

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：51601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16193

研究課題名（和文）単細胞生物の無代謝休眠における細胞傷害ストレス修復機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of mechanisms for stress reparation under cryptobiosis in a unicellular organism

研究代表者

十亀 陽一郎 (Sogame, Yoichiro)

福島工業高等専門学校・化学・バイオ工学科・助教

研究者番号：60769850

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、単細胞生物繊毛虫*Colpoda cucullus*（コルポータ）における無代謝休眠中の細胞障害修復機構に関する研究を行った。コルポータの繊毛虫が8000グレイ以上のガンマ線耐性を有することを明らかにしたことをきっかけに、ガンマ線の照射により損傷したタンパク質が休眠中にも関わらず修復することを明らかにした。さらに、次世代シーケンサーを利用したRNA-Seqを行うことにより、休眠シストで発現が活性化される遺伝子など、修復機構を含めた休眠シストの減少を司るしくみについて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

休眠シストは、古くからその耐性に関して研究されてきた。これまでに、乾燥、高温、低温（凍結）、酸と塩基、UVなど様々な耐性があることが報告されている。本研究では、コルポータの休眠シストに強いガンマ線耐性があることを明らかにし、休眠シストの耐性に関する知見をさらに広げることができた。また、休眠シストは、ミトコンドリアの膜電位が停止することなどから無代謝休眠の状態であると考えられてきたが、ガンマ線による細胞の障害を修復していることを明らかにした。その修復機構に始まり、休眠シスト形成の現象を司る因子（遺伝子）も同定することができ、休眠シストの理解にさらに繋がったと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, I analyzed mechanisms for cell repair of unicellular ciliate *Colpoda cucullus* in the process of resting cyst formation. I found that *Colpoda* resting cysts tolerate to more than 8000 Gy gamma radiation and proteins damaged by gamma radiation can be repaired in the cryptobiotic process of the resting cyst formation. In addition, RNA-Seq using next-generation sequencing revealed that some mechanisms controlling the resting cyst formation, including the cellular repair mechanism. Many genes whose expression level is up-regulated or down-regulated in resting cysts were identified.

研究分野：動物生理学

キーワード：無代謝休眠 原生生物 繊毛虫 細胞修復 ガンマ線

1. 研究開始当初の背景

単細胞生物繊毛虫 *Colpoda cucullus* コルポーダに代表される自由生活型(非寄生性)単細胞生物の劣悪環境に対する適応戦略は、乾燥などの環境ストレスに対する耐性を有する休眠細胞(シスト)を形成することである(シスト化)。休眠シスト細胞では、ミトコンドリアの膜電位が停止し、一部のミトコンドリアが分解されることが報告されており¹⁾⁻²⁾、休眠シスト細胞は、繊毛虫における無代謝休眠の典型的な例として考えられてきた。この状態では、細胞の代謝は完全に停止するが、乾燥、高温、低温、酸など様々な環境ストレスに対する耐性を獲得することが報告されている³⁾⁻⁷⁾。一方、環境ストレスが緩和されると、休眠状態を脱し、通常の状態に蘇生する(脱シスト)。

申請者は、本研究に先駆け、コルポーダの休眠シストが放射線耐性を有し、休眠シストの期間中に放射線照射により受けた細胞の障害を回復している可能性を予備実験にて確認した。本研究では、この現象について詳細に解析し、休眠シストのガンマ線耐性と休眠シスト期間中に行われるシスト細胞の修復機構について分子レベルで明らかにすることを目指す。申請者の知る限り休眠シストを含む無代謝休眠状態における「休眠中の細胞ストレス傷害修復機構」に関する先行研究は見当たらない。

【参考文献】

(1) Funatani et al., 2010. *Protistology* 6: -217 (2) Sogame et al., 2014. *J. Euk. Microbiol.* 61:51-60. (3) Corliss and Esser, 1974. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 95: 578-593. (4) Taylor and Stickland 1936. *Physiol. Zool.* 9:15-26. (5) Bychenkova et al., 1969. *Zool. Zh.*, 48:1772-1779. (6) Sogame et al., 2011 *African J. Microbiol. Res.* (7) 松坂 2006. *原生動物学雑誌* 39: 205-216.

