

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380107

研究課題名(和文) 特殊なアミノ酸を用いて深海生物が硫化水素を無毒化するしくみ

研究課題名(英文) Mechanisms to detoxify hydrogen sulfide using special amino acids in deep-sea organisms

研究代表者

井上 広滋 (Inoue, Koji)

東京大学・大気海洋研究所・准教授

研究者番号：60323630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円、(間接経費) 4,590,000円

研究成果の概要(和文)：深海の熱水噴出域固有生物の硫化水素の毒性に対する適応機構を、アミノ酸の一種ヒポタウリンを手がかりとして解明を試みた。ヒポタウリンはタウリンの前駆体であるが、硫化水素と結合して無毒なチオタウリンとなることができ、その合成機構は適応の鍵となる。本研究では、シチヨウシンカイヒバリガイより海産無脊椎動物で初めてヒポタウリンの合成経路を解明し、それらの遺伝子が飼育環境中の硫化物濃度にかかわらず硫化物に曝される鰓で高発現していることを明らかにした。また、解明された経路を鰓のアミノ酸組成からも検証した。熱水噴出域の二枚貝類はタウリン合成経路の一部を活用することで熱水噴出域に進出したと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We studied the adaptation mechanisms to toxic hydrogen sulfide in deep-sea hydrothermal vent-specific animals through the analysis of the synthetic pathway of hypotaurine, which is a precursor of taurine and can bind to hydrogen sulfide and generate non-toxic thiotaurine. We identified the hypotaurine synthesis pathway, which has not been reported in any marine invertebrates, in the deep-sea mussel *Bathymodiolus septemdierum*. We also revealed that the genes of the enzymes involved in the hypotaurine synthesis actively expressed in the gill regardless of the sulfide concentration in the rearing water. We also analyzed the free amino acids including hypotaurine and its precursors to confirm the activity of the pathway. Bivalves may have acquired the habitat of hydrothermal vent area by utilizing a part of the taurine synthesis pathway.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：適応 特殊環境 深海 熱水噴出域 硫化水素 生理学 共生 無脊椎動物

1. 研究開始当初の背景

(1) 熱水噴出域の生態系

光合成に必要な光が届かない深海では、生物が生きるための有機物が不足するため、浅海に比べて生物の密度は一般に低い。しかし、深海にも例外的に生物密度の高い場所が存在する。その代表的なものは、地下でマグマにより熱せられた海水が噴出する熱水噴出域である。熱水噴出域には、熱水中に含まれる硫化水素などの化学物質の持つエネルギーを利用して有機物を合成する化学合成細菌が繁殖しており、熱水噴出域にすむ生物はこれら化学合成細菌がつくる有機物に主に依存して生活している。

(2) 硫化水素への適応機構の謎

熱水噴出域には、軟体動物、節足動物、環形動物などの無脊椎動物が高密度で生息している。これらの生物が化学合成細菌のつくる有機物を得るためには、化学合成細菌が生息する硫化水素に富む場所で生活する必要がある。加えて、これらの無脊椎動物の多くは、有機物の獲得を容易にするために化学合成細菌を体表や体内に共生させているため、自身が硫化水素に常に曝露されている必要がある。しかし、硫化水素は呼吸の反応を阻害する毒物であり、これらの生物がどのようにしてその毒性を回避しているのかはほとんどわかっていなかった。

(3) アミノ酸による毒性回避

近年、熱水噴出域に固有の無脊椎動物の組織には、ヒポタウリンおよびチオタウリンという物質が高濃度で含まれることがわかってきた。ヒポタウリンは海産無脊椎動物の主要な体成分であるタウリンの合成前駆体であり、多くの無脊椎動物の体内にも存在する。一方、チオタウリンは一般的な生物の組織にはほとんど含まれない物質である。チオタウリンは、ヒポタウリンに硫化水素イオンが結合することにより生成する。また、それ自身は無毒な物質である。従って、熱水噴出域に固有の生物は、硫化水素をヒポタウリンと結合させてチオタウリンに変換することにより、硫化水素を無毒化していると考えられる。この無毒化システムが成立するためには、硫化水素が浸入する組織にヒポタウリンを蓄積するしくみが重要であるが、海産無脊椎動物においてはヒポタウリン蓄積のしくみは殆どわかっていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、熱水噴出域固有の無脊椎動物の持つヒポタウリン蓄積機構を解明し、それを手がかりに硫化水素への適応機構とその進化について解明することである。

