

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06768

研究課題名(和文)ミドリゾウリムシと共生クロレラを用いた細胞内共生の成立機構と維持機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the establishment and maintenance mechanism of endosymbiosis using *Paramecium bursaria* and symbiotic *Chlorella* sp.

研究代表者

児玉 有紀 (Kodama, Yuuki)

島根大学・学術研究院農生命科学系・教授

研究者番号：80582478

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)：ミトコンドリアや葉緑体を生み出した細胞内共生は現在でも多くの生物同士で見られ、真核細胞の進化や多様化の原動力となっている。しかし細胞内共生の成立や維持の機構はほとんど明らかにされていない。細胞内共生研究の新たなモデル生物として注目されている繊毛虫のミドリゾウリムシとその細胞質内に共生しているクロレラを用いて、以下を明らかにした。(1) クロレラが宿主食胞膜から宿主細胞質中へ脱出する際、クロレラ1細胞のみが精密にくびりとられることを明らかにした。(2) ミドリゾウリムシの細胞内にクロレラが共生すると、宿主のミトコンドリア数が減少し、その機能も低下することを複数の方法で初めて証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内共生は、原核細胞からの真核細胞の誕生や、真核細胞の進化と多様化の原動力となった普遍的生命現象で、地球上の至るところで繰り返して行われている。ヒドラやサンゴなどの刺胞動物においても、共生藻の存在により宿主のミトコンドリア関連遺伝子の発現が低下することが報告されている。これは相利共生関係における宿主ミトコンドリアとの関連の重要性や普遍性を示唆している。本研究は、細胞内共生による真核細胞の進化と多様化のメカニズムの解明のみならず、細胞内共生の成立や維持に普遍的な現象の解明、造礁サンゴと共生褐虫藻のように、藻類との細胞内共生によって保証されている生態系の維持と環境保全等にも繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Endosymbiosis, which gave rise to mitochondria and chloroplasts, is still found in many organisms and is the driving force for the evolution and diversification of eukaryotic cells. However, the mechanisms underlying the establishment and maintenance of endosymbiosis remain largely unknown. Using the ciliate *Paramecium bursaria* and its symbiotic *Chlorella* spp., which have become as new model organisms for the study of endosymbiosis, we have clarified the following. (1) Only one *Chlorella* cell is precisely pinched when *Chlorella* escapes from the host DV membrane into the host cytoplasm. (2) We showed that endosymbiotic algae affect the reduced number of host mitochondria and that mitochondrial genes are downregulated in algae-bearing *P. bursaria* cells compared to algae-free cells.

研究分野：進化生物学

キーワード：ミドリゾウリムシ クロレラ 細胞内共生 ミトコンドリア モノクローナル抗体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真核細胞内のオルガネラであるミトコンドリアと葉緑体は、10~20 億年前に起こったと考えられている「細胞内共生」の結果誕生した。この細胞内共生という現象は現在でも多くの生物同士で見られ、新たな構造と機能の獲得による真核細胞の進化や多様化の原動力となっている。しかし、細胞内共生の成立および維持機構はほとんど明らかにされていない。その最も大きな原因は、大部分の細胞内共生生物においては、互いの存在が生存に不可欠なまでに宿主と共生体の一体化が進み、細胞内共生の誘導や共生体の除去実験が困難なためである。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞内共生研究の新たなモデル生物として注目されている、繊毛虫ミドリゾウリムシと緑藻クロレラの共生系を用いて、細胞内共生成立による真核細胞の進化と多様化のメカニズムを細胞および分子レベルで明らかにすることである。ミドリゾウリムシの細胞内には約 700 細胞のクロレラが共生しており、クロレラは 1 細胞ずつ宿主の食胞膜由来の perialgal vacuole (PV) 膜と呼ばれる共生胞膜に包まれている。ミドリゾウリムシとクロレラは相利共生の関係にあるが、まだ互いの存在が生存に必須なまでに共生関係は進んでおらず、それぞれ単独での生存が可能である。これは両者の関係が細胞内共生成立の初期段階にあることを示している。それだけではなく、共生クロレラを人為的に除去した白色のミドリゾウリムシと、ミドリゾウリムシから単離した共生クロレラを混合すると、クロレラはミドリゾウリムシの細胞口から取り込まれ、食胞膜を經由して容易に細胞内共生を再開させることができる。研究代表者らは細胞内共生の同調誘導の最適条件を確立し、クロレラの再共生過程の全容を初めて解明し、再共生の成立に必須な次の 4 つのプロセスの存在を明らかにした (Kodama and Fujishima, 2005)。

