

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 28 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770091

研究課題名（和文） 深海メタン湧出域の多細胞動物における寄生性真核微生物の探索

研究課題名（英文） Exploring parasitic protists in animals inhabiting deep-sea methane seeps

研究代表者

瀧下 清貴（TAKISHITA KIYOTAKA）

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・主任研究員

研究者番号：90392951

研究成果の概要（和文）：化学合成細菌を有し、相模湾のメタン湧出域で優占する二枚貝（シロウリガイ類とシンカイヒバリガイ類）の鰓組織から PCR 法によって新奇なアルベオラータ生物の SSU rRNA 遺伝子を検出した。この PCR 検出された原生生物はホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによって、二枚貝のバクテリオサイトに局在することが示された。

研究成果の概要（英文）：Utilizing PCR techniques, the SSU rRNA gene from a novel alveolate was detected from gill tissues of the bivalves *Calyptogena* spp. and *Bathymodiolus* spp. all of which harbor chemosynthetic bacteria and dominate methane seeps in Sagami Bay. In addition, the protist detected with PCR was localized within bacteriocytes of the bivalves with whole-mount fluorescence *in situ* hybridization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学，生物多様性・分類

キーワード：深海・原生生物・寄生・進化・多様性

1. 研究開始当初の背景

熱水噴出域やメタン湧出域に存在する化学合成生態系では、化学合成独立栄養性の真正細菌や古細菌が一次生産者であり、シロウリガイやハオリムシといった多細胞動物は、それら一次生産者からの有機物の供給に依存している。化学合成生態系における真正細菌、古細菌および多細胞動物の研究は比較的進んでいるが、真核性微生物の多様性や生態学的位置に関しては、ほとんど知られていない状況にある。相模湾初島沖のメタン湧出域に形成される化学合成生態系の底泥を用いて環境 PCR 解析を行った結果、アピコンプレクサ類やイクチオスポレア類といった代表

的な寄生性真核微生物に由来する遺伝子配列が頻繁に得られた。それら遺伝子の由来先として可能性が高いのは、化学合成生態系で大きなバイオマスを持つシロウリガイやハオリムシといった多細胞動物であると考えられた。

2. 研究の目的

相模湾初島沖のメタン湧出域に形成される化学合成生態系で優占する多細胞動物に寄生する真核微生物の調査を行うこととした。特に、どの宿主動物にどのような分類群の寄生性真核微生物が存在するのか？それらの寄生性真核微生物は宿主動物の生存（さらに

は生態系の変動)に影響を与えるのか?に注目することとした。

3. 研究の方法

相模湾メタン湧出域に生息する代表的な多細胞動物(シロウリガイ類, シンカイヒバリガイ類, ハオリムシ類)からPCR法によって, 寄生性真核微生物由来のSSU rRNA遺伝子を検出し, その多様性を調べた。PCRでは, 宿主である多細胞動物のSSU rRNA遺伝子を増幅しないnon-metazoan PCR法を採用した。PCR法によって検出された寄生性真核微生物由来のSSU rRNA遺伝子の情報を基に核酸標識プローブを作製し, *in situ*ハイブリダイゼーション法によって, 宿主動物内での寄生性真核微生物の局在を確認した。

4. 研究成果

(1) PCR 検出された真核微生物: 上述のnon-metazoan PCRによって, 相模湾メタン湧出域のシロウリガイ類とシンカイヒバリガイ類の鰓組織DNAから, ある特定の真核微生物に由来するSSU rRNA遺伝子(clone CABP-1)を特異的に増幅した。ハオリムシ類からは特定のPCR増幅産物は得られなかった。シロウリガイ類およびシンカイヒバリガイ類から得られた遺伝子配列を分子系統解析に供した結果, 検出された遺伝子はシンディニウム類(Syndiniales)と呼ばれる系統群に属することが判明した。しかし, これまでに知られているシンディニウム類の5つのグループのどのグループにも属さない新奇な系統であることが示唆された(図1)。

