

シンカイヒバリガイ類の共生硫黄酸化細菌定量のための FISH 画像解析

2009 年 3 月 自然環境学専攻 76735 藤ノ木 優

指導教官 井上広滋 准教授

キーワード: 化学合成共生系, 蛍光 *in situ* hybridization (FISH), 細胞内共生菌, 定量化

1. はじめに

深海熱水噴出域やメタン湧出域には、化学合成細菌と共生関係を持つ多くの無脊椎動物（二枚貝、腹足類、多毛類、甲殻類）が生息する。共生関係を維持するためには、これらの無脊椎動物は硫化水素などの有害物質を環境から取り込み共生菌に供給する必要があるが、その仕組みは殆どわかっていない。共生の仕組みを解明するためには、宿主の組織における共生菌の挙動を正確に知る必要がある。本研究では、常圧水槽での飼育が可能な深海性イガイ科二枚貝 *Bathymodiolus septemdierum*（シチヨウシンカイヒバリガイ）をモデルとして、蛍光 *in situ* hybridization (FISH) による共生菌の可視化と共焦点レーザー顕微鏡による定量の技術を確立し、更にこの手法を用いて、ii) 野生及び水槽飼育下の *B. septemdierum* の共生硫黄酸化細菌が、環境硫化物濃度に応じてどのようにその存在量を変化させるのか、検討を行った。

2. 試料と方法

2008 年 4 月に実施された「なつしま/ハイパードルフィン」NT08-07 研究航海において、伊豆小笠原海域・明神海丘の熱水噴出域から採取された *B. septemdierum* を用いた。硫化物濃度が異なる環境間での比較を行う試料として、2 つのサイト（潜航番号#819 [32°06.238'N, 139°52.169'E, 水深 1237 m, 硫化物濃度; 0.41 mg/L], 潜航番号#822 [32°06.204'N, 139°52.18'E, 水深 1219 m, 硫化物濃度; 検出限界以下]）から採集された試料を用いた。また硫化物濃度を人工的に調節した環境下での変化を検討するため、#819 を含む複数の潜航から得られた個体を、実験室内の常圧水槽を用いて水温 4°C で通常海水のみと硫化ナトリウム添加下 (Na₂S; 濃度 0.06-0.07 mg/L) で飼育し、11 日目と 90 日目に分析用に採取した。

採集個体は、鰓を単離して 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、パラフィン包埋して厚さ 10 μm の切片を作成後、ホルムアミドを 0-50%（プローブごとに最適条件が異なる）含む反応液に各 FISH プローブを加え、DAPI 対比染色と共に、46°C、2-4 時間の条件下でハイブリダイゼーションを行った後、各塩類を調整した洗浄緩衝液を用いて 48°C、15 分間洗浄処理を施した。試料封入後、蛍光顕微鏡で観察を行い、焦点面を絞って蛍光シグナルを検出できる共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 5 PASCAL) を用いて定量用画像を撮影し、画像解析ソフト Image Pro Plus 5.1J により鰓糸の蛍光強度及び蛍光面積率（鰓糸に占める蛍光場の割合）を算出した。各群間の差の検定には Welch の *t* 検定または Kruskal-Wallis の *H* 検定を用いた。

3. 結果と考察

はじめに、全真正細菌を検出するとされる既存の FISH プローブを用いて、共生菌の存在を確認するとともに、手技に問題がないことを確認した。次に、特異的プローブを作製するため、明神海丘の試料から共生菌の 16S rRNA の配列を決定し、その系統的位置を確認すると同時に、データベース上の他種の共生菌の配列との比較を行い、*Bathymodiolus* の共生硫黄酸化細菌群集に特異的な 2 種類の新規プローブを設計した (*Bsob692*, *Bsob737*)。検出条件の詳細な検討を行った結果、*Bsob692* を用いて、ホルムアミド 20%量添加下でハイブリダイゼーションを行うこと