クロレラ除去細胞とクロレラを混合してから 3 分以降に、アシドソームとリソソームが融合した宿主食胞内で一部のクロレラが一時的に消化酵素に耐性を示す。

30 分以降に、ダイナミンが関与する食胞膜の出芽によってクロレラが宿主細胞質中に 1 細胞ずつ遊離する。

細胞質中に遊離したクロレラを包む食胞膜が、宿主リソソーム融合を阻止する PV 膜に分化する。

共生クロレラを包む PV 膜が宿主細胞表層直下に接着して安定化し、24 時間後には細胞分裂を開始して細胞内共生を成立させる。

これまでに研究代表者らは、4 つのプロセスに関与する細胞生物学的現象を明らかにしてきた (児玉, 2019)。さらに、クロレラと共生前後のミドリゾウリムシのトランスクリプトーム解析を行い、共生によって発現が変化するミドリゾウリムシの遺伝子を初めて明らかにした (Kodama et al., 2014)。

### 3. 研究の方法

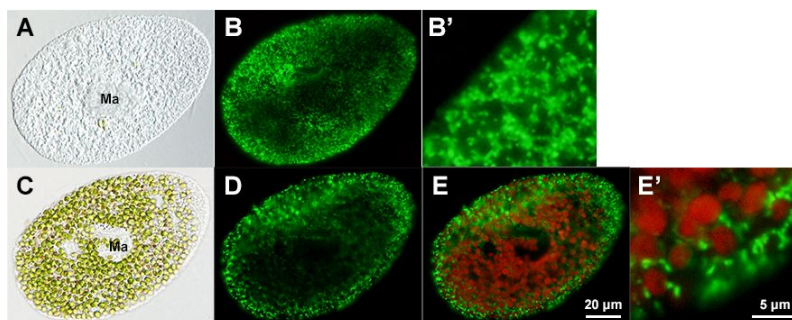
1. 透過型電子顕微鏡を用いて、クロレラが共生しているミドリゾウリムシと、人為的にクロレラを除去したミドリゾウリムシの細胞表層直下を詳細に観察した。
2. ミドリゾウリムシのトリコシストおよびミトコンドリアに対するモノクローナル抗体による間接蛍光抗体法で、クロレラが共生しているミドリゾウリムシと、クロレラ除去ミドリゾウリムシのトリコシストおよびミトコンドリアの局在性や数を詳細に調べた。
3. クロレラが共生しているミドリゾウリムシと、クロレラ除去ミドリゾウリムシのミトコンドリア膜を含む抽出液のタンパク質濃度を比較した。
4. クロレラとの共生の有無による宿主遺伝子発現の変化を明らかにしたトランスクリプトームデータを用いて (Kodama et al., 2014)、クロレラが共生しているミドリゾウリムシと、クロレラを除去したミドリゾウリムシのミトコンドリア関連遺伝子の発現量を比較した。

### 4. 研究成果

- (1) 共生クロレラは、宿主ミドリゾウリムシの細胞小器官の一種であるトリコシストと接着部位をめぐって競合している。トリコシストとクロレラの関係を知るために、クロレラ除去ミドリゾウリムシ(白色株)と保持ミドリゾウリムシ(緑色株)を数日間飢餓状態にし、ミドリゾウリムシ細胞に対する抗トリコシストモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法でトリコシスト数の変化を調べた。その結果、飢餓と暗闇の条件下で白色株のトリコシスト数が、緑色株よりも急速に減少することが明らかになった。この共生クロレラの消化メカニズムにより、宿主のミドリゾウリムシ細胞が飢餓状態でもより長期間生存する可能性がある。これは宿主のミドリゾウリムシが共生クロレラを持つことで得られる新たなメリットの一例である (Kodama and Miyazaki, 2021)。

