

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：10106

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657023

研究課題名(和文) 深海化学合成生物の長期飼育技術に関する研究：サンプリング依存研究からの脱却

研究課題名(英文) Breakthrough of long-term cultivating technologies for chemoautotrophic invertebrates

研究代表者

小西 正朗 (KONISHI, Masaaki)

北見工業大学・工学部・助教

研究者番号：90533860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：硫化水素を供給できる飼育システムを開発し、硫化水素を利用できる硫黄酸化細菌を共生させているシロウリガイやシチヨウシンカイヒバリガイの長期飼育を試み、共生菌を保持できるか検討した。シロウリガイでは43日間、シチヨウシンカイヒバリガイでは14カ月以上の長期飼育に成功した。Fluorescence in situ hybridization (FISH)を用いて、飼育個体のエラ切片を観察したところ、共生菌を保持していることが確認できた。炭酸ナトリウムの安定同位体を含む飼育水中で1週間の短期飼育を行い無機炭素の取り込み量を評価したところ、共生菌を保持した個体で優位に無機炭素の取り込み量が増加した。

研究成果の概要(英文)：We developed a rearing tank system with supplying hydrogen sulfide and cultivated endosymbiont and the host invertebrates including *Calyptogena* spp. and *Bathymodiolus septemdierum*. *Calyptogena* spp. survived for 43 days in the tank. Furthermore, *B. septemdierum* survived for more than 14 months. The symbionts of *B. septemdierum* were observed in the gill tissues of 3 and 14 month-cultivated individuals based on fluorescence in situ hybridization analysis. According to a tracer experiment using stable isotope, ^{13}C uptake in gill and foot tissues of 3 and 14 month-cultivated individuals from inorganic carbon, bicarbonate, observed under the presence of H_2S .

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：生理生態 深海 共生 硫化水素 無脊椎動物 独立栄養細菌

1. 研究開始当初の背景

深海に存在する化学合成生態系は硫化水素・メタン等の化学物質をエネルギー源とした原核生物が一次生産者となる生態系である。化学合成生態系の一次生産者の一部は貝類・多毛類・甲殻類の組織内外に共生した硫黄酸化細菌やメタン酸化細菌が含まれる。中でも硫黄酸化細菌と共生している生物は多く知られており、その生態・多様性・分類・進化に関する研究や共生菌のゲノム解析等が、サンプリング主体の研究手法により推進されている。不用なサンプリングをせずにより効率的な研究方法として、実験室での長期飼育による観察実験が有効である。しかし、深海の低温・微好気を維持しつつ、適切な濃度の硫化水素を飼育水槽中に導入することが困難であったため、飼育を基盤とする研究手法が行われていなかった。

2. 研究の目的

ガスセンサーを利用した硫化水素添加装置を備えた飼育水槽を構築し、深海の化学合成生態系における硫化水素濃度を再現することにより、これまで飼育が困難であった水生生物を長期飼育することを目的とした。

また、飼育が困難であるシロウリガイの生育環境については、調査船を用いて、サンプリングする際、生育環境の化学組成・微生物組成を詳細に検討し、飼育研究へのフィードバックを試みた。

3. 研究の方法

(1) 生育環境調査

シロウリガイの生育環境調査のため、海洋研究開発機構が所有する調査船「なつしま」ならびに ROV「ハイパードルフィン」を使用した調査を実施した。ハイパードルフィンのペイロードに ISFET-pH センサーと自己記録式 CTD (Sea-bird 19plusV2) を艀装し、直上水の環境パラメーターを得た。コアラーを用いて、シロウリガイコロニーならびに直近のリファレンスサイトの地質コアを採取した。コア内の DO を DO センサーで測定した後、4 cm ほどのセクションにカットし、遠心分離にて、間隙水を採取した。また、DNA 抽出用にコアサンプルを採取し、-80°Cにて保存した。硫化水素濃度ならびにアンモニウムイオン濃度は船上で比色法にて、定量した。残りの間隙水は冷凍保存し、HPLCにて、硝酸イオン濃度、硫酸イオン濃度、亜硝酸イオン濃度を測定した。DNA サンプルは陸上ラボにて、DNA 抽出 (PowerMAX soil DNA Isolation Kit, MO BIO Laboratories) し、プライマー (Uni530F, Uni907R) にて 16S rRNA の部分配列を PCR 増幅し TA クローニングした。クローンはキャピラリーシーケンサー (Applied Biosystems Model 3700) で配列解析を実施した。得られたシーケンスは MOTHUR 3.6 を用いて、デフォルトパラメータで 97%の相同性により operational taxonomic units (OUT)にクラスタ

