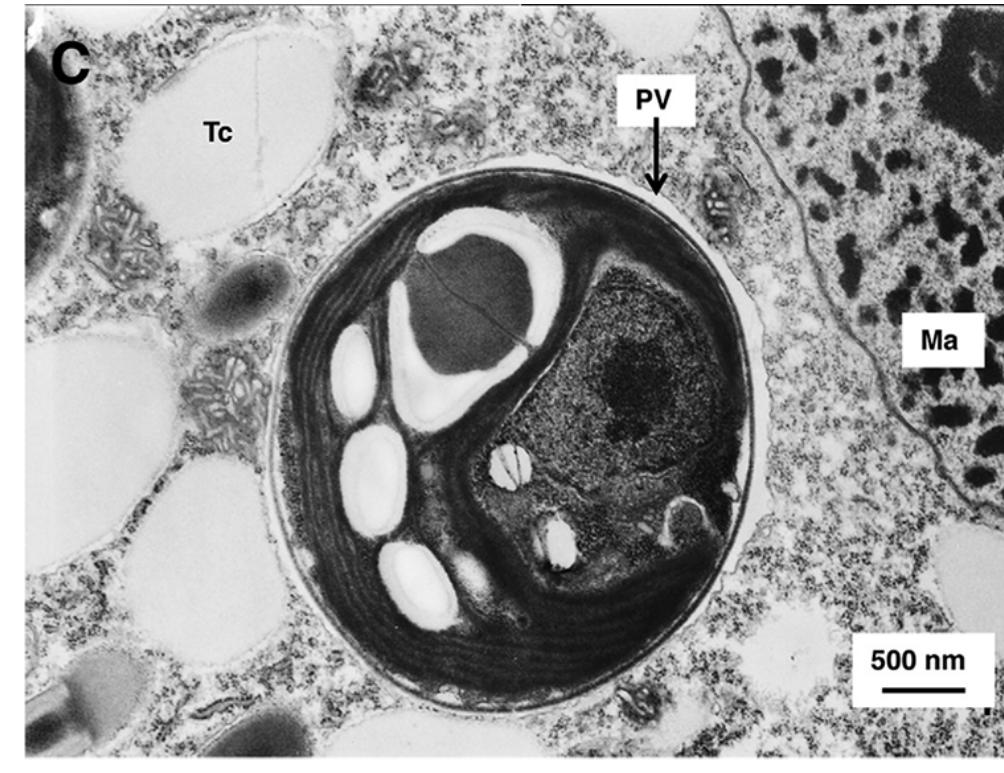


Introduction

細胞内共生は進化の原動力である

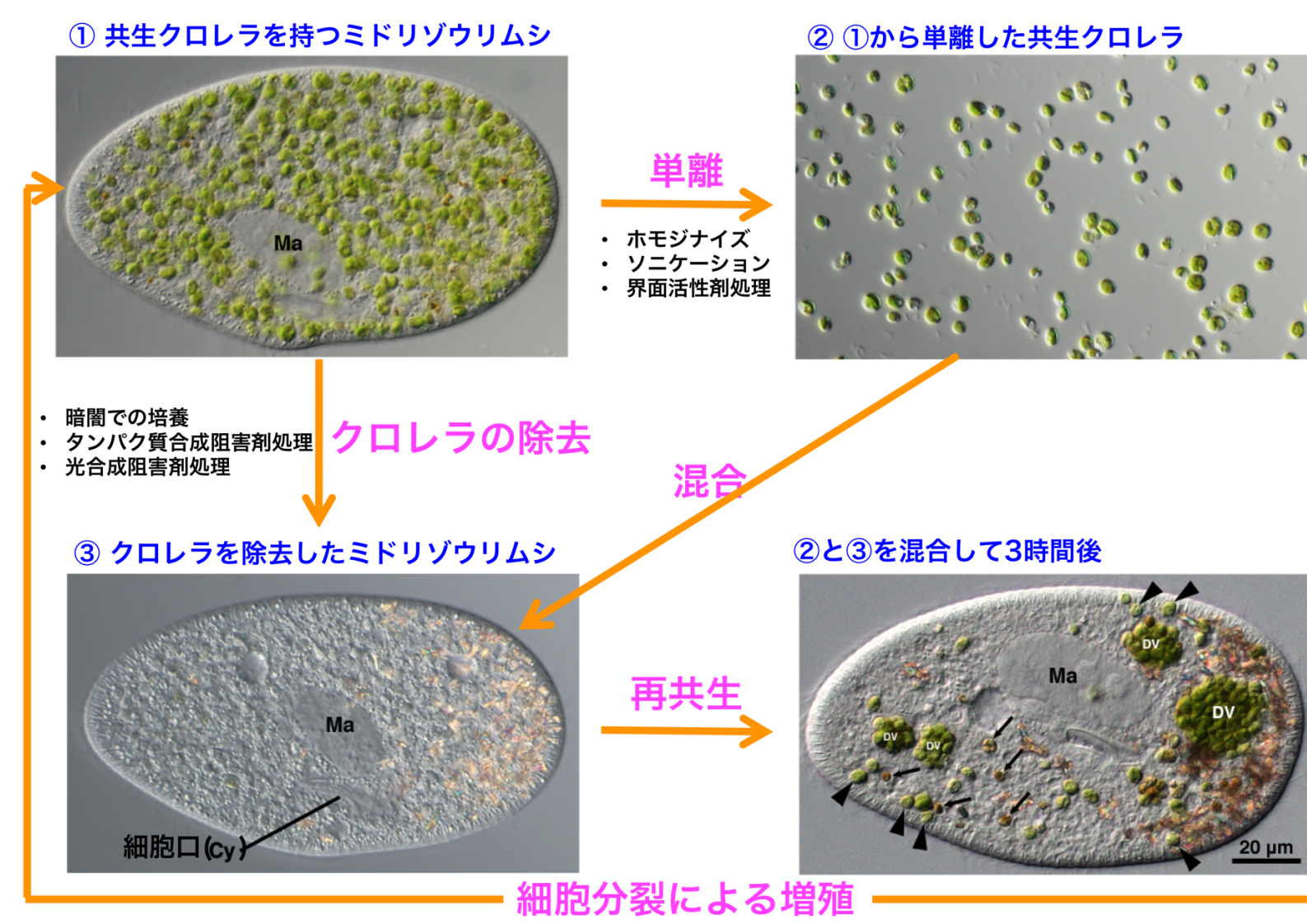
ミトコンドリアや葉緑体を生み出した細胞内共生は現在でも多くの生物同士で見られ真核細胞の進化や多様化の原動力となっている。しかし細胞内共生の成立や維持の機構はほとんど明らかにされていない。この謎を解明するためのモデル生物が繊毛虫のミドリゾウリムシである。ミドリゾウリムシの細胞質内に約700細胞存在している共生クロレラは、1細胞ずつ宿主食胞膜由来のPV膜と呼ばれる共生胞に包まれている。



Fujishima and Kodama (2012) で、ミトコンドリアとPV膜が接着していることを示唆。

ミドリゾウリムシは細胞内共生研究の新たなモデル生物

ミドリゾウリムシとクロレラは相利共生関係であるが、それぞれ単独での生存が可能である。これは両者の関係が細胞内共生による進化の初期段階にあることを示している。クロレラはゾウリムシ以外の多種



原生動物やヒドラやカイメン等にも共生しており、クロレラと動物細胞の細胞内共生は普遍的現象である。本研究はミドリゾウリムシを用いた細胞内共生による真核細胞の進化と多様化のメカニズムの解明を目的としている。

