

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840119

研究課題名(和文)細胞内共生成立の分子機構と細胞内共生の進化的意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism and the evolutionary significance in establishment of endosymbiosis

研究代表者

児玉 有紀 (Yuki, Kodama)

島根大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：80582478

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)： 繊毛虫ミドリゾウリムシの細胞内には約700細胞のクロレラが共生している。本研究課題は、細胞生物学および分子生物学的な手法を用いて、細胞内共生成立の分子機構と進化的意義を解明することを目的として行った。

ミドリゾウリムシと共生前後のクロレラからRNAを抽出し、Illumina HiSeq2000によるシーケンスをおこなった。さらに、ミドリゾウリムシから50年以上前に単離され、宿主外で継代培養されてきた共生クロレラもミドリゾウリムシへの感染能力を維持していることを明らかにした。生きたクロレラは、再共生過程において、宿主食胞内での消化のプロセスに影響を与えることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Paramecium bursaria cells harbor about 700 of symbiotic Chlorella spp. in their cytoplasm. The purpose of this research project was elucidation of the molecular mechanism and the evolutionary significance in establishment of endosymbiosis.

We have undertaken Illumina deep sequencing of mRNAs prepared from symbiotic Chlorella cells. Then, we compared gene expressions of before and after endosymbiosis with *P. bursaria* to elucidate the genetic control for establishment of secondary symbiosis. Furthermore, we clarified that symbiotic algae isolated from *P. bursaria* nearly 50 years ago and was thereafter cultivated outside the host have an infectivity to algae-removed *P. bursaria* cells. Moreover, we found that the isolated living symbiotic algae influence the digestive process in the host *P. bursaria*'s digestive vacuoles during the early reinfection process.

研究分野：共生生物学

キーワード：ミドリゾウリムシ クロレラ 細胞内共生 トランスクリプトーム解析 二次共生 進化

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアや葉緑体を生み出した細胞内共生は現在でも多くの生物同士で見られ、新たな機能と構造の獲得による環境適応能力の増強と進化の原動力となっている。共生体を持つ生物は、地球上の至る所に生息しているが、細胞内共生成立の分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。その最も大きな原因は、ほとんどの細胞内共生生物においては、互いの存在が生存に不可欠なまでに宿主と共生体の一体化が進み、再共生の誘導実験が困難なためである。この点を解決できるのが、繊毛虫のミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) である。ミドリゾウリムシは細胞内に約 700 個の共生クロレラを保持している。各クロレラは宿主の食胞膜由来の perialgal vacuole (PV) 膜と呼ばれる共生胞に包まれている。PV 膜には宿主のリソソームが融合しない。ミドリゾウリムシとクロレラは相利共生の関係にあるが、まだ互いの存在が生存に必須な状態ではなく、ミドリゾウリムシからのクロレラの除去や再共生が可能である。これは、両者の関係が二次共生による新たな真核細胞誕生の初期段階にあることを示している。それだけではなく、宿主と共生体はそれぞれを大量に培養し、混合によって容易に二次共生を誘導することができる。これらの理由からミドリゾウリムシは細胞内共生成立のメカニズム解明のモデル材料になると 50 年以上前から考えられてきた。しかし、この材料を使った二次共生の研究はほとんど進展していなかった。

研究代表者らはクロレラ除去細胞に共生クロレラをパルス的に与え、洗浄してチェイスする方法を初めてこの系に導入し、クロレラの再共生過程を明らかにした。さらに、二次共生成立に必須の 4 つのプロセスの存在が明らかになり、二次共生成立の分子機構解明の突破口を開くことができた。クロレラの再共生過程は「細胞内共生を成立させるクロ

レラは、アシドソーム融合後にリソソーム融合前の食胞から脱出して出現し、PV 膜に包まれる」という Meier and Wiessner (1989) の結果が定説であったが、研究代表者らは細胞内共生を成立させるクロレラは、アシドソームとリソソームが融合した後の食胞から出現することを初めて明らかにした (Kodama and Fujishima, 2005)。このクロレラの宿主リソソーム酵素による消化の回避の方法は、これまでに知られていたどの寄生性および共生性生物とも異なる新規なものであった (Kodama and Fujishima, 2005)。

