

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14800

研究課題名(和文) 海綿動物と微生物の共生関係解明に向けたモデル宿主の確立

研究課題名(英文) Development of sponge reproduction to reveal symbiotic relationship between sponges and bacteria

研究代表者

高田 健太郎 (Takada, Kentaro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：90455353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：海綿動物には1000属以上の微生物が共生し、巨大な微生物共同体を構築しているが、微生物の共生経路の詳細は明らかになっていない。本研究では海綿動物の完全養殖の成功を基に、屋内水槽、屋外水槽、野外でのカイメンの飼育に成功した。また、生活環における各ライフステージにおける二次代謝産物、および、微生物叢の解析をおこなうことで海綿動物 - 微生物の共生関係の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：While almost sponges feed on bacteria and other food particles, sponges contain a diverse of symbiotic microbial communities. The detailed mechanisms of recognition by sponge have not been revealed. Recently we succeeded in reproduction of one of Japanese sponge. Based on its technology, in this study, the culture conditions were optimized to obtain adult sponges cultured in interior and exterior tanks of water. We then analyzed secondary metabolites in the extract of each sponge, embryo, and larvae, and characterized microbial profile in each life stage to reveal a part of symbiotic relationship between sponges and bacteria.

研究分野：海洋天然物化学

キーワード：共生微生物 海洋天然物

1. 研究開始当初の背景

最も原始的な多細胞動物である海綿動物は、極めて単純な体構造を持つにも関わらず、6億年以上もの間、その体構造を大きく変えることなく進化してきた。この背景には、微生物との共生があると考えられる。実際に海綿動物には1000属以上の微生物が共生し、巨大な微生物共同体を構築しているが、微生物の共生経路の詳細は明らかになっていない。また、これらの共生微生物には、様々な生物活性を示す二次代謝産物を生産する種が含まれていると考えられてきたが、詳細は明らかにされていなかった。2014年、八丈島に生息する海綿 *Theonella swinhoei* に含まれる30種以上の化合物が、*Entotheonella* という1種の微生物によって生産されることを遺伝子レベルで明らかにし、難培養性の共生微生物が生物資源として利用できることを証明された。その後、*Entotheonella* の培養に挑戦したが、種々の条件検討にも関わらず失敗に終わった。共生微生物が難培養な理由として宿主中の環境因子の不足が考えられるが、不特定多数の因子を最適化するのは難しい。化合物を有効活用する上で、宿主と微生物の共生機構を理解することは重要である。

2. 研究の目的

本研究課題の開始までの先行研究で、我々が研究対象とするカイメンXの繁殖期を特定した。繁殖後には親個体が消滅してしまうため、恐らくは1年性の生活環を持つと予想した。さらに、屋外水槽にて飼育を継続したところ、次年には次世代のカイメンが成長し、繁殖期には体内に胚を持つこと確認した。カイメンの研究は18世紀からおこなわれているにも関わらず、文献を調査する限り完全養殖の成功例はない。モクヨウカイメンが洗浄用および化粧用スポンジとして利用されていることから、カイメン養殖は産業になっているが、産業界ではカイメンの成熟個体を複数に切断し、海洋環境中で大きく育てるという方法を取る。また、発生の研究では、生殖時の組織切片を作製することで発生様式を観察している。一般的に海綿の生育が遅いことから、そのような取り組みすらおこなわれていないと推測している。本研究では、カイメンの reproduction の技術を確立し、当該カイメンを用いて海綿動物 - 微生物の共生関係を包括的に明らかにするためのモデル生物として確立することを目的とした。

3. 研究の方法

3 - 1. カイメン由来の胚および幼生の取得

野外よりカイメンを採集し、屋外水槽にて飼育した。幼生は駒込ピペットにて採取し、胚は Ca^{2+} 、 Mg^{2+} を含まない人工海水に浸し、

カイメン細胞を分散させた後、胚を駒込ピペットで回収した。取得した胚および幼生は滅菌人工海水で数回洗浄した。

3 - 2. 幼生のシャーレへの着底

幼生をシャーレ内にて飼育し、着底させた。数回の海水交換をおこなった後、2週間程度、屋内水槽にて飼育をおこなった。その後、屋内水槽で継続して飼育する群、屋外水槽にて飼育する群、野外にて飼育する群に分けて1年間飼育をおこなった。

3 - 3. 成体、胚、幼生からのゲノム抽出

成体、胚、幼生は、適量をニッピ社製バイオマッシャーにてすり潰した後に、QIAGEN社製のQIAamp DNA Stool Mini Kitを用いてゲノムを抽出した。ゲノム量は、Thermo Fisher Scientific製のNanoDropにて定量した。

3 - 4. 微生物叢解析

3 - 3で得られたゲノムから微生物叢解析に必要なDNAフラグメントを以下のように調製した。Earth Microbiome Project (<http://www.earthmicrobiome.org/>)では、微生物叢解析に関して標準化したプロトコルを提供している。本研究では、そのプロトコルに従い、微生物の16S rDNA配列中の515-806塩基部分の配列を、指定のIllumina社次世代シーケンサ用adapter配列および、バーコードシーケンスを含むプライマーで増幅し、解析に供した。

3 - 5. 成体、胚、幼生の代謝産物の解析

ゲノム抽出したサンプルとは別に適量の成体、胚、および幼生から、代謝産物をEtOHにて抽出した。得られた粗抽出物は、ODS樹脂を用いて前処理をおこなった後、Bruker社製のamaZon SLを用いてLCMS解析をおこなった。なお、カラムにはナカライテスク社製Cosmosil 2.5C18 MSII (ϕ 2 x 100 mm)を用いた。

