

平成30年 6月26日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18616

研究課題名(和文)生態と進化から解明する深海性多毛類の硫化水素適応戦略

研究課題名(英文) The comparative study of adaptation strategy for hydrogen sulfide between deep-sea polychaete species

研究代表者

小糸 智子 (KOITO, Tomoko)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：10583148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：熱水噴出域は硫化水素が多量に含まれる有毒環境である。本研究では、深海性多毛類(マリアナイトエラゴカイ、ウロコムシ類)に着目し、環境中の硫化水素無毒化戦略を明らかにするため、ヒポタウリン・タウリン合成経路を明らかにした。さらに、硫化物濃度によってタウリン合成に關与する酵素遺伝子の発現量が増減することを見出した。したがって、環境中の硫化物濃度によってタウリン・ヒポタウリンの合成量を変えていることが示唆された。種間比較では、タウリン合成に關与する酵素遺伝子の数やそれらが増減する硫化物濃度が異なっており、同所的に生息しているにも関わらず硫化水素への適応戦略が異なっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The deep-sea hydrothermal vents are known to belch out sulfide-rich fluid. Although hydrogen sulfide is harmful for animals, it has been observed the flourishing invertebrate communities. In this study, we focused on the two polychaete species (*Paralvinella hessleri* and *phyllodocida*) which inhabit sympatrically, to reveal the adaptation mechanism for ambient hydrogen sulfide. Based on our results, we found that both species synthesize the hypotaurine and taurine in their body using taurine synthesis pathway which was identical with mammalian pathway. Furthermore, the expression levels of enzyme genes which involve in taurine synthesis were up or down regulated by sulfide exposure level. Thus, it is considered that deep-sea polychaetes could response to ambient hydrogen sulfide and change the level of synthesis of taurine.

研究分野：分子生物学

キーワード：タウリン合成経路 ヒポタウリン チオタウリン 深海性多毛類

1. 研究開始当初の背景

深海底には、数百に熱せられた海水が硫化水素や重金属とともに噴出する熱水噴出域が存在する。しかしながら、この有毒な環境でも無脊椎動物を中心とした豊かな生物群集が存在する。これらは化学合成生物群集とよばれ、硫黄酸化細菌など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内に共生菌として保有することによりエネルギーを得ている。つまり、これらの生物が生存す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。したがって、何らかの硫化水素無毒化機構が発達していると考えられてきた。

近年、チオタウリン合成が汎用性の高い硫化水素無毒化機構と考えられている。チオタウリンは含硫アミノ酸とよばれる無毒な物質で、前駆体のヒポタウリンよりも硫黄原子が1つ多い構造である。そこで、環境中の硫化水素とヒポタウリンを反応させ、チオタウリンを合成することで無毒化していると考えられてきた。このことから、体内のチオタウリン量は環境中の硫化水素濃度に相関することが示唆されてきた。しかしながら、既往研究では体内に共生菌を保有する生物に主眼を置いた研究が多く、共生菌を保有しない生物についてはほとんど研究されていない。一方、熱水噴出域には多量に生物が存在するが、熱水噴出の位置によって生物相が異なることが経験的に分かっている。そこで、熱水噴出域周辺に生息する生物は動物門に関係なくチオタウリン合成による無毒化を行っており、それは環境中の硫化水素濃度と相関するという仮説を立て、これまで環境硫化水素濃度測定とともに様々な無脊椎動物のアミノ酸分析を行ってきた。その過程で、硫化水素に最も曝露される場所に優占して生息する多毛類であるイトエラゴカイとウロコムシを用いて硫化物曝露実験を行なったところ、イトエラゴカイは4時間までチオタウリン量が増加し、その後減少した。このことから、ほぼ固着性で硫化水素濃度が変化しないため、必要に応じてチオタウリンを合成すると考えた。また、個体が非常に小さいことから、ヒポタウリンを原料の状態に貯蔵しておき、迅速にヒポタウリン合成を行なうと推察した。一方、ウロコムシのチオタウリン量はほぼ変化しなかった。しかし、1gあたりの量で比較するとウロコムシはイトエラゴカイの10倍量のヒポタウリン量を維持していた。そこで、ウロコムシは硫化水素の濃淡がある場所を移動するため、迅速にチオタウリン合成ができるよう多量のヒポタウリンを貯蔵していると考察した。すなわち、同じ多毛類でありながら、生態が異なるために環境応答様式に差異が生じるものと推測できるが、これが深海の極限環境へ進出してから獲得したものであるかは検証していない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、深海性多毛類の適応進化の過程を硫化水素無毒化機構から解明することである。そこで、深海性多毛類は硫化物に対する応答の迅速さと体内に蓄積する原料は種により異なるという作業仮説を立てた。チオタウリンはヒポタウリンから合成され、ヒポタウリンはタウリンから、タウリンはシステインから、というように生物体内では酵素の働きにより何段階かで合成されている。しかし、哺乳類や一部の無脊椎動物ではヒポタウリン合成経路が明らかにされているが、多毛類のヒポタウリン合成経路は全く明らかにされていない。そこで、本研究では深海性多毛類の系統を明らかにするための分子系統解析を試み、さらに多毛類のヒポタウリン合成に関わる酵素遺伝子の有無を確認し、遺伝子発現定量を行ない、生態の異なるマリアナイトエラゴカイとウロコムシ類で比較することで、生態の違いがチオタウリン合成による硫化水素無毒化能力と関係しているのか考察した。