2. 研究の目的

本研究の目的は、単細胞生物コルポーダを用い、新たな生命現象：無代謝休眠細胞のストレス傷害修復機構を分子レベルで解明することである。これまで、無代謝休眠に関する研究は広く行われてきたが、「休眠中の細胞ストレス傷害修復機構」に関する先行研究は見当たらない。さらに、本研究を通じて、無代謝休眠の分子機構全容の解明が期待できる。次世代シーケンサーを利用した RNA-Seq を基盤とし、通常細胞、ストレスを与えた通常細胞、休眠状態の細胞において特異的に発現している遺伝子群を網羅的に比較解析することにより、細胞ストレス傷害の修復に関わる遺伝子群を明らかにし、その分子機構を解明することを目的とする。

3 . 研究の方法

通常細胞と休眠細胞からそれぞれ total RNA を抽出、精製する。total RNA サンプルから mRNA を精製し、cDNA ライブラリーを作製する。得られた cDNA ライブラリーを次世代シーケンサーを用いて、シーケンスを行う。得られたデータ (塩基配列情報) を de novo シーケンスアセンブリしてデータベース検索することにより遺伝子を同定する。発現差解析と遺伝子オントロジー解析を行い、サンプル間において特異的に発現している遺伝子群を網羅的に比較解析することにより、シストで特異的に発現するストレス応答性の遺伝子について明らかにする。

4 . 研究成果

本研究研究期間全体を通じ、コルポータの休眠シストに関して以下の内容を明らかにした。(1)単細胞生物コルポータ休眠シストが強いガンマ線耐性(8000グレイ以上)を有すること。(2)休眠シストは無代謝休眠状態であるにもかかわらず、ストレス(ガンマ線照射)による細胞の傷害を修復すること。ガンマ照射により酸化されたタンパク質が修復され、生存率が回復する。(3)修復機構の分子機構について、休眠シスト形成過程で特定の遺伝子が発現変化し、休眠シストで特異的に発現する遺伝子を特定した。これらの研究成果が評価され、本年度は、日本原生生物学会から「奨励賞」、日本比較生理生化学会から「吉田奨励賞」を授与された。受賞記念講演では、本研究で得られた成果を中心にこれまで研究代表者が関与してきた単細胞生物の無代謝休眠に関わる研究について発表し、研究成果を広く公表した。さらに、生物休眠シストで特異的に発現する遺伝子を同定するなど次代につなげることができる研究成果や単細胞生物の土壤生態に関する研究成果など本研究に関連した研究成果も得られている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Wanner Manfred, Sogame Yoichiro, Shimizu Miki	4. 巻 87-88
2. 論文標題 Testate amoebae from two low-lying tropical islets of Tuvalu, South Pacific	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pedobiologia	6. 最初と最後の頁 150732 ~ 150732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pedobi.2021.150732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Wanner Manfred, Sogame Yoichiro, Shimizu Miki	4. 巻 83
2. 論文標題 An elevation transect study of testate amoeba communities up to 4000?m a.s.l. on Mount Kinabalu, Borneo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Protistology	6. 最初と最後の頁 125868 ~ 125868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejop.2022.125868	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 十亀陽一郎, 島野智之, 松岡光, 有川幹彦, 水津太, 松岡達臣	4. 巻 4
2. 論文標題 土壌繊毛虫コルボダの陸上環境への適応戦略: 休眠シスト形成とその環境ストレス耐性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 原生生物	6. 最初と最後の頁 5-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Ryota Saito, Tatsuya Sakai, Taiga Shimizu, Kaito Mizumachi, Ryota Koizumi, Taiki Ono, Yoichiro Sogame	4. 巻 22
2. 論文標題 Isolation of Photobacterium kishitanii Taigaleon from a local fish Mehikari (Greeneye) found near Iwaki City Japan, and possible application for water quality assessment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Science	6. 最初と最後の頁 12 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sogame Yoichiro, Kojima Katsuhiko, Takeshita Toshikazu, Kikuchi Shiho, Shimada Yuto, Nakamura Rikiya, Arikawa Mikihiro, Miyata Seiji, Kinoshita Eiji, Suizu Futoshi, Matsuoka Tatsuomi	4. 巻 59
2. 論文標題 Analysis of Water-Soluble Proteins by Two-Dimensional Electrophoresis in the Encystment Process of Colpoda cucullus Nag-1 and Cytoskeletal Dynamics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Protozoologica	6. 最初と最後の頁 107 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4467/16890027AP.20.009.13264	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 Rikiya Nakamura, Yoichiro Sogame, Mikihiro Arikawa, Futoshi Suizu, Tatsuomi Matsuoka	4. 巻 30
2. 論文標題 Tolerance of Colpoda cucullus Nag-1 wet resting cysts to extreme pH (pH 1 and 2 13): Implications of less permeability of the cyst membrane to H ⁺ and OH ⁻	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Protozoology Research	6. 最初と最後の頁 38 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Tatsuomi MATSUOKA, Yoichiro SOGAME, Rikiya NAKAMURA, Yuya HASEGAWA, Mikihiro ARIKAWA, Futoshi SUIZU	4. 巻 59
2. 論文標題 Antifreeze Water-Rich Dormant Cysts of the Terrestrial Ciliate Colpoda cucullusNag-1 at -65 °C: Possible Involvement of Ultra-Antifreeze Polysaccharides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Protozoologica	6. 最初と最後の頁 141 ~ 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4467/16890027AP.20.011.13266	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryota Saito, Tatsuya Sakai, Ryota Koizumi, Taiga Shimizu, Taiki Ono, Shuntaro Hakozaki, Sena Kobayashi, Yuta Saito, Yoichiro Sogame	4. 巻 30
2. 論文標題 Comparison of the morphology and viability of gamma irradiated vegetative cells, wet cysts, and dry cysts of the soil ciliate Colpoda cucullus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Protozoology Research	6. 最初と最後の頁 20 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito Ryota, Koizumi Ryota, Sakai Tatsuya, Shimizu Taiga, Ono Taiki, Sogame Yoichiro	4. 巻 59
2. 論文標題 Gamma Radiation Tolerance and Protein Carbonylation Caused by Irradiation of Resting Cysts in the Free-living Ciliated Protist <i>Colpoda cucullus</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Protozoologica	6. 最初と最後の頁 67 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4467/16890027AP.20.006.12674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aoki Yoshiyuki, Sogame Yoichiro, Wanner Manfred, Mazei Yuri, Shimano Satoshi D.	4. 巻 59
2. 論文標題 A New Testate Amoeba, <i>Matsakision ogawaraensis</i> sp. nov. (Silicofilosea: Incertae sedis Euglyphida) from Lake Shore Sand of Northern Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Protozoologica	6. 最初と最後の頁 99 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4467/16890027AP.20.008.12676	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ryota Saito, Ryota Koizumi, Tatsuya Sakai, Taiga Shimizu, Taiki Ono, Manfred Wanner, Toshio Takyu, Toshihiko Tanaka, Yoichiro Sogame	4. 巻 14
2. 論文標題 Recovery of proliferative capability in gamma irradiated <i>Colpoda cucullus</i> (ciliated protist) resting cysts and its radiation hormesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protistology	6. 最初と最後の頁 160 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21685/1680-0826-2020-14-3-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Wanner Manfred, Sogame Yoichiro, Shimizu Miki	4. 巻 88
2. 論文標題 Testate amoebae from two low-lying tropical islets of Tuvalu, South Pacific	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pedobiologia	6. 最初と最後の頁 150732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pedobi.2021.150732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoichiro Sogame, Ryota Saito, Tatsuya Sakai, Taiga Shimizu, Taiki Ono, Ryota Koizumi, Kaito Mizumachi	4. 巻 29
2. 論文標題 Lepidosomes acquire fluorescence after encystation: Including additional notes of morphological events during encystation and reconsideration of the morphological features in the ciliate Colpoda cucullus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Protozoology Research	6. 最初と最後の頁 53-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32268/jprotozoolres.29.1-2_51	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 Yoichiro Sogame, Ryota Saito, Ryota Koizumi, Taiga Shimizu, Taiki Ono	4. 巻 58
2. 論文標題 Evidence of Stress Recovery in Free-Living Ciliate Colpoda cucullus: The Repair Capability of Resting Cysts to Damage Caused by Gamma Irradiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Protozoologica	6. 最初と最後の頁 25-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4467/16890027AP.19.006.10837	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13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Yoichiro SOGAME , Ryota SAITO , Ryota KOIZUMI , Tomohiro SUZUKI , Tatsuya SAKAI , Hiroki , YAMANOBE , Taiga SHIMIZU , Akiko ONO , Tetsuya Aoyama , Toshihiko TANAKA , Manfred WANNER , Kozo WATANABE
2. 発表標題 Alteration of gene expression contributing to high salinity tolerance of resting cysts in Colpoda cucullus
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第43回
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 十亀陽一郎 , 齊藤 瞭汰 , 小泉 亮太 , 鈴木 智大 , 酒井 達弥 , 山野邊 裕樹 , 清水 大雅 , 小野 晶子 , 田中 利彦 , 青山 哲也 , ワーナー マンフレッド , 渡辺 幸三
2. 発表標題 Colpoda cucullus休眠シスト の塩耐性 : シストは海を渡るだろうか ?
3. 学会等名 第54回日本原生生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rikiya Nakamura , Yoichiro Sogame , Mikihiko Arikawa , Futoshi Suizu , Tatsuomi Matsuoka
2. 発表標題 Tolerance of Colpoda cucullus Nag-1 wet resting cysts to extreme pH (pH 1 and 13): Implications of less permeability of the cyst membrane to H ⁺ and OH ⁻
3. 学会等名 The 4th Asian Congress of Protistology (ACOP-IV) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoichiro SOGAME , Ryota SAITO , Ryota KOIZUMI , Tomohiro SUZUKI , Tatsuya SAKAI , Hiroki YAMANOBÉ , Akiko ONO , Sena KOBAYASHI , Shuntaro HAKOZAKI , Yuta SAITO , Toshihiko TANAKA , Kozo WATANABE
2. 発表標題 High Salinity Tolerance and Alteration of Gene Expression during Resting Cyst formation of Freshwater Soil Ciliate Colpoda cucullus
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference Online2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryota Saito , Ryota Koizumi , Tatsuya Sakai , Taiga Shimizu , Taiki Ono, Yoichiro Sogame
2. 発表標題 Analysis of Influence of Gamma Irradiation on Cell Viability, Proliferative Capability, Morphology, and Proteins in Resting Cysts of Colpoda
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference Online 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土壤纖毛虫Colpoda休眠シストにおける細胞傷害修復と発現遺伝子の解析
2. 発表標題 十亀陽一郎、小泉亮太、齊藤瞭汰、酒井達弥、清水大雅、中村瑠奈、鈴木智大
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会 2020年3月
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小泉亮太、酒井達弥、齊藤瞭汰、清水大雅、小野泰輝、十亀陽一郎
2. 発表標題 土壌繊毛虫Colpoda cucullusシスト形成におけるシスト特異的細胞構造形成過程の解析
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会 2020年3月
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 十亀陽一郎、齊藤瞭汰、小泉亮太、清水大雅、小野泰輝、酒井達弥
2. 発表標題 繊毛虫Colpoda休眠シストにおけるガンマ線耐性と細胞修復
3. 学会等名 第52回日本原生生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoichiroo Sogame, Ryota Saito, Ryota Koizumi
2. 発表標題 A New Insight into Cryptobiosis- Cell Repair in Ametabolism
3. 学会等名 International Caparica Conference on Analytical Proteomics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoichiro SOGAME, Ryota SAITO, Ryota KOIZUMI, Taiga SHIMIZU, Tatsuya SAKAI, Taiki ONO, Toshio TAKYU
2. 発表標題 Tolerance to Ionizing radiation and Irradiation Damage Repair in the Unicellular Eukaryote Colpoda cucullus
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsuya SAKAI, Taiga SHIMIZU, Ryota KOIZUMI, Ryota SAITO, Taiki ONO, Yoichiro SOGAME
2. 発表標題 Morphological Events in the Formation of Cyst-specific Cell Structures and Acquisition of Autofluorescence during the Encystment Process in Colpoda cucullus
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryota SAITO, Ryota KOIZUMI, Taiga SHIMIZU, Taiki ONO, Tatsuya SAKAI, Toshio TAKYU, Yoichiro SOGAME
2. 発表標題 Extreme Gamma Radiation Tolerance of Colpoda cucullus: Physiological and Morphological Analysis of Irradiated Cysts
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryota Koizumi, Ryota Saito, Taiga Shimizu, Toshio Takyu, Yoichiro Sogame
2. 発表標題 Effects of Cell Repair on the Excystment of Irradiated Cysts and Cell Growth of Vegetative Cells Excysted from Irradiated Cysts in Colpoda cucullus
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference (国際学会)
4. 発表年 2019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

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
---------	---------