

平成30年6月18日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05605

研究課題名(和文) 新規な共生関係が可能にした動物の深海極限環境進出

研究課題名(英文) Evolution of a novel symbiosis underlying the deep-sea adaptation of invertebrates.

研究代表者

宮本 教生 (MIYAMOTO, Norio)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・研究員

研究者番号：20612237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,500,000円

研究成果の概要(和文)：深海底に沈んだ脊椎動物の骨にのみ生息するホネクイハナムシとその共生細菌をモデルとして、生物が新たな環境へと進出する過程で生じた進化について研究を進めた。ホネクイハナムシが骨を消化吸収する際には、ホネクイハナムシの系統で多様化した消化酵素を根の表皮から分泌することで、骨に含まれているコラーゲンを分解することが明らかとなった。さらに他の動物では消化管で働く栄養吸収に関わる遺伝子が、根の表皮で働くことで消化酵素によって分解された栄養素を吸収している可能性が示唆された。さらにアミノ酸生成経路などはホネクイハナムシと共生細菌で相補的になっており、互いに不足する栄養を補い合っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bone-eating worms of the genus *Osedax* (Annelida, Siboglinidae) have adapted to whale fall environments by acquiring a novel characteristic called the root, which branches and penetrates into sunken bones. We compared transcriptomes from different RNA samples of *Osedax japonicus*. Through targeted gene annotation we found gene family expansions resulting in a remarkably large number of matrix metalloproteinase (mmp) genes in the *Osedax* compared with other invertebrates. These *Osedax* mmp genes were expressed in the root epidermal cells. Genes encoding various types of transporters, including amino acid, oligopeptide, bicarbonate, and sulfate/carboxylate transporters, were also expressed in root epidermal cells. In addition, amino acid and other metabolite transporter genes were expressed in bacteriocytes. These protease and transporter genes were first expressed in root tissues at the juvenile stage, when the root starts to develop.

研究分野：進化生物学

キーワード：共生 深海 細菌 ゲノム トランスクリプトーム ホネクイハナムシ

1. 研究開始当初の背景

生命は地球上の様々な環境に進出しており、その過程を解明することは進化生物における重要な課題である。共生により複数の生物が1つのシステムとなり、まったく新しい機能を獲得することは、生命が新たな環境へと適応するための重要なステップの一つである。深海は浅海に比べ栄養に乏しく、低温や暗黒といった条件もあり、多くの生物にとって生育に適さない環境である。しかし、そのような環境にも進出している生物は存在している。そして深海底の熱水噴出域や湧水域、鯨骨群集においては、無脊椎動物が細菌と共生することにより、それら特異な環境に適応していることが知られている。このような深海における無脊椎動物と細菌との共生とその進化を理解することは、地球における生命進化の過程と進化可能性を理解する上で重要なことであるが、採集や飼育が困難であることなどから、研究事例は乏しかった。

ホネクイハナムシは2004年に発見された環形動物多毛類で、脊椎動物の骨にのみ生息し、口や消化管などを完全に欠いている。ホネクイハナムシは鯨の骨に張り巡らせている樹根状栄養体部の働きによって、鯨の骨を消化し、その中に含まれる栄養を吸収していると考えられている。また樹根状栄養体部の内部には従属栄養細菌が細胞内共生しており、栄養代謝において重要な役割を担っていると考えられている。つまりホネクイハナムシは、細菌と新たな共生関係を成立させるとともに、樹根状栄養体部という新奇形質を獲得したことにより、脊椎動物の骨という他の生物がほとんど利用できない資源に進出したのである。我々は新規な環境へ生物が進出する過程の研究モデルとしてホネクイハナムシの研究を推進してきた。そしてホネクイハナムシの一種 *Osedax japonicus* とその共生細菌2種 *Neptunomonas japonica* と *Amphritea japonica* を用いて、その飼育方法や共生細菌の感染方法などの実験方法の開発成功した。本実験系を用いて、ゲノムやトランスクリプトームなど包括的な遺伝学的情報を得ることにより、ホネクイハナムシ-細菌の共生がどのように機能しているのか、そしてそれがどのように進化してきたのかを解明できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ホネクイハナムシが深海に沈んだ鯨骨にする過程で獲得した、樹根状栄養体部や新たな共生細菌に着目し、(1) 樹根状栄養体部による脊椎動物の骨消化吸收メカニズム、(2) 宿主-細菌の共生関係によって成し遂げられる代謝・生理機能の解明を目的とした。そして、これらの結果を統合し、近縁種と比較することで、樹根状栄養体部という新奇形質がいかんして進化したのか。また新奇形質と新規な共生関係が進化したことによって、いかんして大型脊椎動物の骨と

