

令和元年6月3日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07173

研究課題名(和文) グリーンヒドラ共生系における動物-藻類-細菌間相互作用とゲノム進化

研究課題名(英文) Interactions and genome evolution in animal-algae-microbe symbiotic system in green hydra

研究代表者

濱田 麻友子 (Hamada, Mayuko)

岡山大学・理学部・特別契約職員(助教)

研究者番号：40378584

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)：本研究では動物-藻類共生システムにおける生物間相互作用と進化や、細菌などの微生物の関与を理解するため、刺胞動物グリーンヒドラとその共生クロレラのゲノム・トランスクリプトーム解析を行った。その結果、クロレラの共通祖先においてアミノ酸トランスポーター遺伝子の増加やキチン代謝系遺伝子の水平伝播による獲得が既に起こっていることが明らかになり、クロレラ科における共生性の頻出に寄与した可能性がある。さらに、グリーンヒドラでは細菌からの水平伝播による特殊な二次代謝産物の合成酵素遺伝子の獲得や、細胞質内パターン認識受容体遺伝子の大規模な重複などが見られ、独自の生体防御機構を持っている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、様々な生物で見られる藻類との共生進化をヒドラ-クロレラ共生システムというモデルを用いて明らかにした。ヒドラのような動物における藻類共生システムは共生進化の中間状態にあるといえ、その理解は葉緑体やミトコンドリアのような細胞小器官の進化の過程にも示唆を与えられ、考えられる。さらに、共生クロレラは大量の糖類の体外への分泌や特殊な二次代謝産物の合成など、特異な性質を持つことも明らかになった。本研究はこのようなユニークな共生関係の実態とその進化を理解することにつながるだけでなく、サンゴの白化現象のような環境問題への対策や藻類の産業利用などの基盤にもなると期待される。

研究成果の概要(英文)：To understand the interspecies interactions and evolution of animal-algal symbiosis and the involvement of microbes such as bacteria in the symbiotic system, we analyzed genome/transcriptome of the Cnidarian green hydra and the Chlorella symbionts. The result suggested, in the common ancestor of Chlorella, duplication of amino acid transporter genes and acquisition by horizontal transfer of chitin metabolic gene occurred, which may have contributed to frequent occurrence of symbiosis in Chlorella family. In addition, acquisition of genes for synthesis of specific secondary metabolites by horizontal transfer from bacteria and large-scale duplication of pattern recognition receptor genes were found in green hydra genome, suggesting unique defense mechanisms.

研究分野：進化生物学・ゲノム生物学

キーワード：共生 進化 ゲノム ヒドラ クロレラ

1. 研究開始当初の背景

動物と藻類の共生は、サンゴなどの刺胞動物をはじめ、シャコガイなどの軟体動物、脊索動物ホヤ、ゾウリムシなどの原生生物など様々な生物において頻繁に見られる普遍的な相利関係である。この共生関係において、藻類は光合成によって合成した糖類をホストに供給し、ホストは栄養の他、藻類が生活するのに適した環境を提供していると考えられている。また、この共生システムの成立には細菌などの微生物も役割の一端を担っていると言われている。このような共生コミュニティにおいて、これらの生物はあたかも一つの生命体のような協調的な生命活動を行ない、栄養面や生活環境の面で互いに有利に働くような依存関係を築いている。この関係を維持するためには、共生生物に特異的なメカニズムが存在するはずである。また、このような依存関係はこれらの生物の共進化によってもたらされたと考えられ、その過程においてゲノムレベルでの変化が生じている可能性がある。しかしながら、この共生システムへの適応の実態や、ゲノム進化過程は未だ明らかではない。これはこれらの動物の多くにおいて分子生物学的実験が困難であることや、ゲノムの全貌が明らかになっていないことがひとつの原因である。

