

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291073

研究課題名(和文) 二次共生の成立機構の解明と人為的誘導

研究課題名(英文) Elucidation of the establishment mechanism of the secondary symbiosis and the artificial induction

研究代表者

藤島 政博 (Fujishima, Masahiro)

山口大学・大学院創成科学研究科・教授(特命)

研究者番号：40127783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミドリゾウリムシは大量の細胞に同調して真核細胞どうしの細胞内共生(二次共生)を誘導できる唯一の実験系である。共生クロレラの有無で発現量が顕著に変化するミドリゾウリムシの遺伝子を検出し、遺伝子産物の合成ペプチドを抗原にして抗体を作製し、抗原の細胞内局在性を調べた。また、宿主細胞内でクロレラを包み、リソソーム消化からクロレラを守る重要な役割を果たすクロレラ包膜の抗体を作製し、二次共生成立過程での抗原の出現時期を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Paramecium bursaria is the only experimental system capable of inducing endosymbiosis between eukaryotic cells in synchronization with a large amount of cells. The genes of *P. bursaria* with markedly altered expression level in the presence or absence of symbiotic *Chlorella* cells were detected by RNAseq, and the antibodies raised for synthesized peptides of the gene products were developed and used to know intracellular localization of the antigens. In addition, an antibody against the perialgal vacuole membrane, which plays an essential role to protect algae from lysosomal fusion in secondary symbiosis, and clarified timing of appearance of the antigen during infection process.

研究分野：進化生物学

キーワード：ミドリゾウリムシ 共生クロレラ 二次共生 感染 細胞内共生 食胞

1. 研究開始当初の背景

細胞内共生の成立機構の解明には、細胞内共生生物を持たない細胞と細胞内共生能力を持つ小型細胞を混合し、細胞内共生成立までの計時的変化の解明が必要である。しかし、多くの細胞内共生系では、宿主と共生生物の両方または片方の生存が相手細胞に依存しており、両者の分離培養や両者を混合して細胞内共生再成立の同調誘導が困難であった。

ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) は、藻類のクロレラを細胞内共生させる能力を持っている。ミドリゾウリムシから単離した共生クロレラを、予めクロレラを除去した白いミドリゾウリムシと短時間混合すると、クロレラは宿主の細胞口から食胞を經由して宿主リソソームが融合しない Perialgal Vacuole 膜 (PV 膜) に包まれて細胞質に脱出する。その後、宿主細胞表面直下に定着して 24 時間後に分裂を開始し、細胞内共生を成立させる。ゾウリムシと共生クロレラは、それぞれ単独でも増殖可能である。我々は、共生クロレラを除去した白いミドリゾウリムシ (白色株) に共生クロレラを短時間だけ食胞に取り込ませ、大量の細胞に同調して二次共生 (真核細胞どうしの細胞内共生) を誘導できる条件を開発した (Kodama, Fujishima, Protoplasma, 225, 191-203, 2005)。

この誘導方法を用いて、クロレラの二次共生成立経路を明らかし (Kodama, Fujishima, Int Rev Cell Mol Biol, 279, 33-77, 2009)、同時に、二次共生の成立機構の解明には感染経路にある 4 箇所のチェックポイントの分子機構の解明が必要であることを明らかにすることによって、ミドリゾウリムシが二次共成立のしくみ解明のモデル材料になることを提唱した。

