

北里大学大学院海洋生命科学研究科

海洋生命科学専攻博士後期課程

研究論文要旨

深海産共生二枚貝類のシンカイヒバリガイ
における貪食機構

指導教員 吉田 尊雄 客員准教授

平成 24 年度 海洋生命科学専攻博士後期課程入学

学籍番号 DF-12002

多米 晃裕

平成 29 年 12 月

深海産共生二枚貝類のシンカイヒバリガイにおける食食機構

DF-12002 多米 晃裕

序章

深海の熱水や湧水域には、メタンや硫化水素をエネルギー源に有機物合成する化学合成細菌を一次生産者として、シロウリガイ類、シンカイヒバリガイ類などの二枚貝類が優占種となる化学合成生態系が存在する。光の届かない深海において、二枚貝の多くは化学合成細菌（以下、共生菌）を鰓細胞内に宿し、共生菌が合成した有機物に依存した共生系を構築している。深海産二枚貝類の生命の維持には、共生菌の獲得が重要となるが、未だに獲得経路の詳細など十分に解明されていない。宿主と共生者の関係を構築する共生菌獲得メカニズムの解明は、細胞内共生系の成立過程を理解する上で重要である。

シンカイヒバリガイ類の共生菌獲得方法は、飼育実験により共生菌の消失と再獲得が見られることから、環境中から共生菌を獲得する水平伝達によると考えられている。この一連の現象は、シンカイヒバリガイ類が細胞内共生系の成立過程を実験的に調べるのに有用であることを示しているが、共生菌の獲得メカニズムの詳細は不明である。シンカイヒバリガイ類は、宿主と共生菌は1対1の種特異的な関係にあることが知られている。共生関係を築くためには、環境中に多くの微生物が混在する中で共生菌と他の微生物を区別する必要があり、自己-非自己を識別する生体防御の働きが関与すると予想された。

浅海の二枚貝類では、体内に侵入した微生物に対して、主に血球が生体防御の重要な役割を果たす。二枚貝類の血球は食食機構により微生物を細胞内に取り込み、消化、排除する働きがある。そのため、シンカイヒバリガイ類は血球の食食機構により他の微生物と共生菌を区別することで、共生菌を獲得する可能性が考えられるが、深海産共生二枚貝類の血球の生体防御機構は不明確である。また、シンカイヒバリガイ類は、イガイ類を起源とし、進化の過程で鰓細胞表面に存在する共生菌が細胞外から細胞内共生へ移行したと推定されている。このことから、鰓細胞が食食能を持つことで共生菌を獲得する可能性も考えられる。そこで、本研究ではシンカイヒバリガイの血球及び鰓細胞の食食機構を介した共生菌の獲得方法を探索し、共生系成立のメカニズムを推定することを目的とした。第一章では深海産共生二枚貝類の血球の種類と食食能を調べ、第二章では共生菌の獲得経路を探索し、第三章では血球と鰓細胞の食食機構を詳細に解析した。総合考察では、本研究結果を元に食食機構による共生系の成立メカニズムを推定した。

第一章 シンカイヒバリガイを含む5種の深海産共生二枚貝類の血球の生体防御

二枚貝類の血球の分類は未だ統一した見解がなく、また深海産共生二枚貝類に特有な血球が存在するかは不明である。そのため、生息域や共生菌の種類が異なるシンカイヒバリガイ類3種とシロウリガイ類2種を対象に、血球の種類の特特定と食食能を解析し、これまでの知見に基づき総括的な

比較を行った。シンカイヒバリガイ類の血球は、無顆粒球 (Agranulocyte、以下、AG)、好塩基性顆粒球 (Basophilic granulocyte、以下、BG)、好酸性顆粒球 (Eosinophilic granulocyte、以下、EG) の3種類から構成され、シロウリガイ類は赤血球 (Erythrocyte、以下、ERC)、BG、EG の3種類から構成されていた。5種の二枚貝のAGやERCに貪食能は無く、一方、BGとEGは貪食能を持つが、貪食活性や食胞ーリソソーム融合活性はBGよりもEGの方が高かった。これらの結果から、それぞれ3種類の血球は機能分化していることが示唆された。共生菌を持たない近縁種との比較から、深海産共生二枚貝類に特有な血球は存在せず、生息域の違いや共生菌の種類や有無に関わらず、AG、BG、EGに相当する3種類の血球は多くの二枚貝類に普遍的に備わっていた。また、BGとEGのリソソーム融合反応に時間的な差が見られたが、両者は微生物を2~24時間の間に貪食及び消化し、BGとEGは二枚貝類の血球の中でも異物排除に関わる血球であると考えられた。

