

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07519

研究課題名(和文) 深海性二枚貝と化学合成細菌の細胞内共生系の基盤解明

研究課題名(英文) Molecular basis of the intracellular symbiosis between deep-sea bivalve and the chemoautotrophic bacteria

研究代表者

吉田 尊雄 (YOSHIDA, Takao)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・地球環境部門(海洋生物環境影響研究センター)・主任技術研究員

研究者番号：60399566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：化学合成生態系における宿主と共生細菌の共生機構の維持メカニズムについて、共生系としての宿主と共生細菌の相互作用を司る分子メカニズムを明らかにすることを目的として研究を実施した。化学合成生態系に優占種として生息する二枚貝類を用いて、宿主と共生細菌の発現している遺伝子を網羅的に解析し、その発現遺伝子の機能から、宿主と共生細菌それぞれの代謝経路などを比較した。その結果、有機物を宿主と共生細菌で分担して合成する代謝経路が見つかり、共生系として、有機物合成することがわかった。これは、共生系としての相互作用が強く働いていることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学合成生態系に生息する多くの動物は化学合成独立栄養細菌との共生関係を持つ共生系が存在する。他の共生系とは大きく異なり、宿主の多くは口や消化管が退化的で自ら食物摂取せず、細胞内に共生する化学合成独立栄養細菌が無機炭素やメタンから合成した有機物に完全に依存するとされている。本研究により、このユニークな共生系の実態を明らかにすることができ、共生による生物適応生存戦略の理解を深めることができると期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanism for maintaining the endosymbiosis between host animal and chemosynthetic bacteria, dual transcriptome analysis of host and endosymbiont was conducted using bivalves living in chemosynthetic ecosystems. Comparing the metabolic pathways both host and symbionts, we found that host bivalve was shown to share the metabolic pathway including organic compound biosynthesis between host and endosymbiont, suggesting tight interaction in this endosymbiosis.

研究分野：共生ゲノム進化

キーワード：共生 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球上には動物と微生物の共生系（以下、動物を宿主、微生物を共生細菌と呼ぶ）が数多くみられ、昆虫などの多くの場合、宿主は食物から摂取できず合成できないアミノ酸などの一部の有機物を共生細菌から供給を受け栄養としている。深海の熱水域やメタン湧水域には、化学合成生態系が存在し、そこに生息する多くの動物は化学合成独立栄養細菌との共生関係を持つ共生系が存在する。他の共生系とは大きく異なり、化学合成生態系の共生系では、宿主（主に二枚貝）の多くは口や消化管が退化的で自ら食物摂取せず、細胞内に存在する共生細菌が無機炭素やメタンから合成した有機物に宿主は完全に依存するとされている。つまり、昆虫などの他の共生系とは大きく異なり、宿主の共生細菌への依存度が極めて高い。このような共生系は、真核生物の進化を考える上でも重要かつ特異な特徴を持つにも関わらず、飼育や採取が困難なために、陸上などの共生系ほど研究が進んでおらず、どのような仕組みで共生が維持成立しているのか、詳細は解明されていない。

これまでに化学合成生態系で優占種として生息する二枚貝類を用いて、その共生機構を明らかにするために、まず共生細菌の働きや共生機構を明らかにするために、共生細菌のゲノム解析や比較ゲノム解析を行った。共生細菌は、硫化水素やメタンから ATP を合成し、アミノ酸などの有機物を合成する遺伝子セットを持っていた。しかし、糖（グルコース）を合成する遺伝子セットを持っていなかった。実際には、どの遺伝子が働き、有機物を作り出し、宿主へ供給しているかは、具体的には解らなかった。