リングした。NAST アルゴリズムによるアライメントを行い分類し、系統分類は ARB ソフトウェアにて SILVA SSU Ref111 データベースに割り当てた。

(2) 飼育装置

飼育装置は Konishi et al. *Environ & Microbe* 28:25-32, 2013) で報告したものをシロウリガイ用に改造して使用した。200L の水槽に種々の制御装置を設置した。硫化水素添加用の多孔質チューブをシリコンチューブに変更し、飼育水槽に敷き詰めたサンゴ砂の内部に埋めることで、地殻内からの硫化水素湧出を水槽内で再現した。水温は 5°C に維持し、溶存酸素は特に制御しなかった。水槽内の硫化水素はガスセンサーにより過剰供給を監視しつつ、自動もしくは手動でオンオフを行い適当な硫化水素濃度を維持した。

(3) 安定同位体取り込み実験

安定同位体の取り込みを確認するために、1L 容量の広口瓶に人工海水を入れ、¹³C Atom% が 300 μM の NaH¹³CO₂ を添加した。用意した広口瓶に 1 個体ずつ生物サンプルを入れ、低温室中で保持した。保持中に消費される硫化水素を補うため、1-2 日おきに飼育水槽の硫化水素を含む海水を 30 μM 添加し、硫黄酸化細菌の活性を維持した。飼育後、解剖し、各組織に取り込まれた ¹³C/¹²C を分析した。 $\delta^{13}\text{C}$ は以下の式から算出した。

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{Sample}}}{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{reference}}} - 1 \right)$$

(4) Fluorescence *In situ* hybridization (FISH)

解剖したサンプルのエラ組織をエタノール/パラホルムアルデヒドで固定した後、パラフィンに包埋し、10 μm の切片を作成した。切片はキシレン、エタノールで脱パラフィン処理した後、Cy3 ラベルしたオリゴプローブ Bsob692 (5'-CGCCATTGATGTTTCCTTCAG-3', T_m = 51 °C) を含むハイブリダイゼーション溶液 (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.9 M NaCl, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.01% sodium dodecyl sulfate, 50% (v/v) formamide) に浸漬し、46°C でインキュベーションした。その後、プローブとホルムアミドを含まないハイブリダイゼーション溶液で 48°C で洗浄した。さらに DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) で染色し、蛍光顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

(1) シロウリガイの生育環境

相模湾初島沖のシロウリガイサイトでサ

表 1. コアサンプリングならびに CTD データ

	Core 1	Core 2	Core 3	Core 4
Sampling date	2013. 4. 4	2013. 4. 9	2013. 4. 4	2013. 4. 4
Location	35°00.957N 139°13.336E	35°00.938N 139°13.227E	35°00.960N 139°13.322E	35°00.963N 139°13.237E
Depth (m)	849	809	849	806
Core length (cm)	16	12	20	8
Number of <i>Calypptogena</i> spp.	3	1	0	0
CTD data (Sea **)				
Temp. (°C)	4.15	4.45	4.15	4.45
DO (mg/L)	1.966	1.815	1.966	1.820
pH	7.71	7.57	7.71	7.71
Pressure (Mpa)	8.57	8.65	8.57	8.17

ンプリングを行った。表 1 にサンプリングの詳細なデータを示す。コアサンプルの直上水の温度は 4.15-4.45°C、pH は 7.71-7.57 であった。コロニーサイトのサンプルには 79-100 mm のシロウリガイが 1-3 個体含まれていた。海底面からおおよそ 100 mm 程度までシロウリガイが侵入していた。DO プロファイル (Data not shown) の測定から海底面から 5-10 mm までに溶存酸素が減少し、検出限界以下まで減少することがわかった。シロウリガイは嫌気・微好気の境界条件に適応していることが示唆された。