そのために、本研究では、日本近海の伊豆小笠原海域の熱水噴出域における優占種であり、常圧の水槽でも長期間の飼育が可能なシチヨウシンカイヒバリガイ *Bathymodiolus*

septemdiarium を主な研究対象として、ヒポタウリンを生合成する経路の解明を目指した。平行して、前課題(19380110)で単離したヒポタウリンを細胞に取り込むための輸送体の類縁分子も同定し、それらの進化的位置づけを検討した。

3. 研究の方法

(1) 研究対象生物

シチヨウシンカイヒバリガイは、海洋研究開発機構の研究船「なつしま」研究航海 NT10-08、NT11-09、NT13-05 において、無人潜航艇「ハイパードルフィン」を用いて伊豆小笠原海域の明神海丘および水曜海山で採集した。採集した個体の一部は船上で採集後速やかに解剖を行った。また、一部の個体は船上または下船後に様々な条件下での飼育やアミノ酸注入等を行った後に解剖を行った。解剖は、鰓、外套膜、閉殻筋、足など主要組織を切り出し、それぞれ液体窒素で急速凍結し、使用まで -80 °C で保存した。

(2) RNA 抽出

RNA は Trizol (Life Technology 社) や同等の試薬を用いて抽出した。

(3) cDNA クローニング

船上で解剖した個体の RNA から既報 (Inoue ら, FEBS Lett. 582. 1542, 2008) に従い cDNA プールを調製した。この cDNA プールを鋳型として、哺乳類でわかっている類似配列の保存性が高い部位に相当するプライマー、または次世代シーケンサー (Roche 454) によるトランスクリプトーム解析で得た部分配列から設計したプライマーを用いて PCR 法により配列の探索を行い、得られた部分配列から RACE 法により cDNA のコード領域を単離した。

(4) 分子系統解析

単離した配列とデータベースから得た類似配列について MAFFT または MUSCLE を用いてアラインメントし、RAxML または MEGA を用いて最尤法により行った。

(5) 逆転写 PCR

発現の組織特異性を調べるための逆転写 PCR は、特異的プローブを用いて既報 (Inoue ら, FEBS Lett. 582. 1542, 2008) に従って実施した。

(6) 硫化物、チオ硫酸への曝露

4 個の 20L の密封蓋つき水槽に 10L の海水と約 16 個体のシチヨウシンカイヒバリガイを入れ、実験開始時およびその後 8 時間ごとに各々の水槽に硫化ナトリウム九水和物結晶 1 mg または 10 mg、チオ硫酸ナトリウム五水和物結晶 10 mg を投与してすばやく溶解した。一つの水槽は無投与区 (対照区) とした。24 時間後、48 時間後 (各試薬を投入する前) に各水槽から 8 個体をサンプリングし、解剖・

凍結を行った。

(7) アミノ酸投与実験

生きていたシチヨウシンカイヒバリガイ個体の閉殻筋に、滅菌海水に溶解したチオタウリン、システイン、システインスルフィン酸 (CSA) などを閉殻筋に注射し、一定時間後に解剖、凍結を行った。

(8) 組織抽出物へのアミノ酸添加

シチヨウシンカイヒバリガイ鰓を磨砕し、磨砕液にシステイン、CSA などを添加して、一定時間後に凍結を行った。

(9) リアルタイム PCR

mRNA 量の比較は、Taqman Probe を用いる定量的リアルタイム PCR により行った。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technology 社) 等のキットを用いて逆転写して cDNA を合成し、単離した cDNA 配列から設計したプライマーとプローブを用いて、mRNA 量を比較した。内部標準として 18SrRNA を用いた。

(10) メタボローム解析

採集直後の個体の鰓と足、100 日間硫化物を与えずに飼育した個体の鰓各 5 個体分をプールして、キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) によるメタボローム解析を行った。分析は、Agilent CE-TOFMS System を用い、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社において実施した。

(11) 遊離アミノ酸分析

遊離アミノ酸は組織からエタノールで抽出し、PTC 化した後に逆相 HPLC により定量した。一般的な標準アミノ酸と、ヒポタウリン、チオタウリン、システインスルフィン酸を同時に定量できるように、既報の方法 (Koito et al. *Cah.Biol.Mar.* 51. 429, 2010) を改良して実施した。

