

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 24 年 5 月 12 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22880037

研究課題名（和文） 深海生物が硫化水素を無毒化する機構は浅海生物にも存在するか？

研究課題名（英文） Does the mechanism for detoxification of hydrogen sulfide using deep-sea invertebrates exist also in shallow-water one?

研究代表者

小糸 智子 (KOITO TOMOKO)

日本大学・生物資源科学部・助手

研究者番号：10583148

研究成果の概要（和文）：深海熱水噴出域や冷水湧出域に生息する無脊椎動物は細胞内にタウリンなどを蓄積することで無毒化していることが示唆されている。本研究では、この機構が浅海から深海まで普遍的であるか解明するため、タウリンやその類縁体を細胞内へ輸送するタウリン輸送体（TAUT） mRNA を定量することを目的とした。深海性二枚貝のシチヨウシンカイヒバリガイおよび浅海性二枚貝であるムラサキイガイを用いて硫化物曝露実験を行なったところ、両者ともに同様の硫化物無毒化機構をもつ可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：It has been suggested that the invertebrates which inhabit at hydrothermal vents and cold seeps detoxify the hydrogen sulfide by accumulating taurine and its related compounds in their cells. In this study, we attempted quantification of taurine transporter (TAUT) mRNA to resolve whether this mechanism for detoxification of hydrogen sulfide universally exist among shallow-water and deep-sea invertebrates. On the basis of the result of sulfide exposure experiment, both deep- and shallow-water mussel showed the possibility of using the same mechanism for detoxification of hydrogen sulfide.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,240,000	372,000	1,612,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：分子海洋生物学

科研費の分科・細目：水産化学

キーワード：深海熱水噴出域、タウリン輸送体（TAUT）、チオタウリン、シンカイヒバリガイ類

1. 研究開始当初の背景

深海の熱水噴出域や冷水湧出域には、生物にとって有毒な硫化水素が多量に存在していることが明らかにされている。しかし、そのような環境でも軟体動物や甲殻類、環形動物などの無脊椎動物が豊かな生物群集を形成している。ところが、これらの生物が硫化

水素に対してどのような耐性をもつかは明らかになっていなかった。その後、一部の生物から硫化水素と酸素を運搬できる特殊なヘモグロビンが発見されたが、熱水や冷水環境に生息する多くの生物はこれを持たないことから、多くの無脊椎動物に共通する、何か別の無毒化機構が存在すると考えられた。

近年、熱水噴出域に生息する無脊椎動物の組織内にチオタウリンが特異的に蓄積されているという報告がなされた。チオタウリンは含硫アミノ酸の一種で無毒な物質である。これはヒポタウリンという無毒な含硫アミノ酸が前駆体であり、チオタウリンはヒポタウリンよりも硫黄原子が一つ多い構造であることから、環境中に含まれる硫化水素(H_2S)とヒポタウリンが反応することで無毒なチオタウリンを生合成し、無毒化していることが示唆された。しかし、これらの含硫アミノ酸が体内のどこに、どれくらいの時間で蓄積されているのかということは明らかになっていなかった。

我々はこれまで、この無毒化機構がいつ、どのような組織で行われているのか解明するための研究を行ってきた。細胞の外から内へタウリンやその類縁体を輸送するためには、タウリン輸送体(TAUT)という膜貫通蛋白質を通過する。そこでこのTAUTに着目し、硫化物が多く存在する環境下でTAUT mRNAの発現量が増加するか実験を行ってきた。まず、深海性二枚貝類であるシンカイヒバリガイ類よりTAUT遺伝子を単離し、その配列を明らかにしたのち、mRNAを定量するためのリアルタイムPCRの系を確立した。そして、鰓にメタン酸化細菌が共生しているヘイトウシンカイヒバリガイ(*Bathymodiolus platifrons*)を相模湾から採集し、硫化物添加・非添加区に分けて35日、69日後に解剖し、鰓、足、外套膜のTAUT mRNAを定量した。シンカイヒバリガイ類は世界中の深海熱水噴出域や冷水湧出域に生息しており、陸上に設置した水槽でも飼育することが可能であることが知られていることから実験に供した。リアルタイムPCRの結果、鰓は硫化物添加区において時間の経過に伴いTAUT mRNAが有意に増加した。一方、足、外套膜は増減があったものの、一定の傾向がみられなかったことから、硫化物の影響ではないと考えられた。