(2) ミドリゾウリムシへのクロレラの再共生過程において、リソソームが融合した宿主食胞膜から細胞質中へのクロレラの出芽様の脱出は必須の現象である。直径  $0.20\ \mu\text{m}$  の蛍光標識ビーズをクロレラに混合することで、食胞膜からの出芽の精度を調べた。その結果、食胞膜のくびり取りは非常に精度が高く、直径の小さなビーズとクロレラが同一食胞膜内に取り込まれた状態でも、クロレラ 1 細胞のみが精密にくびり取られることが分かった。さらに、共生クロレラと共にビーズが混合されると、クロレラのみと比較して、クロレラの再共生率は大幅に低下することが明らかになったことから、食胞膜とクロレラの細胞壁との密接な接触が再共生の成立には必要であることが示唆された (Kodama and Sumita, 2022)。

(3) ミドリゾウリムシの共生クロレラは宿主ミトコンドリアと PV 膜との接着によって細胞表層直下に固定されている。共生クロレラと宿主ミトコンドリアの相互作用の可能性を検討した。その結果、ミドリゾウリムシの細胞内にクロレラが共生すると、宿主ミドリゾウリムシのミトコンドリア数が減少し、その機能も低下することを抗ミトコンドリアモノクローナル抗体や透過型電子顕微鏡による観察など複数の方法で初めて証明した。また、クロレラが共生すると、ミト



(図1) クロレラを除去したミドリゾウリムシ (A, B, B') とクロレラが共生しているミドリゾウリムシ (C, D, E, E') の間接蛍光抗体法による顕微鏡写真。緑色の蛍光はミトコンドリアを示している。(A) と (C) : 微分干渉顕微鏡写真。(B') は (B) の細胞表層直下の拡大写真。(E) は (D) とクロロフィル a の自家蛍光のマージ像。(E') は (E) の細胞表層直下の共生クロレラの拡大写真。宿主ミトコンドリアは共生クロレラの周りに局在していることが分かる (E')。クロレラを除去したミドリゾウリムシと比較すると、クロレラが共生しているミドリゾウリムシのミトコンドリアの方が密度が低いことが分かる。Ma, 大核。 Bar= $20\ \mu\text{m}$  (A, B, C, D, E)、 $5\ \mu\text{m}$  (B' と E')。

トコンドリアの膜タンパク質濃度が低下するだけでなく、ミドリゾウリムシの細胞全体のタンパク質濃度も約  $1/2$  に低下することが分かった (図1)。さらに、共生クロレラを保持する緑色細胞は白色細胞と比較すると、複数のミトコンドリア関連遺伝子の発現が低下していることが明らかになった (Kodama and Fujishima, 2022)。

#### <引用文献>

Kodama, Y. and Fujishima, M. (2005) 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. <https://doi.org/10.1007/s00709-005-0087-5>

Kodama, Y., Suzuki, H., Dohra, H., Sugii, M., Kitazume, T., Yamaguchi, K., Shigenobu, S. and Fujishima, M. (2014) Comparison of gene expression of *Paramecium bursaria* with and without *Chlorella variabilis* symbionts. *BMC Genomics*, 15, 183. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-183>

Kodama, Y. and Miyazaki, S. (2021) Autolysis of *Chlorella variabilis* in starving *Paramecium bursaria* help the host cell survive against starvation stress. *Current Microbiology*, 78, 558–565. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02304-9>

Kodama, Y. and Sumita, H. (2022) The ciliate *Paramecium bursaria* allows budding of symbiotic *Chlorella variabilis* cells singly from digestive vacuole membrane into the cytoplasm during algal reinfection. *Protoplasma*, 259, 117–125. <https://doi.org/10.1007/s00709-021-01645-x>

Kodama, Y. and Fujishima, M. (2022) Endosymbiotic *Chlorella variabilis* reduces mitochondrial number in the ciliate *Paramecium bursaria*. *Sci Rep* 12, 8216. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12496-8>

児玉有紀 (2019) 総説：ミドリゾウリムシとクロレラを用いた二次共生の成立および維持機構の解明の研究, 和文誌原生生物, 第2巻(1): 15-24.