いう他の生物がほとんど利用できない環境へと進出することができたのかについて考察することを目的とした。

3. 研究の方法

ホネクイハナムシは浮遊幼生期間を経て、脊椎動物の骨に着底し、固着生活を開始する。その際に環境中から共生細菌を取りこむ。固着生活開始直後から樹根状栄養体部が形成され、骨の消化を始める。本研究では組織特異的トランスクリプトーム解析とゲノム情報をもとに、ホネクイハナムシが脊椎動物の骨を消化吸収する際に働く遺伝子を明らかとした。トランスクリプトーム解析においては、オス、幼生、メスの樹根状栄養体部、体幹などの組織から RNA を抽出し、illumina社の HiSeq2500 においてシーケンスを行った。得られた配列データを精度などでフィルタリングし、Trinity によりアセンブルを行った。作成して遺伝子モデルを用いて、各組織由来の配列をマッピングすることにより、組織ごとの発現の有無などを明らかとした。情報解析により、樹根状栄養体部において有意に発現している GO やドメインなども明らかとし、ホネクイハナムシの樹根状栄養体部の遺伝的な傾向を明らかとした。また *in situ hybridization* により、それらの遺伝子が発現している細胞を特定した。

ホネクイハナムシと共生細菌2種のゲノムとトランスクリプトーム解析から、共生に関与していると考えられる遺伝子の解析を行った。ホネクイハナムシゲノムについては、成体から DNA を抽出し、Paired-end, Mate-pair ライブラリを作成後、illumina社の HiSeq2500 と MiSeq シーケンサーを用いて、推定ゲノムサイズの約150倍の配列データを得た。また Oxford Nanopore Technologies社の MinION シーケンサーを用いて、推定ゲノムサイズの約30倍のロングリード配列も取得した。これらの配列を用いて MaSuRCA など複数のソフトウェアをもちいてアセンブルを行い、その結果を比較した後、最も繋がりの良かったデータを用いて Augustus を使い遺伝子モデルを作成。作成した遺伝子モデルを用いて、ホネクイハナムシにおける遺伝子ファミリーの進化や様々な代謝経路に関与する遺伝子の有無などを明らかとした。また2種の共生細菌のゲノムデータも用いて、同様に代謝経路遺伝子のマッピングを行った。具体的にはアミノ酸やその他の栄養素の生合成経路に関与する遺伝子、栄養素の輸送に関わる遺伝子、免疫関連遺伝子をホネクイハナムシと共生細菌で比較することにより、共生関係の成立や維持、代謝相互作用などを推定した。またホネクイハナムシのゲノムとその他の無脊椎動物のゲノムを比較することにより、遺伝子やドメインの進化などをゲノムレベル解析した。

