

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05231

研究課題名(和文)嫌気環境に生育する真核微生物の多様性の解明

研究課題名(英文) Diversity and evolution of anaerobic/microaerophilic eukaryotic microorganisms

研究代表者

橋本 哲男 (HASHIMOTO, Tetsuo)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：50208451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：真核微生物の中には、嫌気・微好気環境への適応の結果、酸素呼吸能をもつ典型的なミトコンドリアを2次的に失い、縮退型のミトコンドリア(Mitochondrion Related Organelles, MROs)を保持するに至った生物が存在し、それらは真核生物の系統樹上に散在している。しかし、その多様性の実態については未解明な点が多い。本研究では、国内外の嫌気・微好気水圏環境のサンプルから嫌氣的培養によって単離したさまざまな培養株に関して、その微細構造や系統的位置の解析を行うとともに、トランスクリプトームデータに基づくMRO機能の推定などを行い、そのような生物の多様性の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Various eukaryotic organisms that lack canonical mitochondria with oxygen respiration but instead possess mitochondrion related organelles (MROs) are present in anaerobic/microaerophilic environments. MROs are considered to be reduced mitochondria resulted from an adaptation to such environments. However, very little is known about diversity and evolution of these organisms and their MROs. In this study in order to further understand the diversity of MRO-containing organisms, we isolate various novel eukaryotic microorganisms from anaerobic/microaerophilic environments in Palau, Malaysia, and Japan and characterized these organisms by morphological, molecular phylogenetic, and comparative transcriptome analyses.

研究分野：分子進化学

キーワード：嫌気環境 真核微生物 ミトコンドリア関連オルガネラ 縮退進化 代謝多様性

1. 研究開始当初の背景

嫌気的環境(以下、偏性(絶対)嫌気だけではなく微好気(通性嫌気)をも含めて「嫌気」と記す)に適応した生物では、ミトコンドリア(mt)が機能的縮退を遂げヒドロゲノソームやマイトソームなどの mt 関連オルガネラへと変化した。ヒドロゲノソームやマイトソームをもつ生物は、真核生物系統樹上の複数の独立な系統に分布している。すなわち mt の機能的縮退は、真核生物進化上で独立に何回も起きていることを示す。機能縮退 mt は、菌類、繊毛虫、各種寄生原虫で発見されているが、フォルニカータ生物群の *Giardia* (ランブル鞭毛虫)、パラバサリア生物群の *Trichomonas* (トリコモナス原虫)、アーケアメーバ生物群の *Entamoeba* (赤痢アメーバ) など寄生虫での研究が突出して進展していた。その一方、機能縮退 mt をもつ自由生活性生物が嫌気自然環境中に多数存在することが明らかになりつつあった。つまり「機能縮退 mt は、限定された生物系統がもつ特殊な形質である」という認識を改める必要性が生じていた。そこで、mt 関連オルガネラをもつ生物の系統的多様性を明らかにし、寄生虫に偏らない独立した系統間で mt 機能の縮退過程を比較研究することが、mt の本質的機能とは何なのかを解明するうえで極めて重要な知見を提供することに繋がると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

海外および国内の嫌気的水圏環境を調査し、系統的に広範な新奇嫌気性真核微生物を多数単離・培養し、それらの細胞構造と系統的位置を解明することにより、真核生物における嫌気性生物種の多様性と、機能縮退 mt (mt 関連オルガネラ [Mitochondrion Related Organelles, MROs]) の進化過程を明らかにすることを目的とした。

研究開始当初までに、マングローブ林の底泥が嫌気環境になっており嫌気微生物の多様性に富むことが明らかとなっていたため、マングローブ林を含めて、それぞれ特徴のある嫌気的水圏環境をもつ地域として、パラオ共和国：海水湖およびマングローブ林、フィリピン共和国：海水湖およびマングローブ林、マレーシア：マングローブ林、POME 池(パーム油の抽出後の廃液溜め)、沼、ピートランド(泥炭地)、西表島のマングローブ林などを調査地として選定しサンプリングを行うこととした。