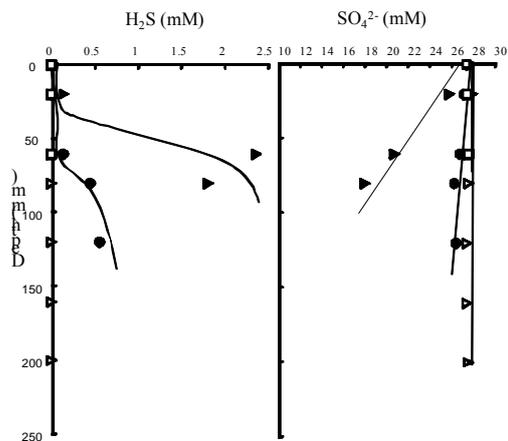
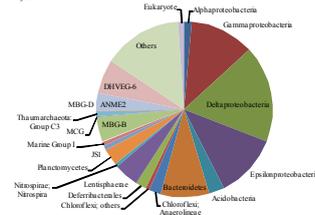


図 1. 硫化水素ならびに硫酸イオンの分布 (●, Core 1, ▲, Core 2, △, core 3, □, core 4)

図 1 にシロウリガイサイトならびにリファレンスサイトにおける硫化水素と硫酸イオンの鉛直プロファイルを示す。シロウリガイコロニー周辺の Core 1 ならびに Core 2 では深度が深くなるにつれて硫酸イオン濃度が減少し、硫化水素濃度が高くなる傾向が観察された。硫化水素濃度が高い Core 2 ではその傾向が強く、硫酸イオン濃度は 28 mM から 18 mM まで減少しており、それに伴い硫化水素が 2 mM 程度生成していることがわかる。一方、リファレンスサイトでは、硫酸イオンの減少ならびに硫化水素の増加は認められなかった。この結果から、シロウリガイコロニ

(A) Sites near *Calypptogena* colony including core 1, 2



(B) Reference sites including core 3, 4

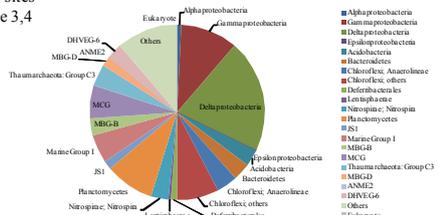


図 3. 菌叢解析結果 (コア全層)

一近傍では、硫酸イオンが還元され硫化水素が生成していることが示唆された。アンモニ、硝酸、亜硝酸濃度のデータについて、検討を進めている。

菌叢解析結果のまとめを図 3 に示す。シロウリガイコロニーサイトでは硫化水素が存在するために、硫黄酸化細菌と思われる *Epsilonproteobacteria* が優占化していることがわかる。また、硫酸還元菌と思われるクローンならびに嫌氣的メタン酸化菌 (ANME-2) のクローンも検出されている。リファレンスサイトではこれらのクローンは検出されていない。一方、一般的な深海底でよく検出される Marine Group I に含まれるクローンは検出されなかった。菌叢解析の結果から、湧出しているメタンを開始物質とする微生物反応により、シロウリガイの生育に必要な化学的な条件が成立していることが示唆された。

(2) シロウリガイの飼育と評価

シロウリガイの飼育条件は水温 3.5~3.9°C、DO 4.8~7.2, pH 7.43~7.52 で期間中維持された。19 個体のシロウリガイを搬入し、飼育を試みたが、2 週間で 8 個体が死亡した。安定同位体の取り込み実験に使用するため、30 日後に 7 個体をサンプリングした。さらに 3 個体死亡したため、43 日後には 1 個体のみが生存していた。生存個体をサンプリングしエラ組織を解析中である。安定同位体実験は小分けした瓶中でほとんどの個体が死んでしまい。議論に耐えうるデータがえられていない。シロウリガイは硫化水素以外の様々な要因に敏感であることが考えられた

また、飼育水槽中の底層中の硫化水素濃度は環境中の 10~100 倍以上高い濃度になっていたことや、途中で死んだ個体からの有機物の影響等で水質をうまく管理できなかったことも悪影響を与えたと考えられる。



