

東京大学大学院新領域創成科学研究科
環境学研究系自然環境学専攻
海洋生命環境学分野
2008年度
修士論文

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

FISH image analysis for quantification of thiotrophic
endosymbionts of bathymodiolid mussels

2009 年 1 月 30 日提出
2008 年度 3 月修了
指導教員 井上 広滋 准教授
76735 藤ノ木 優

目次

第1章 序論

第2章 既存のオリゴヌクレオチド・プローブを用いた

Bathymodiolus septemdierum 共生菌の検出

2-1. 背景と目的

2-2. 試料と方法

2-3. 結果

2-4. 考察

第3章 *Bathymodiolus* の共生硫黄酸化細菌に特異的な FISH プローブの設計

3-1. 背景と目的

3-2. 試料と方法

3-3. 結果

3-4. 考察

第4章 野生および飼育環境下の *Bathymodiolus septemdierum* に

共生する硫黄酸化細菌の FISH による定量

4-1. 背景と目的

4-2. 試料と方法

4-3. 結果

4-4. 考察

第5章 総合考察

5-1. 共生化学合成細菌群集の定量化手法としての FISH

5-2. 単一共生系と二重共生系における共生硫黄酸化細菌群集の環境応答性

5-3. *Bathymodiolus* 属共生系の普遍性

5-4. 今後の展望

謝辞

引用文献

要旨

第 1 章 序論

緒言

1970 年代後半、ガラパゴス・リフトに存在する深海熱水噴出孔 (deep-sea hydrothermal vent) において、口や消化器官を欠く大型ハオリムシ類 (vestimentiferan tubeworm) の一種、*Riftia pachyptila* が発見された (Van Dover, 2000)。当初、この生物は自身の体表から海水中の有機物を吸収して栄養を摂取するものと考えられたが、後に栄養体 (trophosome) と名付けられた特殊化した器官に硫黄酸化細菌を細胞内共生させ、これら細菌から栄養を得ていることが透過型電子顕微鏡 (TEM)、酵素分析、炭素同位体比分析などから明らかとなった (Van Dover, 2000; Dubilier et al., 2008)。光合成に依存せず、硫化水素やメタンなどの無機物を利用して炭素固定を行い、無機独立栄養的に有機物を生産する化学合成細菌を一次生産者とするこのような生態系は、化学合成生物群集 (chemosynthetic community) と呼称される。この特異な生態系は、研究が進むにつれて、熱水噴出孔及びメタン湧水域 (methane seep)、沈木 (wood fall)、鯨骨遺骸 (whale bone) などの深海環境だけでなく、浅海域の泥中や堆積物中など、海洋環境中に広く存在することが判明した。またハオリムシ類以外にも、そこに生息する様々な無脊椎動物 (二枚貝類、腹足類、甲殻類) が化学合成細菌を共生させていることがわかってきた (Dubilier et al., 2008)。しかし宿主動物の分類や記載、宿主と共生菌それぞれの分子マーカーを用いた系統解析、栄養摂取形式の解析など、化学合成生共生系についての研究が徐々に進められ、基礎的な知見はある程度集積されつつあるものの (Dubilier et al., 2008)、このような共生系が環境の化学成分に対してどのような振る舞いをするのか、詳細は未だ明らかでない。

世界中に存在する熱水域及び湧水域にしばしば優占する深海性イガイ科二枚貝の一属である *Bathymodiolus* 属 (シンカイヒバリガイ属) は、i) 常圧下で飼育が可能である、ii) 系統的・生理的に異なる多様な細菌群と共生関係を構築する種が存在する、という点から、共生系の仕組みや宿主二枚貝の化学合成環境への適応を探るために適した研究試料として、現在までに多くの研究が行われている。本研究の狙いは、日本近海に産する *Bathymodiolus* 属二枚貝の一種、*B. septemdierum* (シチヨウシンカイヒバリガイ) を用いて、宿主-共生菌から成る共生系が、硫化物やメタンが豊富な特殊環境にどのように適応したのかを、化学成分に対する共生菌群集の応答から解明することである。

そのために本研究では、この二枚貝の鰓上皮細胞内に局在する共生硫黄酸化細菌群集を、蛍光標識オリゴヌクレオチド断片を用いて検出する FISH によって視覚化し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて定量化する技術を確立した。さらに、開発した手法を用いて、野生及び水槽飼育下の *B. septemdierum* の共生硫黄酸化細菌群集が、硫化物の有無に対してどのようにその存在量を変化させるのか、定量的な検討を行った。

第2章 既存のオリゴヌクレオチド・プローブを用いた *Bathymodiolus septemdierum* 共生菌の検出

2-1. 背景と目的

微生物の 16S rRNA 配列に相補的な蛍光標識オリゴヌクレオチド断片（プローブ）を作成して微生物群集を検出する蛍光 *in situ* hybridization (FISH) (Amann et al., 1990) は、環境微生物学及び微生物生態学の分野では、環境中の微生物群集と分布を理解し、定量化する上で最もポピュラーな分子生物学的手法のひとつである (Siyambalapitiya and Blackall, 2004; Sunamura et al., 2004; Macalady et al., 2006)。情報の豊富な 16S rRNA の配列をプローブに用いることにより、形態的な特徴が乏しい細菌群を、系統情報を反映した画像として検出できることから、本手法は海産無脊椎動物、昆虫、原生生物等様々な生物と微生物との共生系を理解するためにも広く用いられている (von Dohlen et al., 2001; Heinz et al., 2007)。熱水噴出域やメタン湧水域に生息する無脊椎動物の研究においても、FISH によって幾つかの宿主組織中における細菌の局在 (Fujiwara et al., 2001; Suzuki et al., 2005; 2006; Tokuda et al., 2007) や、単一の宿主に複数の細菌種が存在する多重共生 (Duperron et al., 2005; 2007; 2008; Borowski et al., 2002; Blazejak et al., 2005) の証明、また宿主が持つ共生菌が環境中で自由生活を行っている事実が示されるなど (Sunamura et al., 2004; Nussbaumer et al., 2006), 化学合成共生系の理解に大きな成果を上げている (Dubilier et al., 2008)。

Bathymodiolus 属の共生系においても FISH は重要な分子生物学的手法として認識されているが、主な報告は二重共生系あるいは多重共生系を持つ種に限られ (Duperron et al., 2005; 2006; 2007), 硫黄酸化細菌あるいはメタン酸化細菌のみと共生関係を持つ単共生型の種においては、FISH による共生菌の局在に関する報告はない。従って本研究ではまず、野生下のシチヨウシンカイヒバリガイ *Bathymodiolus septemdierum* の鰓組織切片の作成を行い、特異性の低い既存のプローブを用いて、i) *B. septemdierum* の鰓内における共生菌の局在を視覚化して形態的に確認すると同時に、ii) FISH の実験手技に問題がないかを確認した。

2-2. 試料と方法

2-2-1. 生物試料

2008 年 4 月に実施された「なつしま」NT08-07 研究航海の#819 潜航および#822 潜航において、無人探査機ハイパードルフィンによって伊豆小笠原海域の明神海丘に存在する 2 つのサイト（通称“付着板サイト” [32°06.238'N, 139°52.169'E, 水深 1237 m], 通称“たぎり” [32°06.204'N, 139°52.18'E, 水深 1219 m]）（図 1）からそれぞれ採取された *B. septemdierum*（図 2）を 5 個体ずつ試料として用いた。

また、2008 年 9 月に日本海上越沖で採取されたキヌタレガイ属の一種 (*Solemya* sp.) を、*B. septemdierum* とは異なる系統の共生硫黄酸化細菌を持つ対照試料として用いた。採取し

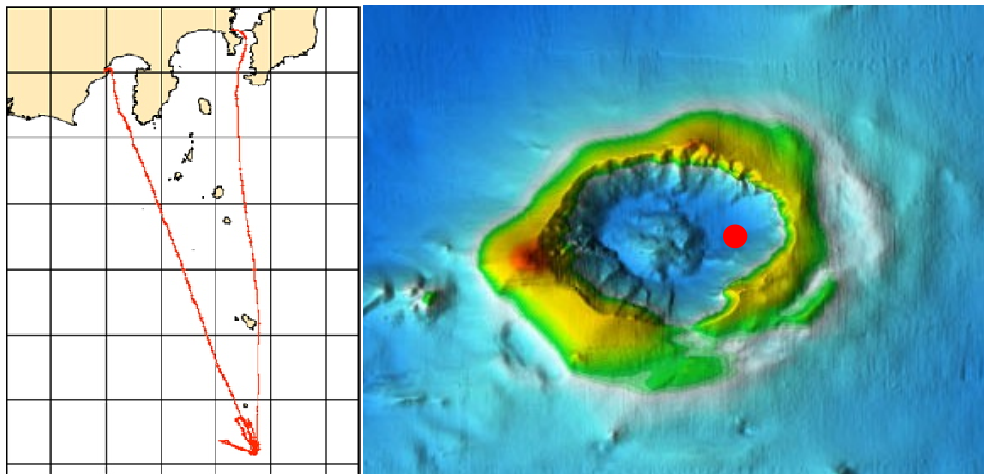


図1. 本研究で用いた生物試料採取地点である明神海丘。

● 試料採集海域



図2. #819; 通称“付着板サイト”の岩場に群生する *Bathymodiolus septemdirum* (シチヨウシンカイヒバリガイ)。

表1. 採取した生物試料

Species	Number	Sampling Sites	Depth (m)	Sulfide conc.
<i>B. septemdirum</i>	<i>n</i> = 5	#819 (32° 06' 238' N, 139° 52' 169' E)	1237 m	Undetected
	<i>n</i> = 5	#822 (32° 06' 204' N, 139° 52' 18' E)	1219 m	0.41 mg/L
<i>Solemya</i> sp.	<i>n</i> = 1	日本海上越沖 (37° 32' 54N-137° 56' 89N 137° 56' 44E-137° 56' 89E)	993-1004 m	/

た生物試料の詳細を表 1 に記す。

2-2-2. 試料の固定と組織切片作製

B. septemdirum の共生硫黄酸化細菌は、宿主の鰓上皮細胞内に局在するという報告 (Fujiwara et al., 1999; 2000) に基づき、鰓の組織切片を作成した。まず試料採集直後に船上で解剖を行い、鰓組織を単離し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) に浸漬 (12-24 時間) した後、70%EtOH/1×PBS に試料を移し替え、4°C で冷蔵保存した。次に上昇エタノール系列 (80%, 90%, 95%, 99%, 100%; 各 30 分間) を用いて脱水処理を施し、パラフィン導入剤であるキシレンに 15 分間浸漬し、65°C に温めたパラフィンとキシレン混合液 (体積比 1:1) に 15 分間浸漬してパラフィンに置換後、パラフィンプロックに包埋した。包埋後は RM2125RT 型ミクローム (Leica) を用いて、厚さ 10 μm の組織切片を作成し、マスコート・スライドガラス (松浪硝子工業) に張り付けた。

2-2-3. 蛍光 *in situ* hybridization (FISH)

キシレン-下降エタノール系列 (キシレン×2, 100%, 99%, 95%, 90%, 80%, 70%エタノール, Milli Q 水; 各 5 分間) による組織切片の脱パラフィン処理後、既報から最適とされる濃度 (表 2) にホルムアミドを調整した反応緩衝液を作成した。反応緩衝液は、ホルムアミドの鮮度を保つため、ホルムアミド以外の各塩類を事前に調整した Master Mix (表 3a) を作成し、実験直前に表 3b に示した量のホルムアミドを混合して濃度調整を行い、反応緩衝液 (表 3c) とした。また、溶液中に含まれるプローブ濃度が 50 ng/μL となるように調整した各 FISH プローブ (表 2) を反応緩衝液に溶かして組織切片に滴下し、46°C で 2-4 時間の条件下でハイブリダイゼーションを行った。プローブ反応後は、反応溶液のホルムアミド濃度に合わせて各塩類を調整した洗浄緩衝液 (表 3c) を用い、48°C で 20 分間洗浄処理を施した。各ホルムアミド量と、それに合わせた洗浄緩衝液中の NaCl 量を表 3b に記す。その後、DAPI (4',6'-ジアミジノ-2-フェニリンジール) を用いて、宿主核と共生菌の形態的位置を検討するため対比染色を施し、スライドガラスを風乾して非蛍光性の退色防止剤である VectaShield (Vecta) を各切片に滴下後、カバーガラスを用いて封入した。