2. 研究の目的

研究代表者らの研究は、細胞内共生の研究を、従来の真核細胞の進化のルーツを探る研究から細胞内共生成立の分子機構解明の研究へ転換させることを可能にした。二次共生の成立機構解明の研究は、研究代表者らを含む少数の研究グループで始まったばかりであるが、二次共生を多数の細胞に同調して誘導し、時間経過に伴う変化を追跡できる実験系は、現在はこのミドリゾウリムシ以外には存在しない。本研究では、細胞生物学および分子生物学的手法を用いて、細胞内共生成立に必須な前述の 4 つのプロセスの分子機構を解明し、さらに生態学的手法を用いて、細胞内共生の進化的意義を解明することを目的としている。本研究の発展は細胞内共生成立に普遍的な現象の分子機構の解明、細胞内共生関係の維持を通じた生態系の維持と環境保全、細胞内共生による真核細胞の進化と多様性のメカニズムの解明等に繋がると期待される。

3. 研究の方法

クロレラを除去したミドリゾウリムシ細胞、クロレラとの共生が成立したミドリゾウ

リムシ細胞、ミドリゾウリムシと共生前後のクロレラ、さらにクロレラの再共生成立に必要な前述の4つの各プロセスのミドリゾウリムシ細胞とクロレラを材料として、遺伝子発現を比較し(トランスクリプトーム解析)、細胞内共生の成立に関連する遺伝子と遺伝子産物を網羅的に解析した。次に、重要な機能が予測されたタンパク質についてはポリクローナル抗体を作製して、共生成立過程での抗原の消長と細胞内局在性を間接蛍光抗体法で調べた。cDNAの作成とイルミナ解析は研究協力者の基礎生物学研究所の重信秀治特任准教授と、研究協力者の山口大学の藤島政博教授(特命)との共同研究で行った。基礎生物学研究所の設備の利用許可は2011年4月に採択済みである。その他に各種阻害剤や蛍光色素やラマン分光解析法等を用いて、クロレラの再共生成立および維持における細胞生物学的な実験を行った。

4. 研究成果

平成 26 年度

- (1) クロレラと共生前後の宿主細胞のトランスクリプトーム解析を行った結果、クロレラとの共生によるミドリゾウリムシの遺伝子発現の変化が初めて明らかになった。6,698の遺伝子発現に差異がみられ、その中にはストレスタンパク質遺伝子や、抗酸化作用をもつグルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子などが含まれていた。
- (2) 細胞内共生に成功するクロレラは、宿主食胞に取り込まれた後、一時的にリソソーム消化酵素に対して耐性を示す。予め恒暗条件下で培養しておいたクロレラは、宿主食胞内での消化酵素耐性を失うことが明らかになった。

平成 27 年度

- (1) 共生クロレラを覆う食胞膜のラマンマッピングを測定した。銀ナノ粒子を取り込ませたミドリゾウリムシの表面増強ラマンスペクトル(SERS)測定を試みた。
- (2) 生きたクロレラは、酸性の小胞であるアシドソームが融合した宿主食胞内の酸性化を遅らせることができるが、ボイルしたクロレラやラテックスビーズにはその働きは無いことが明らかになった。また、酸性オルガネラ内のpHによって蛍光強度が変化するLysoSensor™ Yellow/Blue DND-160を用いて、食胞膜とPV膜を識別できることを明らかにした。
- (3) ミドリゾウリムシから50年以上前に単離され、宿主外で継代培養されてきた共生クロレラも、ミドリゾウリムシへの感染能力を維持していることが明らかになった。

- (4) ミドリゾウリムシの共生クロレラを宿主外で培養すると、定常期初期のクロレラは宿主リソソーム消化酵素による消化を免れるが、定常期のクロレラはその能力を失い、大部分が消化されることが明らかになった。

平成 28 年度

- (1) ミドリゾウリムシと共生前後、および再共生過程のクロレラからRNAを抽出し、それぞれのcDNAライブラリを作成して、Illumina HiSeq 2000によるシーケンスをおこなった。Biological replicatesのシーケンスのデータも含めて3回のシーケンスを行った。

