

平成 21 年 2 月 23 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18570057

研究課題名（和文） ヒゲムシと化学合成細菌の共生：宿主細胞による細菌の支配の解明に向けて

研究課題名（英文） Symbiosis of Frenulata with chemoautotrophic bacteria: clarification of bacterial control by host cells

研究代表者

笹山 雄一（SASAYAMA YUICHI）

金沢大学・環日本海域環境研究センター・教授

研究者番号：30018999

研究成果の概要：口も消化管も無いヒゲムシにおいて栄養物を提供してくれる化学合成細菌を、共生させているバクテリオサイトと呼ばれる細胞において、それらの細菌が細胞内でどの場所を占めているかを調べた。その結果、それらの細菌のほとんどは、バクテリオサイトと、その外周にある栄養貯蔵細胞層との間に存在する毛細血管に向けて存在していることが明らかになった。これは細菌の生産物を栄養貯蔵細胞全体に行き渡らすに都合が良いと判断された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,600,000	0	2,600,000
2007年度	600,000	180,000	780,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	330,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：動物形態、ヒゲムシ、化学合成細菌、共生、バクテリオサイト、

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒゲムシは、本来、深海の低温を好む動物で、口も消化管も無いが、体後部にバクテリオサイトと呼ばれる細胞を持ち、その細胞質に化学合成細菌を共生させている。宿主は、この細菌が作る有機物をもらい生きている。

(2) 石川県能登半島九十九湾は、暖かく浅い海であるが、マシコヒゲムシと命名されたヒゲムシの一種が例外的に棲息する。

(3) 共同研究者との間で、これまでバクテリオサイトに関して以下の所見を得てきた。細菌は細胞包膜と呼ばれる多数の袋の中にいるが、1個の袋の中の細菌数は必ず数個

以下である。栄養物を貯蔵する為の細胞がバクテリオサイトの外周にあるが、細菌はその細胞側の細胞質に偏って存在するようにみえる。栄養貯蔵細胞から遠い所にある細菌は、リゾソームで消化されているようにみえる。

(4) したがって、我々は、バクテリオサイトは、感染した細菌をすぐに支配下におき、細菌が必要以上に増殖することを許さないのではないか、宿主の為に働いている細菌には手をつけないが、老化した細菌は消化して栄養としているのではないか、バクテリオサイトは細胞質における共生細菌の位置を制御しているのではないか、さらに遺伝子の発現を制御している可能性はないか、等に疑問

を持ち、本研究では、これらの推測が正しいか否かを検証することにした。

2. 研究の目的

(1) バクテリオサイトにおいて、働いている細菌と老化した細菌を特殊な染色で区別し、宿主細胞が細菌の活性を見分けて消化していること、それは結果として細菌数の調節につながることを明らかにする。(2) バクテリオサイトにおいて、蛍光顕微鏡により、共生細菌と細胞骨格との関係を立体的に視覚化し、少なくとも細菌の位置に関しては総合的調節があることを明らかにする。(3) バクテリオサイトが、共生時に細菌の遺伝子の発現を制御している可能性を議論する基礎として、制御の影響が可逆的である事を期待して、共生細菌をヒゲムシから分離して再び自由生活ができるか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) モレキュラープローブ社の Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit を用いて生菌と死菌の区別に用いた。また、電子顕微鏡による観察も行った。(2) 免疫染色法としてアブカム社の酵母から哺乳類のチューブリンまでを認識する抗チューブリン抗体を用いて細胞骨格を染色した。さらに、研究を進めて行く過程でバクテリオサイトと栄養貯蔵細胞が存在する栄養体と呼ばれる部分では、毛細血管が重要な働きをしていることが明らかになり、それを染め出す方法として、背血管にマイクロインジェクション装置を持って、濾過することによって一定の粒子の大きさにそろえた墨汁を注入した。(3) 本種の E S T 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 生菌か死菌かを見分けるキットでバクテリオサイトを染色すると、その中に存在するすべての細菌が、生菌を示す緑に染まり、死んだ菌を見い出すことができなかった。これは、後に電子顕微鏡により詳しく調べると 7000 個の調べた細菌のうち、リソゾームで消化されているのは、わずか 1% でしかなく、染色結果を反映しているとわかった。(2) バクテリオサイトにおいて、共生細菌の存在部位はチューブリンの検出部位と一致し、電子顕微鏡による詳細な解析の結果、200 個のバクテリオサイトを調べると、細菌の 85% は栄養貯蔵細胞側に偏って存在することがわかった。この事は、宿主側が、チューブリンに細菌を載せて、その位置を制御している可能性を強く示唆している。但し、この観察過程で、ほとんどの場合、共生細菌は栄養貯蔵細胞側の毛細血管に接していることがわかった (図 1、2、3 及び 4)。(3) 本種のヒゲムシを滅菌した海水中ですりつぶし、共生