共生細菌が合成する有機物の宿主への供給には2つの形式（共生細菌による有機物の分泌と、宿主による共生細菌の消化）が仮説として考えられている（Fisher, *Aquatic Science*, 2, 399(1990)）。共生細菌が自ら合成した有機物を分泌するには、複数の輸送系が必要となるが、共生細菌のゲノム情報では、既知の輸送系はほとんど存在せず、どのように分泌しているかは不明である。そのため、宿主は共生細菌を分解して栄養を得ていると考えられてきたが、これまでの我々のエラの電子顕微鏡観察からは、共生細菌が消化されている様子は見られず、分泌なのか消化なのかは、はっきりしていないという現状があった。

2. 研究の目的

本研究では、化学合成生態系で優占種として生息する二枚貝類シマイシロウリガイとシンカイヒバリガイを用いて、共生細菌及び宿主の大規模発現遺伝子解析を行い、宿主と共生細菌の発現遺伝子の比較を行うことで共生系としての全体像を捉えることを目的とした。これまでの結果から、宿主が通常エネルギー源とするグルコースを共生細菌は作り出せないため、宿主は共生細菌によって合成される有機物を利用・変換し、かつ体を構成する成分の一部としても利用していると考えた。そこで、特に、代謝経路を中心にして、共生細菌が合成する有機物の代謝経路と、その有機物が宿主にどのように変換され利用されているかについての分子メカニズムを明らかにすることにした。本研究により、共生細菌と宿主間の栄養供給という共生の根幹をなす現象の理解に重要な知見を与え、共生系の維持や成立に関する意義を示すことを目指した。

3. 研究の方法

二枚貝類シマイシロウリガイおよびシンカイヒバリガイを材料として、共生細菌が細胞内共生する器官であるエラとシマイシロウリガイの卵を用いて大規模発現遺伝子解析を実施した。各エラは、深海から潜水船で採取後、生息環境中または船上で、RNAlater 中に入れて凍結保管したものをを用いた。一方、卵は、シマイシロウリガイにセロトニンを注射し放卵した卵を集め、エ

ラ同様に RNAlater 中に入れて凍結保管したものをを用いた。各エラおよび卵から NucleoSpin RNA キット (MACHEREY-NAGEL Inc.社) を用いて全 RNA を抽出し、その後、全 RNA 中に含まれる宿主及び共生菌のリボソーム RNA を取り除く試薬 RiboMinus Eukaryote system v2 (サーモフィッシャーサイエンティフィック Thermo Fisher Scientific社) 及び Ribo-Zero rRNA Removal Kit for Gram-Negative Bacteria (Epicentre 社) を用いて、リボソーム RNA を取り除いた。その後、SMARTer Strand RNA-Seq Kit(クローンテック社)を用いて cDNA を作成し、KAPA Hyper Prep Kit (KAPA Biosystems 社)を用いて大規模発現遺伝子解析用のライブラリーを作成した。ライブラリーのシーケンス (250 bp ペアエンド) は、Illumina HiSeq2500 platform (Illumina 社)を用いて行った。得られた配列のクオリティチェックとアダプター配列の除去を Trimmomatic を用いて行った後、Trinity によりアセンブルした。アセンブルにより得られた配列は、Blast により相同性解析を行い、宿主と共生細菌由来の配列を分別した。また、本研究の立案時においては、メタボローム解析を実施する予定であったが、後述するようにトラブルに見舞われたため、大規模発現遺伝子解析を中心に研究を実施した。

4 . 研究成果

本研究では、宿主と共生細菌の遺伝子発現を精製段階で分けることなく、同時にシーケンスデータを取得し、宿主と共生細菌のそれぞれが発現している遺伝子の種類と発現量を比較することを目指した。そのためには、サンプルから全 RNA のみを自己分解が少なく、高収率で精製した上で、発現量が多いリボソーム RNA のみを除去した RNA 精製処理して解析することが重要となってくる。シマシロウリガイを材料にした解析では、エラから抽出した RNA においては、リボソーム RNA 除去処理後においても、少量のリボソーム RNA 由来のピークが確認された。また、高分子のバンドが得られ、DNA の混在が疑われたため、宿主と共生細菌の遺伝子を PCR により増幅したところ、宿主と共生細菌ともに DNA の混在が認められた。これは、全 RNA 抽出後に DNase 処理を強めに行うことで改善できた。また 2 回のリボソーム RNA 除去処理を行うことで改善された。しかしながら、アセンブル後の配列を調べるとリボソーム RNA の配列が大量含まれ、短い配列ばかりで解析が難しかった。これは、DNAase 処理を長時間行ったため、長鎖の RNA が分解してしまったためと考えられた。一方、シマシロウリガイの卵を用いた場合には、アダプター配列のみなど、共生細菌と宿主の配列データ以外の配列が多く得られ、原因は、卵から得られる RNA 量が少ないために生じていると考えられた。