表2. 本研究で用いた既成のオリゴヌクレオチド・プローブ

Name	Sequence (5'-3')	Target Organisms	Position (<i>E.coli</i>)	Labelled	Formamide conc. (v/v)	References
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i>	16S, 338-355	Cy3, FITC	20%	Amann et al. 1990
ALF968	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	<i>Alphaproteobacteria</i>	16S, 968-985	Cy3	20%	Manz et al. 1992
BET42a	GCCTTCCCACTTCGTTT	<i>Betaproteobacteria</i>	23S, 1027-1043	Cy3	35%	Manz et al. 1992
GAM42a	GCCTTCCACATCGTTT	<i>Gammaproteobacteria</i>	23S, 1027-1043	Cy3, FITC	35%	Manz et al. 1992
EP404	AAAKGYGTCATCCTCCA	<i>Epsilonproteobacteria</i>	16S, 404-420	FITC	30%	Macalady et al. 2006
NON338	ACTOCTAOGGGAGGAGC	Negative Control	16S, 338-355	Cy3	20%	Amann et al. 1990

表3. FISHの各種緩衝液類の組成

(a) Master Mixの組成			(c) 反応緩衝液及び洗浄緩衝液の組成	
Master Mix for FISH			Hybridization Buffer	μL
5M NaCl	18 mL		Master Mix	308 μL
1M Tris-HCl	2 mL		Formamide	*Table 3b
0.5M EDTA	1 mL		Milli Q Water	672 μL
1% SDS	1 mL		TOTAL	1400 μL
TOTAL	22 mL			
(b) 反応緩衝液中のホルムアミド量と洗浄緩衝液中のNaCl量			Wash Buffer	mL
Concentration	Formamide	5M NaCl (in Wash B.)	5M NaCl	*Table 3b
0%	0 μL	9.0 mL	1M Tris-HCl	1 mL
10%	140 μL	4.5 mL	0.5M EDTA	0.5 mL
20%	280 μL	2.15 mL	1% SDS	0.5 mL
30%	420 μL	1.0 mL	Milli Q Water	47 mL
40%	560 μL	0.5 mL	TOTAL	50 mL
50%	700 μL	0.2 mL		

2-2-4. 蛍光顕微鏡撮影

FISH による共生菌由来の蛍光シグナルを画像資料として記録するため、Axioplan 2 落射型蛍光顕微鏡 (Zeiss) を用いた顕微鏡撮影を行った。撮影には Plan-NEOFLUAR 20×/0.50, 40×/0.75, 63×/1.40, 100×/1.30 各対物レンズを用い、B 励起 (FITC; 波長 435/490 nm) 及び G 励起 (Cy3; 波長 546 nm), 加えて UV 励起 (DAPI; 334/365 nm) による蛍光下で撮影を行った。

Bathymodiolus の鰓糸は形態的に、共生菌を内包する bacteriocytes (藤倉, 2008 に従っ

て本研究でも以降は菌細胞とする) が密集する共生領域と、鰓糸の上下端に存在し、共生菌を含まない絨毛領域に大別される (Fiala-Médioni et al., 1986) (図 3)。既報では、共生菌の宿主組織における局在を明確にするため、共生菌の存在しない絨毛領域を顕微鏡視野に入れるのが一般的である (Fiala-Médioni et al., 1986; Duperron et al., 2006) ため、本研究においても、×20 倍では絨毛領域を顕微鏡視野に入れての撮影を原則とした。

2-3. 結果

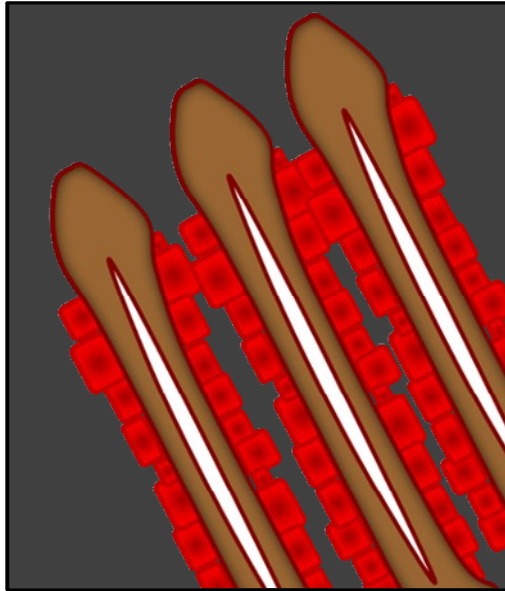
2-3-1. EUB338 プローブを用いた *B. septemdierum* 共生菌の検出

全真正細菌の 16S rRNA 配列を検出することを目的として作成された EUB338 プローブを用いて FISH を行った結果、各鰓糸から直径約 10-20 μm の四角形の輪郭を形成し、基底膜の両側に一列に並ぶ蛍光シグナルが検出された (図 4A)。高倍率下での観察により、これらは細菌サイズの蛍光が集合したものであり、共生菌に由来するものであることがわかった (共生領域) (図 5A, B)。DAPI による対比染色においても、共生菌由来の蛍光シグナルは同様の分布パターンを示した (図 4B)。また DAPI では、基底膜部分 (鰓糸内側) に直径約 10-20 μm の宿主核由来の蛍光シグナルがみられた (図 5B, D)。鰓糸先端部に該当する絨毛領域では EUB338 による共生菌由来の蛍光シグナルは観察されず、DAPI においては宿主核由来の蛍光シグナルが確認できるのみであった (図 4A, B)。

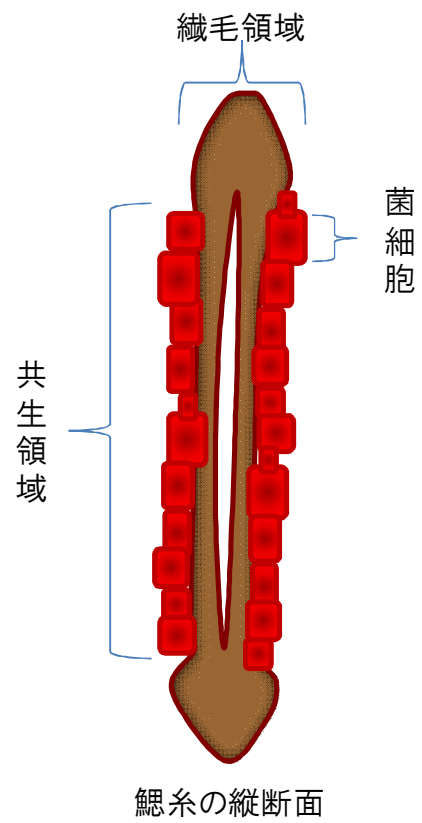
ネガティブ・コントロールである NON338 プローブを用いて FISH を行った結果、EUB338 でみられた共生菌由来の蛍光シグナルは検出されなかった (図 5C)。一方、DAPI では EUB338 と併用した場合と同様の蛍光シグナルが鰓糸の両側に確認できた (図 5D)。

2-3-2. GAM42a プローブによる *B. septemdierum* 共生菌の検出

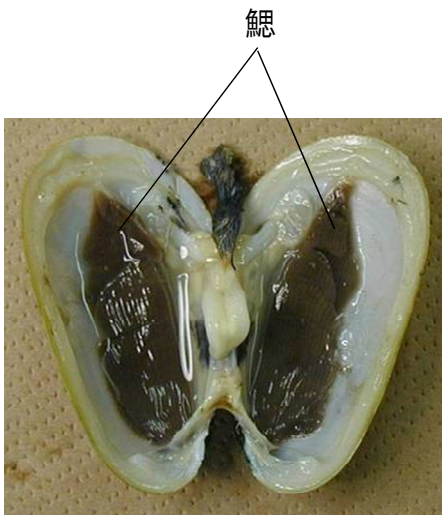
B. septemdierum 共生菌は、既知の *Bathymodiolus* と同様に、ガンマプロテオバクテリア型硫黄酸化細菌であることが 16S rRNA 配列解析から示されている (Fujiwara et al., 2000)。従って本研究では、EUB338 よりも特異性が高く、ガンマプロテオバクテリア亜綱に属する細菌を検出するとされる GAM42a プローブを用いて、*B. septemdierum* 共生菌の検出を試みた。しかし、このプローブでは NON338 プローブと同程度のシグナルしか得られなかった (図 6A)。EUB338 および DAPI による染色で明瞭なシグナルが得られた #819, #822 の両サイトからの合計 6 個体について全く同様の結果が得られたことより、*B. septemdierum* の共生硫黄酸化細菌は GAM42a では検出できないことが判明した (表 4)。GAM42a を用いた FISH では共生菌が検出できなかったことから、過去に報告されていないガンマプロテオバクテリア以外に属する細菌が細胞内に局在している可能性を考え、プロテオバクテリアの各亜綱群を標的とする 3 種類の FISH プローブを用いて実験を行った。しかし結果は GAM42a と同様であり、共生菌は検出できなかった (図 7, 表 4)。



