

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657157

研究課題名(和文)ゾウリムシで発見された新規感染防御機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of a new defense mechanism against microbial infections found in Paramecium

研究代表者

藤島 政博 (FUJISHIMA, MASAHIRO)

山口大学・理工学研究科・教授

研究者番号：40127783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：ゾウリムシは一度核内共生細菌ホロスポラオブツサに感染すると、2回目に与えた時に、この細菌に対して選択的に食胞形成能を低下させる。このゾウリムシは、他の細菌やホロスポラに対してはそれに感染経験がなければ食胞形成する能力を維持している。これらは、ゾウリムシが2回目の感染に対する防御法を備えていることを示している。2回目に与えるホロスポラを、事前に各種酵素で処理しても食胞形成抑制への効果には影響しなかった。また、ホロスポラに感染前の宿主が発現している細胞表面タンパク質に対する抗体で感染型ホロスポラや宿主を処理しても影響がなかった。この現象は再現性があるがその分子機構はまだ明らかではない。

研究成果の概要(英文)：Once *Paramecium caudatum* has been infected by endosymbiotic bacterium *Holospora obtusa*, the host cells become reduced the ability for digestive vacuole formation to the secondary added same bacteria, and that this change in the vacuole formation is induced within 4 h after the first infection. *H. obtusa*-bearing host cells can ingest various bacteria if the host has not yet been infected before by them. These suggest that *Paramecium* can distinguish and memory the infectious *Holospora* and acquires an unknown defense mechanism for the secondary infection. Treatment of the secondary added infectious *H. obtusa* with Lipase, Proteinase K, Lyticase, alpha-mannosidase, or beta-galactosidase did not affect the host digestive vacuole formation. Also, treatments of the secondary added infectious *H. obtusa* and the host with antibodies for a 250-kDa cell surface protein of aposymbiotic paramecia are not effective. This phenomenon is repeatable, but molecular mechanism is still unknown.

研究分野：進化生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：機能進化 細胞内共生 ゾウリムシ ホロスポラ

1. 研究開始当初の背景

(1) 感染性の細菌に対する宿主細胞の防御機構については、単細胞の原生生物ではシュードモナスが感染した宿主ネグレリアが感染を感知してシストを形成し休眠状態になることが知られているが、他では食胞の酸性化とリソソームによる食胞内消化による防御が知られているだけである。原生生物は細胞膜を介して直接外界と接触しているため、食胞経路で細胞質内に取り込まれる微生物や、細胞膜を貫通して細胞質内に侵入する微生物が多数報告され、生態系ではウイルスや細菌などの貯蔵所としての機能を果たしていると考えられている。特にゾウリムシ属では安定して存在する細胞内寄生物や共生生物が約60種も記載され (Fokin and Görtz, *Endosymbionts in Paramecium*, Ed. M. Fujishima, Springer, 162-198, 2009)、リソソーム消化以外の感染防御機構はおそらく存在しないと考えられていた。

(2) Percoll 密度勾配遠心で宿主ホモジネートから単離した核内共生細菌ホロスポラオブツサ (*Holospora obtusa*) 感染型を一度もホロスポラに感染された経験が無いゾウリムシと混合すると、*H. obtusa* はゾウリムシの食胞を経由して標的核に10分で感染するが、6時間以内に、感染能力を持つ同じ細菌を記憶し、2回目の混合では食胞内に取り込まないように変化することを発見した (投稿準備中)。ゾウリムシが有害細菌の感染の初回応答で作った記憶が、同じ細菌との2回目の遭遇に対して、食胞内への取り込みの拒否反応としての応答をもたらしたことを示している。

2. 研究の目的

(1) 核内共生細菌ホロスポラオブツサの感染型をゾウリムシと混合すると、ホロスポラはゾウリムシの細胞口から食胞を経由して10分後には標的核の大核に侵入 (感染) する。ホロスポラが感染したゾウリムシは、混合後6時間で、同種の感染型ホロスポラを食胞に取り込まないように変化するが、熱等で感染能を失活させた感染型や感染能がない増殖型ホロスポラ、エサの細菌は正常に食胞に取り込んだ。これらは、ゾウリムシが感染を経験すると短時間で危険を学習・記憶し、有害な細菌からの感染防御機構を確立する能力を生存戦略に使用していることを示している。

(2) この研究では、食細胞活動の制限による感染防御機構について、下記の事項の解明を試みる。

- ①拒否する微生物として記憶される物質の特徴
- ②拒否反応の記憶に要する時間と記憶持続時間
- ③記憶に伴うゾウリムシの細胞表層タンパク質

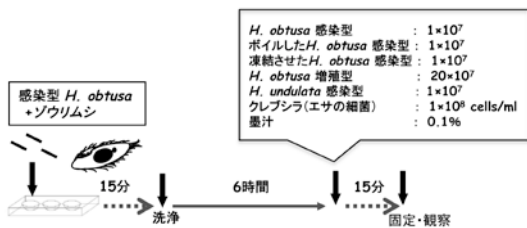
ク質の変化の有無

- ④細胞咽頭で実施される細菌の選別のムービー解析
- ⑤本感染防御機構の発現の引き金が食胞形成か核内感染のどちらかの解明

3. 研究の方法

(1) 拒否する微生物として記憶される物質の性質について

①感染型 *H. obtusa* と定常期のゾウリムシを 1×10^7 bacteria/ml と 1×10^3 cells/ml の細胞密度で3穴スライドガラスを用いて 25°C で15分混合し、15 μ m のメッシュで濾過してゾウリムシ外液の感染型を洗浄して6時間チェースし、拒否反応を誘起させる。その後、ゾウリムシに下図の各種試料を15分間混合して0.15%グルタルアルデヒドで固定し、平均食胞数/細胞/15分を調べる。



まだ感染経験がない別種の小核特異的ホロスポラ *H. undulata* に対しても拒否反応を示すように変化するかどうかを明らかにする。

②感染型 *H. obtusa* の何を識別して食胞への取り込みの拒否反応が誘導させるのかを明らかにするために、上の実験図の最初に混合する感染型 *H. obtusa* を、各種酵素 (Lipase, Proteinase K, Lyticase, α -mannosidase, β -galactosidase) で前処理したものを使用し、感染型 *H. obtusa* への拒否反応を誘起できるかどうかを明らかにする。

(2) 拒否反応の記憶に要する時間と記憶持続時間について

①(1)と同じ細胞密度で感染型 *H. obtusa* とゾウリムシを15分混合し、洗浄後に2、4、6時間のチェースを行い、各チェース時間の後に感染型 *H. obtusa* と15分混合して平均食胞形成数/細胞を調べ、感染型 *H. obtusa* の食胞内取り込みの拒否反応の記憶に要する時間を明らかにする。

②また、①で拒否反応を記憶させたゾウリムシを試験管 (18x180 mm) で継代培養し、定期的に感染型 *H. obtusa* の平均食胞形成数/細胞/15分を調べて、記憶持続時間 (細胞分裂回数) を明らかにする。

(3) 拒否反応の記憶に伴うゾウリムシの細胞表層タンパク質の変化の有無について

①ゾウリムシの細胞表層タンパク質 (GPI-anchored protein) は、環境ストレスの変化によって発現するタンパク質の種類が変化する (Preer, *J Immunol*, 83, 378-384,

1959)。 *H. obtusa* に感染前の宿主から Preer によって確立された方法で抽出した細胞表面タンパク質を抗原にして作成したモノクローナル抗体を使用し、拒否反応の獲得時間と発現している細胞表面タンパク質の型の関係を間接蛍光抗体法で明らかにする。食胞形成の拒否反応と宿主細胞表面タンパク質の型の変化時期が一致すれば、感染型 *H. obtusa* を認識する宿主側物質が細胞表面タンパク質である可能性が高まる。

(4) 細胞咽頭で実施される細菌の選別のムービー解析について

感染型 *H. obtusa* を食胞に取り込まないように変化した *P. caudatum* の生細胞をムラサキガイの分泌物由来の接着剤（セルタック）を用いて攪流培養用スライドガラスに接着させ、ゾウリムシの遊泳速度 (7 m/h) で感染型 *H. obtusa* (1×10^7 bacteria/ml) を攪流させ、ゾウリムシの遊泳環境を再現する。感染型が細胞咽頭のどこまで到達し、どのようにして食胞形成から排除されるかを微分干渉顕微鏡でムービーを撮り、感染の経験を持たないゾウリムシと比較し相違を見つける。

(5) 感染防御機構の発現の引き金が食胞形成か核内感染のどちらかについて

感染型 *H. obtusa* は *P. caudatum* に近縁種の *P. jenningsi* の株 30998 の大核には感染するが、株 30999 では細胞質には脱出するが大核には感染しない。また、*P. caudatum* に遠縁の *P. bursaria* と *P. putrinum* では、感染型 *H. obtusa* は食胞から細胞質には脱出するが大核には感染しない (Fujishima and Fujita, J Cell Sci, 76, 179-187, 1985; Fujishima, Acta Protozool, 25, 345-350, 1986)。これらを使い、感染防御機構の発現の引き金が、感染型 *H. obtusa* の食胞への取り込みか、または核への感染かを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 感染能を持つ感染型 *H. obtusa* は食胞に取り込まれないが、煮沸と凍結で感染能を失活させた感染型 *H. obtusa*、増殖型 *H. obtusa*、エサの細菌の *Klebsiella pneumonia* 株 6081 と墨汁は正常に食胞に取り込まれ、拒否反応は見られなかった。別種の小核特異的 *H. undulata* に拒否反応は見られなかった。

各種消化酵素で前処理した感染型 *H. obtusa* に対する食胞形成拒否反応については、影響は使用したどの酵素処理でも見られなかった。

一方、*H. obtusa* と同様に、*H. undulata* を持つ宿主も *H. undulata* に対する食胞形成拒否反応を示した。

(2) 記憶に要した時間は予備実験の 6 時間より短時間の 4 時間であった。記憶時間は 10 ヶ月後まで確認できた。

(3) 感染前の宿主の細胞表面タンパク質抗原 (分子量約 250 kDa) に対して作成したモノクローナル抗体を使用した間接蛍光抗体法で、食胞形成拒否反応の獲得時間 (約 4 時間) と細胞表面タンパク質の型の変化に要する時間が一致するかを調べたが、初期感染後 2-4 時間経過した宿主の細胞表面タンパク質の抗原性はまだ変化していないことが確認された。これによって、感染による宿主細胞表面タンパク質の変化と食胞形成拒否反応は無関係であることが分かった。

(4) 感染型 *H. obtusa* を食胞に取り込まないように変化した *P. caudatum* の生細胞をセルタックでスライドガラスに接着させ、多めの外液に新たな感染型 *H. obtusa* を加えて、水流の動きがある状態で顕微鏡のムービーを撮影した。しかし、細胞咽頭で感染型 *H. obtusa* が食胞に取り込まれない仕組みを明らかにできなかった。

(5) *H. obtusa* の濃度を変えて *P. jenningsi* の株 30998 と株 30999 と混合し、その後の食胞形成能への影響を観察した。両株に違いは見られなかったが、*P. jenningsi* では大核に感染した *H. obtusa* はその後維持されないことで維持と感染して誘導される現象の可能性がある。被感染能を持たない *P. bursaria* と *P. putrinum* では、この現象は誘導されなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Dohra H., Suzuki H., Suzuki T., Tanaka K., Fujishima M. Draft genome sequence of *Holospira undulata* strain HU1, a micronucleus-specific symbiont of the ciliate *Paramecium caudatum*. Genome Announcements, 査読有, July/August 2013 vol. 1 no. 4 e00664-13. Doi:10.1128/genomeA.00664-13

[学会発表] (計 6 件)

- ① 鈴木治夫、道羅英夫、鈴木智大、田中健也、藤島政博. ホロスポラと近縁細菌のゲノム配列比較解析. NGS現場の会 第3回研究会、2013年9月4日-5日、神戸国際会議場 (神戸市) .
- ② M. Fujishima, C. Morikawa, H. Fujise, T. Kaya, K. Iwatani, K. Tanaka, M. Nakamura, Y. Kodama. Infection process of endonuclear symbiotic bacteria *Holospira* species to the ciliate *Paramecium caudatum*. International Congress of Protistology XIV, 2nd August, 2013, The Westin Bayshore -

- Vancouver, Vancouver (Canada).
- ③ 藤島政博, 森川千穂, 藤瀬弘子, 栢 智昭, 岩谷綱一, 田中健也, 中村美紀, 児玉有紀, 核内共生細菌ホロスポラの感染過程、中国四国地区生物系三学会合同大会 (徳島大会)、2013年5月12日、徳島大学常三島キャンパス (徳島市).
 - ④ M. Fujishima, K. Iwatani, M. Kawai, Y. Nakamura, Y. Kodama, K. Tanaka, H. Fujise, C. Morikawa, T. Kaya and A. Fema. Infection of endonuclear symbiotic bacterium *Holospira* to the ciliate *Paramecium caudatum*. 1st Asian Congress of Protistology and 8th Asian Ciliate Conference of Ciliate Biology, 6 October, 2011, Jeju University, Jeju (Korea).
 - ⑤ 藤島政博、藤瀬弘子、岩谷綱一、森川千穂、児玉有紀. ホロスポラの 89K タンパク質は宿主食胞脱出、細胞質内移動と標的核膜貫通を調節する. 日本動物学会第82回大会、2011年9月21日、旭川市大雪クリスタルホール (旭川市) .
 - ⑥ M. Fujishima. Endosymbiosis in *Paramecium*. Plenary lecture. VI European Congress of Protistology, 29 July, 2011, Berlin Free University, Berlin (Germany).

[図書] (計 2件)

- ① Fujishima M., Kodama Y. Insights into the *Paramecium-Holospira* and *Paramecium-Chlorella* symbioses. In, *Cilia/flagella and ciliates/flagellates*, (Eds) Hausmann K., Radek R., Schweizerbart Science Publishers, Stuttgart, pp. 203-227, 2014.
ISBN:978-3-510-65287-7
- ② Schweikert M., Fujishima M., Görtz H.-D. Symbiotic associations between ciliates and prokaryotes. In, *The Prokaryotes*, 4th Edition, (Eds) Rosenberg E., DeLong E. F., Thompson F., Lory S., Stackebrand E., Quinones D., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 427-463, 2013,
Doi:10.1007/978-3-642-30194-0_18

[その他]

ホームページ等

https://accaff.e.jp/fujishima_lab
<http://nbrpcms.nig.ac.jp/paramecium/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤島 政博 (FUJISHIMA, Masahiro)
山口大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 40127783