

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658187

研究課題名(和文) 深海性二枚貝類の生存戦略 - 硫化水素応答機構の解明 -

研究課題名(英文) Survival strategy of deep-sea mussel

研究代表者

小糸 智子 (KOITO, Tomoko)

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：10583148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：深海熱水噴出域に生息し、鰓に硫黄酸化細菌を共生させているシチヨウシンカイヒバリガイが共生菌から有機物を得るためには有毒な硫化水素に曝露されなければならない。本研究では、本種が環境中の硫化水素を認識しているか明らかにするため、硫化物曝露飼育を行ない、セロトニン受容体遺伝子の定量および心電図の導出を行なった。その結果、硫化物曝露条件下ではセロトニン受容体mRNAおよび心拍数が経時的に減少する傾向がみられたことから、シチヨウシンカイヒバリガイが環境中の硫化物に対して応答していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Deep-sea hydrothermal vent specific mussel, *Bathymodiolus septemdierum* is known to house thioautotrophic symbiont in their gills. They must be exposed to hydrogen sulfide because they rely on the nutrients produced by symbionts. We tried to reveal the response mechanism to hydrogen sulfide in the mussel. We reared *B. septemdierum* in gradually sulfide-added condition for 24 hours and then quantified the expression level of serotonin receptor mRNA using real-time PCR method. Moreover, we derived heart rate of mussels during sulfide-added rearing. The results showed that the expression level of serotonin receptor mRNA and heart rate decreased with time. Thus, we found that *B. septemdierum* could recognize and response to ambient sulfide.

研究分野：分子生物学

キーワード：シンカイヒバリガイ類 セロトニン

1. 研究開始当初の背景

深海熱水噴出域や冷水湧出域は他の深海底に比べ、非常に高濃度の硫化水素が存在することが知られている一方、化学合成生態系が存在する。この生態系は、硫化水素やメタンを代謝する化学合成細菌が一次生産者のような役割を担っており、二枚貝類、環形動物、甲殻類などの無脊椎動物はこの化学合成細菌が産生する有機物を直接摂食、もしくは体外、体内に共生させることで生存していることが明らかにされている。すなわち、深海熱水噴出域や冷水湧出域に生息し、体内に共生菌を保有する生物にとって硫化水素は多量に存在すると有毒であるが、体内に共生する細菌に供給しなければ有機物を得ることも、共生菌を維持することもできないというジレンマが生じていることになる。しかしながら、宿主となる生物が環境中の硫化水素濃度を認識し、体内に取り込む量を調節できるのか、また硫化水素の濃淡によって移動などを行っているのかは明らかにされていない。

本研究では、宿主となる生物が環境中の硫化水素を認識しているかを明らかにするための指標として、セロトニンに着目した。なぜなら、セロトニンをはじめとするカテコールアミン類は二枚貝類において繊毛運動、閉殻筋運動、足糸牽引筋運動、心臓の働きに関与することが知られているため、硫化水素に反応して何らかの生理的反応が生じる際にセロトニンが増減する可能性があるためである。さらに、既往研究よりカキでは飼育水の攪拌によるストレスを与えるとカテコールアミン量が増減すること、ヨーロッパイガイでは飼育水の温度を上下させるとセロトニン量が増減することが明らかにされている。したがって、セロトニンをはじめとするカテコールアミン類は環境変化やストレスの指標になると考えた。

予備実験として、熱水噴出域に生息する二枚貝類であるシチヨウシンカイヒバリガイ (*Bathymodiolus septemdierum*) を用いて採集直後の鰓、足、採集後 100 日間海水で飼育した鰓組織のメタボローム解析を実施した。その結果、採集直後の足からセロトニンが検出されたが、採集直後および 100 日後の鰓からはほとんど検出されなかった。一方、ドーパミンは足ではほとんど検出されなかったものの、鰓からは検出されており、量的には 100 日後の鰓から多く検出された。これらのことから鰓と足ではセロトニンとドーパミンが拮抗していることが推測でき、組織間で異なる応答を示す可能性が考えられた。しかしながら、海洋無脊椎動物組織中のカテコールアミン量を定量している例は少ないことから、組織中のセロトニン量の直接定量を試みるとともにセロトニン受容体遺伝子を定量することによりセロトニンの動態を明らかにすることとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、環境中の硫化水素の有無を深海性二枚貝類が認識できるかを明らかにすることである。そのために (1) セロトニン受容体遺伝子の単離と発現定量および硫化物添加飼育実験 (2) 心電図の導出、(3) カテコールアミン類の直接定量を実施した。また、浅海性二枚貝類であるムラサキイガイと比較することにより、浅海から深海まで普遍的な応答様式であるのか検討した。二枚貝類は貝殻内を非破壊的に観察することが困難であるため、心拍数の変化から応答の迅速さを調べることにした。