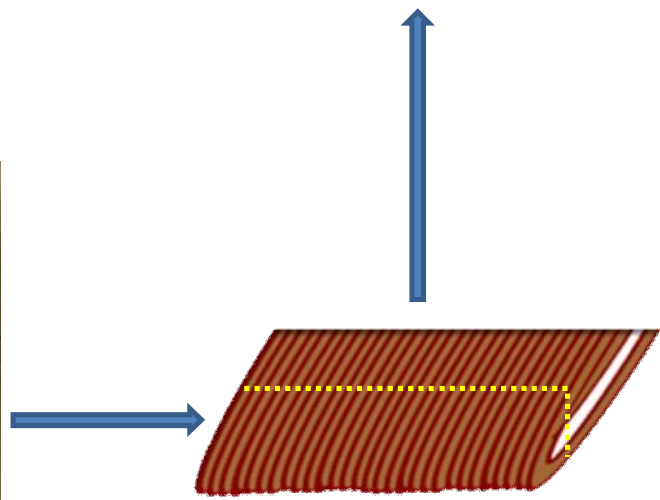
顕微鏡によるFISH画像の例



鰓糸の縦断面



二枚貝の殻内



鰓糸

図3. *B. septemdirum*の鰓微細構造の模式図

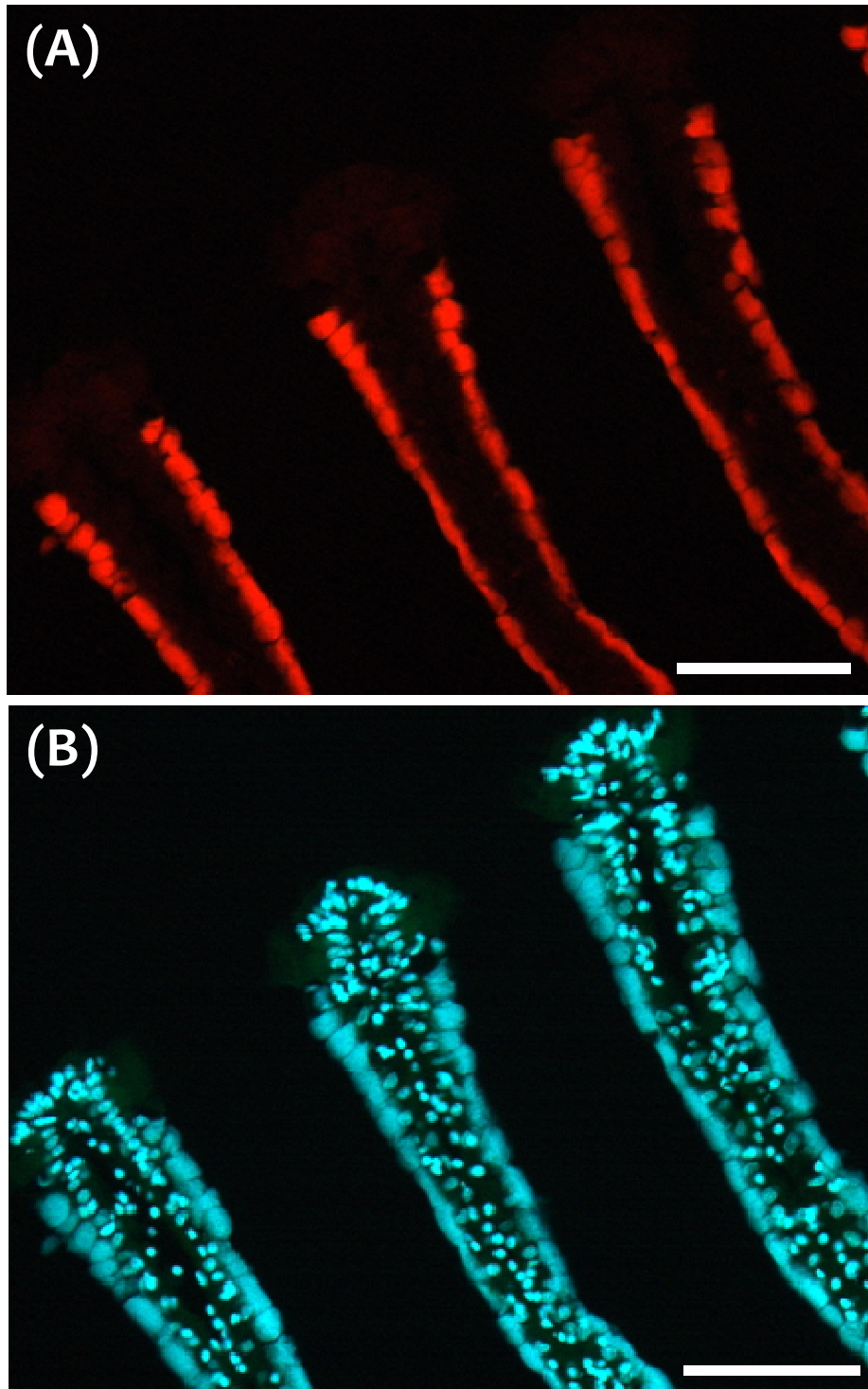


図4. EUB₃₃₈プローブを用いた*B. septepdierum*の
鰓糸の蛍光顕微鏡画像。

試料は#822(たぎり直上)のもの。
(A) Cy3標識EUB₃₃₈, (B) DAPI。スケールは100 μm。

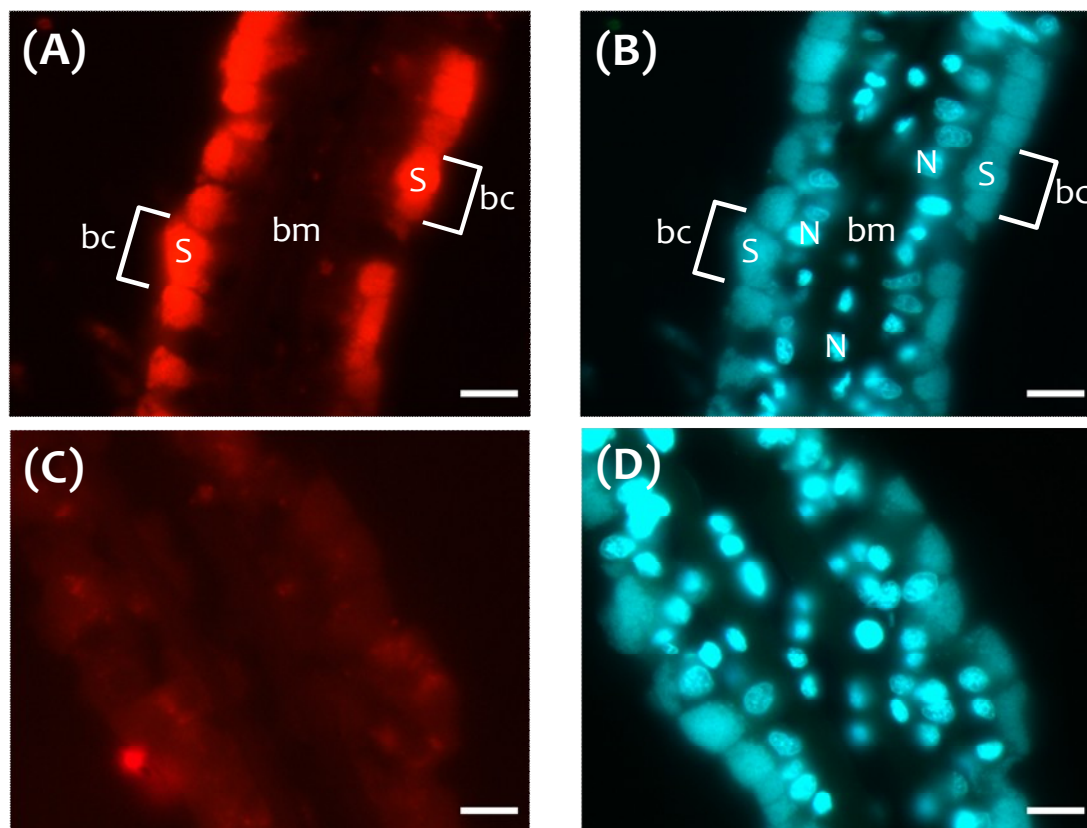


図5. 蛍光顕微鏡による*B. septemdierum*の鰓糸の拡大画像。

(A) Cy3標識EUB338, (B) EUB338と併用したDAPI, (C) Cy3標識NON338, (D) NON338と併用したDAPI。S; 共生菌由来の蛍光シグナル, N; 宿主核由来の蛍光シグナル, bc; 菌細胞の輪郭, bm; 基底膜部分。スケールは20 μm 。

表4. *B. septemdierum*共生菌にプロテオバクテリアの各亜綱に特異的なFISHプローブを用いた結果

Probes	Samples	
	#819 ($n = 3$)	#822 ($n = 3$)
ALF968	-	-
BET42a	-	-
GAM42a	-	-
EP404	-	-

+, positive, -, negative

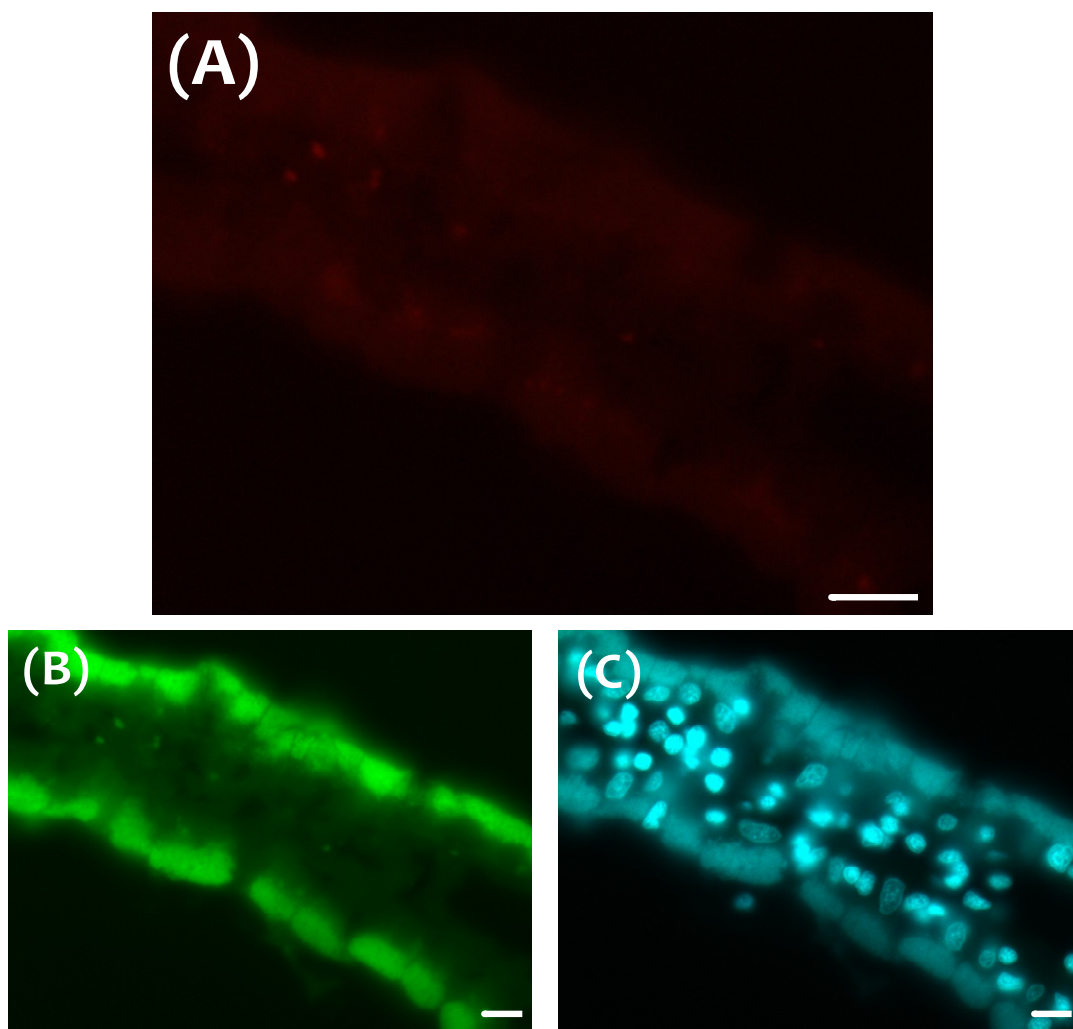


図6. GAM42aプローブを用いた*B. septemdierum*の
鰓系の蛍光顕微鏡画像。

試料は#822 (たぎり直上) のもの。

(A) Cy3標識GAM42a, (B) FITC標識EUB338, (C) DAPI。スケールは20 μm 。

2-3-3. *Solemya* sp. 共生菌の検出

B. septemtdierum との比較のために、系統的に離れた二枚貝である *Solemya* sp. においても、EUB338, GAM42a, NON338 の各 FISH プローブを用いて共生菌の検出を試みた。

EUB338 では、*B. septemtdierum* と同様に共生菌由来の蛍光シグナルが鰓組織の両側に多数観察できた (図 8A)。DAPI による対比染色では、EUB338 と同じ分布パターンを示す粒子状の蛍光シグナルが鰓糸両側から確認でき、また鰓糸の中心部に当たる基底膜部分には、縦 10-20 μm 、横 5-10 μm ほどの宿主核由

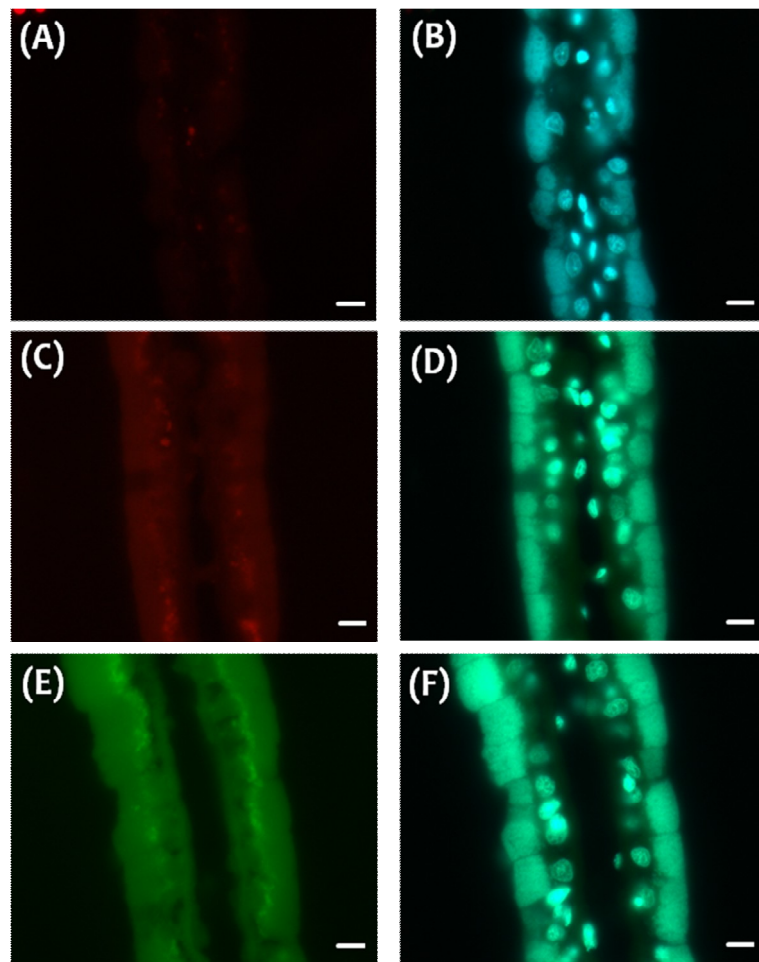


図7. プロテオバクテリアの各亜綱に特異的なFISHプローブを用いた *B. septemtdierum* の鰓糸の蛍光顕微鏡画像。

試料はすべて#822 (たざり直上) のもの。

(A) Cy3標識ALF968, (C) Cy3標識BET42a, (E) FITC標識EP404。
(B), (D), (F)は各プローブに併用したDAPI対比染色。スケールは20 μm 。