これまでに我々は動物 藻類共生システムの生物間相互作用とそのゲノム進化を明らかにするために、グリーンヒドラとクロレラの共生系をモデルとした解析を行ってきた。グリーンヒドラは内胚葉細胞に特定の共生クロレラを共生させている(図1)(1)。これらは互いに深い依存関係にあり、クロレラは垂直伝播によってヒドラに受け継がれ、ヒドラの体外では生存できない。グリーンヒドラは生理学的知見が多く、実験室での培養が容易で、発現・機能解析などの分子生物学的実験手法が確立しており、実験動物として適している。また、非共生性

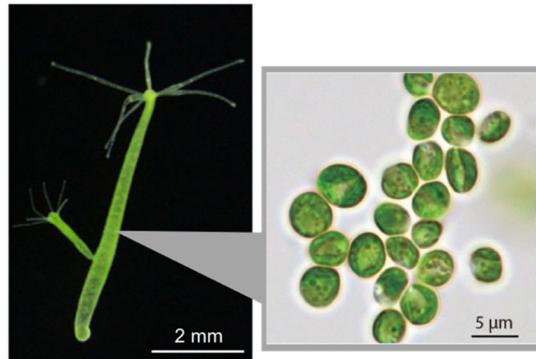


図1 グリーンヒドラと共生クロレラ
グリーンヒドラは内胚葉細胞内に特定のクロレラを共生させている。

の別種のヒドラやクロレラのゲノムやトランスクリプトームが公開されており、比較ゲノム解析が可能である。このような利点を活用し、我々はこれまでにグリーンヒドラのトランスクリプトーム解析などによって、クロレラから供給される光合成産物によってヒドラのグルタミン合成が活性化され、それをクロレラに窒素源として供給するというギブアンドテイクの関係が存在し、それは遺伝子レベルで協調的に調節されているということを示している。また、この共生クロレラのゲノムシーケンスを解読したところ、驚くべきことに、一般の植物では窒素代謝に必須とされている硝酸同化に関わる酵素やトランスポーターの遺伝子が欠失していることがわかった。これらのことから、クロレラはヒドラから供給されるアミノ酸などの窒素源に依存し、ゲノムからは硝酸同化システムが退化したと考えられる。以上のように、これまでにヒドラ-クロレラ間の栄養のやりとりとホストに依存した結果として起こった共生体のゲノムレベルでの特殊化を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに明らかにしたグリーンヒドラと共生クロレラの栄養のやりとりに関する知見をさらに拡大し、近縁種との比較ゲノム解析を行うことで共生進化の全体像を捕らえることを目的とした。また、この共生システムへの細菌などの微生物の関与を明らかにし、グリーンヒドラ共生システムをモデルとした動物 藻類 細菌共生コミュニティにおける生物間相互作用と、共生進化を明らかにすることを目指した。

具体的には、ホストであるグリーンヒドラのゲノムを解読し、他の刺胞動物や非共生性ヒドラのゲノムとの比較ゲノム解析を行う。これまでに解読した共生クロレラゲノムを利用し、他の単細胞緑藻類や近縁のクロレラのゲノムとの比較ゲノム解析を行う。以上の解析によって得られたグリーンヒドラおよび共生クロレラに特異的に起こった遺伝子重複、遺伝子欠失を明らかにし、特に共生性に関与すると考えられる遺伝子に関しては詳細な系統解析を行うことで、共生性獲得の進化の道筋を明らかにする。また、共生クロレラゲノムやヒドラトランスクリプトームの中には、細菌やウイルスなどの微生物の遺伝子と高い相同性を示す遺伝子が存在していたことから、相同性検索や系統解析によってこれらの遺伝子の性質や由来を明らかにする。

以上の解析によってグリーンヒドラ共生系におけるホストと共生体両方のゲノムが出揃う。これを利用し、この共生システムを一つの生命体として捕らえることで共生ゲノム進化の全体像を多角的に捕らえることを可能とし、様々な生物において頻繁に見られるこの相利共生の意義を具体的に示すことを目指した。