当初、シマシロウリガイを中心に解析することを考えていたが、よい結果が得られないために、シンカイヒバリガイを用いた解析を実施することにした。シマイシロウリガイでみられた問題なく、シーケンス用のエラからのライブラリーを作成することができた。これは二枚貝の生息地でのサンプリング時、個体を潰して直接 RNAlater に入れてサンプリングしたことにより、RNA の分解が防げたためと考えられた。クオリティチェック後、約 16000 万リードを得て、そのうちリボソーム RNA の割合は約 15% 含まれた。得られたリードをアセンブルし精査後、約 24 万の配列 (約 9200 万リード) が得られた。得られた配列のうち、約 2.6 万配列 (リードの 64.3%) は宿主(mollusca)に相当し、約 1400 配列 (リードの約 10.8%) は共生細菌(Mathylococcales)に相当する配列となり、得られたリード約 75% が宿主と共生細菌由来であることがわかった(図 1A)。宿主は約 2.3 万のタンパク質遺伝子の配列が得られ、共生細菌は、約 2500 のタンパク質遺伝子の配列が得られた。共生細菌のゲノムには約 2800 のタンパク質遺伝子がコードされており、発現しているタンパク質遺伝子は、ゲノムにコードされている約 9 割が発現していた。宿主と共生細菌の遺伝子の発現量の頻度を比べると、発現量のピーク値は、宿主と共生細菌では、ほぼ一

致したピークを持っていた(図 1B)。これは、宿主と共生細菌の遺伝子発現は同程度に発現していることを示している。発現遺伝子の内部標準としてリボソームタンパク質群と、中央代謝群やアミノ酸合成に關与する遺伝子群などの発現量を比較すると、宿主よりも共生細菌が高いレベルでこれらの遺伝子群が発現していることがわかった(図 2)。これは、宿主に比べると共生細菌は、エネルギーを作り出し、アミノ酸合成を活発に行なっていることが示唆された。また、宿主の細胞膜の構成成分となるコレステロールは、共生細菌が作り出すステロール中間体からを受け取り宿主が合成している経路が見つかり、宿主と共生細菌で分担して合成する代謝経路があることがわかった。共生系として有機物合成することがわかった。これは、共生系としての宿主と共生細菌との相互作用が強く働いていることを示している。今後より詳細に調べる予定である。

