

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19380110

研究課題名 (和文) 深海の熱水噴出域への適応機構をアミノ酸輸送体から探る

研究課題名 (英文) Elucidation of adaptation mechanisms to deep-sea hydrothermal vents through analysis of an amino acid transporter.

研究代表者

井上 広滋 (INOUE KOJI)

東京大学・大気海洋研究所・准教授

研究者番号：60323630

研究成果の概要 (和文)：深海の熱水噴出域に生息する生物は、細胞内にヒポタウリン (HT) という物質を蓄積して環境中の硫化水素を無毒化していると考えられる。本研究では、シンカイヒバリガイ類からタウリン輸送体 (TAUT) という蛋白質の遺伝子を単離し、その性質を解析した。その結果、TAUT が HT を細胞内に集める機能を担い、その遺伝子発現が環境中の硫化物濃度に応じて変化することがわかった。TAUT は細胞内の HT 量を調節することにより硫化水素の無毒化を制御していると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：Invertebrates inhabiting deep-sea hydrothermal vents are thought to use hypotaurine (HT) to detoxify harmful hydrogen sulfide in the environment. In this study, we showed that the taurine transporter (TAUT) has a role to collect HT and its gene expression in the gill cells is correlated to the environmental sulfide level. We conclude that TAUT regulates the process of sulfide detoxification by controlling the amount of HT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	12,700,000	3,810,000	16,510,000

研究分野：分子海洋生物学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：適応, 深海, 熱水噴出域, アミノ酸輸送体, 硫化水素, チオタウリン, シンカイヒバリガイ

1. 研究開始当初の背景

深海の熱水噴出域は、毒性のある硫化水素を含む熱水が噴出する特殊な環境である。しかし、そのような環境にも、大きなバイオマスを持つ生物群集が存在する。しかし、熱水噴出域に棲む生物が、どのようにして環境中の硫化水素の毒性を回避しているのかはよく分かっていなかった。

一部の生物からは、硫化水素と酸素を両方運搬できる特殊なヘモグロビンを進化させ

ていることが報告されている。しかし、そのような種は群集全体の中では少数であり、より一般的な硫化水素への適応機構が存在するものと考えられた。

近年、熱水噴出域に生息する無脊椎動物多くが、チオタウリン、ヒポタウリンという含硫アミノ酸を体内に多く含み、それらの濃度は硫化物への暴露の度合いに相関するという報告がなされた。チオタウリンは、ヒポタウリンと硫化物との反応により生成し、無毒

な物質であることから、熱水噴出域の生物は、細胞内にヒポタウリンを蓄積して、環境から体内に侵入した硫化物をチオタウリンに変換して無毒化しているものと推察される。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、熱水噴出域に生息する生物が硫化水素の毒性を回避するより一般的なメカニズムを解明することである。そのために、本課題ではヒポタウリンを細胞に蓄積する役割を果たす蛋白質を同定し、その機能を明らかにしたい。

3. 研究の方法

一般にアミノ酸は細胞膜の二重脂質膜を透過することができない。従って、細胞にヒポタウリンを取り込むためには、ヒポタウリンを通過させる特異的な輸送体蛋白質を細胞膜上に発現する必要がある。我々はその機能を、「タウリン輸送体 (TAUT)」という蛋白質が担っているものと予想した。なぜなら浅海にいるイガイ類の TAUT がヒポタウリンを輸送できることが報告されているからである。

研究対象として、シンカイヒバリガイ類を選んだ。シンカイヒバリガイ類は世界中の熱水噴出域に分布する、代表的な熱水域固有動物であり、しかも熱水域固有生物でありながら常圧の水槽でも長期飼育できることが知られているからである。我々は、海洋研究開発機構の研究船なつしまに搭載されている無人探査艇ハイパードルフィンを用いて、伊豆小笠原海域の明神海丘の熱水噴出域からシンヨウシンカイヒバリガイ

(*Bathymodiolus septemdiarium*) を採集して実験に供した。本種は熱水噴出域近辺に特異的に分布し、鰓に硫黄酸化細菌を共生させていることが知られている。

