

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22445

研究課題名(和文)原核生物で初めてみつかった“食作用”に関わる遺伝子の機能と進化

研究課題名(英文)Function and evolution of genes involved in the phagocytosis first discovered in prokaryotes

研究代表者

石田 健一郎 (ISHIDA, Ken-ichiro)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：30282198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：原核生物で初めてみつかった食作用をする細菌“ウアブ”がどうやって食作用能を獲得したのか、を解明するため、ウアブ(SRT547株)に近縁な3株(SRT713, SRT719, SRT722)のゲノムを解読し比較ゲノム解析を行なった。その結果、食作用能をもつ細菌に特異的な遺伝子が1,245個検出され、その中に食作用関連遺伝子があると推測された。食作用関連遺伝子をさらに絞り込むため、野外からウアブ系統細菌を特異的に検出し、可視化する系を確立した。これにより淡水域でウアブ系統細菌の新系統群を複数発見し、食作用関連遺伝子の絞り込みと、ウアブ系統での食作用の進化解明につながる進展を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウアブ(SRT547株)の発見により、真核生物にしかないと思われていた“食作用”のような捕食様式を原核生物が独自に獲得していたことが初めて示された。この発見により、食作用の進化や真核生物の起源の理解が大きく進展することが期待されている。本研究は、ウアブの食作用が真核生物のそれとどう違うのか、という疑問を念頭に、ウアブの食作用がどのように機能しているのか、ウアブがいつ、どのように食作用能を獲得したのか、を明らかにするための最初のステップである。本研究成果は、これらの理解に向けた今後の大きな展開の扉を開くものである。

研究成果の概要(英文)：To elucidate how the newly discovered phagocytotic prokaryote, *Ca. Uab amorphum*, acquired its phagocytosis, we sequenced the genomes of three strains (SRT713, SRT719, and SRT722) closely related to “Uab” (SRT547) and performed comparative genomic analysis. As a result, 1,245 genes specific to bacteria with phagocytosis were detected, and the phagocytosis-related genes were presumed to be among them. To further narrow down the phagocytosis-related genes, we established a system to specifically detect and visualize “Uab”-clade bacteria from the field. Several new lineages of “Uab”-clade bacteria were discovered from freshwater samples, which led to the narrowing down of the phagocytosis-related genes and elucidating the evolution of phagocytosis in the “Uab”-clade.

研究分野：系統分類学、進化学、藻類学、原生生物学

キーワード：原核生物 Uab amorphum 食作用 Planctomycetes 比較ゲノム 進化 多様性 ウアブ

1. 研究開始当初の背景

食作用 (phagocytosis) (= 貪食) は、原核細胞にはない真核細胞特有の性質とされ、真核生物の栄養摂取や免疫をはじめとする様々な生体機能を担う基本的な機構の一つである。また、ミトコンドリアや葉緑体の獲得のもとになった細胞内共生の前提となる基本機能であり、真核細胞の成立そのものにも影響を及ぼした可能性も指摘されているように、食作用の出現は生物進化上の最も重要なキーイベントの一つといえる。しかし、原核細胞から真核細胞への進化の過程で食作用がいつどのように出現したのかは不明である。これまで原核生物における食作用は知られておらず、そもそも原核生物において食作用能が進化するのか、が疑問であった。

我々は、2015年と2017年にパラオ共和国の海産サンプルから、大型 (直径 5-10 μm) の2つの原核生物の培養 (SRT547株およびSRT713株) に成功し、これらが食作用に似た様式で周囲の小さなバクテリアや真核生物を自身の細胞で包み込んで捕食して増殖することを発見した。電子顕微鏡による観察では、核やミトコンドリアなどを欠く原核細胞であるにもかかわらず、細胞膜が貫入して餌バクテリアを包んで捕食する様子が確認され、細胞内に消化途中のバクテリアを包む食胞様構造も確認されている。16SrRNA 遺伝子の分子系統解析では、これら2株は Planctomycetes と呼ばれるバクテリアに属し、その中の環境配列のみからなる系統群 (ここではウアブ系統群と呼ぶ) に含まれるが、それぞれは異なるサブクレードに位置した。SRT547株 (*Ca. Uab amorphum*) については既にゲノム解読を進めており、真核生物からの遺伝子水平転移はほとんどないため、食作用能はバクテリアの進化において独自に獲得されたものと推測される。しかし、捕食関連遺伝子は機能未知遺伝子に含まれると考えられ、この株のゲノム配列だけでは同定できない。

