

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06814

研究課題名(和文)藻類と原生動物における細胞内共生形態の解明

研究課題名(英文)Elucidation of endosymbiosis in algae and protozoa

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：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(MARP)がいる。しかし、それら共生藻の種、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。本研究では、繊毛虫ラッパムシ属を中心とし、DNA比較による共生形態の多様性を調査した。またMARPのモデル生物である、ミドリゾウリムシ-共生クロレラを用い、共生・非共生条件下における共生クロレラの比較トランスクリプトーム解析をおこなうことで、MARP内で何が起きているのかを探った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多様性研究においては、日本新産となる *Stentor pyriformis* (繊毛虫ラッパムシ属)の発見が大きい。本種は超貧栄養水域に優先的に繁茂する。本種の細胞内は、共生に特化したクロレラの種類とデンプン粒に満たされており、植物様のストラテジーによって、貧栄養下を生き抜いているものと考えられる。また、ミドリゾウリムシ-クロレラ共生系を用いた比較トランスクリプトーム解析では、クロレラが単独培養よりも共生下において光吸収効率と炭素固定能力が亢進し、宿主への糖(マルトース)供給が増加することが判明した(現在論文を投稿中)。すなわち、細胞内共生に関する研究が今後とも重要であることを確認した。

研究成果の概要(英文)：In freshwater areas, there are various protozoa (MARP) that coexist with a large number of spherical green algae in their own cells. However, there are many unclear points such as the species of these symbiotic algae, the stability of the symbiotic relationship, the regional dependence, and the existence of mutual merits due to symbiosis. In this study, we investigated the diversity of symbioses by comparing DNA, focusing on the genus *Stentor*. We also investigated what is happening in MARP by performing a comparative transcriptome analysis of symbiotic *Chlorella* under symbiotic and non-symbiotic conditions using *Paramecium bursaria*-symbiotic *Chlorella*, which is a model organism of MARP.

研究分野：進化・多様性

キーワード：細胞内共生 光合成亢進 藻類 繊毛虫

### 1. 研究開始当初の背景

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緑色球状藻を共生させる様々な原生動物があり、申請者らはひとくくりに MARP (Multi-algae retaining protists)と呼んでいる。これら MARP の共生状態について、多くの研究者は一時的な現象と考えてきた。繊毛虫ミドリゾウリムシは MARP のモデル生物であり、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* (トレボウクシア藻綱クロレラ科)のどちらかである。両共生藻は単独培養可能だが、栄養要求、光合成産物(糖: マルトース)の細胞外への漏出(宿主への供与と考えられている)が激しい。また、天然下に高濃度で存在するウイルスに致死感受性もある。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ることがわかってきた。しかし、他の MARP の共生状態については、保有する共生藻の種、共生の安定性、共生による生理的、生態学的メリットなど、ほとんど何もわかっていない。

### 2. 研究の目的

**多様性解析:** 本研究では MARP を採集し、種々の MARP が持つ共生藻の正体を突き止める。MARP 共生藻の種レベルでの同定例はほとんどなく、DNA 解析による正確な同定例は皆無に近い。共生藻がクローン化されているかどうかについても確認する。ITS rRNA など可変領域に着目した継続的な調査により、たとえ同一種の共生藻だとしても、それが固定されたものか、あるいは入れ替えがおきているのかを探っていく。多地域でのサンプリングにより、共生形態の多様性・普遍性を明らかにする。

**比較ゲノム・トランスクリプトーム:** クロレラ科には「自由生活種」、「基本的に自由生活だが共生可能な種」、生理特性などから「共生体としてのみ生きられる種」がいる。これら近縁ながらも共生特性を異にする種の比較ゲノム解析をおこなう。この結果から共生を可能にする変異や自立生活を不可能にさせる変異が何であるのかを探っていく。また、細胞内共生において、実際に起きている現象を確認するために、共生時、非共生時の共生藻の比較トランスクリプトーム解析をおこなう。

### 3. 研究の方法

**多様性解析:** 採取した MARP を洗浄、宿主ごと DNA を抽出し、スペシフィックプライマーを用いて宿主・共生種それぞれの DNA 解析をおこなった。ダイレクトシーケンシングにより、共生藻の大まかなクローン状態が判明する。ターゲットとするのは、宿主では主に SSU rDNA、共生種では SSU-ITS1-5.8S-ITS2 rDNA とした。

**比較ゲノム・トランスクリプトーム:** 細胞内共生分野でモデル生物となっているミドリゾウリムシでは、細胞を破碎して内部の共生藻(*Chlorella variabilis*)を取り出し、共生藻を単独培養できる。また、除草剤により共生藻を除去(ホワイトセル)し、これらを用いて再共生試験が可能である。本研究では、共生藻の単独培養時、ホワイトセルに再共生させ共生体としての増殖時、また共生体が増殖し終えた定常時の共生藻について比較トランスクリプトームをおこなった。

