

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840132

研究課題名(和文) グリーンヒドラ クロレラ共生システムにおける分子相互作用・ゲノム間相互作用の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular interaction and genome evolution in the symbiotic system of green hydra and Chlorella

研究代表者

濱田 麻友子 (Hamada, Mayuko)

沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミクスユニット・研究員

研究者番号：40378584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではクロレラを体内に共生させているグリーンヒドラをモデルとして、動物-藻類共生システムにおける相互作用の実態とその共生ゲノム進化を明らかにした。共生クロレラが光合成によって糖を分泌すると、ヒドラでは窒素代謝やリン酸輸送に関わる遺伝子が発現上昇することから、ヒドラ-クロレラ間の協調的な相互作用によって、栄養供給が遺伝子レベルで調節されていることが示唆された。また、共生クロレラのゲノム解読を行ったところ、硝酸同化遺伝子群の一部とそのクラスター構造がゲノムから失われていた。このことから、共生クロレラは窒素源をヒドラに依存した結果、ゲノムからは硝酸同化システムが失われたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To understand common principles of animal-algal symbiosis and their links to evolution at the molecular- and the genome-level, we focused on the mechanisms of interactions between Hydra and Chlorella and the specific features in their genome. We identified candidate genes upregulated only when the specific symbiosis has been established. They included genes involved in nitrogen assimilation and phosphate transport. In addition, the expression of these genes showed clear correlation with photosynthesis of Chlorella. We also performed genome sequencing of the symbiotic Chlorella to understand the genome evolution in the dependent relation. As a result, we found that some genes necessary for nitrate assimilation in plants and their cluster structure have been lost. This indicates that symbiotic Chlorella is dependent on the nitrogen source provided from Hydra and that the nitrate assimilation pathway in symbiotic Chlorella is degenerated.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：共生 ゲノム 進化 ヒドラ クロレラ

1. 研究開始当初の背景

動物と藻類との共生は、単細胞生物ゾウリムシをはじめ、サンゴなどの刺胞動物、シャコガイなどの軟体動物、脊索動物ホヤなど様々な生物で見られる普遍的な現象である。この共生関係において、動物と藻類はあたかも一つの生物のような協調的な生命活動を行ない、栄養面や生活環境の点で互いに有利に働くような依存関係を築いている。

このような関係を維持するためには、共生生物に特異的なメカニズムが存在すると考えられる。例えば、栄養の供給や運搬、共生藻の認識と維持、紫外線や光合成によって生じる活性酸素などによるダメージに应答する生体防御のメカニズムなどである。また、このような依存関係はこれらの生物の共進化によってもたらされたと考えられ、その過程において遺伝子獲得・欠失のような遺伝子レベルでの変化や相互作用がそれぞれのゲノムに生じている可能性がある。

しかしながら、この共生システムにおける具体的な分子相互作用、ゲノム間相互作用は未だ明らかではない。これはこれらの動物の多くにおいて分子生物学的実験が困難であることや、ゲノムの全貌が明らかになっていないことがひとつの原因である。

その点において、刺胞動物グリーンヒドラは共生イベントの生理学的知見が多く、また実験動物として実験手法が確立しており、共生メカニズムの分子的解析に適したモデル動物である。グリーンヒドラは内胚葉細胞内に膜に包まれた状態で特定の緑藻類クロレラを共生させており(図1)これはシンビオソームと呼ばれる。ヒドラとクロレラの関係は相利共生であり、クロレラからヒドラへ光合成産物が供給され、ヒドラからクロレラへ窒素源が供給されると言われている。

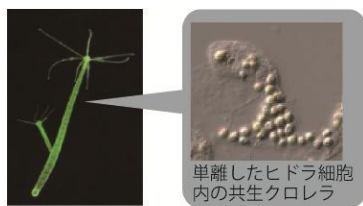


図1 グリーンヒドラと共生クロレラ
ヒドラの内胚葉細胞内に約 30-40 のクロレラが存在する

2. 研究の目的

本研究では、グリーンヒドラを動物 - 藻類共生システムのモデルとし、ヒドラとその共生クロレラとの分子相互作用と、この共生システムのゲノム進化を明らかにすることを目的とした。特に、この共生システムの本質と考えられる藻類から宿主への光合成産物の供給に関わる過程に注目することにより、様々な生物において頻繁に見られるこの現象の普遍性と多様性の理解につながると同時に、その意義を具体的に示すことがで