来の蛍光シグナルが点在していた (図 8B)。鰓糸の両側に共生菌由来の蛍光シグナルが多数みられ、鰓糸の基底膜部分に沿って宿主核が点在する特徴は *B. septemtdierum* と共通していた。しかし、形態的には以下の違いが認められた。i) 共生場領域の幅が *B. septemtdierum* のものと比較すると広い (*B. septemtdierum*: 約 10-20 μm , *Solemya* sp.: 50 μm 以上。どちらも片側のみ)。ii) *B. septemtdierum* よりも共生菌が大型である (*Solemya* sp. の共生菌は大きなもので長さ約 1-1.5 μm の短桿菌であるのに対し、*B. septemtdierum* の共生菌は本研究の FISH 画像からは計測出来ないぐらい小さかった。Fujiwara et al. (2000) によれば平均で直径約 0.6 μm の球菌である)。iii) *B. septemtdierum* では共生菌由来の蛍光シグナルが多数集まって形作る菌細胞の輪郭は明瞭であり、ほぼ正方形に近い四角形であったが、*Solemya* sp. では菌細胞の輪郭は長方形であり、また *B. septemtdierum* のものと比べて不明瞭で、鰓糸の外側に向かうに従い蛍光シグナルが弱くなる傾向にあった。

GAM42a でも、鰓系の両側から EUB338, DAPI と同様の分布パターンを示す蛍光シグナルが観察できた (図 8C)。この結果は、*Solemya* 属二枚貝は鰓組織内にガンマプロテオバクテリア型硫黄酸化細菌を保持するという過去の知見と一致する (Distel et al., 1994)。

2-4. 考察

2-4-1. *B. septemdierum* の鰓系における共生菌の局在

全真正細菌の 16S rRNA 配列を標的とする EUB338 プローブを用いた FISH により、*B. septemdierum* の鰓系の両側に多数の蛍光シグナルが観察できたことから (図 4, 5), *B. septemdierum* の鰓上皮細胞内には確かに真正細菌が存在するものと考えられる。蛍光シグナルは、多数が集まって一定の大きさの区画 (菌細胞) を形成し、その区画は宿主核の直上に局在することがわかった。すなわち、共生菌は宿主の鰓上皮細胞の頂膜側の区画を占有し、宿主核は基底膜側に偏在すると考えられる。これらの形態的特徴は、*Bathymodiolus* 属における共生菌の局在を形態的に確認した既報の電顕像及び FISH 画像 (Fujiwara et al., 2000; Duperron et al., 2005; 2006; 2007) と一致している。また、DAPI によって検出され

た共生菌由来の蛍光シグナルが NON338 では検出されないことから、FISH の実験手技及び試料の固定に問題はないことが確認された。

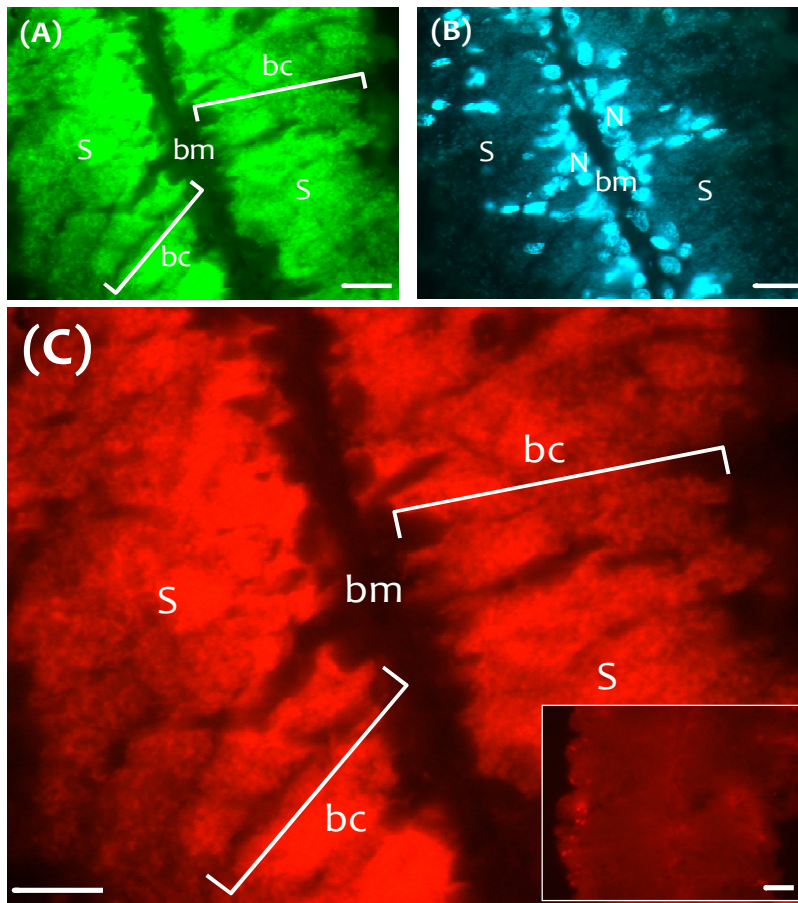


図8. 各FISHプローブを用いて多重染色を施した *Solemya* sp.の鰓系の蛍光顕微鏡画像。

(A) FITC標識EUB338, (B) DAPI, (C) Cy3標識GAM42a, 挿入図はCy3標識NON338。
S; 共生菌由来の蛍光シグナル, N; 宿主核由来の蛍光シグナル, bc; 菌細胞の輪郭, bm; 基底膜部分。スケールは20 μm。

2-4-2. *Solemya* sp. と *B. septemdierum* の鰓系の形態的な相違

比較のために用いた *Solemya* sp.には、*B. septemdierum* と幾つかの形態的な相違があることがわかった。特に菌細胞の大きさや、菌細胞内の共生菌由来の蛍光シグナルの分布パター

ンに大きな違いがみられた。

*B. septemdierum*を含む *Bathymodiolus* 属二枚貝類は、TEM 観察による形態的特徴及び炭素同位体比分析結果から、菌細胞内のリソソームによる細胞内消化 (“farming”) によって共生菌を直接同化しているとされる (Fiala-Médioni et al., 1986; DeChaine et al., 2006; Kádár et al., 2005; 2007)。対照的に *Solemya* は共生菌を直接消化せず、宿主の細胞質に分泌される共生菌由来の各種有機物を同化している (“milking”) とされている (Conway et al., 1992; Kádár et al., 2007)。菌細胞内が明瞭な形状を作り、内部に稠密に共生菌が存在する *Bathymodiolus* は、基底膜近傍に存在するリソソームに迅速に共生菌を送るために、リソソームと共生菌との距離をある程度短く、また共生菌を高密度に一つの菌細胞内に詰める必要があるのかもしれない。共生菌から分泌される栄養源を利用する *Solemya* は、*Bathymodiolus* とは対照的に鰓糸自体の面積を広げ、細胞質の面積 (体積) を大きくすることによって、より多くの有機物を共生菌から得ている可能性が考えられる。また、保持する共生菌のサイズの違いも鰓細胞の形態に大きな影響を与えていると推察される。

2-4-3. GAM42a プローブでは検出不可能な *B. septemdierum* 共生菌

GAM42a プローブを用いて *B. septemdierum* 共生菌の検出を試みた結果、共生菌群集が正常に検出できないことが分かった。*Solemya* sp.共生菌が GAM42a を用いて検出可能であったことから、本研究で用いた GAM42a が FISH プローブとして正常に使用できるのは明らかである。GAM42a と同様に、各プロテオバクテリア亜綱の 16S/23S rRNA 配列を標的とする ALF968, BET42a, EP404 プローブを用いた場合も、GAM42a と同様に *B. septemdierum* 共生菌の検出が不可能であったことから、*B. septemdierum* 共生菌の分子系統について、i) ガンマプロテオバクテリア亜綱に属するが GAM42a では検出できない、ii) プロテオバクテリア綱に属する細菌菌群集ではない、という 2 つの可能性が考えられる。よって第 3 章では、*B. septemdierum* 共生菌の 16S rRNA 配列に基づいた分子系統を確認するとともに、16S rRNA 配列に基づいた特異的 FISH プローブの開発を行った。

第3章 *Bathymodiolus* の共生硫黄酸化細菌に特異的な FISH プローブの設計

3-1. 背景と目的

Bathymodiolus 属の共生系の特徴は、系統的・生理的に異なる複数の共生菌群を多重共生させる種が存在する点である。現在までに *Bathymodiolus* 属で知られている共生型は、1) 硫黄酸化細菌あるいは 2) メタン酸化細菌のみと共生関係を築く種、3) 硫黄・メタン酸化細菌両方と共生関係を築くタイプの3タイプに加え、近年になって4) 3種類以上の共生菌群と共生関係を築くタイプが存在することが明らかとなった (Dupperon et al., 2007)。従って、*Bathymodiolus* 属の共生菌を正確に解析するためには、異なる細菌群を特異的に認識するプローブが必要である。第2章で用いた EUB338 プローブは、真正細菌全てを標的としているため、その特異性に問題があり、ガンマプロテオバクテリア亜綱を標的とする GAM42a プローブや、その他の亜綱を標的とするプローブでは *B. septemdierum* の共生菌を検出することはできなかった。一方、*Bathymodiolus* 属の既往研究において、*B. azoricus*などの他種の共生菌の検出のために作られたプローブは、対象種の共生菌に特異的なものであり、*B. septemdierum* の共生菌を検出できる保証はない。

よって本章では、まず試料として用いた *B. septemdierum* の共生菌の 16S rRNA 配列を調べ、共生菌の系統的位置を推定した。その後、*B. septemdierum* の共生硫黄酸化細菌に高い特異性を持ち、かつ *Bathymodiolus* 属の共生硫黄酸化細菌を共通に検出可能な FISH プローブを新規に設計し、更に検出のための最適条件の検討を行った。

3-2. 試料と方法

3-2-1. *B. septemdierum* および *Solemya* sp. 共生菌の 16S rRNA 配列解析と系統解析

明神海丘で採集され、採集直後の解剖の後、 -80°C で冷凍保存された *B. septemdierum* および日本海上越沖で採集された *Solemya* sp. の鰓 (第2章参照) より DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を用いて全 DNA 抽出を行った。その後、全 DNA を鋳型にして全真正細菌の 16S rRNA 配列を標的とする Bac27F-Uni1492R 及び 530R プライマーセット (Lane, 1991) を用い、共生菌の 16S rRNA 遺伝子領域 (約 1,100 bp) を PCR 法により増幅した。増幅は Ex-Taq Polymerase (タカラバイオ) と PC818 型サーマルサイクラー (アステック) を用い、 $95^{\circ}\text{C}\cdot 10$ 分間の初期熱変性の後、 $95^{\circ}\text{C}\cdot 15$ 秒間の熱変性、 $50^{\circ}\text{C}\cdot 1$ 分間のアニーリングを 40 サイクル行った。得られた PCR 増幅産物を QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) を用いて精製後、PCR に用いたプライマーを用いてダイレクト・シーケンス法を行い、塩基配列を決定した。シーケンス反応には BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver.3.0 (Applied Biosystems), ABI3130 キャピラリー・オートシーケンサー (Applied Biosystems) を用いた。

得られた *B. septemdierum* の共生硫黄酸化細菌の 16S rRNA 配列と、既知の *Bathymodiolus* 属に共生する硫黄酸化細菌、およびこれら共生菌群と近い配列を持つ自由生活型硫黄酸化細菌の配列を、MEGA 4.0 を用いてアライメントし、近隣結合 (NJ) 法と最大節約 (MP) 法による系統樹を作成した。解析条件は既報 (Fujiwara et al., 2000; Duperron et al., 2007; Duperron et al., 2008) に従い、1,000 回試行のブートストラップ解析を行った。

3-2-2. プローブ設計

GenBank データベースから *Bathymodiolus*, *Calyptogen*a, *Thyasiridae* 科二枚貝類, *Provannidae* 科腹足類 (表 5) など, *B. septemdierum* 以外の化学合成生物に共生する共生硫黄酸化細菌及び自由生活型硫黄酸化細菌の 16S rRNA 配列を集め、MEGA 4.0 でアライメントをかけ、*Bathymodiolus* の共生硫黄酸化細菌すべてに共通な特異的配列を決定した。決定した幾つかの候補配列は、Ribosomal Database Project II (RDP II; <http://rdp.cme.msu.edu/>) の“PROBE MATCH”で配列特異性を確認し、特に特異性が高いと判定された配列候補について、Sigma Genosys Oligo Calculator (http://www.genosys.jp/whatsnew/active/active_manual.html) を用いて、プローブの物理構造、計算上の融解温度 (Tm) などを求めた。最終的に候補配列を 2 つに絞り込み、IDT (Integrated DNA Technologies) のオリゴ受託合成サービスで Cy3 標識プローブを合成した。

