

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月23日現在

機関番号：82104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18836

研究課題名(和文) 共生クロレラがもつ細胞内共生に関連する遺伝子の探索とその機能解明

研究課題名(英文) Searching candidate genes for endosymbiosis of Chlorella to Paramecium

研究代表者

藍川 晋平 (Aikawa, Shimpei)

国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・生物資源・利用領域・任期付研究員

研究者番号：40567252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：微生物間の細胞内共生メカニズムの解明は学術的に重要なだけでなく、有用な微生物の創成などのバイオテクノロジーの基盤となると期待される。しかし細胞内共生を可能にする遺伝子およびその分子機構は十分に明らかにされていなかった。本研究では、ミドリゾウリムシに共生する共生クロレラの共生能欠損株を重イオンビームにより作出し、共生能欠損株および野生株の遺伝子発現量、遺伝子情報を比較、クロレラの細胞内共生に関わる遺伝子を探索した。その結果、有意に発現量の異なる数種の遺伝子を抽出することができた。また光強度および栄養塩等の濃度において、野生株と欠損株で増殖および細胞内代謝に違いがあることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微細藻類と他の生物の細胞内共生メカニズムの解明は学術的に重要なだけでなく、メカニズム解明により、人為的に新たな共生生物を創生し、単独の生物ではできなかった新たな有用物質を生産あるいは、有用物質の生産量の増加などに貢献できると考えられる。本研究の研究成果は、細胞内共生メカニズムの一端を解明し、メカニズムの全体像の理解に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of the mechanism of intracellular symbiosis between microorganisms is not only important academically, but is expected to be the basis of biotechnology such as creation of useful microorganisms. However, genes that enable intracellular symbiosis and their molecular mechanisms have not been sufficiently clarified. In this study, we create the strain lacking symbiosis ability with Paramecium by heavy ion beam, we compared gene expression amount and gene information of the mutant and wild strain for searching the gene related to intracellular symbiosis of chlorella. As a result, it was possible to extract several types of genes with different expression levels. In addition, it was revealed that there is a difference in growth and intracellular metabolism between the wild strain and the deficient strain under different light intensity and nutrients concentration.

研究分野：植物生理学

キーワード：細胞内共生 共生クロレラ 微細藻 ミドリゾウリムシ

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 共生生物によるバイオテクノロジーの確立

細胞内共生メカニズムの解明は、生物の進化・多様化の理解など学術的に重要なだけでなく、「有用物質を高生産する生物の創成などのバイオテクノロジー技術の基盤となる」と期待される。原生動物・刺胞動物・植物は光合成微生物と共生関係をもち (Rowe et al., 2013, Reisser, 1986) 光合成生物との共生により光合成産物を享受し、貧栄養環境 (ストレス環境) での生存、生息範囲の拡大などを可能にしている。現在、代謝改変を通して、ストレス耐性や生産性向上が目指されているが、人工的に共生生物を創成することで、ストレス耐性や物質生産能をさらに向上できると考えられる。

(2) 共生クロレラとミドリゾウリムシ

Chlorella valialibis NC64A (共生クロレラ) は繊毛虫 *Paramecium bursaria* (ミドリゾウリムシ) の細胞内に共生する光合成生物であり、ミドリゾウリムシに対して、マルトースを供給、ミドリゾウリムシからアミノ酸を受容していると考えられている。共生クロレラと、クロレラを除去した白化ミドリゾウリムシはそれぞれ単独でも培養可能であり、混合することで容易に再共生させることができるため、細胞内共生を調べるうえで優れた研究対象である。

(3) ミドリゾウリムシにおける細胞内共生の成立機構

エサとして消化される微生物と同様に、まず共生クロレラは食胞膜によってミドリゾウリムシ細胞内に取り込まれる。取り込まれた共生クロレラの一部がリソソームによる消化を逃れ、食胞膜が分化した Perialgal vacuole 膜に包まれることで宿主細胞内に定着する (Kodama and Fujishima, 2008)。この細胞内共生に関わる遺伝子および分子機構を明らかにするために、共生・非共生状態のミドリゾウリムシの発現量解析が行われているが、細胞内共生に関わる遺伝子の手がかりは得られていない (Kodama et al., 2014)。

