

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657058

研究課題名(和文) 極限還元環境における化学認識機構の進化多様性に関する研究

研究課題名(英文) Evolutionary sensory biology of deep-sea animals adapted into extreme environments.

研究代表者

滋野 修一 (SHIGENO, Shuichi)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋生物多様性研究分野・技術研究員

研究者番号：90360560

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)：熱水噴出域適応動物種の感覚能力の解明を試みた。高温耐性種の感覚細胞タイプ、入力経路、グリア細胞の支持構造が同定された。化学物質に対する応答実験では、過酸化水素について比較種よりも十倍の高感度で嫌悪性を示し、抗酸化ストレス効果をもつリナロールに対する強い嗜好性が明らかになった。また多種のRNA配列の解読により、各種感覚、熱、痛み、環境ストレスなどに関わる遺伝子の配列情報を得、特に恒常性維持に重要なTRPチャンネル遺伝子の特異構造を得た。これらの結果は熱水優占種の感知能力の特徴として、酸化ストレスや恒常性維持に関わる特化した外界感知能力および神経系を進化させたものと考察された。

研究成果の概要(英文)：The deep-sea hydrothermal vent endemic animals display an exceptional tolerance to high temperatures and the toxicity of acidic and reducing fluids. By examining vent endemic animals, we identified the epidermal ciliated sensory cell types, specialized glial supportive cells, and their sensory inputs unlikely derived from the dorsal head regions. Additionally, in our chemical stimulation experiments, we found that the worms particularly respond against hydrogen peroxide. Furthermore, we conducted comprehensive RNAseq analyses to identify receptors or channels related genes. Our evidence provides insight into the cellular and system-wide adaptive structure used to sense, process, and combat the deep-sea hydrothermal vent environments.

研究分野：進化形態学、分子神経学

キーワード：熱水動物 神経系 進化

1. 研究開始当初の背景

深海熱水噴出孔周辺域には通常の化学組成と大きく異なる海洋環境が存在する。高温高压下で鉱物や元素成分が溶解し、溶存ガスは飽和濃度以上に含まれ、一般的に pH が低く酸性で還元性物質に富む。有毒な硫化水素などが高濃度で溶存しており、二酸化酸素や水素を含む貧酸素状態でかつアンモニウム、鉄イオンなどが豊富に含まれる。このような限定された環境下に特異的に適応した動物群は、特殊な感覚システム、特に還元物センサに依存した生態系を構築していることが十分期待された。

2. 研究の目的

近年、分子レベルでの嗅覚・味覚などの化学受容研究の急速な進展から、人間を含む限られたモデル生物においてセンシング能力が研究されてきた。生命系における環境認知能力の原型、多様性およびその限界を理解するためには、これまで研究例がほとんどない海洋極限環境下に特異的に適応した生命に注目する必要がある。本研究では、特に熱水固有の動物種に注目し、その組織、細胞、RNA の構造および配列を網羅的に精査することを目的とした。また感覚特性を理解するために化学物質各種に対する応答様式を調べた。さらに、化学受容遺伝子を網羅的に単離して、その特性解明を目的とした。

3. 研究の方法

無人潜水艇 (Hyper Dolphin など) を用いて伊豆小笠原海域または沖縄トラフの熱水噴出孔 (水深 1500m 程度) の深海熱水優占種を多様な系統および環境耐性能力を考慮して採取した。多くの種は船上で下記の研究のための標本作製し、飼育が困難なものは船上で化学刺激実験を行った。

(1) 電子顕微鏡や共焦点顕微鏡などを使用し、その感覚子の細胞タイプ、神経回路、脳の嗅覚系球体を特異マーカーを用いて構造特性を明らかにした。特に熱水最近傍に生息するマリアナイトエラゴカイでは、ほぼすべての上皮性繊毛型の感覚細胞を走査型顕微鏡と共焦点顕微鏡を用いて同定した。

(2) 化学物質でパルス刺激し、その反応応答を類型化する。また分子生物学的解析では、深海熱水域固有種 10 種を選択し、次世代シーケンサーを用いて網羅的に嗅覚・味覚受容体関連遺伝子を単離した。配列から分子系統樹を作成し、他の受容体との近縁性を知ることによりリガンドの候補を挙げ、選択された受容体遺伝子のアミノ酸配列を決定した。