2. 研究の目的

本研究では、この新たに見つかった原核生物の“食作用”に関連する遺伝子を推定し、それらがコードするタンパク質の局在と機能を実験的に確認することで、バクテリアで独自に獲得したと思われる“食作用”機構を明らかにすること、さらにそれを真核細胞の食作用機構と比較することで、食作用の起源と進化の解明、さらには真核細胞の誕生における細胞進化の理解に有用な知見を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

1) SRT713株, SRT719株, SRT722株のゲノム解析

まず、*Ca. Uab amorphum* (SRT547株) における“食作用”に関連する遺伝子を、比較ゲノム的アプローチにより推定するため、2017年にパラオ共和国から新たに分離した SRT547株に近縁性が示唆された培養株、SRT713株、SRT719株及びSRT722株のゲノム解読を実施することにした。そのためにこれら3株について、ゲノム配列が明らかな餌バクテリア *Alteromonas macleodii* との二員培養系を確立した。確立した二員培養系から全DNAを回収し、MinION及びIllumina HiSeqでゲノム配列を取得した。ゲノム配列をFlyeでアセンブリし、Medaka及びPilonで校正を行い、DFASTでアノテーションを行った。得られた3株のゲノム配列とSRT547株のゲノム配列に加えて、非捕食性のバクテリアゲノムを加えて、比較ゲノム解析を行うとともに、本研究で用いた4つの株の系統関係を明らかにするために、最尤法によるゲノム系統解析を実施した。これらの解析結果をもとに食作用関連遺伝子の推定及びそれらの進化的由来を考察した。

2) 未培養系統の生態の解明

上記比較ゲノム解析で用いた非捕食性バクテリアのゲノム配列はウアブ系統には属さない系統的に離れたバクテリアのものであったため、捕食に関わる遺伝子をより精度高く絞り込むためには、ウアブ系統の多様性をさらに把握し、できればより*Ca. Uab amorphum*に近縁な非捕食性ウアブ系統バクテリアとゲノム比較を行うことが望ましい。ウアブ系統には、今回使用した4株以外に培養株は存在しないが、系統内には多くの実体のわからない (16S rDNA配列しか報告がない) 未培養のバクテリアが存在することが知られているため、まずそれらで食作用等の特徴があるのかを明らかにするために、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いてウアブ系統のバクテリアを特異的に検出して可視化できる系を構築した。筑波大学内の池から採集した堆積物からDNAを回収し、*Ca. Uab amorphum*及び周辺の系統に特異的なプライマーを用いたPCRおよび分子系統解析によって、*Ca. Uab amorphum*周辺の系統がサンプル中に存在することを確認した。サンプル中に存在するウアブ系統バクテリアに特異的な16S rRNAの蛍光プローブを作成し、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを行い蛍光顕微鏡で観察を行った。

4. 研究成果

以前から進めていたSRT547株のゲノム解読が本研究課題期間中に完了し、SRT547株を*Ca. Uab amorphum*と命名し、食作用能をもつ初めてのバクテリアとしてゲノム解読結果とともにNature Communications誌に発表し (Shiratori et al. 2019)、国際的に大きな反響を得た (453 Altmetric score)

(2021年6月時点)。

1) SRT713株, SRT719株, SRT722株のゲノム解析

本研究では、この細菌がもつ食作用関連遺伝子を、比較ゲノムのアプローチにより推定するため、Shiratetri et al. (2019)で報告した *Ca. Uab amorphum* (SRT547株)に加えて、新たに3株 (SRT713, SRT719, SRT722) の培養株のゲノム解析を行った。まずは、それらの系統関係を明らかにするために、多数のシングルコピータンパク質コード遺伝子が用いてゲノムレベルの分子系統解析をおこなった。その結果、高い統計的支持で樹形を得ることができ、Uab近縁種の中ではSRT713株が最も早く分岐し、次いでSRT719株が分岐したことがわかった。したがって、SRT713株がもっとも祖先的な形質をもっていると考えられた(図1)。