3-2-3. 新規プローブの特異性検討

FISH プローブは、プローブの結合を阻害するホルムアミド濃度を調節することによって、その特異性が変化する (Amann et al., 1990)。従って、新規に設計した *Bathymodiolus* の共生硫黄酸化細菌に特異的な 2 つのプローブの最適実験条件を検討するため、第 2 章で作成した *B. septemdierum* および *Solemya* sp. の鰓切片に対して 0–50% のホルムアミドを含む反応液中で FISH を行った。その際、Oligo Calculator で求めたプローブの Tm 値から計算式 (http://www.aprosoci.com/jutaku/ISH_Probe.pdf) を用いて得た計算上の最適ホルムアミド濃度を参考にするとともに、0% と 50% ホルムアミド濃度下での特異性も確認した。反応、洗浄、封入の操作は第 2 章に述べた通りである。封入後、各ホルムアミド濃度下における新規プローブの共生菌群集への特異性を厳密に検討するため、焦点面以外の蛍光シグナルを排除して撮影することのできる共焦点レーザー顕微鏡による画像撮影を行い (次項参照)、*B. septemdierum* の鰓糸内の共生菌が最も高い蛍光強度を示し、かつ *Solemya* sp. の共生硫黄酸化細菌の蛍光強度が最も低くなる条件を新規プローブの最適ホルムアミド濃度と定めた。

3-2-4. 共焦点レーザー顕微鏡撮影による蛍光の定量化

表5. プローブ配列決定に用いた細菌群集の16S rRNA遺伝子の一覧

Type	Host	Species	GenBank Accession No.
Thiotroph	Bivalvia	<i>B. septemdierum</i> NT0807 #819 A Sym.*	/
		<i>B. septemdierum</i> NT0807 #819 B Sym.*	/
		<i>B. septemdierum</i> NT0807 #822 Sym.*	/
		<i>B. septemdierum</i> Sym.	AB036709
		<i>Bathymodiolus</i> sp. Mariana Sym.	AB073122
		<i>Bathymodiolus</i> sp. Gabon Margin Sym.	AJ745718
		<i>Bathymodiolus</i> sp. Juan de Fuca	DQ077893
		<i>B. heckerae</i> T1 Sym.	AM236327
		<i>B. heckerae</i> T2 Sym.	AM236328
		<i>B. brooksi</i> Sym.	AM236331
		<i>B. thermophilus</i> Sym.	M99445
		<i>B. azoricus/ puteoserpentis</i> Sym.	AM083974
		<i>B. aff. brevior</i> Sym.	DQ077891
		<i>Idas</i> sp. Sym.	AM402956
		Deep-sea mussel NZ3 Sym.	DQ321718
		<i>Solemya reidi</i> Sym.	L25709
		<i>Acharax jonsonii</i> Sym.	AJ441197
		<i>Codakia orbicularis</i> Sym.	AB189357
		<i>Ectenagena extenta</i> Sym.	AF035725
		<i>Calyptogena kilmeri</i> Sym.	AF035720
		<i>Calyptogena elongata</i> Sym.	AF035719
		<i>Calyptogena laubieri</i> Sym.	AB073121
		<i>Calyptogena oregon</i> subduction sp. Sym.	L25710
		<i>Calyptogena ponderosa</i> Sym.	EU403436
		<i>Calyptogena pacifica</i> C1 40' Sym.	AJ441192
		<i>Calyptogena</i> sp. JS2002 'C3 68' Sym.	AJ441195
		<i>Calyptogena</i> aff. <i>angulata</i> Sym.	AY310507
		<i>Calyptogena packardana</i> Sym.	AY310508
		<i>Calyptogena okutanii</i> Sym.	AP009247
		<i>Vesicomya lepta</i> Sym.	AF035727
		<i>Vesicomya</i> sp. mt-I Sym.	EU403439
		<i>Vesicomya</i> sp. mt-II Sym.	EU403434
		<i>Vesicomya</i> sp. mt-III Sym.	EU403437
		<i>Vesicomya</i> sp. MAR Sym.	EU403435
		<i>Gigantidas gladius</i> Sym.	EU326224
		<i>Conchocele disjuncta</i> Sym.	AJ441190
	Ciliata	<i>Candidatus</i> Thiobios zoothermophilic eSym.	AJ879933
	Vestimentifera	<i>Riftia pachyptila</i> Sym.	AY129116
	Gastropoda	<i>Alviniconcha</i> sp. type 1 Sym.	AB235238
		<i>Alviniconcha hessleri</i> Sym.	AB214932
		<i>Ifremeria nautilei</i> Sym. Lau Basin	AB238964
		<i>Ifremeria nautilei</i> Sym. Manus Basin	AB189713
	Free-living	SUP05-21 Environmental Clone	AB112459
Methanotroph	Bivalvia	<i>Bathymodiolus japonicus</i> Sym.	AB036711
		<i>Bathymodiolus platifrons</i> Sym.	AB036710
		<i>Bathymodiolus heckerae</i> Sym.	AM236325
		<i>Bathymodiolus brooksi</i> Sym.	AM236330
		<i>Bathymodiolus azoricus</i> Sym.	AM083967
		<i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> Sym.	AM083967
		<i>Bathymodiolus childressi</i> Sym.	AM236329
Heterotroph	Free-living	<i>Bathymodiolus</i> sp. Gabon Margin Sym.	AJ745717
		<i>Escherichia coli</i>	J01695

* this study, Sym; endosymbiont, eSym; ectosymbiont

蛍光強度を定量化するため、LSM 5 PASCAL 共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss) を用いて観察及び定量用画像撮影を行った。観察と撮影は、HeNe レーザー (波長 488 nm; FI 励起) と Ar レーザー (543 nm; Cy3 励起) をそれぞれ出力 21-30% で試料に照射して各蛍光標識を励起し、Pinhole 径 95-100 μm の条件で、Plan-NEOFLUAR 20 \times /0.50 対物レンズを用いて行った。鮮明で高解像度の蛍光画像を得るため、撮影時のレーザー走査回数は4回とした。

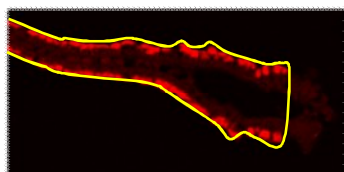
撮影した画像は Image Pro Plus 5.1J (Media Cybernetics) を用いて解析した。輝度を濃淡で表示し、定量化に適した蛍光画像を得るため、Image Pro Plus 5.1J で 16 ビット・グレイスケールに変換後、プローブで検出された共生菌群集を含む鰓組織を、“測定 (M)” 項目から、“マニュアル測定” を選択し、“マニュアル測定” 中の“自由曲線” を選択して鰓組織の共生領域の輪郭をなぞり、面積を算出した。面積算出後、“測定” 項目中の“カウント/サイズ” から、蛍光輝度を測定する“積分光学濃度” を選択して、鰓糸内に占める蛍光シグナルの測定を行った。測定後、得られた蛍光輝度の総和 (蛍光強度) を鰓糸ごとの面積で割り、鰓糸の蛍光強度を求めた。手法についての詳細な模式図を図 9 に記す。

3-3. 結果

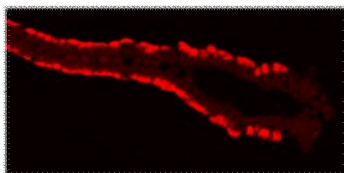
3-3-1. 共生菌の 16S rRNA 配列に基づいた分子系統

PCR 増幅によって、#819 で採取された 2 個体、#822 から採取された 1 個体の鰓組織 DNA 抽出物から、約 1,100 bp に及ぶ共生菌由来の 16S rRNA 配列が増幅産物として得られた。3 つの配列は、わずかな塩基置換 (#819 と #822 A が 11 塩基、#822 A と B が 7 塩基、#822 B

1. 鰓糸の面積と蛍光強度の測定

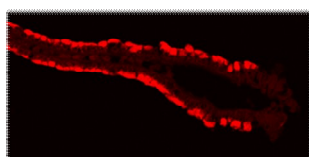


囲った部分の鰓糸の面積を算出 (ピクセル数)

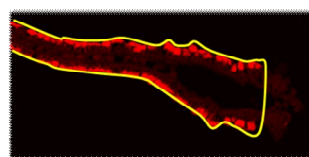


一定以上の蛍光輝度を持つ部分を検出し、総和を出す

2. 鰓糸1本が持つ平均蛍光強度を算出



/



= 平均値

測定した蛍光強度を鰓糸の面積で割る

図9. 蛍光強度測定の様式図

と #819 が 8 塩基) を除きほぼ同一であった。NJ 法に基づいて系統樹を描いた結果、これらの配列は既知の *Bathymodiolus* 属および *Idas* 属の二枚貝に共生するガンマプロテオバクテリア型硫黄酸化細菌と同一のク

リードに含まれ、既知の *B. septemdierum* 共生菌 (GenBank Accession No. AB036709; Fujiwara et al., 2000) に最も近縁であった (図 10)。MP 法による系統樹でも同様の樹形が得られたため、NJ 系統樹上にブートストラップ値のみ記載した (図 10)。

GAM42a プローブで正常に共生菌が検出できた *Solemya* sp. 共生菌についても *B. septemdierum* 共生菌と同様の手法を用いて、16S rRNA 配列からその系統関係を調べた。その結果、本研究で用いた *Solemya* sp. 共生菌を含む 4 つの *Solemya* 共生菌は単系統群を形成し、*Bathymodiolus* の共生硫黄酸化細菌の系統群とは姉妹群を形成することがわかった (図 10)。本研究で用いた *Solemya* sp. 共生菌 (*Solemya* sp. Joetsu sym) は、既知の 3 種の *Solemya* 共生菌群のなかで、*S. reidi* の共生硫黄酸化細菌 (GenBank Accession No. L25709; Distel et al., 1994) に最も近縁であることが判明した。

アルファプロテオバクテリアに属する昆虫共生菌 (*Wolbachia* sp.; GenBank Accession No. EF433794)、イプシロンプロテオバクテリアに属する *Alviniconcha* aff. *hessleri* の共生硫黄酸化細菌 (*A. aff. hessleri* sym AB20405) およびベータプロテオバクテリアに属するアムーバ共生菌 (*Candidatus Procabacter* sp. OEW1; GenBank Accession No. AM412761) との位置関係から見て、*Bathymodiolus* の共生硫黄酸化細菌は、*Solemya* の共生硫黄酸化細菌や大腸菌 *Escherichia coli* と同様、ガンマプロテオバクテリア亜綱に属し、同時に共生硫黄酸化細菌であることが確認された。

3-3-2. *Bathymodiolus* の共生硫黄酸化細菌に特異的な新規プローブ

新規設計した FISH プローブ *Bsob692*, *Bsob737* の詳細を表 6 に示す。FISH プローブにおいて最も重要な性質の 1 つである T_m 値 (理論上の半量変性温度) は、*Bsob692* が 51.0°C, *Bsob737* が 54.1°C であり、既存の FISH プローブ (EUB338; 約 60°C, GAM42a; 約 52°C) の T_m 値とほぼ同様の範囲にあることがわかった。また、 T_m 値から計算した最適ホルムアミド濃度は *Bsob692* が 20%, *Bsob737* が 10% であった。Sigma Genosys Oligo Calculator で各プローブの立体構造を確認した結果、どちらも非常に弱いヘアピン構造を持つ可能性があるが、ダイマーを形成する可能性は殆どなく、FISH プローブとしては特に問題がないことがわかった。

RDPII による特異性検索の結果、データベース上に登録されている約 76 万を超える既知の 16S rRNA 配列の中で、*Bathymodiolus* 属の共生硫黄酸化細菌以外に相同性のある配列は、*Bsob737* では *Bathymodiolus* 属と近縁な *Idas* sp. の共生硫黄酸化細菌 (Duperron et al., 2008)、水曜海山の熱水噴出域から得られた硫黄酸化細菌に近縁な環境クローン (Sunamura et al., 2004)、海産の未培養細菌の遺伝子断片など合計約 60 個の 16S rRNA 配列、*Bsob692* では *Bsob737* と相同性のある上記の菌群に加え、*Methylococcus* 属に属する数種のメタン酸化細菌、Alteromonadacea 科に属する自由生活型細菌など、合計約 140 個