### 4. 研究成果

(1)ロクソデス繊毛虫より単離された巨大球状緑色藻の分類

淡水の原生動物は、しばしば球状の緑色藻を細胞内に保有する。繊毛虫においては、おそらくその細胞サイズが大きいため、1 宿主細胞内に数百の球状藻を保有するのが常である。南大東島での共生藻保有原生動物の調査中、十数個の巨大な球状藻を保有するロクソデス繊毛虫が見つかった。ロクソデスより単離した球状藻の培養に成功し、その詳細を探った。

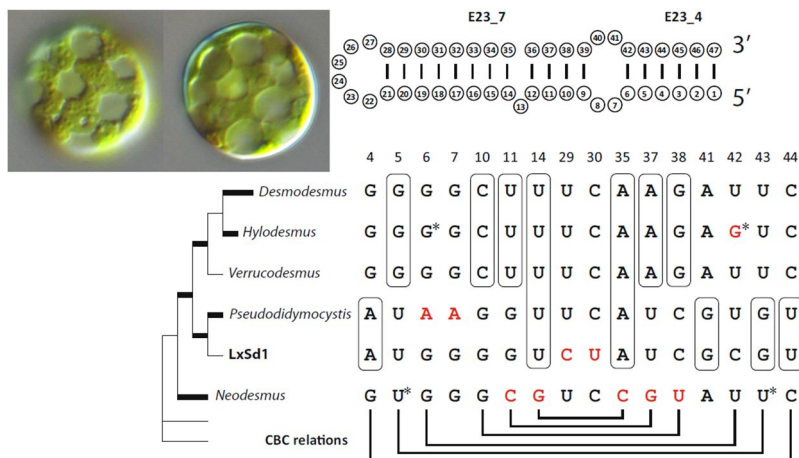


図 1. *Pediludiella daitoensis* (LxSd1) の光顕像(左上)と SSU rRNA helix E23 上の相補的置換比較

図 1. *Pediludiella daitoensis* (LxSd1) の光顕像(左上)と SSU rRNA helix E23 上の相補的置換比較

SSU rDNA による系統解析から、本藻が緑藻綱イカダモ科の *Pseudodidymocystis* spp. にもっとも近縁なことが分かったが、それでもなお 39 塩基以上の相違があった。SSU rRNA の二次構造を比較したところ、両者の間には 8 コの相補的塩基置換(CBC)が含まれた。これら CBC を第一義として、本藻を新属新種、*Pediludiella daitoensis* と記載した。

本藻は培養下において直径 30  $\mu\text{m}$  にもなる。細胞内に大型の顆粒が蓄積することで細胞質が網目状となり、サッカーボール(アディダス Telstar)を想起させる。属名 *Pediludiella* はサッカーボールの意。近年、緑色藻類における種分類は確立されつつあるが、属の定義は画一的なものがなく、曖昧なままとなっている。本研究では藻類の形態形質に頼らず、系統と RNA の構造をもとに新属を定義しており、今後の藻類の分類学へ一石を投じている。

## (2) 超貧栄養環境で生きるラップムシ *Stentor pyriformis* の研究

ラップムシ属(*Stentor*)は、その顕著なトランペット形状により、よく知られる繊毛虫である。日本の湖沼、湿原等 124 か所を調査したところ、23 か所から *S. pyriformis* の生息を確認した。本種は共生藻を持つ、ずんぐりむっくりのラップムシで、1908 年、米国でのレポートを最後に 100 年以上報告されていない種である。生息地は河川等の流入がない、雨水頼りの超貧栄養高所湿原に限られたが、そのような環境下にもかかわらず、大増殖している姿がしばしば見られた。遺伝子解析の結果から、共生している藻類は *Chlorella variabilis* であることが判明した。このクロレラはミドリゾウリムシの共生藻としても知られ、生理的に共生に特化している(宿主にマルトースを供与する)。ただし、ミドリゾウリムシのそれとは遺伝的に距離があることから、共生藻の共有は比較的古いイベントであったことが示唆される。また、ラップムシ細胞内に大量にみつける不定形の顆粒を調べたところ、アミロペクチンに富むデンプンであることが判明した。すなわち、共生クロレラが光合成による一次生産を担い、宿主に栄養を供与する。それを宿主ラップムシがデンプンとして貯蔵しておくことで、飢餓や厳冬期を乗り越え、大増殖のエネルギー源としているようだ。*S. pyriformis* は、細胞内共生のメリットを最大限に生かし、極地への進出を果たした一例といえる。

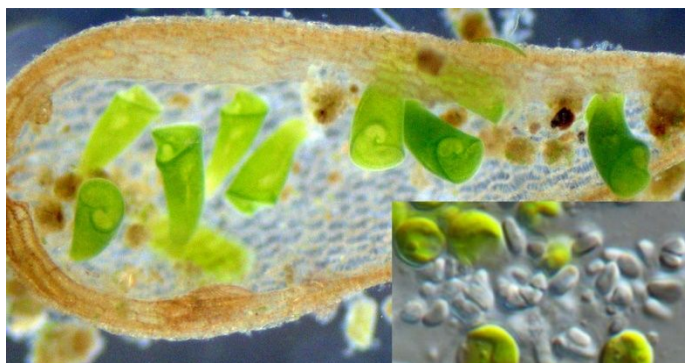


図 2. 植物デブリ上に群生する *Stentor pyriformis* と細胞内容物(右下: 緑の共生藻と透明な不定形顆粒が見られる)

