

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2008～2010

課題番号：20687003

研究課題名(和文) 深海底熱水活動域における化学合成微生物の共生機構を分子的に理解する

研究課題名(英文) Towards a molecular understanding of symbiotic mechanism of chemoautotrophs in deep-sea hydrothermal vent environments.

研究代表者

中川 聡 (NAKAGAWA SATOSHI)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：70435832

研究成果の概要(和文)：

本研究は、深海底熱水孔環境において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。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。これまでの研究において、深海底熱水孔環境に生息する共生微生物およびその宿主生物の両者について、糖鎖の発現解析・プロファイリング・構造解析を行い、両者の相互認識・相互作用に寄与する可能性の高い特異な新奇糖鎖を見いだすことに成功した。

研究成果の概要(英文)：

The main objective of this study is to reveal the molecular mechanisms underlying symbiont-host relationship in deep-sea hydrothermal vent environments. We have focused on sugar chains, glycans. We have succeeded in detection, profiling, structure determination of glycans for both symbionts and their host animals. Glycans having quite unique structures were identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
総計	19,900,000	5,970,000	25,870,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生態・環境

キーワード：深海底熱水孔環境、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・相互作用の研究にとって最適のフィールドである。特に熱水噴出孔の近傍に棲息する大型生物（甲殻類、巻貝な

ど)は「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(ϵ -Proteobacteria と呼ばれる微生物)を選別・獲得する。 ϵ -Proteobacteria が昆虫等のモデル共生微生物(α や γ -Proteobacteria と呼ばれる微生物)と決定的に異なるのは、①ホストレンジおよび共生形態が多様(多毛類や甲殻類に細胞外共生、巻貝においてはエラに細胞内共生)、②ホスト生物の全炭素源を賄う化学合成微生物である、③病原性は無いが系統学的に後述の病原性微生物の祖先にあたる点である。しかしながら、共生微生物とホスト生物間の相互作用や相互認識に関わる分子メカニズムは全く知見がなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、深海底熱水孔環境において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、糖鎖生物学的手法を用いて分子レベルで解明することにある。特に深海棲共生微生物が有する特異な糖鎖合成系(NLG)に注目し、「NLGが本微生物群と幅広いホスト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突破口を切り開く。

3. 研究の方法

共生微生物における糖鎖の発現を確認するため、2次元電気泳動と糖鎖染色の手法を組み合わせ用いた。さらに、発現している糖鎖の種類や構造を解析するため、ヒドラジン分解法を用いて糖鎖を遊離し、精製・ラベル化を行なった後にMALDI-TOFMSによる質量解析を行なった。

また、共生微生物の細胞表層に高発現している糖鎖をプロファイリングするため、FISH(fluorescent in-situ hybridization)法により染色した微生物細胞を、レクチンをスポットしたマイクロアレイにより検出した。同様に、糖鎖をスポットしたマイクロアレイにより、ホスト生物の血清中のレクチン活性を検出した。

さらに、共生微生物とホスト生物の細胞を濾過と遠心分離により物理的に分画し、上述した糖鎖精製・ラベル化・MALDI-TOFMS解析を用い、様々な生理状態における細胞内共生微生物およびホスト生物の糖鎖プロファイルを解析した。

4. 研究成果

2次元電気泳動と糖鎖染色を組み合わせた解析により、共生微生物において多数の糖鎖修飾タンパク質を検出し、とくに基盤的役割を担うタンパク質の多くが糖鎖修飾を受けていることを見いだした。糖鎖精製法・ラベル化法・MALDI-TOFMSの設定を最適化することにより、微量の糖鎖を高感度に検出し構造解析することが可能な系を確立し、部分的ではあるが共生微生物において発現している糖鎖のプロファイル決定と大まかな構造解析を行うことに成功した。加えて、アレイ技術を用いて、細胞表層に高発現している糖鎖をプロファイリングすること、さらに、ホスト生物の血清中のレクチン活性を検出することに成功した。また、共生微生物とホスト生物の細胞を物理的に分画し、糖鎖精製法・ラベル化法・MALDI-TOFMS解析法を用い、様々な生理状態における細胞内共生微生物およびホスト生物の糖鎖プロファイルを解析することに成功した。

これらの過程において、共生微生物に発見された糖鎖の一部は極めて新規性が高く、共生微生物-ホスト生物間の相互認識機構に関与する可能性が高いと考えられる。また、共生微生物を分離できない細胞共生系においても、細胞外共生系と同じレベルで、異種生物間の糖鎖を介した相互認識・相互作用機構を解析し、総合的に体系化するための知見を得ることが出来た。加えて、ホスト生物において発現している糖鎖のプロファイルが、ホスト生物の生理状態を敏感に反映する指標として応用可能であることを見いだした。本研究を通じて見いだされた糖鎖構造は、微生物における真核生物型糖鎖の生理機能やその進化過程の研究のみならず、病理学・免疫学といった幅広い研究分野へのインパクトが非常に大きい。加えて、インド洋中央海嶺で実施した研究調査航海において、細胞内共生微生物を有する希少巻貝の大群集を発見した。

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10件)

- ① Kawagucci, S, Chiba, H, Ishibashi, J, Yamanaka, T, Toki, T, Muramatsu, Y, Ueno, Y, Makabe, A, Inoue, K, Yoshida, N, Nakagawa, S, Nunoura, T, Takai, K, Takahata, N, Sano, Y, Narita, T, Teranishi, G, Obata, H, Gamo, T, Hydrothermal fluid geochemistry at the Iheya