4. 研究成果

(1) ヒポタウリン合成に関わる酵素をコードする cDNA の単離

ヒポタウリンはタウリンの前駆体である。タウリンの合成経路は哺乳類で研究が進んでおり、システインスルフィン酸 (CSA) 経路、システアミン経路、システイン酸経路の 3 つの経路が同定されている。前の二つはヒポタウリンを経由するが、システイン酸経路はヒポタウリンを経由しない。一方、タウリンを組織中に高濃度に含む貝類や、その他の海産無脊椎動物においても、タウリン合成経路に関する報告はこれまで無かった。そこで、哺乳類の配列から設計したプライマーでの PCR によるスクリーニングや、次世代シーケンサーによるシチヨウシンカイヒバリガイのトランスクリプトームデータの解析から、システインジオキシゲナーゼ (CDO) 様およびシ

ステインスルフィン酸デカルボキシラーゼ (CSAD) 様のタンパク質をコードする断片を単離し、それらのコード領域全長を RACE 法により得た。一方、システアミン経路やシステイン酸経路に関わる酵素の cDNA は検出できなかった。

(2) 分子系統解析

得られた CDO 様配列および CSAD 様配列の分子系統解析を行ったところ、それぞれ脊椎動物や昆虫の CDO および CSAD とクラスターを形成した。また、配列のアラインメントにより、既知の CDO および CSAD において保存性が高いアミノ酸残基は、今回得た CDO 様および CSAD 様配列においても保存されていた。以上より、本研究で得た cDNA がコードするタンパク質をそれぞれ BsCDO、BsCSAD と命名した。CDO、CSAD が存在することより、シチヨウシンカイヒバリガイは CSAD 経路でヒポタウリンを合成することが示唆された。

(3) 発現組織

BsCDO および BsCSAD の mRNA の発現量を主要組織間で比較した結果、両者とも鰓で強く発現していることが明らかになった。このことはシチヨウシンカイヒバリガイが鰓でヒポタウリンを活発に合成していることを示唆する。鰓以外では、生殖腺で比較的強い発現が認められた。

(4) 硫化物およびチオ硫酸への曝露

水槽での曝露実験の結果は、硫化ナトリウム、チオ硫酸ナトリウムどちらへの曝露においても、BsCDO および BsCSAD mRNA の発現変化は統計的に有意ではなかった。この結果は、環境中の硫化物やチオ硫酸濃度による発現誘導は顕著ではないことを示唆する。

(5) メタボローム解析

メタボローム解析により、鰓および足組織中の遊離アミノ酸やその前駆体や中間体の分布状況が明らかになった。タウリンやヒポタウリンは高濃度に検出された。しかし、組織中のシステインや CSA の量は検出限界以下であった。

(6) 組織の遊離アミノ酸分析

遊離アミノ酸分析の手法を改良し、CSA やヒポタウリン、チオタウリンを一般的な遊離アミノ酸とともに一斉分析できる方法を確認した。その方法で鰓組織を分析した結果、上記のメタボローム解析と同様、鰓組織中にタウリンやヒポタウリンは高濃度に検出された。システインや CSA の濃度は高くなかった。

(7) 注射によるシステイン・CSA の投与

合成経路の活性を証明するために、注射によりシステインや CSA を閉殻筋に投与した。投与したアミノ酸は血リンパにより鰓に輸送されることを期待した。実際、投与したアミ

ノ酸は血リンパ中に検出された。しかし、鰓組織中の濃度は上昇しなかった。すなわち、血リンパから鰓細胞内への輸送速度は高くないと考えられた。

(8) 組織磨砕物へのシステイン・CSAの投与注射による投与では鰓組織に投与したアミノ酸が輸送されなかったため、組織磨砕物に両者を投与して、ヒポタウリンやタウリンの変化を調べた。この実験に関する解析は現在進行中である。

(9) ヒポタウリン輸送体の再検討

上記(7)の結果から、ヒポタウリン合成前駆体の血リンパから鰓細胞への取り込み能は高くないことが予想されたが、ヒポタウリンそのものを取り込む能力のあるタンパク質があることを前研究課題において確認している。しかし、このタンパク質の進化的な位置づけがはっきりしていなかった。そこで類縁の輸送体である GAT-1 を単離し、分子系統解析と比較ゲノム解析を行って、両者の進化的な関係を解明した。これらの輸送体の機能分化について、今後検討する予定である。