- (2) 共生クロレラを持つミドリゾウリムシと除去したミドリゾウリムシ双方のラマンイメージを得ることに成功した。
- (3) ミドリゾウリムシのミトコンドリアに対するモノクローナル抗体を用いて、クロレラの共生前後に伴って起きる宿主のミトコンドリアの変化を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

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3件)

Y. Kodama, M. Nagase and A. Takahama: Symbiotic *Chlorella variabilis* strain, 1N, can influence the digestive process in the host *Paramecium bursaria* during early infection. *Symbiosis*, 71(1), 47-55, 2016. DOI: 10.1007/s13199-016-0411-1

Y. Kodama and M. Fujishima: 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*, 5, 55-61, 2015. DOI:10.1242/bio.013946

Y. Kodama and M. Fujishima: 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*, 90, 946-955, 2014. DOI: 10.1111/1574-6941.12448

[学会発表](計12件)

N. Yasumura, S. Uemura, K. Iwasaki, H. Noothalapati, Y. Kodama and T. Yamamoto: Elucidation of PV membrane differentiation mechanism in the green *Paramecium* and *Chlorella* symbiosis by Raman microspectroscopy. (14th annual meeting of The Japan Association of Medical Spectroscopy, Awajishima, Awaji Yumebutai International Conference Center, 2016年12月6日、ポスター発表)

児玉 有紀「二次共生の成立機構解明のモデル生物としてのミドリゾウリムシ」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」(第87回日本動物学会沖縄大会、オキナワコンベンションセンター、2016年11月17日)

河原 由香里、児玉 有紀、石田 秀樹「宍道湖・中海における原生生物の種組成と水質変動との関連性」(第49回日本原生生物学会大会、岡山大学、2016年10月10日、ポスター発表)

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」(第48回日本原生生物学会大

会、国立感染症研究所、東京都新宿区、
2015年11月8日、口頭発表)

児玉 有紀「繊毛虫ミドリゾウリムシと
緑藻クロレラとの細胞内共生」昆虫共生
酵母研究会主催公開シンポジウム「生物
の共生進化を考える」(島根大学松江キ
ャンパス、2015年6月1日)

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」(第47回日本原生生物学学会大会、
宮城教育大学、2014年11月2日、口頭
発表)

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」(第47回日本原生生物学
学会大会、宮城教育大学、2014年11月
2日、口頭発表)

A.P. Hata, Y. Kodama and T. Yamamoto:
Raman spectroscopic analysis of the
perialgal vacuole (PV) membrane of
symbiotic *Chlorella*
variabilis in *Paramecium bursaria*.
(Biomedical Molecular Imaging, 台北、
台湾、2014年11月、ポスター発表)

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」(第85回日本動物学会大会、東
北大学、2014年9月11日、口頭発表)

児玉 有紀、藤島 政博「感染初期過程に
お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
整される」(日本動物学会 第85回大会、
東北大学、2014年9月11日、口頭発表)

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
結合」(生物系三学会中国四国支部大会、
岡山大学、2014年5月11日、口頭発表)

児玉 有紀「繊毛虫ミドリゾウリムシと
緑藻クロレラとの細胞内共生成立機構
の解明を目指して」新学術領域研究「植
物細胞壁の情報処理システム」主催シ
ンポジウム「寄生共生インシデント」(東
京大学弥生講堂一条ホール、2014年4
月28日、招待講演)

〔図書〕(計2件)

Yuuki Kodama and Masahiro Fujishima:
Chapter16: *Paramecium* as a Model
Organism for Studies on Primary and
Secondary Endosymbioses. In,
Biocommunication of Ciliates, (Eds.)
Guenther W. and Mariusz N., Springer
International Publishing Switzerland,
pp. 277-304, 2016. ISBN:
978-3-319-32209-4

M. Fujishima and Y. Kodama: Insights
into the *Paramecium-Holospora* and
Paramecium-Chlorella symbioses. In,
Cilia/flagella and
ciliates/flagellates, (Eds.)
Hausmann K., Radek R., Schweizerbart
Science Publisher, Stuttgart, pp.
203-227, 2014. ISBN:
978-3-510-65287-7

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

児玉研究室のホームページ

http://accaff.e.jp/kodama_lab_jpn/

or

<https://sites.google.com/site/eryuyoujinohomepeji/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児玉 有紀 (KODAMA, Yuki)

島根大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：80582478

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：