

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780071

研究課題名（和文） トリミエマ原虫共生系を用いた細胞内共生研究モデルの構築

研究課題名（英文） Model construction for the study of intracellular symbiosis using *Trimyema* protozoa

研究代表者

新里 尚也（SHINZATO NAOYA）

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・助教

研究者番号：00381252

研究成果の概要（和文）：トリミエマ原虫に生息する共生細菌、TC1の機能を推定する目的で、抗生物質により共生体を欠失させた株を作出し、宿主トリミエマの生育や代謝産物への影響を評価した。その結果、宿主の生育が30%程度にまで抑制され、宿主の活発な生育に必須であることが示された。ステロール添加によっても宿主の生育は回復しなかったことから、TC1の機能が以前に指摘されていた脂質合成ではないことが伺えた。また、凍結保存法の検討によりプロピレングリコール等が凍結保護剤として適していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To evaluate the contribution of TC1 symbiont to the growth of host *Trimyema*, the growth properties and metabolites of symbiont-free protozoa strain were examined. As the results, the host's growth considerably decreased as low as 30% of maximum cell densities of symbiont-bearing strain, indicating the essential role of the symbionts for healthy growth of the host. On the other hand, propylene glycol was shown to be a candidate additive to protect *Trimyema* cell from freezing damage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、応用微生物学

キーワード：細胞内共生・メタン生成菌・ゲノム・原生動物

1. 研究開始当初の背景

（1）細胞内共生はどのように生物を進化させるか？

ミトコンドリアや葉緑体の獲得が生物進化を加速した事は議論の余地がない。しかしながら、こうした共生が成立した要因や成立直後の進化過程については不明確であり、常に議論の対象となってきた。これは共生が生じ

てからの時間があまりにも経過している為に、宿主と共生体がすでに完成された一つのシステムとなってしまっているからである。細胞内共生というプロセスを理解する為には、どのような状況において共生が成立するのか？共生した生物はどのように変化していくのか？といった点を具体的に検証していく必要がある。幸いなことに、このよ

うな細胞内共生の現象は、なにも太古の昔に稀に起こった奇跡的な現象ではない。現存する生物の間においても、細胞内共生を始めようとする者、始めて間もない者達が存在する。こうした、まさに過渡期にある共生関係をモデルとして、宿主と共生体の相互作用やゲノムレベルでの進化過程を解析して行く事が、細胞内共生進化をめぐる様々な疑問を解き明かして行く上で必要不可欠であると考えられる。

(2) トリミエマ原虫に見る三者間共生系
細胞内共生研究において注目すべき研究対象が、トリミエマ原虫における三者間共生系である。トリミエマ原虫は、淡水性の嫌気性原虫であり、家庭用の小型浄化槽などで不溶性の有機物や細菌を捕食して生活をしている。本研究で対象としたトリミエマ原虫は、共同研究者であった山田らによって15年前に小規模合併処理浄化槽より分離がなされ、分類や食性、生育特性等の基礎的な研究が行われた(Yamada, 1994)。この当時、トリミエマ原虫の細胞内共生体に関する研究は本格的には行われていなかったものの、メタン生成古細菌と思われる共生体を細胞内に保持している事が、それらが持つ特異的な蛍光性補酵素の顕微鏡観察の結果から示唆されていた。その際に、メタン生成古細菌の細胞内での局在性を明らかにする為に行った電子顕微鏡観察により、トリミエマ原虫が第二の共生体である、真正細菌共生体も細胞内に保持している事が明らかとなった。このような三者間共生系は世界的に見ても例がなく、トリミエマ共生系が細胞内共生を研究するモデル系になり得ると考えられた。