さらに、より長期間にわたり硫化物曝露を行なうため、伊豆・小笠原明神海丘から採集したシチヨウシンカイヒバリガイ(*Bathymodiolus septemdiarum*)を10個体ケージに入れ、熱水の影響のない場所へ設置し、1年後に回収した。シチヨウシンカイヒバリガイは鰓に硫黄酸化細菌が共生している二枚貝である。回収した個体群のTAUT mRNAを、移植前に採集した個体群と比較したところ有意に減少していた。これらの研究から、シンカイヒバリガイ類は硫化物の有無に応じてTAUT mRNA量を増減させることが明らかとなり、TAUTが硫化水素の無毒化に関与していることが示唆された。深海に生息する生物の多くがその祖先を浅海にもつことが明らかにされているが、このTAUTを介した硫化

物無毒化機構が浅海生物にも存在しているのかは明らかにされていない。

一方、浅海の無脊椎動物は、環境浸透圧の変化に応答して細胞内へタウリンなどを蓄積する、もしくは排出することにより細胞容積を一定に保つことが知られている。そしてこのときTAUTの発現量を増減させることも明らかにされている。

これらのことから、現在熱水噴出域や冷水湧出域に生息する生物群は、深海環境へ進出してから無毒化機構を獲得したのではなく、浸透圧調節のために保有していたタウリン蓄積機構を応用することで、容易に深海へ適応できたのではないかと推察した。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、深海熱水噴出域や冷水湧出域に生息する無脊椎動物がもつ無毒化(タウリンやその類縁体を細胞内へ蓄積させて環境中の硫化水素を無毒化する)機構を、浅海から深海へ進出する過程で獲得したのか、浅海から深海まで普遍的に保有する機構なのか解明することである。つまり、海洋無脊椎動物が浸透圧調節と硫化水素の無毒化という二つの機能を生来保有しているのかを明らかにすることで無毒化機構獲得の歴史を明らかにできると考えた。そこで、本課題では環境中の硫化物に対して浅海性の無脊椎動物が応答するか、そして深海性の無脊椎動物が環境浸透圧の変化に応答してタウリンなどを細胞内に蓄積するか検証することに主眼を置いた。

3. 研究の方法

本研究では、TAUT mRNAの発現量を、これまでの研究で確立したリアルタイムPCRの系によって定量することを試みた。

実験には、深海性二枚貝のシチヨウシンカイヒバリガイおよび浅海性二枚貝であるムラサキガイ(*Mytilus galloprovincialis*)を用いた。ムラサキガイは潮間帯などに見られる二枚貝類で、シンカイヒバリガイ類と同じイガイ科に属しているため研究に用いた。

本研究では、浸透圧変化や環境中の硫化物に対してTAUTを介した応答を行なうかを明らかにするため、以下の飼育実験を行なった。

(1) シチヨウシンカイヒバリガイの低浸透圧飼育実験

2011年6月に実施された『なつしま』研究航海NT11-09において伊豆・小笠原海域の水曜海山(水深1300m)から、無人探査機『ハイパードルフィン』により採集したシチヨウシンカイヒバリガイを用い、100%海水(コントロール)、97.5%、95.5%、85.0%の試験区に分

けて飼育した。低浸透圧海水は、海水に純水を混合して調整した。24時間、48時間経過後に解剖し、各組織（鰓、足、外套膜）に切り分けたのち-80℃で保存した。なお、1試験区につき8個体ずつ用いた。

