

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770228

研究課題名(和文) 二次共生成立に関する遺伝子と遺伝子産物の網羅的解析

研究課題名(英文) Comparison of gene expression and gene products related to establish secondary endosymbiosis

研究代表者

児玉 有紀 (KODAMA, Yuki)

島根大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：80582478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：繊毛虫ミドリゾウリムシの細胞内には約700個のクロレラが共生している。本研究課題は、二次共生成立に関する遺伝子と遺伝子産物を網羅的に解析することを目的として行った。クロレラが共生前後の細胞からRNAを抽出し、Illumina HiSeq2000によるシーケンスをおこなった。その結果、クロレラとの共生による宿主側の遺伝子発現の変化が初めて明らかになった。発現が変化する遺伝子数は6,698であり、その中には、ストレスタンパク質遺伝子や抗酸化作用をもつグルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子などが含まれていた。さらに、細胞内共生成立機構に関する細胞生物学的なデータをいくつか得た。

研究成果の概要(英文)：Paramecium bursaria cells harbor about 700 of symbiotic Chlorella spp. in their cytoplasm. The purpose of this research project was an comparison of gene expression and gene products related to establish secondary endosymbiosis. We have undertaken Illumina deep sequencing of mRNAs prepared from symbiont-bearing and symbiont-free P. bursaria cells. Then, we compared gene expressions of symbiont-bearing and symbiont-free P. bursaria to elucidate the genetic control for establishment of secondary symbiosis. Of the 10,557 transcripts, 6,698 were significantly differentially expressed between symbiont-bearing and symbiont-free cells. In these genes, heat shock 70 kDa protein and glutathione S-transferase were included. Furthermore, we have gotten some biological data about the mechanism of the establishment of endosymbiosis.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・進化生物学

キーワード：細胞内共生 ミドリゾウリムシ クロレラ 進化

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアや葉緑体を生み出した細胞内共生は現在でも多くの生物同士で見られ、新たな機能と構造の獲得による環境適応能力の増強と進化の原動力となっている。共生体を持つ生物は、地球上の至る所に生息しているが、細胞内共生成立の分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。その最も大きな原因は、ほとんどの細胞内共生生物においては、互いの存在が生存に不可欠なまでに宿主と共生体の一体化が進み、再共生の誘導実験が困難なためである。この点を解決できるのが、繊毛虫のミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) である。ミドリゾウリムシは細胞内に約 700 個の共生クロレラを保持している。各クロレラは宿主の食胞膜由来の perialgal vacuole (PV) 膜と呼ばれる共生胞に包まれている。PV 膜には宿主のリソソームが融合しない。ミドリゾウリムシとクロレラは相利共生の関係にあるが、まだ互いの存在が生存に必須な状態ではなく、ミドリゾウリムシからのクロレラの除去や再共生が可能である。これは、両者の関係が二次共生による新たな真核細胞誕生の初期段階にあることを示している。それだけではなく、宿主と共生体はそれぞれを大量に培養し、混合によって容易に二次共生を誘導することができる。これらの理由からミドリゾウリムシは細胞内共生成立のメカニズム解明のモデル材料になると 50 年以上前から考えられてきた。しかし、この材料を使った二次共生の研究はほとんど進展していなかった。

研究代表者らはクロレラ除去細胞に共生クロレラをパルス的に与え、洗浄してチェイスする方法を初めてこの系に導入し、クロレラの再共生過程を明らかにした。さらに、二次共生成立に必須の 4 つのプロセスの存在が明らかになり、二次共生成立の分子機構解明の突破口を開くことができた。クロレラの再共生過程は「細胞内共生を成立させるクロレ

ラは、アシドソーム融合後にリソソーム融合前の食胞から脱出して出現し、PV 膜に包まれる」という Meier and Wiessner (1989) の結果が定説であったが、研究代表者らは細胞内共生を成立させるクロレラは、アシドソームとリソソームが融合した後の食胞から出現することを明らかにした (Kodama and Fujishima, 2005)。このクロレラの宿主リソソーム酵素の回避の方法は、これまでに知られてきたどの寄生性および共生性生物とも異なる新規なものであった (Kodama and Fujishima, 2005)。