第二章 シンカイヒバリガイにおける共生菌獲得経路の探索

血球及び鰓による共生菌の獲得経路を明らかにするため、シンカイヒバリガイ個体へ、24時間のGFP発現大腸菌(生菌、以下、LEc)とFITC蛍光標識ビブリオ菌(死菌、以下、DV)の添加実験を行った。ホールマウント切片観察の結果、体腔内に流入した極少数のLEcとDVは血球のBGやEGに局在し、貪食される可能性を示した。一方で、LEcとDVの多くは鰓細胞内に局在した。個体及び切り出した鰓組織片に、LEc、DVに加え、FITC蛍光標識した大腸菌(死菌、以下、DEc)と共生菌(死菌、以下、DSy)を24時間添加する実験を行った。鰓組織片での実験でも、全ての微生物が鰓細胞内に局在した。これにより、鰓細胞自身が共生菌を含め微生物の種類や生死に関わらず貪食する可能性が明らかとなった。鰓細胞が貪食した微生物と、元々鰓細胞内に共生する共生菌(以下、菌細胞内共生菌)のリソソーム融合反応を調べると、前者は2時間ですでに融合反応が見られるのに対し、後者の融合反応は24時間後でもほとんど見られなかった。そのため、菌細胞内共生菌と貪食した微生物の間で細胞内消化への進行に違いがあることが示唆された。

第三章 血球と鰓細胞の貪食機構における食胞成熟過程

貪食機構における細胞内消化は、様々な因子の制御により食胞の成熟過程を経て進行する。貪食後、微生物を内包する食胞に、Rab5や初期エンドソーム抗原-1 (EEA1)が付加して初期ファゴソームが形成され、その後、Rab7やRab9が付加して後期ファゴソームへ成熟する。この時、ゴルジ体にある加水分解酵素は、マンノース6リン酸受容体(M6PR)と結合して後期ファゴソームに輸送される。M6PRは後期ファゴソームに集積し、貪食された微生物は輸送された加水分解酵素により処理された後、後期ファゴソームとリソソームの融合により細胞内消化される。そこで、貪食機構の食胞成熟に着目し、血球が貪食したLEcやDSy及び、鰓細胞での菌細胞内共生菌と貪食されたLEcとDSyの食胞成熟過程を、上述の5つの因子(Rab5, Rab7, Rab9, EEA1, M6PR)に対する抗体を用いて免疫染色

を行い解析した。その結果、血球や鰓細胞に貪食された LEc、DSy では、一連の食胞成熟を経て、食胞に M6PR の集積が見られることから、その後細胞内消化されると考えられる。しかし、菌細胞内共生菌を内包する食胞では、EEA1、Rab5、Rab7、Rab9 の局在は見られるが、M6PR の局在はほとんど見られなかった。この結果は、菌細胞内共生菌は貪食により細胞内に取り込まれ、その後、M6PR の集積が無い後期ファゴソーム内に局在し、消化されない状態で留まっていることを示唆する。シンカイヒバリガイを海水のみで飼育し、菌細胞内共生菌が消失する過程での M6PR の局在を調べた。その結果、飼育 0 日個体では M6PR の局在はほとんど無いが、2 日の個体では、食胞を含め一つの細胞内全体に M6PR の局在が見られ、さらに、7、14、28 日間の経過ごとに M6PR が集積した鰓細胞が増加した。1 細胞ごとに食胞への M6PR 集積増加に伴って菌細胞内共生菌が減少していくことから、飼育時の共生菌の消失は食胞の細胞内消化によって引き起こされる事が明らかとなった。

総合考察

体腔内に僅かに流入した微生物や共生菌は血球の BG や EG により貪食、消化されることから、血球は共生菌の獲得に関与しないと考えられた。一方、鰓細胞は貪食能を持ち、菌細胞内共生菌は M6PR の集積が無い後期ファゴソーム内に局在することから、鰓細胞の貪食機構により共生菌が獲得されると考えられた。刺胞動物の共生系の確立やサルモネラの感染は、共生者や感染者側の分泌因子により Rab7 や Rab9 の付加を阻害して成立するとされている。しかし、シンカイヒバリガイでは、共生菌の食胞に Rab7 と Rab9 が付加しており、これらは M6PR の輸送を制御すること知られていることから、宿主側が共生菌の消化と維持を制御していると推察された。もし菌細胞内共生菌から阻害因子が出ているならば、飼育時の共生菌消失過程で、1 つの鰓細胞内で複数の共生菌が同時に消化されることはないはずである。シンカイヒバリガイ類の栄養獲得方法は、菌細胞内共生菌の消化又は菌細胞内共生菌から供給される有機炭素を得るといった 2 つの方法が考えられてきた。飼育 0 日個体では M6PR 集積食胞は非常に少ないため、菌細胞内共生菌の消化は主たる栄養獲得法ではないと推察される。以上のことから、宿主は貪食によって共生菌を獲得し、M6PR を制御できる後期ファゴソーム内で維持することで、共生菌から直接有機炭素を得ているものと考えられる。また、共生菌からの供給物が低下した際は消化すると推定される。本研究の結果から、宿主の貪食機構が、共生系の確立と維持及び栄養の獲得を制御していると結論した。

細胞内共生説では、宿主に捕食された細菌は、宿主と共生関係を結び、やがて自身のゲノムが縮小しオルガネラが成立したとされている。本研究が提唱する宿主の貪食機構の制御は、宿主が細菌を支配する過程の 1 つの現象と考えることも出来、真核生物の成り立ち及び多様化の理解に重要な知見を与えると考えられる。今後、宿主は何を共生菌から得て、どのように M6PR を制御するかを明らかに出来れば、宿主の制御機構がもたらす生物の進化や多様化及びオルガネラ進化の過程を解き明かす手掛かりになると期待される。