(10) まとめと展望

本研究では、代表的な熱水噴出域固有生物であるシチヨウシンカイヒバリガイにおいて、硫化水素への適応に重要な役割を果たすヒポタウリンを合成する経路を解明することができた。熱水噴出域固有生物ばかりか、貝類やその他の無脊椎動物においても、ヒポタウリン合成経路はこれまで全くわかっていなかったため、本研究の成果は海産無脊椎動物の体成分に関する理解を大きく前進させたといえる。

また、合成経路を構成する酵素の遺伝子が鰓で強く発現し、また、その発現レベルが環境硫化物を変化させても有意に変動しなかったことより、鰓においてヒポタウリン合成が常時活発に行われていることが示唆された。シチヨウシンカイヒバリガイの組織内のシステインや CSA の含量が低いことは予想外であった。同じイガイ科のムラサキイガイでは一定量のシステインや CSA が存在することという報告がある。しかし、ヒポタウリンが生存のためにきわめて重要なシチヨウシンカイヒバリガイでは、酵素を活発に発現することにより、システインと CSA を可能な限りヒポタウリンに変換してしまうと考えれば説明がつく。

そのことを生体への注射により証明しようとしたが、血リンパから鰓への輸送活性が低かったために証明することはできなかったが、現在組織磨砕物への投与実験により証明しようとしているところである。

メタボローム解析により、システインより上流の化合物で、組織中にある程度蓄積している化合物がいくつか見ついている。組織中の種々の遊離アミノ酸の量は、個々に管理さ

れているのでなく、様々な代謝経路のネットワークとして制御されていると考えられ、今後は種々の網羅的な解析によりその詳細を明らかにしていきたい。

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 9 件)

Setoguchi, Y., Nomaki, H., Kitahashi, T., Watanabe, H., Inoue, K., Ogawa, NO, Shimanaga, M.: Nematode community composition in hydrothermal vent and adjacent non-vent fields around Myojin Knoll, a seamount on the Izu-Ogasawara Arc in the western North Pacific Ocean. Mar. Biol. in press. 査読有. DOI: 10.1007/s00227-014-2460-4

Kinjo, A., Koito, T., Kawaguchi, S., Inoue, K.: Evolutionary history of the GABA transporter (GAT) group revealed by marine invertebrate GAT-1. PLoS One, 8, e82410 (2013). 査読有. DOI: 10.1371/journal.pone.0082410

井上広滋: 魚介類の生態を支える生理機能に関する分子生物学的研究. 日本水産学会誌 79, 315-318 (2013). 査読有. https://www.jstage.jst.go.jp/article/suisan/79/3/79_WA1905/_pdf

Yorusue, T., Kado, R., Watanabe, H., Høeg, J.T., Inoue, K., Kojima, S., Chan, B.K.K.: Influence of water temperature on the larval development of *Neoverruca* sp. and *Ashinkailepas seepiophila* - implications for larval dispersal and settlement in the vent and seep environments. Deep-Sea Res. Part I. 71, 33-37 (2013). 査読有. DOI: 10.1016/j.dsr.2012.10.007

Fujinoki, M., Koito, T., Nemoto, S., Kitada, M., Yamaguchi, Y., Hyodo, S., Numanami, H., Miyazaki, N., and Inoue, K.: Comparison of the amount of thiotrophic symbionts in the deep-sea mussel *Bathymodiolus septemdiemum* under different sulfide levels by using fluorescent in situ hybridization. Fish. Sci. 78, 139-146 (2012). 査読有. DOI: 10.1007/s12562-011-0419-7

Fujinoki, M., Koito, T., Fujiwara, Y., Kawato M., Tada, Y., Hamasaki, K., Jimbo, M., and Inoue, K.: Whole-mount fluorescence in situ hybridization to visualize symbiotic bacteria in the gills of deep-sea mussels. Aquatic Biol. 14, 134-140 (2012). 査読有. DOI: 10.3354/ab00385

Yorusue, T., Inoue, K., Miyake, H., and Kojima, S.: Trophic structure of

hydrothermal vent communities at the Myojin Knoll and the Nikko Seamount in the northwestern Pacific: Implications for photosynthesis-derived food supply. *Plankton Benthos Res.* 7, 35-40 (2012). 査読有.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/pbr/7/2/7_35/_pdf

