

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 19 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440240

研究課題名(和文)人工生態系を用いた藻類と原生動物間の細胞内共生の初期過程の解析

研究課題名(英文) Experimental analysis of an early stage of endosymbiosis between an alga and a protozoon using a synthetic microbial ecosystem

研究代表者

中島 敏幸 (Nakajima, Toshiyuki)

愛媛大学・理工学研究科・教授

研究者番号：70314945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ある種の単細胞生物が他の種の細胞内に入り代謝し、宿主細胞の増殖に合わせて増殖し、共に生きていくことは“細胞内共生”と呼ばれ、その進化は進化的イノベーションとして広く認知されている。私たちは、藻類(Micractinium sp.)・細菌(Escherichia coli)・原生動物(Tetrahymena thermophila)から構成される人工生態系を作成し、共生の進化過程を直接観察し、その過程を解析するという前例のない実験を開始した。培養は既に10年経過した。本研究では、この系において“藻類と原生動物間の細胞内共生”と“藻類と細菌の間の細胞外共生”が進化していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Endo-symbiosis is widely recognized as a process generating evolutionary innovation, in which unicellular organisms of a particular species live within, i.e., metabolize and propagate synchronically with a host cell of a different species. We conducted an unprecedented experiment of a long-term culture of a green alga (Micractinium sp.), a bacterium (E. coli), and a ciliate (Tetrahymena thermophila), in order to observe directly the evolution of component species in the culture. In this study, we revealed that a primitive form of endo-symbiosis between the alga and the ciliate, and also ecto-symbiosis between the alga and the bacterium, evolved in the long-term culture.

研究分野：進化生態学

キーワード：細胞内共生 マイクロコズム 実験進化

## 1. 研究開始当初の背景

ある種の単細胞生物が他の種(単細胞・多細胞生物)の細胞内に入り代謝し、宿主細胞の増殖に合わせて増殖し、共に生きていくことは“細胞内共生”と呼ばれ、その進化は進化的イノベーションとして広く認知されている。これまで、原生物/動物/植物と細菌/藻類/藍藻との間で既に共生が進化した生物を用いて共生関係の分子・生理・生態・進化が解析されてきた。しかし、共生関係にない生物種間において共生が進化する過程は不明である。この過程は、既存の生物種の間を解析することによって明らかにすることが不可能であるという方法論的な限界によって、ほとんど明らかにされていない状況にあった。

この問題に対し研究代表者等は、本研究に先立ち、藻類(*Micractinium* sp.)・細菌(*Escherichia coli*)・原生動物(*Tetrahymena thermophila*)から構成される人工生態系(“CET マイクロコズム”)を作成し、共生の進化過程を直接観察し、その過程を解析するという前例のない実験を開始した。本研究の開始時点では、この実験培養は既に約10年経過し、個体群動態の調査、および構成種の分離・凍結保存がなされていた。しかし、分離された構成種の特長や共生関係の解析はなされていなかった。

## 2. 研究の目的

これまでの研究から、CET マイクロコズムにおいては、様々な種間関係の進化が起こっており、“藻類と原生動物間の細胞内共生”という一つの種間関係の進化は、生態系全体の挙動や他の種間関係の進化との関連において適切に理解できることが示唆された。言い換えると、藻類と原生動物間の細胞内共生の進化過程には、その背後に藻類と細菌間の細胞外共生の進化が密接に関連していることが推測される。したがって、本研究では、生態系における共生の進化という一般的な視点から、以下の3つの問題を解決することを目的とした。



図1 CET マイクロコズム

### (1) 藻類の二分化

藻類(以下、*Micractinium*)は、原生動物(以下、*Tetrahymena*)との細胞内共生を進化させる方向と、細菌(以下、*E. coli*)と細胞外共生を進化させる方向へと二分化の進化を起こしたという仮説を検証する。

### (2) 取り込み率と排出率の進化

CET マイクロコズムの中では、*Micractinium* 細胞は *Tetrahymena* の中に取り込まれ、また排出されていると考えられる。そこで、細胞内共生の進化の特性の一つとして、長期培養後の分離株同士では、祖先株同士と比べ、取り込み率と排出率は変化しているのかを明らかにする。さらに、*Tetrahymena* による *E. coli* の利用能力に変化が見られるかも明らかにする。