ゲノム進化学的解析を含めた研究を行うためには、遺伝的に均一な細胞集団を使用する事が望ましいが、最初に山田らによって培養された株は、環境試料より集積されたクローン集団であり、単一細胞から派生したものではなかった。そこで報告者らは細胞内共生研究のモデルとする為に、再度、合併処理浄化槽から単一細胞をマニピュレーションにより分取する事で、クローン化培養株を得た。次いで、このクローン株の一つを用いて、二つの共生体の分類学的な帰属を明らかにするために、リボソームRNA遺伝子の解析を行った。その結果、第一の共生体は予想どおり、水素と炭酸ガスからメタンを生成する既知のメタン生成古細菌の近縁種であったが、第二の共生体は既知の細菌種とは大きく異なった、未知の低GCグラム陽性細菌である事が示された。さらにこれらの塩基配列情報からプローブを作成し、蛍光in situ ハイブリダイゼーション法(FISH法)を行って共生体の細胞内での局在性についても明らかにした。ここまでの研究内容は報告者を筆

頭著者として *Microbial Ecology* 誌に掲載され(Shinzato, 2007)、FISHにより二つの共生体を同時検出した写真は本誌の表紙を飾る事となった。

2. 研究の目的

本共生系は、宿主と共生体との相互作用や共進化に関する知見を提供できる事はもちろん、異なった二つの共生体を保持している事ができる貴重な材料である。世界的に見ても培養株として利用できる三者間共生系はこのトリミエマ共生系以外にはなく、細胞内共生研究のモデル系として確立されるべきものである。これまでの研究により、本共生系に関する基礎的な知見の収集はほぼ完了しているが、細胞内共生研究のモデル系とする為には、以下に示すような要件を満たす必要があると考えられる。一点目は、二つの共生体の機能(共生の成立要因)を明確にする事。二点目は、培養株を安定的に保存する技術開発を行い、他の研究者への提供が可能な管理体制を構築する事。三点目は、共進化研究を推進するベースとなる、共生体の全ゲノムシーケンスを解読して公開する事である。本研究では、本研究は、上記の要件を満たすべく研究計画の策定を行った(具体的に以下に示す)。

3. 研究の方法

(1) 共生体の機能推定

これまでの研究により、トリミエマ原虫内の二つの共生体の系統学的帰属が明らかとなっている。第一の共生体はドメイン・アーキアに属するメタン生成古細菌であり、炭酸ガスを水素で還元してメタンを生成していると推定されている。この事から、メタン生成アーキアはトリミエマ原虫が無酸素環境下で有機物を代謝する際に生成する水素を基質として利用していると考えられる。一方で、第二の共生体である真正細菌共生体については、系統学的帰属以外の性状がまったく不明な未知の細菌である。本共生体のリボソームRNA遺伝子の塩基配列は既知の細菌とは大きく異なっており(相同性=85%)、トリミエマ原虫内に特異的に生息する、宿主への依存が強い細菌であると考えられる。基本的な代謝系の情報が欠如している為宿主への寄与は全く不明であるが、本共生体の機能を解明する事は、トリミエマ原虫共生系を理解する上で必要不可欠である。そこで本項目では、こうした点を明らかにすべく、共生体の特異的な抗生物質によりトリミエマ原虫共生系より脱落させ、宿主の増殖特性と有機酸等の代謝産物の挙動を解析して、トリミエマ原虫共生系における共生体の機能を明確にする事を試みる。

(2) 長期保存技術の確立

この世界的に見ても稀な三者間共生系は、細胞内共生進化を研究する上で貴重な材料であるが、これまでに株として安定的に保存する手法の検討が行われてこなかった。現在は月に一度、生育細胞を細々と植え継いで維持している状況である。貴重な研究材料を失わない為にも、共生系の変質を防ぐ上でも、凍結により保存する技術の確立が不可欠である。本項では、様々な保護剤や添加剤、凍結方法の検討を行って、本共生系を長期的に安定保存する技術開発を行い、他の研究者らへも供給できる管理体制の確立を目指す。