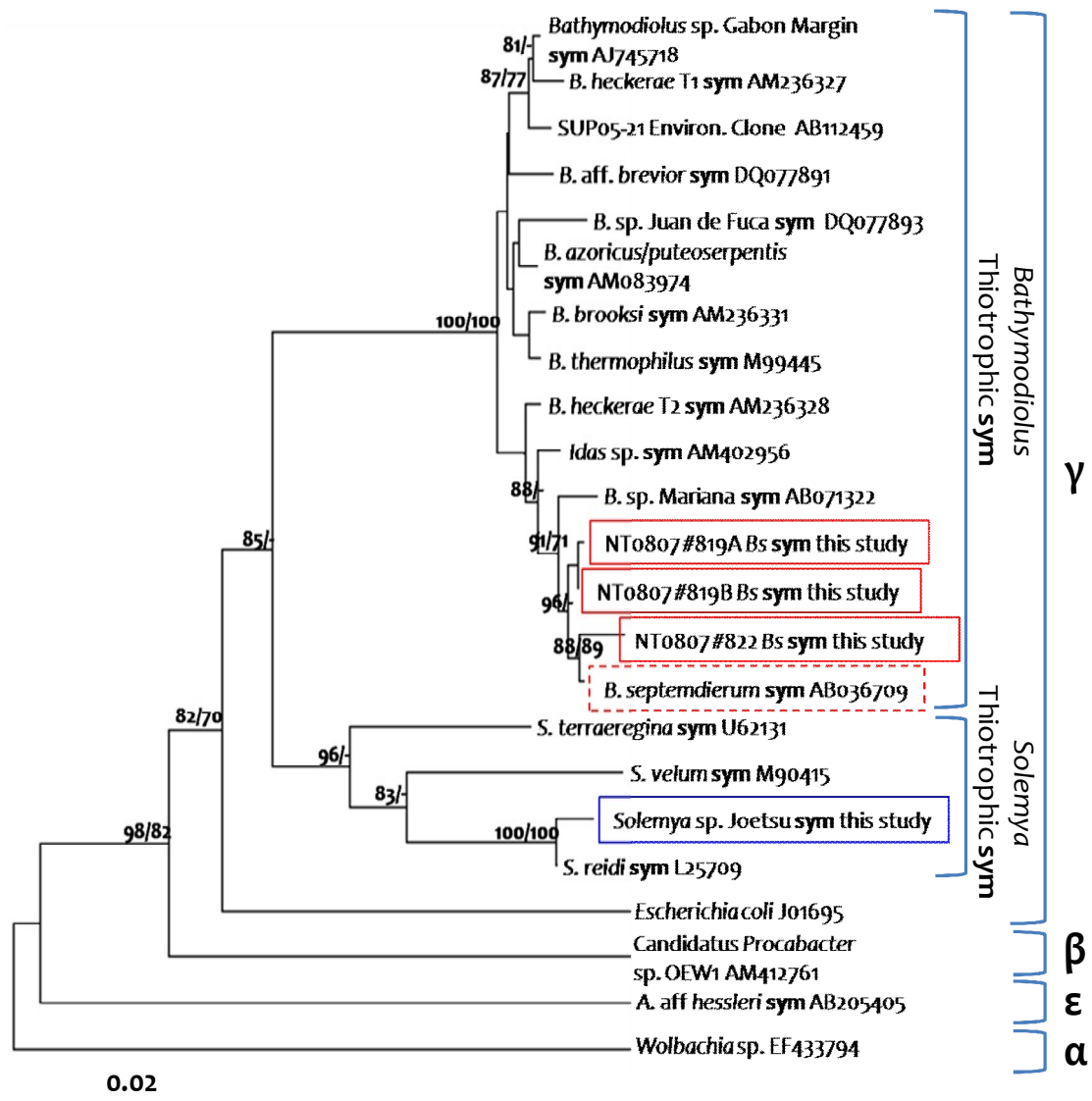


図10. 16S rRNA配列を基にした近隣結合 (NJ) 法と最大節約 (MP) 法による*B. septemdierum*共生菌の系統関係。

Bathymodiolus Thiotrophic sym; 主に*Bathymodiolus*の共生硫黄酸化細菌を中心とした系統群, *Solemya* Thiotrophic sym; *Solemya*の共生硫黄酸化細菌を中心とした系統群, α; アルファプロテオバクテリア亜綱の系統群, β: ベータプロテオバクテリア亜綱の系統群, γ: ガンマプロテオバクテリア亜綱の系統群, ε; イプシロンプロテオバクテリア亜綱の系統群, sym; 細胞内共生菌。

ブートストラップは1,000回試行, 70以上の値を各分岐に記載し, 表記した値の内訳はNJ/MP。スケールは0.02塩基置換率を示す。

□ 本研究で用いた*B. septemdierum*共生菌, □ 既報 (Fujiwara et al., 2000) の*B. septemdierum*共生菌
□ 本研究で用いた*Solemya* sp.共生菌。

表6. 本研究で設計した新規FISHプローブ

Name	Sequence (5'-3')	Target Organisms	Position (<i>E.coli</i>)	Labelled	Tm (°C)
<i>Bsob692</i>	CGCCATTGATGTTTCCT TCAG	<i>Bathymodiolus</i> thiotrophic endosymbiont	16S, 692-711	Cy3	51.0
<i>Bsob737</i>	CCTGAAATTCACATTT CCTC	<i>Bathymodiolus</i> thiotrophic endosymbiont	16S, 737-756	Cy3	54.1

の配列のみであることがわかった。

3-3-3. 新規プローブを用いた FISH

本研究で新規に設計した 2 つの FISH プローブ *Bsob692*, *Bsob737* を用いて, *B. septemdierum* と *Solemya* sp. に対して FISH を行った。はじめに, 標準的な条件であるホルムアミド 30% 存在下で鰓内の共生菌群集の検出を試みた結果, *Bsob692* では *B. septemdierum* 共生菌のみが検出されたものの (図 11A; 12A), *Bsob737* は *B. septemdierum* 共生菌に加えて (図 11D), *Solemya* sp. の共生菌も検出した (図 12D)。

FITC 標識 EUB338, DAPI で同様の蛍光シグナルが共生場から観察できる (図 11B, C; 図 12B, C) ことから, *Solemya* sp. 共生菌は確かに鰓糸内に存在し, *Bsob737* によって検出されていることが分かった。また, *Bsob692* はホルムアミド濃度 30% 下では少なくとも *Solemya* sp. 共生菌を検出せず, また *B. septemdierum* 共生菌を正常に検出することがわかった。両プローブの標的領域と *Solemya* sp. の 16S rRNA 配列を調べた結果, 配列のミスマッチは *Bsob692* では 4 塩基, *Bsob737* では 2 塩基であった。

3-3-4. 共焦点レーザー顕微鏡によるプローブの最適条件決定

更に, 0%, 50% 及び計算により求めた最適ホルムアミド濃度で *B. septemdierum*, *Solemya* sp. の鰓切片と両プローブをハイブリダイズさせ, 共焦点レーザー顕微鏡によって鰓組織を撮影した結果, *Bsob692* では *B. septemdierum* では 0%, 計算値の 20% それぞれで強い蛍光シグナルが観察出来たが, 50% では蛍光シグナルは殆ど観察されなかった (図 13)。 *Solemya* sp. は, 0% でのみ強い蛍光シグナルが観察されたものの, 20%, 50% では殆ど共生菌由来の蛍光シグナルはみられなかった (図 13)。一方, *Bsob737* ではどのホルムアミド濃度でも *B. septemdierum*, *Solemya* sp. 双方から強い蛍光シグナルが観察された (図 14)。

撮影した画像から蛍光強度を数値化した結果, *Bsob692* の場合, *B. septemdierum* の 0% 条件下での蛍光強度を 1 とすると, 20% 下では 1, 50% 下では 0.10 の蛍光強度を, *Solemya* sp. では 0% 条件下での蛍光強度を 1 とすると, 20% 下では 0.11, 50% 下では 0.00 の蛍光強度となることが分かった (値はすべて小数点 2 位以下を四捨五入; 図 15A)。 *Bsob737* の *B. septemdierum* では, 0% 条件下での蛍光強度を 1 とすると, 10% 下では 1.00, 50% 下では 0.70 の蛍光強度を, *Solemya* sp. では 0% 条件下での蛍光強度を 1 とする

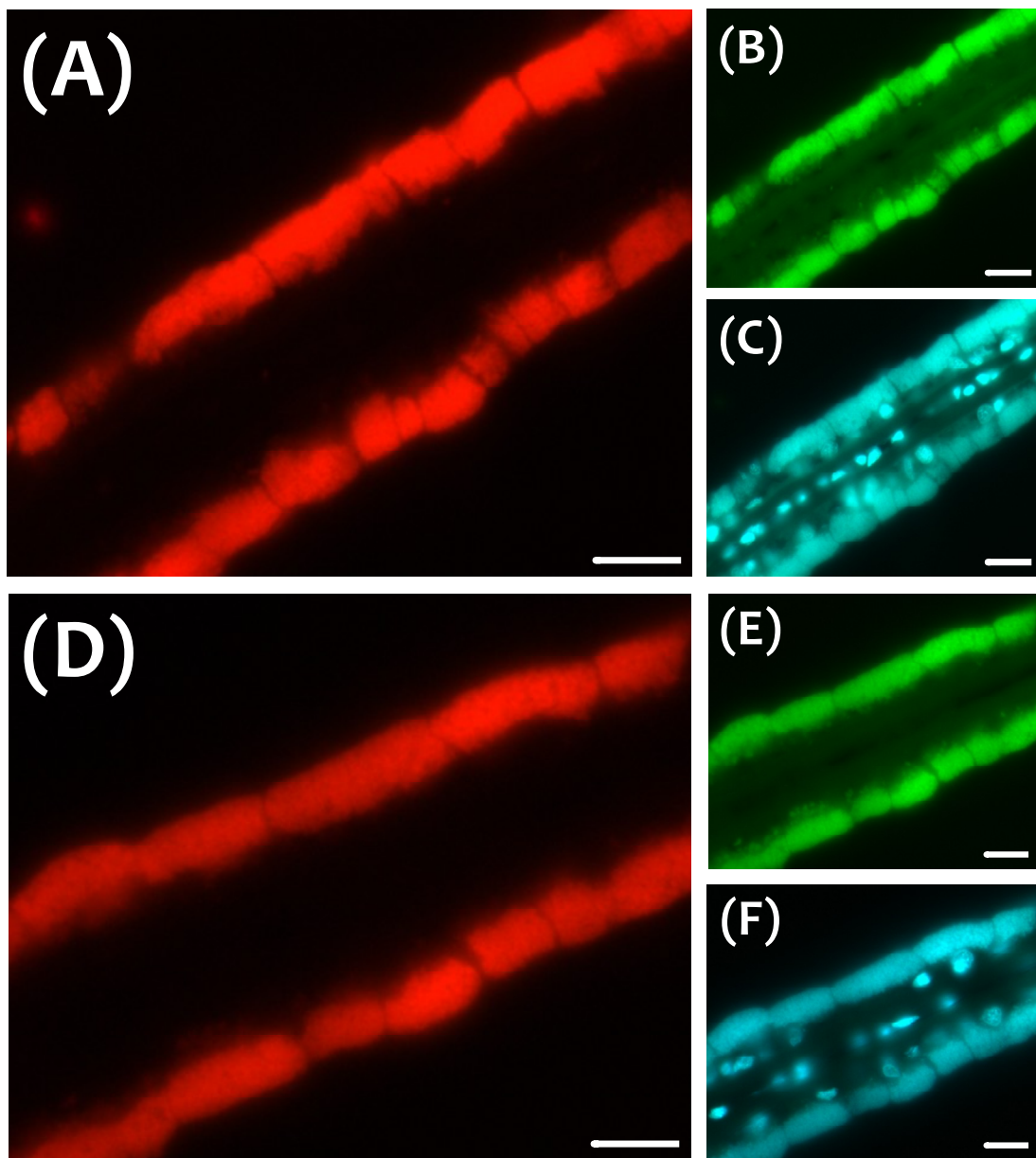


図11. Bsob692とBsob737プローブを主体に多重染色を施した *B. septemdierum* の鰓系の蛍光顕微鏡画像。

(A) Cy3標識Bsob692, (B) FITC標識EUB338, (C) DAPI対比染色, (D) Cy3標識Bsob737, (E) FITC標識EUB338, (F) DAPI対比染色。スケールは20 μm 。

