

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570252

研究課題名(和文) 深海性二枚貝シロウリガイ類の共生系の進化

研究課題名(英文) Evolution of symbiotic system in deep-sea Calyptogena clams

研究代表者

吉田 尊雄 (YOSHIDA, Takao)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋生物多様性研究分野・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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、深海に生息する二枚貝シロウリガイとその細胞内共生細菌をモデルに用いて、宿主とその細胞内共生細菌の共進化と細胞内共生菌のゲノム縮小進化過程の解明を目指した。宿主と共生細菌の系統樹解析から、シロウリガイの一部の宿主と共生細菌は、共進化関係を示さなかった。また、共生細菌のゲノム解析を行い、一部の共生細菌のゲノムサイズはこれまで知られているものより約1.5倍大きいことがわかった。シロウリガイの共生細菌のゲノムは、これまでに報告されている共生細菌のゲノムよりもゲノム縮小の初期段階であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to elucidate the coevolution between host animals and their intracellular bacteria (symbiont), and detailed process of reductive genome evolution in intracellular symbiont by using deep-sea Calyptogena clam-symbiont symbiosis as a model. Some hosts and symbiont showed the obscure patterns of coevolution by the phylogenetic tree analysis. We also found that the genome size of their symbionts were approximately 1.5-fold larger than that of previously reported symbionts. These data suggested that reductive genome evolution in Calyptogen symbiont genomes is still in an earlier stage than that in the previously reported symbiont genomes.

研究分野：生物分子化学、進化生物学、ゲノム科学

キーワード：共生 共進化 ゲノム解析 比較ゲノム

1. 研究開始当初の背景

真核生物の誕生と進化を理解する上で、ミトコンドリアや葉緑体の祖先が細胞内共生によって獲得され、オルガネラ化した過程は重要な現象である。特に、共生者が宿主細胞に統合されオルガネラ化する過程において、共生者のゲノムが縮小し、宿主核のコントロール下に置かれる過程は最も重要な過程の一つである。

現生の細胞内共生細菌のゲノム解析から共生者のゲノム縮小の過程を明らかにすることが試みられている。これまでに様々な昆虫の細胞内共生細菌のゲノム解析や比較ゲノム解析から、共生者の役割やゲノム縮小進化とその過程が議論されている。昆虫の細胞内共生細菌は従属栄養細菌であり、ゲノム解析から、その多くは宿主昆虫の食物に不足する栄養素を補う役割を担っていることが解ってきた。さらに、多くの昆虫の共生細菌は、ゲノムサイズが 1M 以下と自由生活型の細菌と比べると非常に小さく、ゲノム縮小がかなり進んでいる段階を示していると考えられた。昆虫の共生細菌のゲノム解析からは、共生の初期段階で共生者のゲノムがどのような過程を経て縮小してゆくのか、詳細な理解に至っていないかった。

本研究では、深海の化学合成生態系に優占種として生息する二枚貝であるシロウリガイ類とそのエラ細胞内に共生している化学合成細菌（以後、共生細菌と呼ぶ）の共生系をモデルとして、共生細菌のゲノム縮小進化を調べることにした。シロウリガイ類の共生細菌は、親から卵を介して次世代に受け継がれる垂直伝播をすると考えられている。垂直伝播型の細胞内共生細菌は、垂直伝達時に有効集団サイズが小さくなり、ボトルネック効果と遺伝的浮動により、世代が進むにつれて、遺伝子への変異が蓄積する。さらに細胞内環境では必須ではなくなった遺伝子は偽遺伝子化してゲノムから取り除かれる。この現象の積み重ねにより、ゲノムサイズを縮小させる方向に進化してきたと考えている。これまでに 2 種類のシロウリガイの共生細菌のゲノム解析が行われた (H. Kuwahara et al. *Current biology* 17, (2007); I.L.G. Newton et al. *Science* 315, (2006))。2 種類のシロウリガイ類共生細菌は、独立栄養細菌としての特徴を持ち、そのゲノムサイズは、1.0M と 1.2M であり多くの昆虫の細胞内共生細菌と比べてゲノムサイズが大きい。我々は、この 2 種類の共生細菌比較ゲノム解析から、シロウリガイ類共生細菌はゲノム縮小の進化過程の途中段階にあり、多くの昆虫の共生細菌よりゲノム縮小の途中にあり、ゲノム上に縮小進化の痕跡が残されている可能性を提案した (H. Kuwahara et al. *Extremophiles* 12, (2008))。シロウリガイ類は、祖先系は一緒に、宿主の分化とともに共生細菌も分化し、宿主と共生細菌が共進化してきたと考えられて