(3) ゲノムシーケンス解析

生物進化の過程を研究する際に非常に多くの情報を提供してくれるのがゲノムである。細胞内共生進化の研究においても、共生体と宿主のゲノムを解析する事で数多くの事が判る可能性がある。近年、昆虫や原生動物を含む、いくつかの細胞内共生体の全ゲノム解析結果が報告され、共生に寄与する特定の機能性遺伝子が保存されている一方で、それ以外の遺伝子の偽遺伝子化や欠失、著しいゲノムの縮退(サイズ減少)等が確認されている。共生体のゲノム構造を明らかにする事は、共生における進化過程を理解する上で重要である。具体的には、項目(2)で検討した抗生物質を用いた手法によりメタン生成古細菌を選択的に脱落させ、真正細菌共生体をマニピュレーターにより採取する。分取した細胞より極微量なゲノムDNAを抽出した後に、近年、技術的に確立された、ランダムゲノム増幅法を用いて、ゲノム全体をライブラリ構築可能な程度まで増幅する。調製したゲノムはクローニング等を経る事なしに、近年普及しつつあるギガシーケンサーによるシーケンス解析に供する。ギガシーケンサーは、これまでのサンガー法シーケンスを遥かに凌ぐ超高速解析が可能であり、ゲノム解析の強力なツールである。ギガシーケンサーを用いたde novoシーケンスはゲノムサイズによっては難しい場合があるが、細胞内共生体は一般にかなりゲノムが縮退している事が報告されており(1~2Mbp)、冗長度を高く設定する事で十分可能であると考えている。ギガシーケンサーによるシーケンスが困難である場合には、ショットガンゲノムライブラリの構築を行い、サンガーシーケンスへ解析方法を変更する。構築されたゲノムライブラリは外部委託等により、直ちにシーケンス解析に供する事が可能となる。

4. 研究成果

(1) 共生体の機能推定

機能未知の真正細菌共生体 TC1 について、抗

生物質を作用させることで共生体を除去することを試みた。種々の代表的な抗生物質を作用させた結果、テトラサイクリンを用いることで効果的に真正細菌共生体を欠失させることができた。この処理により得られた欠失株(S10C)を野生株と比較することで真正細菌共生体の機能推定を試みた。メタン生成アーキアの機能性評価と同様に生育特性の評価を行った結果、真正細菌共生体の欠失によりトリミア原虫の生育は著しく制限され、野生株と比較して最大細胞密度が30%程度にまで低下した(図1)。このことは真正細菌共生体が宿主であるトリミア原虫の活発な生育に必須の役割を担っていることを示していた。嫌気性原虫では、ステロール前駆体の合成ができないためにこれらを外部環境より摂取していることが知られている。そこで本研究では、真正細菌共生体がこれらの供給に関わっている可能性を考え、ステロール前駆体として機能し得る化合物の候補として、スティグマステロールを添加することでトリミア原虫の生育が回復するか検討した。過去の研究においてスティグマステロールはトリミア原虫の生育を活性化させる効果が報告されている。

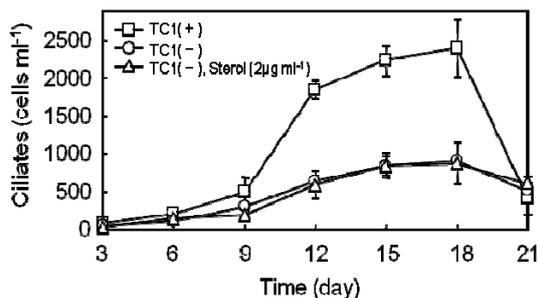


図1 トリミア原虫の生育曲線

(□) 野生株、(○) 共生体欠失株(S10C)、(△) スティグマステロール添加欠失株

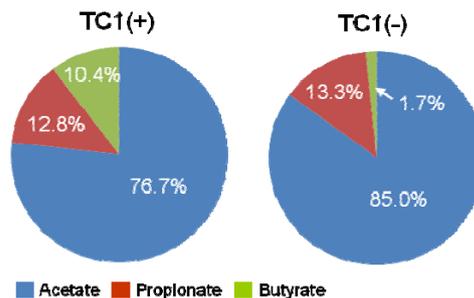


図2 真正細菌共生体の有無におけるトリミア原虫の代謝産物(有機酸)組成

真正細菌共生体を欠失した株に対して、スティグマステロールを20 µg/mlの濃度で添加して生育特性を評価したが、共生体の欠失によって低下した生育を活性化することはできなかった。代謝産物については、大きな変化はなかった(図2)。