## 2. 研究の目的

研究代表者らの研究は、細胞内共生の研究を、従来の真核細胞の進化のルーツを探る研究から細胞内共生成立の分子機構解明の研究へ転換させることを可能にした。二次共生の成立機構解明の研究は、研究代表者らを含む少数の研究グループで始まったばかりであるが、二次共生を多数の細胞に同調して誘導し、時間経過に伴う変化を追跡できる実験系は、現在はこのミドリゾウリムシ以外には存在しない。本研究では、二次共生成立の分子機構を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

次世代 DNA シーケンサーのイルミナ HiSeq2000 を用いた cDNA の大量解読で、細胞内共生成立に関わるミドリゾウリムシとクロレラの遺伝子を mRNA の網羅的比較で特定する。クロレラの維持および再共生成立に関与すると予測される mRNA の発現時期を FISH で調べ、その遺伝子産物の量的変化と細胞内局在性をモノクローナル抗体で解析する。

最初に、共生クロレラの有無によってミドリゾウリムシが合成する mRNA の違いを比較する。また、細胞内共生中のクロレラと宿主外培養したクロレラが合成する mRNA の違いを比較し、細胞内共生の維持に関与するクロ

レラの遺伝子と遺伝子産物を同定する。次に、パルスラベルとチェイスの方法で再共生を同調して進行させ、前述の4つのプロセスの各段階でクロレラとミドリゾウリムシの双方の mRNA の合成の変化を比較する。二次共生の同調誘導は、ミドリゾウリムシでのみ可能な実験で、研究代表者らが最適条件を開発した (Kodama and Fujishima 2005)。

cDNA の作成とイルミナ解析は研究協力者の基礎生物学研究所の重信秀治特任准教授と、研究協力者の山口大学の藤島政博教授の研究室で行う。基礎生物学研究所の設備の利用許可は 2011 年 4 月に採択済みである。

#### 4. 研究成果

平成 24 年度

- (1) クロレラの再共生過程におけるクロレラの細胞分裂の開始時期を明らかにした。さらに、クロレラの細胞分裂に与える宿主の餌の有無の影響を調べた結果、共生が成立して72時間以内には、PV膜を介した宿主とクロレラの物質交換が可能になることが明らかになった。
- (2) クロレラは宿主細胞表層直下のどの部分にも均等に接着しているのではなく、宿主の背側・腹側、後端、前端の順に接着しやすく、この逆の順に外れやすいことが明らかになった。
- (3) クロレラが共生している状態のミドリゾウリムシとクロレラを除去したミドリゾウリムシからRNAを抽出し、それぞれの cDNA ライブラリを作成し、Illumina HiSeq2000によるシーケンスをおこなった。Biological replicatesのシーケンスのデータも含めて3回のシーケンスのデータ解析を行い、DDBJへの登録作業を行った。

平成 25 年度

- (1) 細胞を高速で遠心することで、細胞表層直下に接着している共生クロレラの離脱と各種細胞内器官の細胞内分層化を誘導する条件を開発した。さらに、クロレラの離脱後は宿主の原形質流動速度が速まり、クロレラはその流れに乗って遠心後 10 分以内に表層への再接着を完了させることが明らかになった。この再接着の現象はノコダゾールで阻害された。
- (2) クロレラが共生前後の細胞から RNA を抽出し、Illumina HiSeq2000 によるシーケンスをおこなった結果、クロレラとの共生による宿主側の遺伝子発現の変化が初めて明らかになった。発現が変化する遺伝子数は 6,698 であり、その中には、ストレスタンパク質遺伝子や抗酸化作用をもつグルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子などが含まれていた。

#### 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)

[雑誌論文](計6件)

Y. Kodama, H. Suzuki, H. Dohra, M. Sugii, T. Kitazume, K. Yamaguchi, S. Shigenobu, and M. Fujishima:  
Comparison of gene expression of *Paramecium bursaria* with and without *Chlorella variabilis* symbionts. BMC Genomics, 15:183, 2014. Doi: 10.1186/1471-2164-15-183 (YK and HS, equal contributors)

査読有

Y. Kodama and M. Fujishima:  
Synchronous Induction of Detachment and Reattachment of Symbiotic

*Chlorella* spp. from the Cell Cortex of the Host *Paramecium bursaria*. Protist, Vol. 164, 660-672, 2013. Doi: 10.1016/j.protis.2013.07.001

査読有

Y. Kodama: Localization of attachment area of the symbiotic *Chlorella variabilis* of the ciliate *Paramecium bursaria* during the algal removal and reinfection. Symbiosis, Vol. 60, 25-36, 2013. Doi: 10.1007/s13199-013-0233-3

査読有

Y. Kodama and M. Fujishima: Cell division and density of symbiotic *Chlorella variabilis* of the ciliate *Paramecium bursaria* is controlled by the host's nutritional conditions during early infection process.