研究対象はシチヨウシンカイヒバリガイとした。本種は伊豆小笠原海域の熱水噴出域固有種であり、鰓に硫黄酸化細菌を共生させるイガイ科の二枚貝類である。本種は採集後、陸上水槽でも長期飼育が可能であるためモデル生物として有効である。

3. 研究の方法

(1) セロトニン受容体の単離と遺伝子発現定量および硫化物添加飼育実験

シチヨウシンカイヒバリガイは、海洋研究開発機構の海洋調査船『なつしま』研究航海 NT11-09、NT13-05 において、伊豆・小笠原海域明神海丘から採集した。比較に用いたムラサキイガイは広島県から養殖個体を購入した。両種の鰓から RNA を抽出し、cDNA クローニングを行なった。cDNA クローニングで使用したプライマーは EMBL/DDBJ/GenBank に登録されている無脊椎動物のセロトニンレセプター配列をアライメントし、保存的領域に設計した (Bs receptor Fw: ATTTTCGTTGGATCGGTTCTG、Bs receptor Rev: TGTTCACAGTCCCGTTAAGC)。シチヨウシンカイヒバリガイとムラサキイガイから得られた配列の保存領域に TaqMan プローブを設計した。

飼育実験は、10L 水槽に 15 個体のシチヨウシンカイヒバリガイもしくはムラサキイガイを入れ、ポンプにより毎時 5ml の硫化ナトリウム溶液 (25mg/ml) を添加した。硫化水素曝気は危険であるため、硫化ナトリウム九水和物を代替として使用した。対照実験として海水を添加し、24 時間、48 時間後に 6 個体ずつ解剖した。解剖した個体の鰓から抽出した RNA を用いて cDNA を合成したのちリアルタイム PCR を行ない、セロトニン受容体遺伝子を定量した。

(2) 心電図の導出

(1) の飼育条件下で貝に双極電極を装着し、電位変化を生体電気アンプで増幅したのちに、PowerLab にて AD 変換したものを心電図として導出した。電位変化に表れる R 波と次の R 波までの間隔 (R-R 間隔) を心臓の拍動 1 回とカウントし、1 分間当たりの拍動数を心拍数として算出し、各条件下で比較した。

(3) カテコールアミン類の直接定量

重量を量った鰓、足、外套膜組織（いずれも採集直後の個体）に 0.1N 過塩素酸とイソプロテレノール塩酸塩を添加し、ホモジナイズした上澄を精製し、HPLC-ECD により定量した。その際、組織サンプルに標準物質を添加することによりノルアドレナリン（NA）、アドレナリン（AD）、セロトニン（5HT）、5HIAA、ドーパミン（DA）、DOPAC、ホモバニリン（HVA）を添加することによりピークの特定を行なった。

4. 研究成果

(1) セロトニン受容体遺伝子の単離と遺伝子発現定量および硫化物添加飼育実験

両種の鰓から約 500 塩基のセロトニン受容体 cDNA を得た。シチヨウシンカイヒバリガイとムラサキガイのセロトニン受容体遺伝子の相同性は高く、演繹すると 2 残基の置換がみられた。また、得られた配列と EMBL/DDBJ/GenBank に登録されているセロトニン受容体遺伝子の配列を用いて近隣結合法による系統解析を行なったところ、二枚貝類と腹足類は相同性が高く、これらはヒトの 5-HT₁ サブファミリーと姉妹群を形成した。このことから、受容体の機能も類似している可能性が示唆されたが、腹足類であるアメフラシからは 3 つのサブタイプが単離されているため、シンカイヒバリガイ類についても発現部位や機能の異なるサブタイプが存在する可能性がある。

リアルタイム PCR の結果、両種とも硫化物添加条件ではセロトニン受容体 mRNA が経時的に減少する傾向がみられた。

(2) 心電図の導出

シチヨウシンカイヒバリガイとムラサキガイに電極を装着し、両種から心電図を導出することに成功した（図 1）。心電図の解析結果において、シチヨウシンカイヒバリガイの心拍数（4.35 回/分）は硫化物添加により 6 時間までの間心拍数が減少し（3.73 回/分）、その後増加する傾向がみられた（図 2）。ムラサキガイの心拍数（33.0 回/分）は硫化物添加後 3 時間までの間増加し、徐々に低下した（図 2）。