これらの結果から、具体的な機能については不明であるが、真正細菌共生体はトリミエマ原虫の生育に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(2) 長期保存技術の確立

トリミエマ原虫株の長期安定保存を実現するために、凍結保存法の開発にも着手した。検討すべき凍結保存の条件として、凍結保護剤の選択と凍結方法（プログラムフリーズ条件等）が挙げられる。凍結保護剤の検討は主に細胞形態への影響で評価を行い、凍結方法の検討は復元できるかによって評価を行うこととした。凍結保護剤として4種類（グリセロール、ジメチルスルホキシド、エチレングリコール、プロピレングリコール）、添加剤としてトレハロースとシュークロースを検討した。凍結保護剤と添加剤の組み合わせで8つの条件で評価を行った。2週間生育させたトリミエマ原虫株に対し、最終濃度として保護剤15%、添加剤0.3Mとなるように添加し、 -80°C で凍結後24時間で解凍して細胞形態の観察を行った。その結果、グリセロールを保護剤として用いた条件ではほとんどの細胞が粉砕されており、凍結保護剤としては機能しないことが示された。その他の保護剤では細胞形態を維持していたが、中でもプロピレングリコールとジメチルスルホキシドにおいて効果が高かった。2種類の添加剤の効果について違いは認められなかった。解凍後の試料を培地へ接種し、その後の復元状況を1ヶ月にわたって観察を行ったが、いずれの状況においても生育は認められなかった。今回は凍結条件の検討は行わなかったことから、今後プロピレングリコールやジメチルスルホキシドを用いて、プログラムフリーズ等の条件を検討し、復元できる凍結条件を検討する必要がある。

(3) ゲノムシーケンス解析

生物進化の過程を研究する際に非常に多くの情報を提供してくれるのがゲノムである。細胞内共生進化の研究においても、共生体と宿主のゲノムを解析する事で数多くの事が判る可能性がある。近年、昆虫や原生動物を含む、いくつかの細胞内共生体の全ゲノム解析結果が報告され、共生に寄与する特定の機能性遺伝子が保存されている一方で、それ以外の遺伝子の偽遺伝子化や欠失、著しいゲノムの縮退（サイズ減少）等が確認されている。共生体のゲノム構造を明らかにする事は、共生における進化過程を理解する上で重要である。本研究では、トリミエマ原虫の共生体（TC1）についてゲノムDNAの調整を行い、ギガシーケンサーによる解析を行った。具体的には、二日間絶食を行ったトリミエマ原虫をマイクロマニピュレーターで分取し、凍結融解を行って核を破壊したのちに洗浄、集菌を行って共

生体の画分を得た。この画分をアルカリ処理して細胞を破碎し、得られたゲノムDNAをPhi29 DNA polymerase によって増幅してギガシーケンサー（Roche GS FLX、illumina GAII）によるシーケンスを実施した。その結果、2800本あまりのcontigを得る事が出来た。最大長のcontigは85kbであった。しかしながら、TC1の16-23SリボソームRNA遺伝子はcontig上に1カ所見出されたものの、得られたcontigの半数は宿主トリミエマ由来と思われる配列が含まれていた。また、バクテリア由来であると考えられた配列もTC1から系統的に離れた微生物種の遺伝子に類似しており、どのような解析手法をとるにしても、解析に供する増幅ゲノムの純度を高める必要があると考えられた。

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）

〔図書〕（計1件）

- ① Shinzato, N., and Y. Kamagata. 2010. The methanogenic and eubacterial endosymbionts of Trimyema. pp35-53. In J. H. P. Hackstein (ed.), Microbiology Monographs 19, (Endo)symbiotic methanogenic archaea, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新里 尚也 (SHINZATO NAOYA)
琉球大学・熱帯生物圏研究センター・助教
研究者番号：00381252

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

鎌形 洋一 (KAMAGATA YOICHI)
産業技術総合研究所・バイオプロセス研究
部門・部門長
研究者番号：70356814