

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06779

研究課題名(和文) 深海性二枚貝の細胞内共生系の共生者の獲得と維持メカニズムの基盤解明

研究課題名(英文) Mechanism for acquisition and maintenance of intracellular symbionts in deep-sea bivalves.

研究代表者

吉田 尊雄 (Yoshida, Takao)

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)・主任研究員

研究者番号：60399566

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)：本研究では、共生菌がエラ細胞内に共生する深海性の二枚貝シンカイヒバリガイを用いて、共生菌の維持に関わる宿主由来の因子を同定し、その分子メカニズムを解明することを目標として研究を行った。研究方法としては、シンカイヒバリガイのエラ組織を用いて、発現遺伝子解析、抗体を用いた宿主由来の因子の局在解析などを実施した。その結果、共生菌は環境中からエラ上皮細胞の食作用によって細胞内の食包に取り込まれるが、宿主に分解されずに細胞内に維持される。共生菌の維持には、宿主の細胞内の栄養感知に関する因子によって制御されており、細胞内共生は、このシステムを利用して共生を成り立たせている可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物の細胞内に微生物が共生する共生系では、宿主である動物が共生者である微生物を細胞内に取り込んだ上で、取り込んだ微生物が細胞内で勝手な振る舞いをしないように制御して共生系を維持する必要がある。本研究では、宿主が食作用により微生物の種類を選ばずに細胞内に取り込むが消化される、一方で、共生者となる微生物は、細胞内で消化されずに維持されることを見出した。この共生者の維持に関する宿主の因子を新たに同定し、それが宿主の微生物からの栄養摂取と関連することを明らかにした。本研究は、細胞内共生系への生物適応システムの実態を理解するのに貢献する。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular mechanism for maintaining the endosymbiosis between host animal and chemosynthetic bacteria, we examined transcriptome and the localization of host factors using immunohistochemistry with antibodies were analyzed in mussel gill. We found that host bivalve acquires its symbiont from the environment by phagocytosis of gill epithelial cells. We also identified that host nutrient sensing factor was controlled the symbiont phagosome digestion. The regulation mechanism of phagosome digestion by host nutrient sensing factor is key for maintaining animal-microbe intracellular nutritional symbiosis.

研究分野：細胞内共生

キーワード：細胞内共生 共生者の獲得 共生の維持

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

深海の熱水域やメタン湧水域に存在する化学合成生態系において、二枚貝などの多くの動物は、動物種ごとに種特異的な化学合成独立栄養細菌(以後、共生菌と呼ぶ)との細胞内共生系を形成する。宿主となる二枚貝類は口や消化管が退化的であり、鰓細胞内に存在する共生菌は一次生産者として環境中の無機炭素やメタンから有機物を合成し、宿主は自らの栄養を共生菌からの有機物に完全に依存する。そのため昆虫などの他の共生系と比較しても、共生菌への栄養の依存度は極めて高い。宿主は共生菌から有機物を分泌により受け取るか、直接共生菌を消化することによって得ると推察されている(Fisher, Aquatic Science, 2, 399(1990))。しかしながら、これまでの電子顕微鏡観察からは、共生菌が消化されている様子は見られず、共生系の維持に関わる宿主-共生菌間の有機物摂取に関わる相互作用は未だ不明確である。また、宿主の共生菌の獲得方法は、環境中から共生菌を獲得する方法(水平伝達)と卵を介して獲得する方法(垂直伝達)の2つの方法が考えられている(Bright, Nat. Rev. Microbiol., 8, 218(2010))。宿主と共生菌は1対1の種特異的な関係にあるため、宿主にとって栄養を作り出す共生菌を環境中の微生物群から選択して獲得・維持することは宿主にとって重要となるが、その詳細は未だ明らかでない。二枚貝シンカイヒバリガイ類の共生菌は、メタンからエネルギー及び全てのアミノ酸、補酵素、核酸などを合成する遺伝子セットを持って。しかし、それらの輸送に関する輸送体の遺伝子を持っておらず、宿主への有機物の供給は具体的に解らなかつた。シンカイヒバリガイ類は、環境中に生息する共生菌を鰓細胞の食作用により獲得する可能性を見出したが、宿主がどのように食作用を介して共生菌と相互作用しながら選択的に獲得して維持するのは、その詳細なメカニズムは解っていない。かつた。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究知見がある二枚貝シンカイヒバリガイを用いて、宿主の食作用による共生菌の獲得と共生系の維持とそれに関与する共生菌からの有機物を得るための相互作用について、その分子メカニズムを解明することを目的とし以下の項目について解析を行った。