Method

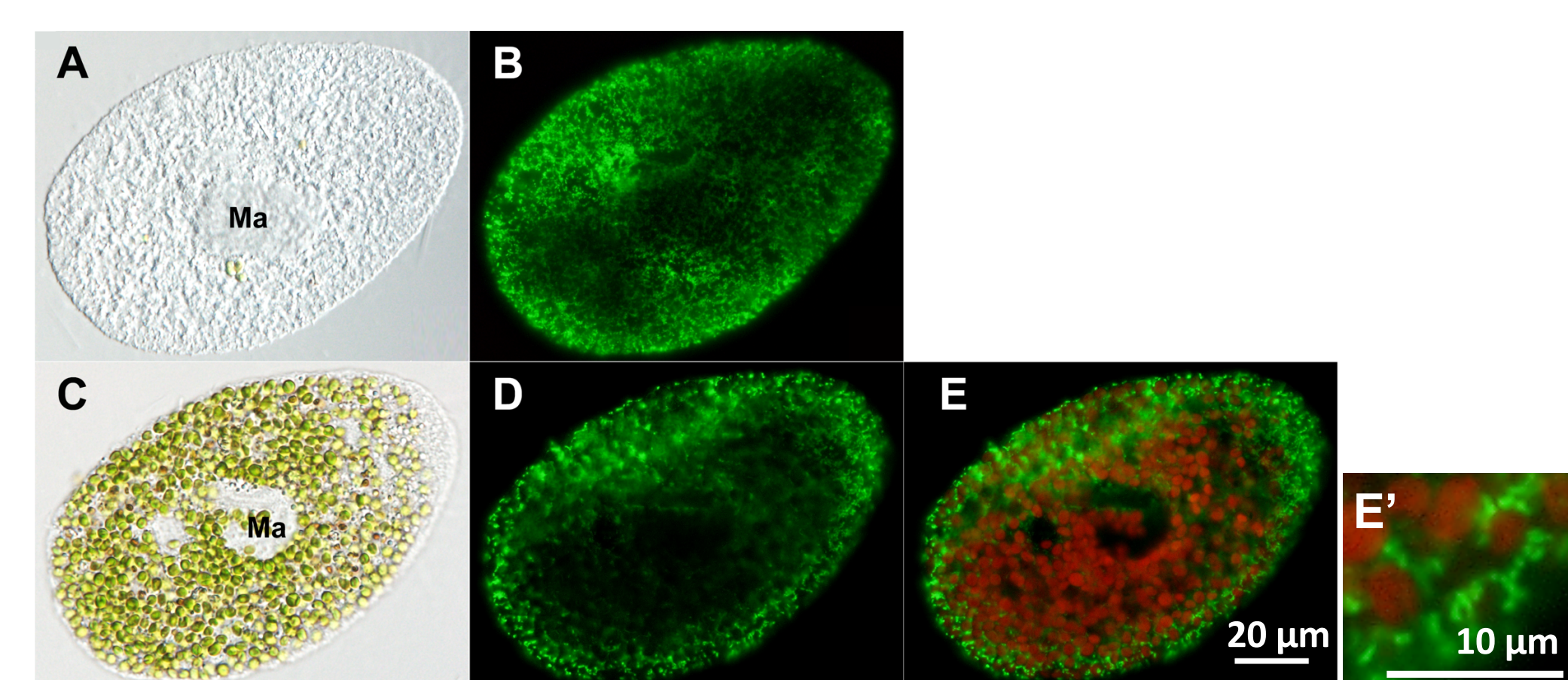
共生クロレラは宿主ミトコンドリアとPV膜との接着によって細胞表面直下に固定されている。共生の成立や維持における宿主ミトコンドリアの機能を調べるために、抗ミドリゾウリムシミトコンドリアモノクローナル抗体を作製した。その抗体を使用して、クロレラ除去株（白色株）と保持株（緑色株）の抗原の局在性を蛍光抗体法で比較した。さらにミドリゾウリムシのトランスクリプトームデータから、抗酸化物質の一つであるグルタチオンを付加する反応を触媒するグルタチオンSトランスフェラーゼの部分塩基配列を使って合成ペプチドを作製し、それを抗原にした抗血清を使用して抗原の局在性を蛍光抗体法で比較した。