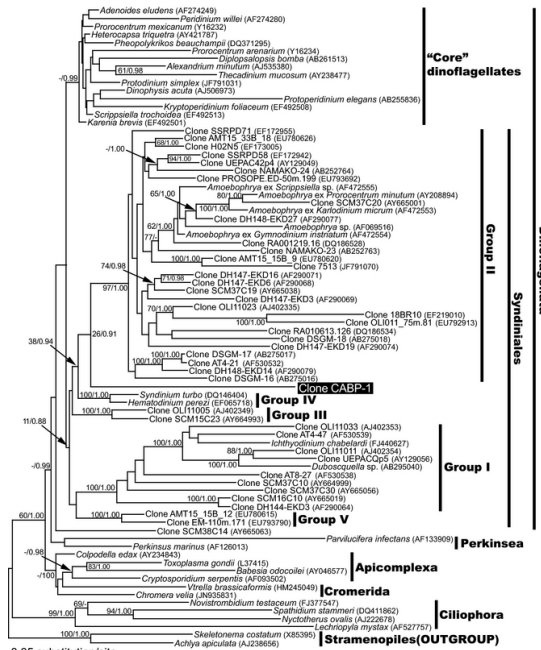


図1. アルベオラータのSSU rRNA遺伝子配列に基づく分子系統樹

(2) 検出された真核微生物の宿主動物内での局在: 得られたSSU rRNA遺伝子配列情報を基に作製したDNAプローブを用いて, シンカイヒバリガイの鰓組織に対してホルマウント *in situ*ハイブリダイゼーションを行った結果, 該当の真核微生物が鰓上皮のバクテリオサイト(共生細菌を有する細胞)内に特異的に存在していることが明らかとなった(図2)。

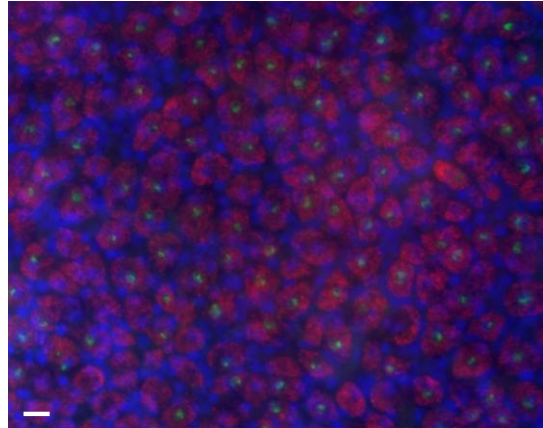


図2. シンカイヒバリガイの鰓組織に対するホルマウント蛍光 *in situ*ハイブリダイゼーション。青色: DAPI, 赤色: メタン酸化共生細菌特異的DNAプローブ由来の蛍光, 緑色: 真核微生物(CABP-1生物)特異的DNAプローブ由来の蛍光。赤色蛍光を有するバクテリオサイト内のみ, 緑色蛍光が確認された。

(3) 検出された真核微生物の生態学的意義: 得られた遺伝子配列に由来する真核微生物はRNAレベルでも検出されたため, 宿主細胞内で代謝的にactiveであると考えられる。また, これまでに知られているシンディニウム類は全て寄生性であり, したがって本研究において得られた遺伝子配列に由来する真核微生物も寄生性である可能性が高い。しかし, 宿主細胞および組織の損傷はこれまでのところ確認されておらず, 宿主に対する致死性等の影響は不明である。

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8件)

① Fumiya Noguchi, Masaru Kawato, Takao Yoshida, Yoshihiro Fujiwara, Katsunori Fujikura, Kiyotaka Takishita. A novel alveolate in bivalves with chemosynthetic bacteria inhabiting deep-sea methane seeps. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 査読有り. Vol.60. 2013. pp.158-165. doi:10.1111/jeu.12017

② Kiyotaka Takishita, Yoshito Chikaraishi, Michelle M. Leger, Eunsoo

Kim, Akinori Yabuki, Naohiko Ohkouchi, Andrew J. Roger. Lateral transfer of tetrahymanol-synthesizing genes has allowed multiple diverse eukaryote lineages to independently adapt to environments without oxygen. *Biology Direct*. 査読有り. Vol.7. 2012. pp.5. doi:10.1186/1745-6150-7-5

③ Kiyotaka Takishita, Martin Kolisko, Hiroshi Komatsuzaki, Akinori Yabuki, Yuji Inagaki, Ivan Cepicka, Pavla Smejkalova, Jeffrey D. Silberman, Tetsuo Hashimoto, Andrew J. Roger, Alastair G.B. Simpson. Multigene phylogenies of diverse *Carpodomonas*-like organisms identify the closest relatives of 'amitochondriate' diplomonads and retortamonads. *Protist*. 査読有り. Vol.163. 2012. pp.344-355. doi:10.1016/j.protis.2011.12.007