2. 研究の目的

微生物間の細胞内共生メカニズムの解明は学術的に重要なだけでなく、「有用物質を高生産する微生物の創成などのバイオテクノロジーの基盤となる」と期待される。しかし、これまでに細胞内共生を可能にする遺伝子およびその分子機構は十分に明らかにされていない。本研究ではミドリゾウリムシと共生関係をもつ、共生クロレラの細胞内共生の成立に関わる遺伝子を特定することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 共生クロレラの共生能欠損株の作出

一般的に変異源として利用されている紫外線やガンマ線など (電磁波) は散逸的にエネルギーを DNA に与えるのに対し、重イオンビームは局所的に莫大なエネルギーを与える。そのため、重イオンビームはこれまで作出し得なかった変異株を作出でき、さらに電磁波に比べて、目的形質以外の変異が少ないという特徴をもつ。日本原子力機構のイオン照射施設 TIARA にあるイオン加速器 AVF サイクロトロンを用い、深度制御種子照射装置で寒天培地上の共生クロレラに $^{12}C_5+$ イオンを照射した。照射後の藻体と白化処理後のミドリゾウリムシを混合し、再共生の可否を指標として共生能欠損株を選抜した。

(2) 共生能欠損株の遺伝子発現解析等による候補遺伝子の探索

重イオンビーム照射によって、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では同様の条件で 50 箇所程度に変異が導入されることが明らかとなっている (Matuo et al., 2006)。そのため、候補遺伝子を絞り込むためには、数十株の共生能欠損株を作出する必要がある。次世代シーケンサーを用いて、野生株と共生能欠損株のリシーケンスおよび発現量解析を行い、共生能欠損株の変異部位を調べた。そして数株の変異部位を調べ、株間で重複している遺伝子を細胞内共生に関わる遺伝子の候補として選抜した。このように発現解析情報およびシーケンス情報を集約し、短期間での候補遺伝子の絞り込みを目指した。

(3) 遺伝子組換え技術の開発と共生能欠損株の作出

共生クロレラへの遺伝子導入は緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* で導入効率が高いことが確認されている遺伝子導入装置を用いて行った。選抜した候補遺伝子を欠損させた共生クロレラ株の作出を目指した。

(4) 候補遺伝子の機能同定

共生能欠損株・復帰株の再共生過程を光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて経時的に観察し、細胞内共生の成立過程における候補遺伝子の機能の同定を目指した。

(5) 共生能欠損株の生理学的特徴の解析

共生メカニズムへの直接的な影響だけでなく、生理学的な特徴の変化のために、共生能を失っていることも予想されるため、光合成活性や光エネルギーの移動効率などの共生クロレラの生理学的な特徴の変化を調べた。光合成活性はクロロフィル蛍光や酸素電極などを用いて調べ、光エネルギーの移動効率は時間分解蛍光法を用いて調べた。

4. 研究成果

(1) 重イオンビーム照射による共生能欠損株の獲得

日本原子力機構のサイクロトロンによりシャーレ上に塗布した共生クロレラに異なる強度の重イオンビームを照射した(図1)。その結果、150~250 gly が共生クロレラの変異体作出に最適な強度であり、照射後に120株の継代培養可能な株を取得できた。それらの照射株をそれぞれ白化処理後のミドリゾウリムシと混合し、再共生実験を行った。その結果、3株の共生クロレラが共生能を欠損していた(図2)。重イオンビーム照射により、共生能欠損株の作出に成功した。

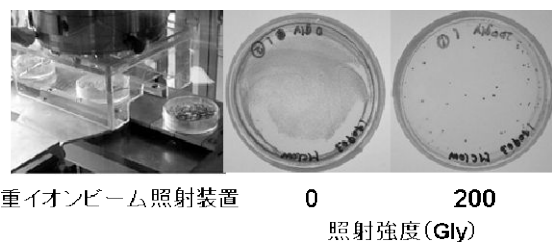


図1. 重イオンビーム照射後の試料

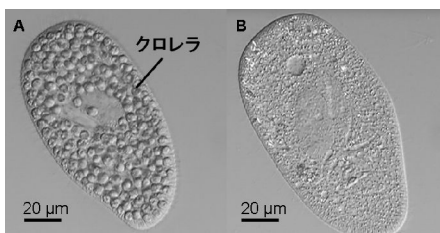


図2. 再共生後の宿主：共生能保持株(A)、共生能欠損株(B)