Trinity transcript name	Annotation from the SwissProt database	logFC	White : Green
Glutathione S-transferase			
comp37410_c0	sp P78417 GSTO1_HUMAN Glutathione S-transferase omega-1 OS=Homo sapiens	-0.119	1 : 0.92
comp32377_c0	sp Q9ZRT5 GSTT1_ARATH Glutathione S-transferase T1 OS=Arabidopsis thaliana	-0.288	1 : 0.82
comp36943_c0	sp Q9ZVQ3 GSTZ1_ARATH Glutathione S-transferase Z1 OS=Arabidopsis thaliana	-0.748	1 : 0.60
comp37841_c0	sp Q9ZRT5 GSTT1_ARATH Glutathione S-transferase T1 OS=Arabidopsis thaliana	-0.851	1 : 0.55
comp36483_c0	sp Q9ZRT5 GSTT1_ARATH Glutathione S-transferase T1 OS=Arabidopsis thaliana	-1.557	1 : 0.34
comp35816_c1	sp P78417 GSTO1_HUMAN Glutathione S-transferase omega-1 OS=Homo sapiens	-1.564	1 : 0.34
comp36242_c0	sp P16413 GSTMU_CAVPO Glutathione S-transferase B OS=Cavia porcellus	-5.749	1 : 0.02
Superoxide dismutase			
comp36467_c0	Superoxide dismutase [Fe] OS=Synecoccus elongatus	-2.039	1 : 0.24
comp39897_c0	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Yarrowia lipolytica	-1.170	1 : 0.44
Thioredoxin reductase			
comp38835_c0	Bifunctional thioredoxin reductase/thioredoxin OS=Mycobacterium leprae	-1.536	1 : 0.34
comp41865_c0	Thioredoxin reductase 3 (Fragment) OS=Mus musculus	-0.741	1 : 0.60
comp38474_c0	Thioredoxin reductase SEP1 OS=Emiliania huxleyi	-0.774	1 : 0.58
comp41838_c0	Thioredoxin reductase 2, mitochondrial OS=Rattus norvegicus	-0.644	1 : 0.64

タンパク質	抗原のアミノ酸配列	P value<0.01
Gultathione S-transferase 2 [Paramecium tetraurelia strain d4-2] (233残基) Pos: 1-16	CENQLRKKILMDNQKVT 17残基	

Result

抗ミトコンドリアモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法



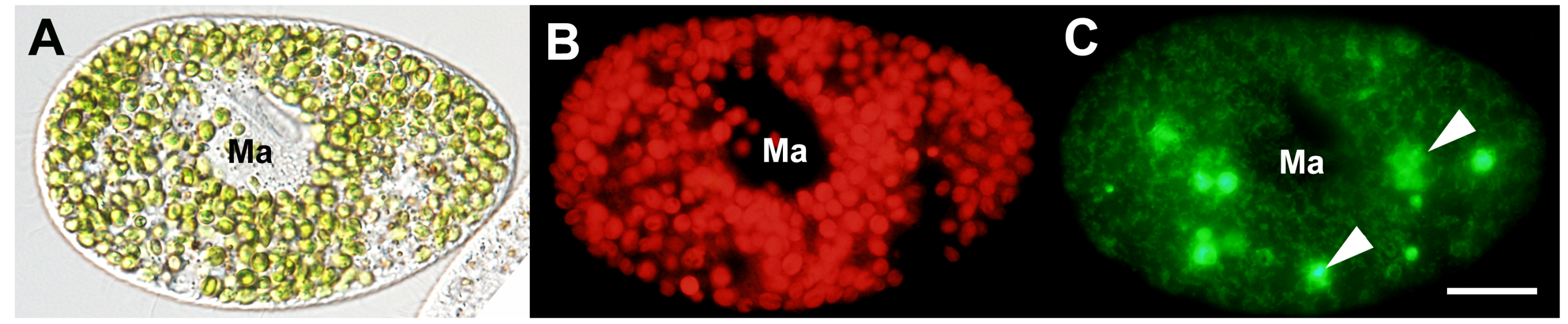
抗ミドリゾウリムシミトコンドリアモノクローナル抗体を使った間接蛍光抗体法の結果

- (A) クロレラ除去細胞の微分干渉顕微鏡写真
- (B) (A) の蛍光抗体法の結果
- (C) クロレラ保持細胞の微分干渉顕微鏡写真
- (D, E) (C) の蛍光抗体法の結果
- (E') (E) の一部の拡大写真

