

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06640

研究課題名(和文) 共生能を失ったクロレラ変異体を用いた細胞内共生を可能とする因子の探索

研究課題名(英文) Search for factors enabling intracellular symbiosis using a chlorella mutant that have lost symbiotic ability

研究代表者

洲崎 敏伸 (Suzaki, Toshinobu)

神戸大学・理学研究科・理学研究科研究員

研究者番号：00187692

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)：ミドリゾウリムシの共生藻NC64A株から重イオンビーム照射により、ホストへの共生能とクロレラ表層に存在するp120タンパク質を欠く突然変異体(NC64A-#48)が作出されている。p120をコードする遺伝子の配列解析を行った結果、ゲノム配列には変異は見られなかった。しかし、mRNA配列ではスプライシング異常が生じていることがわかった。NC64A株は、ミドリゾウリムシ以外にも、アメーバやラッパムシ、さらに多細胞のミドリヒドラにも共生する。これらの生物に対してもNC64A-#48株は再共生できないことがわかり、p120の機能が宿主の種を超えて一般的であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミドリゾウリムシとクロレラとの共生関係については、これまでにミドリゾウリムシの側から調べた研究が多く報告されているが、共生成立の分子機構に関する手掛かりは何も得られていなかった。そこで本研究では、研究の視点を変えて、クロレラ側からのアプローチによって、細胞内共生の分子機構を解明しようと試みた。その結果、クロレラが細胞壁上に提示しているp120タンパク質が共生包膜とクロレラとの細胞間接着を介した細胞内共生の成立と維持に不可欠であることがわかった。今回の研究結果は、さまざまな共生系に共通する分子機構の解明に繋がる可能性を示すものとして意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, a mutant strain (NC64A-#48) was created from *Chlorella variabilis* NC64A that lacks symbiotic ability with the host paramecium. The mutant also lacked p120 protein, which is normally found on the cell wall surface layer. Comparison of the genomic sequence of the gene encoding p120 showed no variation in the genomic sequence of the mutant strain. However, the mRNA sequence showed splicing aberrations for some reason, suggesting that this may be the cause of the aberrant expression of p120. In addition to Paramecium, strain NC64A is known to be symbiotic with amoebae and stentors, as well as multicellular green hydras. The NC64A-#48 strain was found to be unable to re-symbiose with these organisms, suggesting that the function of p120 is common across host species.

研究分野：原生生物学

キーワード：細胞内共生 クロレラ ミドリゾウリムシ 細胞間相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

宿主のミドリゾウリムシと共生クロレラは、二次共生の初期段階にあると考えられ、細胞内共生機構を解明する上で非常に適したモデルであるといえる。しかし、現在まで様々な研究が行われてきたが、細胞内共生の確立と維持に関わる分子の基盤はほとんど明らかになっていない。また、クロレラ側からの細胞内共生に関わる研究に至っては、宿主であるミドリゾウリムシに比べてほとんど行われていないという状況にあった。ミドリゾウリムシに共生することができるクロレラは、Chlorella 属の中においても一部に限られている。これまでも共生性のクロレラと非共生性のクロレラの比較を行っているいくつかの研究は報告されているが、共生成立に必要な因子の特定は成されていなかった。

以上のことを踏まえて、本研究ではミドリゾウリムシに共生するクロレラ NC64A 株と、NC64A に重イオンビームを照射することで作出した共生能欠損変異株である NC64A-#48 株を用い、特にクロレラ細胞表面のタンパク質に注目して比較を行うこととした。

## 2. 研究の目的

これまでの研究から、共生藻を失った変異株の表面から、p120 タンパク質が欠失していることがわかってきた。このような変異株を用いることができることが、本研究の独自性と創造性の基盤となっている。褐虫藻と刺胞動物との共生系や、マラリア原虫などの病原性微生物と哺乳動物細胞との感染系などにおいても、共生能を失った変異体の作出が試みられている。従って、将来本研究の成果との比較が可能となれば、細胞内共生系の基本原理が解明されることが期待できる。このことは、ミトコンドリアや葉緑体を獲得して進化してきた真核生物の成立機構を説明することにも繋がる可能性がある。

このような観点から、本研究では NC64A-#48 株が宿主への共生能を失った理由を探るため、1. 電子顕微鏡を用いた微細構造解析、2. 比較トランスクリプトーム解析、3. p120 タンパク質をコードする遺伝子の同定と p120 タンパク質の発現異常の原因の追究、を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 電子顕微鏡観察

本研究ではクロレラ細胞を常法に従い、グルタルアルデヒドと四酸化オスミウムを用いて化学固定することで電子顕微鏡観察を行った。エタノール脱水した試料は Spurr 樹脂に包埋し、薄切・電子染色した後に透過型電子顕微鏡 (Hitachi, H-7100) で観察を行った。

### (2) 比較トランスクリプトーム解析

次世代シーケンサー Illumina HiSeq X を用いて、NC64A と NC64A-#48 の 2 群間でのサンプルについて de novo トランスクリプトーム解析を行った。De novo トランスクリプトーム解析は主に Trinity (Haas et al., 2013) のパッケージで行った。まず、次世代シーケンサーで得られたリードに FastQC (ver. 0.11.5) によるクオリティチェックと AfterQC (ver. 0.9.3) によるトリミングを行いクリーニングした。次に Trinity (ver. 2.5.1) による de novo アセンブリーを行い、レファレンス配列を作成した。作成されたレファレンス配列にリードの塩基配列をマッピングし、kallisto (ver. 0.3.1) で発現量を推定した。さらに発現変動遺伝子を検出し、MA plot により特徴的なものを可視化した。

### (3) SDS-PAGE サンプルの調製

NC64A と NC64A-#48 のクロレラ細胞表面タンパク質の抽出は、次の通りである。まず、細胞懸濁液に sample buffer を加え、手で振り混ぜ、20 秒以内に、10,000 rpm 20 で 1 分間遠心した。その後、上清を新しいエッペンチューブに移し、95 で 5 分間加熱し、細胞表面タンパク質の SDS-PAGE 用サンプルとした。

### (4) 質量分析によるタンパク質の同定

銀染色処理をしたゲルを切り出し、NC64A から取得したトランスクリプトームデータをレファレンスとして質量分析を行った。その結果から、Mascot score 値が最も高かったものの Accession Number から目的の塩基配列を特定した。

## 4. 研究成果

### (1) NC64A と NC64A-#48 の比較トランスクリプトーム解析

NC64A と NC64A-#48 の遺伝子発現量を算出し、2 群間での差次的発現解析を行うことで

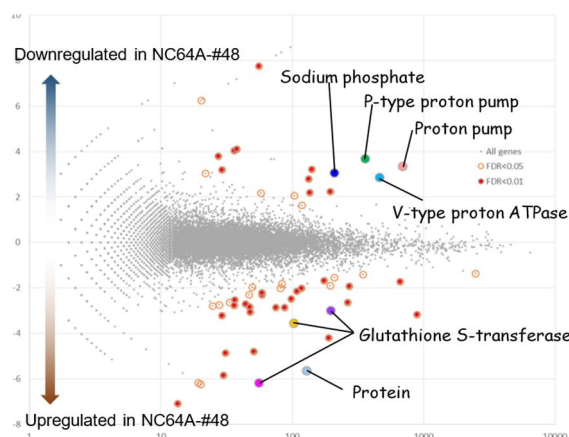


図 1. NC64A と NC64A-#48 の比較トランスクリプトーム解析 (MA-plot)

図の上半分が NC64A-#48 でダウンレギュレートされていると見られる mRNA で、下半分は NC64A-#48 でアップレギュレートされていると見られる mRNA である。