(3) 受容体の遺伝子を単離するために近年急速に安価、高速、大量に配列情報が入手可能になった RNA シーケンス解析を行った。当初

の予定ではマイクロアレイを用いた遺伝子単離を考えていたが、短い断片しか得られないこと、特定の受容体のみ特異的な配列しか得られないなどの欠点から、近年急速に安価になった RNA シーケンスの手法の方を優先的に用いた。

4. 研究成果

(1) レセプタ細胞の構造特性と入力経路、および脳構造の解析。

熱水適応種 5 種の感覚系を調べ、特に高温耐性を持つマリアナイトエラゴカイにおいて上皮性繊毛型の感覚子をすべて同定し、沿岸の近年種と比較した際に特殊な頭部の感覚入力経路が存在することが分かった (図 1)。また、これまでに知られていないグリア細胞からなる多重の膜構造を同定し、中枢神経系の細胞体を覆っていることを同定した (図 1)。特殊なレセプタ細胞は同定されなかったが、どの感覚細胞体もミトコンドリアに富み、未同定の顆粒を多く含む細胞であることが分かった。

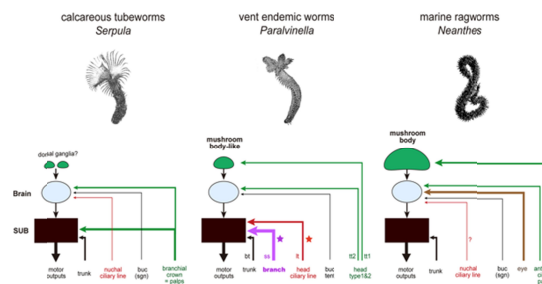


図 1. 近縁沿岸種にはないマリアナイトエラゴカイの特殊な感覚入力経路を星印で示す (Shigeno et al. 2014) .

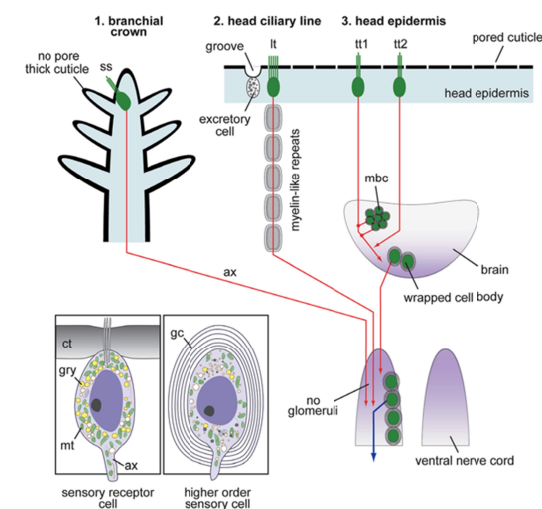


図 2. マリアナイトエラゴカイの感覚入力経路と特異な保護構造 (Shigeno et al. 2014) .

(2) 化学物質に対する行動様式。

アミン類、酸類、腐臭であるチオール類など合計 35 種の化学物質に対する応答実験では、活性酸素である過酸化水素について沿岸性の比較種よりも十倍の高感度で嫌悪性があることを示唆する結果を得た(図 3, 4)。一方、ビタミン E 様の構造を持ち、抗酸化ストレス効果をもつリナロールに対する強い嗜好性が明らかになった。ビタミン様の匂い物質の熱水現場海域からの起源は不明だが、いずれの場合でも抗酸化に関わる匂い物質に対して高感度の応答、もしくは嗜好性を持つことが判明した。

