

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23687004

研究課題名(和文) 深海底熱水活動域における糖鎖を介した生物間相互作用の分子的解明

研究課題名(英文) Molecular understanding of host-symbiont interaction in deep-sea hydrothermal fields.

研究代表者

中川 聡 (Nakagawa, Satoshi)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70435832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、深海底熱水活動域において絶対的な共生関係にある微生物・大型生物の相互作用・相互認識機構を分子レベルで解明することを主な目的としている。特に生物間の相互認識に関わる生体分子「糖鎖」に注目し研究を進めてきた。本研究では深海底熱水活動域に見られる様々な共生系(細胞外共生系から細胞内共生系)において、共生微生物/ホスト生物が有する特異糖鎖の機能解析や糖鎖認識分子の同定・発現解析等を実施することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The main objective of this study is to reveal the molecular mechanisms underlying host-symbiont interactions in deep-sea hydrothermal vent environments. We especially have focused on sugar chains which might play important roles in the host-symbiont interactions. We have analyzed biological functions of unique sugar chains and glycan-binding proteins in various symbiotic systems (both episymbiosis and endosymbiosis).

研究分野：微生物生態学

キーワード：深海底熱水活動域 共生 生物間相互作用 糖鎖 グライコミクス

1. 研究開始当初の背景

深海底熱水孔環境は、全ての大型生物が微生物と絶対的な共生関係にあり、微生物-大型生物間の相互認識・相互作用の研究を行なう最適のフィールドである。熱水噴出孔近傍に棲息する大型生物群は全て「環境獲得型」の相利共生、すなわち卵の段階では共生微生物を保持せず、発生初期に環境中から共生微生物(例えば *Epsilonproteobacteria*)を選別・獲得する。しかし共生微生物の培養および宿主生物の飼育が困難であるため、それらの相互作用を実験生物学的に検証することができず、宿主と共生微生物の相互作用および相互認識に関わる分子メカニズムは未解明である。*Epsilonproteobacteria* がモデル共生微生物 (*Alphaproteobacteria* や *Gammaproteobacteria*) と決定的に異なるのは、ホストレンジおよび共生形態が多様、宿主生物の全炭素源を賄う化学合成微生物である、病原性は無いが後述の病原性微生物の祖先にあたる点である。これまで我々は、深海性 *Epsilonproteobacteria* の網羅的分離培養に世界で初めて成功したのを起点に、その生理生態学的機能や鍵酵素の生化学解析、全ゲノム解析や糖鎖生物学的解析等を展開してきた。しかしながら、共生微生物と宿主生物の間の相互作用や相互認識に関わる分子メカニズムに関する包括的知見は得られていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、深海底熱水活動域において絶対的な共生関係にある微生物-大型生物の相互作用・相互認識機構を分子レベルで解明することを目的としている。具体的には、まず共生 *Epsilonproteobacteria* の細胞外共生系を対象として、共生微生物が有する特異糖鎖の機能に着目したグライコミクスを展開し、確立した方法論を細胞内共生系に適用することで、深海底における異種生物間相互作用の分子機構を比較・体系化することを目指した。

3. 研究の方法

本研究は「共生関係は如何に成立するか?」という帰納的探求が困難な難問に、「共生微生物の特異糖鎖こそ、本微生物群と幅広い宿主との共生を成立させる分子擬態システム(換言すれば病原性微生物の有する感染機構の進化的プロトタイプ)である」という仮説から演繹的に研究を進めた。具体的には、NMR や GCMS を用いた糖組成分析や糖鎖構造解析、アフィニティークロマトグラフィーによる糖鎖認識分子の精製や性状解析に加え、様々な深海性微生物から調整した糖鎖を蛍光ビーズに付加し、宿主生物に対するエリシターとして用いることで、宿主生物の各組織における特異糖鎖の影響を解剖学的・半定量的に可視化した。