3. 研究の方法

海外3か所(パラオ、フィリピン、マレーシア)嫌気水圏環境および国内のさまざまな嫌気水圏環境において採集したサンプルを嫌気的に粗培養した。粗培養の前で真核生物を特異的に検出するための環境 DNA 解析を行いその分布状況を調査した。粗培養によって生育してきた真核微生物種のうち、光顕

観察にて明らかに既知種とは考えられない生物種を分離・培養株化した。株化できた生物種について、リボソーム RNA の配列解析を行い新奇なものであるかどうかを判断した。新奇と考えられるものに関してはさらに詳細な光顕観察、走査型電顕観察、連続切片による透過型電顕観察を行うことにより、詳細な形態情報を取得した。また、株化できたもののうち、真核生物系統樹上での多様性を反映する観点から適切と考えられる生物種を選び、トランスクリプトーム解析を行った。得られたデータに基づき複数遺伝子による分子系統解析を行った。以上の調査、実験、データ解析の結果を総合し、嫌気性真核微生物群の多様性の実態、系統進化の道筋を明らかにした。一方、トランスクリプトームデータに基づき MRO の機能に関連するタンパク質を MRO を保持する既知生物種および新奇培養株において探索し、系統樹を基盤として MRO の機能縮退進化の過程を推測した。

4. 研究成果

(1) メタモナス生物群の系統関係と MRO の縮退進化の解明

筑波大の本プロジェクトのグループとカナダのダルハウジー大のグループを中心とする5か国のグループの国際共同研究により、典型的な mt をもたないもののみから構成されるメタモナス生物群(フォルニカータ、パラバサリア、プレアキソスティラを含む大系統群)に属す18生物種のトランスクリプトームデータをもとに大規模比較解析を行った。対象とした18種の中には筑波大のグループが嫌気・微好気自然環境から単離・記載したフォルニカータ生物3種(*Aduncisulcus paluster*, *Kipferlia bialata*, *Dysnectes brevis*)が含まれており、それらのトランスクリプトームデータは本研究の開始以前に得たものである。本研究では、データ解析の部分を共同研究として実施した。まず、約150遺伝子に基づく大規模分子系統解析の結果、メタモナス生物群18種の系統関係を高い解像度で推測した。その系統樹とトランスクリプトームの遺伝子配列情報をもとに、MROへの局在が予測されるタンパク質を比較解析し、MRO機能の縮退過程に関する知見を得た。とくにフォルニカータ生物群の寄生虫で、嫌気的 ATP 合成も水素発生も行わず鉄・硫黄クラスター合成のみを機能とする著しく縮退した MRO をもつ *Giardia* の分岐に至るフォルニカータの進化過程で、MRO 機能の段階的な縮退が起こったことを示唆することができた(論文4)。

一方、上述のメタモナスの系統樹において *Giardia* の分岐の直前に分岐した *Dysnectes brevis* およびさらに以前に分岐した *Kipferlia bialata* の2つのフォルニカータ生物について以前の解析よりも大容量のトランスクリプトームデータおよびゲノムデータを得て、アセンブルと予備的な遺伝子アノ

テーション解析を行った。その結果、Kipferlia の推定 MRO タンパク質のレパートリーは、フォルニカタ生物群の姉妹群であるパラバサリア生物群の寄生虫である Trichomonas のそれとほぼ同様のものであることが明らかとなり、Kipferlia の分岐後に大幅な縮退が進んだものと考えられた。これらの結果を含め Kipferlia のデータについては自由生活性フォルニカタにおける初めてのドラフトゲノムとして報告した(論文 1、学会発表 6,12,13)。現在、Dysnectes に関するゲノム解析を進めている(学会発表 1)。

(2) 自由生活性 Entamoeba の記載とゲノム解析

Entamoeba 属はヒトの赤痢アメーバの病原体 (E. histolytica) を含む寄生性の生物からなる分類群である。本研究に先行するプロジェクトのもとで行われた嫌気的水圏環境調査において、マングローブ林から得られた自由生活性の Entamoeba について微細構造解析と生理学的性状の解析を行い、Entamoeba marina として報告した(論文 9)。さらに、E. marina と培地中から単離したγ-プロテオバクテリア Shewanella sp. との 2 者培養系を確立し、大容量のゲノムデータを得た。現在、アセンブルを終え遺伝子アノテーション解析を進めている。