2. 研究の目的

下記の 1) から 6) を目的とした。

1) チェックポイント 1 (同一食胞内の一部のクロレラが宿主リソソーム酵素耐性を獲得) に必要な光合成でリソソーム酵素耐性になる原因の解明

2) チェックポイント 2 (食胞膜の出芽でクロレラは食胞から脱出し、出芽にはダイナミンが必要) で機能するダイナミンの種類の特長と出芽の引き金の解明

3) チェックポイント 3 (食胞膜は、出芽後 15 分以内にリソソーム阻止機能を持つ PV 膜に分化する) の PV 膜分化時期の詳細

4) PV 膜のリソソーム融合阻止機能に関する PV 膜物質の同定

5) ミドリゾウリムシの大核クロマチン移植で近縁種のゾウリムシにクロレラを共生させる能力を付与できるかどうかを解明

6) ミドリゾウリムシの PV 膜物質は他の二次共生系のシンビオソーム膜と同じ物質かどうかを解明

7) RNAseq で検出されたクロレラの有無で発現量が変化する宿主遺伝子産物の細胞内

局在性の確認

3. 研究の方法

1) について: ミドリゾウリムシの白色株と共生クロレラを光合成阻害剤存在下の恒常条件で混合し、食胞内でのリソソーム酵素耐性の有無を明らかにする。

2) について: 市販のダイナミン抗体を使用した間接蛍光抗体法で宿主食胞膜の出芽時にダイナミンのリング状蛍光が出芽部分に出現するかどうかを確認し、リングを確認できたらイムノプロットで抗原スポットを特定して抗原を精製し部分アミノ酸配列を調べる。

3) について: 食胞膜と PV 膜のモノクローナル抗体を作製し、各抗原の消失と出現時期を調べる。

4) について: PV 膜特異的抗原の抗原決定基が PV 膜のどちら側の面に存在するかを間接蛍光抗体法で確認し、細胞質側に抗原決定基が露出している場合には、抗体を細胞質に注射して抗原をマスクし、それによって PV 膜へのリソソーム融合が誘導されるかどうかを確認する。

5) について: 近縁種でクロレラを維持できないゾウリムシ種 A の大核にミドリゾウリムシの大核クロマチンを移植し、A がクロレラを共生させる能力を獲得できるかどうかを確認する。次にミドリゾウリムシ大核の染色体分画をパルスフィールド電気泳動でサイズで分画し、各分画を A の大核に移植して、その分画が細胞内共生誘導力を持つかを調べる。有効な分画の各染色体の塩基配列を解読し、A のクロレラ維持能力付与に関係する機能を持つと予測される遺伝子のリストを作製する。リストの各遺伝子を A の大核に移植し、クロレラ維持能力の有無を確認する。

6) について: PV 膜特異的モノクローナル抗体を用いて、他の二次共生系のシンビオソーム膜との交差反応性を間接蛍光抗体法とイムノプロットで明らかにする。

7) について: 合成ペプチドを抗原にした間接蛍光抗体法で抗原の細胞内局在性を調べる。

4. 研究成果

1) について: 宿主から単離したクロレラを遮光条件に一晩おいてからミドリゾウリムシ白色株と混合するとほぼ全てのクロレラが食胞内で消化され、光合成に伴う何かがリソソーム耐性獲得に必要であることが分かっていたが、その実体は解明できなかった。

2) について: ダイナミン重合阻害剤のダイナソアで食胞の出芽が阻害されることから、市販のダイナミン抗体を複数使用して間接蛍光抗体法で食胞の出芽形成時期を観察した。しかし、まだ、出芽部位にダイナミンリングは確認されていない。継続して観察を行っている。

3) について: 食胞膜特異的モノクローナル

抗体を作製し、食胞の出芽時に出芽した部分の食胞膜が抗体で標識されなくなることを確認した、このことは、出芽時に食胞膜の組成が変化することを示している(2014年日本動物学会で発表、論文準備中)。一方、PV膜特異的モノクローナル抗体を作製し、間接蛍光抗体法で抗原の出現時期を確認した。抗原は食胞から脱出したクロレラが宿主細胞表面直下に接着した後にクロレラを包む膜に出現した。食胞膜特異的抗原の消失時期からかなり遅れた時期なので、PV膜特異的抗原は複数あり、作製した抗体は、リソソーム融合阻止機能を持つ抗原以外の抗原に対する抗体であった可能性が示唆された。PV膜特異的抗体を使用したイムノプロットでは抗原のバンドを検出できなかった(論文準備中)。

4)について:3)の結果からPV膜特異的抗体がリソソーム融合阻止機能と関係しない抗原に対する抗体である可能性が示唆されたので、新たな抗体の作製が必要になり、期間中には調べることができなかった。

5)について:ミドリゾウリムシの大核クロマチンを近縁種の大核に移植したが、レシピエント細胞の細胞分裂速度が遅く、クロレラの感染実験に使用できる株はまだ得られていない。継続して実験を行っている。

6)について:作製したPV膜抗体を用いて、グリーンヒドラを用いて、抗体が藻類包膜と交差反応するかどうかを調べたが顕著な蛍光を観察できなかった。今後、ラッパムシ、サンゴ、ツリガネムシ、コルポダ、ユープロテス等の共生藻類保持細胞を使用して交差反応性を調べる。

