

平成21年5月29日現在

研究種目:基盤研究(B)

研究期間:2005~2008

課題番号:17405020

研究課題名(和文) ゾウリムシとその核内共生細菌ホロスポラの世界分布図の作成

研究課題名(英文) Development of the world distribution map of the ciliate
Paramecium and its endosymbiotic bacteria *Holospora*

研究代表者

藤島 政博 (FUJISHIMA MASAHIRO)

山口大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号:40127783

研究成果の概要: 繊毛虫 *Paramecium* 属とその核内共生細菌 *Holospora* 属を野外採集し, 世界分布図に棲息が確認された場所をプロットすることを目的とし, 北欧 (フィンランド, スウェーデン, ノルウェー) とその周辺国 (エストニア, ロシア), 中国, ブラジル及びオーストラリアで現地協力者の協力を得て採集を行った。その結果, オーストラリアとブラジルで, *P. caudatum*, *P. aurelia* species, *P. bursaria*, 及び, 新種と思われる *P. bursaria* 類似の細胞を採集したが, *Holospora* 維持細胞は採集できなかった。

交付額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	4,200,000	0	4,200,000
2006年度	3,300,000	0	3,300,000
2007年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
総計	12,700,000	1,560,000	14,260,000

研究分野: 生物学

科研費の分科・細目: 生物科学・進化生物学

キーワード: 細胞内共生, 共進化, ゾウリムシ, シンジエン, ホロスポラ, 地理的隔離, 環境適応, 細胞の進化

1. 研究開始当初の背景

(1) 原生動物繊毛虫類のゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) には, syngen と呼ばれる交配反応の有無で生殖的に隔離されたグループが存在し, 種分化の初期段階と考えられている。ゾウリムシは海水では生存できず風で飛ぶシストも形成しないため, syngen の分布と進化は大陸の移動と密接な関係があると予測される。一方, ゾウリムシの核内共生細菌ホロスポラ・オブツサの増殖と維持は syngen 特異的であり (Fujishima

and Fujita, J. Cell Sci. 76, 179-187, 1985), 共生によって宿主を各種ストレスに耐性にさせ (Hori and Fujishima, J. Euk. Microbiol. 50, 293-298, 2003; Fujishima et al. FEMS Microbiol. Lett. 240, 209-213, 2004), 宿主の生存に不適な環境でも生存を可能にする。この事実は, syngen と *Holospora* が共進化することを示し, *Holospora* 依存性のゾウリムシが出現している可能性が予測される。(2) *Holospora* 属はこれまでに10種発見され, いずれも宿主の種特異性と核特異性を持ち、

北半球の比較的寒冷地に棲息する *Paramecium* 属の核内で検出されている (Fokin et al. Europ. J. Protistol. Europ. J. Protistol. 32, 19-24, 1996)。

2. 研究の目的

本研究は、野外採集によって、大陸移動による *Paramecium* 種及び *P. caudatum* の syngen の地理的隔離と syngen の進化の証明、*Holospira* とゾウリムシとの共生が syngen の進化のどこで成立したか、さらに *Holospira* 依存性のゾウリムシの出現の発見を目的に行い、解明には長期間を要するプロジェクトである。同課題での基盤研究(B) 海外の採扱は2回目である。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者と研究分担者による北欧3カ国 (フィンランド, スウェーデン, ノルウェー) とその周辺国 (エストニアのタリン, ロシアのサンクトペテルブルグ) 及びオーストラリアでの採集を行った。さらに、海外研究協力者はロシア, ドイツ, イタリアで採集を行った。また、研究代表者による、研究期間内に開催された国際会議の出張先 (ロシア, 中国, ブラジル) でも採集を行った。

(2) 現地ではプランクトンネットで濃縮した水をキムワイプで濾過してゾウリムシの天敵のミジンコ等の大型の微生物を除去したあとに、実体顕微鏡で観察して、ゾウリムシをクローニングした。帰国の際には、空港の動物検疫を経由し、研究室で培養して生細胞の微分干涉顕微鏡観察と Feulgen 染色した標本で核と細胞の形態の特徴を観察して種の判定と核内にホロスポラが存在しているかどうかを観察した。*P. caudatum* の場合は、当研究室保有の syngen の標準株と混合して交配反応性の有無から syngen と接合型の判別を試みた。*P. aurelia* species の場合は、ポーランド科学アカデミーの Ewa Prizibos 氏に株を送り、標準株との交配反応性の有無で種と接合型の同定を依頼した。