(3) 新奇の嫌気・微好気性真核微生物の単離と培養株化

本研究のもとで行われた、パラオ、マレーシア、国内数カ所の嫌気水圏環境調査において、10 種以上の新奇嫌気・微好気性真核微生物を獲得することができた。これらの培養株を用いて、微細構造解析、分子系統解析を順次進めている。それらの中で、SRT213 株はヘテロロボサ生物群に属する生物であり(学会発表 3,4)、PAP020 株はフォルニカタ生物群の基部から分岐する生物である(学会発表 9,10,11)ことが明らかとなっている。これら 2 種は MRO を保持していると考えられるため、現在、トランスクリプトームデータに基づき推定 MRO タンパク質を同定している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

Tanifuji G, Takabayashi S, Kume K, Takagi M, Nakayama T, Kamikawa R, Inagaki Y, Hashimoto T. 2018. The draft genome of Kipferlia bialata reveals reductive genome evolution in fornicate parasites. PLoS One 13: e0194487. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0194487.

Kamikawa R, Yazaki Y, Tahara M, Sakura T, Matsuo E, Nagamune K, Hashimoto T, Inagaki Y. 2018.

Fates of evolutionarily distinct, plastid-type glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase genes in kareniacean dinoflagellates. Journal of Eukaryotic Microbiology in press. 査読有.

doi: 10.1111/jeu.12512.

Brown MB, Heiss A, Kamikawa R, Inagaki Y, Yabuki A, Tice AK, Shiratori T, Ishida K, Hashimoto T, Simpson AGB, Roger AJ. Phylogenomics places orphan protistan lineages in a novel candidate super-group. 2018. Genome Biology and Evolution 10:427-433. 査読有.

doi: 10.1093/gbe/evy014.

Leger MM, Kolisko M, Kamikawa R, Stairs CW, Kume K, Cepicka I, Silberman JD, Andersson JO, Xu F, Yabuki A, Eme L, Zhang Q, Takishita K, Inagaki Y, Simpson AGB, Hashimoto T, Roger AJ. 2017.

Organelles that illuminate the origins of Trichomonas hydrogenosomes and Giardia mitosomes. Nature Ecology & Evolution 1:0092. 査読有.

Takishita K, Chikaraishi Y, Tanifuji G, Ohkouchi N, Hashimoto T, Fujikura K, Roger AJ. 2017.

Microbial Eukaryotes that Lack Sterols. Journal of Eukaryotic Microbiology 64: 897-900. 査読有.

doi: 10.1111/jeu.12426.

Kamikawa R, Moog D, Zauner S, Tanifuji G, Ishida K, Miyashita H, Mayama S, Hashimoto T, Maier UG, Archibald JM, Inagaki Y. 2017.

A Non-photosynthetic Diatom Reveals Early Steps of Reductive Evolution in Plastids. *Molecular Biology and Evolution* 34: 2355-2366.

査読有.

doi: 10.1093/molbev/msx172.

Yazaki E, Ishikawa SA, Kume K, Kumagai A, Kamaishi T, Tanifuji G, Hashimoto T, Inagaki Y. 2017.

Global Kinetoplastea phylogeny inferred from a large scale multigene alignment including parasitic species for better understanding transitions from a free living to a parasitic lifestyle.

Genes and Genetic Systems 92:35-42.

査読有.

doi: 10.1266/ggs.16-00056.

Nishimura Y, Tanifuji G, Kamikawa R, Yabuki A, Hashimoto T, Inagaki Y.

2016. Mitochondrial Genome of *Palpitomonas bilix*: Derived Genome Structure and Ancestral System for Cytochrome c Maturation. *Genome Biology and Evolution* 8: 3090-3098. 査読有.

doi: 10.1093/gbe/evw217.

