

令和 4年 5月 31日

報道機関 各位

ミドリゾウリムシの細胞内にクロレラが共生すると
宿主のミトコンドリア数が減少することを初めて証明

◆本件のポイント！

- ・ 島根大学と山口大学との共同研究で、ミドリゾウリムシの細胞内にクロレラが共生すると、宿主ミドリゾウリムシのミトコンドリア数が減少し、その機能も低下することを複数の方法で初めて証明した。
- ・ クロレラが共生すると、ミトコンドリアの膜タンパク質濃度が低下するだけでなく、ミドリゾウリムシの細胞全体のタンパク質濃度も約 1/2 に低下することが分かった。
- ・ ミドリゾウリムシは、細胞内共生による細胞進化の研究や理科教育に役立つ。
- ・ 本研究成果は、2022年5月30日（英国時間10時、日本時間18時）に、国際学術雑誌「Scientific Reports」にオンライン掲載された。

◆本件の概要

ゾウリムシ属細胞は、最も知名度の高い単細胞の真核生物の一種です。それらを使った研究は世界各国で行われ生物学の発展に大きく貢献しています。

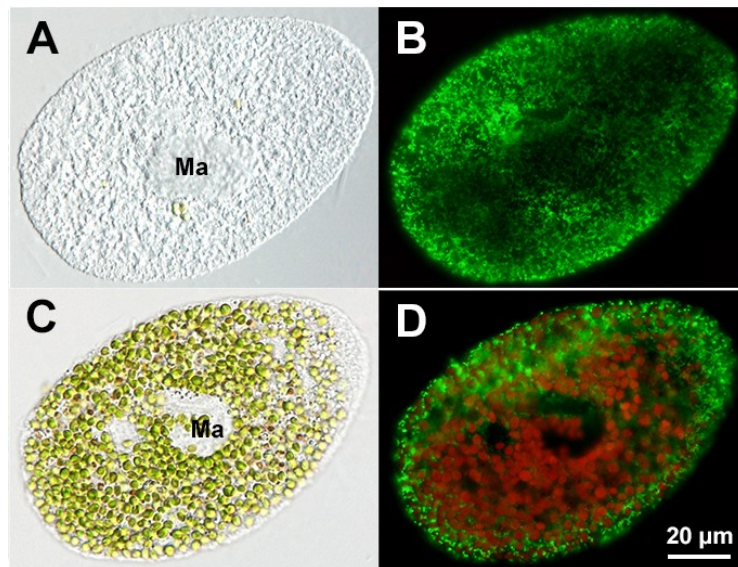
本研究では、ゾウリムシ属のミドリゾウリムシを使って、真核細胞の進化の解明に関する現象を発見しました。ミドリゾウリムシの細胞内には多数の緑藻類のクロレラが共生しています。宿主のミドリゾウリムシはクロレラに二酸化炭素や窒素源を与え、クロレラは光合成で得られた酸素や糖をミドリゾウリムシに与えます。このように、ミドリゾウリムシとクロレラの共生は互いにメリットがある相利共生の関係ですが、まだそれぞれの細胞が単独でも生存することができます。共生クロレラの除去や再共生を繰り返して行うことができるので、ミドリゾウリムシとクロレラは細胞内共生の研究のモデル生物として注目されています。

今回、島根大学の児玉有紀准教授は山口大学の藤島政博名誉教授との共同研究で、ミドリゾウリムシの細胞内にクロレラが共生すると、宿主のミドリゾウリムシの主要な細胞小器官であるミトコンドリアの数が減少し、その機能も低下することを複数の方法で初めて証明しました。それだけではなく、クロレラが共生するとミドリゾウリムシの細胞全体のタンパク質の濃度が約 1/2 に低下することも分かりました。細胞内共生は、真核生物の細胞小器官の起源を説明する重要な現象です。クロレラの共生によって、いつどのようにミトコンドリアの数や機能に変化が起こるのかを詳細に調べることで、共生生物が細胞小器官になる過程やその仕組みの解明に役立つことが期待されます。