いる。しかしながら、共進化を示す信頼性の高い系統関係を示すデータはない。ゲノム縮小進化の過程を理解するには、宿主と共生細菌の系統関係を明らかにした上で、共生細菌のゲノム解析することで、共生細菌のゲノム縮小の過程が捕らえられるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、シロウリガイ類の宿主と共生細菌の系統関係を明らかにした上で、宿主の種分化と共生細菌のゲノム縮小進化の関係を明らかにし、共生細菌のゲノム縮小進化過程について解析をすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究 1: シロウリガイ類の宿主と共生細菌の系統関係の解析

宿主と共生細菌の系統関係を明確にするために、信頼性の高い分子系統樹を作成し、それぞれの系統樹を統計的に比較することにした。宿主に関してはミトコンドリアゲノム配列を決定し、その配列を用いて信頼性の高い分子系統樹を作成することにした。サンプルは、これまでの調査航海で得られ、-80 で凍結保管している日本近海や太平洋に生息する 12 種類のシロウリガイ類を用いた。凍結サンプルから細胞内共生細菌がない足を切り出し、キットにより全 DNA を抽出した。ミトコンドリアゲノムは、データベースに公開されているシロウリガイ類のミトコンドリアのチトクロムオキシダーゼ I 遺伝子と 16S リボソーム RNA 遺伝子を比較し共通する配列を用いてプライマーを作成し、PCR により、一般的に環状構造とされるミトコンドリアゲノムを二つに分けて増幅させ、サンガー法により DNA 配列を決定した。得られた配列から遺伝子を同定し、その遺伝子配列を使って RAxML と MrBayes を用いて系統樹を作成した。系統樹のアウトグループとして、シロウリガイ類に近縁であり、既にミトコンドリアゲノム配列が決定している二枚貝のハマグリやアサリを用いた。

また、共生細菌の系統関係は、共生細菌の複数の遺伝子配列を決定し、その配列を用いて信頼性の高い分子系統樹を作成することにした。アウトグループとしてシロウリガイ類の共生細菌と近い系統であり、共生細菌が水平伝達する深海性二枚貝シチヨウシンカイヒバリガイのエラ細胞内共生細菌を用いることとした。12 種類のシロウリガイ類共生細菌のうち 1 種類は、我々のグループで既に全ゲノムが決まっているので、ゲノム配列が決まっていない、残りの 11 種類の凍結シロウリガイ類及びシチヨウシンカイヒバリガイサンプルから共生細菌が共生するエラを切り出し、キットにより全 DNA を抽出した。既知の共生細菌のゲノム配列を元にして、8 種

類の遺伝子 (GroEL, GroES, GyrB, 16S, 23S, Mfd, UvrD, UvrA) の全長がとれるように共通プライマーを設計し、PCRにより増幅し、サンガー法によりDNA配列を決定した。得られた遺伝子配列を連結した配列基に、RAxMLとMrBayesを用いて系統樹を作成した。

得られた宿主及び共生細菌の分子系統樹を元に、Consefプログラムを用いて2つの系統樹を統計的に比較した。

(2) 研究2: 共生細菌のゲノム解析

当初、既報の共生細菌のゲノム配列を元にして、比較ゲノム解析からゲノム縮小が起こっている代表的な領域(2-3個の遺伝子を含む領域、10数個の遺伝子を含む領域、遺伝子を含まない非コード領域)を2種類のシロウリガイ共生細菌のゲノム配列を基にしてプライマーを設計し、PCRにより増幅し、シーケンスを行いDNA配列をえる予定であった。しかし、本研究期間中にラボに次世代シーケンサーが導入され運用できるようになった。そこで、次世代シーケンサーを用いて、ドラフトゲノムを決めることにした。既に共生細菌のゲノムが決まっている1種類を除く11種類のシロウリガイの凍結又は生きたサンプルを用いた。ゲノム解析には宿主由来のDNAをなるべく含まないように共生細菌だけを得る必要がある。そこで、サンプルからエラを切り出し、ホモジェナイズにより宿主細胞破碎を行い、未破碎宿主細胞を遠心により取り除き、その後、41µm, 10µm, 5µmのフィルター濾過を行い、その濾液を遠心して、精製共生細菌とした。精製共生細菌からキットを用いてDNAを抽出して、ライブラリーを作成し、シーケンスした。

