

令和元年6月13日現在

機関番号：21401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06979

研究課題名(和文) 共生メタン菌を環境中から獲得する嫌気性繊毛虫：共生系確立の分子基盤を解明する

研究課題名(英文) Elucidating the molecular basis of symbiotic association between anaerobic ciliates and their endosymbionts

研究代表者

竹下 和貴 (TAKESHITA, Kazutaka)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：40799194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：一部の自由生活性嫌気性繊毛虫は、メタン生成古細菌および機能未知の真正細菌との3者間共生系を確立させている。この共生現象の分子基盤の解明に迫るため、本研究では、長期間安定的に培養されているトリミアマ属の嫌気性繊毛虫を対象に、摂食RNAi実験系の構築を目指した。本研究期間中に実験系構築の成功には至らなかったが、引き続き条件検討を進めていく予定である。一方で新たな嫌気性繊毛虫の培養株(GW7株)の取得に成功し、その共生メタン生成古細菌と共生真正細菌を同定した結果、この共生真正細菌が好気性繊毛虫の核内共生真正細菌と近縁であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新たに培養に成功したGW7株の共生真正細菌が、好気性繊毛虫(ゾウリムシ)の核内共生真正細菌と近縁関係にあることを示した。好気性繊毛虫と嫌気性繊毛虫の各共生系間にこのような共通性を見出したのは本研究が初めてである。今後同様の培養法を用いて新たな培養株の取得を続けていくこと、また、今回成功に至らなかった摂食RNAi実験系を完成させることで、未だ多くが謎に包まれている繊毛虫における共生系の多様性を理解し、本共生系の進化を解明することにつながると考えている。

研究成果の概要(英文)：Some free-living anaerobic ciliates establish tripartite symbiotic relationships with methanogenic archaea and bacteria with unknown functions. To elucidate the molecular basis of these symbioses, I tried to apply “feeding RNAi experiment” established in aerobic ciliates, *Paramecium* spp., to a cultured anaerobic ciliate of the genus *Trimyema*, which has been stably maintained for over 20 years in the laboratory. The application has not yet succeeded but I continue to try to apply it. On the other hand, an anaerobic ciliate, strain GW7, has been newly isolated successfully. I taxonomically identified its methanogenic and bacterial endosymbionts based on their 16S rRNA sequences and revealed that the bacterial symbiont is phylogenetically related to the intranuclear symbionts of aerobic ciliates.

研究分野：共生微生物学

キーワード：細胞内共生 原生生物 繊毛虫 嫌気 RNAi

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

1. 研究開始当初の背景

嫌気環境に生息する自由生活性の繊毛虫(単細胞真核生物)の一部は、代謝により発生する水素を消費してメタン生成を行うメタン菌(古細菌)と機能未知のバクテリア(真正細菌)を細胞内に共生させている(Esteban *et al.*, *Eur J Protistol*, 1993; Shinzato *et al.*, *Microb Ecol*, 2007 など)。生物界ドメインの異なる 3 者間共生という興味深い研究対象にも関わらず、この共生現象に関するこれまでの研究は、共生微生物の同定およびそれらの繊毛虫内での局在観察といった共生系の記載を中心としたものであった。その最大の要因は、嫌気性繊毛虫を実験室内で安定的に培養することの困難さにあり、この細胞内 3 者間共生を成立・維持させている分子基盤に迫ることは、これまで非常に困難であった。そのような状況の中、申請者の所属していた研究室では、環境中より単離したトリミアマ属(*Trimyema*)の嫌気性繊毛虫(以下、トリミアマ原虫)を 10 年以上に渡って安定的に培養できていた。

一方で、培養が比較的容易な好気性繊毛虫のゾウリムシ(*Paramecium*)では、線虫で確立した RNAi 法による遺伝子抑制実験系が早くから取り入れられ(Galvani & Sperling, *Trends Genet*, 2002)、ゲノム情報も既に解読されていることから(Aury *et al.*, *Nature*, 2006)、分子細胞生物学におけるモデル生物として様々な遺伝子の機能解析が進んでいた。よって、嫌気性繊毛虫として安定的培養に世界で唯一成功しているトリミアマ原虫に、近年発展の著しい実験技術(次世代シーケンズ技術や、RNAi 法による遺伝子発現抑制技術、CRISPR-Cas9 によるゲノム改変技術など)を適用することができれば、このトリミアマ原虫をモデル共生系として、この興味深い細胞内 3 者間共生の分子基盤に実験的アプローチで迫ることが可能となると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、嫌気性繊毛虫に見られる生物界ドメインの異なる細胞内 3 者間共生を成立・維持させている分子基盤を実験的に解明することである。この目的のため、嫌気性繊毛虫の中で唯一安定的に長期培養に成功しているトリミアマ原虫を対象に、この細胞内 3 者間共生の分子基盤へ実験的にアプローチ可能なモデル共生系を立ち上げることを目指した。具体的には、下記に示す 2 つの実験系を構築することを目指す。