7)について:合成ペプチドを抗原にして、5種のタンパク質に対する抗血清を作製し、間接蛍光抗体法で緑色細胞と白色細胞で抗原の存在場所と蛍光の強さを比較した。RNAseqの結果を反映した結果が得られた(2017年日本動物学会で発表、論文準備中)

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 9件)

Claudia Vannini, Cristiana Sigona, Martin Hahn, Giulio Petroni, Masahiro Fujishima. High degree of specificity in the association between symbiotic betaproteobacteria and the host *Euplotes* (Ciliophora, Hypotrichia). *European Journal of Protistology*, 査読有, 59, 124-132, 2017. Doi: 10.1016/j.ejop.2017.04.003
Kodama Y, Fujishima M. Chapter 16. *Paramecium* as a model organism for studies on primary and secondary endosymbioses. In, *Biocommunication in ciliates*, (Eds, Guenther Witzany, Mariusz Nowacki) Springer International Publishing Switzerland, pp. 277-304, 2016, 査読無, Doi:

10.1007/978-3-319-32211-7_16

Watanabe K, Nakao R, Fujishima M, Tachibana M, Shimizu T, Watarai M. Ciliate *Paramecium* is a natural reservoir of *Legionella pneumophila*. *Scientific Reports*, 査読有, 6, Article number: 24322 (2016). Doi:10.1038/srep24322

Kuroiwa T, Ohnuma M, Imoto Y, Misumi O, Nagata N, Mlyakawa I, Fujishima M, Yagisawa F, Kuroiwa H. Genome size of the ultrasmall unicellular freshwater green alga, *Medakamo hakoo* 311, as determined by staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole after microwave oven treatments: II. Comparison with *Cyanidioschyzon merolae*, *Saccharomyces cerevisiae* (n, 2n), and *Chlorella variabilis*. *Cytologia*, 査読有, 81 (1), 1-8, 2016. DOI: 10.1508/cytologia.81.69

Kodama Y, Fujishima M. Differences in infectivity of endosymbiotic *Chlorella variabilis* that are cultivated outside the host *Paramecium bursaria* for 50 years and that are immediately isolated from the host cells after 1 year reendosymbiosis. *Biology Open*, 査読有, (2016) 5, 55-61 Doi:10.1242/bio.013946.

Dohra Hideo, Fujishima Masahiro, Suzuki Haruo. Analysis of amino acid and codon usage in *Paramecium bursaria*. *FEBS Letters*, 査読有, 589, 3113-3118, 2015. Doi: 10.1016/j.febslet.2015.08.033

Kodama Y, Fujishima M. Symbiotic *Chlorella variabilis* incubated under constant dark condition for 24 hours loses ability to avoid digestion by host lysosomal enzymes in digestive vacuoles of host ciliate *Paramecium bursaria*. *FEMS Microbiology Ecology*, 査読有, 90, 946-955, 2014. Doi: 10.1111/1574-6941.12448

Dohra Hideo, Tanaka Kenya, Suzuki Tomohiro, Fujishima Masahiro, Suzuki Haruo. Draft genome sequences of three *Holospora* species (*Holospora obtusa*, *Holospora undulata*, and *Holospora elegans*), endonuclear symbiotic bacteria of the ciliate *Paramecium caudatum*. *FEMS Microbiology Letters* (Genome announcements), 査読有, 359 (1), 16-18, Oct. 2014. Doi: 10.1111/1574-6968.12577

Yuuki Kodama, Haruo Suzuki, Hideo Dohra, Manabu Sugii, Tatsuya Kitazume, Katsushi Yamaguchi, Shuji Shigenobu, Masahiro Fujishima. Comparison of gene expression of *Paramecium bursaria* with and without *Chlorella variabilis* symbionts. *BMC Genomics*, 査読有, 2014, 15:183. Doi:10.1186/1471-2164-15-183

[学会発表](計 30件)