3. 研究の方法

<グリーンヒドラおよび共生クロレラのゲノム・トランスクリプトーム解読と遺伝子モデルの構築>

ゲノム解読にはグリーンヒドラ *Hydra viridissima* A99 系統を用いた。共生クロレラを除去し、抗生物質処理によってバクテリアを除去した個体からゲノム DNA を抽出し、シーケンズライブラリーとして、paired-end (insert size: 平均 540bp) および、mate-pair library (insert size: 平均 3.2, 4.6, 7.8 and 15.2 kbp) を作成した。ゲノムシーケンズには Illumina HiSeq (150bp x2), MiSeq (300 bp x2) を使用した。アセンブルには Newbler と SSPACE 等のソフトウェアを、遺伝子モデルの構築には AUGUSTUS を用いた。また、これまでに解読した共生クロレラ *Chlorella* sp. A99 のゲノム配列からも、同様にして遺伝子モデルを構築した。また、トランスクリプトーム解析には、*Hydra viridissima* A99 および *Chlorella* sp. A99 から total RNA を抽出し、mRNA-seq 用ライブラリーを作成し、Illumina Hi-seq (150bp x2) を用いて mRNA-seq を行った。ゲノムへのマッピングは Tophat などのソフトウェアを用いた。

<グリーンヒドラと共生クロレラの比較ゲノム解析>

上記のようにして得られたグリーンヒドラおよび共生クロレラの遺伝子モデルを用いて、近縁種との比較ゲノム解析を行った。グリーンヒドラ *Hydra viridissima* A99 との比較には、すでにゲノムが公開されている非共生性のヒドラである *H. magnipapillata* や花虫綱に属するサンゴ *Acropora digitifera* やイソギンチャク *Nematostella vectensis* などを用いた(2,3,4)。*Chlorella* sp. A99 の比較ゲノム解析には、ミドリゾウリムシの共生クロレラとして知られる *Chlorella variabilis* NC64, *Micractinium conductrix* SAG 241.80 や、非共生性のクロレラである *Chlorella sorokiniana* UTEX 1602 や他の単細胞緑藻類を用いた(5,6)。これらの遺伝子配列を用い、オーソロググループへの分類や Pfam ドメイン検索を行い、遺伝子数の比較を行った。また、グリーンヒドラおよび共生クロレラの遺伝子モデルの相同性解析には BLAST を用い、必要に応じて系統解析を行った。

4. 研究成果

<グリーンヒドラとその共生クロレラのゲノム解析>

グリーンヒドラ *Hydra viridissima* A99 のゲノムを解読しアセンブルを行った結果、N50=1.1Mbp の 2677 本の Scaffold を得た。k-mer 解析によりゲノムサイズは 340Mbp と予測され、これは非共生性のヒドラ *H. magnipapillata* のゲノムサイズ 1,36bp と比較すると大幅に小さい(2)。また、遺伝子数は 21476 遺伝子で、*H. magnipapillata* (31452 遺伝子) と比較すると少なめであった。さらに、これまでに解読の終わっていた共生クロレラ *Chlorella* sp. A99 のゲノム配列からも遺伝子モデルを構築し、8298 遺伝子を得た。ゲノムサイズや遺伝子数、GC% は他のクロレラとほぼ同様で、共生性・非共生性による違いは見られなかった(5,6)。また、系統解析の結果、*Chlorella* sp. A99 はクロレラ科の中でも Meyerella 属に属し、ゾウリムシや太陽虫の共生クロレラなどとは系統的に離れていることから、共生性はクロレラ科において複数回独立に出現していると考えられる。

