

令和元年6月19日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07491

研究課題名(和文) 多数の藻類を細胞内共生させる原生動物における共生形態の多様性と進化に関する研究

研究課題名(英文) Study on the diversity and evolution of symbiotic protozoa which contain much number of algal cells

研究代表者

保科 亮 (Hoshina, Ryo)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・助教

研究者番号：40373089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内に多数の共生藻を有する原生動物をMARPと定義づける。琵琶湖では複数のMARPが同一種の藻類を共有する。この共生藻は欧州においても同様の共有現象が報告され、MARP共生系の鍵と目される。共生藻の単離培養に成功し、新属新種として記載した。共生のモデル生物であるミドリゾウリムシの共生藻が、単独培養時と共生時において細胞壁の厚さや化学組成が変化することが判明した。この現象は細胞内共生の可否にもかかわるものと考えられ、今後非共生種との詳細な比較が課題となる。また、中型サイズのゲノムを高品質・低コストで決定する手法を開発した。今後様々な共生藻類のゲノムを比較研究し、MARP共生系の解明に役立てる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己の細胞内に他者を受け入れる＝細胞内共生という生物間現象は、ミトコンドリアや葉緑体に見られるように、真核生物の進化においてきわめて重要な役割を果たしてきた。また、近年の藻類の研究からは、真核光合成藻類を新たに別の真核微生物が取り込んで融合(二次共生)し、これにより多様な光合成生物が続々と誕生したことがわかってきている。淡水域では自己の細胞内に多数の球状緑色藻類を共生させる様々な原生動物がいる。しかし、それら共生緑色藻の種、共生関係の安定度、地域依存性や共生による互いのメリットの有無など、その実態は不明な点が多い。今後「植物化」へと進むのかどうかを含め、細胞内共生の実態解明に挑んでいる。

研究成果の概要(英文)：Protozoa with many symbiotic algae in the cell are defined as MARP. In Lake Biwa, multiple MARPs share algae of the same species. This symbiotic alga is reported to have the same sharing phenomenon in Europe and is considered to be the key to the MARP symbiotic system. We succeeded in isolation and cultivation of this symbiotic alga and described as a new genus new species.

For a natural symbiont *Chlorella variabilis*, it was found that the thickness and the chemical composition of the cell wall changed between symbiotic condition and free-culture. This phenomenon is considered to be related to possibility of intracellular symbiosis, and in the future, detailed comparison with non-symbiotic species becomes an issue.

We developed a method to determine middle-sized genome with high quality and low cost. We are currently comparing the genomes of various symbiotic algae, and will help clarify the MARP symbiosis system.

研究分野：進化・多様性

キーワード：細胞内共生 植物化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内共生は進化の原動力といわれる。近年の藻類の研究では細胞内共生が何度も起きており、その結果多様な光合成生物が出現したことがわかっている。淡水域では自己の細胞内に多数の球状緑色藻類を共生させる様々な原生動物があり、研究代表者らはそれらをひとくくりに MARP: (Multi-algae retaining protists)と呼んでいる。MARPs の共生状態は一時的なものであり、共生藻は一定期間で外部の藻類と入れ替えられるものとみなされてきた。繊毛虫ミドリゾウリムシは MARP のモデル生物で、その共生状態の詳細がようやく解明されつつある: ミドリゾウリムシ 1 個体は数百の共生藻を保有するが、共生藻はクローン化されており、ほとんどの場合 *Chlorella variabilis* か *Micractinium reisseri* (研究代表者が新種記載)のどちらかである。両共生藻はかろうじて単独培養可能だが、光合成産物(マルトース)の細胞外への漏出が激しく、また天然下で高濃度で存在する溶藻ウィルスに感受性がある。すなわち、両共生藻はもはや自由生活を営むことのできない隷属状態にあり、半永久的な共生状態にあることがわかってきた。一方、ミドリゾウリムシ以外の MAPK 共生系に関しては、ほとんど何も理解が進んでいない状況にあった。

2. 研究の目的

淡水域では様々な原生動物が細胞内に数百個体の緑色藻類を共生させており(MARP)、研究代表者はこれまで、これら共生藻の多様性や季節的変動を DNA 解析によりアプローチしてきた。その結果から共生藻として確立された種が様々な宿主原生動物へ水平的に伝播、それぞれで固定の共生藻として半永久的に保持されるといった傾向がみえてきている。本研究では天然下における原生動物-藻類共生系のさらなる多様性研究、実験環境下における共生藻の特性解析、自立生活種~共生種の比較ゲノムに基づいた共生を可能にする変異、あるいは自立生活を不可能にする変異について探る。

3. 研究の方法

定点(琵琶湖)、および、諸地域から MARP を採集。培養、DNA 解析、共生藻の単離・培養を試みた。重要種に関しては、電子顕微鏡による観察や、共生藻の生理特性等の解析を追加し、共生形態を考察した。