共生系の維持とそれに関与する共生菌からの有機物を得るための相互作用についてその分子メカニズムを解明すること

### 3. 研究の方法

一般的に食作用によって細胞内に取り込まれた微生物は食胞に内包され、食作用に関連する様々な因子の食胞への局在と制御により食胞の成熟過程を経る(図1参照)。まず、細胞内に取り込まれた微生物の食胞に、Rasスーパーファミリーに属する低分子量Gタンパク質であるRab5や初期エンドソーム抗原-1(EEA1)などの因子が結合して初期食胞が形成され、その後、Rab7やRab9などの因子が結合して後期食胞へ、そして後期食胞はゴルジ体から輸送されるマンノース6リン酸受容体(M6PR)を介して輸送される加水分解酵素により分解された後、リソソームと融合して消化される。

本研究では、目的で述べた2点を明らかにするために、上記で示した食作用の成熟過程に着目しながら以下の実験を実施した。

共生系の維持とそれに関与する共生菌からの有機物を得るための相互作用についてまずは、宿主の食作用により共生菌などが細胞内に取り込まれることを確認するために、宿主の鰓細胞から抽出した共生菌及びビブリオ菌や大腸菌などを蛍光染色試薬を用いて蛍光ラベルした微生物がシンカイヒバリガイに食作用により取り込まれるかを調べた。また、食作用による食胞成熟が、どのように共生菌の獲得と維持及び有機物

摂取に関与するのかを明らかにするために、飼育により共生菌が消失した個体と採取直後の共生菌を持つ個体を用いて、共生菌が局在する鰓組織の遺伝子発現を解析した。

その分子メカニズムを解明すること

宿主の共生菌が局在する食胞の成熟段階を明らかにするために(図1参照)、RabやM6PRなど食胞成熟に関与する因子や宿主のトランスポーターや有機物シグナル受容因子(mTORC1)など有機



どのように食作用を介して共生菌を獲得・維持するのか? 共生菌が局在する食胞はどの段階か?

図1 食作用の食胞の成熟過程

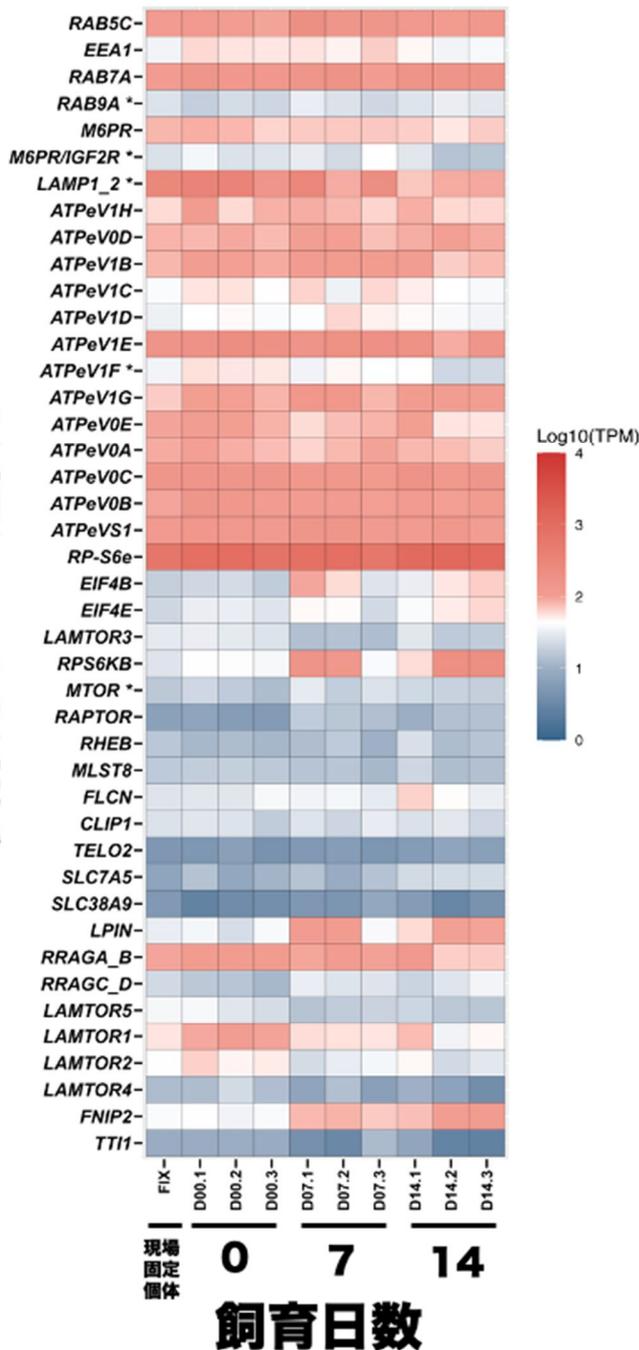
物摂取に関する因子の抗体を用いて、組織切片の抗体染色を行った。

#### 4. 研究成果

シンカイヒバリガイから切り出したエラや個体に、蛍光ラベルした微生物(大腸菌、ビブリオ菌、エラから抽出した共生菌)及び蛍光蛋白質 GFP を発現させた大腸菌を海水に加え、しばらく放置すると、これら微生物は、エラ細胞内に多く局在することがわかった。蛍光及び電子顕微鏡観察などから、食作用により微生物が取り込まれる様子が見られ、細胞内に取り込まれた微生物は食胞に内包され、速やかにリソソームと融合して消化されることがわかった。この現象は、用いた微生物の種類に関係なく、起こっていた。また、エラ細胞で多く食作用が起こっていることを見出した。一方で、エラ細胞内に存在する共生菌は、宿主由来の膜に内包され分解されないで存在することを明らかにした。この結果は、宿主のエラ細胞の食作用により環境中にある共生菌を含む微生物を選択せずに細胞内に取り込み、共生菌以外の微生物は細胞内でリソソームにより分解され、共生菌は、消化されずに細胞内に維持している可能性が見いだされた。そこで遺伝子発現解析データを用いて宿主の食作用などに関する遺伝子の発現を調べた。その結果、Rasスーパーファミリーに属する低分子量 G タンパク質である Rab5、Rab7、Rab9、LAMP1、マンノース 6 リン酸受容体(M6PR)などが比較的高発現していることが明らかとなった。これらの因子は食作用により取り込まれた微生物が存在する小胞に局在している可能性があるので、遺伝子発現解析から得られた配列情報を元に食作用に関する 6 種類の因子に関するペプチド抗体 (Rab9、LAMP1、EEA1、M6PR、V-ATPase、mTORC1)を作成し、その局在を調べた。これら因子は共生菌を含む膜表面に局在していた。また細胞内の栄養や環境状況を感じ取る有機物シグナル受容因子 mTORC1 も局在することがわかった。mTORC1 は細胞内のアミノ酸を検知して活性化しリソソームに局在し、タンパク質合成などを制御していることが知られている。これらの解析結果から、環境中から微生物はその種類を選択されずに食作用によって細胞内に取り込まれ、その後、宿主への栄養供給として有機物を合成し分泌により供給する共生菌は分解されずにエラ細胞内に維持され、宿主は、mTORC1 を介して共生菌からの有機物をセンシングながら、共生菌の維持に関与すると考えられた。

## 飼育による 発現量比較解析

### 食作用などの遺伝子



現場固定個体1個体と  
飼育0日、7日、14日の各3個体の  
食作用に関わる遺伝子の発現パターン

図2 食作用の食胞の成熟過程

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Maeda Taro, Takahashi Shunichi, Yoshida Takao, Shimamura Shigeru, Takaki Yoshihiro, Nagai Yukiko, Toyoda Atsushi, Suzuki Yutaka, Arimoto Asuka, Ishii Hisaki, Satoh Nori, Nishiyama Tomoaki, Hasebe Mitsuyasu, Maruyama Tadashi, Minagawa Jun, Obokata Junichi, Shigenobu Shuji	4. 巻 10
2. 論文標題 Chloroplast acquisition without the gene transfer in kleptoplastic sea slugs, <i>Plakobranthus ocellatus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.60176	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 -
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 1-4
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 -
1. 著者名 Tame Akihiro, Maruyama Tadashi, Yoshida Takao	4. 巻 9
2. 論文標題 Phagocytosis of exogenous bacteria by gill epithelial cells in the deep-sea symbiotic mussel <i>Bathymodiolus japonicus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Royal Society Open Science	6. 最初と最後の頁 211384 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsos.211384	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 -
1. 著者名 Takishita Kiyotaka, Ikuta Tetsuro, Komatsu Miho, Sakaba Norika, Yoshida Takao, Otsubo Mayuko	4. 巻 69
2. 論文標題 Molecular detection of a novel perkinsid associated with the deep sea clam <i>Phreagena okutanii</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Eukaryotic Microbiology	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) 10.1111/jeu.12917	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Sotaro, Somei Kimiko, Asaeda Yuka, Igawa Takeshi, Hattori Keiyu, Yoshida Takao, Sambongi Yoshihiro	4. 巻 200
2. 論文標題 Heterologous expression and biochemical comparison of two homologous SoxX proteins of endosymbiotic Candidatus Vesicomysocius okutanii and free-living Hydrogenovibrio crunogenus from deep-sea environments	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Expression and Purification	6. 最初と最後の頁 106157 - 106164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pep.2022.106157	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoda Kotaro, Takagi Toshiyuki, Koito Tomoko, Okai Masahiko, Makita Hiroko, Mitsunobu Satoshi, Yoshida Takao, Inoue Koji	4. 巻 89
2. 論文標題 Heterologous expression and functional characterization of cysteamine dioxygenase from the deep-sea mussel Bathymodiolus septemdirum	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 387 - 397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-023-01674-w	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0件

〔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
---------	---------