- North field in the mid-Okinawa Trough: Implication for origin of methane in subseafloor fluid circulation systems, *Geochem J*, 45, 109-124, 2011、査読有り
- ② Watsuji, T., Nakagawa, S., Tsuchida, S., Toki, T., Hirota, A., Tsunogai, U., Takai, K., Diversity and function of epibiotic microbial communities on the galatheid crab, *Shinkaia crosnieri*, *Microbes Environ*, 25, 288-294, 2010、査読有り
- ③ Takaki, Y., Shimamura, S., Nakagawa, S., Fukuhara, Y., Horikawa, H., Ankai, A., Harada, T., Hosoyama, A., Oguchi, A., Fukui, S., Fujita, N., Takami, H., Takai, K., Bacterial Lifestyle in a Deep-sea Hydrothermal Vent Chimney Revealed by the Genome Sequence of the Thermophilic Bacterium *Deferribacter desulfuricans* SSM1, *DNA Res*, 17, 123-137, 2010、査読有り
- ④ Steinsbu, BO., Thorseth, IH., Nakagawa, S., Inagaki, F., Lever, MA., Engelen, B., Ovreås, L., Pedersen, RB., *Archaeoglobus sulfaticallidus* sp. nov., a novel thermophilic and facultatively lithoautotrophic sulfate-reducer isolated from black rust exposed to hot ridge flank crustal fluids., *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 2745-2752, 2010、査読有り
- ⑤ Takai, K., Miyazaki, M., Hirayama, H., Nakagawa, S., Querellou, J., Godfroy, A., Isolation and physiological characterization of two novel, piezophilic, thermophilic chemolithoautotrophs from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Environ Microbiol*, 11, 1983-1997, 2009、査読有り
- ⑥ Sawabe, T., Yoshizawa, A., Kawanishi, Y., Komatsu, E., Nakagawa, S., Sawabe, T., Ootubo, M., Satomi, M., Yano, Y., Yamazaki, K., Multi-probe-fluorescence in situ hybridization for the rapid enumeration of viable *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbes Environ*, 24, 259-264, 2009、査読有り
- ⑦ Nakagawa, S., Takaki, Y., Nonpathogenic Epsilonproteobacteria. *Encyclopedia of Life Sciences*, a002189, 2009、査読有り
- ⑧ Imachi, H., Sakai, S., Hirayama, H., Nakagawa, S., Nunoura, T., Takai, K., Horikoshi, K., *Exilispira thermophila* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic spirochaete isolated from a deep-sea hydrothermal vent chimney., *Int J Syst Evol Microbiol*, 58, 2258-2265, 2008、査読有り
- ⑨ Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai, U., Miyazaki, M., Miyazaki, J., Hirayama, H., Nakagawa, S., Nunoura, T., Horikoshi, K., Cell proliferation at 122 °C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 10949-10954, 2008、査読有り
- ⑩ Nakagawa, S., Takai, K., Deep-sea vent chemoautotrophs: diversity, biochemistry and ecological significance. *FEMS Microbiol Ecol*, 65, 1-14, 2008、査読有り
- [学会発表] (計 9 件)
- ① 中川 聡, インド洋の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、ブルーアース 11、2011 年 3 月 8 日、東京海洋大学品川キャンパス (東京都品川区)
- ② 中川 聡, インド洋の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、第 26 回 微生物生態学会大会、2010 年 11 月 25 日、筑波大学大会館 (つくば市)
- ③ 澤辺 智雄, 海藻糖質をエタノール水素発酵するビブリオの種同定、平成 22 年度日本水産学会春季大会、2010 年 3 月 28 日、日本大学生物資源科学部 (藤沢市)
- ④ 石澤 明子, 魚介類の粘液に対する腸炎ビブリオの化学走性、腸炎ビブリオシンポジウム、2009 年 11 月 26 日、岡山大学大学院自然科学研究科 (岡山市)
- ⑤ Sawabe, T., Chemotaxis of *Vibrio harveyi* using sequence type defined strains. *Vibrio 2009*, 2009 年 11 月 6 日、リオデジャネイロ・ブラジル
- ⑥ 中川 聡, 深海底熱水活動域に優占する化学合成微生物の群集遺伝学的解析、ブルーアース 2009、2009 年 3 月 13 日、立教大学 (東京都豊島区)
- ⑦ Nakagawa, S., Allelic diversity and population structure in deep-sea vent epsilon-Proteobacteria as determined from sequence analysis of housekeeping genes. *ASLO2009*, 2009 年 1 月 28 日、ニース・フランス
- ⑧ Nakagawa, S., Genome analysis of deep-sea vent epsilon-Proteobacteria. *ISSM Satellite Symposium*, 2008 年 11 月 15 日、中央大学 (東京都文京区)
- ⑨ Nakagawa, S., Population genetic analysis of deep-sea vent epsilon-Proteobacteria by multilocus sequence typing. *ISME12*, 2008 年 8 月 21 日、ケアンズ・オーストラリア

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：アルギン酸の分解方法

発明者：井上 晶、中川 聡

権利者：北海道大学

種類：特許

番号：特願 2010-065945

出願年月日：2010年3月23日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 聡 (NAKAGAWA SATOSHI)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：70435832

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

高井 研 (TAKAI KEN)

独立行政法人海洋研究開発機構・研究員

研究者番号：80359166

牧田 寛子 (MAKITA HIROKO)

独立行政法人海洋研究開発機構・研究員

研究者番号：40553219

澤辺 智雄 (SAWABE TOMOO)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授

研究者番号：30241376