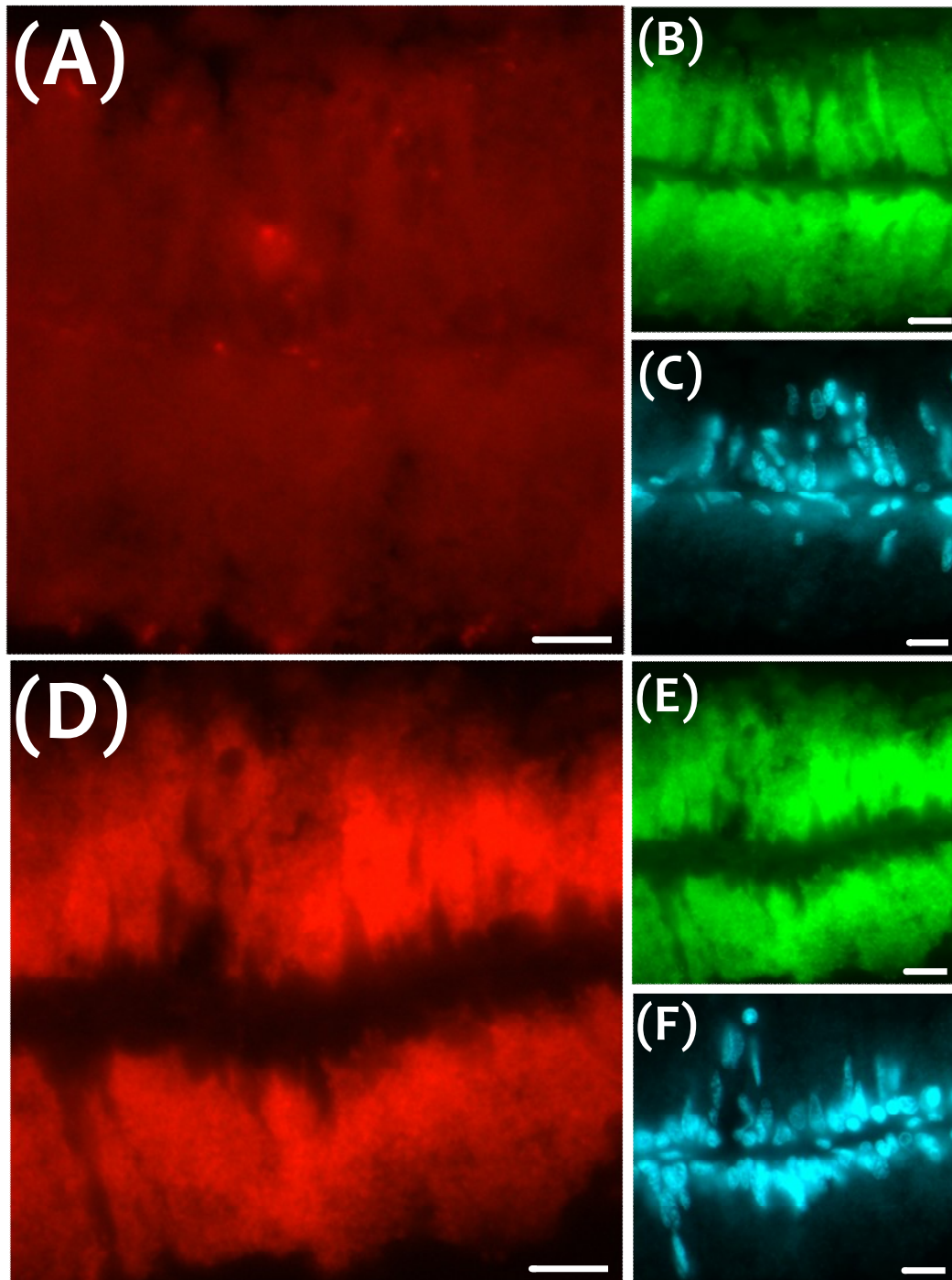


図12. *Bsob692*と*Bsob737*を主体に多重染色を施した
Solemya sp.の鰓糸の蛍光顕微鏡画像。

(A) Cy3標識*Bsob692*, (B) FITC標識*EUB338*, (C) DAPI対比染色, (D) Cy3標識*Bsob737*,
(E) FITC標識*EUB338*, (F) DAPI対比染色。スケールは20 μm 。

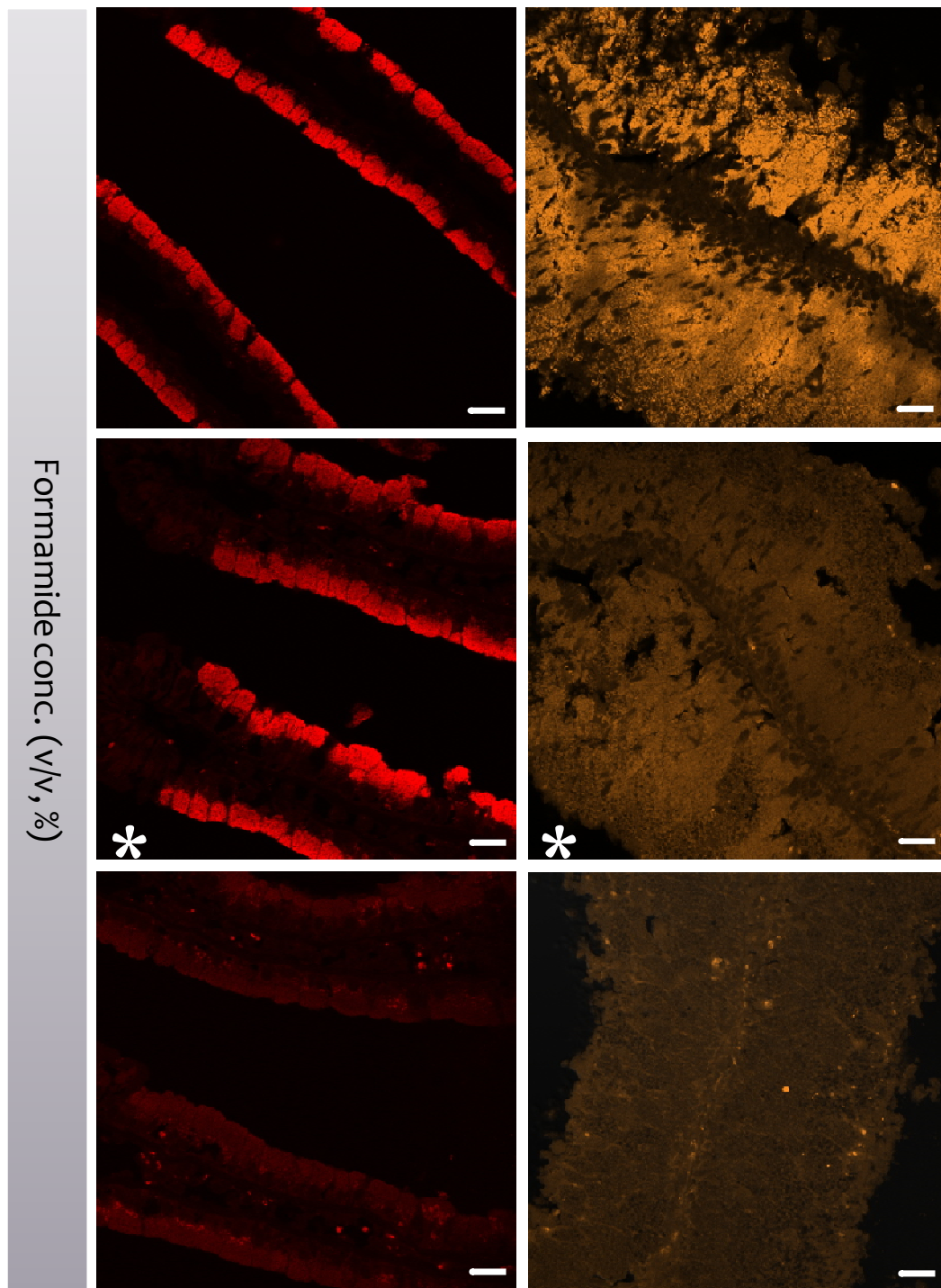


図13. 各ホルムアミド濃度条件下でのBsob692プローブの共焦点レーザー顕微鏡画像。

左縦列; *B. septemdierum*, 右縦列; *Solemya* sp. (どちらも本来のCy3が持つ色ではなく, 撮影時に再構成された疑似色)。ホルムアミド濃度は, 上から下へ順に0%, *20%, 50%。スケールは20 μ m。

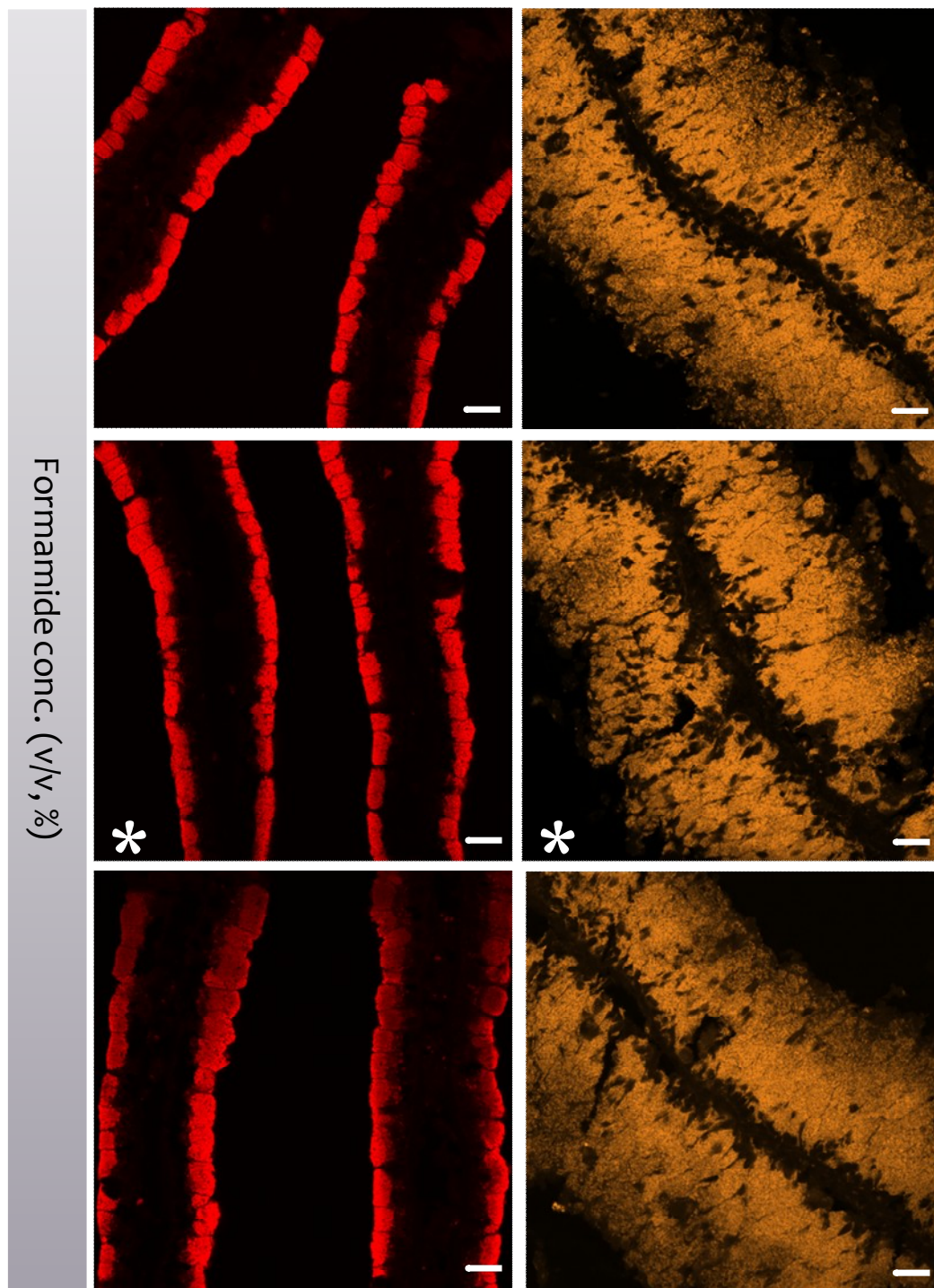


図14. 各ホルムアミド濃度条件下でのBsob737プローブの共焦点レーザー顕微鏡画像。

左縦列; *B. septemdierum*, 右縦列; *Solemya* sp. (どちらも本来のCy3が持つ色ではなく, 撮影時に再構成された疑似色)。ホルムアミド濃度は, 上から下へ順に0%, *10%, 50%。スケールは20 μ m。