Environmental Microbiology, Vol. 14(10), 2800-2811, 2012. Doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02793.x

査読有

Y. Kodama and M. Fujishima: Characteristics of the digestive vacuole membrane of the alga-bearing ciliate *Paramecium bursaria*. Protist, Vol. 163, 658-670, 2012.

Doi:10.1016/j.protis.2011.10.004

査読有

M. Fujishima and Y. Kodama: Endosymbionts in *Paramecium*. European Journal of Protistology, Vol. 48, 124-137, 2012. Doi:

10.1016/j.ejop.2011.10.002

査読無

[学会発表](計10件)

児玉有紀、藤島政博 「繊毛虫ミドリゾウリムシと緑藻クロレラの細胞内共生」(日

本生態学会第61回全国大会、広島国際会議場、2014年3月18日、口頭発表)

Y. Kodama “Endosymbiosis between the ciliate *Paramecium bursaria* and *Chlorella* spp.” (International Symposium on Endosymbiosis, Yamaguchi 2013, 山口大学、2013年12月20日、口頭発表) 招待講演

荒木創太郎、児玉有紀 「繊毛虫ミドリゾウリムシの共生クロレラの感染能について」(第46回日本原生動物学会大会、広島大学、2013年11月10日、口頭発表)

児玉有紀、藤島政博 「ミドリゾウリムシの細胞表層直下に存在する共生クロレラの離脱と再接着の同調誘導」(日本動物学会 第84回大会、岡山大学、2013年9月28日、口頭発表)

M. Fujishima, C. Morikawa, H. Fujise, T. Kaya, K. Iwatani, K. Tanaka, M. Nakamura, and Y. Kodama “Infection process of endonuclear symbiotic bacteria *Holospira* species to the ciliate *Paramecium caudatum*.” (XIVth International Congress of Protozoology,バンクーバー、カナダ、2013年8月2日、口頭発表)

Y. Kodama and M. Fujishima “Synchronous induction of detachment and reattachment of symbiotic *Chlorella* spp. from the cell cortex of the host *Paramecium bursaria*.” (XIVth International Congress of Protozoology,バンクーバー、カナダ、2013年8月2日、口頭発表)

児玉有紀 「繊毛虫ミドリゾウリムシと緑藻クロレラの細胞内共生」共生とは何か？～微生物相互作用からオルガネラまで～（第28回日本微生物生態学会大会、豊橋技術科学大学、2012年9月22日）招待講演

児玉有紀 「ミドリゾウリムシの共生クロレラの宿主細胞表層直下への接着について」（日本動物学会 第83回大会、大阪大学、2012年9月15日、口頭発表）

児玉有紀 「繊毛虫ミドリゾウリムシと共生クロレラとの細胞内共生成立機構の解明」（第17回日本光生物学協会年会、大阪大学、2012年8月18日、口頭発表）招待講演

児玉有紀、藤島政博 「ミドリゾウリムシの共生クロレラの接着領域の局在性について」（生物系三学会中国四国支部大会、島根大学、2012年5月13日、口頭発表）

〔図書〕(計1件)

M. Fujishima and Y. Kodama: Insights into the *Paramecium-Holospora* and *Paramecium-Chlorella* symbioses. In, *Cilia/flagella and ciliates/flagellates*, (Eds.) Hausmann K., Radek R., Schweizerbart Science Publisher, Stuttgart, pp. 203-227, 2014. ISBN 978-3-510-65287-7

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

児玉研究室

[http://accaff.e.jp/kodama\\_lab\\_jpn/](http://accaff.e.jp/kodama_lab_jpn/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児玉 有紀 (KODAMA, Yuki)

島根大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号: 80582478

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: