

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650132

研究課題名(和文)嫌気性真核微生物における新規ステロール代替物質の探索

研究課題名(英文)A search of novel surrogates of sterols in anaerobic eukaryotes

研究代表者

瀧下 清貴 (TAKISHITA, Kiyotaka)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋生物多様性研究分野・主任研究員

研究者番号：90392951

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)：一般的な生物学の教科書では「真核生物は細胞膜にステロールを持つ」と記されている。ステロールは真核細胞膜の柔軟性を維持し、食作用にも重要な役割を果たしていると考えられており、その生合成には分子状酸素が必須である。しかし嫌気環境に適応している真核生物の中には、ステロールもそれと類似の構造を持つ代替物質も存在しないことがゲノム/トランスクリプトーム解析およびGC-MS解析より明らかとなった。ただし、該当の嫌気性真核生物はステロールと同様に親水性部分と比較して疎水性部分が極端に小さいセラミドと呼ばれる脂質を合成する能力は持っており、それがステロール代替物質として機能している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：It is known that sterols are associated with fluidity and permeability of eukaryotic cell membranes, and are key to fundamental eukaryotic-specific cellular processes such as phagocytosis. Several steps of de novo sterol biosynthesis require molecular oxygen. Our studies unveiled that some of eukaryotes inhabiting anoxic environments have neither sterols nor their structurally similar molecules based on analyses of genome, transcriptome, and GC-MS. However, it seems that the anaerobic eukaryotes in question can produce ceramides, in which a hydrophilic portion is very small compared with a hydrophobic portion as in the case of sterols, and the ceramides could be surrogates of sterols in these eukaryotes.

研究分野：原生生物学

キーワード：原生生物 嫌気 細胞膜 ステロール

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物は細胞膜中にトリテルペノイド(5個の炭素からなるイソプレン単位が6個結合して30個の炭素原子からなる脂質性化合物)の一種であるステロールを有していることが知られている。また、真正細菌の一部は細胞膜中に同じくトリテルペノイドの一種であるホパノールを持つことも知られている。ステロール、ホパノールともに細胞膜の「補強材」としての役割を果たしているが、さらにステロールは真核生物における細胞膜の柔軟性維持にも大きく関与している。ステロールは細胞膜リン脂質二重層の片方からもう片方へ移動する、いわゆる flip-flop を行うことが出来る。これにより、リン脂質外層と内層の表面差を自在に変化させ、結果として真核生物特有の現象である食作用(ファゴサイトーシス)を行うことが可能となる。一方、ホパノールはステロールとは異なり flip-flop は行わず、したがって真正細菌において食作用は基本的には認められない。ステロールはスクアレンと呼ばれる物質から複雑な生化学反応を経て合成されるが、その反応系の中で分子状酸素を要求するステップが存在する。つまり、ステロール合成は好気的条件下のみで起こり得る。ここで以下の疑問が生じる:「嫌気環境/貧酸素環境に生息する真核微生物(原生生物)は如何にして細胞膜の柔軟性を維持し、食作用をおこなっているのか?」海洋環境には酸素の無い(あるいはほとんど無い)場所が至るところに存在し、そこには真正細菌や古細菌だけではなく、極めて多様な真核微生物も生息している。これらの真核微生物は、その生合成に分子状酸素を必要とするステロールを作り出すことは出来ない。また、餌となる真正細菌や古細菌は基本的にステロールを有していないため、餌からステロールを確保することも不可能である。しかし、嫌気環境/貧酸素環境に生息する真核微生物の多くは、実際には食作用により真正細菌や古細菌を活発に補食することによって生命活動を営んでいる。

### 2. 研究の目的

平成24年、研究代表者らは、一部の嫌気性真核微生物のゲノム中に(その生合成に分子状酸素を必要としない)テトラヒマノールと呼ばれる第3の機能性有機化合物を合成するための遺伝子が存在し、実際にテトラヒマノールがステロールの代替物質として細胞膜中で機能していることを示した。しかし、真正細菌や古細菌を捕食する、その他多くの嫌気性真核微生物のゲノム中において、テトラヒマノール合成遺伝子は見出されておらず、これまでに知られていない物質がステロール代替物質としてそれらの細胞膜中で機能している可能性が高い。本研究では、その未知物質およびその合成

遺伝子の同定を目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究ではトランスクリプトーム解析でステロール合成およびテトラヒマノール合成に関与する遺伝子が見いだされない嫌気性真核微生物における未知ステロール代替物質の特定を試みた。具体的には祖先的ユニコント生物である *Pygusua biforma* やフォルニカタ生物群に属する *Dysnectes brevis*, *Kipferlia bialata*, *Carpediemonas membranifera*, *Ergobibamus cyprinoides* 等を解析の対象とした。また、トランスクリプトーム情報は未だ無いが、研究代表者らが平成24年、鹿児島県甌島貝池の嫌気的水塊から分離した高次レベルで新規なストラメノパイル生物 *Cantina marsupialis* もその対象とした。これらの嫌気性真核微生物をステロールが存在しない培地で嫌気培養し、得られる培養サンプルから、有機溶媒を用いて脂質成分を抽出した。その脂質成分をガスクロマトグラフ質量分析(GC-MS)に供して検出される物質の確認を行った。さらに餌バクテリアとの二者培養系の確立した *K. bialata* においてゲノム解析を行い、ステロール合成系を含めた脂質代謝の詳細な解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) ミトコンドリアが退化し嫌気環境に適応している原生生物の1グループであるフォルニカタ生物群の5つすべての培養株(*D. brevis*, *K. bialata*, *C. membranifera*, *E. cyprinoides*)、さらには嫌気性ストラメノパイル生物 *C. marsupialis* において、真核生物で一般的に検出されるステロール、繊毛虫や一部の嫌気性真核生物が有しているテトラヒマノール、さらにはそれに相当するような化合物はGC-MS解析で一切検出されなかった。このことは該当生物のトランスクリプトーム解析から得られた結果と矛盾しない。したがって、これらの生物は、真核生物特有の柔軟性を維持した細胞膜を有しているにも関わらず、その中にはステロールやテトラヒマノールと類似の構造を持った代替物質は存在しないことが示唆された。その一方で、嫌気性ケルコゾア生物(未記載)および嫌気性エクスカバータ生物 *Trimastix marina* のトランスクリプトームデータの中にテトラヒマノール合成酵素をコードする遺伝子を同定し(図)、実際GC-MS解析でもそれに相当するシグナルが検出された。テトラヒマノール合成能を有する生物は、真核生物の系統の中で広範囲にわたって存在していると考えられる。また、嫌気性プレビアータ生物 *P. biforma* のトランスクリプトームデータ中にスボルレンと呼ばれるテルペノイドを合成する酵素をコードする遺伝子が存在することが確認されたが(図)、GC-MS解析ではそれに相当するシグナルが検出されなかった。

スポルレンは枯草菌 (*Bacillus subtilis*) が孢子を形成する際に合成され、それによって活性酸素分子種に対する抵抗性を獲得すると考えられている。*P. biforma* がスポルレン合成能を持つ場合、それが何のために合成されるのか？ステロール/テトラヒマノール代替物質としての機能を持つのか？に関しては現段階では不明である。

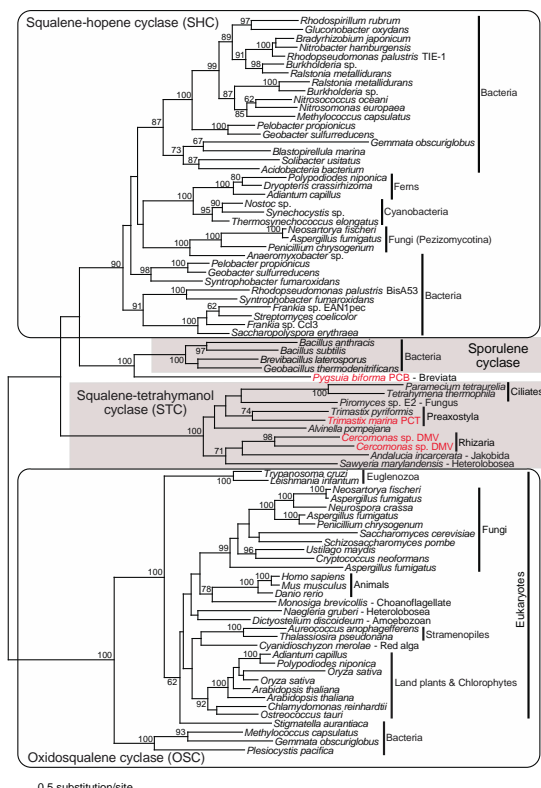


図. トリテルペノイド合成酵素遺伝子の分子系統樹。分岐点の数字はブートストラップ解析値 (60%以上の値を表示)。赤文字が今回新たに同定した遺伝子。

(2) *Kipferlia bialata* のゲノム解析においてステロール合成系の遺伝子は一切見つからず、GC/MS 解析およびトランスクリプトーム解析によって得られた結果と矛盾はなかった。その他の脂質合成系を検索した結果、他の真核生物同様にグリセロ脂質やスフィンゴ脂質の合成に関わる遺伝子は存在していた。スフィンゴ脂質合成系に関しては、スフィンゴシンに1つの脂肪酸が結合したセラミドの合成能はあるものの、モデル動物等で最終産物として一般的に合成されるスフィンゴリン脂質やスフィンゴ糖脂質の合成能はないことが明らかとなった。つまり、*K. bialata* ではセラミドがスフィンゴ脂質合成系の最終産物として合成され機能していると考えられる。セラミドはステロールと同様に親水性部分が小さく、細胞膜脂質二重層の片方の層からもう片方の層へ移動するフリップフロップが比較的容易に起こりうると考えられる。このフリップフロップが細胞膜の柔軟性に貢献しているとするれば、*K. bialata* においてセラミドがステロールの代

替物質として機能している可能性もある。今後、質量分析によって *K. bialata* に実際にセラミドが存在するか確認するとともに、その機能を検証する予定である。

## 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8件)

1 Naoji Yubuki, Tomas Panek, Akinori Yabuki, Ivan Cepicka, Kiyotaka Takishita, Yuji Inagaki, Brian S. Leander. Morphological identities of two different marine stramenopile environmental sequence clades: *Bicosoeca kenaiensis* (Hilliard 1971) and *Cantina marsupialis* (Larsen and Patterson, 1990) gen. nov., comb. nov. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 査読有り. Vol.62. 2015. (印刷中) doi:10.1111/jeu.12207

2 石谷佳之, 瀧下清貴. 有孔虫と放散虫を姉妹群とする「レタリア仮説」. *化石*. 査読有り. Vol.96. 2015. pp.13–21.

3 Sakiko Orui Sakaguchi, Kiyotaka Takishita, Tomoaki Goto, Haruka Shibata, Shigeaki Kojima, Shinji Tsuchida, Hiroshi Kitazato, Katsunori Fujikura. Analyses of age and population genetic structure of the broadbanded thornyhead *Sebastolobus macrochir* in North Japan suggest its broad dispersion and migration before settlement. *Journal of Oceanography*. 査読有り. Vol.70. 2014. pp.13–21. doi:10.1007/s10872-014-0240-x

4 Yoshiyuki Ishitani, Yurika Ujiie, Kiyotaka Takishita. Uncovering sibling species in Radiolaria: evidence for ecological partitioning in a marine planktonic protist. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 査読有り. Vol.78. 2014. pp.215–222. doi:10.1016/j.ympev.2014.05.021