で、*Bathymodiolus* の共生硫黄酸化細菌を特異的に検出することができることがわかった。

確立した手法に基づき、野生下および飼育下の試料の解析を行った。野生下の 2 つのサイトの比較では、硫化物濃度が高い #822 区の方が硫化物濃度の低い #819 区より蛍光強度、蛍光面積率とも有意に高かった。飼育下の個体では、飼育 11 日後には Na_2S 添加飼育区よりも海水飼育区において、共生菌の顕著な減少が FISH 画像から伺われ (図 1), 定量解析においても両区の間には蛍光強度、蛍光面積率の双方に有意差があることが判明した (図 2)。飼育 90 日後には Na_2S 添加区、海水区とも共生菌はほとんど消滅した。*B. septemdiarium* の鰓上皮内の共生硫黄酸化細菌群集は、環境中の硫化物濃度に応じて変動すると推察される。また、野生下 (#819) と比較すると、海水区、 Na_2S 添加区とも蛍光強度と蛍光面積率が有意に減少している ($p < 0.001$) ことより、用いた飼育条件は共生菌群集を維持するには十分ではないと考えられる。

Bathymodiolus 属二枚貝類は、常圧水槽での飼育が可能で、共生型の多様性に富むため、共生の仕組みを解明するための優れたモデル生物である。本研究で確立した手法は、熱水噴出域における共生機構解明の研究に広く活用できることが期待される。また本定量手法は、*Bathymodiolus* 属以外の生物種を対象とした同様の研究に高い汎用性があると思われる。

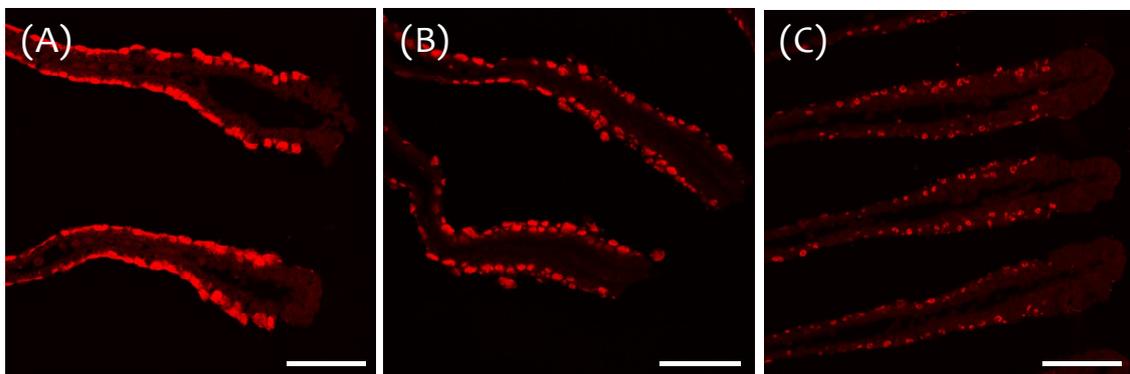


図1. 共生菌特異的のプロープであるCy3標識Bsob692 (5'-CGCCATTGATGTCCTTCAG-3')を用いた*Bathymodiolus septemdiarium*の鰓系の共焦点レーザー顕微鏡画像。(A) 野生下 (#819), (B) Na_2S 添加飼育11日目, (C) 海水飼育11日目の鰓系。鰓系上の共生菌由来の蛍光シグナルが、野生下の個体と比較すると飼育下の個体では弱くなっているのがわかる。スケールは100 μm 。

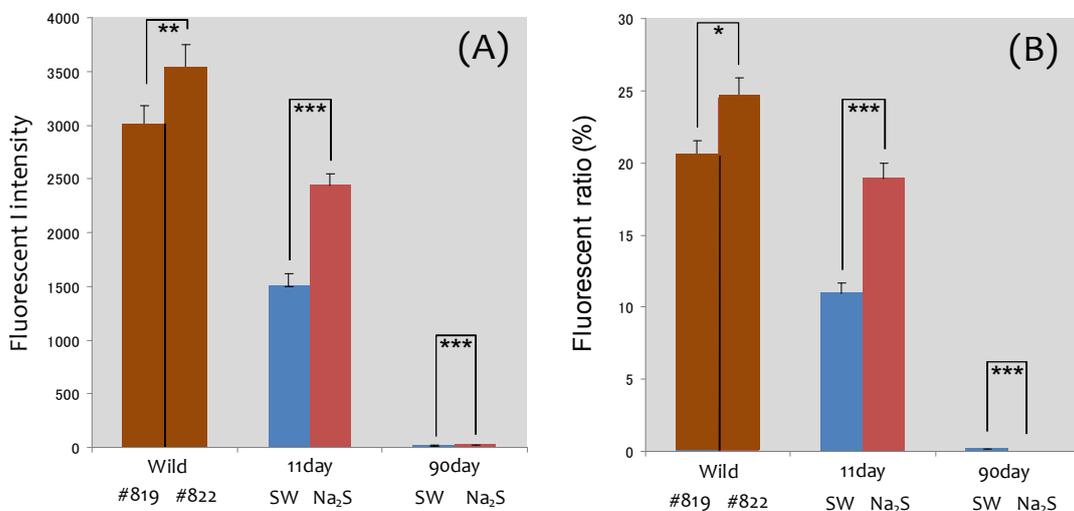


図2. 定量画像から得られた野生下と飼育11日目, 90日目の*B. septemdiarium*の鰓系における蛍光強度及び蛍光面積率の平均値と標準誤差の比較。(A) 蛍光強度, (B) 蛍光面積率, 標本数はいずれも $n = 25$ 。*はt検定で有意差が認められたもの。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ を示す。

FISH image analysis for quantification of thiotrophic endosymbionts of bathymodiolid mussels

2009, March. Institute of Environmental Studies, 76735 Masaru FUJINOKI

Supervisor; Associate Professor, Koji INOUE

Key Words: Chemosynthetic symbiosis, Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH), bacterial endosymbiont, quantification

1. Introduction

Various invertebrates inhabiting hydrothermal vents and cold seeps in the deep sea have chemoautotrophic endosymbionts (thiotroph or methanotroph). The hosts must provide the symbionts with toxic chemicals such as sulfides to maintain the symbiosis but the mechanism of uptake and delivery of such chemicals is still unknown. To elucidate the mechanisms of the symbiosis, it is important to know the abundance and distribution of endosymbionts precisely. In this study, using the deep-sea mussel *Bathymodiolus septemdeirum* as a model, i) I established a method of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and image analysis to quantify the endosymbionts in the gill bacteriocytes, and ii) I analyzed specimens collected at two sites, at which sulfide levels are different, and those reared in aquarium with or without adding sodium sulfide, to know changes in bacterial population under various sulfide concentrations.

2. Materials and Methods

Specimens of *B. septemdeirum* were collected at the hydrothermal vents in Myojin Knoll using ROV Hyper-Dolphin during NT08-07 cruise. Wild specimens were sampled at two sites, Dive #819 [32°06.238'N, 139°52.169'E, depth; 1237 m, sulfide conc.; 0.41 mg/L] and Dive #822 [32°06.204'N, 139°52.18'E, depth; 1219 m, sulfide conc.; undetected]. Specimens for aquarium experiments were obtained in several dives including #819, and reared in the aquaria containing seawater (SW) or that with Na₂S (sulfide conc., 0.06-0.07 mg/L; 1 atm; 4°C; for 11 or 90 days). The gill of the samples was fixed using 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, sectioned (thickness, 10 μm), hybridized with some FISH probes (2-4 hour at 46°C; formamide conc. 0-50%) and washed in the buffer at 48°C for 15 min. FISH images were captured using LSM 5 PASCAL Confocal Laser Scanning Microscope. Fluorescent intensity (F_i) and fluorescent-area ratio (F_r) were evaluated using Image Pro Plus 5.1J. Statistical analyses were performed using Welch's *t*-test and Kruskal-Wallis's *H*-test.

3. Result and Discussion

In the first experiment, FISH was performed using a probe that recognizes all eubacteria, and symbionts were successfully visualized. Subsequently, I determined 16S rRNA sequence of *B. septemdeirum*, and designed new specific probes, *Bsob692* and *Bsob737*, by comparing the sequence with those of the symbionts of other bathymodiolids and related species.

Using *Bsob692*, which showed higher specificity, wild specimens from #819 and #822 dives were analyzed and the F_i and F_r values were found to be higher in #822. Specimens reared in Na_2S -containing SW also exhibited higher F_i and F_r values than those reared without sulfide (Figs. 1, 2). It is inferable that sulfide concentration in ambient SW would affect the abundance of endosymbionts. In addition, F_i and F_r values of all aquarium specimens were significantly lower than those of wild specimens ($p < 0.001$). Thus, the condition of aquarium experiment in this study may be insufficient to maintain the abundance of endosymbionts of *B. septemdierum*.