### (3) ホスト内の藻類フリーライダー

*Micractinium* 細胞は全て宿主の生存率を高めるのか、それとも利益を与えないフリーライダーが存在するのかを、培養10年後の *Tetrahymena* 1細胞内から分離した藻類株(8株)を解析することによって、明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 藻類の二分化

共生関係にない藻類祖先株(クローン)から繊毛虫と細胞内共生関係を持つタイプが進化したかを明らかにするために、1つの藻類株(祖先株、分離株)と *Tetrahymena* 分離株(培養開始約7年後に分離した株 TC20)とを混合し、細菌無しの条件で共培養し、*Tetrahymena* の数の変化を調べた。また、藻類の各株が細胞集塊(*E. coli* と細胞外共生を形成するうえで重要な性質)の形成能を持つか否かを調べるために、*Micractinium* 各株を単独培養し、培養サンプルを顕微鏡下で写真撮影して細胞集塊のサイズ分布を求めた。

さらに、細胞集塊を形成する分離株と非形成株の競争的優位性を調べるために、両者を *E. coli* 存在下および非存在下の各条件で共培養し、両者の数の変化を調べた。温度および培地成分は CET マイクロコズムと同じ条件で行った。

### (2) 取り込み率と排出率の進化

培養5~8年目の CET マイクロコズムから分離された5株の *Tetrahymena* (分離時に細胞内に藻類を保持していた *Tetrahymena* 細胞に由来する TC20、TC21 と藻類を保持していなかった細胞に由来する TN1、TN3、TN7) と2株の *Micractinium* の分離株 (*Tetrahymena* 細胞内より分離された SC9-1、SC10-2)、CET マイクロコズム作成時に使用した *Tetrahymena*、*Micractinium*、*E. coli* の各祖先株を用いて、以下に示す方法で、長期培養前後での *Tetrahymena* による *Micractinium* の取り込み率の変化( )と、*Tetrahymena* の *E. coli* 利用能の変化( )をそれぞれ解析した。

*Tetrahymena* による *Micractinium* 取り込み率の解析：*Tetrahymena* と *Micractinium* の各株を無機塩培地中で混合して共培養系を作製し (n=4)、混合後0分から480分の間

に8回のサンプリングを行った。各サンプルの *Tetrahymena* を計 200 細胞観察して1細胞ごとに含まれる *Micractinium* 細胞数を計数し、*Tetrahymena* の体積あたりの *Micractinium* 細胞密度 (cells/mL) を算出した。その値を *Tetrahymena* 細胞外液中の *Micractinium* 密度 (cells/mL) で割り、初期の値の傾きから取込み率を求め、数理モデル  $dC_{in}/dt = aC_{out} - bC_{in}$  を用いて排出率と保持係数 (取込み率/排出率) を算出した。

*Tetrahymena* の *E. coli* 利用能の解析:*Tetrahymena* 単独条件と、3つの *E. coli* 濃度条件 (低濃度:  $1.0 \times 10^6$  cells/mL、中濃度:  $5.0 \times 10^6$  cells/mL、高濃度:  $1.0 \times 10^7$  cells/mL) で *Tetrahymena* を培養し (n=4)、それぞれの条件における *Tetrahymena* と *E. coli* の密度変化を計測した。そして、*Tetrahymena* の減少率、増殖率および定常期密度を算出した。

### (3) ホスト内の藻類フリーライダー

10年 (3556日) 間培養した CET マイクロコズムから採取した *Tetrahymena* の1つの細胞からそれが保持する全ての藻類細胞を分離した。この分離は4つの *Tetrahymena* 細胞について行ったが、本研究ではそのうちの1つ (D細胞) から分離した8つの *Micractinium* 細胞株 (D1~D8株) を用い、これらが宿主である *Tetrahymena* (培養開始約7年後に分離した株 TC20) に対し生存率を高める利益を与えるか否か、またそれらの増殖特性を比較した。本研究では、8つのD株のそれぞれと細菌の存在しない条件下で *Tetrahymena* との共培養を行い、*Tetrahymena* に対して延命効果を示すか調査した。

