

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：82670

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26660176

研究課題名(和文)水曜海山に生息する核膜構造が不完全な深海微生物の系統進化的解析

研究課題名(英文)Evolutionary analysis of deep-sea microorganisms incomplete in nuclear membrane structure inhabiting the Wednesday Seamount

研究代表者

八谷 如美(Hachiya, Naomi)

地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・開発本部開発第二部バイオ応用技術グループ・主任研究員

研究者番号：30408075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：原核生物と真核生物をつなぐ形態を有する生物は見つかっていないので、進化の過程において既に淘汰されてしまったか、あるいは、採取困難な場所に生息しているか、であろう。本研究は、後者の可能性を見込み、伊豆・小笠原沖水曜海山深海底から採取した微生物を用いて当該生物を見出すこと、さらに、当該生物の単離において極微小領域を摘出可能な実験手法を新規に構築すること、を目的とした。透過型電子顕微鏡観察による網羅的なスクリーニングにより、採取した深海ウロコムシに付着する微生物が当該生物である可能性を見出した。また、これらの解析のために、極微小領域の単離が可能なレーザーマイクロダイセクション装置を構築した。

研究成果の概要(英文)：Since no organisms linking prokaryotes and eukaryotes have been found, it is likely that they have already been culled in the process of evolution or live in places difficult to collect. In this research, we anticipate the possibility of the latter, find out the organisms using microorganisms collected from the deep-sea floor of the Izu-Ogasawara offshore Seamount. Through comprehensive screening by transmission electron microscopy, we found the possibility that microorganisms attached to deep sea weed beetle collected are such organisms. Furthermore, for the experimental analysis, we have developed an advanced system of the laser microdissection system (Advanced-LMD) which easily cut microscopic region of less than 1 μm in diameter. In addition, we constructed a system to recover a large number of samples at once by the capillary phenomenon of the glass capillary.

研究分野：生化学，細胞生物学

キーワード：レーザーマイクロダイセクション法 深海微生物

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報は通常親から子へと伝達され、進化の原動力となる変異も親から子へと垂直に受け渡される。ゆえに進化は祖先から子孫へと向かって展開するために生物の進化は系統樹にて表される。生物が共通に持つ遺伝子の多くはこうして一貫して親から子へと垂直に受け渡されていると考えられる一方で、ミトコンドリアや葉緑体が共生によって生じたとする細胞内共生説では、生物個体丸ごとの水平移動が進化の一時期に起き定着したと主張する。この過程が真核生物を生じたと考えられているが、現在のところ、原核生物と真核生物をつなぐ生き物が地上に存在した痕跡は見つからない。

しかしながら、地上における激しい生存競争とは異なる環境である深海は、もし生物がその環境に適応することができれば捕食者の少ないきわめて安泰な生活環境であり、そこにいる生き物の一部には一定の段階で進化をとめてしまったか、若しくは、地上と比較してきわめて遅い進化の速度で移行しており見かけ上進化を止めてしまったかのような生物が存在することが予想される。小笠原沖水曜海山付近の深海底は比較的生物の多様性に乏しく、シチョウシノカイヒバリガイやユノハナガニおよびウロコムシなどが熱水鉱床付近に生息しているがその他の生き物に出会うことはまれであることから、当該生物の生存の可能性を期待し、平成 19 年に海洋研究開発機構深海調査に参加し、無人潜航艇「ハイパードルフィン」により伊豆・小笠原沖水曜海山にて潜航調査を行い(平成 19 年 伊豆・小笠原海域水曜海山 海洋研究開発機構調査潜航 NT07-08)、生物試料採取装置スラップガンを用いて試料を採取したところ、深海ウロコムシの体表部分および筋肉層に付着・共生する、核酸を包む膜系が不完全にもかかわらずミトコンドリアが存在する未同定の深海微生物を見出した。このことは形態学上の観察からは、これまでに見出されていない原核生物と真核生物をつなぐ生き物が水曜海山における深海に現存する可能性を示唆していた。

2. 研究の目的

国内外において原核生物と真核生物をつなぐ生物の存在の可能性を示した先行研究はまだ発表されていない。そこで本研究では、伊豆・小笠原沖水曜海山深海底 1,800メートルで採取されたウロコムシに付着していた深海微生物が原核生物と真核生物をつなぐミッシングリンク微生物であるという作業仮説を証明することを全体の目的とする。また、本仮説を証明するために、極微小領域をレーザー抽出可能な新規のレーザーマイクロダイセクションシステムを確立することで、コンタミネーションのない方法で目的微生物や、さらには微生物中の

ミトコンドリアや核などのオルガネラを正確に単離し、遺伝子および生化学的解析や微細構造観察をより高精度に行うことができる新たな解析手法を確立することを、併せて本研究の目的とする。