- (1) 共生メタン菌の再獲得実験系
- (2) 摂食 RNAi 法による遺伝子発現抑制実験系

加えて、嫌気性繊毛虫における共生系の多様性を理解することを目的とし、(3)トリミアマ原虫と同様の培養法により、新たな嫌気性繊毛虫の安定培養株の取得も目指した。

3. 研究の方法

(1) 共生メタン菌の再獲得実験系の構築

嫌気グローブボックスを用いて、トリミアマ原虫より共生メタン菌 TS1 株(Shinzato *et al.*, *Microb Ecol*, 2007)の単離培養を試みた。また、薬剤処理により TS1 株を欠落させたトリミアマ原虫の共生メタン菌欠落系統の樹立も試みた。

先行研究(Wagener *et al.*, *Arch Microbiol*, 1990)に従い、薬剤処理により TS1 株を欠落させたトリミアマ原虫に培養した TS1 株を与えることで、共生メタン菌の再獲得実験系を再構築する計画であった。しかし、TS1 株の単離培養およびトリミアマ原虫の共生メタン菌欠落系統の樹立が成功に至らなかったため、実験系の再構築は断念した。

(2) 摂食 RNAi 法による遺伝子発現抑制実験系の構築

好気性繊毛虫のゾウリムシで既に確立している摂食 RNAi 法による遺伝子抑制実験系(Galvani & Sperling, *Trends Genet*, 2002)をトリミアマ原虫に適用する。まずは、ゾウリムシで RNAi 効果が確認されている致死性や運動性に関わる遺伝子をターゲットとし、dsRNA 発現用プラスミド(L4440)へターゲット遺伝子部分配列のクローニングを行った。作製したプラスミドを用いて宿主大腸菌(*E. coli* HT115)の形質転換を行った。

作製した形質転換体は、IPTG 存在下でターゲット遺伝子部分配列の dsRNA を発現する。IPTG 存在下で培養した形質転換体を集菌、回収し、トリミアマ原虫へとエサとして与えた(摂食 RNAi 実験)。摂食 RNAi 処理後、培養液中のトリミアマ原虫の細胞数のカウントおよび顕微鏡による表現型観察により遺伝子発現抑制効果を確認した。

(3) 新たな嫌気性繊毛虫の安定培養株の取得

トリミアマ原虫で成功している培養法を用いて、下水処理水より新たな嫌気性繊毛虫の培養を試みた。培養株が得られたため、18S rRNA, 16S rRNA 遺伝子の配列を決定することで、宿主繊毛虫および共生微生物を同定した。加えて、各種顕微鏡観察を行い、共生微生物の細胞内局

在観察を行った。

4. 研究成果

(1) 共生メタン菌の再獲得実験系の構築

嫌気グローブボックス内にて共生メタン菌 TS1 株の単離培養を試みるも、成功には至らなかった。

また、2-プロモエタンスルホン酸ナトリウムの培養液へ添加することで、TS1 株を欠落させたトリミアマ原虫系統の樹立を試みたが、継代培養するにつれトリミアマ原虫の細胞数が減少してしまい、安定したメタン菌欠落系統は樹立できなかった。目指した共生メタン菌の再獲得実験系の構築には至らなかったものの、トリミアマ原虫と共生メタン菌間の確固たる相互依存性が再確認されたと言える。

(2) 摂食 RNAi 法による遺伝子発現抑制実験系の構築

ゾウリムシで致死性を示す遺伝子をひとまずのターゲットとした。ゾウリムシの配列をもとに、研究協力者の新里尚也准教授（琉球大学・熱帯生物圏研究センター）の所有するトリミアマ原虫のトランスクリプトームデータを探索し、ターゲットのオルソログを同定した。同定したオルソログの部分配列を専用の特殊なプラスミド（L4440）へクローニングし、IPTG による誘導でその部分配列を dsRNA として発現するエサ大腸菌株の作製に成功した。