4. 研究成果

下記の採集地に約1週間滞在し、野外採集を行った。

2005年7月: 中国 (広州市)

8月: フィンランド (ヘルシンキ) とエストニア (タリン) の湖沼

12月: オーストラリア (ダーウィン) 周辺の熱帯雨林

2006年7月: 中国 (武漢市)

8月: スウェーデン (ストックホルム) 周辺の湖沼

12月: オーストラリア (アリススプリングス) 周辺の池

2007年7月: ロシア (サンクトペテルブルグ) の池

8月: ノルウェー (ベルゲン, オスロ) 周辺の湖沼

11月: ブラジル (カシャンプー) の沼

12月: オーストラリア (メルボルン) 周辺の池

2008年11月: オーストラリア (メルボルン) 周辺の温帯雨林とタスマニア

その結果、北欧と中国ではゾウリムシを採集できなかった。北欧でゾウリムシを採集できなかった理由は、気温が低く、水が比較的綺麗で餌の細菌数が少ないためと思われた。一方、中国では学会が開催された都市の湖沼で採集を試みたが、家庭排水等の混入で水の汚染がひどく、それが原因と思われる。

ロシアのサンクトペテルブルグでは、海外研究協力者が現地で採集した *P. caudatum* 5株を譲り受けた。どの syngen とも交配反応を示さず新たな syngen と思われる。

オーストラリアでは、2005年にダーウィン近郊の熱帯雨林の沼で *P. aurelia* species を1株採集した。2006年にはアリススプリングス近郊の池で *P. caudatum* 1株 (syngen 未同定)、*P. aurelia* species 30株を採集した。2007年にはメルボルン近郊の河川で *P. trichium* 5株、*Paramecium* (種名未同定) 6株、*P. bursaria* らしい株 17株を採集した。2008年にはタスマニアで *P. aurelia* species 4株を採集した。オーストラリアは2006年から大干ばつが続き、溜まり水を採す事自体が困難であった。

2007年にはブラジルのリオデジャネイロ近郊のカシャンプーで *P. aurelia* species 3株、*P. trichium* 1株、小型の *P. multimicro-nucleatum* らしい株を1株採集した。

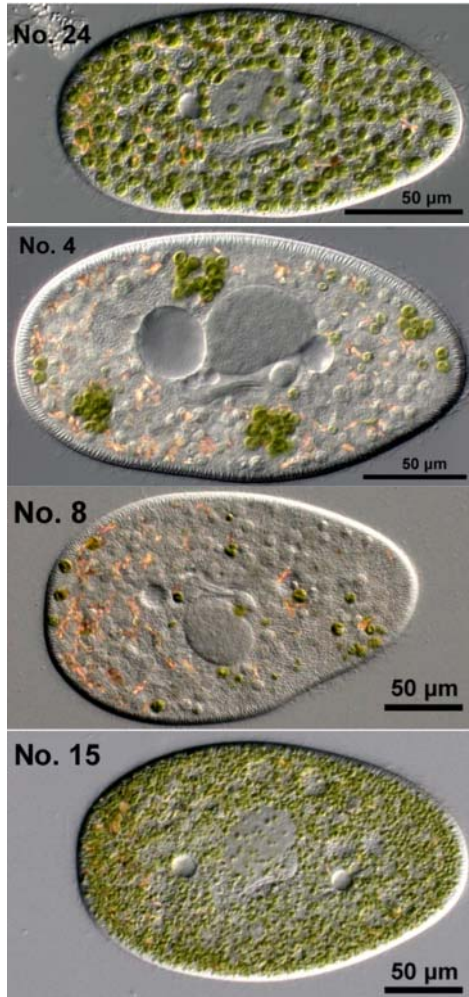
これらの *P. aurelia* species は、種名の判定がまだポーランドの Rrizzbos 氏から届いていない。メルボルン近郊で採集した *P. bursaria* らしい株の中には、下図の No. 24 の株のように通常の *P. bursaria* と形態的に同じ株もあるが、No. 4, 8 と 15 株のように細胞のサイズが普通の2倍もあり、さらにクロレラが個々に分離せずに共通の膜に複数を取り込まれた状態の No. 4 株、クロレラ数が極端に少ない No. 8、極端に小さなクロレラをもつ No. 15 株が採集された。これらは、これまでに知られる *P. bursaria* とは異なる特徴であり、*P. bursaria* かどうかの判定が必要である。オーストラリアは、ゾウリムシの研究者数と採集記録が少なく、新種が発見できる可能性は高い。