④ Yoshiyuki Ishitani, Ryoma Kamikawa, Akinori Yabuki, Masashi Tsuchiya, Yuji Inagaki, Kiyotaka Takishita. Evolution of elongation factor-like (EFL) protein in Rhizaria is revised by radiolarian EFL gene sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 査読有り. Vol.59. 2012. pp.367-373. doi: 10.1111/j.1550-7408.2012.00626.x

⑤ Taro Maeda, Euichi Hirose, Yoshito Chikaraishi, Masaru Kawato, Kiyotaka Takishita, Takao Yoshida, Heroen Verbruggen, Jiro Tanaka, Shigeru Shimamura, Yoshihiro Takaki, Masashi Tsuchiya, Kenji Iwai, Tadashi Maruyama. Algivore or phototroph? *Plakobranthus ocellatus* (Gastropoda) continuously acquires kleptoplasts and nutrition from multiple algal species in nature. *PLoS ONE*. 査読有り. Vol.7. 2012. pp.e42024. doi:10.1371/journal.pone.0042024

⑥ Yoshiyuki Ishitani, Sohta Ishikawa, Yuji Inagaki, Masashi Tsuchiya, Kozo Takahashi, Kiyotaka Takishita. Multigene phylogenetic analyses including diverse radiolarian species support the "Retaria" hypothesis - the sister relationship of Radiolaria and Foraminifera. *Marine Micropaleontology*. 査読有り. Vol.81. 2011. pp.32-42. doi:10.1016/j.marmicro.2011.06.007

⑦ Laura Escalera, Beatriz Reguera, Kiyotaka Takishita, Sadaaki Yoshimatsu,

Kanae Koike, Kazuhiko Koike. Cyanobacterial endosymbionts in the benthic dinoflagellate *Sinophysis canaliculata* (Dinophyceae, Dinophysiales). *Protist*. 査読有り. Vol.162. 2011. pp.304-314. doi:10.1016/j.protis.2010.07.003

⑧ Takuya Matsumoto, Fumihiko Shinozaki, Tomoko Chikuni, Akinori Yabuki, Kiyotaka Takishita, Masanobu Kawachi, Takeshi Nakayama, Isao Inouye, Tetsuo Hashimoto, Yuji Inagaki. Green-colored plastids in the dinoflagellate genus *Lepidodinium* are of core chlorophyte origin. *Protist*. 査読有り. Vol.162. 2011. pp.268-276. doi:10.1016/j.protis.2010.07.001

[学会発表] (計 5 件)

① Fumiya Noguchi, Masaru Kawato, Takao Yoshida, Yoshihiro Fujiwara, Katsunori Fujikura, Kiyotaka Takishita. A novel alveolate in gill epithelium cells of bivalves with chemosynthetic bacteria inhabiting deep-sea methane seeps in Sagami Bay, Japan. *Protist*2012. 29 July-3 August 2012. Oslo University, Norway.

② Martin Kolisko, Ryoma Kamikawa, Kiyotaka Takishita, Ivan Cepicka, Qianqian Zhang, Tetsuo Hashimoto, Akinori Yabuki, Yuji Inagaki, Andrew J. Roger, Alastair G.B. Simpson. Evolutionary analysis of mitochondrial ancestry of diplomonads: Phylogenomics of mitochondrial-related organelles in *Carpodomonas*-like organism. *Protist*2012. 29 July-3 August 2012. Oslo University, Norway.

③ Akinori Yabuki, Wenche Eikrem, Kiyotaka Takishita. Fine structure of *Telonema subtile* Griessmann, 1913: A unique cytoskeletal structure among eukaryotes. *Protist*2012. 29 July-3 August 2012. Oslo University, Norway.

④石谷佳之, 石川奏太, 神川龍馬, 矢吹彬憲, 土屋正史, 稲垣祐司, 瀧下清貴. 放散虫と有孔虫を姉妹群とする「レタリア仮説」に基づいたアクチン, チューブリンおよびペプチド伸長因子の複雑な進化シナリオ. 日本地球惑星科学連合 2012 年大会. 2012 年 5 月 24 日. 幕張メッセ.

⑤野口文哉, 河戸勝, 吉田尊雄, 藤原義弘,

藤倉克則, 瀧下清貴. 相模湾メタン湧出活域に生息するヘイトウシンカイヒバリガイから検出された原生生物. 日本進化原生生物学研究会. 2011年6月11日. 富山大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧下 清貴 (TAKISHITA KIYOTAKA)
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・主任研究員
研究者番号：90392951

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし