

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01202

研究課題名(和文)単細胞生物の複雑性：有孔虫サブシングルセル遺伝子発現と超微細構造解析で迫る

研究課題名(英文)Unravelling a complex nature of eukaryotic microbes using ultrastructural analyses and sub-single cell genomics

研究代表者

野牧 秀隆(Nomaki, Hidetaka)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭研究開発プログラム)・上席研究員

研究者番号：90435834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,900,000円

研究成果の概要(和文)：単細胞でありながら細胞が最大で10cm以上にもなる底生有孔虫が、細胞を格納する房室ごとに異なる機能を持たせた「疑似的な」多細胞化を行っているのではないかと仮説のもと、超微細構造解析、細胞内元素マッピング、細胞を区分した遺伝子発現解析を行った。細胞の部位ごとに細胞小器官の分布は大きく異なり、エネルギー貯蔵に特化した場所、微生物との共生に特化した場所、餌の消化に特化した場所、などが見られ、それに伴った元素分布も確認された。これらの場所ごとに発現している遺伝子が異なることも確認され、単細胞生物が細胞内の機能分化を行うことで多様な代謝機能を持ちうることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物の進化は、「単純な単細胞生物が誕生し、それらが共生して真核生物になり、やがて多細胞になり、大型化、複雑化し、現在の動物や植物になった」というストーリーがよく知られている。本研究の成果から、有孔虫などの生物は「単細胞生物が多細胞化することなく独自の異なるメカニズムにより機能分化、大型化したことで、海洋の様々な環境で繁栄している」ことが明らかになり、生物の進化、適応がこれまで以上に複雑かつ謎に満ちたストーリーであることを示している。

研究成果の概要(英文)：Benthic foraminifera are unicellular eukaryote but have large cell up to more than 10 cm. They have wide variety of metabolisms and symbiotic relationships and adapted diverse marine environments. We hypothesized that this metabolic diversity may have archived by a "pseudo-multicellular" manner, with each chamber containing cells having a different function. We conducted ultrastructural analysis, intracellular elemental mapping, and gene expression analysis at sub-single cell levels. The distribution of organelles varies greatly depending on the part of the cell, with some areas specialized for energy storage, symbiosis with prokaryotes, and for food digestion. Elemental distribution also confirmed these observations and presumable functions. Genes expression patterns also differ among the positions of chambers, indicating that this giant unicellular organism can have diverse metabolic functions through intracellular functional differentiation.

研究分野：深海生態学

キーワード：単細胞真核生物 機能分化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

単細胞真核生物(原生生物)である有孔虫は、さまざまな海洋環境に豊富に分布している。その多くは砂粒や炭酸塩などでできた殻をもつが、殻の中には複数の「房室」があり、細胞質はそれらの部屋の中にわかれて存在している。時に、房室間の細胞質は「プラグ」と呼ばれる栓のような構造により区切られており、単細胞生物であるにもかかわらず、細胞質が複数に区画化されているように見える。

浅海から深海に生息する 10 種の有孔虫について、プラグの分布を透過型電子顕微鏡(TEM)観察やマイクロフォーカス X 線コンピュータトモグラフィ(MXCT)により観察したところ、酸素の少ない堆積物深部に生息する深部内在性の種ではプラグが不明瞭もしくは最終房室付近のみ見られるのに対し、酸素の多い環境に生息する浅部内在性の種では、初室側から最終房室までほぼすべての房室間がプラグで区切られていた。さらに、浅海の *Ammonia* 属では、プラグが数多くみられる個体とまったく見られない個体が混在していた。このことは、酸素濃度などの生息環境や周囲の環境変化などによって、有孔虫は特定の代謝のために房室間をプラグで区切ることを示唆する。実際に、形成途中のプラグや不要となり外れた状態のプラグが、TEM 観察により見出されている。プラグにより区切られた細胞質の構造を TEM で観察すると、核を保持している房室、液胞を多数保持している房室、ミトコンドリアやペルオキシソームを多数保持している房室、など、多くの種で、房室ごとに細胞小器官の比率が大きく異なる。

これらの複数種の比較観察による事実は、「有孔虫は単細胞生物ではあるものの、実際にはその大きな細胞質をプラグで区切り、区切られた房室ごとに特有の代謝機能を持つことで、多様な環境に適応している」ことを示唆していた。

2. 研究の目的

上記の有孔虫の細胞内機能分画仮説を検証するため、房室ごとの細胞小器官の分布を定量的に示し、房室ごとの機能を推定するとともに、有孔虫を解剖し細胞小器官の分布パターンごとに房室をまとめ、房室ごとのトランスクリプトーム解析を行い、細胞小器官分布から推測される機能分化を遺伝子発現レベルで検証することを目的とした。単細胞生物の中でも巨大で、かつ細胞質が区切られている有孔虫細胞の細胞内機能分化の証明は、単細胞生物の巨大化や多細胞化といった生物進化の根源的問いに重要な手掛かりを与える。

3. 研究の方法

(1)房室ごとの細胞小器官組成と溶存化学成分析

MXCT 観察: グルタル固定した底生有孔虫をオスミウムで導電染色し、X 線吸収率を高めたうえでレジン樹脂に包埋し、MXCT 観察を行った。これによりプラグが明瞭に識別できるほか、細胞小器官のうち比較的大きなサイズ(5-20 μ m 程度)を持つ液胞や核についても特定した。

TEM 観察: MXCT では判別できない、オスミウム導電染色されにくい構造や、数 μ m 以下のサイズの細胞小器官(ミトコンドリア、ペルオキシソーム、小胞体など多くの構造が該当)については、TEM 観察を行って房室ごとの細胞小器官分布を観察した。口孔から初室に向かって切片を

切ることで、初室 最終房室までを連続的に TEM 観察し細胞小器官の評価を行った。

Cryo-SEM-EDS による細胞小器官ごとの元素組成解析:有孔虫細胞を凍結固定し、凍結状態のまま切断、SEM 観察を行った後に元素マッピングを行うことで、通常の切片作成過程では失われてしまう溶解態の元素などについて、細胞小器官ごと、細胞部位ごとにマッピングし、それぞれの細胞小器官や房室が持つ代謝機能について検討した。

(2)分割した房室ごとの遺伝子発現解析

細胞小器官の分布の違いから推測される房室ごとの機能の違いを、微量遺伝子発現解析及び付随する遺伝子発現情報解析により明らかにした。房室全体を、MXCT、TEM 観察に基づいて初室側、外界とのやり取りの大きい最終房室側、その中間の3つに分け、それぞれの房室ごとに RNA-seq 解析を行い、各部位ごとでの比較解析を行った。

4 . 研究成果

岩礁地、相模湾深海底水深 700-1500m、深海平原水深 5000-6000m で採取、固定した有孔虫種について、上述の各種解析を行った。

初室 最終房室までの細胞小器官の分布を解明した結果、有孔虫の種類により、その細胞小器官の分布の違いがあることを明らかにした。共生細菌を持つ有孔虫の場合、その共生細菌は最終房室側 2-3 室で顕著に分布していた。酸素浸透深度以深に生息する有孔虫種では、周囲にミトコンドリアの局在が見られる液胞の割合が房室ごとに異なる様子も見られた。一方で、典型的な石灰質の多室有孔虫とは異なる磁器質殻をもつ多室有孔虫では、細胞質に明確な区切りがなく、細胞小器官の局在の様子も限定的であるなど、多室化の程度が大きく異なることが示された。さらに、超大型単細胞生物である Xenophyophore の細胞構造、細胞小器官局在解析も行い、生息場により非常に多様な種組成と細胞構造を持つこと、細胞質の様子も細胞部位ごとに異なることなどを明らかにした。

Cryo-SEM-EDS 解析の結果、特定の種の初室においてのみ存在する液胞様構造では Na が枯渇し K が局在していること、TEM 観察では観察できなかった細胞小器官の分布にも房室ごとの偏在の様子が確認でき、細胞内での細胞小器官局在、元素の局在、および関連する代謝について複数の有孔虫種で明らかにすることができた。

さらに、これらの有孔虫のゲノム解析および細胞部位ごとの遺伝子発現解析から上記の細胞内で偏在する細胞小器官についてその機能を推定し、これらの結果について複数の論文にまとめて投稿中、投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 6件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Bernhard Joan M., Nomaki Hidetaka, Shiratori Takashi, Elmendorf Anastasia, Yabuki Akinori, Kimoto Katsunori, Tsuchiya Masashi, Shimanaga Motohiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Hydrothermal vent chimney-base sediments as unique habitat for meiobenthos and nanobenthos: Observations on millimeter-scale distributions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Marine Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmars.2022.1033381	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 Nomaki Hidetaka, Kawatani Kento, Motomura Yusuke, Tame Akihiro, Uyeno Daisuke, Ogawa Nanako O., Ohkouchi Naohiko, Shimanaga Motohiro	4. 巻 103
2. 論文標題 Bacterivory of the hydrothermal-vent-specific copepod <i>Stygiopontius senokuchiae</i> (Dirivultidae, Siphonostomatoida) from copepodite through adult stages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S0025315423000139	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 Bouchet Vincent M.P., Seuront Laurent, Tsujimoto Akira, Richirt Julien, Frontalini Fabrizio, Tsuchiya Masashi, Matsuba Misako, Nomaki Hidetaka	4. 巻 324
2. 論文標題 Foraminifera and plastic pollution: Knowledge gaps and research opportunities	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Environmental Pollution	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.envpol.2023.121365	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 Pascal Pierre-Yves, Nomaki Hidetaka, Miyairi Yosuke, Yokoyama Yusuke	4. 巻 148
2. 論文標題 The use of radiocarbon to evaluate the trophic role of geothermal bacteria in shallow hydrothermal water ecosystem	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Ecological Indicators	6. 最初と最後の頁 -8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ecolind.2023.110108	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 Ikuta Tetsuro, Tame Akihiro, Takahashi Tomoko, Nomaki Hidetaka, Nakajima Ryota	4. 巻 9
2. 論文標題 Microplastic particles are phagocytosed in gill cells of deep-sea and coastal mussels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Marine Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmars.2022.1034950	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 Mizuno Katsunori, Nomaki Hidetaka, Chen Chong, Seike Koji	4. 巻 12
2. 論文標題 Deep-sea infauna with calcified exoskeletons imaged in situ using a new 3D acoustic coring system (A-core-2000)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-16356-3	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 Wakita Masahide, Watanabe Shuichi, Yoshino Jun, Oguri Kazumasa, Nomaki Hidetaka, Kawagucci Shinsuke, Ariyoshi Keisuke, Nagano Akira, Fujikura Katsunori	4. 巻 9
2. 論文標題 Deep-sea bottom-water environment change caused by sediment resuspension on the continental slope off Sanriku, Japan, before and after the 2011 Tohoku Earthquake	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Progress in Earth and Planetary Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40645-022-00515-1	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 Govindankutty Menon Anjaly, Davis Catherine V., N?rnberg Dirk, Nomaki Hidetaka, Salonen Iines, Schmiedl Gerhard, Glock Nicolaas	4. 巻 13
2. 論文標題 A deep-learning automated image recognition method for measuring pore patterns in closely related bolivinids and calibration for quantitative nitrate paleo-reconstructions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-46605-y	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 Varrella Stefano, Barone Giulio, Corinaldesi Cinzia, Giorgetti Alessio, Nomaki Hidetaka, Nunoura Takuro, Rastelli Eugenio, Tangherlini Michael, Danovaro Roberto, Dell'Anno Antonio	4. 巻 10
2. 論文標題 Fungal Abundance and Diversity in the Mariana Trench, the Deepest Ecosystem on Earth	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Fungi	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jof10010073	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 Chen Chong, Isobe Noriyuki, Nomaki Hidetaka	4. 巻 19
2. 論文標題 A deep abyssal natural wood fall in the Northwestern Pacific and its associated fauna	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Marine Biology Research	6. 最初と最後の頁 556 ~ 563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/17451000.2023.2291579	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 Ishikawa NF, Chen C, Hashimoto R, Ogawa NO, Uyeno D, Nomaki H	4. 巻 727
2. 論文標題 Amino acid nitrogen isotopic compositions show seep copepods gain nutrition from host animals	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Marine Ecology Progress Series	6. 最初と最後の頁 81 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3354/meps14503	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 Okada Satoshi, Richirt Julien, Tame Akihiro, Nomaki Hidetaka	4. 巻 30
2. 論文標題 Rapid Freezing and Cryo-SEM/EDS Imaging of Foraminifera (Unicellular Eukaryotes) Using a Conductive Viscous Cryogenic Glue	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microscopy and Microanalysis	6. 最初と最後の頁 359 ~ 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mam/ozae026	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 Richirt J, Okada S, Ishitani Y, Uematsu K, Tame A, Oda K, Isobe N, Ishimura T, Tsuchiya M, Nomaki H	4. 巻 -
2. 論文標題 Composite calcite and opal test in Foraminifera (Rhizaria)	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 EGUSphere	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5194/egusphere-2024-60	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

〔学会発表〕 計0件

〔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	HUSNIK Filip (Husnik Filip) (30886130)	沖縄科学技術大学院大学・進化・細胞・共生の生物学ユニット・准教授 (38005)	

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			
英国	サウサンプトン国立海洋研究所			
米国	ウッズホール海洋学研究所			
ドイツ	ハンブルグ大学			