きると考えられる。また、この共生関係のゲノム進化の理解によって、シンビオジェネシスの過程、例えば細胞内共生による葉緑体の進化や、他の生物における藻類共生システムの成立にも示唆を与えることになるであろう。

具体的には、(1) グリーンヒドラとクロレラのゲノム・トランスクリプトーム解析を行い、この共生システムの進化の過程においてゲノム中で起こった遺伝子の変化を明らかにする、(2) 共生システムの本質と考えられる藻類から宿主への光合成産物の供給に関わるヒドラ遺伝子を同定するために、クロレラの有無、明暗条件、光合成阻害などで発現変化するヒドラ遺伝子の発現解析を行う、(3) 以上の遺伝子について、その生体内での役割を明らかにすることで、ヒドラクロレラ間相互作用の分子メカニズムを具体的に理解することを目指した。

3. 研究の方法

< グリーンヒドラ共生関連遺伝子の解析 >

グリーンヒドラ *Hydra viridissima* A99 系統を用い、共生クロレラを除去した個体 (Apo) クロレラを除去した上に人為的に他種のクロレラ (ゾウリムシの共生クロレラ *Chlorella variabilis* NC64) を導入した個体 (NC64) を作成し、マイクロアレイを用いてそのトランスクリプトームを正常なグリーンヒドラ (A99) と比較した。A99 と Apo の比較によってクロレラとの共生の有無によって発現変化する遺伝子を、A99 と Apo, NC64 両方の比較によって特に本来のクロレラとの特異的な共生が成立している状態で発現変化する遺伝子を同定した。以上の候補遺伝子について、相同性検索、ドメイン検索、Gene Ontology との対応づけを行い、候補遺伝子群にはどのような遺伝子が多く含まれているのかを調べた。また、その中から特に重要であると考えられる遺伝子に関しては Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR (qPCR) による発現変化の確認、*in situ* ハイブリダイゼーションによる発現パターンの解析を行った。さらに、候補遺伝子の発現と共生クロレラの光合成との関連を調べるため、明暗条件、光合成阻害、クロレラの光合成産物 (マルトース) 添加に対する遺伝子発現変化を qPCR によって解析した。

< 共生クロレラ A99 系統のゲノム解析 >

共生クロレラにはどのような特徴があるのかを理解するため、*Hydra viridissima* A99 系統の共生クロレラ *Chlorella* sp. A99 の全ゲノムを解読した。共生クロレラをグリーンヒドラから単離し、ゲノム DNA を抽出して、ライブラリーとして paired-end および mate-pair library を作成した。ゲノムシーケンシングには Illumina HiSeq, Miseq を使用

し、アセンブルには Newbler と SSPACE 等のソフトウェアを用いた。

共生クロレラゲノムにおける窒素代謝遺伝子を探索するために、シーケンスの結果得られた raw reads と scaffold に対して、他種の緑藻類の既知の窒素代謝遺伝子配列を用いて相同性検索を行った。また、同定された窒素代謝遺伝子周辺のクラスター構造の比較解析には、*Chlorella variabilis* NC64 と *Chlorella vulgaris* (*Coccomyxa subellipsoidea* c-169) のゲノム配列を用いた。*Chlorella* sp. A99 で失われている可能性のある遺伝子については、ゲノム DNA をテンプレートとして、候補遺伝子における緑藻類間で保存された領域に設計したプライマーを用いた PCR を行い、ゲノムに遺伝子が存在するかを確認した。

また、共生クロレラにおいて利用可能な窒素源を調べるため、硝酸塩、アンモニウム塩、グルタミン、カサミノ酸を同濃度で添加した培養液中でクロレラの培養を行った。コントロールとして、*C. variabilis* NC64 と *C. vulgaris* c-169 を同条件で培養した。

4. 研究成果

<クロレラとの共生に重要な役割を果たすヒドラ遺伝子>

まず A99 と Apo のトランスクリプトームの比較解析を行い、クロレラとの共生の有無によって発現変化する 679 遺伝子を同定した。この遺伝子群は、グリーンヒドラに種特異的に存在する遺伝子を多く含む傾向を示した。一方、既知遺伝子のオルソログについては、共生状態で発現上昇を示した遺伝子には膜輸送に関わるものが多く、逆に共生状態で発現減少を示した遺伝子には代謝に関わる遺伝子が多いことがわかった。このことから、グリーンヒドラでは共生状態において分子の輸送が活発であり、非共生状態とは代謝状態が異なると考えられる。

