

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19209

研究課題名（和文）海洋性無脊椎動物の体液共生を分子的に理解する：移植実験で迫る共生機能の発動機構

研究課題名（英文）Molecular understanding of symbiosis in coelomic fluids of marine invertebrates: experimental approach for clarifying the symbiotic function.

研究代表者

中川 聡（Nakagawa, Satoshi）

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：70435832

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者らは、海洋性無脊椎動物の体腔液内に細菌が普遍的に生息していることを発見した。本研究では、これらの体腔液特異微生物の独自の生理機能に関する分子機構を解明するため、実験生物学的手法を駆使し、特に体液中の微生物叢、宿主と微生物の遺伝子発現を時系列で解析した。本研究の期間内において、主に様々な飼育条件下でのトランスクリプトーム解析を進め、微生物の生理機能に迫ることができた。また、飼育実験の低死亡率により、長期にわたるサンプル収集に成功し、体液共生系の安定性を検討する貴重なデータを得た。これらに関連する成果は、学会や国際誌で報告している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、以下の3つの点に集約される。まず、動物の体液に特異微生物が棲息し、動物が新たな生理機能を発揮することを明らかにすることで、生物学の常識に挑戦する。また、人類に蔓延する病原菌の誕生と進化過程を理解することで、医学や農学など幅広い分野に影響を有する。さらに、沿岸生態系の中核種への新たな対策を創出し、水産業の持続可能性を支援する。本研究は、海洋性無脊椎動物の免疫機能の起源と進化を探りつつ、人類に蔓延する病原微生物の進化の理解や、海洋資源の持続的利用に大きく貢献する微生物学的研究と位置づけられる。

研究成果の概要（英文）：We have found that unique bacteria, closely related to *H. pylori*, are consistently present in the coelomic fluids of starfish, *Asterias amurensis*. In addition, *Patiria pectinifera* was also found to harbor specific bacteria in their coelomic fluids. This study aimed to uncover the molecular mechanisms and physiological functions of these microbial symbionts using time-series analyses of the microflora and host and microbial gene expression. During FY2022-2023, we primarily conducted transcriptome analyses under various rearing conditions to explore the physiological functions of these bacteria. The low mortality rates in these experiments allowed for extended sample collection, providing valuable data to assess the stability of the symbiosis system. These findings have been presented at scientific conferences and published in international journals.

研究分野：微生物生態学

キーワード：共生

1. 研究開始当初の背景

海洋性無脊椎動物は、海洋に生息する全動物バイオマスの半分以上を占めると見積もられるなど、海洋生態系において極めて重要な役割を担っている。特に我が国の潮間帯に代表される沿岸域は海洋性無脊椎動物の棲息量および多様性が極めて高いが、近年の埋め立て開発や地球温暖化等の影響を受け、内陸の農地や森林・都市の生態系とは比較にならないほど、著しく損なわれている。国家面積あたりの海岸延長（島嶼性）が米国の 1.5 倍、中国の 2 倍以上に達する日本において、次世代に残すべき重要な自然・歴史・文化的資源が急速に失われている状況にある。

海洋には約 10^{29} 細胞もの天文学的な数の微生物が棲息しており、全ての海洋性無脊椎動物は様々な海洋微生物と共生状態にあるといえるが、中には特別な微生物と極めて密接かつ安定的な共生関係を築き、その結果共進化が見られるようなものも知られている。例えば、サンゴや海綿、発光イカの仲間においては、それらに共生する特殊微生物の多様性やゲノムレベルの進化・生理機能・宿主-微生物間相互作用等に関する研究が活発に行われ、共生微生物が宿主の発生や行動に大きな影響を及ぼしたり免疫機能の一部を担ったりすることもあるなど、宿主の生存や生態・進化に極めて重要な役割を有することが明らかとなってきている。また、海洋性無脊椎動物は一般に様々な新規生理活性物質の宝庫として知られるが、近年とくに海綿の研究において様々な有用生理活性物質（抗マラリア活性や抗がん活性を持つ）が発見され、それらが動物本体ではなく共存する微生物により作り出されていることが明らかとなりつつある。これらの研究は、海洋性無脊椎動物と微生物の共生に関する知見を深めることが、宿主・微生物の生理生態や進化の理解につながるだけでなく、共生微生物が産生する二次代謝産物が医療・製薬に应用可能であることから注目されている。さらに、深海底熱水活動域や海底の冷湧水域に見られる化学合成生態系においては、特定の組織に住み着いた共生微生物が宿主のほぼ全栄養を賄うような例も知られ、口や肛門を持たない環形動物や、腹足部に鉄の鱗をまとった巻貝など、世界各地の深海底から 500 種を超える固有の動物種が発見されている。海洋には極めて多様な無脊椎動物が生息し、それらに共生する微生物の種類や役割、宿主との共進化過程も多様であると考えられるが、これまでの研究はサンゴやダンゴイカといったごく一部のモデル生物に集中しており、とりわけ棘皮動物における共生微生物に関する知見は大変少ない状況にある。