本研究成果は、2022年5月30日（英国時間10時、日本時間18時）に、国際学術雑誌「Scientific Reports」にオンライン掲載されました。

* 詳しい研究内容は添付資料をご覧ください。

◆本件に関する写真



クロレラを除去したミドリゾウリムシ (A と B) とクロレラが共生しているミドリゾウリムシ (C と D)。(B) と (D) の緑色の蛍光はミドリゾウリムシのミトコンドリアを、(D) の赤色の蛍光はクロレラの自家蛍光を示している。クロレラが共生しているミドリゾウリムシの方がミトコンドリアの数が少ないことが分かる。

◆助成

本研究は、児玉准教授が代表の公益財団法人発酵研究所の平成 30 年度（2018 年度）一般研究助成、科学研究費補助金 基盤研究 (C) (20K06768)、藤島名誉教授が代表の文部科学省の特別経費（2012-2015 年度）の支援のもとで行われました。

◆本件の連絡先

島根大学 学術研究院 農生命科学系（生物資源科学部 生命科学科担当）
准教授 児玉 有紀（こだま ゆうき）

TEL : 0852-32-6438

E-mail : kodama[at]life.shimane-u.ac.jp ※[at]は@に置き換えてください



◆その他

詳しい研究内容や最新情報はこちらをご覧ください

▼児玉研究室の HP

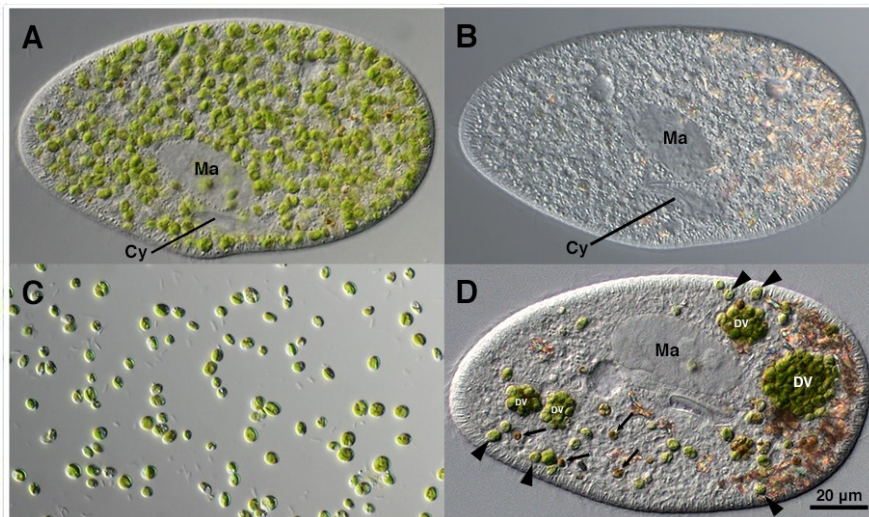
<https://sites.google.com/view/yuuki-kodama/home>



