

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

深海性二枚貝シロウリガイ類と
その細胞内共生細菌の共進化に関する研究

指導教員 吉田 尊雄 客員准教授

平成 25 年度 海洋生命科学専攻博士課程 入学

小澤 元希

平成 29 年 1 月

第一章 イントロダクション

深海の熱水域や湧水域には化学合成生態系が存在する。化学合成生態系では、硫化水素の酸化によりエネルギーを得て、無機炭素から有機物を合成する化学合成細菌が一次生産者となり、そこに生息する無脊椎動物の多くは化学合成細菌と共生している。この共生系の成り立ちを把握することは重要であるが、未だ十分に解明されていない。

化学合成生態系で優占種の二枚貝シロウリガイ類は、鰓上皮細胞内に化学合成細菌(共生細菌と呼ぶ)を共生させている。共生細菌は、卵を介して次世代に垂直伝達する(Cary and Giovannoni, 1993; Endow and Ohta, 1995)。宿主であるシロウリガイ類と共生細菌の系統樹の比較から共通祖先の宿主と共生細菌が同時に共種分化してきたと提唱された(Peek et al., 1998)。近年、1種の宿主とその共生細菌について系統解析から共種分化していない例が示された(Stewart et al., 2008)。現在まで、宿主と共生細菌の系統解析では、用いた遺伝子情報が十分ではなく、高い信頼性を示す系統樹ではないため、全ての宿主が共生細菌と共種分化してきたか不明である。本研究は、シロウリガイ類と共生細菌の系統関係を明らかにし、その進化パターンとメカニズムを調べる事を目的とした。具体的には、宿主及び共生細菌の信頼性の高い系統樹が必要となる。共生細菌は、既に2種のゲノムが決定され複数種の共生細菌で複数種類の遺伝子情報が得られている。一方、宿主の遺伝子情報は少ない。そこで第二章では、宿主の系統関係を明らかにする遺伝子マーカーとして、核遺伝子よりも進化速度が早いミトコンドリア遺伝子に着目し、4種のシロウリガイ類のミトコンドリアゲノム配列を新規に決定し解析を行った。第三章では決定した配列をもとに8種の宿主のミトコンドリア遺伝子配列を決定し、ミトコンドリア及び共生細菌の複数の遺伝子配列に基づいた系統樹の比較から、宿主と共生細菌の進化パターンを解析した。第四章では、共生細菌の伝達経路の考察を行った。

第二章 シロウリガイ類のミトコンドリアゲノム解析

本研究では *Abyssogena mariana*、*A. phaseoliformis*、*Isorropodon fossajaponicum* 及び *Phreagena okutanii* の4種のミトコンドリアゲノムを決定した。既存の *cox1* と *rrnL* 遺伝子上で共通 PCR プライマーを作成し、ミトコンドリアゲノムを2断片に分けて増幅し塩基配列を決定した。他の二枚貝と同様に、シロウリガイ類のミトコンドリアゲノムは、13種の蛋白質 (*atp6*, *atp8*, *cox1-3*, *cob*, *nad1-6*, *nad4L*)、2つの rRNA (*rrnL*, *rrnS*)、22種の tRNA (18種のアミノ酸 tRNA に対して1種類の tRNA, ロイシン、セリンそれぞれに対して各2種類の tRNA)を持っていた。アサリやイガイでは、卵と精子由来の塩基配列が異なるミトコンドリアが次世代に伝達する両性遺伝がある。アサリ雌雄ミトコンドリア

を含めて *rrnL* 遺伝子上で共通 PCR プライマーを作成し増幅した *P. okutanii* 3 個体の卵巣と精巢の *rrnL* 遺伝子配列は同じであり、シロウリガイ類のミトコンドリアは母性遺伝と考えられた。4 種のシロウリガイ類と既知の二枚貝類のミトコンドリアゲノムを用いて、*atp8* 遺伝子以外の 12 種の蛋白質のアミノ酸配列と 2 種の rRNA の塩基配列の連結配列を用いて系統樹を作成した。その結果、シロウリガイ類は強い単系統性を示し、ハマグリ科との姉妹関係を示し、ハマグリ科は第三章の系統解析の外群に適している事が示された。無脊椎動物ではミトコンドリアゲノムの遺伝子配置に多様性があるが、同じ属内では tRNA 以外の遺伝子配置に保存性が見られる。近年決定された *Calypptogena magnifica* (Liu et al., 2015) を含む 5 種のシロウリガイ類のミトコンドリアゲノムは、tRNA 以外の遺伝子配置が同じであった。この結果から、4 属(*Abyssogena*, *Calypptogena*, *Isorropodon*, *Phreagena*) は、ミトコンドリア遺伝子配置では同属レベルで近縁であると考えられた。