4. 研究成果

まず中部沖縄トラフに位置する伊平屋北熱水活動域において、独立行政法人海洋研究開発機構の無人探査機を用いた研究航海を実施した。本熱水活動域の水深約 1,000m において採取した甲殻類の共生系(化学合成共生微生物は宿主生物の腹部剛毛に付着共生)を主な解析対象とした。これまでの研究において、本甲殻類の共生微生物が類稀な構造の真核生物型糖鎖を有することを突き止めている。共生微生物のものだけでなく、様々な深海性微生物から調整した糖鎖を蛍光ビーズに付加し、宿主生物に対するエリシターとして用いることで、宿主生物の各組織における特異糖鎖の影響を解剖学的・半定量的に可視化することに成功した。加えて、NMR および GCMS を用いて、共生微生物糖鎖(特に細胞表層に存在するリポ多糖)の糖組成分析および構造解析を行った。

また当該甲殻類において、その共生微生物の特異糖鎖を認識する分子を探索し性状を解析した。共生微生物特異糖鎖の作用部位に注目し、当該糖鎖へのアフィニティークロマトグラフィーおよびイオン交換を組み合わせて用いることにより、糖鎖認識分子を検出・精製することに成功した。その存在量や生化学的性状を解析するだけでなく、蛍光ラベルした分子を新たに調整し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて共生微生物を含む各種微生物細胞との相互作用をイメージ解析することに成功した。

次に、インド洋の深海底熱水活動域から採取した試料(主に巻貝)を解析した。エラや食道組織の細胞内に存在する共生微生物は特異な構造および組成の糖鎖を有するが、宿主生物において当該の特異糖鎖を認識するレクチン様タンパク質を検出・精製し、詳細な生化学的性状解析を行うことに成功した。また、当該宿主生物のトランスクリプトームにより、複数のレクチン様タンパク質遺伝子を見だし、環境変化に応じてその発現量が変化することを突き止めた。加えて、HPLC および GCMS を用いて、当該の共生微生物糖鎖(特に細胞表層に存在するリポ多糖)の糖組成を比較解析した。

さらに、様々な巻貝類において、共生微生物が有する特異糖鎖を認識する分子を探索した。その結果、宿主生物および共生微生物の種類に応じて、宿主生物が有する糖鎖認識分子の種類や特性が大きくことなることが示唆された。これらにより、本研究期間全体を通して、細胞外共生および細胞内共生の両者を解析し、深海底における異種生物間相互作用の分子機構を比較・体系化することが世界で初めて可能となった。

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8件)