藤島政博. 真核細胞のモデル材料として使用されてきたゾウリムシコレクション

の展望 .第 91 回日本細菌学会総会ワークショップ 7「魅力ある研究素材としての第四期 NBRP コレクションの紹介と ABS 情報の最前線」、福岡国際会議場、2018 年 3 月 28 日、招待講演
Nishida T, Hara N, Watanabe K, Shimizu T, Fujishima M, Watarai M. *Legionella pneumoniae* ToIC inhibits cellular trafficking in *Paramecium tetraurelia*. 第 91 回日本細菌学会総会、福岡国際会議場、2018 年 3 月 27 日
渡邊健太、西田隆司、橘 理人、藤島政博、清水 隆、度会雅久 . 比較ゲノム解析を用いたレジオネラのゾウリムシ共生因子の探索 . 第 91 回日本細菌学会総会、ワークショップ 3「選抜ワークショップ」. 福岡国際会議場、2018 年 3 月 27 日、招待講演
徳田岳、福井知穂、松浦優 (琉球大・熱生研)、渡辺裕文 (農研機構)、藤島政博 . タカサゴシロアリの腸内共生スピロヘータによるキシラン分解 . 3 月 25-27 日 (発表は 27 日) . 鹿児島大学郡元キャンパス、第 62 回日本応用動物昆虫学会大会
藤島政博 . ゾウリムシの凍結保存の現状 . Cryopreservation Conference 2017. つくば市、文部科学省研究交流センター 2 階国際会議場 (茨城県つくば市) . 2017 年 11 月 2 日
藤島政博、児玉有紀 . 共生藻の有無で発現が変化するミドリゾウリムシの遺伝子産物の細胞内局在性、第 88 回日本動物学会、富山県民会館、2017 年 9 月 21-23 日、発表は 21 日 . 11:00-11:15
原奈穂、西田隆司、渡邊健太、藤島政博、清水隆、度会雅久 . *Legionella pneumophila* と原生生物との共生における ToIC の機能解析 . 第 160 回日本獣医学会、鹿児島大学郡元キャンパス、2017 年 9 月 13-15 日 .
渡邊健太、三島真渚美、西田隆司、藤島政博、清水隆、度会雅久 . レジオネラのゾウリムシ共生必須因子の同定とその機能解析 . 第 160 回日本獣医学会、鹿児島大学郡元キャンパス、2017 年 9 月 13-15 日 .
道羅英夫、鈴木治夫、鈴木智大、藤島政博 . PacBio シーケンスによるゾウリムシ核内共生 *Ca. Megaira polyxenophila* のゲノム解析 . NGS 現場の会第五回研究会、2017 年 5 月 22-24 日、仙台国際センター
藤島政博 . シンポジウムオーガナイザー、一次共生の成立機構解明のモデル生物としてのゾウリムシ . 第 87 回日本動物学会沖縄大会シンポジウム『ナショナルバイオリソースプロジェクト「ゾウリムシ」を用いた研究例』、宜野湾市、オキナワコンベンションセンター、平成 28 年 11 月 17 日
渡邊健太、藤島政博、度会雅久 . LefA 遺

伝子を介した *Legionella pneumophila* の原生生物共生メカニズムの解析 . 第 159 回日本獣医学会、日本大学生物資源科学部、2016 年 9 月 6-9 日

三島真渚美、渡邊健太、鈴木治夫、藤島政博、清水 隆、度会雅久 . ゾウリムシ共生細菌のゲノム情報を利用したレジオネラ属のゾウリムシ共生因子の探索、第 159 回日本獣医学会、日本大学生物資源科学部、2016 年 9 月 6-8 日

渡邊健太、中尾亮、藤島政博、橘理人、清水隆、度会雅久 . Modulation of endosymbiosis by *Legionella pneumophila* in Ciliate *Paramecium*. 第 89 回日本細菌学会総会、大阪国際交流センター、2016 年 3 月 23 日-25 日

内田綺乃、村上崇史、児玉有紀、藤島政博 . 核内共生細菌ホロスポラが菌体内に取り込む宿主核ヒストンの分子種の特定 . 日本原生生物学会第 48 回東京大会、国立感染症研究所、2015 年 11 月 6-8 日

藤島政博 . 細胞内共生の成立機構の解明と宿主細胞の環境適応力の増強 . 30 回微生物生態学会 (土浦大会) . JSME シンポジウム、土浦市亀城プラザ、2015 年 10 月 20 日、招待講演

Fujishima M . UV induces transfer of 16S rRNA fragments of the micronucleus-specific bacterium *Holospora undulata* to the host *Paramecium* nucleoli. VII European Congress of Protistology, Seville Univ. Spain. Sept. 6-10, 2015.