第三章 シロウリガイ類と共生細菌の共進化解析

第二章の結果から共通 PCR プライマーを作成し、8 種のシロウリガイ類(*Akebiconcha kawamurai*, *C. fausta*, *C. laubieri*, *C. nautili*, *C. pacifica*, *P. kilmeri*, *P. soyoae*, *Pliocardia stearnsii*) のミトコンドリア遺伝子 11 種(*atp6*, *atp8*, *cob*, *cox1-3*, *nad1*, *nad3-5*, *rrnL*) を増幅し塩基配列を決定した。第二章で決定した 4 種と *C. magnifica* を含めた 13 種の宿主(上記 11 遺伝子) と共生細菌[配列が決定している遺伝子 8 種(16S rRNA, 23S rRNA, *galU*, *groEL*, *groES*, *mfd*, *uvrA*, *uvrD*)] のそれぞれの遺伝子の結合塩基配列を用いて系統樹を作成した。両者の分岐が異なる場合は、系統的位置の違いが支持されるか AU 検定を行った。その結果、多くの分岐点で高い信頼性を示す宿主と共生細菌の系統樹が得られ、6 種(*C. fausta*, *C. magnifica*, *C. pacifica*, *P. kilmeri*, *P. okutanii*, *P. soyoae*) は、宿主と共生細菌の系統的位置は同じであった。残りの 7 種の(*A. kawamurai*, *A. mariana*, *A. phaseoliformis*, *C. laubieri*, *C. nautili*, *I. fossajaponicum*, *P. stearnsii*) は、宿主と共生細菌の系統的位置が異なり、AU 検定により系統的位置の違いが支持された。

宿主と共生者間の系統的位置が異なる原因として、以下の 4 つの共生者の進化過程が関与すると考えられる (1. 欠失、2. 重複、3. 宿主転換、4. 非種分化)。樹形の比較から共種分化を含む 5 つの進化過程を予測するソフト Jane4 を用いた結果、*C. fausta*, *C. pacifica* では、共種分化が支持された。一方、*C. pacifica* と *C. fausta* の共通祖先と以下の 3 つの系統との間で宿主転換が起こった事が支持された(① *A. kawamurai*, *C. magnifica*, *C. laubieri*, *P. kilmeri*, *P. okutanii*, *P. soyoae* の共通祖先、② *C. nautili*、③ *P. stearnsii*)。 *C. pacifica* / *C. fausta* の共通祖先と①の 6 種の共通祖先間で宿主転換が起きた後に、*C. magnifica*, *P. kilmeri*, *P. okutanii*, *P. soyoae* では、宿主と共生細菌は共種分化し、*A.*

kawamurai と *C. laubieri* 間で、さらに宿主転換が起きた可能性が示された。また *I. fossajaponicum* と *A. mariana* 間でも宿主転換の可能性が示された。*A. phaseoliformis* は、宿主と共生細菌の系統樹の系統的位置が異なるが共種分化したと示された。宿主転換は、2 つの系統間で起こる進化である。3 つの系統(*A. phaseoliformis*, *I. fossajaponicu*, *A. mariana*)間では、AU 検定により宿主と共生細菌の系統的位置が異なると支持されたため、宿主転換が起きた系統を特定できなかったと考えられた。本研究から全てのシロウリガイ種が共生細菌と共種分化したわけではなく、シロウリガイ類の初期進化過程で宿主転換が複数の系統間で起こった可能性を初めて示すことができた。

第四章 総合考察

宿主転換を起こすには、異なる宿主へ共生細菌が水平伝達する必要がある。近年、系統的位置が離れた2種のシロウリガイ類が同一コロニーに生息している場合に、2種ともに片方の共生細菌が存在すると報告された(Decker et al., 2013)。この報告は異なる宿主が同所的に生息する事で共生細菌が水平伝達する事を示唆している。モントレー湾では、*C. pacifica* と *P. stearnsii* が同所的に生息し、宿主転換した可能性が考えられた。共生細菌が水平伝達する経路として三つの仮説(仮説①: 異種交配による精子を介した異種の共生細菌とミトコンドリアの転移、仮説②: 宿主が環境から自由生活型の共生細菌を獲得、仮説③: 宿主間の共生細菌の水平伝達)が提唱されているが、検証されていない(Stewart et al., 2008)。シロウリガイ類のミトコンドリアが母性遺伝である事(第二章)、また、*P. okutanii* では精巣内に共生細菌が存在しない事(Ikuta et al., 2016)から、仮説①の可能性はない。また、共生細菌ゲノム解析から、自由生活はできないと考えられており、仮説②の可能性も低い。最近、*P. okutanii* では卵の外部表面に共生細菌が局在する事が明らかとなった(Ikuta et al., 2016)。また、シロウリガイ類は海水温の上昇により同調的に放精放卵する(Fujikura et al., 2007)。よって、仮説③の異なる宿主間で卵を介した接触により共生細菌が水平伝達される可能性が考えられた。本研究により、シロウリガイ類の初期進化過程で卵と卵を介して共生細菌が水平伝達し、その後宿主転換が起こった可能性を初めて示す事ができた。本成果は、シロウリガイ類と共生細菌の共生系の成り立ちを考える上で、重要な知見を与えるものである。