートを共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus Fluoview FV1000) で観察を行った。

培養液中には、多数の *T. acidophilum* 細胞が緑色の蛍光を発する球状の構造として観察された。細胞の中には、内部に赤色の蛍光を発するものがあつた。おそらく、緑色に染色をした *T. acidophilum* 細胞が、赤色に染めたりポソームを補食していると推定できる。

(3)古細菌一般には、真正細菌同様に細胞壁をもっているために、食作用をしめすことは容易に想像できない。しかし、古細菌のなかでも *Thermoplasma* 属は細胞壁を持たない。そこで我々は以前より、*Thermoplasma* 属古細菌が真核生物の細胞骨格関連現象の手がかりを今ものこしているのではないかと推定して、本菌の細胞骨格関連遺伝子、及び細胞内構造の研究を行ってきた (Hara et al. 2007)。電子顕微鏡画像は *Thermoplasma* の菌株のなかでも我々が以前、箱根大涌谷で採集した本研究室だけが保有する菌株 (Yasuda et al. 1995) で観察された画像である。これまで、原核生物に起きる食作用の観察は皆無であり、本研究で得られた結果は学会発表で大きな反響を得た。今後、論文発表を行う予定であるが、さらに大きな世界的反響が予想される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

- 1 船木健司、松本翼、山岸明彦、好熱好酸性古細菌サーモプラズマ細胞の立体構造、生命の起原および進化学会第 38 回学術講演会、2013/3、福岡

〔図書〕(計 1 件)

- 1 横堀伸一、山岸明彦、第 12 章 真核生物(真核細胞)の誕生(2013) p. 156-168  
山岸明彦編集、「アストロバイオロジー」  
化学同人

〔その他〕

ホームページ等

- 1 . 山岸 明彦監修 生命の起源かるた  
[https://www.facebook.com/karuta.origino  
flife](https://www.facebook.com/karuta.originoflife)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山岸 明彦 (YAMAGISHI, Akihiko) 東京薬  
科大学・生命科学部・教授

研究者番号：5 0 1 5 8 0 8 6