細菌を培養したが、純粋培養はできず、なぜか他の細菌と一緒にだと、常に本種の特徴を示す 16SrDNA を増幅できた。E S T 解析で、栄養体の部分から増幅された産物は、その四分の一がヘモグロビンのサブユニットであった。栄養体以外の部分からもアクチン等の配列が増幅されたが、本種が共生に入って遺伝子の発現に影響を受けているか否かの確証は得られていない。

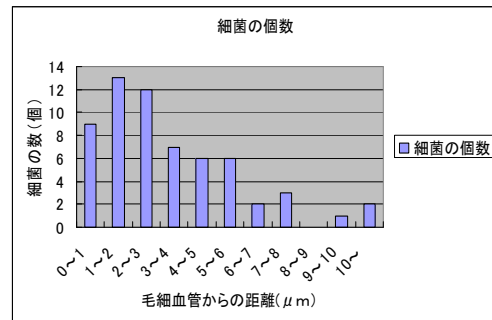


図 1. 毛細血管からのバクテリアの位置。そのほとんどが毛細血管より 3 マイクロメートル以内の位置にいる。



図 2. 栄養体における毛細血管の墨汁による視覚化

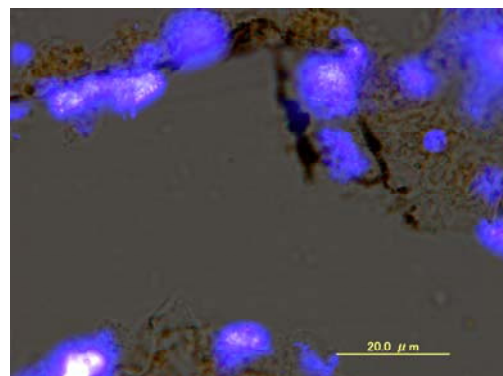


図 3. 毛細血管 (黒色の墨汁に接して共生細菌の核様体が D A P I で青く蛍光を発している。この事は、共生細菌が毛細血管に極めて隣接していることを示している。

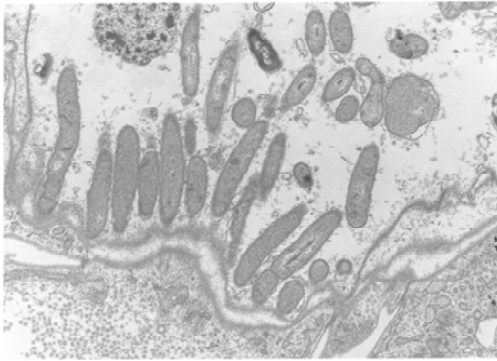


図4. 細長い隙間に見える毛細血管に向って頭をそろえている共生細菌。

また、研究の過程で以下のことも明らかになった。本種の栄養体と呼ばれる部分はグリコーゲン顆粒が蓄積されている。しかしながら、これらの物質の供給および消費経路は不明である。したがって、本研究で調べた結果、 α -グルコシダーゼ活性が皮膚と栄養体から検出された。これはさらに研究を進め、論文⑥として発表した。

