

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06799

研究課題名(和文) シンカイヒバリガイ類で共生細菌が水平伝達される際、細胞では何が起きているのか？

研究課題名(英文) Cell processes and mechanisms during horizontal transmission of symbiotic bacteria in Bathymodiolus mussels

研究代表者

生田 哲朗 (Ikuta, Tetsuro)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・地球環境部門(海洋生物環境影響研究センター)・研究員

研究者番号：80584846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：化学合成独立栄養細菌との共生は、動物の深海環境への適応進化を可能にした生命現象であり、共生細菌の獲得はその核となる機構である。本研究では、化学合成細菌を環境から取り込み鰓細胞に宿すシンカイヒバリガイ類において、共生細菌を取り込む際に細胞で何が起きているのかを明らかにすることを目的し、各種感染実験や組織科学解析、遺伝子発現解析等を行った。その結果、シンカイヒバリガイ類の共生における細胞内/外の中間的性質を明らかにし、新たな進化モデルを立てるとともに、共生細菌取り込みプロセスについて細胞レベルの新たな仮説を提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、これまで未知であったシンカイヒバリガイ類が共生菌を環境からどのように獲得するのか？その細胞プロセスについて理解が進み、動物の深海環境への適応進化機構の理解も深まった。また本研究成果を手掛かりとして、他の生物でも蓄積されつつある水平伝達機構についての知見との比較を行うことで、細胞内共生系の成立と進化における動物門を超えた共通の機構解明へ向けた研究展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Symbiosis with chemosynthetic autotrophic bacteria is a biological phenomenon that has enabled animals to adapt and evolve to deep-sea environments, and the acquisition of symbiotic bacteria is a core process. In this study, we conducted various infection experiments, histological analyses, and gene expression analyses in order to elucidate what is happening in the gill cells of Bathymodiolus mussels when they take up chemosynthetic bacteria from the environment. As results, we clarified the intracellular/extracellular intermediary property of symbiosis in Bathymodiolus mussels and proposed a new evolutionary model of the Bathymodiolus symbiosis as well as a novel hypothesis for the symbiotic bacterial uptake process at the cellular level.

研究分野：共生生物学

キーワード：化学合成 共生細菌 シンカイヒバリガイ 水平伝達 細胞形態 共生進化

1. 研究開始当初の背景

動・植物と微生物の間で広く見られるとの共生は、生物の多様な環境への適応・進化の原動力となってきた。光が届かず光合成ができない深海では、熱水噴出域や湧水域といった地殻活動が盛んな場において、地中から供給される物質の化学エネルギーを一次生産に利用する化学合成独立栄養細菌を体の中や外に共生させる動物がしばしば数多く見られ、必要な栄養をその共生細菌に大きく依存する。つまり化学合成細菌との共生は、動物の深海環境への適応進化を可能にした主要な契機の一つといえる。

宿主動物の各世代において、如何に共生微生物を獲得するかは、共生関係の成立と世代を越えた維持に重要であると同時に、その機構の理解は進化上どのように共生関係が成り立ったのかを知る上で鍵となる。共生微生物の獲得方法は、卵などを介して受け継ぐ垂直伝達と、環境から取り込む水平伝達に大きく分けられる。深海化学合成生態系に優占する二枚貝シンカイヒバリガイ類は、特定の化学合成細菌を環境から水平伝達によって鰓の細胞内に取り込んで共生させている。しかし宿主動物の各世代で、あるいは進化的にどのように共生細菌を獲得して共生関係を築いている（築いた）のか、その機構はよく分かっておらず、水平伝達による共生の成立に決め手となるような分子細胞レベルの知見を深めることが重要であった。

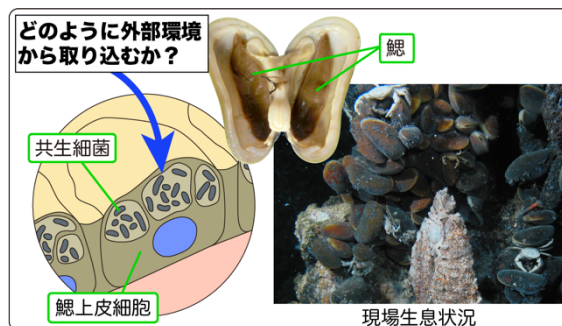


図1 シンカイヒバリガイ類の共生

2. 研究の目的

(1) 共生細菌取り込みの細胞プロセスの理解：同種だが異なる代謝系を持つ共生細菌の亜集団が同一宿主個体に共存するシチヨウシンカイヒバリガイ (*Bathymodiolus septemdierum*) において、共生細菌亜集団のユニークな分布パターン成立の背景となる、共生細菌の取り込みや増殖に係る細胞プロセスを明らかにする。

(2) 種特異的な共生細菌取り込みを支える分子背景の理解：同所的に生息し、近縁だが異なる種類のメタン酸化共生細菌をそれぞれ1対1の関係で特異的に宿すシンカイヒバリガイ (*Bathymodiolus japonicus*) とヘイトウシンカイヒバリガイ (*B. platifrons*) 2種において、共生細菌の特異性を支える分子細胞メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 水槽飼育により無菌状態にしたシチヨウシンカイヒバリガイに共生細菌の再感染を起こさせ、菌亜集団の宿主鰓上皮細胞内の局在性の推移を観察する。また、同宿主鰓上皮細胞の超微細構造の3次元的な組織科学解析を行い、さらに個々の細胞に共生する菌亜集団の集団構造についてゲノム科学的解析を行う。

(2) シンカイヒバリガイとヘイトウシンカイヒバリガイ2種について、共生細菌種を入れ替えた菌懸濁液を暴露する実験を行い、暴露した宿主鰓組織について網羅的遺伝子発現解析を行う。

4. 研究成果

(1) 共生細菌取り込みの細胞プロセスの理解

硫黄酸化型共生細菌を宿すシチヨウシンカイヒバリガイを、陸上の無添加水槽で数ヶ月飼育して共生細菌のいない状況を作り出し、これを調査航海で新たに採集した個体と共に硫化ナトリウム添加水槽に入れ、そこから数個体を定期的にサンプリングしたが、qPCR解析では再感染の現象は確認できなかった。そこで陸上の水槽ではなく、生息現場に無菌化した個体を持ち込んで1年後回収するという方法に切り替えたところ、通常個体での菌数と比した割合として多くはないが、再感染を示すと思われる結果が得られた。さらに詳細な解析に供する試料を確保するため、無菌化処理後1年間生息現場に設置した貝を回収する調査航海を計画したが、海況不良により回収作業を行うことは出来なかった。今後の調査航海における回収と詳しい解析を予定している。

一方、同宿主鰓上皮の菌保有細胞（バクテリオサイト）の連続超薄切片を走査型電子顕微鏡で観察し、トモグラフィー法で3次元的に再構築することによって、共生細菌を包む膜構造の詳細な解析を行ったところ、個々のバクテリオサイトにおいて、共生細菌を包むほぼ全ての膜小室は互いに繋がっており、さらに外部環境に通じる複数の経路を持っていることが分かった。外部との連絡通路には、共生細菌を包む部屋が直接外部に開いている箇所もあれば、複雑な膜構造を呈するものも観察され、これまで言われてきたような共生細菌取り込みにおける食作用の過程を

示す構造とは考え難かった。このような、共生細菌が膜に包まれながらも外部環境との繋がりを複雑な膜構造を介して保つ構造は今回初めて発見されたものであり、細胞内共生と細胞外共生の進化の中間段階となる新しい共生形態である可能性がある。また、今回確認されたようなバクテリオサイト表面の開口構造は、シチヨウシンカイヒバリガイを含め、主に硫黄酸化細菌との共生でのみ報告されてきた。本研究においても、メタン酸化型細菌を宿主シチヨウシンカイヒバリガイ (*B. japonicus*) では開口部は確認されなかったことから、外部と繋がりを保つ特徴は硫黄酸化細菌との共生でのみ現れることが示唆された。

さらに、共生細菌を包むほぼ全ての膜小室が繋がっていたことから、個々のバクテリオサイトに共生する細菌の集団構造に着目した。酵素処理により解離した鰓組織からマイクロ油滴デバイスを用いてバクテリオサイトを単離してDNAを抽出し、共生細菌のヘテロなゲノム構成上、配列の多様性の高い遺伝子のアンプリコン解析を行ったところ、個々のバクテリオサイトの共生細菌は各々ほぼ単一株からなることが証明された。

これらの結果から、シチヨウシンカイヒバリガイの共生細菌取り込みの細胞レベルのプロセスについて、「同宿主の鰓で共生が成立する際、鰓の細胞は共生細菌を一つだけ取り込み、その細菌が小室内で外部との連絡を保ちながらクローナルに増殖する」という仮説を提唱するとともに、シチヨウシンカイヒバリガイの共生における細胞内/外の中間的性質から、シンカイヒバリガイ類の共生の新たな進化モデルを立てた。

(2) 種特異的な共生細菌取り込みを支える分子背景の理解

シンカイヒバリガイとヘイトウシンカイヒバリガイは、近縁ながら別種のメタン酸化型化学合成細菌を宿主、相模湾初島沖などで同所的に生息する種である。本研究では、この2種の鰓を用いて、共生細菌種を入れ替えた菌懸濁液を暴露する実験を行い、暴露した宿主鰓組織について網羅的遺伝子発現解析を行った。自種あるいは多種の共生細菌が接触した時の遺伝子発現量の変動を網羅的に探索することで、宿主が体外からの共生細菌の接触に対してどのように応答するのかを調べた。その結果、宿主シンカイヒバリガイとヘイトウシンカイヒバリガイ両方において、どちらの共生細菌を暴露した時でも、種々の細胞プロセスに関わる遺伝子の転写量が変動していることが確認された。詳細は現在解析中だが、シンカイヒバリガイ類における共生では、こうした遺伝子がコードする因子の機能による制御を行うことによって、自種の共生細菌を積極的に受け入れている可能性が示された。さらに、自種と他種の種レベルでの共生細菌認識機構が、今回発現変動遺伝子として挙げられた因子の上流に存在するという展望を示すことができた。

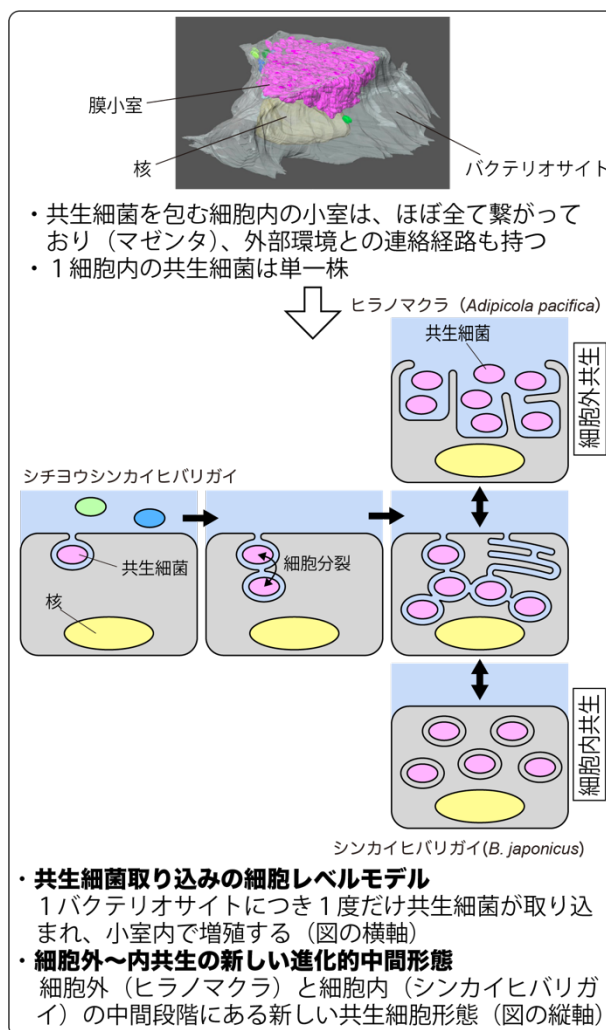


図 2 共生細菌取り込みの細胞プロセスと進化モデル

シンカイヒバリガイ類の共生の新たな進化モデルを立てた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikuta Tetsuro, Amari Yuka, Tame Akihiro, Takaki Yoshihiro, Tsuda Miwako, Iizuka Ryo, Funatsu Takashi, Yoshida Takao	4. 巻 1
2. 論文標題 Inside or out? Clonal thiotrophic symbiont populations occupy deep-sea mussel bacteriocytes with pathways connecting to the external environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ISME Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s43705-021-00043-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 甘利友花, 高木善弘, 津田美和子, 多米晃裕, 吉田尊雄, 生田哲朗
2. 発表標題 シンカイヒバリガイ類は共生細菌をどのように見分けているのか?
3. 学会等名 海と地球のシンポジウム 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 甘利友花, 多米晃裕, 高木善弘, 津田美和子, 飯塚怜, 船津高志, 吉田尊雄, 生田哲朗
2. 発表標題 深海性二枚貝シチヨウシンカイヒバリガイにおける化学合成細菌を共生させる鰓上皮細胞のユニークな構造
3. 学会等名 日本動物学会 第92回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	吉田 尊雄 (Yoshida Takao)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高木 善弘 (Takaki Yoshihiro)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関