一方、ブラジルを含む南米も、ゾウリムシの採集歴がほとんどない地域であり、今回採

集した *P. aurelia* species は、ブラジルで初めての採集記録である。これまでに記載されている種と同じか、または新種かがじきに明らかにされる。

P. caudatum は今回の採集地ではほとんど採集できなかった。また、ホロスボラを持つゾウリムシは全く採集できなかった。

P. aurelia らしい細胞の種名と *P. bursaria* らしい細胞の種名が判定してから世界地図への種の分布をプロットし、研究結果を今年度中または次年度に学会や論文等で公表する。



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)

[雑誌論文] (計 17 件)

①Kodama Y. and Fujishima M. Localization of perialgal vacuoles beneath the host cell surface is not a prerequisite phenomenon for protection from the host's lysosomal fusion in the ciliate

Paramecium bursaria. Protist, 160 (2) 319-329, 2009, 査読有.

②Kodama Y. and Fujishima M. Timing of perialgal vacuole membrane differentiation from digestive vacuole membrane in infection of symbiotic algae *Chlorella vulgaris* of the ciliate *Paramecium bursaria*. Protist, 160 (1), 65-74, 2009, 査読有.

③Hori M, Fujii K and Fujishima M. Micronucleus-specific bacterium *Holospora elegans* irreversibly enhances stress gene expression of the host *Paramecium caudatum*. Journal of Eukaryotic Microbiology, 55 (6), 515-521, 2008, 査読有.

④Kodama Y. and Fujishima M. Cycloheximide induces synchronous swelling of perialgal vacuoles enclosing symbiotic *Chlorella vulgaris* and digestion of the algae in the ciliate *Paramecium bursaria*. Protist, 159 (3), 483-494, 2008, 査読有.

⑤Abamo F., Dohra H. and Fujishima M. Fate of the 63-kDa periplasmic protein of the infectious form of the endonuclear symbiotic bacterium *Holospora obtusa* during the infection process. FEMS Microbiology Letters, 280 (1), 21-27, 2008, 査読有.

⑥Tonooka Y., Mizukami Y. and Fujishima M. One-base excess adaptor ligation method for marking uncloned genomic DNA. Applied Microbiology and Biotechnology, 78, 173-180, 2008, 査読有.

⑦児玉有紀, 藤島政博. 単細胞動物ミドリゾウリムシと共生クロレラの細胞内共生の成立機構. 顕微鏡, 講座, 43(1), 60-63, 2008, 査読有.

⑧児玉有紀, 藤島政博. ミニレビュー 単細胞動物ミドリゾウリムシと共生クロレラの細胞内共生成立機構. 原生動物学雑誌, 41 (1), 15-19, 2008, 査読無.

⑨児玉有紀, 藤島政博. 総説 単細胞動物ミドリゾウリムシと緑藻クロレラの細胞内共生成立機構. 原生動物学雑誌, 41(2), 117-132, 2008, 査読無.

⑩Kodama Y. and Fujishima M. Infectivity of *Chlorella* species for the ciliate *Paramecium bursaria* is not based on sugar residues of their cell wall components, but based on their ability to localize beneath the host cell membrane after escaping from the host digestive vacuole in the early infection process. Protoplasma, 231, 55-63, 2007, 査読有.

⑪Kodama Y., Nakahara M. and Fujishima M. Symbiotic alga *Chlorella vulgaris* of the

ciliate *Paramecium bursaria* shows temporary resistance to host lysosomal enzymes during the early infection process. *Protoplasma*, 230, 61-67, 2007, 査読有.