1. Mino, S, Kudo, H, Arai, T, Sawabe, T, Takai, K, Nakagawa, S. *Sulfurovum aggregans* sp. nov., a hydrogen-oxidizing, thiosulfate-reducing chemolithoautotroph within the *Epsilonproteobacteria* isolated from a deep-sea hydrothermal vent chimney, and an emended description of the genus *Sulfurovum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 3195-3201, 2014、査読有り
2. 中川 聡、*Epsilonproteobacteria*: 特殊環境のスペシャリスト. *JJSE* 12, 63-70, 2014、査読有り
3. Nakagawa, S., Shimamura, S, Takaki, Y, Suzuki, Y, Murakami, SI, Watanabe, T, Fujiyoshi, S, Mino, S, Sawabe, T, Maeda, T, Makita, H, Nemoto, S, Nishimura, SI, Watanabe, H, Watsuji, TO, Takai, K. Allying with armored snails: the complete genome of gammaproteobacterial endosymbiont. *The ISME J* 8, 40-51, 2014、査読有り
4. Beedessee, G, Watanabe, H, Ogura, T, Nemoto, S, Yahagi, T, Nakagawa, S., Nakamura, K, Takai, K, Koonjul, M, Marie, DE. High connectivity of animal populations in deep-sea hydrothermal vent fields in the Central Indian Ridge relevant to its geological setting. *PLoS One* 8, e81570, 2013、査読有り
5. Makita, H, Nakagawa, S., Miyazaki, M, Nakamura, K, Inagaki, F, Takai, K. *Thiofractor thiocaminus* gen. nov., sp. nov., a novel hydrogen-oxidizing, sulfur-reducing epsilonproteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent chimney in the Nikko Seamount field of the northern Mariana Arc. *Arch Microbiol* 194, 785-794, 2012、査読有り
6. Kawagucci, S, Ueno, Y, Takai, K, Toki, T, Ito, M, Inoue, K, Makabe, A, Yoshida, N, Muramatsu, Y, Takahata, N, Sano, Y, Narita, T, Teranishi, G, Obata, H, Nakagawa S., Nunoura, T, Gamo, T. Geochemical origin of hydrothermal fluid methane in sediment-associated fields and its relevance to the geographical distribution of whole hydrothermal circulation. *Chem Geol* 339, 213-225, 2012、査読有り
7. Enomoto, M, Nakagawa, S., Sawabe, T. Microbial communities associated with holothurians: presence of unique bacteria in the coelomic fluid. *Microbe Environ* 27, 300-305, 2012、査読有り
8. Masaki, Y, Kinoshita, M, Inagaki, F, Nakagawa, S., Takai, K, Possible kilometer-scale hydrothermal circulation within the Iheya-North field, mid-Okinawa Trough, as inferred from heat flow data., *JAMSTEC Rep Res Dev*, 12, 1-12, 2011、査読無し
1. 砂田 高志、浅海性無脊椎動物の体腔液に存在する微生物の群集構造解析、環境微生物系学会合同大会 2014、2014年10月24日、アクトシティ浜松(静岡県浜松市)
2. 村上 俊一、深海底熱水活動域に生息する巻貝類とその共生細菌の群集遺伝学的解析、環境微生物系学会合同大会 2014、2014年10月24日、アクトシティ浜松(静岡県浜松市)
3. Mino S, Global biogeography and population structure of deep-sea vent chemolithoautotrophs inferred from multilocus sequence analysis (MLSA)、ISME15、2014年8月26日、Coex Convention Center (Seoul, Korea)
4. 中川 聡、深海底熱水活動域に見られる化学合成共生系の多様性とその進化、極限環境生物学会 第15回シンポジウム、2014年6月7日、東京工業大学大岡山キャンパス(東京都目黒区)
5. 中川 聡、深海底熱水活動域に発達する化学合成共生系の多様性とその進化、第29回日本微生物生態学会大会、2013年11月24日、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)
6. 中川 聡、深海底熱水活動域に棲息する化学合成独立栄養微生物の多様性とその進化、極限環境生物学会 2013年度年会、2013年10月27日、明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)
7. 中川 聡、深海底熱水活動域に優占する微生物群の生態と特異生理機能、日本生物工学会北日本支部シンポジウム、2013年9月27日、北海道大学函館キャンパス(北海道函館市)
8. Fujiyoshi, S, Purification and characterization of serum lectin from a deep-sea hydrothermal vent invertebrate. 5th International Symposium on Chemosynthesis-Based Ecosystems、2013年8月19日、Victoria Conference Center (Victoria, Canada)
9. 藤吉 奏、深海底熱水活動域の固有甲殻類が有するレクチンの精製と性状解析、第32回日本糖質学会年会、2013年8月5日、大阪国際交流センター(大阪府大阪市)
10. 藤吉 奏、深海底熱水活動域に棲息する大型無脊椎動物の血清中レクチンの探索と性状解析、ブルーアース 2013、2013年3月15日、東京海洋大学(東京都品川区)
11. 神藤 彩加、深海底熱水活動域に棲息する化学合成独立栄養細菌の細胞表面に存在する糖脂質の構造比較、第28回日本微生物生態学会大会、2012年9月20日、豊橋技術科学大学(愛知県豊橋市)
12. 新井 崇之、深海性共生細菌とその自由生活型近縁種が有するリポ多糖の構造解析、第28回日本微生物生態学会大会、2012年9月20日、豊橋技術科学大学(愛知県豊橋市)
13. 藤吉 奏、深海底熱水活動域に棲息する