次に、ウアブ系統でゲノム配列が得られた培養株4株 (SRT547株, SRT713株, SRT719株, SRT722株)の比較ゲノム解析を行なった。それらのゲノムサイズは、7.2-11.4 Mbpであり、SRT719株は3つの、SRT722株は1つのプラスミドをそれぞれ保持していた。ゲノムには、5,167から7,729タンパク質コード遺伝子が存在することが予測された。4株間で遺伝子レパートリーを比較すると、4株全てで保存されるものはオルソログクラスター全体の33%に過ぎず(2,051オルソログクラスター)、株間で形質が高度に多様化していることが示唆された(図2)。さらに、捕食性に関するタンパク質を推定するために、これらの捕食性細菌4株と、非捕食性の細菌種2株(ウアブ系統ではないPlanctomycetes)を加えてオルソログ解析を行なった。その結果、7,001オルソログクラスターが得られ、そのうち1,245クラスター(18%)が捕食性種特異的であった。この結果は捕食性種の遺伝子レパートリーの高い独自性を示している。Gene ontology (GO) termに基づき、捕食性種特異的タンパク質の機能予測を行なったところ、細胞膜関連タンパク質、転移酵素活性、加水分解酵素活性、タンパク質分解酵素活性をもつタンパク質が多いことがわかった。これらのタンパク質は食胞形成や消化に関連していることが示唆された。

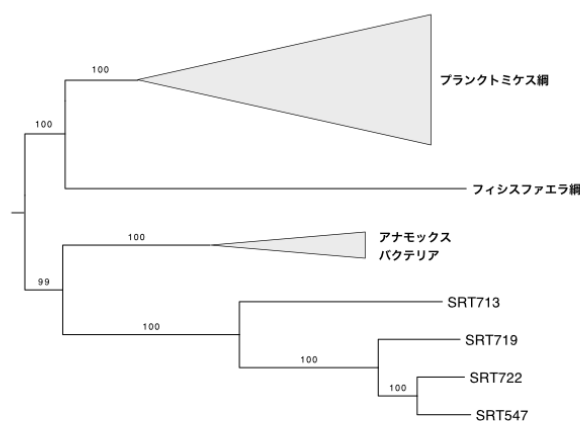


図1. ゲノム情報に基づく *Uab* 近縁種の系統関係

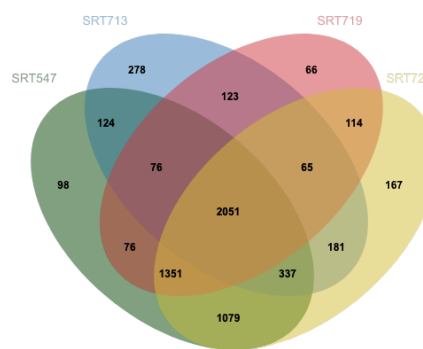


図2. *Uab* 近縁種ゲノムにコードされる遺伝子によるオルソログクラスターのベン図

2) 未培養系統の生態の解明

上記解析では、1,245オルソログクラスター(18%)が捕食性種特異的であったが、これらが全て食作用関連遺伝子ではないと考えられる。食作用関連候補遺伝子として実験により機能を確認できるようにするためには、より精度高く食作用関連遺伝子を絞り込む必要がある。そこで、ウアブ系統の多様性をさらに把握し、食作用能獲得以前の最も近縁な細菌や食作用能に変異がみられる近縁細菌を取得することにした。淡水環境から多くのウアブ系統細菌が検出されるかどうかはわからなかったが、コロナ禍中であることから筑波大学内の池で検出を試みた。ウアブ系統特異的なプライマーを新規にデザインし、筑波大学内の池から取得したDNAからPCRによりウアブ系統の存在の有無を確認したところ、*Ca. Uab amorphum* 周辺の系統が複数検出された(図3)。その中の1系統に対して特異的な16S rRNAの蛍光プローブを作成し、堆積物サンプルに対して蛍光 in situ ハイブリダイゼーションを行い、蛍光顕微鏡で観察ところ、*Ca. Uab amorphum* に似た円盤状で大型の細胞が検出された(図4)。この観察によって、淡水環境に生息する *Ca. Uab amorphum* 周辺の系統の可視化に初めて成功した。また、検出された細胞が *Ca. Uab amorphum* に似ていたことから、この系統においても食作用が保存されている可能性が示唆された。