(2) 共生能欠損株と野生株との遺伝子発現解析およびリシーケンス

数株の共生能欠損株のリシーケンス、遺伝子発現解析の比較解析等を実施し、ミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生に関わる遺伝子を調べた。遺伝子発現解析の結果から、共生能欠損株と野生株で有意に発現量の異なる遺伝子を抽出することに成功した。

(3) 共生能欠損株の生理学的特徴の解析

共生能欠損株と野生株では、光合成電子伝達や光合成初期過程に違いがみられ、光合成初期過程を調べたところ、光合成系間の電子移動に違いがあることが明らかになった。さらに光条件などの培養条件が欠損株と野生株の増殖に及ぼす影響を調べたところ、光強度、有機炭素濃度および栄養塩等の濃度において、野生株と欠損株の増殖に違いがあることが確認できた。これらの違いも共生能に影響している可能性が示唆されるため、発現解析により得られた発現量の異なる遺伝子とこれらの生理学的な特徴との相関を調べている段階である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Ueno Yoshifumi, Aikawa Shimpei, Kondo Akihiko, Akimoto Seiji, *Photosynthesis Research*, 査読有, Adaptation of light-harvesting functions of unicellular green algae to different light qualities, 2018, 139, 145-154

DOI: 10.1007/s11120-018-0523-y

Aikawa Shimpei, Inokuma Kentaro, Wakai Satoshi, Sasaki Kengo, Ogino Chiaki, Chang Jo-Shu, Hasunuma Tomohisa, Kondo Akihiko, *Biotechnology for Biofuels*, 査読有, Direct and highly productive conversion of cyanobacteria *Arthrospira platensis* to ethanol with CaCl₂ addition, 2018, 11, 1-9

DOI: 10.1186/s13068-018-1050-y

[学会発表](計8件)

Aikawa Shimpei, Hasunuma Tomohisa, Kondo Akihiko, Enhancement of glycogen production from cyanobacteria via metabolic engineering., The 4th Asia-Oceania Algae Innovation Summit, 2016, Wuhan, China.

Ueno Yoshifumi, Akimoto Seiji, Aikawa Shimpei, Kondo Akihiko, Modification of light-harvesting functions of unicellular green algae in response to different light qualities., 第 59 回日本植物生理学会年会, 2018.

Akimoto Seiji, Ikeda Shiho, Aikawa Shimpei, Kondo Akihiko, Changes in light-harvesting and energy-transfer processes in response to CO2 concentrations., 8th International Conference "Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability-2017", 2017.

Akimoto Seiji, Aikawa Shimpei, Kondo Akihiko, Changes in excitation energy transfer processes in photosynthesis under different environments, Trombay Symposium on Radiation & Photochemistry 2018, 2018.

Aikawa Shimpei, 藻類バイオマスの変換と膜バイオプロセス, 春季講演会・膜工学サロン, 2018.

植野嘉文, 嶋川銀河, 藍川晋平, 三宅親弘, 秋本誠志, 単細胞緑藻 *Chlorella variabilis* における低 CO2 条件での光捕集機能調節, 第 9 回日本光合成学会年会, 2018.

植野嘉文, 嶋川銀河, 藍川晋平, 三宅親弘, 秋本 誠志, 蛍光分光法による酸素発生型光合成生物における光エネルギー調節機構に関する研究, 2018 年光化学討論会, 2018.

嶺井隆平、保科亮、藍川晋平、洲崎敏伸、小倉淳, 偏性共生藻 *Chlorella variabilis* の共生能欠損変異株を用いたオミクスアプローチによる細胞内共生メカニズムの解明, 日本藻類学会, 2019.

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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：荻野千秋

ローマ字氏名：(OGINO chiaki)

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。