IPTG 添加により dsRNA を発現させた状態で集菌、回収したエサ大腸菌をトリミアマ原虫培養液へと添加することで、トリミアマ原虫での摂食 RNAi 法を試みた。処理後、3 日ごと 3 週間に渡り培養液中のトリミアマ原虫細胞数をカウントしたが、コントロール区と処理区でトリミアマ原虫細胞数に明確な違いは見られなかった。本研究期間中にトリミアマ原虫での摂食 RNAi 法の確立には至らなかったが、今後も引き続き摂食実験の条件検討を行う予定である。

(3) 新たな嫌気性繊毛虫の安定培養株の取得

トリミアマ原虫の培養成功例を参考に、環境中から新たな嫌気性繊毛虫培養株の取得を試みた。その結果、沖縄県内の下水処理場より、トリミアマ原虫とは系統の異なる体長 30 μm 程度の嫌気性繊毛虫（GW7 株）の培養に成功した。16S rRNA 遺伝子の配列決定に基づき GW7 株の共生微生物の同定を試みた結果、GW7 株はトリミアマ原虫とは異なる系統の共生メタン菌および共生バクテリアをその細胞内に保持していることが明らかとなった（図参照）。また、透過型電子顕微鏡観察により、宿主の細胞内小器官であるヒドロゲノソームと共生メタン菌、共生バクテリアが複合体を形成するかたちで GW7 株の細胞内に局在していることもわかった。さらに、分子系統解析の結果、興味深いことに、この共生バクテリアが好気性繊毛虫（ゾウリムシ）の核内共生細菌と近縁関係にあることが判明した。好気性繊毛虫と嫌気性繊毛虫の各共生系間に共通性を見出したのは本研究が初めてである。今後同様の培養法を用いて新たな培養株の取得を続けていくことで、繊毛虫における共生系の多様性を理解し、共生系の進化を解明することにつながると考えている。また、今回得られた GW7 株へ摂食 RNAi 法を適用することも検討していく予定である。

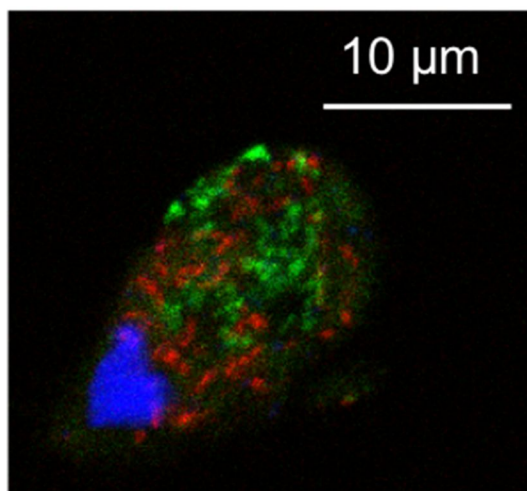


図 GW7 株の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション像。緑：共生メタン菌；赤：共生バクテリア；青：宿主細胞核；をそれぞれ染色している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

Kazutaka Takeshita, Takanori Yamada, Yuto Kawahara, Takashi Narihiro, Yoichi Kamagata, Naoya Shinzato. Tripartite partnership with methanogenic and bacterial endosymbionts in an anaerobic scuticociliate strain GW7. ISME17, Leipzig, Germany, Aug 2018.

竹下 和貴, 山田 尊貴, 川原 邑斗, 成廣 隆, 鎌形 洋一, 新里 尚也. 嫌気性繊毛虫におけるメタン菌、バクテリアとの共生関係. 日本微生物生態学会第 32 回大会, 沖縄コンベンションセンター, 2018 年 7 月.

竹下 和貴, 山田 尊貴, 成廣 隆, 鎌形 洋一, 新里 尚也. 培養に成功した嫌気性繊毛虫 GW7 株における 3 者間共生. 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合同大会, 筑波大学, 2017 年 11 月.

竹下 和貴, 山田 尊貴, 成廣 隆, 鎌形 洋一, 新里 尚也. 培養に成功した嫌気性繊毛虫シクリディウム原虫 における 3 者間共生. 環境微生物系学会合同大会 2017, 東北大学, 2017 年 8 月.

〔図書〕(計 1 件)

Naoya Shinzato, Kazutaka Takeshita, Yoichi Kamagata. 2018. Methanogenic and Bacterial Endosymbionts of Free-Living Anaerobic Ciliates. p. 37–53. In: Hackstein J. (eds) (Endo)symbiotic Methanogenic Archaea. Microbiology Monographs, vol 19. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-98836-8_4.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/view/kazutakatakeshita/home>

6 . 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：新里 尚也

ローマ字氏名：SHINZATO, Naoya

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。