4. 研究成果

(1) 研究1: シロウリガイ類の宿主と共生細菌の系統関係の解析

本研究ではまず、宿主のミトコンドリアゲノム配列の取得として、解析に用いる12種類のシロウリガイ類のうち2種類について非翻訳領域を除く全ミトコンドリアゲノムを決定した。その結果、シロウリガイ類のミトコンドリアゲノムの遺伝子の種類とその配置は一緒であった。そこでその配列情報を元に残りの10種類のシロウリガイ類について、ミトコンドリアゲノム中の11種類の遺伝子の配列を得た。一方、共生細菌については、8種類の遺伝子の配列を得ることができた。得られた宿主ミトコンドリア及び共生細菌の遺伝子は、それぞれ遺伝子配列を連結させて系統樹を作成したところ、宿主、共生細菌ともに、従来の系統樹よりもブートストラップ値及び事後確率が高い分岐を示す系統樹が得られた。その両者の系統樹を比較したところ、共生細菌は、2つのクレードに分岐するが、宿主はそのような分岐を示さなかった。5種類のシロウリガイの宿主とその共生細菌

の系統関係は一致し、それぞれ共進化の関係性にあることが強く示唆された。その一方で、残りの7種類のシロウリガイ類の宿主と共生細菌の系統関係は共進化を示さなかった。また、尤度比検定より、これら7種類の宿主とその共生細菌の系統関係の一致が棄却され、系統関係が異なることが支持された。これら7種類の宿主と共生細菌の系統群は共進化関係にはない可能性が考えられた。この原因の一つとして、共生細菌の宿主転換の可能性が考えられた。

(2) 研究2: 共生細菌のゲノム解析

12種類のシロウリガイ類の共生菌のうち、1種は既に全ゲノム解析が決まっているので、残りの11種類の共生菌のゲノム解析を進めるため、次世代シーケンサーを用いたドラフトゲノムシーケンス解析を行った。解析した11種のうち、共生菌の16S系統樹において進化速度が遅く、共進化関係を示さなかった2種類の共生細菌の全ゲノムシーケンスを決定することができた。その結果、これら2種類のシロウリガイの共生細菌のゲノムサイズは、それぞれ約1.5Mbpあり、既にゲノム配列が決まっている2種類(約1.0Mbp)と比較すると、約1.5倍のサイズであった。しかしながら、遺伝子数は、既報の2種類とほぼ同程度であり、残りのゲノム領域には偽遺伝子が確認された。これらの結果は、共生細菌の祖先が環境中における自由生活では必要であった機能が、宿主動物の細胞内共生へ移行していく中で、不必要になった機能の遺伝子をまず偽遺伝子化させ、最終的には、偽遺伝子領域を欠失させてゆくことが考えられた。

これらの解析から、シロウリガイ類の一部の共生細菌のゲノムは、これまでに報告されている共生細菌のゲノムよりもゲノム縮小の初期段階であると考えられた。

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6件)

Nagasaki, T., Hongo, Y., Koito, Y., Nakamura-Kusakabe, I., Shimamura, S., Takaki, Y., Yoshida, T., Maruyama, T., and Inoue, K.: "Cysteine dioxygenase and cysteine sulfinate decarboxylase genes of the deep-sea mussel *Bathymodiolus septemdierum*: possible involvement in hypotaurine synthesis and adaptation to hydrogen sulfide", *Amino Acids*, 47, 571-578 (2015). 査読有
DOI: 0.1007/s00726-014-1891-z

Shigeno, S., Ogura, A., Mori, T., Toyohara, H., Yoshida, T., Tsuchida, S.,

and Fujikura, K. : “ Sensing deep extreme environments: the receptor cell types, brain centers, and multi-layer neural packaging of hydrothermal vent endemic worms ” , *Frontiers in Zoology*, 11:82 (2014). 査読有
DOI: 10.1186/s12983-014-0082-9

Takahara, H., Ogiwara, J., Yoshida, T., Okuda, S., Nakajima, M., Iwabuchi, N., and Sunairi, M. : “ Enhanced translocation and growth of *Rhodococcus erythropolis* PR4 in the alkane phase of aqueous-alkane two phase cultures were mediated by GroEL2 overexpression ” , *Microbes and Environments*, 29, 346-352 (2014). 査読有
DOI: 10.1264/jisme2.ME13158

Numoto, N., Nakagawa, T., Ohara, R., Hasegawa, T., Kita, A., Yoshida, T., Maruyama, T., Imai, K., Fukumori, Y., and Miki, K. : “ The structure of a deoxygenated 400 kDa hemoglobin reveals ternary and quaternary structural changes of giant hemoglobins ” , *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 70, 1823-1831 (2014). 査読有
DOI: 10.1107/S1399004714008475