さらに A99 において NC64、Apo 両方と比べて発現変化が見られる遺伝子、つまり A99 において *Chlorella* sp. A99 との種特異的な共生関係が成立している時のみ発現が変動する 12 遺伝子を同定した。興味深いことに、明暗実験と光合成阻害実験により、これらのヒドラ遺伝子の大部分の発現はクロレラの光合成と相関を示した。共生クロレラは大量の糖類（マルトース）を光合成産物として分泌し、ヒドラに供給しているという報告がある。本研究で同定された候補遺伝子はクロレラの光合成によって合成・分泌された糖類に反応し、発現が変化した可能性が考えられる。これを確かめるため、マルトースを加えた培養液中でヒドラを飼育したところ、候補遺伝子の中でグルタミン合成酵素（GS）、ナトリウム依存性リン酸トランスポーター（NaPi）、Spot14 の遺伝子の発現が上昇した。Spot14 はヒトやマウスでは甲状腺ホルモン投与の

他、炭水化物や糖の摂食で発現が上昇することが報告されている。このことから共生状態においてヒドラ細胞は高い糖レベルにあることを示唆していると考えられる。また、GS はアンモニアとグルタミン酸からグルタミンを合成する酵素で、植物の窒素代謝に重要であることが知られている。また、NaPi はリン酸を細胞内に能動輸送するトランスポーターで、細胞内恒常性の維持に重要である。窒素、リンは植物にとって必須な栄養素であり、これらの結果から、クロレラが光合成によりマルトース(Mal)を分泌してクロレラに与え、ヒドラはこれに反応して遺伝子発現を変化させ、グルタミン(Gln)やリン(Pi)を栄養源としてクロレラに与えるという相互作用が考えられる(図2)。このことは栄養面での依存関係においてヒドラとクロレラが高度に適応し合っており、ヒドラ-クロレラ間の協調的な相互作用によって、栄養供給が遺伝子レベルで調節されている可能性を示唆している。

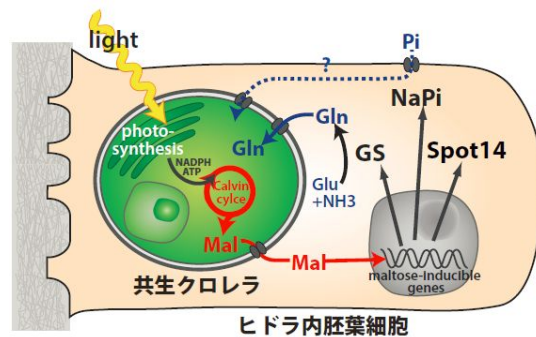


図2 ヒドラと共生クロレラ間の栄養面での相互作用

<共生クロレラ *Chlorella* sp. A99 のゲノム解析>

以上のような依存関係が成立している時、共生クロレラのゲノムにはどのような特徴があるのかを明らかにするため、グリーンヒドラ A99 の共生クロレラ *Chlorella* sp. A99 のゲノム解読を行った。Illumina Miseq と Hiseq を用いたシーケンシングと Newbler などによるアセンブルの結果、N50 = 1.7M の非常に長い Scaffold を得ることができた。ゲノムサイズは約 60Mb、GC 含量は約 70%で、多種のクロレラとほぼ同等であった。

この共生クロレラゲノムにおける窒素代謝系遺伝子の有無を調べたところ、興味深いことに一般の植物では窒素同化に必須とされている硝酸トランスポーター(NRT)や硝酸還元酵素(NiR)などの硝酸同化に関わる遺伝子の一部が欠失していた(図3)。これら遺伝子の欠失は、緑藻類の硝酸同化遺伝子間で保存された領域に設計したプライマーを用いた PCR でも確かめられた。また、菌類や藻類など多くの硝酸同化生物において、硝酸同化関連遺伝子群は染色体上にクラスターを形成しており、同化の効率に寄与していると言われている。実際に *C. variabilis* NC64 や *C. vulgaris* c-169 ではこのようなクラス

ターが見られる。その一方、*Chlorella sp.* A99 ゲノムにはこのような構造は見つからなかった。

さらに、硝酸、アンモニウム、アミノ酸(カサミノ酸、グルタミン)をそれぞれ窒素源として *Chlorella sp.* A99 を単離培養したところ、アミノ酸存在下でのみ増殖が見られた。その一方、通常の藻類用培地にアミノ酸を加えただけでは継続的な培養はできなかったことから、他にも何か足りない栄養素があると考えられる。