熱ショック蛋白質 (HSP) は、原核生物から哺乳類まで、熱のみならず、種々の物理・化学的ストレスに対して作られる分子である。これまでゾウリムシでは、核内に細菌が共生することによって、HSP70 を作り出し、自分の生存に有利に働かせることが知られている。本研究では HSP70 に対する抗体を用いて免疫学的に検出を試みると、バクテリオサイトのみが弱い陽性の反応を示した。現在、さらに研究を進めるべく手段を練っている。

バクテリオサイトは、消化管上皮に由来することが示唆されている。高等動物において消化管上皮は、典型的な細胞再生系に属し、常にアポトーシスによって消化管足りえている。そこで、消化管の機能を失った栄養体においてアポトーシスが発現しているか否か興味深い。現在、不活性型カスパーゼの抗体を用いると、バクテリオサイトが陽性の反応を示すことを突き止めた。

本種の巨大ヘモグロビンは、4つのサブユニットからなる。そのうちのA1サブユニットの配列をプローブにして、その産生部位を *in situ* hybridization 法によって調べた。その結果、栄養体を覆う体腔上皮に最も強く、また心臓小体を覆う体腔上皮からも強い、シグナルが得られた。このことはこれらの部位でヘモグロビンを産生していることを示している。これは、論文④として発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

① Matsuno A, Sasayama Y A discussion of the morphology of the central lumen in the

trophosome of a Frenulata (beard worm), *Oligobrachia mashikoi*, Siboglinidae, Annelida. Rep. Noto Mar. Cent. 14: in press, 査読無し。

② Sasayama Y, Fukumori Y, Nakabayashi H, Shimizu N Detection of sulfur using an X-ray analytical microscope from the trophosome of a beard worm, *Oligobrachia mashikoi*, Frenulata, Siboglinidae. Nihonkai Kenkyu, in press, 査読無し。

③ Numoto N, Nakagawa T, Kita A, Sasayama Y, Fukumori Y, Miki K Structural basis for the heterotropic and homotropic interactions of invertebrate giant hemoglobin. Biochemistry, 47: 11231-11238, 2008, 査読有り。

④ Nakahama S, Nakagawa T, Kanemori M, Fukumori Y, Sasayama Y Direct evidence that extracellular giant hemoglobin is produced in chloragogen tissues in a beard worm, *Oligobrachia mashikoi* (Frenulata, Siboglinidae, Annelida) Zool. Sci., 25: 1247-1252, 2008, 査読有り。

⑤ Koizumi T, Sasayama Y Alpha-glucosidase-like activity detected in a siboglinid polychaete, *Oligobrachia mashikoi*. Zool. Sci., 25: 364-271, 2008, 査読有り。

⑥ Numoto N, Nakagawa T, Sasayama Y, Fukumori Y, Miki K Structure of the partially unliganded met state of 400 kDa hemoglobin: Insights into ligand-induced structural changes of giant hemoglobins. Proteins, 73: 111-125, 2008, 査読あり。

⑦ Aida M, Kanemori M, Kubota N, Matada M, Sasayama Y, Fukumori Y Distribution and population of free-living cells related to endosymbiont A harbored in *Oligobrachia mashikoi* (a siboglinid polychaete) inhabiting Tsukumo Bay. Microbes Environ., 23: 81-88, 2008, 査読有り。

⑧ Sasayama Y, Higashide Y, Sakai M, Matada M, Fukumori Y Relationship between the lifestyle of a siboglinid (Pogonophora) polychaete, *Oligobrachia mashikoi*, and the total sulfide and nitrogen levels in its habitat. Zool. Sci., 24: 131-136, 2007, 査読有り。

⑨ Deguchi M, Kubota N, Matsuno A,

Kanemori M, Fukumori Y, Sasayama Y Actual distribution of bacteriocytes in the trophosome of a beard worm (*Oligobranchia mashikoi*, Siboglinidae, Annelida): Clarification using whole-mount *in situ* hybridization. Acta Zool., 88: 129-135, 2007, 査読有り。