<共生関連遺伝子>

以上のようにして得られたグリーンヒドラと共生クロレラの遺伝子モデルを用いて、近縁種の遺伝子との比較を行った。グリーンヒドラの共生クロレラにおいてはこれまでに植物では重要とされる硝酸同化関連遺伝子が失われていることを明らかにしてきたが、さらに尿素輸送体などの窒素代謝関連遺伝子や糖代謝に係る遺伝子など、他にも重要な代謝系遺伝子が見つからなかった。また、このような窒素代謝系遺伝子の欠失は他の共生クロレラやサンゴの共生藻である褐虫藻では見られないことから、ヒドラの共生クロレラに特異的な特徴であると考えられる。一方、低分子の中性アミノ酸を取り込むアミノ酸輸送体遺伝子が増加しており、ヒドラから供給されるグルタミンなどのアミノ酸を効率的に取り込むことが可能であると考えられる。他のクロレラや緑藻類を用いた系統解析の結果、意外なことに、このようなアミノ酸輸送体遺伝子はクロレラ科共通で多い傾向があり、クロレラ共通祖先で既にある程度の遺伝子重複により増加していると考えられる。

また、細菌などの微生物とのゲノム間相互作用を理解するため、グリーンヒドラおよび共生クロレラゲノム中に存在する他の生物の遺伝子と相同性の高いものを探索した。その結果、グリーンヒドラと共生クロレラ間での遺伝子の水平伝播は見られなかった一方、細菌、菌類、ウイルスに相同性を持つ遺伝子が両方のゲノムに確認された。これまでにゾウリムシの共生クロレラで、キチンやキトサンの代謝に関わる遺伝子がウイルスなどから水平伝播によって獲得されたことが報告されているが(5)、解析の結果、*Chlorella* A99 や他のクロレラ属にもこれらの遺伝子が存在していることから、クロレラ共通祖先においてウイルスや細菌のキチン代謝系遺伝子の水平伝播が起こり、キチン質の細胞壁を獲得したと考えられる。

以上のように、クロレラの共通祖先で既にアミノ酸輸送体の増加や堅牢なキチン質の細胞壁など、共生に深く関係すると考えられる性質が獲得されていたことが明らかになった。このことは、クロレラ科で独立かつ頻繁に共生性が出現した理由かもしれない。

<生体防御関連遺伝子>

さらに、グリーンヒドラとその共生クロレラ両方のゲノムから、細菌からの水平伝播によって獲得されたと考えられる非リボソームペプチド合成酵素遺伝子が見つかった。これは抗生物質や色素、毒素などのペプチドをリボソームを介さないで合成する酵素で、主に細菌や菌類で見ついているが、動物や植物では稀である。これらの配列の相同性から、ヒドラ、共生クロレラそれぞれに別々のバクテリアから伝播したものであることが示唆された。また、これら合成酵素のペプチド結合部位の相同性から、抗生物質を合成する酵素である可能性が高い。特に共生クロレラのはドメイン重複が起こっており、複雑で高分子の物質を合成することが可能であることが予想された。また、mRNA-seqの結果から、これらの遺伝子はヒドラや共生クロレラで実際に発現しており、何らかの機能があると考えられる。

グリーンヒドラにおいて特に多く存在する遺伝子を探したところ、細胞内異物認識レセプターとして自然免疫に関わることが知られている Nod-like receptor (NLR) に似たタンパクをコードする遺伝子が多くみられた。NLR の種特異的増幅は同じ藻類共生生物であるサンゴでも見られたことから(7)、共生生物で共通に見られる特徴である可能性がある。その機能は未だ不明であるが、共生や生体防御など共生環境の維持に関係しているのかもしれない。