Shiratori T, Ishida K. *Entamoeba marina* n. sp.; a New Species of *Entamoeba* Isolated from Tidal Flat Sediment of Iriomote Island, Okinawa, Japan. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 63(3):280-286. 査読有.

doi: 10.1111/jeu.12276

[学会発表](計 13 件)

井上貴史, 谷藤吾朗, 神川龍馬, 久米慶太郎, 稲垣祐司, 橋本哲男. *Giardia* に近縁な自由生活性鞭毛虫 *Dysnectes brevis* の MRO 機能の推測. 第 86 回日本寄生虫学会大会, 2017.

Yazaki E, Shiratori T, Kume K, Hashimoto T, Ishida K, Inagaki Y.

Mitochondrial genome of a protist branched at the base of Euglenozoa. An SMBE Satellite Meeting, Mitochondrial Genomics and Evolution, 2017.

Yazaki E, Shiratori T, Kume K, Hashimoto T, Ishida K, Inagaki Y. A heterolobosean strain SRT213 and its mitochondrion-related organelle. 15th International Congress of Protistology, 2017.

矢崎裕規, 白鳥峻志, 久米慶太郎, 橋本哲男, 石田健一郎, 稲垣祐司. 新奇ヘテロロボサ生物 SRT213 における縮退的ミトコンドリア機能の推測. 日本進化学会第 19 回大会, 2017.

Shiratori T, Yazaki E, Inagaki Y, Hashimoto T, Ishida K. Characterization of strain SRT308; a new heterotrophic flagellate basal to Euglenozoa. Protist-2016 Moscow Forum, 2016.

Tanifuji G, Takabayashi S, Kume K, Inagaki Y, Hashimoto T. The draft genome of *Kipferlia bialata* reveals the gain of function contributes the massive reductive evolution in Metamonada. Protist-2016 Moscow Forum, 2016.

矢崎裕規, 白鳥峻志, 久米慶太郎, 橋本哲男, 石田健一郎, 稲垣祐司. 真核生物進化の空白を埋める! 分子系統解析が解き明かすプロティストの系統関係. 日本進化学会第 18 回大会(招待講演), 2016. Yazaki E, Shiratori T, Hashimoto T, Ishida K, Inagaki Y. A phylogenetic study placed a previously undescribed eukaryote, strain SRT308, at the base of the Euglenozoa clade. ICES 2016, 2016.

矢崎裕規, 白鳥峻志, 久米慶太郎, 橋本哲男, 石田健一郎, 稲垣祐司. 嫌気性生物 PAP020 株のミトコンドリア様オルガネラ代謝機能の推測. 第 85 回日本寄生虫学会大会, 2016.

矢崎裕規, 白鳥峻志, 久米慶太郎, 橋本哲男, 石田健一郎, 稲垣祐司. トランスクリプトームデータを基盤とした大規模分子系統解析による新奇嫌気性真核微生物 PAP020 株の系統的位置の解明. 日本進化学会第 17 回大会, 2015.

Yazaki E, Shiratori T, Kume K, Ishikawa SA, Ishida K, Hashimoto T, Inagaki Y. Strain PAP020, a novel anaerobic eukaryote branching at the base of Fornicata. VII ECOP-ISOP Joint Meeting, 2015.

高林舜, 久米慶太郎, 神川龍馬, 谷藤吾朗, 稲垣祐司, 橋本哲男. フォルニカタ + パラバサリア生物群内でのミトコン

ドリア縮退進化 第75回日本寄生虫学会
東日本支部大会, 2015.

Kume K, Takabayashi S, Kamikawa R,
Tanifuji G, Inagaki Y, Hashimoto T.
Prediction and comparison of the
metabolism of mitochondrion-related
organelles in free-living fornicate
organisms. 2nd International
Symposium on Matoryoshka-type
Evolution in Eukaryotic Cells, 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 哲男 (HASHIMOTO, Tetsuo)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：50208451

(2) 研究分担者

石田 健一郎 (ISHIDA, Kenichiro)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：30282198

稲垣 祐司 (INAGAKI, Yuji)

筑波大学・計算科学研究センター・教授

研究者番号：50387958

(3) 連携研究者

半澤 直人 (HANZAWA, Naoto)

山形大学・理学部・教授

研究者番号：40292411