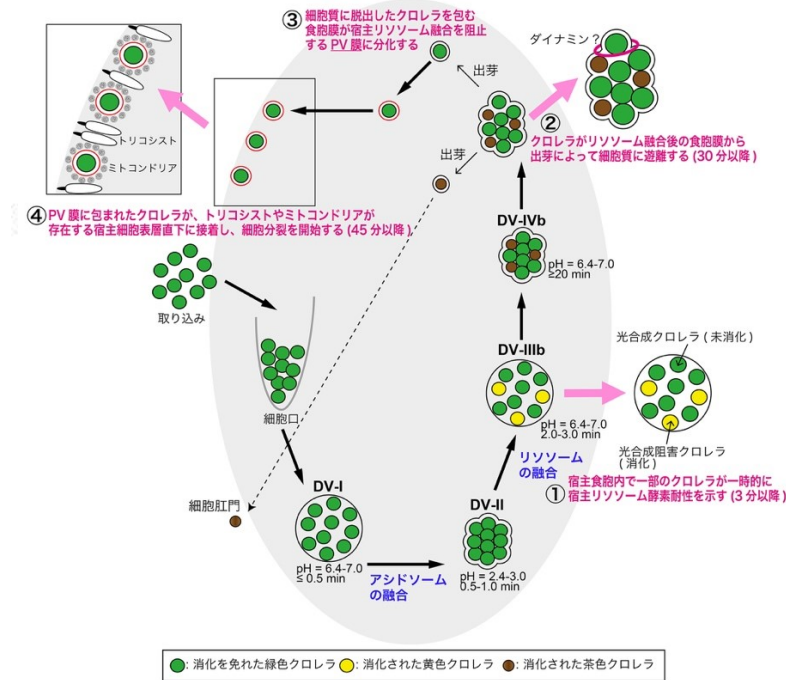
【添付資料： あり（ 5 枚） なし】

本研究の背景と目的

真核細胞内の主要な細胞小器官であるミトコンドリアや葉緑体を生み出した細胞内共生¹⁾は現在でも多くの細胞同士で見られ、真核細胞の進化や多様化の原動力となっています。しかし細胞内共生の成立や維持の機構はほとんど明らかにされていません。この謎を解明するためのモデル生物が、児玉と藤島が研究材料としている繊毛虫のミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) です (図 1A)。単細胞の真核生物のミドリゾウリムシの細胞内には約 700 個の緑藻類のクロレラ (*Chlorella variabilis*) が共生しているためその細胞は緑色に見えます。クロレラは光があれば光合成を行うことができるので、宿主のミドリゾウリムシに酸素やマルトースなどの光合成産物を与え、宿主のミドリゾウリムシはクロレラに二酸化炭素や窒素源などを与えています。このように、ミドリゾウリムシとクロレラは、共生することで互いにメリットをもたらす「相利共生」と呼ばれる関係です。その一方で、ミドリゾウリムシを暗闇で培養したり、光合成阻害剤で処理すると、完全にクロレラを除去することができます (図 1B)。クロレラの方も、ミドリゾウリムシの細胞から取り出して培養することが可能です (図 1C)。このように両者はまだ単独で増殖することが可能であり、互いの存在は生存に必須なまでに強固なものではありません。さらに興味深いことに、単独で培養しておいた両者を混合すると、クロレラはミドリゾウリムシの食胞 (私達の胃に相当する膜) を経由して再共生することができます (図 1D)。培養や顕微鏡での観察、実験操作のしやすさなどから、ミドリゾウリムシとクロレラは真核細胞同士の細胞内共生である二次共生の成立機構を解明するためのモデル生物として有望視されています。実際、児玉と藤島によって、ミドリゾウリムシとクロレラの二次共生の際の経時的変化が追跡され (Kodama and Fujishima, *Protoplasma* 225, 191–203, 2005)、細胞内共生の成立に必須な 4 つのチェックポイントが明らかになりました (図 2) (Kodama and Fujishima, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 279, 33–77, 2010)。



(図 1) A: クロレラが共生しているミドリゾウリムシ。B: A を暗闇で培養し光合成を阻止することで完全にクロレラを除去したミドリゾウリムシ。C: ミドリゾウリムシから単離した共生クロレラ。D: B と C を混合してから 3 時間後の細胞。矢尻は消化されずに生き残り、再共生に成功したクロレラを示す。Ma: 大核、Cy: 細胞口、DV: 食胞 (Kodama and Fujishima, *Protist*, 163, 658–670, 2012 から許可を得て転載。)



(図 2) クロレラとミドリゾウリムシの共生成立に必須な 4 つのチェックポイント。①宿主から単離したクロレラとクロレラを完全に除去したミドリゾウリムシを混合してから 3 分以降に、アシドソームとリソソームが融合した宿主の食胞内で一部のクロレラは宿主の消化酵素に耐性を示して緑色を維持するが、残りは黄色く変色して消化が始まる。②混合 30 分以降に、ダイナミンが関与する食胞膜の出芽によってクロレラが食胞膜に包まれて宿主細胞質中に 1 細胞ずつ遊離する。③細胞質中に遊離したクロレラを包む食胞膜が、宿主リソソームの融合を阻止する PV 膜に分化する。④共生クロレラを包む PV 膜が宿主細胞表面直下に接着して安定化し、24 時間後に細胞分裂を開始して細胞内共生を成立させる。(Fujishima and Kodama, J. Euk. Microbiol., 2022, in press を改変。)