3. 研究の方法

採取生物の生存環境と同じ条件にて形態学的観察標本作製するべく、一部は深海中でグルタルアルデヒド、オスミウムにより電顕用固定を行った。これらの標本は、詳細な透過型電子顕微鏡(TEM)観察のために、すべてのサンプルについて、包埋後、薄切切片を作成して、微細構造形態観察による当該生物のスクリーニングを行った。

また、細胞内の構造物を単離可能とする極微小領域からの標的物の抽出をおこなうための改良型レーザーマイクロダイセクション装置を開発すべく、倒立蛍光顕微鏡に深紫外レーザーを積載し、適切な切削が可能になるよう調整を行った。切削後のサンプル回収においては、ガラスキャピラリーを用い、毛細管現象で吸引して回収する短時間で効率的な回収方法を検討した。

4. 研究成果

透過型電子顕微鏡(TEM)にて微細構造形態観察を行ったところ、採取生物の深海ウロコムシには、数種類の深海微生物が付着、共生していることを見出した。なかでも、体表および筋層内に局在していた長さ 2~10 ミクロン、直径 1~3 ミクロンのベジータ様の一種類の微生物における細胞内構造は特異であり、核酸を包んでいる膜系が閉鎖しておらず電子顕微鏡観察用切片上において顕著な不連続性を示していた。さらに高角度試料傾斜法により詳細な微細構造観察を行ったところ、この開放膜系に囲まれた領域には核小体類似の構造も観察された。ところが一方、この未知の深海微生物は細胞内に明確な構造をしたミトコンドリアを持っており、微細形態学上の観察からは、「核酸を包む膜系が不完全にもかかわらずミトコンドリアが存在する」、いわば進化上のミッシングリンクに相当する生物である可能性が非常に大きいものであることが判明した。ミトコンドリアの細胞内共生説は現在既に定説となっているが、その共生の時期やしくみは特定できてはいない。しかしながら、この深海微生物においては、核膜が完全に形成される以前にミトコンドリアとなる原核生物が共生した可能性が考えられ、その共生時期を検討するうえで大変興味深いものであった。

さらに、標的物の単離のために、改良型レーザーマイクロダイセクション装置の開発を行った。既存のダイセクションシステムでの単離では、シングルセル、あるいは細胞塊に相当する直径数十 μm 程度の大きさの抽出までは実現していたところ、本研

究の成果により、オルガネラ程度の直径数 μm 程度の細胞「内」の構造体についても、その単離・摘出が初めて可能になった。

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 11 件)

1. Hachiya N and Kozuka Y. Development of Advanced-Laser Micro Dissection System for Protein Aggregation Diseases. *Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences*. ISSN 2572-11151. 2018.2. DOI:10.19080/CTBEB 12.55584-61, 2018.
2. Hachiya NS. Unfoldin, A novel Tool for the Analysis of Protein misfolding or Neurodegenerative Diseases. *Journal of Neurology and Neurosurgery*. (ISSN:2476-0501 DOI:10.19080/OAJNN2017.06.55686), 2017.
3. Miyahara H., Sawashita J., Ishikawa E., Yang M., Ding X., Liu Y., Hachiya N., Kametani F., Yazaki M., Mori M., Higuchi K. Comprehensive proteomic profiles of mouse A β poAII amyloid fibrils provide insights into the involvement of lipoproteins in the pathology of amyloidosis. *Journal of Proteomics*. (doi.org/10.1016/j.jprot.2017.10.003), 172:111-121, 2017.
4. Monkawa A., Gessei T., Hachiya N. Existence of Unprocessed a Mitochondrial Enzyme: YDL178wp in the Membrane Fraction as an Oligomeric Formation with a Protein-Unfolding Activity. *MOJ Cell Science & Report*. (DOI:10.15406/mojcsr.207.04.00082), 2017.
5. Kawaguchi Y., Taoka M., Takekiyo T., Uekita T., Shoji I., Hachiya N., Ichimura T. TRIM32-Cytoplasmic-Body Formation Is an ATP-Consuming Process Stimulated by HSP70 in Cells. *PLOS ONE*. (DOI: 10.1371/journal.pone.0169436 January 4, 2017), 2017.
6. Yoshinaga T., Yazaki M., Sekijima Y., Kametani F., Miyashita K., Hachiya N., Tanaka T., Kokudo N., Higuchi K., Ikeda S. The pathological and biochemical identification of possible seed-lesions of transmitted transthyretin amyloidosis after domino liver transplantation. *J Pathol: Clin Res*.2(2):72-79, 2016.
7. Yazaki M., Yoshinaga T., Sekijima Y., Nishio S., Kanizawa Y., Kametani F., Miyashita K., Hachiya N., Higuchi K., Ikeda S. The first pure form of Ostertag-type amyloidosis in Japan: a sporadic case of hereditary fibrinogen A α -chain amyloidosis associated with a novel frameshift variant. *Amyloid*.22(2):142-144, 2015.
8. Miyashita K., Nishijima K., Hachiya N. D-leucine suppresses prion formation in prion-infected culture cell. *Int. J. Neurol. Neurother*. (DOI: 10.23937/2378-3001/1/1/1011), 2014.
9. 紋川亮, 八谷如美. ミスフォールド蛋白解析技術の革新-改良型レーザーマイクロダイセクションシステムの開発- 別冊医学のあゆみ. 2017.7月号別冊: 148-149, (ISSN0039-2539 CODEN:IGAYAY), 2017.
10. 紋川亮, 八谷如美. ミスフォールド蛋白解析技術の革新-改良型レーザーマイクロダイセクションシステムの開発- 医学のあゆみ. 258: 748-749, 2016.