⑩ Kubota N, Kanemori M, Sasayama Y, Aida M, Fukumori Y Identification of endosymbionts in *Oligobranchia mashikoi* (Siboglinidae, Annelida). Microbes Environ., 22: 136-144, 2007, 査読有り。

⑪ Aki Y, Nakagawa T, Nagai M, Sasayama Y, Fukumori Y, Imai K Oxygenation properties of extracellular giant hemoglobin from *Oligobranchia mashikoi*. BBRC, 360: 673-678, 2007, 査読有り。

⑫ Mita M, Deguchi M, Sasayama Y Lipid composition of the trophosome in the beard worm, *Oligobranchia mashikoi* (Pogonophora). J. Mar. Biol. Ass. U.K., 86: 283-286, 2006, 査読有り。

[学会発表] (計 8 件)

① Aida M, Kubota N, Asada R, Kodani T, Sasayama Y, Kanemori M, Fukumori Y Search for the genes related to chemoautotrophic sulfur oxidation in the genome of *Oligobranchia mashikoi* endosymbiont. 日本微生物生態学会 2007. 9. 15、愛媛

② 小泉隆、山田哲也、笹山雄一 環形動物門マシコヒゲムシに存在する α -グルコシダーゼ様活性を示す蛋白の生化学的研究、第78回日本動物学会、2007. 9. 20、弘前

③ 小泉 隆、笹山雄一 環形動物多毛類のマシコヒゲムシの栄養体の生化学的研究、第77回日本動物学会、2006. 9. 22、島根

④ 国田新平、金森正明、福森義宏、笹山雄一 マシコヒゲムシのバクテリオサイトにおける熱ショック蛋白の検出の試み、第77回日本動物学会、2006. 9. 22、島根

⑤ 浅田光子、角明子、笹山雄一、松野あきら マシコヒゲムシの栄養体における抗アポトーシス関連酵素抗体による免疫組織学的研究、第77回日本動物学会、2006. 9. 22、島根

⑥ 中浜重之、中川太郎、金森正明、福森義宏、笹山雄一 マシコヒゲムシの巨大ヘモグ

ロビン: *in situ* hybridization 法を用いた産生部位の研究、第77回日本動物学会、2006. 9. 22、島根

⑦ 榎本あきら、岡田アキ、福森義宏、笹山雄一、山口和男 マシコヒゲムシのcDNAライブラリーの作成と発現遺伝子の解析、第77回日本動物学会、2006. 9. 22、島根

⑧ 山田哲也、笹山雄一 マシコヒゲムシ(環形動物多毛類)の単離されたバクテリオサイトにおけるバクテリアと細胞骨格 日本動物学会中部支部大会、2006. 7. 30、名古屋

その他

① 笹山雄一・福森義宏・東出幸吾 「生きたヒゲムシ撮影：進化の謎を解く鍵に、氷河期から現代に適応」北國新聞 2007年4月10日カラー掲載

② 笹山雄一・福森義宏 「ヒゲムシ生態撮った：世界初 九十九湾で金大教授ら」北陸中日新聞 2007年4月10日カラー掲載

③ 笹山雄一・福森義宏 「九十九湾のマシコヒゲムシ：水深25m撮影成功、金沢大、世界初」読売新聞 2007年4月11日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹山 雄一 (SASAYAMA YUICHI)
金沢大学・環日本海域環境研究センター・教授
研究者番号：30018999

(2) 研究分担者

福森 義宏 (FUKUMORI YOSHIHIRO)
金沢大学・自然システム学系・教授
研究者番号：60135655

金森 正明 (KANEMORI MASA AKI)
金沢大学自然システム学系・講師
研究者番号：20324064

松野 あきら (MATSUNO AKIRA)
島根大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：60032629