一方、アンモニアトランスポーターは *Chlorella sp.* A99 ゲノムに存在している。しかし共生クロレラの存在するシンビオソームの内部は酸性であり、酸性条件下ではアンモニア同化は阻害されるという報告がある。以上のことから、共生クロレラは窒素源としてヒドラから供給されるアミノ酸に依存し、その結果、*Chlorella sp.* A99 のゲノムからは硝酸同化システムが失われたと考えられる。

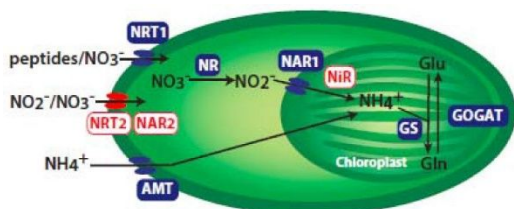


図3 共生クロレラ *Chlorella sp.* A99 の窒素同化経路
赤文字で示した遺伝子がゲノムから失われている。

<まとめ>

以上のように、本研究において動物 藻類共生システムの本質と考えられる栄養面のやりとりについて、分子相互作用のモデルを遺伝子発現の面から具体的に示すことができた。さらに、本研究では共生による依存関係の結果、共生体のゲノムにおいて重要な代謝経路の遺伝子の一部が欠失していることを明らかにした。

共生・寄生生物のゲノムが遺伝子欠失を伴い縮小し、宿主のゲノムと機能的統合に向かって行く傾向があることは多くの生物で示されている。藻類との共生システムにおけるその究極の例がオルガネラ化した葉緑体で、ほとんどの遺伝子は宿主側に移動したか消失したと考えられている。今回、グリーンヒドラにおいて、栄養供給の相互依存と、共生藻の主要な代謝経路の一部の縮小が見られた一方、ゲノムサイズや GC 含量は他の遊泳性のクロレラとそれほど差はなかった。このことは、ヒドラ クロレラ共生システムは、共生ゲノム進化の過程の比較的初期段階にあることを示しており、栄養供給の依存関係の成立とその代謝経路の縮小はシンビオジェネシスの進化の第一段階なのかもしれない。

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)

[学会発表](計6件)

(1) International Joint Meeting of the German Society for Cell Biology and the German Society for Developmental Biology. "The Hydra viridissima/ Chlorella symbiosis revisited: Understanding a complex team of players at the base of animal evolution." Mayuko Hamada, Ulrich Knief, Katja Schröder, Sebastian Fraune, Nori Satoh and Thomas C.G. Bosch. (2013年9月・Heidelberg, Germany)

(2) International Workshop "Unravelling the Developmental Regulatory Network in Early Animals" "The Hydra viridissima/ Chlorella symbiosis revisited: understanding a complex team of players at the base of animal evolution." Mayuko Hamada, Ulrich Kürn, Katja Schröder, Sebastian Fraune, Nori Satoh and Thomas C.G. Bosch. (2013年9月・Tutzing, Germany)

(3) 日本動物学会第85回大会「グリーンヒドラを用いた共生システムにおける分子的相互作用とゲノム進化の解析」濱田麻友子, 佐藤 矩行, Thomas C. G. Bosch. (2014年9月・仙台)

(4) 平成26年度日本動物学会中部支部大会シンポジウム「海産無脊椎動物研究の最前線」 「ゲノムから見た刺胞動物 藻類共生システム」濱田麻友子(2014年11月・金沢)

(5) 日本藻類学会第39回大会「グリーンヒドラ クロレラ共生系における分子相互作用とゲノム進化」濱田麻友子, 新里宙也, Ulrich Kürn, 佐藤矩行, Thomas C.G. Bosch(2015年3月・福岡)

(6) Molecular interaction and genome evolution in the green hydra and chlorella symbiosis. Mayuko Hamada, Ulrich Kürn, Katja Schröder, Sebastian Fraune, Maria Khalturina, Chuya Shinzato, Nori Satoh and Thomas C.G. Bosch. International Workshop "Animal evolution: new perspectives from early emerging metazoans" (2015年9月・Tutzing, Germany)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 麻友子 (HAMADA, Mayuko)
沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミクスユニット・研究員
研究者番号: 40378584

(2)研究分担者 ()

研究者番号 :

(3)連携研究者 ()

研究者番号 :

(4)研究協力者
Thomas C.G. Bosch (BOSCH, C.G. Thomas)
キール大学・教授