11. 八谷如美. プリオン病の基礎. 東京医科大学雑誌. 72: 12-18, 2014.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. Hachiya N. Paradigm shift of analytical methods for protein aggregates. The Congress of Neurodegeneration in Wroclaw Medical University. 2017.11. (ヴロツワフ, ポーランド)
2. 八谷如美. 蛋白質凝集疾患研究における改良型レーザーマイクロダイセクション(Advanced-LMD)法の開発と応用. 第56回日本白内障学会総会・第43回水晶体研究会. 2017.8. (宇都宮)
3. 八谷如美. 生命科学研究の新手法の開発とタンパク質凝集疾患への挑戦. 都医学研セミナー. 2016.11. (東京)
4. 八谷如美. 改良型レーザーマイクロダイセクション法によるタンパク質解析の新手法. 第89回日本生化学会大会. 2016.9. (仙台)(オーガナイザー)
5. 八谷如美. アミロイド研究のための新しい研究手法. BMB2015. 2015.12. (神戸)(オーガナイザー)
6. 八谷如美. 改良型ダイセクターALMDによるドミノ移植後アミロイドーシス十二指腸生検の解析. 京都大学原子炉実験施設専門研究会. 2015. 11. (大阪)
7. 八谷如美. 改良型LMDによるアミロイド解析と新しい生命科学研究手法への展開. 第三回日本アミロイドーシス研究会学術集会. 2015. 8. (東京)
8. Hashimoto S, Yaguchi Y, Takahashi Y, Hino, H, Miyashita K, Hachiya N. Adjuster for repeatable targeting of local part of cell at stage of microscope for biochemical analysis. The 19th world multiconference on systemic, cybernetics and informatics, Orlando, Florida, U

SA. 2015.7. (オーランド, 米国)

9. Hachiya N. Innovation of Laser Micro Dissection System for the Psychogeriatric study. World Psychiatric Association Regional Congress, Osaka International Convention Center. 2015.6. (大阪)(オーガナイザー)
10. 八谷如美. ダイレクトバイオロジーの創成. 第一回ダイレクトバイオロジー研究会. 2015.2. (東京)(オーガナイザー)
11. 八谷如美, 宮下佳奈. ラマン共焦点イメージング微細マイクロダイセクターの開発. 京都大学原子炉実験施設専門研究会. 2014. 12. (大阪)
12. Hachiya N. ALMD and Unfoldin-nnovation for protein analysis- Japan-Hungary Seminar "Mechanism and regulation of aberrant protein aggregation" 2014. 11. (大阪)
13. 加藤大樹, 福島実紀, 宮下佳奈, 鈴木森香, 西島佳奈, 八谷如美. 正常型プリオンタンパク質が引き起こす神経変性機構の解析. 第87回日本生化学会大会. 2014. 11. (京都)
14. Hachiya N. Analysis of psychiatry-nanotechnology as a tool- 19th ICGP Congress. 2014. 10. (つくば)(オーガナイザー)
15. 八谷如美. 細胞内異常凝集体の直接解析. 第14回蛋白質科学会. 2014. 6. (横浜)

〔図書〕(計 1 件)

1. Suzuki M., Kato H., Hachiya N. Mitochondrial Physiology and Cerebro-Spinal Protection. Neuroanesthesia and Cerebro-Spinal Protection (ed. Uchino H, Ushijima K, Ikeda Y). Chapter 6. 63-70, Springer. 2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称:レーザーマイクロダイセクターおよびレーザーマイクロダイセクション方法

発明者:八谷如美, 紋川亮

権利者:東京医科大学, 東京都立産業技術研究センター

種類:特許

番号:特願 2016-008947. 2016.1

出願年:2016年

国内外の別: 国内

名称:レーザーマイクロダイセクターおよびレーザーマイクロダイセクション方法

発明者:八谷如美, 紋川亮

権利者:東京医科大学, 東京都立産業技術研究センター

種類:特許

番号:特願 2016-008946. 2016.1

出願年:2016年

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

八谷 如美 (Hachiya, Naomi)

研究者番号: 30408075