5 Akinori Yabuki, Takashi Toyofuku, Kiyotaka Takishita. Lateral transfer of eukaryotic ribosomal RNA genes: an emerging concern for molecular ecology of microbial eukaryotes. *ISME Journal*. 査読有り. Vol.8. 2014. pp.1544–1547. doi:10.1038/ismej.2013.252

6 Fumiya Noguchi, Masaru Kawato, Takao Yoshida, Yoshihiro Fujiwara, Katsunori Fujikura, Kiyotaka Takishita. A novel alveolate in bivalves with chemosynthetic bacteria inhabiting deep-sea methane

seeps. Journal of Eukaryotic Microbiology. 査読有り. Vol.60. 2013. pp.158-165. doi:10.1111/jeu.12017

7 Akinori Yabuki, Wenche Eikrem, Kiyotaka Takishita, David J. Patterson. Fine structure of *Telonema subtilis* Griessmann, 1913: a flagellate with a unique cytoskeletal structure among eukaryotes. Protist. 査読有り. Vol.164. 2013. pp.556-569. doi:10.1016/j.protis.2013.04.004

8 瀧下清貴, 矢吹彬憲, 力石嘉人, 大河内直彦. 酸素のない環境に生息する真核生物の細胞膜および食作用にまつわるエトセトラ-原始真核細胞モデル: 嫌気性原生生物. 細胞工学. 査読無し. Vol.32. 2013. pp.1286-1288.

〔学会発表〕(計4件)

1 野口文哉, 島村繁, 中山卓郎, 矢崎裕規, 橋本哲男, 稲垣祐司, 藤倉克則, 瀧下清貴. 嫌気性ストラメノパイル生物 *Cantina marsupialis* が有するミトコンドリア関連オルガネラの代謝能推定. 日本藻類学会第39回大会. 2015年3月21日. 九州大学(福岡県福岡市).

2 矢吹彬憲, 瀧下清貴. 珪藻寄生捕食性原生生物 *Hemistasia phaeocysticola* の系統分類学的研究. 日本藻類学会38回大会. 2014年3月15日. 東邦大学(千葉県船橋市).

3 矢吹彬憲, 豊福高志, 瀧下清貴. 不等毛植物門ディクテイオカ藻綱 *Ciliophrys infusionum* のゲノム断片より見いだされた rRNA 遺伝子の水平伝搬. 日本植物学会第77回大会. 2013年9月13日. 北海道大学(北海道札幌市).

4 Akinori Yabuki, Takashi Toyofuku, Kiyotaka Takishita. Ribosomal RNA gene laterally transferred from a perkinsid alveolate to *Ciliophrys infusionum* (Stramenopiles, Dictyochophyceae). The ICOP XIV - International Congress of Protistology. 28 July-2 August 2013. The Westin Bayshore, Vancouver, Canada.

〔図書〕(計1件)

1 Kiyotaka Takishita. Diversity of microbial eukaryotes in deep-sea chemosynthetic ecosystems illuminated by molecular techniques. In: Otsuka S., Suzuki T., Horiguchi T., Suzuki N., Not F. (eds.) Marine Protists: Diversity and dynamics, Springer, Tokyo. 査読有り. 2015. (印刷中)

6. 研究組織

(1)研究代表者

瀧下 清貴 (TAKISHITA, Kiyotaka)  
独立行政法人海洋研究開発機構・海洋生物  
多様性研究分野・主任研究員  
研究者番号: 90392951

(2)連携研究者

大河内 直彦 (OHKOUCHI, Naohiko)  
独立行政法人海洋研究開発機構・生物地球  
化学研究分野・分野長  
研究者番号: 00281832

力石 嘉人 (CHIKARAISHI, Yoshito)  
独立行政法人海洋研究開発機構・生物地球  
化学研究分野・主任研究員  
研究者番号: 50455490