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuuki Kodama and Masahiro Fujishima	4. 巻 12
2. 論文標題 Endosymbiotic <i>Chlorella variabilis</i> reduces mitochondrial number in the ciliate <i>Paramecium bursaria</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-12496-8	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 Kodama Yuuki and Sumita Haruka	4. 巻 259
2. 論文標題 The ciliate <i>Paramecium bursaria</i> allows budding of symbiotic <i>Chlorella variabilis</i> cells singly from the digestive vacuole membrane into the cytoplasm during algal reinfection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protoplasma	6. 最初と最後の頁 117 ~ 125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00709-021-01645-x	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 Yuuki Kodama and Shoya Miyazaki	4. 巻 78
2. 論文標題 Autolysis of <i>Chlorella variabilis</i> in starving <i>Paramecium bursaria</i> help the host cell survive against starvation stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Microbiology	6. 最初と最後の頁 558-565
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00284-020-02304-9	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6件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 児玉有紀
2. 発表標題 繊毛虫のミドリゾウリムシを用いた細胞内共生の成立・維持機構の解明
3. 学会等名 第6回ERATO共生進化機構先端セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田光、児玉有紀
2. 発表標題 繊毛虫のミドリゾウリムシの共生クロレラが与えるミジンコからの捕食率への影響について
3. 学会等名 第92回日本動物学会 オンライン 米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 児玉 有紀
2. 発表標題 繊毛虫のミドリゾウリムシを用いた細胞内共生の研究
3. 学会等名 第40回 日本動物行動学会大会（オンライン）ラウンドテーブル#4 共生微生物が切り開く行動生態学の新展開（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 児玉 有紀
2. 発表標題 緑藻クロレラと共生する繊毛虫ミドリゾウリムシ
3. 学会等名 第21回名古屋大学遺伝子実験施設公開セミナー 光合成を利用する動物、その巧みな生き方 ~ミドリゾウリムシ・サンゴ・ウミウシ~（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 児玉 有紀
2. 発表標題 細胞内共生クロレラが与える宿主ミドリゾウリムシへの影響について
3. 学会等名 日本藻類学会第46回大会 オンライン（福井）シンポジウム「藻類と他者とのインタラクション」（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾林 景子、児玉 有紀
2. 発表標題 Paramecium multimicronucleatumの生細胞観察で明らかになった食胞分化のダイナミクス
3. 学会等名 日本動物学会 第91回大会 2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

児玉研究室のホームページ <a href="https://sites.google.com/view/yuuki-kodama/home">https://sites.google.com/view/yuuki-kodama/home</a> 2021年1月 広報しまだい Vol. 47 「ダイバーシティへの取り組み」 <a href="https://www.shimane-u.ac.jp/_common/images/01/stories/koho_shimadai/file_koho_shimadai/kohoshimadai47-2/html5.html#page=1">https://www.shimane-u.ac.jp/_common/images/01/stories/koho_shimadai/file_koho_shimadai/kohoshimadai47-2/html5.html#page=1</a> 2022年3月 SAN'INダイバーシティ推進ネットワークの推し研究室 Vol. 1 <a href="https://diversity.shimane-u.ac.jp/_files/00267113/osi.pdf">https://diversity.shimane-u.ac.jp/_files/00267113/osi.pdf</a> 児玉研究室のホームページ <a href="https://sites.google.com/view/yuuki-kodama/home">https://sites.google.com/view/yuuki-kodama/home</a> 2020年1月 Vol. 43広報しまだい <特集3> SDGs達成を目指す取り組み <a href="https://www.shimane-u.ac.jp/_files/00185516/kouhoushimadai43.pdf">https://www.shimane-u.ac.jp/_files/00185516/kouhoushimadai43.pdf</a> 2020年3月 島根大学ダイバーシティ推進室 ロールモデル集vol. 5 <a href="https://diversity.shimane-u.ac.jp/wp-content/uploads/2020/04/Role-model-collection-vol.5.pdf">https://diversity.shimane-u.ac.jp/wp-content/uploads/2020/04/Role-model-collection-vol.5.pdf</a>
--

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
研究協力者	藤島 政博  (Fujishima Masahiro)  (40127783)	山口大学・名誉教授    (15501)	

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		
米国	Arizona State University		