緑色蛍光：ミトコンドリア、赤色蛍光：クロレラ葉緑体

- ◆ クロレラ保持細胞と比較すると、クロレラ除去細胞のミトコンドリアの数が少ない
- ◆ ミトコンドリアは、共生クロレラを囲むようにして局在している

MitoTracker® Green FMを用いたミトコンドリアの染色



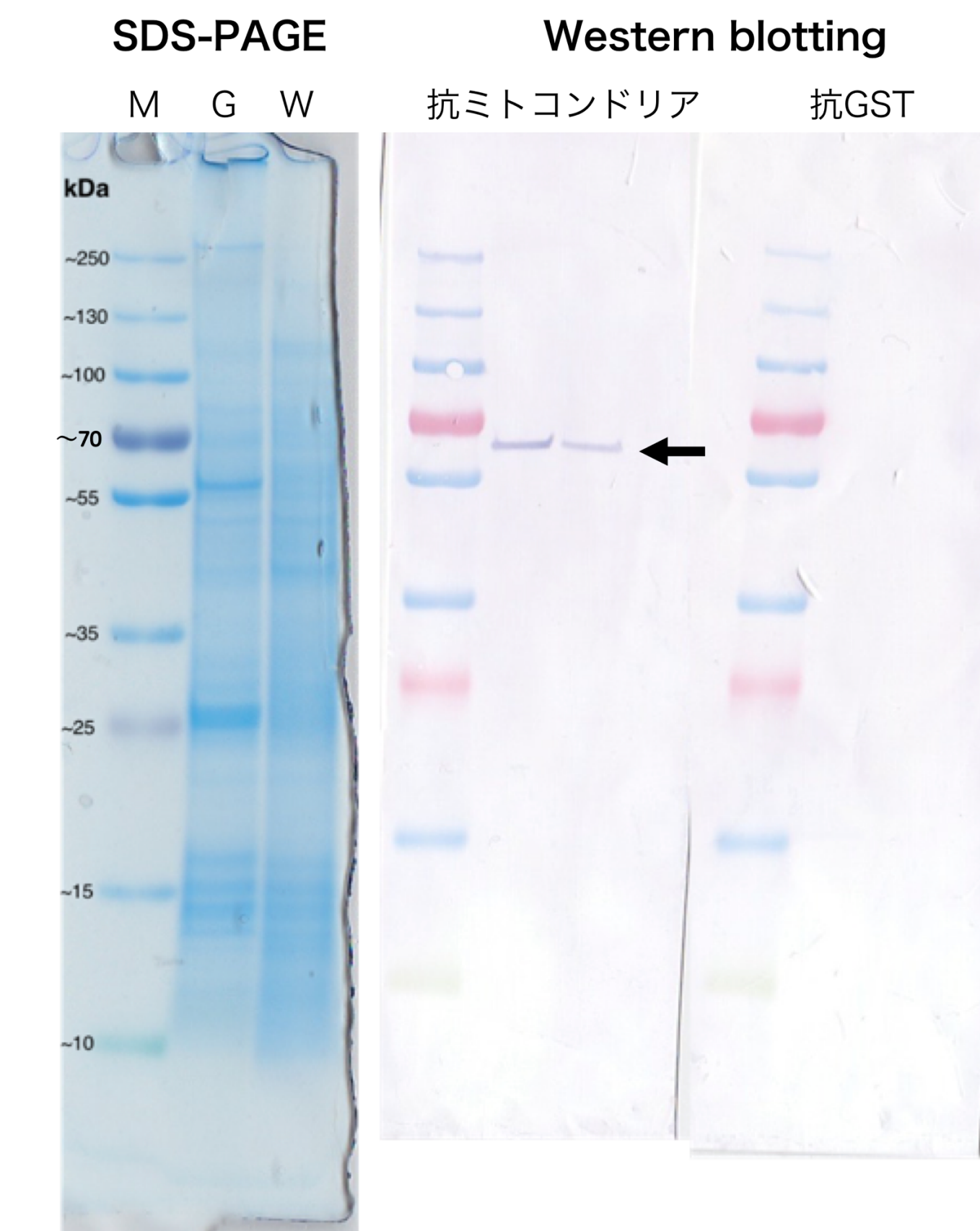
MitoTracker® Green FMによる染色（最終濃度は500 nM）

- (A) クロレラ保持細胞の微分干渉顕微鏡写真
- (B) クロレラの直蛍光
- (C) MitoTrackerの染色結果

Ma, 大核; 矢印, 食胞膜; Scale bar = 20 μm

- ◆ MitoTracker® Green FMを用いたミトコンドリアの染色結果からも、ミトコンドリアは、共生クロレラを囲むようにして局在していることが分かる

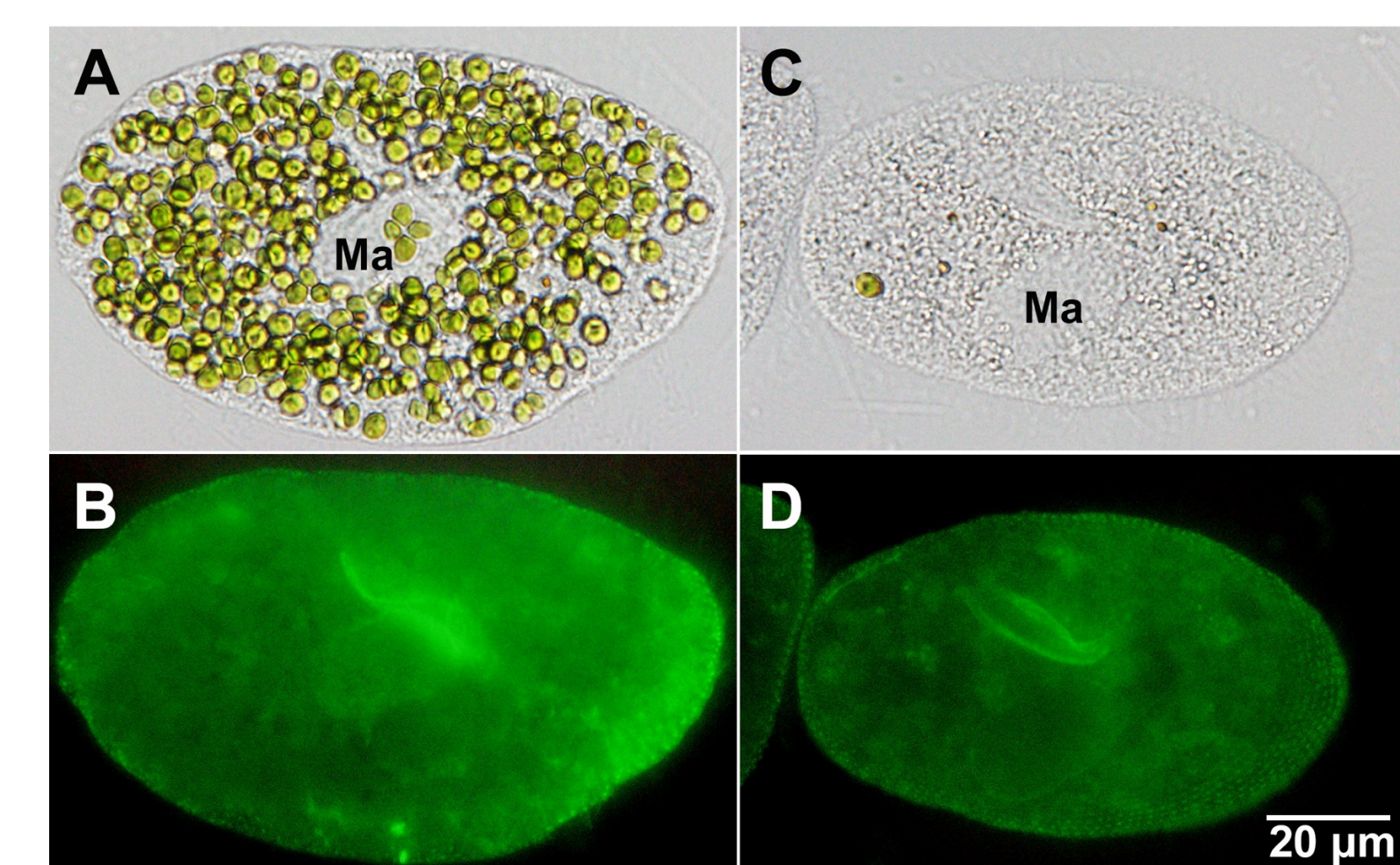
ウェスタンブロッティングの結果



抗ミドリゾウリムシミトコンドリアモノクローナル抗体と抗グルタチオンSトランスフェラーゼポリクローナル抗体を使ったウェスタンブロッティングの結果
M, 分子量マーカー
G, クロレラ保持細胞（細胞数: 2,400 cells/lane, タンパク質濃度: 3.7 mg/ml)
W, クロレラ除去細胞（細胞数: 2,400 cells/lane, タンパク質濃度: 3.6 mg/ml)