FAMILY	Chemical name	Odor type	dilution		
			1 mM	10 ⁻² mM	10 ⁻⁴ mM
AMINES	ammonium hydroxide	ammonia odor	like	like	no res.
	trimethylamine	rotten fish-like	dislike	dislike	no res.
ACIDS	acetic acid	strong pungent odor	dislike	dislike	no res.
	lactic acid	strong pungent odor	dislike	dislike	no res.
	hydrochloric acid	strong pungent odor	dislike	dislike	no res.
	formic acid	strong pungent odor	dislike	dislike	no res.
	butyric acid	strong pungent odor	dislike	dislike	no res.
TERPENE	terpinolene	cardamom fragrance	like	like	no res.
ALDEHYDE	alpha-pinene	woody fragrance	like	like	no res.
	linalool	floral fragrance	like	like	no res.
KETONE	valeraldehyde	strong pungent	dislike	dislike	no res.
	2-nonenal	human aging greasy odor	dislike	dislike	no res.
ALCOHOLS	2-heptanone	fruity odor	like	like	no res.
	acetoin		like	like	no res.
AROMATICS	methanol	etheral odor	like	like	no res.
	ethanol	etheral odor	like	like	no res.
	hexanol	etheral odor	like	like	no res.
	ethanolamine	etheral odor	like	like	no res.
SULFUR THIOL	methyl salicylate	mint or wintergreen oil	like	like	no res.
	ethyl benzoate	mint or wintergreen oil	like	like	no res.
OTHERS	dimethyl sulfide	'smell of the sea', cabbage-like	dislike	dislike	no res.
	methanethiol	putrid smell in animal feces	dislike	dislike	no res.
	ethanethiol	onion-like putrid smell	dislike	dislike	no res.
	capsaicin	chili pepper	dislike	dislike	no res.
	menthol	peppermint	like	like	no res.
	S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine	NO generator	like	like	no res.
	2-mercaptoethanol	biological antioxidant	like	like	no res.
	sodium hydrosulfide hydrate	H ₂ S generator	dislike	dislike	no res.
	hydrogen peroxide	reactive oxygen species	dislike	dislike	no res.
	t-butyl hydroperoxide	organic peroxide	dislike	dislike	no res.
	urea	nitrogen excretion	like	like	no res.
	hexane (petroleum)	oil, dry woody	like	like	no res.
	sodium glutamate	'umami'	like	like	no res.
	D(+)-glucose	'sweet'	like	like	no res.

図 3. 多種の化学物質とマリアナイトエラゴカイの応答。活性酸素である過酸化水素水に忌避行動を示し、ビタミンであるリナロールに嗜好行動を示す (Shigeno et al. 2014)。

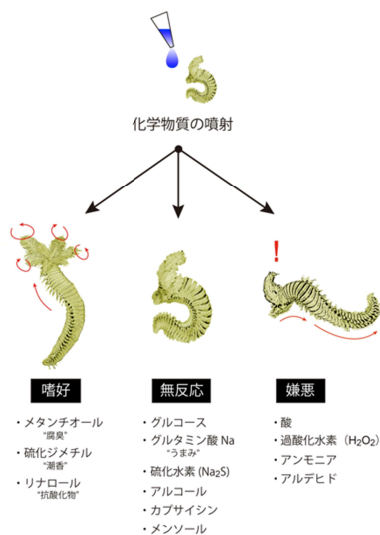


図 4. 化学刺激実験の模式図と応答様式の要約。

(3) 網羅的な化学受容関連遺伝子の単離。

今回が初めての試みとなる多様な熱水動物を対象とした網羅的な転写物すなわち RNA 配列の解読により、各動物種 80-200 億塩基対の配列情報を得た結果、視覚、嗅覚、味覚、熱、痛み、環境ストレス応答などに関わる相同遺伝子の配列情報を得ることに成功した。

その内、特に酸化還元、酸化ストレス、硫化水素、重金属、熱、痛み応答などの恒常性に重要な TRP チャンネル遺伝子ファミリーのアミノ酸配列、イオン感受性受容体、また酸化ストレス応答関連遺伝子の特異構造を得た。その推定アミノ酸を既知の脊椎動物などの配列と比較し、アミノ酸部位の保存領域および変異コドンを同定した。クラスター解析から、沿岸性種の相同物との類似性が得られたが、アミノ酸配列から、他の受容体構造とは異なる配列を得たがその機能特性の解明は次回の課題として残された。

最終的に上記の刺激応答実験などの見解を踏まえると、熱水優占種の感知能力の特長として、酸化ストレスや恒常性維持に関わる特化した外界感知能力および神経系経路および保護構造を進化させたものと考察された。今後は、酸化ストレス応答の特異性の解明、受容体のタンパク構造などの詳細な解析などから、高感度性のセンサーに特異な配列の同定、また、近年は RNA 自体のバリエーション形成と多様性が生み出されることによる感度増強性や機能多様化が起こっていることが知られていることから、RNA 配列およびの多様性をもう少し詳細に同定することにより、熱水動物に特異な化学受容能力が判明すると考えている。

5. 主な発表論文等 (雑誌論文)(計 2 件)

- (1) Shigeno S., Tame A., Uematsu K., Miura T., Tsuchida S., Fujikura K. Dual cellular supporters: multi-layer glial wrapping and penetrative matrix specialized in the deep-sea hydrothermal vent endemic scale-worms. *Biological Bulletin*. 査読有, 2015, in press.
- (2) Shigeno S., Ogura A., Mori T., Toyohara H., Yoshida T., Tsuchida S., Fujikura K. Sensing deep extreme environments: the receptor cell types, brain centers, and multi-layer neural packaging of hydrothermal vent endemic worms. *Frontiers in Zoology*, 査読有, 11:e82. doi:10.1186/s12983-014-0082-9. 2014.

〔学会発表〕(計9件)

- (1) Shigeno S., Clark M.R., Schnabel K., Yamamoto M., Tsuchida S., Fujikura K. A hydrothermal vent fish reveals unique brain organization and adaptation to the extreme environment. 14th DSBS, Deep-Sea Biology Symposium, Aveiro, Portugal, 2015 Sep 4th.
- (2) 荻野哲也, 滋野修一, 前川真吾, 西村大希, 小倉淳, 藤倉克則, 豊原治彦. 熱水噴出孔適応動物から探る新規バイオセンサー. 第17回マリンバイオテクノロジー学会大会. 東京海洋大学, 東京都港区, 2015年5月31日.
- (3) 荻野哲也, 前川真吾, 滋野修一, 藤倉克則, 小倉淳, 豊原治彦. 熱水噴出域の極限環境適応種から探る化学センシングとその分子基盤. アクアゲノムシンポジウム. 東京海洋大学, 東京都港区, 2015年5月30日.
- (4) 滋野修一, Clark M., Rowden A.A., Schnabe K., Boschen R., 山本正浩, 土田真二, 藤倉克則. 北部ケルマディック島弧の熱水性魚類から同定された新規の恒常性維持システム 極限環境適応に注目した医生物学モデルの開拓にむけて. ブルーアースシンポジウム. 東京海洋大学, 東京都港区, 2015年3月19日.
- (5) 荻野哲也, 前川真吾, 滋野修一, 藤倉克則, 豊原治彦. 熱水噴出孔最近傍に生息するマリアナイトエラゴカイの化学刺激感知機構に関する研究. ブルーアースシンポジウム. 東京海洋大学, 東京都港区, 2015年3月19日.
- (6) 滋野修一, 土田真二, 藤倉克則. 熱水極限環境に適応した深海動物の感覚系と脳の特異構造, 日本進化学会ワークショップ, 高槻現代劇場, 大阪府高槻市, 2014年8月24日.
- (7) Shigeno S., Ogura A., Yoshida M., Mori T., Toyohara H., Yoshida T., Tsuchida S., Fujikura K. The unusual brains in deep-sea hydrothermal vent environment: the neural tracts and multi-layer cellular packaging of the alvinellid worms, International Congress of Neuroethology/JSCP, Sapporo, Japan (2014), July 31th.
- (8) Shigeno S., Ogura A., Tsuchida S., Fujikura K. Sensing extreme environment: the diverse chemical receptors identified by comprehensive RNAseq analysis of

hydrothermal vent endemic animals. In 5th International Symposium on Chemosynthesis-Based Ecosystems. Victoria, Canada, (2013) Aug 20th.

- (9) 滋野修一, 小倉淳, 森 司, 豊原治彦, 前川真吾, 細井公富, 吉田真明, 植松勝之, 多米晃裕, 土田真二, 平岡礼鳥, 鶴若祐介, 吉田尊雄, 藤倉克則. 熱水適応種における環境センシング 網羅的RNAseq 解析と生体センサ素子の提供, ブルーアースシンポジウム. 東京海洋大学, 東京都港区, 2013年3月14日.

〔図書〕(計1件)

- (1) 滋野修一 (2015) 深海の熱水噴出孔に適応した動物の化学受容実験, In 研究者が教える動物実験, 第一巻, 感覚, 日本比較生理生化学会編, 共立出版. 印刷中.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滋野 修一 (SHIGENO, Shuichi)
独立行政法人海洋研究開発機構・
海洋生物多様性研究分野・技術研究員
研究者番号: 90360560

(2) 研究分担者

小倉 淳 (OGURA, Atsushi)
長浜バイオ大学・コンピュータバイオサイ
エンス学科・准教授
研究者番号: 60465929

(3) 連携研究者

神崎 亮平 (KANZAKI, Ryohei)
東京大学・先端科学技術研究センター・
教授
研究者番号: 40221907