- ⑫Hori M., Tomikawa I., Przybos E. and Fujishima M. Comparison of the evolutionary distances among syngens and sibling species of *Paramecium*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38, 697-704, 2006, 査読有.
- ⑬Iwatani K., Dohra H., Lang B. F., Burger G., Hori M. and Fujishima M. Translocation of an 89-kDa periplasmic protein is associated with *Holospira* infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337, 1198-1205, 2005, 査読有.
- ⑭Fujishima M., Kawai M. and Yamamoto R. *Paramecium caudatum* acquires heat-shock resistance in ciliary movement by infection with the endonuclear symbiotic bacterium *Holospira obtusa*. *FEMS Microbiology Letters*, 243, 101-105, 2005, 査読有.
- ⑮Kodama Y. and Fujishima M. Symbiotic *Chlorella* sp. of the ciliate *Paramecium bursaria* do not prevent acidification and lysosomal fusion of host digestive vacuoles during infection. *Protoplasma*, 225, 191-203, 2005, 査読有.
- ⑯Fokin S. I., Schweikert M. and Fujishima M. Recovery of the ciliate *Paramecium multimicronucleatum* following bacterial infection with *Holospira obtusa*. *European Journal of Protistology* 41, 129-138, 2005, 査読有.
- ⑰Lang B. F., Brinkman H., Koski L., Fujishima M., Görtz H.-D. and Burger G. On the origin of mitochondria and Rickettsia-related eukaryotic endosymbionts. Review article. *Japanese Journal of Protozoology*, 38 (2), 171-183, 2005, 査読無.

②の論文は, October-December 2008 の Protist の Agriculture and Biological Sciences と Immunology and Microbiology の領域の Top 25 Hottest Articles の 10 位に選出された。

④の論文は, April-June 2008 の Protist の Agriculture and Biological Sciences と Immunology and Microbiology の領域の Top 25 Hottest Articles の 6 位, July-September 2008 では 16 位, October-December 2008 では 23 位に選出された。

[学会発表] (計 47 件、下記はその一部)

- ①Fujishima M. Infection and maintenance of *Holospira* in *Paramecium*. International Symposium on Protistology. Evolution and Diversity. Nov. 8, 2008, Tsukuba University. 招待講演.
- ②藤島政博. ミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生成立機構. 第 41 回日本原生動物学会, 市民公開講演会, 2008 年 11 月 3 日, 筑波大学. 招待講演.
- ③村上崇史. ゾウリムシの大核特異的共生細菌ホロスポラ・オブツサと宿主ヒストン H4 の相互作用. (社) 日本動物学会第 79 回大会, 2008 年 9 月 7 日, 福岡大学.
- ④藤島政博. ゾウリムシの核内共生細菌ホロスポラは宿主食胞膜に穴を開けて細胞質に脱出する. (社) 日本動物学会第 79 回大会, 2008 年 9 月 7 日, 福岡大学.
- ⑤児玉有紀. 共生クロレラを包む PV 膜は宿主リソソームの融合阻止能力を持つ. (社) 日本動物学会第 79 回大会, 2008 年 9 月 7 日, 福岡大学.
- ⑥藤島政博. 核内共生細菌ホロスポラの標的核への感染はラトランキュリン B で阻害される. (社) 日本動物学会第 78 回大会, 2007 年 9 月 20 日, 弘前大学.
- ⑦児玉有紀. ミドリゾウリムシと共生クロレラの細胞内共生成立機構. 第 71 回日本植物学会シンポジウム「藻類学・プロティストロジーが招く植物科学」, 2007 年 9 月 7-9 日, 東京理科大学. 招待講演.
- ⑧Kodama. Timing of differentiation of perialgal vacuole membrane from digestive vacuole membrane of the ciliate *Paramecium bursaria* during infection with symbiotic algae *Chlorella vulgaris*. V European Congress of Protistology and XI European Conference on Ciliate Biology, July 26, 2007, St. Petersburg, Russia.
- ⑨M. Fujishima. Infection of *Holospira* is controlled by 89-kDa periplasmic protein and the host actin. V European Congress of Protistology and XI European Conference on Ciliate Biology, July 26, 2007, St. Petersburg, Russia.
- ⑩Abamo F. Fates of 63-kDa periplasmic protein of infectious form of endonuclear symbiotic bacterium *Holospira obtusa* during infection process. 第 39 回日本原生動物学会, 2006 年 11 月 18 日, 西九州大学.
- ⑪中村欽光. 感染型の核内共生細菌ホロスポラは宿主に選択的食胞形成を誘導する. 第 39 回日本原生動物学会, 2006 年 11 月 18 日, 西九州大学.