- ◆ ミトコンドリアモノクローナル抗体では、72.5 kDa付近にバンドが検出された
- ◆ GST抗体では、バンドは検出されなかった。

抗GSTポリクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法



抗ミドリゾウリムシGSTポリクローナル抗体を使った間接蛍光抗体法の結果

- (A) クロレラ保持細胞の微分干渉顕微鏡写真
- (B) (A) の蛍光抗体法の結果
- (C) クロレラ除去細胞の微分干渉顕微鏡写真
- (D) (C) の蛍光抗体法の結果

Ma, 大核

- ◆ クロレラ保持細胞・除去細胞ともに、細胞口、大核膜、細胞質内にGSTの蛍光が観察された
- ◆ クロレラ保持細胞・除去細胞において蛍光強度に違いは見られなかった

Discussion

モノクローナル抗体を使用した蛍光抗体法の結果、緑色株と比較して白色株のミトコンドリア数が多いことが分かった。緑色株のミトコンドリアはクロレラを取り囲んでいた。ミトコンドリア選択的蛍光色素のMito Tracker® Green FMを使い同様の結果を得た。抗血清を使用した蛍光抗体法の結果、白色株と緑色株の差異は検出できなかった。藻類と共生することで宿主は、光合成による酸化ストレスを受ける。共生藻を持つ複数種の宿主において、活性酸素種の発生源となる宿主ミトコンドリアの機能の低下と、抗酸化酵素遺伝子の発現の上昇が報告されている。一方ミドリゾウリムシにおいては白色株で抗酸化酵素遺伝子が高発現し、その理由は不明であったが、本研究からミトコンドリア数の減少が酸化ストレスを軽減している可能性が示唆された。トキソプラズマやレジオネラの寄生胞も宿主ミトコンドリアと密着・融合している。これは相利共生関係や寄生関係における共生胞や寄生胞と宿主ミトコンドリアとの関連の重要性や普遍性を示唆している。

Future work

今後はクロレラの共生過程におけるマイトファジーの可能性などを調べ、元は共生細菌由来であるミトコンドリアと共生クロレラの関係に迫りたい。

References

- Fujishima M, Kodama Y (2012) Endosymbionts in Paramecium. *Europ J Protistol* 48:124–137
- 湯山育子(2018)ゲノム、トランスクリプトームデータから明らかにされる刺胞動物—藻類の細胞内共生(特集 浅海における光合成共生研究と深海の栄養共生研究のクロストーク). *生物科学*, 69, 214–222.
- Kodama, Y., Suzuki, H., Dohra, H., Sugii, M., Kitazume, T., Yamaguchi, K., Shigenobu, S. and Fujishima, M. (2014) Comparison of gene expression of *Paramecium bursaria* with and without *Chlorella variabilis* symbionts. *BMC genomics*, 15, 183.