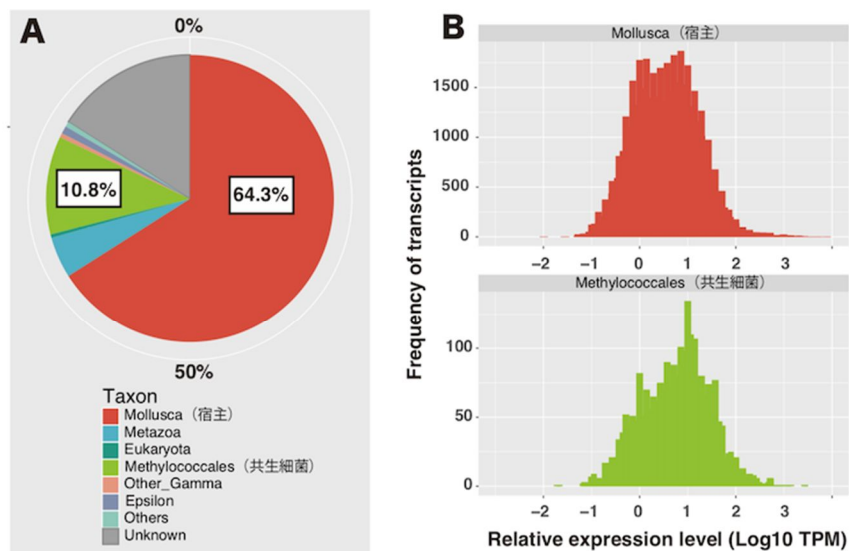


図 1 遺伝子発現解析結果 1

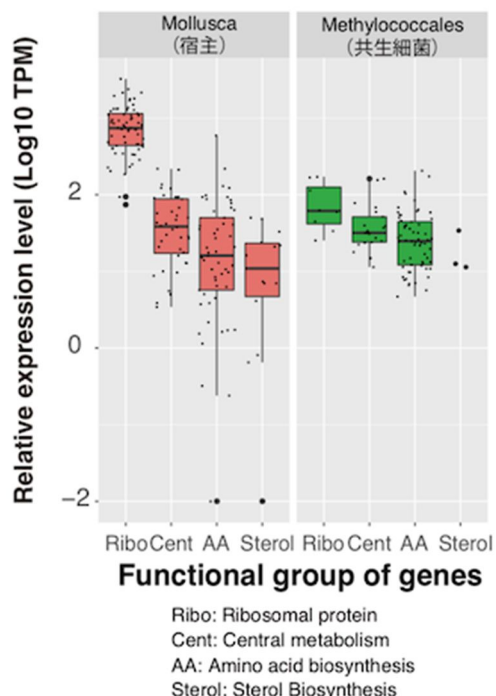


図 2 遺伝子発現解析結果 2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tame Akihiro, Ozawa Genki, Maruyama Tadashi, Yoshida Takao	4. 巻 74
2. 論文標題 Morphological and functional characterization of hemocytes from two deep-sea vesicomid clams <i>Phreagena okutanii</i> and <i>Abyssogena phaseoliformis</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Fish & Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 281 ~ 294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.fsi.2017.12.058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohishi Kazue, Nakamura Yoshimitsu, Kusaka Chiho, Nagai Yukiko, Nakazawa Masatoshi, Yoshida Takao, Maruyama Tadashi	4. 巻 26
2. 論文標題 Monoclonal antibodies that recognize symbiotic bacteria and hemocytes in the deep-sea vesicomid clam <i>Phreagena okutanii</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JAMSTEC Report of Research and Development	6. 最初と最後の頁 75 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.5918/jamstecr.26.75	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Saito Chiaki, Ohishi Kazue, Kakizoe Yuka, Saito Masafumi, Mishima Hideki, Hongo Yuki, Nakamura Yoshimitsu, Nakazawa Masatoshi, Yoshida Takao, Maruyama Tadashi	4. 巻 27
2. 論文標題 Monoclonal antibodies against leukocytes in the beluga whale, <i>Delphinapterus leucas</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JAMSTEC Report of Research and Development	6. 最初と最後の頁 119 ~ 126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.5918/jamstecr.27.119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ikuta Tetsuro, Tame Akihiro, Saito Masaki, Aoki Yui, Nagai Yukiko, Sugimura Makoto, Inoue Koji, Fujikura Katsunori, Ohishi Kazue, Maruyama Tadashi, Yoshida Takao	4. 巻 93
2. 論文標題 Identification of cells expressing two peptidoglycan recognition proteins in the gill of the vent mussel, <i>Bathymodiolus septemdiarum</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fish & Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 815 ~ 822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.fsi.2019.08.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 藤倉 克則、木村 純一編著：吉田尊雄(第1章, 1.2節, 1.3節)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 296
3. 書名 深海 極限の世界 生命と地球の謎に迫る	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----