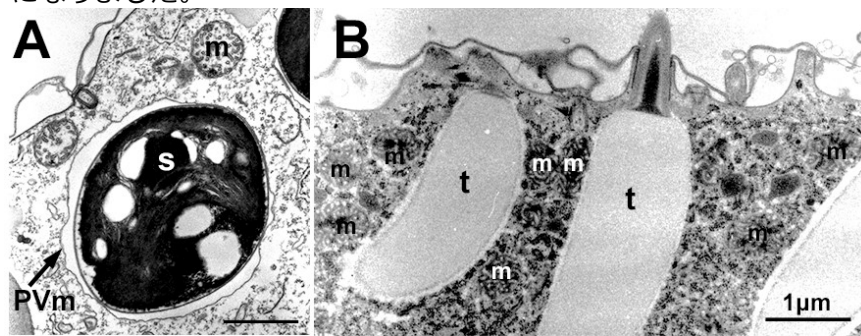
共生クロレラは、ミドリゾウリムシの細胞内では 1 細胞ずつ宿主食胞膜由来の perialgal vacuole (PV) 膜と呼ばれる共生包膜²⁾に包まれています。ミドリゾウリムシの細胞内では共生クロレラはミドリゾウリムシのミトコンドリアと PV 膜との接着によって細胞表面直下に固定されています。児玉と藤島の過去の観察結果から、クロレラを包む PV 膜はトリコシストと呼ばれる捕食者からの防御の機能を持つ細胞小器官を除去した空きスペースに接着することが明らかになっています (Kodama and Fujishima, Protist 160, 319-329, 2009)。ミドリゾウリムシの細胞表面直下にはトリコシストの他にミトコンドリアも常在しているの、これに PV 膜に包まれたクロレラが接着することで安定化し、ミトコンドリアの数にも影響を及ぼす可能性がありました。この可能性を検証するため、本研究では以下の実験を行いました。

1. 透過型電子顕微鏡³⁾を使って、クロレラが共生しているミドリゾウリムシと、全てのクロレラを除去したミドリゾウリムシの細胞表面直下のミトコンドリアとトリコシストを観察しました。
2. 藤島教授が作製したゾウリムシのミトコンドリアを特異的に認識するモノクローナル抗体⁴⁾を使って、クロレラが共生しているミドリゾウリムシと、クロレラを除去したミドリゾウリムシのミトコンドリアの位置や数を詳細に調べました。
3. クロレラが共生しているミドリゾウリムシと、クロレラを除去したミドリゾウリムシのミトコンドリア膜を含む抽出液のタンパク質濃度を比較しました。
4. クロレラとの共生の有無によって、ミドリゾウリムシの遺伝子発現がどのように変化するか

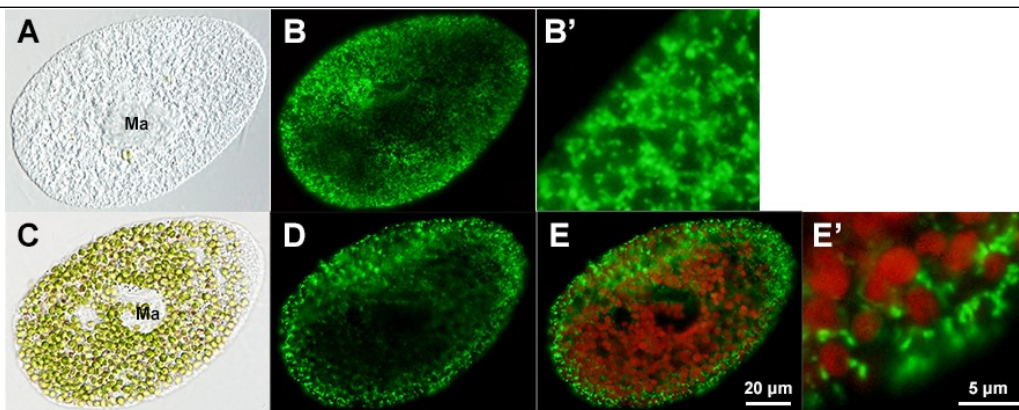
を明らかにしたトランスクリプトームデータ⁵⁾を使って (Kodama et al., BMC Genomics 15, 183, 2014)、クロレラが共生しているミドリゾウリムシと、クロレラを除去したミドリゾウリムシのミトコンドリアの遺伝子の発現量を比較しました。