(2) シチヨウシンカイヒバリガイおよびムラサキガイの硫化物曝露実験

シチヨウシンカイヒバリガイおよびムラサキガイを用い、硫化ナトリウム添加区（1mg/10L、10mg/10L）、チオ硫酸ナトリウム添加区（10mg/10L）、非添加区（コントロール）の4試験区に分けて飼育し、24時間後、48時間後に解剖ののち-80℃で保存した。硫化水素を曝気するのは危険であるため、代替物質として硫化ナトリウム九水和物を海水に溶解して用いた。硫化物は添加後に濃度が変化するため、8時間ごとに添加した。チオ硫酸ナトリウムも同様に、硫化水素の代替物質として用いた。なお、各試験区8個体ずつ用いた。また、本実験は前述の航海で採集したシチヨウシンカイヒバリガイを用い、ムラサキガイは清浄な環境で養殖された活貝を購入して行なった。

(3) タウリン輸送体 (TAUT) mRNA の定量

上記 (1) および (2) で解剖した鰓組織から、常法により全 RNA を抽出し、リアルタイム PCR に供するために逆転写反応を行ない、cDNA を合成した。また、シチヨウシンカイヒバリガイとムラサキガイの TAUT 遺伝子の塩基配列は高い相同性があり、TaqMan プローブの配列は一致しているが、シンカイヒバリガイ類に汎用性のあるプライマー配列が異なっていたことから、ムラサキガイのリアルタイム PCR 用プライマーを新たに設計した。

4. 研究成果

ムラサキガイの硫化物曝露実験では、死亡個体が少なかったことから、細胞内にタウリンやその類縁体を蓄積させることで無毒化する、というシンカイヒバリガイ類と同じ機構をもつ可能性が示された。また、シチヨウシンカイヒバリガイについても、低浸透圧環境下での飼育において死亡する個体はほとんど見られなかった。これらのことから、シチヨウシンカイヒバリガイとムラサキガイの TAUT が浸透圧調節と硫化物の無毒化に関与している可能性が示唆された。シチヨウシンカイヒバリガイはリアルタイム PCR による TAUTmRNA の定量を行なったところ、硫化物濃度、浸透圧刺激に応じてその量が増加する傾向がみられたが、個体数を増やして再度飼育実験を行ない、再現性を確認する必要がある。さらに、メタン酸化細菌が共生するヘイトウシンカイヒバリガイやシンカイヒバリガイを用いて同様の実験を行なうことにより、硫化水素に曝露されるシンカイヒバリ

ガイ類が同様の応答を示すか確認する必要がある。本研究では、濃度の異なる硫化水素に曝露されているシチヨウシンカイヒバリガイの比較を行ないたい。また、本研究で用いた鰓組織は外界に曝される器官であるが、同じく外界に曝される外套膜や足など、他の組織でどのように TAUTmRNA 量に変化するかわかりかしたい。

浅海種に関しても、干潟やマングローブなど還元的な環境に生息する無脊椎動物から TAUT を単離し、リアルタイム PCR を用いた TAUTmRNA の定量、アミノ酸分析によるタウリン、チオタウリン、ヒポタウリンの定量を行なうことにより、シンカイヒバリガイ類が示す無毒化機構が深海へ進出する過程で獲得したのか、浅海から深海まで普遍的にもつ機構であるのか解明していきたい。

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1件)

① Koito, T., Morimoto, S., Toyohara, H., Yoshida, T., Jimbo, M., Maruyama, T., Miyazaki, N., Inoue, K.: Decline in taurine transporter mRNA and thioautotrophic bacterial 16S rDNA levels after transplantation of the hydrothermal-vent mussel *Bathymodiolus septemdirum* to a non-vent position. *Cah. Biol. Mar.* 51, 429-433 (2010) 査読有り

[図書] (計1件)

① 井上広滋・小糸智子. 生物研究社. 熱水噴出域への適応機構をアミノ酸輸送体から探る (Studies on mechanisms of adaptation to the sulfide-rich environments in hydrothermal vents through analyses of an amino acid transporter), *海洋と生物* 187 vol 32 no. 2.: 123-128, 2010

[その他]

①アウトリーチ活動情報

ポスター発表: 「海底温泉に暮らす生物を研究する」

海のプロフェッショナル～海洋学への招待状～出版記念セミナー, 東京大学駒場キャンパス学際交流ホール, 2011年1月29日

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・助手

研究者番号：10583148

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：

研究協力者

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
山中 寿朗 (YAMANAKA TOSHIRO)
岡山大学・自然科学研究科・准教授
研究者番号：60343331