

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06844

研究課題名(和文) 深海性多毛類腸管内硫黄化合物は金属および硫化水素無毒化に貢献するか

研究課題名(英文) Do deep-sea polychaete intestinal sulfur compounds contribute to detoxification of metals and hydrogen sulfide?

研究代表者

小糸 智子 (KOITO, Tomoko)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：10583148

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)：深海熱水噴出域固有種であるマリアナイトエラゴカイが環境中から体内へ侵入する過剰な硫黄や金属を無毒化するため、腸管細胞内で球晶を形成するという仮説を検証した。本種と同所的に生息するウロコムシ類を比較対象として腸内細菌叢を調べたところ、両種は類似したがウロコムシ類では球晶を発見できなかった。また、本種に比べ含硫アミノ酸量が多い一方、金属元素量は少なかった。したがって、球晶の形成に腸内細菌は関与しないことが示唆され、硫黄や金属の代謝がウロコムシ類とは異なることを明らかにした。また、浅海性多毛類への曝露実験により、生息環境を問わず多毛類腸管に硫化物および金属の蓄積機構が存在する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、深海熱水鉱床は鉱物資源の開発対象として注目されている。開発に対する生物影響を明らかにするために、まずそこに生息する生物の生態を解明し、希少性や特異性の有無を評価することが肝要である。とりわけ熱水噴出域は熱水に由来する化学物質に依存する特異な生態系が形成されている。本研究は、熱水噴出域固有生物を対象とし、その特異性について明らかにした。したがって本研究成果を社会に発信することは生物影響評価の一助になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the hypothesis that *Paralvinella hessleri*, a deep-sea hydrothermal vent endemic species, forms spherocrystals in their digestive tract cells to detoxify excess sulfur and metals permeating the body from the environment. Intestinal flora of this species and sympatric scale worms were compared, revealing that although both species were similar, spherocrystals were not found in scale worms. In addition, the content of sulfur-containing amino acids was higher than that of this species, while the content of metallic elements was lower. Therefore, it was suggested that intestinal bacteria were not involved in the formation of spherocrystals, and it was found that the metabolism of sulfur and metals was different from that of scale worms. Furthermore, exposure experiments to shallow-water polychaetes suggested that sulfide and metal accumulation mechanisms may exist in the polychaete digestive tract regardless of the habitat.

研究分野：海洋生物学

キーワード：腸管内球晶 マリアナイトエラゴカイ 深海熱水噴出域

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

深海熱水噴出域や冷水湧出域には、他の深海底に比べ高濃度の硫化水素や金属元素が存在する。このような環境に無脊椎動物を中心とした化学合成生物生態系が形成されている。高濃度の硫化水素や金属の存在は生物にとって有毒であるにもかかわらず、二枚貝類や甲殻類、多毛類が高密度で生息している。したがって、硫化水素や金属の無毒化機構が存在すると考えられてきた。

硫化水素への応答については、一部の生物で特殊なヘモグロビン様タンパク質を保有することが知られている。このタンパク質が硫化水素と結合することで、無毒な状態で体内を循環させることが示唆されてきた。一方、このタンパク質をもたない種では、含硫アミノ酸の生合成が硫化水素無毒化に貢献していることが示唆されてきた。多くの生物体内ではタウリンやその類縁体であるヒポタウリン、チオタウリンの生合成が行われている。化学合成生態系を構成する無脊椎動物は、ヒポタウリンやチオタウリン量が浅海性無脊椎動物に比べ多いこと、人為的な硫化物曝露によってその量が増加することが報告されてきた。ヒポタウリンはチオタウリンよりも硫黄元素が1つ多い構造であることから、環境中の硫化水素とヒポタウリンを反応させ、チオタウリンへ変換することによって硫化水素を無毒化すると推測されてきた。すなわち、硫化水素濃度に応じて含硫アミノ酸量が増減するはずである。そこで、熱水噴出域のチムニー(熱水の成分が沈殿して形成される煙突状の構造物)に付着する生物を、チムニー上部から下部にかけて採集し、含硫アミノ酸量を定量した。ところが、チムニー頂端で同所的に生息するマリアナイトエラゴカイとウロコムシ類体内の含硫アミノ酸量が異なっていた。前者は後者に比べ、ヒポタウリン、チオタウリン量が著しく少なかった。この結果から、マリアナイトエラゴカイの硫化水素無毒化機構がウロコムシ類と異なるのではないかという仮説を立てた。

仮説を検証するため、分析型走査電子顕微鏡(SEM-EDS)によってマリアナイトエラゴカイおよびウロコムシ類の組織観察および元素分析を行なった。その結果、マリアナイトエラゴカイ腸管上皮細胞内に多数の球晶が存在することを見出した。この球晶は硫黄以外にも鉄、亜鉛、砒素などの金属元素から構成されていることが明らかとなった。そこで、マリアナイトエラゴカイは環境中に多量に含まれる硫化水素や金属を無毒な状態で体内に蓄積・排出することで無毒化を行なうという新たな仮説を立てた。

