

研究課題別評価

1. 研究課題名 :共生藻を利用した原生動物の生存戦略の多様化

2. 研究者氏名 細谷浩史

3. 研究の狙い 本研究のねらいは、ミドリゾウリムシへの共生を可能にする共生藻由来の因子を、蛋白質レベル・遺伝子レベルで解析することを通じて、共生藻を利用した原生動物の生存戦略の多様化を議論できる科学的素地を確立することにある。

本研究の3年間の期間に、体内から共生藻を取り除いた「共生藻除去ミドリゾウリムシ」に共生可能な共生藻（以下、Aとする）および共生不可能な共生藻（以下、Bとする）両者の比較を行って、蛋白質レベル・遺伝子レベルの双方で、例えばAにのみ存在する因子、Bにのみ存在する因子を網羅的にピックアップし、その後、これらの候補因子の中から、共生に不可欠な因子、あるいは共生を不可能にする因子の同定を行っていく作業を行う。実験に使用する共生藻は、ミドリゾウリムシ体内から取り出され、既に複数クローン化されたものを準備済みであるので、これらの複数のクローン化共生藻を用いて、2次元電気泳動による構成蛋白質の比較を行う。また、mRNAをもとにした differential Display の方法による構成遺伝子の比較を行い、Northern 解析によって A、B 両者で発現量に差のある遺伝子の選別・絞り込みを行っていく。

この絞り込みを行うために必要な作業として、クローン化共生藻（以下、Cとする）と、それを共生藻除去ミドリゾウリムシに再共生させたあと、その再共生ミドリゾウリムシから再び単離・精製した共生藻（以下、Dとする）それぞれを、蛋白質レベル・遺伝子レベル双方で比較し、CにあってDにない因子またはDにあってCにない因子を複数同定するという実験を、同時に進行させる。これらの実験から得られた因子と、上記 A・B の比較により得られた因子を比較することにより、共生に関与する因子の絞り込みを行っていく。

以上の方法で実験を進行させていく段階で、本研究期間中に大きな問題が生じた。これは、「1996年ごろにクローン化され、寒天培地上または液体培地上で保存されてきた複数の共生藻の、共生藻除去ミドリゾウリムシへの再共生能が、保存期間中に徐々に変化してきた」という点である。具体的には、これらの複数のクローン化共生藻は、以前は共生藻除去ミドリゾウリムシへ再共生可能であったが、本研究期間中に徐々にその共生能力を失い、大半が再共生不可能になった。従って、本研究申請時に、複数のクローン化共生藻の rRNA small subunit 配列を用いて分類系統樹を作成し、それぞれの共生藻の再共生能を比較したところ、再共生可能な共生藻（自由生活のクロレラを含む）および不可能な共生藻がそれぞれ近縁のグループにまとまるという結果を提出したが、これらの大半の共生藻は、現在共生藻除去ミドリゾウリムシへの共生能を失っているという状況にある。このため、新たにクローン化共生藻を作成し、共生藻除去ミドリゾウリムシへの再共生能を測定し、再共生可能なもの・不可能なもの（上記の A・B）を分類するという新たな作業を行う必要が生じた。

4. 研究結果：

ミドリゾウリムシより、複数の共生藻を新たにクローン化した。

これらのクローン化共生藻の、共生藻除去ミドリゾウリムシへの再共生能を全て測定した。

これらのクローン化共生藻および自由生活性のクロレラ(30種)の構成蛋白質を二次元電気泳動法を用いて解析し、泳動パターンにより六種類に分類できることを明らかにした。そのうち、二種の分類群は、A,B 一 종류ずつの共生藻・クロレラから構成されており、それぞれの蛋白質を比較して、A にあって B にないもの、または B にあって A にないものそれぞれの蛋白質を単離し、現在プロテオーム解析によりそのアミノ酸配列を網羅的に解析して、因子の同定を行っているところである。

上記のクローン化共生藻および自由生活性のクロレラから mRNA を単離し、Differential Display の方法を用いて、A にあって B にない遺伝子、および B にあって A にない遺伝子を同定し、これらを順次 Northern 解析にまわして、AB それぞれで発現量に差のある遺伝子を逐次同定しているところである。現在までに、Differential Display のレベルで差のある因子を 35 種類ピックアップし、これらの中から Northern 解析で差の見られた 4 因子を同定し、そのうちの 3 種類の遺伝子について遺伝子配列を解析した。これらの遺伝子は、human や chlamydomonas 由来の遺伝子に約 60% の相同性を示した。

上記、C、D の比較を行うため、まず、ミドリゾウリムシから、細胞内小胞や膜デブリスなどを除いて共生藻を純粋に単離する方法を検討した (density gradient で約 60? 80% の sucrose 濃度で精製されてくることがわかった)。現在、CD それぞれの共生藻の蛋白質レベル、遺伝子レベルでの比較を、上記と同様の方法で行っている。

共生藻の遺伝子・蛋白質の比較を行っていく段階で、培養している共生藻それぞれの「細胞周期」各期における、(共生藻の)形態および構成蛋白質・遺伝子に差が見られるか(あるいは、みられないか)という問題が浮かび上がってきた(つまり、同じ種の、同じ時期の共生藻でも、その増殖時期によってミドリゾウリムシへの共生能が異なる可能性があるのではないか、ということ)。そのために、FACS を使用して、培養開始後経時的に共生藻の形態(大きさや扁平度など)、DNA 量、クロロフィル量を調べているところである。また、これらをソーティングし、それぞれの(ミドリゾウリムシへの)再共生能を現在詳査しているところである。