まず、シンヨウシンカイヒバリガイの組織から RNA を抽出し、cDNA を合成した後、既知の TAUT の配列から設計したプライマーを用いて PCR を行い、TAUTcDNA を単離した。

単離した cDNA を用いて、分子系統解析、逆転写 PCR 法による発現組織解析を行った。また、アフリカツメガエル卵母細胞上に発現させ、ラジオアイソトープでラベルしたタウリンや競合物質を取り込ませて、輸送特性解析を行った。また、硫化物添加水槽での飼育や、熱水から離れた場所への個体の移植などを行い、TAUT 遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR 法により解析した。その際、イオウ酸化細菌の量も、16SrRNA 遺伝子の量や、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) により比較した。さらに、近縁種だがメタン酸化細菌を共生させるヘイトウシンカイヒバリガイ (*B. platifrons*) からも TAUTcDNA を単離し、種間比較を行った。

4. 研究成果

(1) シンヨウシンカイヒバリガイ TAUTcDNA の単離

シンヨウシンカイヒバリガイの鰓から 2151bp の TAUTcDNA の全長を単離した。単離した cDNA は 683 残基のアミノ酸配列をコードしていた。アミノ酸配列はムラサキイガイ TAUT の配列と 82.5% の相同性があり、12 回膜貫通型の輸送体であることが予想された。膜貫通部位は種間で特に高い相同性を示したが、細胞外領域の一部の相同性は低かった。

(2) 発現部位

逆転写 PCR 法により、シンヨウシンカイヒバリガイの鰓、閉殻筋、足糸牽引筋、外套膜、足、生殖腺における発現レベルを調べたところ、その組織でも発現は検出されたが、鰓と生殖腺で高い発現が認められた。硫化水素への暴露を最も受ける鰓での高発現は、TAUT の硫化水素代謝における重要性を示唆する。

(3) 機能解析

アフリカツメガエルの卵母細胞上に発現させ、取り込み活性を調べたところ、シンヨウシンカイヒバリガイ TAUT はタウリンを輸送することが確認された。また、競合実験により、タウリンと同様にチオタウリン、ヒポタウリン、 β -アラニンなども輸送できることがわかった (図 1)。すなわち、本輸送体はヒポタウリンを細胞内に取り込むことができることが証明できた。

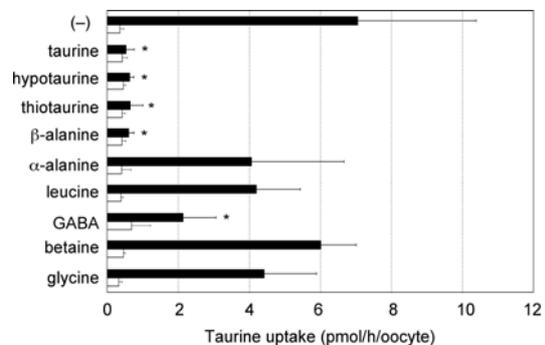


図 1 標識タウリンとの競合によるシンヨウシンカイヒバリガイ TAUT の輸送特異性解析の結果。アスタリスクは競合物質がない場合 (-) との有意差を示す。(業績 6 より)

(4) 種間比較と分子系統解析

近縁種のヘイトウシンカイヒバリガイから TAUTcDNA を単離した。両種の TAUT は 95.7% の高い相同性を示した。両種の TAUT とムラサキイガイやカキの TAUT および哺乳類で発見されている近縁の輸送体との関係を分子系統解析により調べたところ、貝類の TAUT はすべて非常に近い関係にあることがわか

ったが、哺乳類の TAUT とは異なる場所にクレードを形成した (図 2)。哺乳類と貝類の TAUT の関係については、近縁の輸送体をシンカイヒバリガイ類から単離することにより、今後解析する予定である。

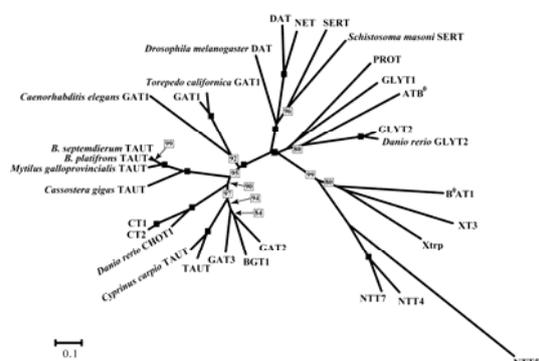


図 2 TAUT および近縁の輸送体の分子系統樹. 種名のないものはヒトの輸送体を示す. 近隣結合法による. 数字はブートストラップ値. (業績 2 より)

(5) 環境中の硫化物による発現誘導

熱水噴出孔に隣接してコロニーを形成しているシチヨウシンカイヒバリガイを、10 個体網かごに入れてすぐ近隣の熱水が当たらない場所に移植し、1 年間静置したのち回収して、共生菌の 16SrRNA 遺伝子量と、TAUT 遺伝子の発現レベルを比較した。共生菌の 16SrRNA 遺伝子は移植個体において減少しており、硫化水素への暴露が少なくなったことが確認できた。そして、TAUT 遺伝子の発現量はやはり移植個体で低下していた。この結果は、環境中の硫化物が減少すると、TAUT 遺伝子の発現も減少することを示している。

また、ヘイトウシンカイヒバリガイを硫化物添加海水と、通常海水の水槽において 69 日間飼育し、TAUT 遺伝子の発現量を比較したところ、硫化物添加水槽で飼育した群のほうが TAUT の発現量が高いことがわかった。この結果は硫化物の添加が TAUT 遺伝子の発現量を上昇させることを示している。イオウ酸化細菌でなく、メタン酸化細菌を共生させているヘイトウシンカイヒバリガイにおいても硫化物への応答が認められたことより、TAUT 遺伝子の応答は、共生させる菌の種類に関わらず、シンカイヒバリガイ類一般に認められる応答であることがわかった。

(6) 結論

シンカイヒバリガイ類において、TAUT は硫化物の無毒化に必要なヒポタウリンを細胞内に運ぶ機能を担っており、環境中の硫化物濃度が上がると TAUT 遺伝子の発現も上昇して、多くのヒポタウリンを蓄積しようとすることが示唆された。以上より TAUT は細胞内

のヒポタウリン量を調節することにより硫化水素の無毒化を制御していると考えられる。

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 6 件)

1. Koito, T., Morimoto, S., Toyohara H., Yoshida, T., Jimbo, M., Maruyama, T., Miyazaki, N., Inoue, K.: Decline in taurine transporter mRNA and thioautotrophic bacterial 16S rDNA levels after transplantation of the hydrothermal-vent mussel *Bathymodiolus septemdierum* to a non-vent position. *Cah. Biol. Mar.* 51, 429-433 (2010). 査読有り
2. Koito, T., Nakamura-Kusakabe, I., Yoshida, T., Maruyama, T., Omata, T., Miyazaki, N., and Inoue, K.: Effect of long-term exposure to sulfides on taurine transporter gene expression in the gill of the deep-sea mussel *Bathymodiolus platifrons*, which harbors a methanotrophic symbiont. *Fish. Sci.* 76, 382-388 (2010). 査読有り
3. Miyake, H., Kitada, M., Itoh, H., Nemoto, S., Okuyama, Y., Watanabe, H., Tsuchida, S., Inoue, K., Kado, R., Ikeda, S., Nakamura, K., and Omata, T.: Larvae of deep-sea chemosynthetic ecosystem animals in captivity. *Cah. Biol. Mar.* 51, 441 - 450 (2010). 査読有り
4. 北橋倫, 嶋永元裕, 井上広滋, 渡部裕美: 熱水噴出域のメイオフアウナの定量的研究におけるサンプラーバイアスについて: 内径の異なる 2 種類のハンドコアラーによる堆積物の比較. *JAMSTEC Rep. Res. Dev.* 10, 33-39 (2010). 査読有り
5. 井上広滋・小糸智子: 熱水噴出域への適応機構をアミノ酸輸送体から探る. *海洋と生物* 32, 123-128 (2010). 査読無し
6. Inoue, K., Tsukuda, K., Koito, T., Miyazaki, Y., Hosoi, M., Kado, R., Miyazaki, N., and Toyohara, H.: Possible role of a taurine transporter in the deep-sea mussel *Bathymodiolus septemdierum* in adaptation to hydrothermal vents. *FEBS Letters* 582, 1542-1546 (2008). 査読有り

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 小糸智子・吉田尊雄・丸山正・神保充・井上広滋・宮崎信之: 長期飼育したシンカイヒバリガイ類におけるタウリン輸送体遺伝子の発現変化. 平成 22 年度日本水産学会春季大会. 2010 年 3 月 26 日. 藤沢市
2. 頼末武史・渡部裕美・Benny K. K. Chan・加戸隆介・井上広滋・小島茂明: 深海化学合成生態系に生息する蔓脚類ネッスイハナカゴの一種及びハツシマレパスの幼生形態. 2009 年度日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会. 2009 年 10 月 17 日, 函館市
3. Miyake H., Kitada M., Ito T., Nemoto S., Okuyama Y., Watanabe H., Tsuchida S., Inoue K., Nakamura K. and Omata T.: Larvae of deep-sea, chemosynthetic animals in captivity. 4th International Symposium on Chemosynthesis-based Ecosystems. 2009 年 7 月 2 日, 名護市
4. Fujinoki M., Koito T. and Inoue K.: FISH image analysis for quantification of thiotrophic endosymbionts of bathymodiolin mussels. 4th International Symposium on Chemosynthesis-based Ecosystems. 2009 年 6 月 30 日, 名護市
5. Koito T., Fujinoki M., Yoshida, T., Maruyama T., Miyazaki N. and Inoue K.: Molecular evolution and the function taurine transporter (TAUT) in *Bathymodiolus platifrons*. 4th International Symposium on Chemosynthesis-based Ecosystems. 2009 年 6 月 29 日, 名護市
6. 小糸智子・吉田尊雄・丸山正・神保充・宮崎信之・井上広滋: 硫化物への暴露によるヘイトウシンカイヒバリガイタウリントランスポーター遺伝子の発現誘導. Blue Earth '09 2009 年 3 月 12 日. 豊島区
7. 藤ノ木優・小糸智子・根本卓・北田貢・沼波秀樹・井上広滋: シンカイヒバリガイ類に共生する硫黄酸化細菌の蛍光 in situ hybridization による視覚化及び定量. Blue Earth '09. 2009 年 3 月 12 日. 豊島区
8. 吉田尊雄・丸山正・三輪哲也・小山純弘・前田太郎・穴戸玲子・垣添奈月・足立文・岩淵範之・神保充・三宅裕志・井上広滋・小糸智子・藤井輝夫・福場辰洋・玉井雄一朗・菊池淳・奥野光: NT08-03 “相模湾初島沖チューブワーム-の分布と共生細菌の幼生への感染に関する研究” 航海概要報告 Blue Earth '09. 2009 年 3 月 12 日. 豊島区
9. 小俣珠乃・井上広滋・加戸隆介・豊原治彦・山下倫明・山本啓之・松村清隆・大越健嗣・佐俣哲郎・三宅裕志・渡部裕美・今井啓吾: シンカイヒバリガイ類を中心とした熱水・冷湧水域固有生物の生態に関する研究: NT06-23 成果報告. Blue Earth '09 2009 年 3 月 12 日. 豊島区
10. 北田貢・伊藤寿茂・根本卓・北嶋円・倉田桂子・笠川宏子・原明日香・佐藤有希・井上広滋・渡部裕美. 深海生物の伝え方: 子供ボランティアによる深海生物展示. Blue Earth '09. 2009 年 3 月 12 日. 豊島区
11. 井上広滋・渡部裕美・佐藤崇・小糸智子・頼末武史・小島茂明・伊勢優史・豊原治彦・石田貴之・三宅裕志・池田周平・遠藤紀之・北橋倫・嶋永元裕・伊藤希・長谷川優・大越健嗣・根本卓・杉田敦子・Benny K. K. Chan: NT08-07 Leg2 明神海丘航海概要: 熱水噴出域における生物の環境適応機構および生物固有性の解明に向けて. Blue Earth '09. 2009 年 3 月 12 日. 豊島区
12. 北嶋円・伊藤寿茂・北田貢・根本卓・三宅裕志・井上広滋・渡部裕美・木村聡: 熱水噴出孔を設置した水槽内におけるゴエモンコシオリエビとユノハナガニの定位場所選択. Blue Earth '09. 2009 年 3 月 12 日. 豊島区
13. 三宅裕志・池田周平・北田貢・伊藤寿茂・根本卓・奥山陽子・土田真二・井上広滋・中村光一. 飼育によって得られた熱水噴出域周辺生物の幼生. Blue Earth '09 2009 年 3 月 12 日. 豊島区
14. 伊藤希・大越健嗣・根本卓・伊藤寿茂・北田貢・井上広滋: シチヨウシンカイヒバリガイの形態および行動特性: 深海性二枚貝類と比較して Blue Earth '09. 2009 年 3 月 12 日. 豊島区
15. 宮崎佳子・佃知彦・井上広滋・小糸智子・細井公富・豊原治彦・森本晋一郎: シチヨウシンカイヒバリガイのタウリントランスポーターの発現解析 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会. 2008 年 12 月 10 日. 神戸市
16. Koito T., Kusakabe I., Iizasa K., Watanabe H., Yoshida T., Ohishi K., Maruyama T., Kojima S., Miyazaki N. and Inoue K.: Quantitative analyses of taurine transporter mRNA in hydrothermal vent and cold seep mussels *Bathymodiolus septemdiemum* and *B. platifrons*. 5th World Fisheries Congress. 2008 年 10 月 21 日, 横浜市
17. 小糸智子・井上広滋・宮崎信之: 深海性二枚貝ヘイトウシンカイヒバリガイの硫

()
研究者番号：

- 化水素への適応機構をタウリン輸送体から探る. 東京大学生命科学ネットワークシンポジウム 2008. 2008年9月23日, 文京区
18. 小糸智子・日下部郁美・渡部裕美・吉田尊雄・大石和恵・丸山正・飯笹幸吉・小島茂明・井上広滋・宮崎信之: 陸上水槽で飼育したシチヨウシンカイヒバリガイにおけるタウリン輸送体遺伝子の発現変化. 平成20年度日本水産学会春季大会. 2008年3月28日, 静岡市
19. 小糸智子・日下部郁美・渡部裕美・吉田尊雄・大石和恵・丸山正・飯笹幸吉・小島茂明・井上広滋・宮崎信之: リアルタイムPCRを用いたシチヨウシンカイヒバリガイタウリン輸送体 mRNA の定量. Blue Earth '08 2008年3月13日, 横浜市.
20. 豊原治彦・佃知彦・宮崎佳子・細井公富・井上広滋・加戸隆介: シチヨウシンカイヒバリガイのタウリン輸送に関する分子生物学的研究—タウリン輸送体の同定と輸送機能の解析. 2007年度日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会. 2007年9月17日, 横浜市
21. 大越健嗣・内田陽介・山内 東・加戸隆介・井上広滋・小俣珠乃: シチヨウシンカイヒバリガイの幼生・稚貝、貝殻微細構造の観察とチムニー付着個体群の変動. 日本貝類学会平成19年度大会. 2007年4月21日, 豊橋市

[その他]

ホームページ等

<http://cicplan.ori.u-tokyo.ac.jp/inoue/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 広滋 (INOUE KOJI)

東京大学・大気海洋研究所・准教授

研究者番号：60323630

(2) 研究分担者

豊原 治彦 (TOYOHARA HARUHIKO)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：90183079

(H20→H22：連携研究者)

丸山 正 (MARUYAMA TADASHI)

海洋研究開発機構・海洋生態環境研究プログラム・プログラムディレクター

研究者番号：90373464

研究者番号：90373464

(H20→H22：連携研究者)

(3) 連携研究者