4. 研究成果

(1) 樹根状栄養体部による脊椎動物の骨消化吸収メカニズム

ホネクイハナムシの様々な発生段階や組織で発現している遺伝子をトランスクリプトーム解析により網羅的に比較し、各組織に特異的に発現している遺伝子や発現している遺伝子に含まれるドメインのリストなどを作成した。その結果、ホネクイハナムシにおいて、骨の主な有機成分であるコラーゲンなどの細胞外マトリックスを分解する機能を持つ Matrix metalloproteinase をコードする遺伝子が多様化していることが明らかとなった。そしてその多くが樹根状栄養体部の表皮細胞で発現していることが明らかとなった。またホネクイハナムシにおいて Matrix metalloproteinase 遺伝子は、浮遊幼生期には発現しておらず、骨に着底した後、樹根状栄養体部において発現を開始していた。ゲノム情報が得られる複数種の動物において、Matrix metalloproteinase 遺伝子を数えたところ、通常無脊椎動物においては、2-8 個程度しか存在していなかった。一方でホネクイハナムシにおいては少なくとも 24 個の Matrix metalloproteinase 遺伝子が存在していた。これはヒト (24 個) や魚 (26 個) などの脊椎動物と同程度の数である。近縁の無脊椎動物においては数個しか存在しないことや、分子系統解析の結果から、Matrix metalloproteinase 遺伝子の数は、脊椎動物とホネクイハナムシにおいてそれぞれの系統で独立に増えたと考えられる。脊椎動物においては、その系統で多様化した様々な細胞外マトリックスを分解するために、Matrix metalloproteinase が働いている。ホネクイハナムシにおいては、Matrix metalloproteinase 遺伝子の重複と機能分化によって、脊椎動物の細胞外マトリックスを分解することができるようになった可能性がある。また栄養素を輸送するトランスポーターをコードする遺伝子も樹根状栄養体部の表皮細胞で発現していた。これらのトランスポーターは他の動物では消化管上皮で発現し、アミノ酸やペプチドなどの消化した栄養素を吸収するために働いている。この結果からホネクイハナムシによる脊椎動物の骨内の栄養の吸収には、他の生物において内胚葉である消化管で機能している吸収メカニズムが、外胚葉である樹根状栄養体部の表皮において使い回されている (co-option) ことが示唆された。以上の結果からホネクイハナムシにおける脊椎動物の骨消化吸収においては、樹根状栄養体部の表皮細胞が主要な役割を果たしており、またその機能においては、タンパク質分解酵素の分子進化とトランスポーター遺伝子の異所的な発現の獲得が重要であったことが明らかとなった (図 1)。

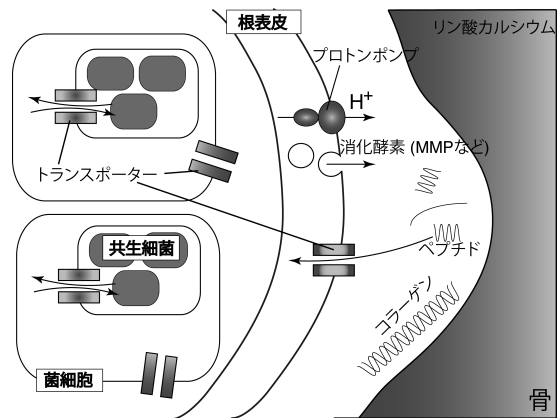


図 1 ホネクイハナムシの樹根状栄養体部による脊椎動物の骨消化吸収モデル。

(2) 宿主-細菌の共生関係によって成し遂げられる代謝・生理機能の解明

ホネクイハナムシゲノムのアッセムブルと遺伝子予測の結果 15,696 遺伝子モデルを得た。動物が普遍的に持つ遺伝子セットが、予測された遺伝子セットにどの程度含まれているかを明らかにするために、BUSCO 解析を行った。その結果 87%の動物共通遺伝子セットが予測された遺伝子モデルに含まれていた。また予測された遺伝子のアノテーションを行い、代謝経路にマッピングした結果、ホネクイハナムシと共生細菌においては、一部のアミノ酸等の代謝経路において、相補的な関係がみられた。この結果は、脊椎動物の骨という成分が非常に偏っているものを食料とする際に不足する栄養素を共生細菌に依存して生活している可能性を示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Miyamoto, N., Yoshida, M. A., Koga, H., and Fujiwara, Y. 2017. Genetic mechanisms of bone digestion and nutrient absorption in the bone-eating worm *Osedax japonicus* inferred from transcriptome and gene expression analyses. BMC Evolutionary Biology 17:17. 査読あり

DOI: 10.1186/s12862-016-0844-4.

〔学会発表〕(計 4 件)

Miyamoto, N. Function and evolution of root in bone-eating worm *Osedax*, 4th International Congress on Invertebrate Morphology, 2017.

宮本教生, ホネクイハナムシが根っこでクジラの骨を食べる仕組み, 第 19 回マリンバイをテクノロジー学会, 2017 年.

宮本教生, ホネクイハナムシが根っこでクジラの骨を食べる仕組み, 第 5 回 NGS 現場の会, 2017 年.

宮本教生, 「飼う!」深海生物学, 日本進化学会第 17 回大会, 2015 年.

〔その他〕(計 2件)

宮本教生, ホネクイハナムシが根っこで鯨の骨を食べる仕組み, 生物科学, in press

宮本教生, ホネクイハナムシ～根っこでクジラの骨を食べる蟲～, 現代化学 2016年1月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 教生 (MIYAMOTO, Norio)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・研究員

研究者番号: 20612237