共生のモデル生物であるミドリゾウリムシでは、除草剤によって共生藻を抜いた「ホワイトセル」を作製し、藻類を貪食させることによって再共生の過程を見ることが出来る。共生藻 *Chlorella variabilis* の共生時と非共生時における細胞壁の形態的、化学的特性の相違について解析を試みた。

共生の可否にかかわる、あるいは、自立生活を不可能にさせる変異を探るため、ゲノム解析を敢行。解析手法の確立と、比較ゲノム、発現遺伝子の確認等をおこなった。

4. 研究成果

琵琶湖では複数の MARP 繊毛虫が同一種の藻類を共有することがわかっていた。継続的サンプリングと DNA 解析の結果、いくつかの繊毛虫では共生藻を入れ替えることなく、子孫へ受け継いでいることが判明した。また、この共生藻は、欧州においても同様の共有現象が報告されており、MARPs 共生系の鍵と目された。本研究では共生藻の単離培養に成功し、新属新種 *Carolibrandtia ciliaticola* (タイプ標本 NIES-50018)として記載した(論文)。本種の生理特性について解析をおこなったところ、光合成産物の細胞外流出は認められず、また、環境水中のウィルス感受性も認められないことから、隷属状態とまでは至っていないようである。

その他、いくつかの天然サンプルに関しては、解析中、または、論文として執筆中・投稿中である。

ミドリゾウリムシ「ホワイトセル」が共生しうるクロレラ類は、種、あるいは株に依存する。しかし、ミドリゾウリムシがクロレラの何(どこ)を認識して、共生の可否が決定されるのかはわかっていない。研究代表者らは、それが細胞壁の化学組成にあると考えており、共生藻 *Chlorella variabilis* の、単独培養時と共生時の相違について分析したところ、細胞壁化学組成の変化に加え、壁の厚さ事態も有意に変化することが判明した(論文)。この現象は細胞内共生の可否と密接にかかわるものと考えられ、他の共生種や非共生種との詳細な比較が今後の課題となる。

手のひらサイズの新型次世代シーケンサー MinION (Oxford NANOPORE Technologies)によるロングリードシーケンスとイルミナのショートリードシーケンスを併せ、高品質・低コストで中型ゲノムを決定する手法を開発した(論文)。本手法を用いて複数の隷属的共生種と、それに近縁な自由生活種のゲノムを決定しており、現在共生の可否にかかわる遺伝子の探索をすすめている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Rina Higuchi, Chihong Song, Ryo Hoshina, Toshinabu Suzaki (Sep. 2018) Endosymbiosis-related changes in ultrastructure and chemical composition of *Chlorella variabilis* (Archaeplastida, Chlorophyta) cell wall in *Paramecium bursaria* (Ciliophora, Oligohymenophorea). *European Journal of Protistology* 66: 149–155. DOI: 10.1016/j.ejop.2018.09.003

Ryuhei Minei, Ryo Hoshina, Atsushi Ogura (Sep. 2018) De novo assembly of middle-sized genome

using MinION and Illumina sequencers. BMC Genomics 19: Article no. 700 (20 pages). DOI: 10.1186/s12864-018-5067-1

Ryo Hoshina, Takashi Nakada (Jan. 2018) Carolibrandtia nom. nov. as a replacement name for Brandtia Hoshina (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae). Phycological Research 66: 82–83. DOI: 10.1111/pre.12208

Ryo Hoshina, Mayumi Kobayashi, Toshinobu Suzaki, Yasushi Kusuoka (Jan. 2018) Brandtia ciliaticola gen. et sp. nov. (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae) a common symbiotic green coccoid of various ciliate species. Phycological Research 66: 76–81. DOI: 10.1111/pre.12194

保科 亮 (Jul. 2017) クロレラ分類の現在. 藻類 65: 115-117.

[学会発表](計 19 件)

嶺井 隆平, 保科 亮, 藍川晋平, 洲崎 敏伸, 小倉 淳: 共生できなくなった偏性共生クロレラ *Chlorella variabilis* 変異株のオミクスアプローチによる共生メカニズム解明. 日本藻類学会第 43 回大会 京都 Mar. 2019.

嶺井 隆平, 保科 亮, 洲崎 敏伸, 小倉 淳: ミドリゾウリムシ共生クロレラのゲノム・トランスクリプトーム解析から明らかになった細胞内二次共生初期におけるゲノムの変化. 日本共生物学会第 2 回大会 神戸 Nov. 2018.

村瀬 佳乃, 嶺井 隆平, 保科 亮, 小倉 淳: 非共生クロレラから発見された共生クロレラ特異的的巨大ウイルス全ゲノム挿入. 日本共生物学会第 2 回大会 神戸 Nov. 2018.