## 4. 研究成果

### (1) 藻類の二分化

藻類の形質と繊毛虫への効果を調べた結果、藻類は形質的に *Tetrahymena* に対し延命効果を持つグループ (図2; 数がV字回復する) と持たないグループに分けられること、後者は細胞集塊形成することが明らかになった。この結果は、*Micractinium* 個体群は二分化する傾向を示し、液相 (繊毛虫細胞外) で細菌と共生するタイプ (集塊形成型) と細胞内共生をするタイプ (集塊非形成型) とに分かれることが示している。

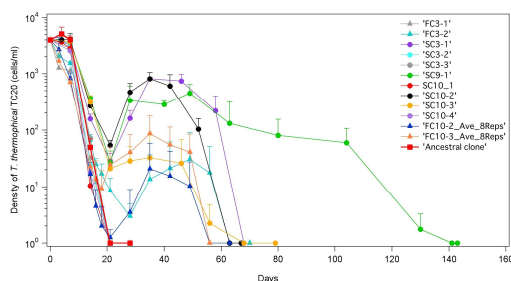


図2 *Micractinium* 分離株の *Tetrahymena* 分離株 (TC20) に対する延命効果

また、両タイプ間の競争実験の結果、液相においては細菌と共生するタイプとの競争が強く働き、これが宿主に利益を与え細胞内に留まる方向に選択圧として働いて、細胞内共生の進化が促進されることが示唆された。

### (2) 取り込み率と排出率の進化

*Micractinium* 祖先株と *Micractinium* 分離株に対する *Tetrahymena* 祖先株の取込み率と保持係数を比較した結果、*Tetrahymena* 祖先株は *Micractinium* 分離株に対して有意に大きな取込み率と保持係数を示した。この結果は、*Micractinium* 分離株が *Tetrahymena* に取り込まれやすく (侵入しやすく) 保持されやすい (留まりやすい) 形質を獲得したと考えられる。*Tetrahymena* 祖先株と *Tetrahymena* 分離株が *Micractinium* 祖先株に示す取込み率と保持係数を比較した結果、取込み率と保持係数のそれぞれで祖先株より有意に大きな値を4つの分離株が示した。また、*Tetrahymena* 祖先株と *Tetrahymena* 分離株が *Micractinium* 分離株に示した取込み率と保持係数を比較した結果、取込み率は分離株の4株、保持係数は分離株の3株で祖先株よりも有意に大きな値を示した。これらの結果は、*Tetrahymena* 分離株には、その祖先株に比べ *Micractinium* (祖先型および分離型) を積極的に取込んだり、保持したりする性質を獲得したものがいることを示している (図3)。さらに興味深いことに、*Micractinium* 分離株はその祖先株よりも *Tetrahymena* 祖先株に高い率で取り込まれることが明らかになった。このことは、*Micractinium* の側も *Tetrahymena* に対し細胞内に入り込みやすい形質を進化させたことを示している (図3)。

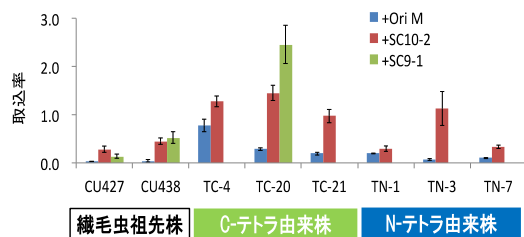


図3 取り込み率の比較

*Tetrahymena* による *E. coli* の利用能力の変化に関しては、分離株の TN1 は単独培養時と *E. coli* 低濃度条件時において減少率が他の株よりも小さく、TC4 と TC20 は *E. coli* 中濃度条件と高濃度条件における増殖率が他の株に比べて高かった。また、*E. coli* 高濃度条件の TN1 と TN7 は定常期密度が他の株よりも大きな値を示していた。TN3 株はいずれの値も *Tetrahymena* 祖先株に近かった。以上のことから、*E. coli* の利用能は TN3 以外の分離株で祖先株よりも向上している傾向が見られた。CET マイクロコズム内は貧栄養状態にあるため、*Tetrahymena* が貧栄養状態で生き残るために資源の利用効率を向上させている可能性が示された。



結論として、細胞内共生関係が進化する初期の過程において、宿主は共生者に対する取り込みを積極的にを行い保持する方向へと進化し、共生者は取込まれやすく、かつ保持されやすく進化していることが明らかになった。また、この時に餌資源（細菌）の利用能も同時に向上する可能性が高いことが示唆された。