Koito, T., Hashimoto, J., Nemoto, S., Kitajima, M., Kitada, M., Inoue, K.: New distribution record of deep-sea mussel, *Bathymodiolus aduloides* Hashimoto & Okutani 1994 [Mollusca: Bivalvia: Mytilidae] from a hydrothermal vent, Myojinsho. *Marine Biodiversity Records.* 5, e38 (2012). 査読有. DOI:

10.1017/S1755267212000267

井上広滋: 猛毒の硫化水素をエネルギー源とする深海生物の生存戦略. *バイオサイエンスとインダストリー* 70, 251-254 (2012). 査読無.

http://www.jba.or.jp/pc/archive/2012/vol70_no4.html

[学会発表](計17件)

津澤一輝: シチヨウシンカイヒバリガイの共生菌獲得機構の解明. 平成26年度日本水産学会春季大会. 2014年3月27-30日. 北海道大学

金城梓: 海産無脊椎動物の GAT-1 が解き明かす GABA 輸送体グループの分子進化と機能進化. 日本動物学会関東支部第66回大会. 2014年3月15日. 東京大学大気海洋研究所

瀬戸口友佳: 明神海丘の熱水域・被熱水域における線虫類群集の空間変異. 日本生態学会大会 2014年3月14-18日. 広島国際会議場

井上広滋: シンカイヒバリガイ類のヒポタウリン蓄積機構: NT11-09 とその後の展開. *ブルーアース* 2014. 2014年2月19-20日. 東京海洋大学

小系智子: 深海性二枚貝のセロトニン受容体遺伝子の発現動態. 平成25年度日本水産学会秋季大会. 2013年9月19-22日. 三重大学

井上広滋: 魚介類の生態を支える生理機能に関する分子生物学的研究. 2013年3月26-30日. 東京海洋大学

小系智子: シンカイヒバリガイ類とその共生菌の集団構造解析. 平成25年度日本水産学会春季大会. 2013年3月26-30日. 東京海洋大学

日下部郁美: 硫化物存在下でのシチヨウシンカイヒバリガイタウリントランスポーター遺伝子の発現誘導. 平成25年度日本水産学会春季大会. 2013年3月26-30日. 東京海洋大学

長崎稔拓: 深海性二枚貝におけるヒポタウリン合成経路と硫化物に対する発現

応答. 2013年3月26-30日. 東京海洋大学

金城梓: 海産無脊椎動物の GAT-1 が解き明かす GABA 輸送体グループの進化の歴史. *ブルーアース* 2013. 2013年2月22-23日. 東京海洋大学

日下部郁美: 硫化物存在下でのシチヨウシンカイヒバリガイタウリントランスポーター遺伝子の発現誘導. *ブルーアース* 2013. 2013年2月22-23日. 東京海洋大学

Inoue K.: Mechanisms of adaptation to hydrothermal vents using taurine-related amino acids. *Malaysia International Biological Symposium.* 2012年7月12日. Serdan, Malaysia.

金城梓: 海産無脊椎動物の GAT-1 が示す GABA 輸送体グループの進化の歴史. 東京大学生命科学シンポジウム. 2012年6月30日. 東京大学

Inoue K.: Mechanisms of adaptation to hydrothermal vents using taurine-related amino acids. *University of Hawaii and University of Tokyo Joint Symposium on Ocean, Coastal, and Atmospheric Sciences.* 2012年6月13-15日. University of Hawaii

Kinjo A.: Evolutionary history of the GABA transporter group revealed by marine invertebrate GAT-1 genes. *University of Hawaii and University of Tokyo Joint Symposium on Ocean, Coastal, and Atmospheric Sciences.* 2012年6月13-15日. University of Hawaii

金城梓: 貝類の GAT-1 から見た GABA 輸送体グループの分子進化. 東京大学生命科学シンポジウム. 2011年9月28日-10月3日. 長崎大学

井上広滋: タウリン関連物質による熱水噴出域への適応機構. 第14回マリンバイオテクノロジー学会. 2011年5月28-29日. 東海大学

[その他]

ホームページ等

<http://darwin.aori.u-tokyo.ac.jp/inoue1ab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 広滋 (INOUE, Koji)

東京大学・大気海洋研究所・准教授

研究者番号: 60323630

(3) 連携研究者

豊原 治彦 (TOYOHARA, Haruhiko)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号: 90183079

丸山 正 (MARUYAMA, Tadashi)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極
限環境生物圏領域・プログラムディレク
ター

研究者番号：90373464