(3) カテコールアミン類の直接定量

鰓、足、外套膜いずれの組織中からもカテコールアミン類が検出された。ムラサキガイ外套膜は全てのカテコールアミンが最も多く含まれており、特に AD が多かった。この傾向はシチヨウシンカイヒバリガイも同様であった。無脊椎動物はオクトパミンが多量に存在することが知られているが、本研究では両種ともにほぼ検出されなかった。

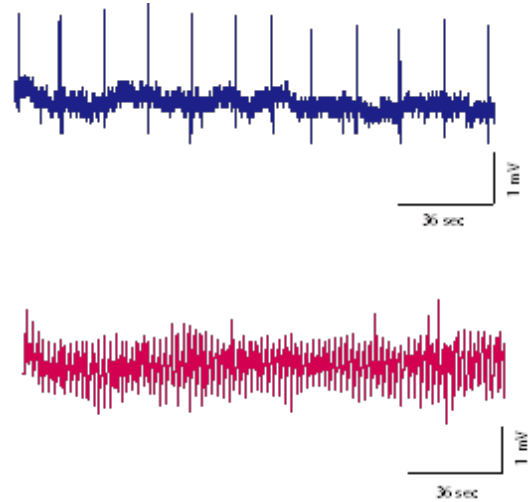


図 1.シチヨウシンカイヒバリガイ（上）とムラサキガイ（下）の心電図

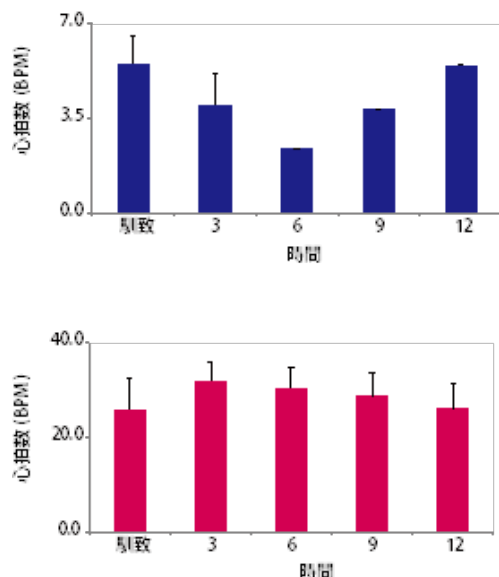


図 2.シチヨウシンカイヒバリガイ（上）とムラサキガイ（下）の心拍数の経時的変化

シチヨウシンカイヒバリガイとムラサキガイを比較すると、シチヨウシンカイヒバリガイは全組織において DOPAC、5HIAA が著しく少ないことが明らかとなった。また、NA はシチヨウシンカイヒバリガイ鰓で多く、足で少ないのに比べ、ムラサキガイは鰓で少なく足に多い傾向がみられた。2 種に共通した傾向として、DA は鰓に多く足に少ないこと、5HT が鰓に少なく足に多いことが挙げられる。得られた結果からシチヨウシンカイヒバリガイは DA として組織中に保持し、DOPAC、HVA へあまり代謝しないことが考えられた。また、2 種は 5HT から 5HIAA への代謝をあまり行っていない可能性が示唆された。二枚貝類は脳神経節、内臓神経節、足神経節が存在するが、各神経節で異なる制御をしている可能性が示唆された。詳細を明らかにするため、今後も継続して分析する予

定である。

以上(1)-(3)の結果を総合すると、両種とも環境中の硫化物に対して応答することが明らかとなり、セロトニンはその指標物質となりうることが示唆された。さらにこの硫化物への応答は浅海から深海まで普遍的であり、同じ機構であることも示唆された。シチヨウシンカイヒバリガイ、ムラサキイガイに共通して心拍数が硫化物存在下では低下すること、鰐でセロトニン受容体遺伝子の発現調節を行なっていることからセロトニン量を増減させることで応答している可能性が考えられる。しかしながら、鰐ではドーパミンが多いことを鑑みると今後はドーパミン輸送体遺伝子の動態も併せて解析する必要があると考えられる。さらに直接定量ではカテコールアミン類の量が組織間で異なっていたことから、組織単位で環境変化やストレスに応答している可能性がある。したがって、今後は応答組織の特定を行ないたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

小糸智子・牧口祐也・井上広滋、深海性二枚貝類のセロトニン受容体遺伝子の発現動態、平成 25 年度日本水産学会秋季大会、2013 年 9 月 20 日、三重大学(三重県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小糸 智子 (KOITO, Tomoko)
日本大学・生物資源科学部・助教
研究者番号：10583148

(2) 研究分担者

牧口 祐也 (MAKIGUCHI, Yuya)
日本大学・生物資源科学部・助教
研究者番号：00584153

(3) 連携研究者

()

研究者番号：