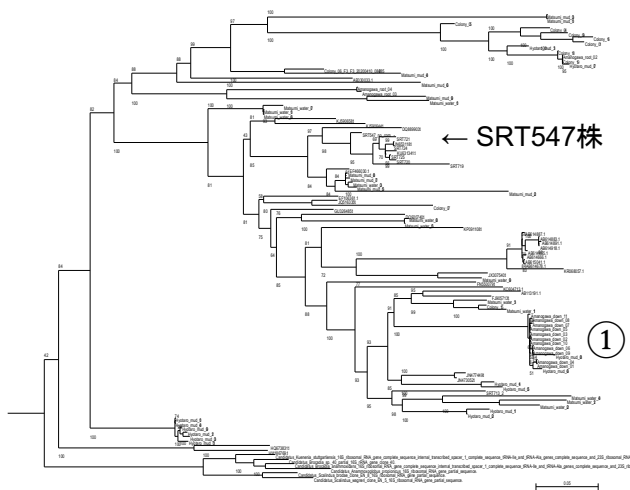


図3. 筑波大学周辺の池から取得した DNA から検出された 16S rDNA 遺伝子による分子系統解析。①は系統特異的蛍光 in situ ハイブリダイゼーションを行った系統

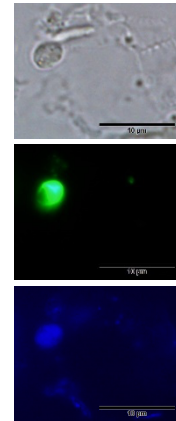


図4. 系統特異的蛍光 in situ ハイブリダイゼーションによる *Ca. Uab amorophum* 周辺の系統の可視化

今回、既存の培養株の比較ゲノム解析だけでは、食作用関連遺伝子の局在実験を実施できる段階にまでは到達できなかったが、ウアブ系統の多様性把握が進展することにより、より精度高く食作用関連遺伝子の絞り込みが可能になると期待できる。特に、本研究課題の中で淡水環境でのウアブ系統細菌の検出が比較的容易にでき、細胞の可視化に成功したことは、今後の多様性把握の進展が約束されることを意味しており、ウアブ系統内で食作用の進化解明とともに、食作用関連遺伝子の特定に道をつけることができたと考えている。

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 1件)

1. 著者名 Takashi Shiratori, Shigekatsu Suzuki, Yukako Kakizawa & Ken-ichiro Ishida	4. 巻 10
2. 論文標題 Phagocytosis-like cell engulfment by a planctomycete bacterium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13499-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	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 Takashi Shiratori, Shigekatsu Suzuki, Yukako Kakizawa, Ken-ichiro Ishida
2. 発表標題 A novel predatory bacterium with endocytosis-like cell engulfment
3. 学会等名 The 14th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白鳥峻志、鈴木重勝、柿澤侑花子、浜崎大雅、石田健一郎
2. 発表標題 捕食性バクテリアCandidatus Uab amorphumと近縁株3株のゲノム比較
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

原核生物の常識覆す、他の生物を丸のみする新バクテリア発見 ~真核生物誕生の謎を解き明かす手掛かりに~
<http://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p201912111800.html>

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
研究分担者	白鳥 峻志 (Shiratori Takashi) (70800621)	国立大学法人筑波大学・生命環境系・助教 (12102)	

	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
研究協力者	鈴木 重勝 (Suzuki Shigekatsu) (10785108)	国立研究開発法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・特別研究員 (82101)	

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