

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：34204

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840141

研究課題名(和文) 繊毛虫類における細胞内共生藻の多様性と共生藻選択に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the diversity of the endosymbiotic algae in ciliates

研究代表者

保科 亮 (HOSHINA, Ryo)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・助手

研究者番号：40373089

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)：繊毛虫における藻類との細胞内共生は、一時的なものと考えられてきた。著者らは継続的なサンプリングとDNA解析を通じ、比較的多くの共生繊毛虫は長期にわたり独自の藻類を保有すること、また、種レベルでわずかな種類の共生藻が多様な宿主生物にシェアされる傾向が見えてきた。ただし、同種の藻類においても、異なる宿主種間では Spacer 領域の塩基配列が異なるなど、上述の長期保持を支持する結果を得ている。

研究成果の概要(英文)：It has been thought that the symbiotic associations between ciliates and their endosymbiotic algae are temporary. We executed continuous sampling of the ciliates and their algal DNA analyses. In consequence, we found that comparatively large number of ciliate species maintain their own algae, and the small number of algal species are shared among different host species. It was found some differences, e.g., nucleotide substitutions in spacer region, in the same species of algae among different host species, which may also indicate the persistent symbioses.

研究分野：細胞内共生

キーワード：共生藻 植物化 継続的共生 ズークロレラ

1. 研究開始当初の背景

細胞内共生は進化の原動力といわれる。近年の藻類の研究では細胞内共生が何度も起きており、その結果多様な光合成生物が出現したことがわかっている。共生した藻類の葉緑体化が完成した二次的な植物(珪藻、褐藻など)やその直前段階にある生物(クリプト藻、クロララクニオ藻)に関する研究は進んでいるものの、共生の初期段階にある生物群の解析はほとんど進んでいない。淡水域では様々な繊毛虫が主に緑色藻類を細胞内共生させており、これらは「植物化」への一過程と考えられているが、その実態はよくわかっていない。

2. 研究の目的

(1) 繊毛虫が細胞内共生させている共生藻のアイデンティティーを、種レベルで突き止める。

(2) 繊毛虫がもつ共生藻と繊毛虫出現地の藻類フロラとを比較し、繊毛虫における細胞内共生藻の選択性について類推する。

(3) 共生藻の系統を解析し、共生藻として受け入れられやすい系統の有無、あるいは何らかの特性があるのかについて探る。

(4) 培養系が確立した共生繊毛虫ミドリゾウリムシを実験材料に、共生藻を保有することによる宿主側のメリットを探る。

3. 研究の方法

(1) 共生藻を保有する繊毛虫(以下「共生繊毛虫」と称す)は多数知られるが、ミドリゾウリムシを除くと公的機関のストックはほとんどなく、自身でサンプリングをおこなう必要があった。琵琶湖、および琵琶湖博物館自然観察池を定点に設定し定期的なサンプリングをおこなったほか、居住地周辺や島嶼域の湖沼にてサンプリングをおこなった。

(2) 採集した共生繊毛虫ごと DNA を抽出し、緑色藻あるいは宿主にスペシフィックなプライマーを用いて共生藻および宿主の DNA 解析をおこなった。特に共生藻の DNA 解析では SSU rDNA ITS2 全域を決定した。

(3) 採集地の水を植物育成用寒天プレートに塗布し、出現する藻類コロニーの形態観察と DNA を解析し(藻類フロラ)、共生藻との関連を調べた。

(4) ミドリゾウリムシをさまざまな環境下に曝し、そのレスポンスを探った。また、共生藻を除去したミドリゾウリムシを用いて、共生藻の置換実験をおこなった。

4. 研究成果

(1) 定点として設定した琵琶湖および関連水域より、約 10 種の共生繊毛虫を採集、直後に洗浄し DNA 抽出、共生藻の rDNA をターゲットとした PCR をおこなった。これらの PCR 産物は、ダイレクトシーケンスであるにも関わらず、ほとんどのケースではきれいなシングルピークが得られた。これは、各々の共生繊毛虫種が、天然下においても共生藻を細胞内で高度にクローン化させていることを示すと考えている。また、いくつかの繊毛虫種が特定の共生藻種(新属新種として記載予定: 仮称“Chlorb”)を共有していた。同一共生藻種のシェアリングに関してはすでに報告されていたが、周囲にいる自由生活型藻類を選択的に取り込んだためと考えられていた。しかし、本研究では繰り返しのサンプリングと各共生藻の多置換領域の比較から、種としては同一でありながら、それぞれの繊毛虫が持つ各共生藻が識別できており、同一

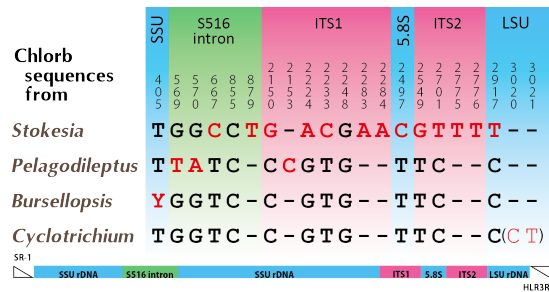


図1 宿主を異にする Chlorb 間の相違

の共生藻を3年以上の長期間にわたって維持している(図1)ことが判明した。一般には繊毛虫における藻類との共生は一時的なものと考えられており、この事実は長期的なサンプリングゆえに判明した大きな発見といえる。なお、同域の藻類フロラから Chlorb の出現は確認できていない。