Bathymodiolid mussels offers good models to study the mechanisms of symbiosis because i) they can be reared in aquarium at normal pressure and ii) they have various types of symbionts. I expect that the FISH protocol established in this study will be utilized in studies on symbiosis in Bathymodiolids, and also applicable to other species.

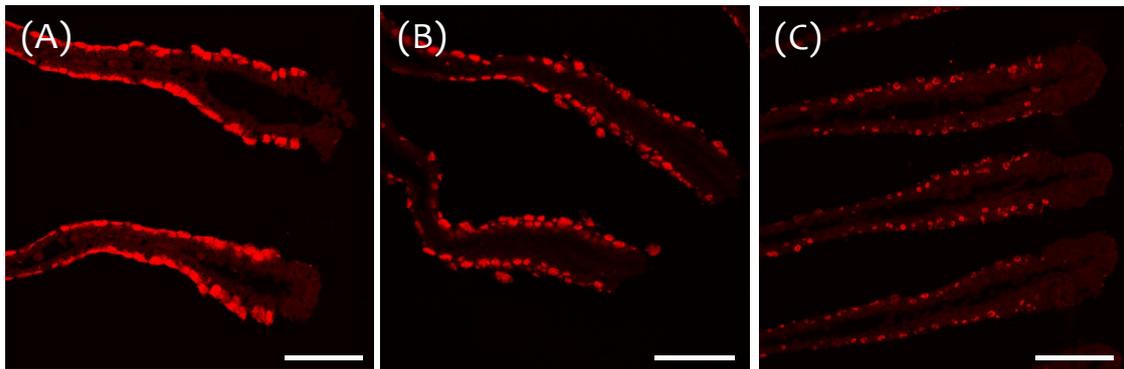


Fig. 1. Fluorescence *in situ* hybridization using Cy-3 labelled *Bsob692* (5'-CGCCATTGATGTTCTTCAG-3') of symbiotic bacteria on trasverse section of gill filaments of *B. septemdierum*. (A) Wild (#819), (B) reared for 11days with Na_2S , (C) reared for 11day in seawater. Scale bar = 100 μm .

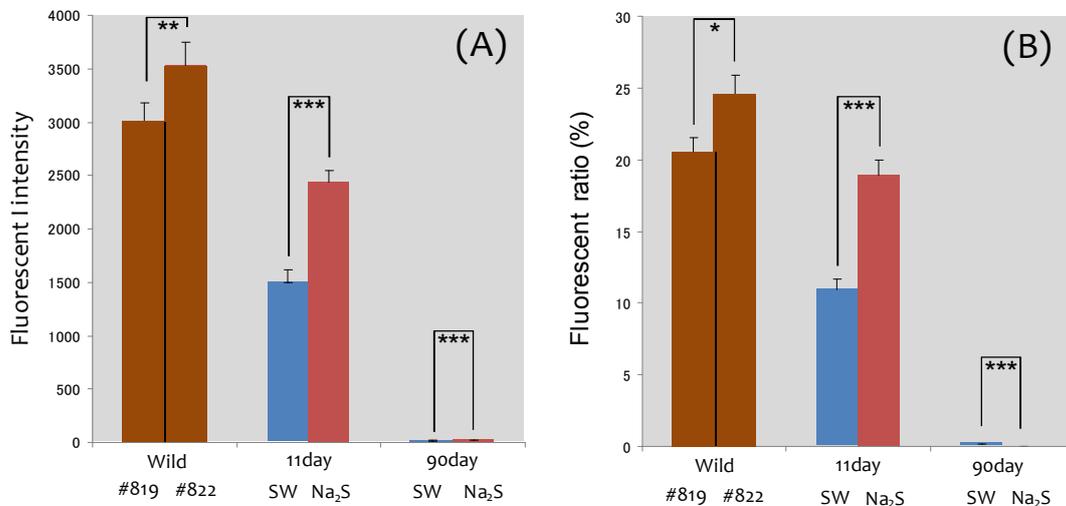


Fig. 2. Abundance of symbionts in gill filaments of Wild, and aquarium-reared (for 11 and 90 days) mussels estimated by FISH image analysis. Histograms show average value and standard error ($n = 25$). (A) fluorescent intensity, (B) fluorescent-area ratio. *Indicates significant difference. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.