### (3) ホスト内の藻類フリーライダー

解析の結果、8つのD株の中で延命効果を示したのは4株、示さなかったのは4株であった(図4)。このことから、細胞内に存在していても全てが利益供与するわけではないことが示唆された。また、生細胞密度や増殖率が低いものは延命効果を示さず、それらの値が高いものは延命効果を示す傾向が見られた。このことから、無機塩培地での増殖と宿主に対する延命効果はトレードオフの関係にないことが示唆された。

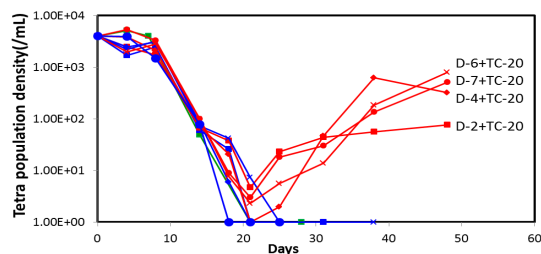


図4 *Micractinium* D株の *Tetrahymena* 分離株 (TC20) に対する延命効果

## 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 2件)

Nakajima, T., Fujikawa, Y., Matsubara, T., Karita, M., Sano, A.  
Differentiation of a free-living alga into forms with ecto- and endosymbiotic associations with heterotrophic organisms in a 5-year microcosm culture. *BioSystems*, 131: 9-21 (2015)、査読有り  
Arno Germond, Masahiro Inouhe & Toshiyuki Nakajima. Effects of acidic conditions on the physiology of a green alga (*Micractinium* sp.) before and after a 5-year interaction with *Tetrahymena thermophila* in an experimental microcosm, *European Journal of Phycology*, 49: 526-537. (2014)、査読有り

[学会発表](計 10件)

中島敏幸、生態系は進化装置：人工生態系の長期培養による解析と展望」, 進化する群集生態学シンポジウム, 京都大学(京都市・左京区) (2015.9.25) (招待講演)  
中島敏幸、藤川佳之、松原俊行. 人工生態系における藻類の分化と共生進化の生態学的機構. 進化学会 (2015年8月, 中央大学(東京都・文京区))

中島敏幸、松原俊之、大西陽一郎、モデル生態系を用いた藻類と繊毛虫の細胞内共生の進化における選択過程の解析: ホストに利益を与える共生藻の選択機構をさぐる、日本原生生物学会 (2014年10.30-11.2 宮城教育大学(宮城県・仙台市))

大西陽一郎・佐野明子・中島敏幸、実験モデル生態系で見る細胞内共生進化の初期過程: 繊毛虫による藻類取込率の変化の解析、日本進化学会(2014年8月(高槻現代劇場(大阪市・高槻))

松浦正幸、藤井陽介、中島敏幸、長期培養モデル生態系における藻類と細菌の共生関係の進化の解析日本進化学会(2014年8月(高槻現代劇場(大阪市・高槻))  
大西陽一郎、中島敏幸、モデル生態系における進化過程: 藻類と原生動物の細胞内共生、生物学基礎論研究会(2014年8月愛媛大学(愛媛県・文京町))

中島敏幸、3種からなるモデル生態系を用いた藻類と繊毛虫の細胞内共生進化の初期過程の解析、日本原生動物学会(2013年9月、広島大学(広島県・東広島市))

大西陽一郎、佐野明子、中島敏幸、長期培養モデル生態系における繊毛虫-藻類間の細胞内共生の初期進化における繊毛虫による藻類の取り込み率の変化、日本原生動物学会(2013年9月、広島大学(広島県・東広島市))

松浦正幸、藤井陽介、中島敏幸、長期培養モデル生態系における藻類と細菌の種間関係の進化、日本原生動物学会(2013年9月、広島大学(広島県・東広島市))  
Nakajima, T. Ecosystem downwardly affects adaptive evolution (ISHPSSB 2013) (2013年7月, Montpellier, France)

[図書](計 1件)

Arno Germond, Toshiyuki Nakajima, Symbiotic associations in ciliates: ecological and evolutionary perspectives. p253-275. In: *Biocommunication of Ciliates*; Ed. Guenther Witzany), Springer. (2016)

[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 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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 敏幸 (NAKAJIMA, Toshiyuki)  
愛媛大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：70314945

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：