<クロレラとヒドラの共生進化の道筋>

以上の結果から、クロレラとヒドラの共生進化について以下のようなモデルを考えた(図2)。クロレラの共通祖先において、アミノ酸輸送体遺伝子の重複や、キチン代謝遺伝子の水平伝播による獲得と重複が起こり、効率的なアミノ酸の取り込みが可能となり、消化などに強い堅牢な細胞壁が獲得された。このことは動物の体内での共生生活に適した性質であったと考えられる。その後、ヒドラやゾウリムシなどの共生生活を始めるものや遊泳生活を続けるものへと種分化した。さらにヒドラの共生クロレラでは、ヒドラから供給される栄養であるアミノ酸に依存した結果、コストのかかる窒素代謝系である硝酸や尿素の同化に関わる経路は退化してしまった。また、グリーンヒドラと共生クロレラ両方で、特殊な二次代謝産物の合成に関わる遺伝子がバクテリアなどから水平伝播で獲得された。それに加え、ヒドラでは NLR のような生体防御に関わる遺伝子の大規模な重複が起こった。このことから、共生や生体防御などに関わる独自の環境応答機構が存在する可能性が考えられる。

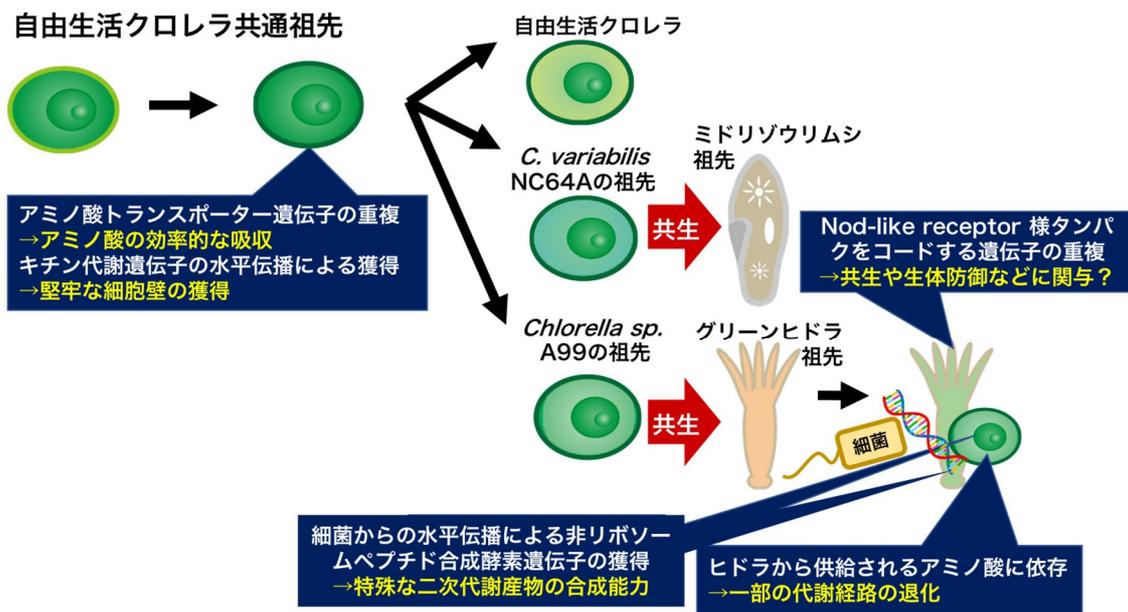


図2 ヒドラークロレラ共生進化の道筋

<引用文献>

- (1) Muscatine, Endosymbiosis of cnidarians and algae. Coelenterate Biology: Reviews and New Perspectives (Lenhoff and Muscatine, eds.). Academic Press, New York, 359-395 (1974).
- (2) Chapman et al., The dynamic genome of *Hydra*. Nature 25, 592-596 (2010).
- (3) Shinzato et al., Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change. Nature 476, 320-323 (2011).
- (4) Putnam et al., Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. Science 317, 86-94 (2007).
- (5) Blanc et al., The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. Plant Cell 22, 2943-2955 (2010).

(6) Arriola et al., Genome sequences of *Chlorella sorokiniana* UTEX 1602 and *Micractinium conductrix* SAG 241.80: implications to maltose excretion by a green alga. *Plant J.* 93, 566-586 (2018).