保科 亮, 柴田 あいか, 河地 正伸: 織毛虫に共有される共生藻 *Carolibrandtia ciliaticola* の特性. 日本共生物学会第 2 回大会 神戸 Nov. 2018.

嶺井 隆平, 保科 亮, 洲崎 敏伸, 小倉 淳: ミドリゾウリムシ共生クロレラのゲノム・トランスクリプトーム解析から明らかになった大規模な遺伝子増加と共生の関連性. 日本原生生物学会第 51 回大会 松江 Oct. 2018.

Atsushi Ogura, Ryuhei Minei, Yoshino Murase, Ryo Hoshina: Whole genome integration of giant virus to chlorella and its implication to the evolution of giant virus and the symbiosis of chlorella and ciliates. Society for Molecular Biology & Evolution, Yokohama, July 9 2018.

嶺井 隆平, 保科 亮, 小倉 淳: ロングリード NGS MinION を用いた中型ゲノムパイプラインの構築 ~共生藻類 *Chlorella variabilis* のゲノム決定をとおして~. 日本分子生物学会第 40 回大会 神戸 Dec. 2017

村瀬 佳乃, 福本 龍馬, 嶺井 隆平, 保科 亮, 小倉 淳: クロレラゲノムに挿入された巨大ウイルス PBCV-1 の化石ゲノムの考察. 日本分子生物学会第 40 回大会 神戸 Dec. 2017

Ryo Hoshina, Mayumi Kobayashi, Toshinabu Suzaki, Yasushi Kusuoka: ‘Chlorb’ (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae) a common symbiotic green coccoid of various ciliate species. VIII Asian Pacific Phycological Forum, Kuala Lumpur, Oct. 2017.

嶺井 隆平, 保科 亮, 小倉 淳: Nanopore MiniON で共生クロレラのゲノムを決めてみました！ —サンガーシーケンサーで決定されたゲノムに MiniON は勝てるのか？—. 生命情報科学若手の会第 9 回大会 蒲郡 Oct. 2017.

Ryuhei Minei, Ryo Hoshina, Atsushi Ogura: De novo endosymbiotic green algae genome assembly Nanopore MinION. The International Conference on Genome Science: from Basic Research to Applications, Hanoi, Sep. 22. 2017.

Ryo Hoshina, Ryuhei Minei, Atsushi Ogura: Evolutionary genomics change of symbiont in relation to giant virus. The International Conference on Genome Science: from Basic Research to Applications, Hanoi, Sep. 22. 2017.

Ryo Hoshina, Mayumi Kobayashi, Toshinabu Suzaki, Yasushi Kusuoka: Study on Pelagovasicola-like ciliate with sequestered diatom chloroplasts. XV International Congress of Protistology, Prague, Jul.-Aug. 2017.

嶺井 隆平, 秋月 祐輝, 植田 侑希, 保科 亮, 小倉 淳: クロレラ共生種・自由生活種、そして巨大ウイルスのゲノム比較から迫るゲノム共進化とウイルス抵抗性. NGS 現場の会第 5 回研究会 仙台 May 2017.

保科 亮: クロレラ: 分類、生態、ゲノム、進化.... 日本藻類学会ワークショップ「クロレラと気生藻の魅力 - 採集・観察から分類・バイオマス生産」高知 Mar. 2017.

保科 亮, 早川昌志, 洲崎敏伸: 織毛虫口クソデスから得られた共生藻株について. 日本藻類学会第 41 回大会 高知 Mar. 2017.

嶺井 隆平, 秋月 祐輝, 植田 侑希, 保科 亮, 小倉 淳: クロレラ共生種・自由生活種、そして巨大ウイルスのゲノム比較から迫るゲノム共進化とウイルス抵抗性獲得機構. 日本分子生物学会第 39 回大会 横浜 Nov.-Dec. 2016

Atsushi Ogura, Yuki Akizuki, Ryuhei Minei, Ryo Hoshina: Genomic changes of symbiont for the multi-algae retaining protists. VI Euro Evo Devo, Uppsala, Sweden, Jul. 26-29. 2016.

Ryo Hoshina, Toshinabu Suzaki, Yasushi Kusuoka: Ocher-colored granules in the ciliate *Cyclotrichium* sp. are evidently diatom chloroplasts. Annual meeting International Society of Protistologists/21st International Society for Evolutionary Protistology, Moscow, Jun. 6-10. 2016.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小倉 淳

ローマ字氏名：OGURA, Atsushi

所属研究機関名：長浜バイオ大学

部局名：バイオサイエンス学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：60465929

(2)研究協力者

研究協力者氏名：楠岡 泰

ローマ字氏名：KUSUOKA, Yasushi

研究協力者氏名：洲崎 敏伸

ローマ字氏名：SUZAKI, Toshinobu

※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。