4. 研究成果

4 - 1. カイメン幼生の取得

先行研究例が少ないため、他のカイメンとの比較は難しいが、当該カイメンは幼生の放出が始まり、2週間近く毎日幼生を放出することが明らかとなった。また月齢とはあまり相関がなく、日の午前中に多く幼生を放出することが分かった。放出された幼生を駒込ピペットにて回収した次項のシャーレへの着底をおこなった。

4 - 2. 幼生のシャーレへの着底

様々な生育環境での飼育を実施するため、シャーレへの幼生の着底をおこなった。基本的な方法論はカタユレイボヤの研究に倣い、実施した。幼生をシャーレ内で遊泳させ

る(図1a)と一定時間の後に着底を開始する。さらに継続して飼育すると2週間後には図1bのように、出水管が生じ、カイメンらしい姿に変態することが明らかとなった。変態の様子は最初の3日間は経時的に観察をおこなっていたが、顕微鏡の光によって変態に異常が生じてしまい、それ以上の観察は困難であった。今後、観察方法を検討する必要がある。2年間の研究プロジェクトの中で、着底方法にも改良を重ね、成功率が格段に高くなっている。

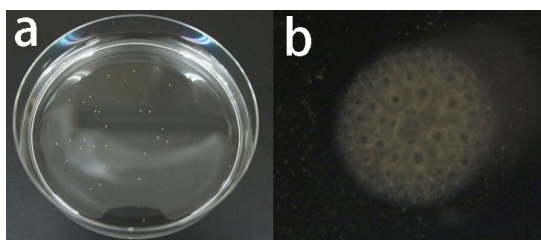


図1 .a)シャーレ内で遊泳する幼生、b)変態開始後約2週間の稚カイメン。画面中央に出水管が見える。

4 - 3 . 異なる環境におけるカイメンの成長

シャーレに着底させた稚カイメンを屋内水槽、屋外水槽、野外にて飼育を試みた。屋内水槽では還流はおこなわず2日に一度、海水の交換をおこなったが、生存率が低く、個体の成長も屋外水槽や野外飼育のカイメンと較べて著しく遅いことが明らかとなった。カイメンはフィルターフィーダーとして知られ、海水中のバクテリア、あるいは溶存有機物をろ過することで餌にしているとされている。カイメンのろ過海水量が非常に多いことから、屋内水槽の成長の遅さは餌不足に起因すると考えられるが、その詳細は明らかとなっていない。一方、屋外水槽では海水のかけ流し環境で飼育をおこなっているため、野外環境と同程度の餌を供給できていると考えていたが、やはり野外飼育のカイメンと較べると成長が遅いことが明らかとなった。今後は、どのような餌で成長が促進するかを検討していく必要がある。

また、野外飼育のカイメンはコンテナに収容して飼育していたが、驚くべきことに当該カイメンが持つ色彩が失われていることが明らかとなった(図2)。現在、色素の同定をおこなっており、異なる環境下での色素の発現の有無や機能を明らかにできると考えている。



図2 .野外で飼育したカイメン

4 - 4 . 各生活環における二次代謝産物の比較

当該カイメンには主要な二次代謝産物が存在し、強い細胞毒性を生じることが知られているが、その化合物の生産者は明らかとなっていない。本研究課題では、二次代謝産物が各生活環でどのように変遷していくかを調査することで、生産者に関する情報が得られるのではないかと考えた。その結果、全ての二次代謝産物が全てのステージで確認されるわけではないが、ある特定の化合物は幼生中からも検出されることが明らかとなった。化合物の生産者が特定されれば、カイメンに含まれる二次代謝産物の来源や、存在意義についても明らかにできる可能性が高い。

4 - 5 . 各生活環における微生物叢の解析

本研究では生活環の各ステージにおけるカイメンからゲノムを抽出することに成功した。カイメン成体は、様々な真核生物と共生し、それに付随(共生)する原核生物が多数存在しているため、一般的な親個体からゲノム解析をしても解析が困難であることが予想できる。今回の研究で、幼生から純粋なカイメンおよび共生微生物のゲノムを抽出できた意義は大きい。また、得られたゲノムから微生物叢解析のためのDNA断片を得ることに成功した。現在、ゲノム解析中をおこなっている。

4 - 6 . 総括

本研究は、「海綿動物と微生物の共生関係解明に向けたモデル宿主の確立」というテーマで研究をおこなってきた。カイメンのreproductionに挑戦するという前例のない研究テーマの下、カイメンの繁殖期の特定、幼生の回収・着底法の確立、および、飼育環境の最適化を実践することができた。さらなるモデル生物として確立するためには、閉鎖空間での飼育に成功する必要がある。餌生物の特定、任意に繁殖させるための方法論の確立が必要である。一方で、宿主と微生物の共生関係を明らかにする上では、十分なモデル系を構築できたと考えており、今後は他種のカイメンにも応用できると考えている。また、今回の研究で確立した実験系を用いて、フィルターフィーダーであるカイメンがどのように餌微生物と共生微生物を識別しているか、その認識システムを明らかにしていきたいと考えている。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔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
特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

高田 健太郎 (TAKADA KENTARO)
東京大学大学院・農学生命科学研究科・助教
研究者番号：90455353

(2)研究分担者

伊勢 優史 (ISE YUJI)
名古屋大学大学院・理学研究科・特任助教
研究者番号：20535108

(3)連携研究者

()
研究者番号：

(4)研究協力者

()