3. 研究の方法

(1) 生物採集

研究航海『かいよう』KY15-07において、伊豆小笠原海域明神海丘およびベヨネース海丘より無人探査機“ハイパードルフィン”を用いてチムニーを採取し、そこに付着しているマリアナイトエラゴカイを含む多毛類を複数種採集した。一部は採集直後に液体窒素により凍結した。

(2) 短期硫化物曝露実験

採集した多毛類のうち、マリアナイトエラゴカイおよびウロコムシ類を700mlの人工海水に馴致し、0.5mM、20mMに調整した硫酸ナトリウム溶液を添加した。0、30分、1時間、4時間後にサンプリングし、凍結保存した。

(3) 系統解析

採集した多毛類のうち、形態的に異なる数種から全DNAを抽出し、ミトコンドリアDNA COI領域を増幅した。得られた配列とDDBJ/EMBL/GenBankに登録されている多毛類の塩基配列と併せてアライメントを行ない、MEGAおよびMrBayesによって系統解析を行なった。

(4) 次世代シーケンサを用いたRNA-Seq

採集直後のマリアナイトエラゴカイおよびウロコムシ類から全RNAを抽出し、次世代シーケンサによるRNA-Seqに供した。得られた配列をアセンブルした。タウリン合成酵素や硫黄代謝に関与する遺伝子(CDO1、CSAD、ADO、GAD1、SDO、ST、SQR)の類似配列をGenBankより引用し、アセンブルしたコンティグをlocal blastで検索した。

(5) タウリン合成に関与する酵素遺伝子の組織発現解析

(4)で得られた類似配列のうち、マリアナイトエラゴカイCDO1、CSAD、ADO、GADについてcDNAの単離を行ない、一次構造を明ら

かにするとともに、マリアナイトエラゴカイの鰓、頭部、体幹部、尾部から抽出、逆転写した cDNA に対して PCR を行ない、各酵素遺伝子の組織間での発現量比較を行なった。また、(2)の硫化物曝露で用いた個体から RNA を抽出し、リアルタイム PCR による発現定量を行なった。

(6) 硫化物曝露個体を用いた RNA-Seq

(2)の実験で曝露を行なった多毛類のうち、0.5mM、20mM で 30 分間曝露した群およびコントロール群の 3 個体ずつから RNA を抽出し、次世代シーケンサを用いて RNA-Seq を実施した。得られた配列は MASER 上に設定されているパイプラインを用いてアセンブルおよびアノテーション、RPKM の算出を行なった。また、アセンブルしたコンティグを KAAS 上で検索し、アノテーションを付したのち KEGG のパスウェイ解析を行なった。

4. 研究成果

系統解析の結果、採集した深海性多毛類はウロコムシ科、ゴカイ科、カザリゴカイ科、エラゴカイ科、ミズヒキゴカイ科に属することが明らかとなった。一方、形態的に明らかに異なる 3 種の塩基配列が同一であったため、28S rRNA、ミトコンドリア DNA 16S rRNA、Cyt b、ND4 領域での塩基配列解読も行なったが、いずれも同一の配列となった。したがって、正確な系統関係を得るのは困難であると判断した。過去に 1 つのチムニーから採取したウロコムシ類が 4 つの異なる系統を示した例もあることから、将来的にはこれら深海性多毛類の形態および系統関係を詳細に調べていく必要がある。

マリアナイトエラゴカイとウロコムシ各 1 個体から得た RNA-Seq をアセンブルしたところ、それぞれ約 10 万コンティグを得た。得られたコンティグの Local blast の結果、既報の CDO、CSAD、ADO、GAD と相同性を示す配列が存在した。その部分配列から、マリアナイトエラゴカイにおいてクローニングを実施し、これら 4 種類の酵素遺伝子の完全長を単離することができた。したがって、マリアナイトエラゴカイは脊椎動物で明らかにされているタウリン合成経路によってヒポタウリンやタウリンを合成している可能性が示唆された。組織ごとの半定量 PCR では、CDO 1 が全ての組織でほぼ一定の発現をしているのに対し、ADO や CSAD は体幹部付近での発現、GAD では頭部での発現がみられ、組織によって発現量が異なる可能性が示唆された。一方、4 時間までの硫化物曝露実験に使用した個体で行なったリアルタイム PCR の結果、GAD を除いて顕著な遺伝子発現の増減はみられなかった。つまり、曝露される硫化物濃度や曝露される時間によって、タウリン合成に関与する酵素そのものが増減する可能性は低いと考えられる。