[学会発表](計27件)

- 無脊椎動物の血清中レクチンの性状解析、第 28 回日本微生物生態学会大会、2012 年 9 月 20 日、豊橋技術科学大学(愛知県豊橋市)
14. 神藤 彩加、深海底熱水活動域に棲息する化学合成独立栄養細菌が有する細胞表面糖脂質の構造比較、第 31 回日本糖質学会年会、2012 年 9 月 18 日、鹿児島市民文化ホール(鹿児島県鹿児島市)
 15. 新井 崇之、深海底熱水活動域に優占する化学合成独立栄養性共生細菌が持つ糖鎖抗原の構造解析、第 31 回日本糖質学会年会、2012 年 9 月 18 日、鹿児島市民文化ホール(鹿児島県鹿児島市)
 16. 藤吉 奏、深海底熱水活動域に固有の無脊椎動物が有する血清中レクチンの性状、第 31 回日本糖質学会年会、2012 年 9 月 18 日、鹿児島市民文化ホール(鹿児島県鹿児島市)
 17. 小西 正朗、硫酸化細菌と共生している深海底生物の長期飼育装置の開発、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 23 日、京都女子大学(京都府京都市)
 18. 丸茂 克美、伊平屋北海丘の海底熱水系の水銀濃度と同位体組成、ブルーアース 12、2012 年 2 月 23 日、東京海洋大学(東京都品川区)
 19. 北嶋 円、飼育下で観察されたゴエモンコシオリエビの摂餌行動、ブルーアース 12、2012 年 2 月 23 日、東京海洋大学(東京都品川区)
 20. 神藤 彩加、化学合成生態系の糖鎖生物学～異種生物間相互認識機構の解明にむけて～、ブルーアース 12、2012 年 2 月 23 日、東京海洋大学(東京都品川区)
 21. 富安 卓滋、伊平屋北海丘海底熱水系周辺における環境試料中水銀濃度分布、ブルーアース 12、2012 年 2 月 23 日、東京海洋大学(東京都品川区)
 22. 島村 繁、糖鎖解析支援ソフト「GlyfinTMS™」の開発、第 34 回日本分子生物学会、2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
 23. 中川 聡、深海底熱水活動域に優占する微生物群の分離とその性状解析、第 27 回日本微生物生態学会大会、2011 年 10 月 10 日、京都大学(京都府京都市)
 24. Nakagawa, S、Population genetics and ecophysiology of chemoautotrophic deep-sea vent Epsilonproteobacteria. International Union of Microbiological Sciences 2011 Congress、2011 年 9 月 6 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
 25. 島村 繁、インド洋深海底熱水活動域に棲息する細胞内共生微生物のゲノム解析、ゲノム微生物学会ワークショップ、2011 年 8 月 20 日、東北大学(宮城県仙台市)
 26. 渡邊 珠希、深海底熱水活動域に棲息する共生微生物糖脂質と宿主生物血清中の N 結合型糖鎖の解析、第 30 回日本糖質

学会年会、2011 年 7 月 12 日、ハイブ長岡(新潟県長岡市)

27. 島村 繁、糖鎖解析支援ソフト「GlyfinTMS™」の紹介、第 10 回国際バイオ EXPO バイオアカデミックフォーラム、2011 年 7 月 1 日、東京ビックサイト(東京都江東区)

〔図書〕(計 1 件)

今中忠行、極限環境生物の産業展開、シーエムシー出版、2012 年、p. 218-223.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kanbi.marine.kais.kyoto-u.ac.jp/Site/Scaly-Foot.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 聡 (NAKAGAWA SATOSHI)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：70435832