(2) 定点外のサンプルを含めると、上述のようにシェアリングされる藻類種が他にも複数種あることが判明した。さらに、ある藻類種は、繊毛虫、太陽虫およびアメーボゾアと、スーパーグループをまたぐ宿主群でシェアされることもわかってきた。このケースでは SSU rDNA 中のイントロン挿入がそれぞれで異なるなど、シェアリングの時期は少なくとも最近ではなく、盗葉緑体的な共生藻の奪い合いによるものではないと示唆される。このようなデータから、いくつかの藻類種では、プロトゾア細胞内で長期的に維持されることを可能にする生理的迎合を含む遺伝的変化が起きているものと考えられ、ゲノム解析によるこれらの遺伝的比較と進化機構の解明を次の研究目標に掲げるに至っている。

(3) 共生藻はその多くが予想通りトレボウクシア藻綱クロレラ科に位置したが、緑藻綱に位置するものもあった。長期的な共生種と

思われるものは、どれも培地に補助的な有機窒素源を付加しなければ成長が促進されない、あるいは成長できず、共生藻らが生理的変貌を遂げていることが示唆される。

(4) ミドリゾウリムシを低温・暗黒下に曝したところ、共生藻が多くの油滴と思しきドロップを産生、また宿主細胞の大型化がみられた。このレスポンスは、繊毛虫が共生藻を保有する意義の根幹にかかわる可能性もあり、今後とも注目していきたい。一方、共生藻の置換実験においては、光合成産物を宿主に供与するとされるミドリゾウリムシ本来の共生藻 (*Chlorella variabilis* あるいは *Micractinium reisseri*) を持つ場合、放しない自由生活の藻を共生させた場合、また藻類なしの4条件において、ミドリゾウリムシの増殖率に変化は見られず、光合成産物の供与が宿主の成長に直接寄与するわけではないようである。

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 3 件)

Ryo Hoshina, Yasushi Kusuoka (Apr. 2016) DNA analysis of algal endosymbionts of ciliates reveals the state of algal integration and the surprising specificity of the symbiosis. *Protist* 167: 174–184. 査読あり
DOI: 10.1016/j.protis.2016.02.004

Ryo Hoshina (Sep. 2014) DNA analyses of a private collection of microbial green algae contribute to a better understanding of microbial diversity. *BMC Research Notes* 7: 592 (15 pages). 査読あり
DOI: 10.1186/1756-0500-7-592

Ryo Hoshina (Aug. 2014) Size of *Paramecium bursaria* individuals under cold and dark conditions. *Biologia* 69: 1018-1022. 査読あり
DOI: 10.2478/s11756-014-0404-6

[学会発表](計 9 件)

Ryo Hoshina, Toshinabu Suzuki, Yasushi Kusuoka: A ciliate *Cyclotrichium* sp. with ocher-colored granules. “Protist-2016 Moscow” Annual meeting International Society of Protistologists/21st International Society for Evolutionary Protistology, Moscow, Russia, 2016年6月7日

保科 亮, 楠岡泰: 琵琶湖から採取され

た藻類共生繊毛虫 *Cyclotrichium* spp. について. 日本藻類学会第40回大会 東京 2016年3月21日

楠岡泰, 保科 亮: 琵琶湖周辺の共生藻をもつ繊毛虫とその共生藻 II. 琵琶湖博物館研究セミナー 滋賀県草津市 2016年3月18日

秋月 祐輝, 保科 亮, 寺林 靖宣, 吉良 聡, 佐藤 昭之, 北川 正成, 小倉 淳: クロレラ共生種・自由生活種のゲノム比較から迫る共生初期メカニズムの解明. 日本分子生物学会第38回大会/日本生化学会第88回大会 兵庫県神戸市 2015年12月3日

Ryo Hoshina: Thinking about the symbiotic state of MARP: the multi-algae retaining protists. The Second International Symposium of Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells, Tsukuba, Japan 2015年10月2日 —招待講演—

保科 亮, 早川昌志, 楠岡泰, 洲崎 敏信: シェアされる共生藻. 日本藻類学会第39回大会 福岡県福岡市 2015年3月22日

楠岡泰, 保科 亮: 琵琶湖周辺の共生藻をもつ繊毛虫とその共生藻. 琵琶湖博物館研究セミナー 滋賀県草津市 2015年3月20日

Ryo Hoshina, Yasushi Kusuoka: The possibility of ‘persistent symbiosis’ in ciliate-algae symbioses. The second Asian Congress of Protistology/Ninth Asian Conference on Ciliate Biology, West Bengal, India, 2014年11月28日

保科 亮: 琵琶湖産藻類共生繊毛虫にみる共生藻選択. 原生生物合同セミナー 2014 兵庫県神戸市 2014年5月24日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保科 亮 (HOSHINA, Ryo)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・助手
研究者番号: 40373089

(2) 研究協力者

小倉 淳 (OGURA, Atsushi)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・

准教授

研究者番号：60465929

楠岡 泰 (KUSUOKA, Yasushi)

滋賀県立琵琶湖博物館・研究部・専門学芸
員

研究者番号：80359265

洲崎 敏伸 (SUZAKI, Toshinobu)

神戸大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：00187692