硫化物に 30 分間曝露したマリアナイトエラゴカイおよびウロコムシ類の RNA-Seq をア

センブルし、パスウェイ解析を行なったところ、マリアナイトエラゴカイではタウリン合成経路に関与する先述の 4 つの酵素遺伝子に加え、GGT が検出された。また、ウロコムシ類では GGT、BAAT、tauD が検出された。哺乳類では、GGT はタウリンから 5-グルタミルタウリン、BAAT はタウリンからタウロコール酸塩、tauD はタウリンから亜硫酸塩、アミノアセトアルデヒド合成に関与することが知られている。これらを総合すると、マリアナイトエラゴカイとウロコムシ類は哺乳類で知られているタウリン合成経路によってヒポタウリンやタウリンを合成していることが示唆された。しかしながら、ヒポタウリンからタウリンへ触媒する Hypotaurine dehydrogenase が RNA-Seq では検出されなかった。したがって、ヒポタウリンからタウリンを直接合成していない可能性がある。そして、合成したタウリンの代謝についてはマリアナイトエラゴカイとウロコムシで異なっており、ウロコムシ類のほうがバリエーションに富んでいることが推察された。これらの酵素遺伝子の RPKM を曝露した硫化物濃度と比較すると、マリアナイトエラゴカイの CDO1 はコントロール群が最も低く、0.5mM のとき最も高かった。一方、GGT は硫化物濃度が高くなるにつれ RPKM も高くなっていった。また、その他の酵素遺伝子は硫化物濃度に対して顕著な増減はみられなかった。ウロコムシ類の CDO1 は硫化物濃度の増加に伴い、RPKM も減少した。また、CSAD、ADO、GGT の RPKM はコントロール群で最も高く、硫化物曝露群は 0.5、20mM いずれも減少する傾向がみられた。これらのことから、マリアナイトエラゴカイとウロコムシ類のタウリン合成に関与する酵素遺伝子は環境中の硫化物の存在によって発現量が変化し、さらに種によって発現量が増加する濃度が異なることを明らかにした。

本研究により、深海熱水噴出域で同所的に生息しているマリアナイトエラゴカイとウロコムシが哺乳類と同じ合成経路によってタウリンおよびヒポタウリンを合成していることを明らかにした。さらに、タウリン合成に関与する酵素遺伝子は環境中の硫化物の有無、濃度によって発現量が異なることを見出した。つまり、環境中の硫化物濃度に応答し、タウリンやヒポタウリンを合成していると考えられる。種間による代謝経路の違い、タウリン合成に関与する酵素遺伝子の発現様式の差異が生じる理由として、マリアナイトエラゴカイとウロコムシ類の細胞容積の差などが挙げられるが、この差異を明確にするためには代謝産物の分析等の検証が必要である。また、本研究の動機であったタウリン関連化合物量が種間で大きく異なっていた理由としては、タウリン、チオタウリン合成以外の経路によって硫黄を代謝している可能性や餌由来のタウリンを取り込んで代謝に用いている可能性が考えられる。今後は

これら2種が摂餌する餌にタウリン関連化合物が含まれているのか、チオタウリン合成以外に硫化水素を無毒化する機構が存在するのかを各々の生態と照らし合わせながら探索する予定である。

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 2 件)

Nagasaki, T., Koito, T., Nemoto, S., Ushio, H. and Inoue, K. (2017): Simultaneous analysis of free amino acids and taurine-related compounds in deep-sea mussel tissue using reverse phase HPLC. *Fisheries Science* 84:127-134 (査読有)

Koito T., Liu, W., Morimoto, S., Inoue, K. and Toyohara, H. (2016): Comparison of taurine related compounds in deep- and shallow-water mussel species. *Plankton and Benthos Research* 11 (3):81-86 (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

小糸智子他：深海性・浅海性多毛類のタウリン関連化合物代謝の比較。日本水産学会秋季大会。(2016)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

小糸智子 (2017) *Marine Voice* 21 vol.299 ,10-11

頁 海底温泉で毒と暮らす生物を研究する。一般社団法人日本埋立浚渫協会編 全 28 頁

井上広滋, 角村(金城)梓, 長崎稔拓, 小糸

智子 (2017) 月刊海洋 558, 249-252

頁 タウリン蓄積機構を使いまわして深海熱水噴出域へ In: 海洋生物の適応戦略(下) 新規技術・現象からの新展開 海洋出版株式会社 全 43 頁

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・講師
研究者番号：10583148

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

井上 広滋 (INOUE, Koji)
長崎 稔拓 (NAGASAKI, Toshihiro)