図 4. 飼育中のシロウリガイ

(3) シチヨウシンカイヒバリガイの飼育と評価

シチヨウシンカイヒバリガイは 2012 年 4 月 24 日～5 月 1 日に行われた NT12-10 航海ならびに 2013 年 4 月 21 日～4 月 29 日に行われた NT13-09 で得られたものを使用した。飼育中の水温は 4-5°C、DO は積極的に制御せず、硫化水素濃度は 10-50 μM 付近で維持した。1 cm 以下の小さな個体が生存しやすい傾向があることがわかり、NT12-10 航海で得られた個体は 14 カ月以上生存した。NT12-10 航海で得られた個体は硫化水素存在下ならびに非存在下で 3 カ月飼育した。飼育した個体をそれぞれ小瓶にわけ、安定同位体を含む重炭酸から有機炭素への炭素取り込みについて検討した。小瓶での飼育期間は 2 週間とし、小瓶中での硫化水素は逐次的に添加し可能な限り、維持した。安定同位体を含まないサンプルは 3 カ月飼育したものをを用いた。その後、解剖し、エラ組織ならびにアシ組織に含まれる安定同位体比を測定した結果を図 5 に示す。硫化水素存在下で鰓組織中 $\delta^{13}\text{C-VPDB}$ がの 3 カ月飼育した個体群は +300% 程度まで増加した。一方、硫化水素を添加せずに飼育した個体では、安定同位体を添加しなかったリファレンスと比べてわずかの $\delta^{13}\text{C-VPDB}$ の増加にとどまった。面白いことに 14 カ月飼育した個体群は 3 カ月飼育した個体群よりも多くの安定同位体を取り込んでおり、約 +600% の $\delta^{13}\text{C-VPDB}$ を示した。アシ組織中にもエラ組織と同等若しくは若干少ない同位体の取り込みが確認できた。エラのみならずアシ組織に同位体を取り込まれていることから、共生硫黄酸化細菌を介して無機炭素がシチヨウシンカイヒバリガイ中の有機炭素へ取り込まれていることを示している。

さらに同位体の取り込み実験に用いた組

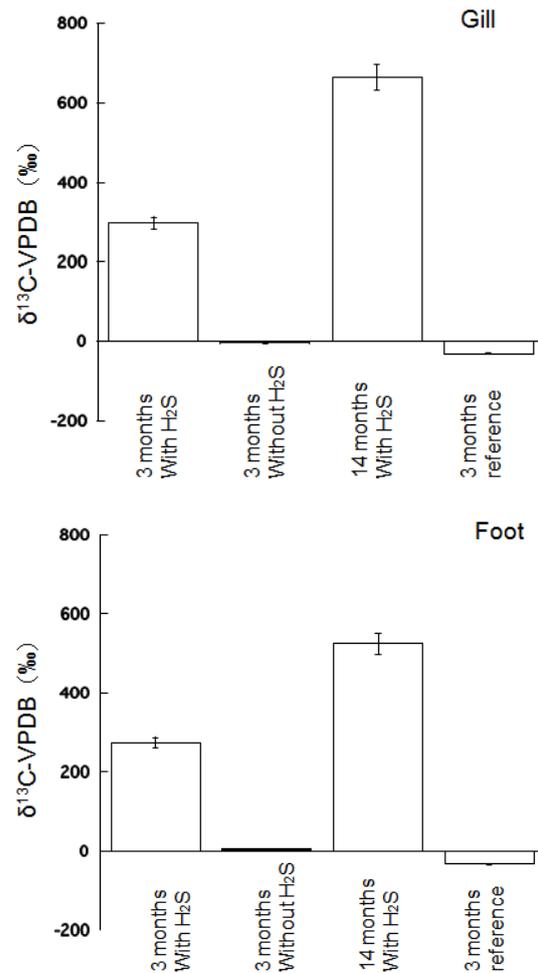


図 5. 安定同位体取り込み実験結果

織を固定化し FISH 解析を行った結果を図 6 に示す。硫化水素添加をせずに 3 カ月飼育した個体では、共生菌の存在を示す赤色蛍光のシグナルが全く検出されなかった。硫化水素が与えられないことで共生菌の数が減少したことが示唆された(図 5B)。硫化水素存在下で 3 カ月飼育した個体ではシグナルが弱いものの赤色蛍光シグナルが検出された(図 5A)。これらの結果は適当な濃度の硫化水素の添加が共生菌の維持に寄与することを示している。14 カ月飼育した個体では 3 カ月のもので比べて赤色蛍光シグナルがよりはっきり強く検出されていることがわかる(図 5C)。生育段階の異なるサンプルであるが、サンプリング直後ではエラ系組織の周辺にバクテリオサイトがはっきりと検出される(図 5D)。若干少ないものの、14 カ月飼育した個体では、飼育水槽中の硫化水素を効率的に利用できる程度の硫黄酸化細菌が保持されていることが示唆された。