発現変動遺伝子を検出した ( 図 1 )。NCBI による BLAST 検索を行った結果、NC64A-#48 でダウンレギュレートされている mRNA にはリン酸ナトリウム共輸送体や、プロトンポンプ、V 型プロトン ATPase などが特徴的なものとして検出された。一方、アップレギュレートされている mRNA としては、グルタチオン転移酵素やプロテインコンバーターゼなどが特徴的なものとして検出された。比較トランスクリプトーム解析の結果から、NC64A-#48 でダウンレギュレートされている mRNA としてはプロトンポンプやリン酸ナトリウム共輸送体などが、アップレギュレートされている mRNA としてはグルタチオン転移酵素やプロテインコンバーターゼなどが特徴的であった。宿主とのマルトース授受に関係している可能性があるプロトン ATPase や、タンパク質活性に関与するプロテインコンバーターゼなど興味深いタンパク質が見られたが、細胞内共生成立の機構に直接関与するタンパク質は見つからなかった。また、MA plot 上では p120 の mRNA 発現は NC64A と NC64A-#48 で有意差は無く、むしろ若干 NC64A-#48 においてアップレギュレートされているという結果が得られた。

### (2) NC64A と NC64A-#48 の SDS-PAGE

NC64A と NC64A-#48 から抽出したタンパク質を SDS-PAGE によって分析した。Whole Cell タンパク質については、現れたバンドに差は見られなかったが、細胞表層から抽出されたタンパク質を比較すると、120 kDa 付近のタンパク質 ( p120 ) が NC64A-#48 では完全に消失していた ( 図 2 )。

### (3) p120 の解析

p120 のバンドを切り出し、質量分析を行った。得られた結果より、最も有意に Mascot score 値が高かった Contig を NC64A のトランスクリプトームデータ上で検索し、塩基配列を特定した。その配列を NCBI で BLAST 検索したところ、*Chlorella sorokiniana* の von Willebrand Factor ( vWF ) に 97% の相同性を持ち、E value 8e-171 のタンパク質であることが分かった。また、このタンパク質は 3 つのエフリンレセプター様ドメインを有することも分かった。さらに、SOSUI WWW Server ( BINDS ) の検索では、p120 は 1 回膜貫通型の膜タンパク質であることが予想された。vWF は動物の血管損傷部位での初期血小板接着や、血小板凝集などの作用を持つ高分子のタンパク質である。vWF はマラリア原虫のオーキネート ( 虫様体 ) でも存在が確認されている。特に vWF A ( von Willebrand Factor type A ) ドメインは接着ドメインを主成分とし、蚊の中腸との表面を繋ぐ可溶性タンパク質として、マラリア原虫の先端から分泌されて作用する可能性が報告されている。また、細胞接着因子であるインテグリンのサブユニットの全てにおいて vWF A ドメインが存在するという報告がある。これらの事から、p120 は細胞間接着に関わっている可能性が考えられる。クロレラ細胞表層に存在する p120 のエフリンレセプター様ドメインは、ミドリゾウリムシ由来の食胞膜上に存在するリガンドと接着することにより活性化し、PV 膜への変化に関与しているかもしれない。

続いて、NC64A と NC64A-#48 についてのゲノム情報を元に、予想される mRNA 配列を比較した。その結果、p120 のゲノム配列には差は無いが、NC64A-#48 の mRNA 配列の 5' 末端には本来イントロンであるはずの配列が組み込まれていることが分かった。また、開始コドンと終止コドンの位置もずれていたため、ORF が非常に短くなっていることが予想された。

本研究により、p120 がクロレラのミドリゾウリムシ細胞内への共生成立に必要な可能性が示唆された。具体的には、宿主側の PV 膜の内側とクロレラ表層との相互作用に p120 は図 3 のように働いていると考えられる。