- ⑫児玉有紀. 感染初期過程でのクロレラのミドリゾウリムシに対する感染能は食胞から脱出したクロレラが細胞表層に定着できるかどうか依存する. 第39回日本原生動物学会, 2006年11月18日, 西九州大学.
- ⑬Iwatani K. Translocation of an 89-kDa periplasmic protein is associated with *Holospira* infection. 7th Asian Ciliate Biology Meeting, July 17, 2006, Wuhan, China.
- ⑭Kodama Y. Protein synthesis of symbiotic *Chlorella vulgaris* of the ciliate *Paramecium bursaria* is required to protect the alga from the host lysosomal digestion in early infection process. 7th Asian Ciliate Biology Meeting, July 17, 2006, Wuhan, China.
- ⑮藤島政博. ゾウリムシは核内共生細菌ホロスボラの感染で各種温度耐性を獲得する. 第77回日本動物学会, 2006年9月22日, 島根大学.
- ⑯西嶋綾子. ミドリゾウリムシの共生クロレラは共生クロレラ特異的な細胞壁抗原を発現している. 第77回日本動物学会, 2006年9月22日, 島根大学.
- ⑰児玉有紀. クロレラの感染とミドリゾウリムシ食胞内酸性フォスファターゼ活性の出現時期. 第77回日本動物学会, 2006年9月22日, 島根大学.
- ⑱岩谷綱一. 核内共生細菌ホロスボラオブツサの先端特異的なタンパク質89Kの感染時における動態. 第38回日本原生動物学会. 2005年10月14日, 帯広畜産大学.
- ⑲児玉有紀. ミドリゾウリムシとクロレラの感染過程に対するタンパク質合成阻害剤の影響について. 38回日本原生動物学会. 2005年10月14日, 帯広畜産大学.
- ⑳中村欽光. ホロスボラオブツサの感染は宿主のパラメシウムカウダツムの食胞形成能を変化させる. 38回日本原生動物学会. 2005年10月14日, 帯広畜産大学.

[図書] (計3件)

- ①Kodama Y. and Fujishima M. Chapter 2, Infection of *Paramecium bursaria* with symbiotic *Chlorella* species. In, *Endosymbionts in Paramecium*. Microbiology Monographs Vol. 12, Fujishima M. (Ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.31-55, 2009.
- ②Fujishima M. Chapter 8, Infection and maintenance of *Holospira* species in *Paramecium caudatum*. In, *Endosymbionts in Paramecium*. Microbiology Monographs Vol. 12, Fujishima M. (Ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg,

pp.200-224, 2009.

- ③Fujishima M. and Kodama Y. Environmental adaptation of *Paramecium* by endosymbionts and application to remediation of ecosystem. pp. 1-15. In, *Proceedings of Infrastructure and Environmental Management Symposium in Yamaguchi 2008*, Miyamoto A, Fujishima M. (Eds), Sankyo Insatsu, pp.2-15, 2008. (ISBN-9901161-9-4 C3060)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

- ①名称: リガーゼを用いた塩基置換方法
発明者: 藤島政博, 水上洋一, 殿岡裕樹
権利者: 同上
種類: 実用新案権
番号: 特願2007-194777
出願年月日: 平成19年7月26日
国内外の別: 国内
- ②名称: DNA断片の製造方法
発明者: 藤島政博, 水上洋一, 殿岡裕樹
権利者: 同上
種類: 実用新案権
番号: 特願2006-349873
出願年月日: 平成18年12月26日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~biology/fujishima.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤島 政博 (FUJISHIMA MASAHIRO)
山口大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 40127783

(2) 研究分担者

道羅 英夫 (DOHRA HIDEO)
静岡大学・遺伝子実験施設・准教授
研究者番号: 10311705

(3) 連携研究者 なし

(4) 海外研究協力者

GORTZ Hans-Dieter
シュツツガルト大学・生物学部・教授
FOKIN Sergei
サンクトペテルブルグ大学・生物学部・教授