結果と今後の展望

1. 透過型電子顕微鏡観察の結果、クロレラが共生すると宿主ミドリゾウリムシのトリコシストとミトコンドリアの両方の数が減少することが明らかになりました (図 3)。
2. ミトコンドリア特異的のモノクローナル抗体を使った間接蛍光顕微鏡観察の結果、クロレラの共生によって宿主のミトコンドリアの数が減少することが分かりました。また、共生クロレラを取り囲むようにしてミトコンドリアが配置していることも観察されました (図 4)。
3. ミトコンドリア膜を含む抽出液のタンパク質濃度を比較した結果、クロレラが共生するとミトコンドリア膜タンパク質濃度が低下することが明らかになりました (図 5A)。それだけではなく、ミドリゾウリムシの細胞全体のタンパク質濃度も約 1/2 に低下することが分かりました (図 5B)。
4. クロレラが共生するとミトコンドリアの機能に関する複数の遺伝子の発現量が低下することが明らかになりました。

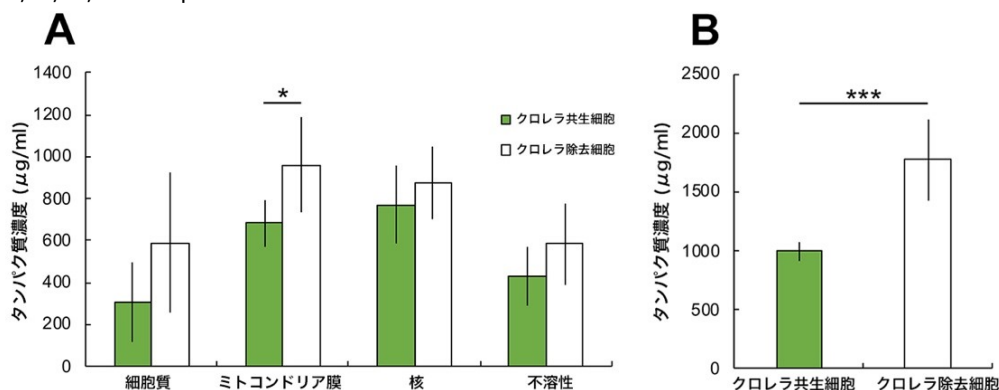


(図 3) クロレラが共生しているミドリゾウリムシ (A) とクロレラを除去したミドリゾウリムシ (B) の細胞表面直下の透過型電子顕微鏡写真。クロレラを除去したミドリゾウリムシではトリコシストとたくさんのミトコンドリアが観察されるが (B)、クロレラが共生しているミドリゾウリムシはミトコンドリアの数が少ない (A)。m, ミトコンドリア; t, トリコシスト; PVm, PV 膜; s, 共生藻。Bar=1 μm。



(図 4) クロレラを除去したミドリゾウリムシ (A, B, B') とクロレラが共生しているミドリゾウリムシ (C, D, E, E') の間接蛍光抗体法による顕微鏡写真。緑色の蛍光はミトコンドリアを示している。(A) と (C) : 微分干渉顕微鏡写真。(B') は (B) の細胞表面直下の拡大写真。(E) は (D) とクロレラの葉緑体中のクロロフィル a の自家蛍光 (赤い蛍光) の合成写真。(E') は (E) の細胞表面直下の共生クロレラの拡大写真。宿主ミトコンドリアは共生クロレラの周りに局在していることが分かる (E')。クロレラを除去したミドリゾウリムシと比較すると、クロレラが共生しているミドリゾウリムシのミトコンドリアの方が密度が低いことが分かる。Ma, 大核。Bar=20

μm (A, B, C, D, E)、5 μm (B'とE')。



(図5) (A) クロレラを除去したミドリゾウリムシおよびクロレラが共生しているミドリゾウリムシの4種類の細胞抽出液のタンパク質濃度。4種類の抽出液は、細胞質・ミトコンドリア膜を含む膜・核・および不溶性タンパク質(細胞骨格)を含む。クロレラを除去したミドリゾウリムシのミトコンドリア膜タンパク質の濃度は、クロレラが共生しているミドリゾウリムシよりも高いことが分かる。(B) クロレラを除去したミドリゾウリムシおよびクロレラが共生しているミドリゾウリムシの細胞全体のタンパク質濃度を比較したグラフ。クロレラを除去したミドリゾウリムシのタンパク質濃度は、クロレラが共生しているミドリゾウリムシの約1.8倍であった。

以上の結果から、ミドリゾウリムシにクロレラが共生すると、宿主ミドリゾウリムシの細胞小器官のミトコンドリアの数が減少し、それらの遺伝子発現も低下することが証明されました。

ミドリゾウリムシの共生クロレラだけではなく、トキソプラズマやレジオネラなどの細胞内寄生生物を包んでいる寄生胞も、宿主ミトコンドリアと密着・融合していることが知られています(Horwitz, J. Exp. Med, 158, 1319-1331, 1983; Sinai et al., J. Cell Sci. 110, 2117-2128, 1997)。この現象は、細胞内共生生物や細胞内寄生生物と宿主ミトコンドリアとの関連の重要性と普遍性を示唆しています。ミトコンドリアは、約20億年前に呼吸をする細菌が真核細胞内に共生して誕生したと考えられています。ミドリゾウリムシを含む繊毛虫類は、水素仮説の提唱やヒドロゲノソーム⁶⁾の発見など、進化生物学において非常に重要な発見に寄与してきました。また、ミドリゾウリムシは高校生物の教科書の「改訂版 生物基礎(2017年数研出版)」にも細胞内共生の例として紹介されています。ミドリゾウリムシは、真核細胞の進化の理科教育にも役立っている生物です。今回の研究で、クロレラの細胞内共生は宿主の主要な細胞小器官のミトコンドリアの数の減少と機能の低下という大きな変化をもたらすことが明らかになりました。クロレラの共生が、いつどのようにして宿主細胞のミトコンドリアの数や活性に変化を起こすのかを詳細に調べることで、共生生物が細胞小器官になる過程の仕組みを解明できることが期待されます。

論文の情報

論文のタイトル: Endosymbiotic *Chlorella variabilis* reduces mitochondrial number in the ciliate *Paramecium bursaria*

著者: Yuuki Kodama* and Masahiro Fujishima (*: 責任著者)

掲載誌: Scientific Reports

公開日: 2022年5月30日(英国時間10時、日本時間18時)

DOI: 10.1038/s41598-022-12496-8

語句の説明

- 1) 細胞内共生：細胞が他の細胞を食作用によって細胞内に取り込み、それを消化することなく維持する現象。
- 2) 共生胞膜：細胞内共生体を包んでいる宿主由来の膜。
- 3) 透過型電子顕微鏡：電子顕微鏡の一種。厚さ約 70~80 nm の薄く切った試料に電子線を透過させて観察する。細胞内の微細構造を詳細に観察することができる。
- 4) モノクローナル抗体：一種類の抗原決定基だけと抗原抗体反応を行う抗体。
- 5) トランスクリプトームデータ：特定の環境で細胞中に存在する全ての mRNA の種類と量を解析する手法のトランスクリプトーム解析で得られたデータ。
- 6) ヒドロゲノソーム：ミトコンドリアや葉緑体と同様に二重膜に包まれた細胞小器官。ミトコンドリアが起源の構造と考えられており、水素と ATP を産生する機能を持つ。一部の繊毛虫類などで見られる。