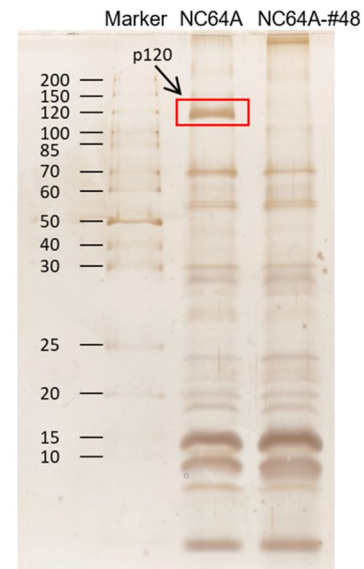


図 2 . クロレラ表層タンパク質の SDS-PAGE. 共生能を失った変異株 NC64A-#48 では p120 が欠失していた。

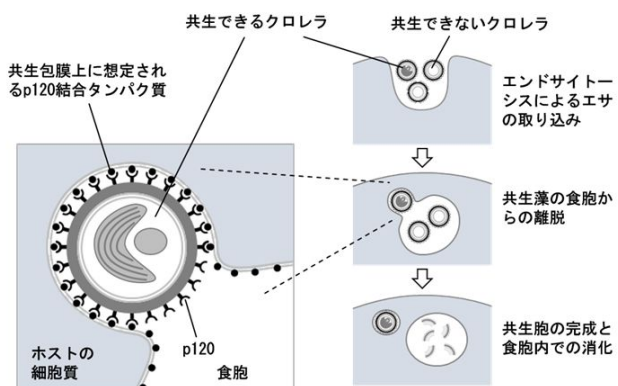


図 3 . p120 と食胞膜 ( 後の PV 膜 ) の相互作用. ミドリゾウリムシの共生クロレラの表層には、vWF 様タンパク質 p120 が存在している。P120 を欠く変異体は食胞から離脱することができず、共生が成立しないと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Liudmyla Gaponova, Toshinobu Suzaki, MD Shafiqul Islam and Andrii Kolosuik	4. 巻 53
2. 論文標題 Interaction between centrohelid and actinophryid heliozoans: Field and laboratory studies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Protistology	6. 最初と最後の頁 e004
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18980/jop.e004	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 該当する

1. 著者名 Odagaki Sin-Ichi, Maekawa Shohei, Hayashi Fumio, Suzaki Toshinobu, Morigaki Kenichi	4. 巻 736
2. 論文標題 The effects of phospholipids and fatty acids on the oligomer formation of NAP-22	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135288 ~ 135288
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2020.135288	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 Hoshina Ryo, Tsukii Yuuji, Harumoto Terue, Suzaki Toshinobu	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 2865 ~ 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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Masashi M. Hayakawa and Toshinobu Suzaki
2. 発表標題 Morphological changes in Paramecium bursaria associated with algal endosymbiosis
3. 学会等名 4th Asian Congress of Protistology（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Liudmyla Gaponova, Toshinobu Suzaki, MD Shafiqul Islam and Andrii Kolosiuk
2. 発表標題 Actinophryids-centrohelids interactions and their behavior in field and laboratory experiments
3. 学会等名 4th Asian Congress of Protistology
4. 発表年 2021年

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

1. 発表者名 Yumeng Wan and Toshinobu Suzaki
2. 発表標題 Ultrastructure and function of the kinetocyst in the centrohelid heliozoon Raphidiophrys contractilis
3. 学会等名 Joint Meeting of the Japan Society of Protistology and Korean Society of Protistologists (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Xin Yang and Toshinobu Suzaki
2. 発表標題 Involvement of mitochondria in Chlorella-Paramecium bursaria endosymbiosis
3. 学会等名 Joint Meeting of the Japan Society of Protistology and Korean Society of Protistologists (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Motomu Inoue, Shinji Izumiyama and Toshinobu Suzaki
2. 発表標題 Semi-permeability assay of Cryptosporidium oocyst wall using saturated sodium chloride solution
3. 学会等名 Joint Meeting of the Japan Society of Protistology and Korean Society of Protistologists (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Liudmyla Gaponova, Toshinobu Suzaki and Andrii Kolosuik
2. 発表標題 Interaction between centrohelid and actinophryid heliozoans in co-culture
3. 学会等名 Joint Meeting of the Japan Society of Protistology and Korean Society of Protistologists (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 洲崎敏伸, 保科 亮, 春本晃江
2. 発表標題 過酷な栄養環境で生き残るための新しい「半植物」戦略としての繊毛虫における藻類共生
3. 学会等名 第4回日本共生生物学会大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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