(7) Hamada et al., The complex NOD-like receptor repertoire of the coral *Acropora digitifera* includes novel domain combinations. *Mol Biol Evol.* 30,167-176 (2013).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Mayuko Hamada, Katja Schröder, Jay Bathia, Ulrich Kürn, Sebastian Fraune, Mariia Khalturina, Konstantin Khalturin, Chuya Shinzato, Nori Satoh, Thomas C.G. Bosch. Metabolic co-dependence drives the evolutionarily ancient *Hydra-Chlorella* symbiosis. *eLife* 7, e35122 (2018). 査読あり

〔学会発表〕(計8件)

(1) 濱田麻友子「原始後生動物の生存戦略を探る：刺胞動物と藻類の共生ゲノム進化」日本比較内分泌学会 第43回大会 若手企画シンポジウム「魅力的な研究との出会いと挑戦するモチベーション」(2018年11月 仙台) 招待講演

(2) 濱田麻友子「刺胞動物と藻類の共生ゲノム解析：ヒドラとクロレラの深い関係を探る」日本動物学会 第89回大会 シンポジウム「海の生物の生存戦略：共生と環境適応に関するざっくばらんな話」(2018年 北海道胆振東部地震のため紙面開催のみ) 招待講演

(3) 濱田麻友子、Konstantin Khalturin、Katja Schröder、新里宙也、Thomas C.G. Bosch、佐藤矩行「ゲノムから見たグリーンヒドラとクロレラの共生進化」第50回日本原生生物学会大会 第1回日本共生生物学会大会 (2017年11月 つくば)

(4) Mayuko Hamada, Katja Schröder, Jay Bathia, Ulrich Kürn, Sebastian Fraune, Mariia Khalturina, Konstantin Khalturin, Chuya Shinzato, Nori Satoh, Thomas C.G. Bosch “Interactions and co-evolution of symbiosis: Comparative genome analysis of green hydra and the symbiotic *Chlorella*.” International Workshop “The diversification of early emerging metazoans: a window into bilaterian origins” (2017年9月 Tutzing, Germany)

(5) Mayuko Hamada “Genome analysis to explore the traces of interactions between organisms in green hydra holobiont.” Workshop “Symbiotic interactions at the base of animal evolution” (2017年9月 Aidling, Germany) 招待講演

(6) 濱田麻友子、Konstantin Khalturin、Katja Schröder、新里宙也、Thomas C.G. Bosch、佐藤矩行「グリーンヒドラの共生クロレラ *Chlorella* sp. A99 のゲノム解読」日本藻類学会第41回大会 (2017年3月 高知)

(7) 濱田麻友子、Katja Schröder、新里宙也、Konstantin Khalturin, Thomas C.G. Bosch, 佐藤矩行「グリーンヒドラ クロレラ共生系における分子相互作用とゲノム共進化」日本進化学会第18回大会 (2016年8月 東京)

(8) Mayuko Hamada, Katja Schröder, Konstantin Khalturin, Sebastian Fraune, Chuya Shinzato, Thomas C.G. Bosch and Nori Satoh “Molecular interaction and genome evolution in the green hydra and *Chlorella* symbiosis.” The Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology & the 87th meeting of the Zoological Society of Japan. (2016年11月 沖縄)

〔その他〕

ホームページ等

岡山大学プレスリリース：動物と藻類の共生の謎を解明

https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id559.html

Okayama University e-Bulletin Research Highlights

[https://www.okayama-](https://www.okayama-u.ac.jp/user/kouhou/ebulletin/research_highlights/vol23/highlights_001.html)

[u.ac.jp/user/kouhou/ebulletin/research_highlights/vol23/highlights_001.html](https://www.okayama-u.ac.jp/user/kouhou/ebulletin/research_highlights/vol23/highlights_001.html)

OIST Marine Genomics Genome Project: *Chlorella* A99 genome database

https://marinegenomics.oist.jp/chlorellaA99/viewer/info?project_id=65

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：Thomas CG Bosch

ローマ字氏名：Thomas CG Bosch

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。