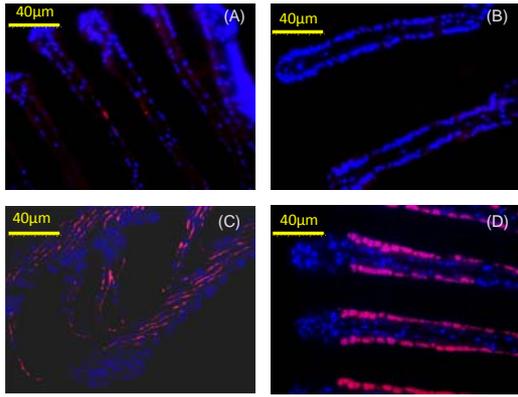


図 6. FISH 解析結果 (A) 硫化水素添加条件で 3 カ月飼育 (B) 硫化水素無添加で 3 カ月飼育 (C) 硫化水素添加条件で 14 カ月飼育 (D) サンプル直後

これらの結果から、これまでに報告しているゴエモンコシオリエビのような外部共生菌のみならず、強い共生関係を持つ内部共生菌に対しても飼育中の硫化水素添加効果が立証できた。

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 2 件)

小西正朗(他 5 名 1 番目) Effects of hydrogen sulfide on the bacterial communities on the surface of galatheid crab, *Shinkaia crosnieri*, and in a bacterial mat, cultured in rearing tanks., *Microbes Environ* 28: 25-32 (2013) (査読有)

小西正朗, “「木を食べる」貝とその共生菌: バイオ燃料研究との関連” *生物工学*, 90(8): 509 (2012) (査読なし)

[学会発表] (計 7 件)

小西正朗(他 7 名 1 番目) Enrichment culture for symbiotic microbes and its hosts of chemosynthetic ecosystems in the deep sea: potential as new approach for deep-sea bioresources, 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition, 16-21th Sept, 2012, EXCO, Deagu, Korea.

小西正朗, 和辻智郎, 中川聡, 秦田勇二, 高井研, 豊福高志 “飼育培養手法を用いた化学合成系無脊椎動物の共生菌-宿主関連性の実験的検討” 日本地球惑星科学連合 2012 年大会, 千葉, 幕張メッセ, 2012 年 5 月 23 日

小西正朗 “深海生態系の解明とバイオ資源としての活用に関する研究—プロセス制御技術の活用による飼育培養技術開発を中心として” 平成 24 年度技術士会生物工学部会業

績発表会東京, 茸手第 2 ビル, 2012 年 6 月 2 日

長井裕季子, 豊福高志, 野牧秀隆, 和辻智郎, 生田哲朗, 高木善弘, 吉田尊雄, 小西正朗 “硫化水素添加水槽を用いたシロウリガイ飼育に向けて” 2014 ブルーアースシンポジウム, 東京海洋大学 平成 26 年 2 月 19 日

小西正朗, 野牧秀隆, 平山仙子, 山本正浩, 柳川勝紀, 牧田寛子, 西真郎, 阿部真理子, 長井裕季子, 福場辰洋, 堀内淳一, 生田哲朗, 吉田尊雄, 豊福高志 “シロウリガイ類の生育環境の調査” 2014 ブルーアースシンポジウム, 東京海洋大学 平成 26 年 2 月 20 日

杉村 誠, 根本 誠, 根本 卓, 北嶋 円, 吉田尊雄, 長井裕季子, 豊福高志, 小西正朗, 生田 哲朗 “長期飼育下におけるシロウリガイ類の行動観察の試み” 2014 ブルーアースシンポジウム, 東京海洋大学 平成 26 年 2 月 20 日

長井裕季子, 豊福高志, 野牧秀隆, 和辻智郎, 生田哲朗, 高木義弘, 吉田尊雄, 滋野修一, 井上広滋, 小西正朗 “シチヨウシカイヒバリガイ共生系は実験室でも化学合成できるのか?” 日本地球惑星科学連合 2014 年大会, パシフィコ横浜, 平成 26 年 4 月 29 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 水生生物の飼育システムとその飼育方法

発明者: 小西正朗・和辻智郎

権利者: 独立行政法人海洋研究開発機構

種類:

番号: 特願 2013-537531 (PCT/JP2012/075641)

出願年月日: 2012 年 10 月 3 日

国内外の別: 国内・海外

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 正朗 (KONISHI, Masaaki)

北見工業大学・工学部・助教

研究者番号: 90533860