5. 自己評価:

3年の研究期間中に、共生に関与する共生藻由来の蛋白質・遺伝子の絞り込みを完了させることができなかった。

一方、研究期間中に、今後参考にすべき以下のような事実を新たに明らかにした。

培養期間中に、共生藻の共生藻除去ミドリゾウリムシへの再共生能が変化する(低下する)という事実が起こり、また実験進行中に、共生藻自身の細胞周期を考慮にいれなくてはならないという事実に気づいた。前者の原因として、クローン化共生藻自身のエイジングあるいは、共生藻に共生している新たな因子(クロレラウイルスなど)が存在して、その有無が共生に重要であり、培養中にこれらの因子が離脱したりして共生能に変化が生じたことなどが考えられる。今まで「クローン化されていた」と考えられていた共生藻に、新たに「共生体(=クロレラウイルスやバクテリアなど)」が共生している可能性があり、その点について今後検討を加えて行かななくてはならない。後者に関連して、クローン化し維持している共生藻自身の「同調培養」を行うことが今後急務である。

また、共生藻を捕食する側の「ミドリゾウリムシ」が、まだ純粋培養されていないため、宿主側の条件の不安定さを克服するため、今後、ミドリゾウリムシの無菌培養などの検討も視野に入れる必要がある。

6. 研究総括の見解：

葉緑体は光合成細菌が細胞に寄生しているうちに分化したと考えられている。本研究ではミドリゾウリムシに寄生するクロレラ藻に着目、非寄生のクロレラ藻との遺伝子の違いに着目して、目下4種類の遺伝子が見られた。野心的な研究であり、3年間の成果としては評価すべきである。進化との関連づけには長期間の研究を要するが、さきがけ研究21によって、その端緒が開かれたといえる。

7. 主な論文等：

- (1) B.I. Gerashchenko, N.Nishihara, T.Ohara, H.Tosuji, T.Kosaka and H.Hosoya (2000)
Flow cytometry as a strategy for study of host-symbiont cellular interactions:
Symbiotic algae in light of flow cytometry. Cytometry, 41, 209-215
- (2) 細谷浩史 (2000) 太陽エネルギーで生きる動物 **岩波 科学** 70, 636-641
- (3) B.I. Gerashchenko, T. Koaska and H.Hosoya (2001)
Growth kinetics of algal populations exsymbiotic from Paramecium bursaria
by flow cytometry measurements. Cytometry, 44, 257-263
- (4) B.I. Gerashchenko, T. Koaska and H.Hosoya (2001)
New horizons for endosymbiosis of algae in Paramecium bursaria in light of flow
cytometry.
In: Recent Research Developments in Biophysics and Biochemistry.
Managing editor S.G. Pandalai. Research Signpost. T.C. 36/248(1),
Trivandrum-695 008, India, 1, 145-160
- (5) B.I.Gerashchenko, T. Kosaka and H. Hosoya (2002)
Optical compartmentation of vegetating algae species as a basis for their growth-specific
characterization. Cytometry, 48, 153-158
- (6) M. Tanaka, M. Murata-Hori, T. Kadono, T. Kawano, T. Kosaka and H. Hosoya (2002)
Complete elimination of endosymbiotic algae from Paramecium bursaria and its confirmation
by diagnostic PCR. Acta Protozool., 41, 255-261

国際学会

- (1) B.I. Gerashchenko, T. Ohara, Y. Ishizaka, H. Tosuji, N. Nishihara and H. Hosoya
Flow cytometry as a strategy for study of relationship between endosymbiotic algae and
Paramecium bursaria.
XX International Congress of the International Society for Analytical Cytology
(Montpellier, France, 2000. 5)
- (2) B. I. Gerashchenko, M. Hino and H. Hosoya
Enrichment for late telophase cell populations using flow cytometry.
13th Heidelberg Cytometry Symposium (Heidelberg, Germany, 2000. 10)
- (3) M. Tanaka, M. Murata-Hori, T. Kadono, T. Kosaka and H. Hosoya
Elimination of endosymbiotic algae in Paramecium bursaria confirmed by diagnostic
PCR
Endocytobiology VIII (Nagoya, Japan, 2001. 10)
- (4) T. Kawano, T. Kosaka and H. Hosoya

Impact of a sulfonylurea herbicide on growth of photosynthetic protozoa
2nd European meeting on environmental chemistry (France, 2001.12)

(5) M. Tanaka, H. Hosoya, Y. Ishizaka, H. Tosuji, M. Kunimoto, N. Nishihara, T.
Kosaka and N Hosoya

A new bioassay system of chemical substances in environment using green
paramecia, *Paramecium bursaria*

2nd European meeting on environmental chemistry (France, 2001.12)

国内シンポジウム等

(1) 細谷 浩史

日本動物学会中国四国支部シンポジウム 共生藻を利用したミドリゾウリムシの生存戦略の多
様化」(広島 2000.5.20)

(2) 細谷浩史

日本原生動物学会シンポジウム 不思議な動物? 原生動物」
(東京、2001.8.3)