Fujishima M . Plenary lecture Endosymbiosis in *Paramecium bursaria* and *Chlorella variabilis*. 2nd Asian Congress of Protistology and 9th Asian Conference of Ciliate Biology, Univ. of Kalyani, India, Nov. 29, 2014. 2nd Asian Congress of Protistology, Karyani Univ., India, Nov. 29, 2014

Yuki Kawamoto, Masahiro Fujishima . Ultraviolet ray induces transfer of 16S rRNA fragments of micronucleus-specific bacterium *Holospora* to the host *Paramecium* macronuclear nucleoli. 2nd Asian Congress of Protistology, Karyani Univ., India, Nov. 27-29, 2014

藤島政博、山下淳平、児玉有紀 . ミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生初期過程における Perialgal vacuole 膜の分化時期 . 日本原生生物学会、宮城教育大学、2014 年 10 月 31-11 月 2 日

道羅英夫、児玉有紀、鈴木治夫、杉井 学、北爪達也、山口勝司、重信秀治、藤島政博 . ミドリゾウリムシのトランスクリプトームデータを用いたゲノム機能解析 . 日本原生生物学会、宮城教育大学、2014 年 10 月 31-11 月 2 日 .

21 Cristiana Sigona, Masahiro Fujishima, Giulio Petroni, Martin Hahn, Claudia

- Vannini. An investigation on the role of betaproteobacterial endosymbionts in *Euplotes* for a better understanding of symbiosis evolution: preliminary results of trans-infection experiments. 29th Italian Society of Protistology, Padova, Italy. Oct 2-4, 2014.
- 22 渡邊健太、橘理人、南川薫、藤島政博、清水隆、度会雅久．ゾウリムシ感染モデルを用いたレジオネラ属菌の原生生物内寄生機序の解析．第157回日本獣医学会学術集会、北海道大学、2014年9月9-11日
- 23 藤島政博、山下淳平、児玉有紀．ミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生初期過程におけるクロレラ包膜の分化時期．日本動物学会第85回仙台大会、2014年9月11日
- 24 児玉有紀、藤島政博．感染初期過程に置けるクロレラの細胞分裂と細胞数は宿主ミドリゾウリムシの栄養状態で調節される．日本動物学会第85回仙台大会、発表日、2014年9月11日
- 25 田中健也、藤島政博．ゾウリムシ属における油産生能力の比較．日本動物学会第85回仙台大会、発表日、2014年9月11日
- 26 河本雄貴、佐藤晋也、藤島政博．紫外線はゾウリムシの小核特異的共生細菌ホロスポラの16S rRNA断片を宿主大核核小体に転移させる．日本動物学会第85回仙台大会、発表日、2014年9月11日
- 27 藤島政博、西山翔、児玉有紀．ミドリゾウリムシの共生クロレラ包膜と宿主細胞表層直下のミトコンドリアとの接着．生物系三学会中四国支部大会、岡山理科大学、2014年5月11日
- 28 名原諒、藤島政博．ミドリゾウリムシの共生クロレラ包膜特異的モノクローナル抗体の作成．生物系三学会中四国支部大会、岡山理科大学、2014年5月10日
- 29 寺田弥生、藤島政博．ゾウリムシの小核特異的共生細菌 *Holospora undulata* のペリプラズムに存在する高分子量抗原の性質．生物系三学会中四国支部大会、岡山理科大学、2014年5月10日．
- 30 河本雄貴、佐藤晋也、藤島政博．紫外線UV-Cの照射によって誘導されるゾウリムシの小核特異的共生細菌 *Holospora undulata* の16SリボソームRNA断片の宿主大核核小体への転移．生物系三学会中四国支部大会、岡山理科大学、2014年5月10日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

研究室 HP: https://accafe.jp/fujishima_lab

NBRP ゾウリムシ:

<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・大学院創成科学研究科・教授(特命)

研究者番号: 40127783

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

児玉 有紀 (KODAMA, Yuuki)

島根大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号: 80582478

(4) 研究協力者

田中 健也 (TANAKA, Kenya)

村上 理子 (MURAKAMI Riko)