2. 研究の目的

ヒトを含め、動物が腸管から金属を吸収することはよく知られ、浅海性無脊椎動物でも多数報告されてきた。一方、熱水噴出域に生息する多毛類については知見が乏しいことに加え、固着性、移動性といった生活型や食性などの生態と関連付けた研究はない。本研究では、深海熱水噴出域に生息するマリアナイトエラゴカイが環境中に存在する金属や硫黄を無毒化するための機構として腸管内に球晶を形成する、という仮説を検証することを目的とした。先述のマリアナイトエラゴカイとウロコムシ類は前者が薄い棲管でチムニーに固着し、後者は移動性をもつ。したがって、同じ環境に曝されているながら生態が異なるため、比較に適していると考えられる。また、熱水噴出域に比べ、硫黄や金属が少ない環境に生息する浅海性無脊椎動物でも曝露実験によって球晶を形成するかを調べ、生息環境中の元素に由来する球晶を腸管内で形成する現象の普遍性を検証することとした。

3. 研究の方法

深海性多毛類の採集

深海性多毛類であるマリアナイトエラゴカイおよびウロコムシ類は、伊豆・小笠原海域明神海丘(水深約1300m)のチムニーを無人探査機で採取し、船上でチムニー表面から単離した。

電子顕微鏡観察

腸管上皮細胞における硫黄および鉄元素の局在を明らかにするため、SEM-EDSによる観察を実施した。グルタルアルデヒド固定したマリアナイトエラゴカイおよびウロコムシ類の腸管上皮細胞のマッピングを実施し、各元素の局在を調べた。

菌叢解析

熱水噴出域には金属や硫化物を利用するバクテリアが多数存在する。それらが餌として深海性多毛類に摂食され、腸管内で顆粒を形成しているかを明らかにすることを目的として菌叢解析を実施した。70%エタノール固定済みのマリアナイトエラゴカイとウロコムシ類を解剖して腸管を摘出した後、全DNAを抽出した。16rRNAのV3-V4領域をMiSeqで解読し、Metagenome@KINを用いて相同検索を行なった。

元素分析

腸管の硫黄、鉄およびその他金属元素を定量した。サンプルには凍結保存したマリアナイトエラゴカイおよびウロコムシ類を用い、腸管とその他部位に分けオープンで乾燥した。乾燥した組織を酸で溶解・希釈し、ICP-OES に供した。

アミノ酸分析

構造内に硫黄元素を含むタウリン、ヒポタウリン、チオタウリンおよび遊離アミノ酸を定量するため、深海性・浅海性多毛類の腸管およびその他部位を 80%エタノール中でホモジナイズし、その上澄をアルカリ化、誘導体化した。誘導体化したサンプルを Pico-Tag 法により高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定量した。

メタロチオネインの定量

腸管で特異的に金属結合タンパク質が発現しているか検証するため、Metallothionein ELIZA Kit を用いてメタロチオネインの定量を試みた。サンプルとして多毛類の腸管およびその他部位をリン酸バッファー中でホモジナイズした上澄を用いた。

ハナオレウミケムシの曝露実験

熱水噴出域固有多毛類の対照として、浅海性多毛類であるハナオレウミケムシを用いた硫化物および鉄の曝露実験を実施した。既往知見より、硫黄は 20、200 $\mu\text{mol/L}$ 、鉄は 0.1、1.0ppm とし、24 時間までの曝露を実施した。硫黄は硫化ナトリウム九水和物を海水に溶解、鉄は元素分析用鉄標準液を海水で希釈して用いた。4、24 時間後にサンプリングし、腸管とその他部位 (体壁) に解剖して凍結保存した。各々の曝露したサンプルの含硫アミノ酸量を先述の方法で定量した。また、フェロジン法により鉄濃度を求めた。

4. 研究成果

マリアナイトエラゴカイとウロコムシ類の縦断および横断切片を観察したところ、前者は口から肛門にかけて広範囲に球晶が存在したが、後者には同様の局在を示す顆粒はなく、消化管付近に顆粒様の構造が認められた。マリアナイトエラゴカイで観察された球晶は真球に近い形状で概ね直径 1 μm 程度であり、腸管上皮細胞の頂側膜側に多く存在した。ウロコムシ類の顆粒様構造も同様に頂側膜側に存在したが、大きさ、形状が不揃いだった。EDS で 1 視野中の元素をマッピングしたところ、マリアナイトエラゴカイは硫黄と鉄の局在が球晶と一致したが、ウロコムシ類ではそれらの元素が細胞内に散在しており、顆粒様構造の局在とは一致しなかった。これらのことから、マリアナイトエラゴカイ腸管には硫黄と金属元素からなる球晶が存在することが明らかになった。

マリアナイトエラゴカイで存在が確認された球晶の形成に細菌が関与しているかを明らかにするため、ウロコムシ類と菌叢を比較した。その結果、両種の菌叢は類似していた。しかし、ウロコムシ類ではマリアナイトエラゴカイと同様の球晶が検出されていないことから、マリアナイトエラゴカイ球晶の形成に細菌が関与しているとは考え難く、腸管内球晶はマリアナイトエラゴカイの生理的機構により形成されている可能性が示唆された。また、含硫アミノ酸 (タウリン、ヒポタウリン、チオタウリン) 量を両種で比較したところ、マリアナイトエラゴカイ腸管のチオタウリン、ヒポタウリン量がウロコムシ類腸管に比べ著しく少ないことが明らかになった。また、元素分析により、マリアナイトエラゴカイ腸管の鉄元素はウロコムシ類腸管に比べ多量に検出された。これらの結果から、マリアナイトエラゴカイは硫化水素ないし硫化物と金属を腸管内で顆粒にする一方、ウロコムシ類は含硫アミノ酸として体内に蓄積することが示唆された。同所的に生息する両種の応答が異なる要因として、固着型と移動型という生活型の相違が挙げられる。マリアナイトエラゴカイは熱水の近傍に薄い棲管で付着する。熱水噴出域のウロコムシ類はチムニー表面で疣足を使って移動する。他方、熱水の流路、流速は一定でない。つまり、ウロコムシ類は熱水の濃淡を認知して至適な場所へ移動できるが、マリアナイトエラゴカイはそれができない。したがって、マリアナイトエラゴカイは体内に侵入する過剰量の硫化物や金属で球晶を形成して細胞に蓄積し、腸管上皮細胞ごと体外へ排出している可能性がある。一方、ウロコムシ類は硫化物、金属いずれも至適濃度の範囲で移動するため、過剰量の硫化物や金属が取り込まれないものと考えられる。

マリアナイトエラゴカイの腸管内顆粒の形成と金属結合タンパク質の関連性を調べるため、マリアナイトエラゴカイとウロコムシ類のメタロチオネイン濃度を調べた。その結果、マリアナイトエラゴカイ腸管はウロコムシ類腸管に比べ 5 倍以上メタロチオネインが多かった。多くの生物で腸管から金属を吸収することを鑑みれば、腸管でメタロチオネイン濃度が高いという結果は妥当である。しかし、メタロチオネインが球晶の形成に関与するという確証は得られていない。今後、硫黄や鉄にマリアナイトエラゴカイを人為的に曝露し、メタロチオネインタンパク質の発現が誘導されるか調べる予定である。

浅海性多毛類であるハナオレウミケムシを硫化物と鉄に曝露し、腸管から検出されるか調べた。その結果、硫化物、鉄いずれも体壁より腸管で多く検出された。さらに、曝露する硫化物濃度が高くなると腸管のタウリン、チオタウリン濃度が増加し、その状態が 24 時間まで維持された。1.0ppm の鉄に曝露したところ、腸管から検出される量は経時的に増加する傾向を示した。

したがって、水中への曝露であっても浸透などにより腸管に硫化物や金属が取り込まれることが明らかとなった。硫化物曝露によりチオタウリンが増加したことから、深海性ウロコムシ類同様にチオタウリン合成によって硫化物を無毒な状態で蓄積していることが推察されるが、球晶の有無を組織観察で確認する必要がある。恒常的に硫化物や金属に曝露されない環境に生息する浅海性多毛類であっても、それらに曝露すると腸管で応答する潜在的能力を具えていることが示唆された。つまり、硫化物や金属など、多量に摂取すると毒性を示すような物質に対して腸管が応答するのは生息環境を問わず多毛類に普遍的な機構であり、一種の無毒化機構なのかもしれない。腸管で球晶を形成するか含硫アミノ酸を生合成するかは種により異なると考えられる。その相違が生活型や生態に起因するか、系統進化に依存するかについて、今後種数を増やして解析していく予定である。

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 Koji Inoue, Yuri Onitsuka, Tomoko Koito	4. 巻 87
2. 論文標題 Mussel biology: from the byssus to ecology and physiology, including microplastic ingestion and deep-sea adaptations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 761-771
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-021-01550-5	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koito, T., Ito, Y., Suzuki, A., Suzuki, M., Mitsunobu, S., Sugimura, M., Inoue, K.
2. 発表標題 A possible hydrogen sulfide detoxification mechanism in deep-sea hydrothermal vent-endemic polychaeta
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019（国際学会）
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------