高木善弘、吉田尊雄：“化学合成生態系における動物と化学合成細菌との共生”，*生物の科学 遺伝*, 67, 482-489 (2013). 査読無

Hongo, Y., Nakamura, Y., Shimamura, S., Takaki, Y., Uematsu, K., Toyofuku, T., Hirayama, H., Takai, K., Nakazawa, M., Maruyama, T., and Yoshida, T. : “ Exclusive localization of carbonic anhydrase in bacteriocytes of the deep-sea clam *Calyptogena okutanii* with thioautotrophic symbiotic bacteria ” , *Journal of Experimental Biology*, 216, 4403-4414 (2013). 査読有
DOI: 10.1242/jeb.092809

〔学会発表〕(計9件)

生田哲朗、高木善弘、丸山正、吉田尊雄：“深海化学合成系における新しい環境適応戦略 ～シチヨウシンカイヒバリガイ共生菌ゲノムから～” 日本進化学会第16回大会、2014年8月24日、高槻現代劇場(大阪府・高槻市)

吉田尊雄、高木善弘、島村繁、丸山正：“深海性二枚貝に細胞内共生する化学合成細菌のゲノム進化” 第17回微生物アカデミー研究集会、2014年8月21日、北里大学(神奈川県・相模原市)

Ozawa, G., Kaneko, T., Shimamura, S.,

Takaki, T., Koshiishi, T., Kato, C., Maruyama, T., and Yoshida, T.: “深海性二枚貝シロウリガイ類における化学合成共生細菌の宿主転換の可能性” 日本地球惑星科学連合2014年大会、2014年4月29日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Ikuta, T., Takaki, Y., Shimamura, S., Maruyama, T., and Yoshida, T.: “Heterogeneous subpopulations of thioautotrophic intracellular symbiont in a deep-sea mussel, *Bathymodiolus septemdiarum*, and their patchy distribution in the host gill.” 5th International Symposium on Chemosynthesis-Based Ecosystems, 2013年8月20日、Victoria (Canada)

Yoshida, T., Takaki, Y., Shimamura, S., Nagai, Y., Tsuda, M., Tsukahara, M., Nezu, M., Shimoji, M., Teruya, K., Teruya, M., and Maruyama, T. : “ The genomes of intracellular symbionts in deep-sea *Calyptogena* clams are still in an early phase of reductive genome evolution. ” 5th International Symposium on Chemosynthesis-Based Ecosystems, 2013年8月20日、Victoria (Canada)

Ozawa, G., Kaneko, T., Shimamura, S., Takaki, Y., Yokobori, S., Koshiishi, T., Kato, C., Maruyama, T., and Yoshida, T.: “ Cospeciation of deep-sea *Calyptogena* clams and chemoautotrophic bacteria ” 5th International Symposium on Chemosynthesis-Based Ecosystems, 2013年8月19日、Victoria (Canada)

野村洋輔、生田哲朗、中村欽光、丸山正、吉田尊雄：“シマイシロウリガイの鰓と卵巣における共生菌の硫黄酸化系遺伝子及び二酸化炭素固定遺伝子の発現の局在解析” 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月14日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

小澤元希、島村繁、高木善弘、丸山正、吉田尊雄：“ミトコンドリアゲノムから見た深海性二枚貝シロウリガイ類の系統関係および共生細菌との共進化について” 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月12日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

Hongo, Y., Nakamura, Y., Shimamura, S., Takaki, Y., Uematsu, K., Toyofuku, T., Hirayama, H., Takai, K., Nakazawa, M., Maruyama, T., and Yoshida, T.: “ The characterization and localization of carbonic anhydrase in symbiotic deep-sea clam *Calyptogena okutanii*. ” *Advances in genomics of (Deep-sea) chemoautotrophic*

symbioses, 2012年5月25日、Roscoff
(France)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 尊雄 (YOSHIDA, Takao)
独立行政法人海洋研究開発機構・海洋生物多
様性研究分野・主任技術研究員
研究者番号：60399566

(2) 連携研究者

高木 善弘 (TAKAKI, Yoshihiro)
独立行政法人海洋研究開発機構・深海・地殻
内生物圏研究分野・主任技術研究員
研究者番号：10399561

島村 繁 (SHIMAMURA, Shigeru)
独立行政法人海洋研究開発機構・深海・地殻
内生物圏研究分野・技術主事
研究者番号：40416003