研究代表者らは、ヒトデ等の棘皮動物の体液（体腔液すなわち我々の血液とリンパ液を合わせたものに相当する）に、 10^4 細胞/ml を超える特異な細菌が、恒常的かつ普遍的に生息することを見出し、それらの多様性や進化を解析し、その生理機能や進化過程を解明する本研究を着想した。動物の体液は排他的ディフェンス（免疫）の場であり、無菌的と考えるのが常識であり、本研究は動物における体液の役割の再定義を促すものである。また本研究は、これまでの解析対象として典型的であった海洋性無脊椎動物のエラや消化管・発光器ではなく、体液に注目している点でも新規性が高い。また本研究ではヒトの胃癌原因菌として知られるピロリ菌の近縁細菌に注目しており、本微生物を宿主マヒトデは北海道だけで年間 1,500 トン以上廃棄され、ホタテや北寄貝を食い荒らす“海のギャング”として知られており、これらの生理生態学的性状の解明は喫緊の課題である。マヒトデの体液に見出したピロリ菌近縁種は他の環境に報告例がなく、宿主体外で培養できないが、抗生物質感受性があり体液中の優占度が高いため、体液を希釈・サイズ分画して純化し、抗生物質で除菌後の宿主へ戻す移植実験が可能である。

我々はこれまでの研究において、マヒトデの体腔液微生物を対象とするメタゲノム解析、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析といったマルチオミクス解析を実施し、マヒトデの体腔液に特徴的に生息する微生物の系統・量・ゲノム中に存在する遺伝子のレパートリー・発現遺伝子のプロファイル等に関する知見を得ることに成功してきた。加えて、それら微生物が宿主の環境ストレス耐性において重要な役割を担っていることが示唆されたため、抗生物質による共生微生物のクリアランスや微生物移植実験を通じて、その役割を多元的に解析してきた。本研究はそれらの過程で確立してきた移植実験の技術を用いて、様々な飼育環境において、共生微生物を異宿主に移植することで構築できる「長続きしない人為的共生系」における発現遺伝子や微生物の挙動を、天然の共生系や本来の宿主と共生微生物を組み合わせた自然的共生系と比較することにより、“海洋性無脊椎動物の体液になぜ特異な微生物が棲み着くのか”という問いに答えようとするものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マヒトデおよびイトマキヒトデの体腔液に棲息する特異な未知微生物を対象として、それらの生態や生理機能を明らかとすることである（すなわち本研究は従来の腸内細菌や他の細胞外および細胞内共生微生物の研究とは根本的に異なる新規性を有している）。具体的には、抗生物質による微生物の除去や体腔液微生物の濃縮・宿主細胞の選択的除去等の技術を駆使し、自然状態および細菌移植後のマヒトデおよびイトマキヒトデにおいて、体腔液内の微生物群集構造、宿主と微生物の遺伝子発現、代謝物質を時系列で総合的に分析し、それらを通じて研究目的を達成する。なお、対象がヒトデの理由は、これまでの予備実験において(a)人間に

癌を引き起こすピロリ菌の近縁種が体腔液中に豊富に存在すること、(b) 当該微生物を欠く個体は高温に対する耐性が低いことが判明し、(c) 飼育や捕獲が容易で、世界中で漁業への被害が大きいことが挙げられる。

3. 研究の方法

2022年の8月に北海道の道東においてマヒトデおよびイトマキヒトデを採取し(図1)、生きたまま迅速に研究室へ持ち帰って様々な条件下で飼育実験を実施した。具体的には、抗生物質を使用して各ヒトデの体腔液や体表等に棲息する共生微生物をクリアランスし(その過程は蛍光顕微鏡観察で確認している)様々な共生微生物の移植および環境ストレスの有無を組み合わせた(なお環境ストレスとして、これまでに行ってきた研究20K21447と継続性をもたせるため、同様の手法により、また特に近年の海洋で顕著な温度ストレスに着目した)。水槽で飼育中の個体を形態により識別し、個体に対する負担を最小限に抑えるため、注射針を用いて体腔液を時系列で採取し、蛍光顕微鏡で微生物量の変化を観察し、宿主の死亡率や行動(摂餌量を含む)に基づいて代表試料を選定した。選定した試料の体腔液において微生物の群集構造と多様性を解明するため、複数回にわたる遠心分離を行うことで微生物濃縮画分を調製し、そこから抽出したゲノムDNAを用いて16S rRNA遺伝子を対象とするアンプリコン解析を行った。本解析は、原核生物のユニバーサルプライマーで得られたPCR産物をイルミナ社の次世代シーケンサーMiSeqを用いてディープシーケンシングすることにより実施した。アンプリコン解析の結果に基づき、特徴的な体腔液微生物叢を示した代表試料を選抜し、それらの発現遺伝子の網羅的解析(トランスクリプトーム解析)を実施した。抽出したトータルRNAからrRNAを除去し、ポリTカラムを使用して宿主と微生物のRNAを分画した後、次世代シーケンサーで配列決定を行った(受託分析)。



図1. サンプルングの様子

4. 研究成果

2022年の8月に北海道道東にて採取したマヒトデおよびイトマキヒトデを用いて、予定していたすべての条件下で飼育実験を行うことに成功した。飼育期間中は、注射針を用いて体腔液を経時的に個体ごとに採取し、微生物の群集構造や量の変化、さらにはそれらの発現遺伝子、宿主の死亡率・行動(摂餌量を含む)などの重要な知見を得ることができた。2021年度に行った研究において、マヒトデが環境ストレスによって自切する場合があることを確認していた。この自切行動が発生すると、水槽の水質が急激に悪化し、他の個体も連続して自切し、実験系の目的が達成できない可能性があった。そのため、本研究では水槽にカメラを設置し、常時監視することで自切を示す個体(図2)を迅速に除去し、すべての実験を無事に完遂することができた(図3)。



図2. 自切個体の様子

予定通り、様々な飼育条件下での体腔液特異微生物の発現遺伝子のデータ解析(トランスクリプトーム解析)を主に進めた。マヒトデだけでなく、イトマキヒトデの共生微生物もターゲットとし、異なる温度や除菌操作、共生微生物の入れ替えの有無など多様な条件下でトランスクリプトーム解析を実施し、各体腔液微

生物の生理機能についての理解を深めた。飼育実験における宿主の死亡率が低かったことから、現在も飼育を継続しており、当初想定していたより長期間の時系列試料を採取することにも成功しており、体液共生系の安定性を検討するうえで貴重な試料を得ることができたと考えている。



図 3. 飼育実験の様子

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 Igisu Motoko, Miyazaki Masayuki, Sakai Sanae, Nakagawa Satoshi, Sakai Hiroyuki D., Takai Ken	4. 巻 38
2. 論文標題 Domain-level Identification of Single Prokaryotic Cells by Optical Photothermal Infrared Spectroscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	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） 10.1264/j sme2.ME23052	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 0件）

1. 発表者名 河野圭丞
2. 発表標題 潮間帯に生息するクモヒトデの体内に宿る特異微生物の多様性および生理機能
3. 学会等名 第36回日本微生物生態学会大会
4. 発表年 2023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
---------	---------