## (3) その他のラップムシが保有する共生藻の多様性

上記 *Stentor pyriformis* では、調査したすべてのサンプルで保有共生藻が一様に *Chlorella variabilis* (ミドリゾウリムシのそれとは遺伝的に異なる)であったが、他の共生ラップムシでは、保有共生藻に多様性が見られることがわかってきた。これら共生藻の違いが地域性に基づくのか、あるいは他の原因があるのか、現在サンプリング地域を拡大して解析をすすめている。

## (4) 比較ゲノム・トランスクリプトーム

ミドリゾウリムシ共生藻 *Chlorella variabilis* と遺伝的に近縁な自由生活クロレラ *C. vulgaris*, *C. sorokiniana* との比較ゲノムをおこなった。一般に、共生段階が進み、宿主への依存度が高まると、共生種のゲノムサイズが減少することが知られるが、*C. variabilis* では自由生活種に比べ、むしろゲノムサイズが拡大しており、特に膜のトランスポーターや細胞壁関連遺伝子数の顕著な増加がみられた。

トランスクリプトーム解析では、各段階における共生藻(FL: 共生藻単独培養時、SL: ホワイトセルに再共生させ共生体としての増殖時、SS: 共生体が増殖し終えた定常時)の遺伝子発現レギュレーションに明瞭な差がみられた。FL と比較し、SL、SS では炭素固定、マルトース合成関連遺伝子発現が上昇。とりわけ SS ではクロロフィル合成、集光アンテナ複合体を形成するタンパク質の遺伝子発現が上昇した。すなわち、共生藻 *C. variabilis* は、単独培養よりも共生下において光吸収効率と炭素固定能力が亢進し、宿主への糖(マルトース)供給を増加させる仕組みが発達していることが判明した。

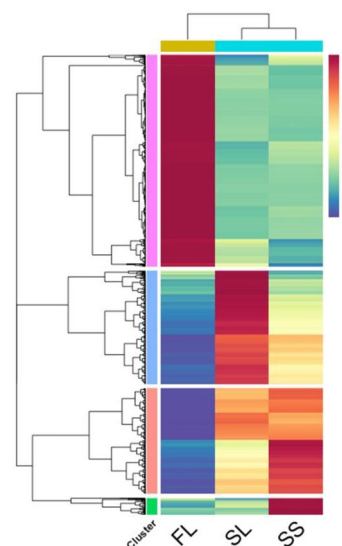


図 3. 遺伝子発現ヒートマップ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ryo Hoshina, Yuuji Tsukii, Terue Harumoto, Toshinobu Suzaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Characterization of a green Stentor with symbiotic algae growing in an extremely oligotrophic environment and storing large amounts of starch granules in its cytoplasm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 Article no 2865
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-82416-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ryo Hoshina, Masashi M Hayakawa, Mayumi Kobayashi, Rina Higuchi, Toshinobu Suzaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Pediludiella daitoensis gen. et sp. nov. (Scenedesmeceae, Chlorophyceae), a large coccoid green alga isolated from a Loxodes ciliate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 Article no. 628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-57423-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Ryo Hoshina
2. 発表標題 Multi-algae retaining protists: Exploring the diversity and role of photobionts
3. 学会等名 Joint meeting of the Japan Society of Protistology and Korean Society of Protistologists, Kobe (online) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryo Hoshina, Toshinobu Suzaki, Terue Harumoto, Yuuji Tsukii
2. 発表標題 Stentor pyriformis which was loved by late Dr. Tsukii
3. 学会等名 VIII European Congress of Protistology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Hoshina, Masashi M Hayakawa, Yuuji Tsukii, Terue Harumoto, Toshinobu Suzaki
2. 発表標題 Preferable partner? A phenomenon in which some protozoa share particular algal symbionts
3. 学会等名 XIV Endocytobiology and Symbiosis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保科 亮
2. 発表標題 月井先生のレガシー：原生生物情報サーバ
3. 学会等名 日本原生生物学会若手の会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保科 亮, 洲崎 敏伸, 春本 晃江, 月井 雄二
2. 発表標題 月井先生の愛した Stentor pyriiformis
3. 学会等名 日本原生生物学会若手の会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Nishida, Ryo Hoshina, Toshinobu Suzaki
2. 発表標題 Protists as live food to feed brine shrimp larvae
3. 学会等名 IV Asian Congress of Protistology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 洲崎 敏伸, 保科 亮, 春本晃江
2. 発表標題 過酷な貧栄養環境で生き残るための新しい「半植物」戦略としての織毛虫における藻類共生
3. 学会等名 日本共生生物学会第4回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小倉 淳 (Ogura Atsushi)  (60465929)	長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授  (34204)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------