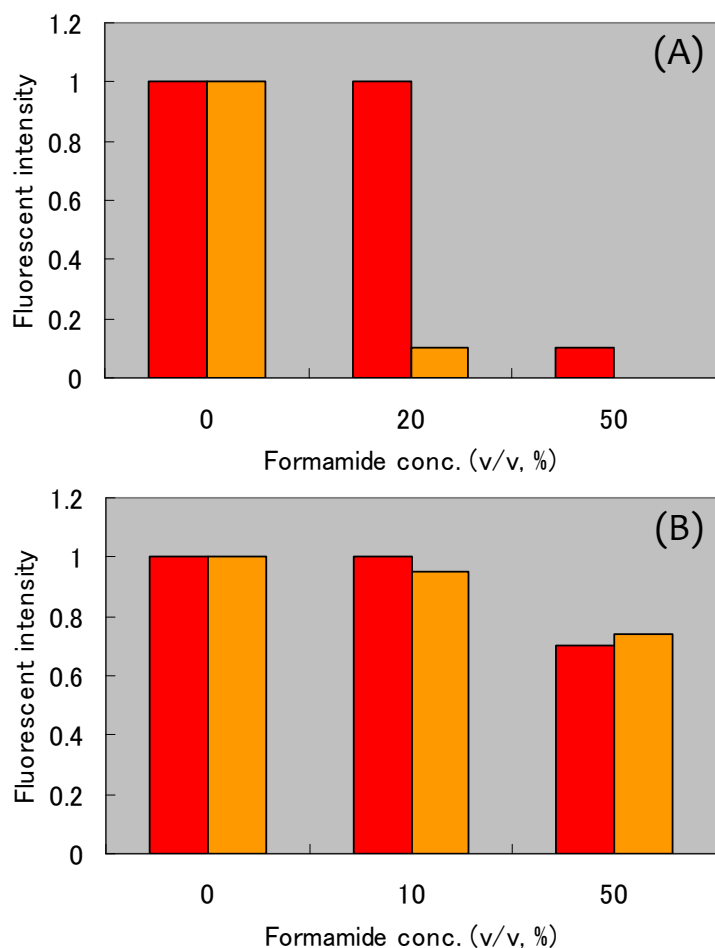


図15. 2つの新規プローブの
各ホルムアミド濃度条件下における蛍光強度。

■ *B. septemdirum* ■ *Solemya sp.*

(A) Bsob692を用いた*B. septemdirum*と*Solemya sp.*, (B) Bsob737を用いた*B. septemdirum*と
Solemya sp.。各プローブの理論上のホルムアミド濃度（ヒストグラム中央）で、
各生物試料ごとに得られた蛍光強度を1とした場合の相対値を表す。

と、10%下では
0.95, 50%下では
0.74 の蛍光強度と
なった（値はすべ
て小数点2位以下
を四捨五入；図
15B）。

以上の結果から、
Bsob737 ではホル
ムアミド濃度にか
かわらず *Solemya*
sp. 共生菌を検出
するが、*Bsob692*
は計算上の最適濃
度である 20%ホル
ムアミド濃度では
Solemya sp. 共生
菌を検出せず、本
来の標的である *B.*
septemdirum の
共生硫黄酸化細菌
を検出できることが
わかった。

3-4. 考察

3-4-1. *B. septemdirum* 共生菌の GAM42a のミスマッチ

本研究で用いた *B. septemdirum* 共生菌は、ガンマプロテオバクテリア亜綱に属する細菌群集であることが 16S rRNA 配列解析から明らかになった。GAM42a で検出されなかった（第2章）理由は、当該部位に複数の塩基置換が起こっているためと考えられる。過去に採取された *B. septemdirum* 共生菌の 23S rRNA 配列と GAM42a には、2塩基のミスマッチが存在するという（Kuwahara, 私信）。本研究では GAM42a の標的配列である 23S rRNA の解析は行っていないが、共生菌が既報のものと極めて近縁であることが 16S rRNA 配列解析から示されたため、本研究の *B. septemdirum* 共生菌にも同様のミスマッチが存在すると考えられる。

GAM42a で検出できないガンマプロテオバクテリアの例は、植物病原菌を系統群中に多く

含む *Xanthomonas* 属の多くの菌群 (Siyambalapitiya and Blackall, 2004) や、熱水域から発見された蔓脚類の一種である *Neoverruca* sp. の蔓脚表面に存在する一部のガンマプロテオバクテリア (Watanabe et al., in prep.) など近年多数報告されている。我々も相模湾湧水域で採取された *B. platifrons* (ヘイトウシンカイヒバリガイ), *B. japonicus* (シンカイヒバリガイ) の共生メタン酸化細菌及び同じく相模湾湧水域で採取された *Calymene* sp. (シロウリガイの一種) の共生硫黄酸化細菌が GAM42a では検出できないことを確認している (未発表)。一説によると, GAM42a で検出可能な菌群は, ガンマプロテオバクテリアに属する菌群のうち, 3 分の 2 程度であると推定されている (Siyambalapitiya and Blackall, 2004)。恐らく, このプローブが設計された当時 (Manz et al., 1992), データベースに登録されていた微生物群集のゲノム情報が十分に蓄積されていなかったことが一つの原因であると考えられる。様々な微生物の配列情報が集積された現代においては, より特異性の高い FISH プローブの設計が可能であると考えられる。

3-4-3. 特異性の高い新規プローブの作製

本研究では, データベースを活用して, 標的とする *Bathymodiolus* 属の共生硫黄酸化細菌に高い特異性を持ち, かつ *Bathymodiolus* 属に共生する硫黄酸化細菌に共通に使用できるプローブの配列を検索した。その結果, *Bathymodiolus* 属の共生硫黄酸化細菌以外では極めて少数の細菌種としか相同性のない候補配列を 2 つ得ることができた。しかし, 実際にプローブを合成して FISH を行くと, 一方のプローブ *Bsob737* はホルムアミド濃度 50% の厳密な検出条件でも *Solemya* sp. の共生菌にハイブリダイズすることが判明した。しかし, もう一方のプローブ *Bsob692* は, 計算上の最適ホルムアミド濃度 (20%) で *Bathymodiolus* の共生硫黄酸化細菌を検出し, かつ *Solemya* sp. の共生硫黄酸化細菌を検出しないことから, 特異性の高い FISH プローブであると考えられ, 以降の研究には主として本プローブをホルムアミド 20% の条件で用いることとした。なお, *Bsob737* についても, *Solemya* 属及び *Bathymodiolus* 属の共生菌を検出できることから, より広い特異性を持つ FISH プローブとして今後活用できる可能性がある。

第 4 章 野生および飼育環境下の *Bathymodiolus septemdierum* に共生する硫黄酸化細菌の FISH による定量

4-1. 背景と目的

Bathymodiolus 属二枚貝の特徴のひとつは、生息域が深海の熱水噴出域やメタン湧水域であるにもかかわらず、常圧水槽下でも比較的長期の飼育が可能なことである。この特徴を生かせば、様々に条件を変えた飼育などによる実験的なアプローチにより、この二枚貝の環境適応や共生のメカニズムを解明できる。本研究の研究対象種である *B. septemdierum* も他の *Bathymodiolus* 属二枚貝種と同様に、伊豆小笠原弧の熱水噴出域に生息する種でありながら、長期にわたる飼育が可能であることが既報により判明している (Fujiwara et al., 1999)。

本章では、3 章で確立した *Bathymodilus* の共生硫黄酸化細菌に特異的な新規プローブを用いた FISH と、共焦点レーザー顕微鏡による画像撮影及び画像解析による定量の手法を用いて、*B. septemdierum* 共生菌が環境中の硫化物量の変化にどのように応答し、その存在量を変化させるのかを、硫化物濃度が互いに異なる場所で採集された野生下の個体群の比較及び硫化物を添加した海水と通常海水で飼育した個体群の比較を行うことによって検討することを目的とした。

同様の試みは、大西洋中央海嶺に生息する *B. azoricus* おいて報告がある (Halary et al., 2008; Riou et al., 2008) もの、*B. azoricus* は硫黄酸化細菌、メタン酸化細菌と二重共生関係を持つ種であり、硫化物存在下での共生機構や、硫化物に対する共生菌群集の挙動と適応機構を解析するためには、むしろ *B. septemdierum* のように共生硫黄酸化細菌のみと共生関係を持つ単一共生系を用いる方が理解が容易であると考えられる。

4-2. 試料と方法

4-2-1. 生物試料と水槽飼育

硫化物濃度の異なる環境に生息する野生下の個体の比較を行うために、表 1 (第 2 章) で示した 2 つのサイトで採集された *B. septemdierum* 個体の一部を船上で解剖し、第 2 章に準じて固定を行った (Wild #819, Wild #822)。明神海丘において、*B. septemdierum* は熱水噴出孔の周囲に生息するが、熱水に直接暴露されない、噴出孔から数十センチ離れた場所にコロニーを形成することが多い。#819 ではそのような典型的なコロニーから採集を行った。一方 #822 は、コロニーの直下に小さな噴出があり、噴出水による海水のゆらぎに曝されている個体を選択的に採集したものである。コロニー直上の海水をバッグ採水器で採水し、HACH 水質計で測定した硫化物濃度は #822 は 0.41 mg/L, #819 は検出限界以下であった。また、同 NT08-07 航海の #818, #819, #824 で採集された個体 (#818, #824 においても #819 と同様の環境から採集した) をプールし、実験室での水槽飼育に供した (表 7)。水槽飼育は硫化ナトリウム (Na₂S) 添加海水、通常海水の 2 つの水槽で、常圧、水温 4°C の条件下で行った。ア

表7. 飼育概況と飼育試料の詳細

Reared Period	Chemical compounds	Number	Sampling Sites	Sulfide conc.
11 days	None	$n = 5$	東大海洋研・飼育水槽	/
	Na ₂ S	$n = 5$	東大海洋研・飼育水槽	0.07 mg/L
90 days	None	$n = 5$	新江ノ島水族館・飼育水槽	/
	Na ₂ S	$n = 5$	新江ノ島水族館・飼育水槽	0.06 mg/L

*すべての水槽で圧力は1気圧、水温は4℃を維持した

クリル水槽（60 cm×45 cm×45 cm）の水温維持には HC-100 型サーモ・コントローラー（レイシー）を、循環濾過にはエーハイム 2026 循環濾過フィルター（EHEIM）を用いた。硫化ナトリウムの添加は、イワキ EHN-YT 型電磁ポンプ（イワキ）を用いて行った。飼育実験は 11 日間の短期飼育（海水区; 11day SW, 硫化ナトリウム添加区; 11day Na₂S）および 90 日間の長期飼育（海水区; 90day SW, 硫化ナトリウム添加区; 90day Na₂S）の 2 通りの実験を行った。サンプリング時に HACH 水質計を用いて測定した硫化ナトリウム濃度はそれぞれ、短期飼育実験で 0.07 mg/L, 長期飼育実験は 0.06 mg/L であった。サンプリングは各実験区から 5 個体を採取し、2 章に準じて解剖の後、固定を行った。

4-2-2. FISH と共焦点レーザー顕微鏡撮影

FISH の実験手技は第 2 章に、共焦点レーザー顕微鏡を用いた定量画像の撮影および解析方法は、第 3 章にそれぞれ準じた。なお、定量方法については、蛍光強度だけでなく、鰓糸内における蛍光面積の割合からも共生菌群集の増減を検討するため、得られた蛍光シグナルの面積（共生菌の存在する面積; 以降は“蛍光面積率”と称する）を鰓糸の面積で割って算出し、蛍光強度と共に解析に用いた。共生菌の存在量を検討する蛍光画像は 1 個体につき、鰓糸 5 本として撮影を行った。

4-2-3. 統計検定

各実験区で鰓糸の蛍光強度と、共生菌が占有する蛍光面積に各群間で統計的に有意に差があるかを検定するため、表計算ソフト Excel (Microsoft Corp.) のアドインであるエクセル統計 Statcel2 (柳井, 1998) を用いて統計検定を行った。検定には、各データセットの正規性を F 検定により検定した上で、母分散の均一性に依拠しない Welch の t 検定を用いた。同様に、野生と各飼育系列間で共生菌群集の存在量が経時的に変化するかを検討するために、Excel のアドインである StatMate III (高橋, 2000) を用いて、各群間の統計的な差を Cluskal-Wallis の H 検定および Tukey-type の多重比較法により求めた。

4-3. 結果

4-3-1. 異なる環境から採集された野生下の *B. septemdierum* の共生菌群集

#819と#822で採取された *B. septemdierum* を用いて *Bsob692* プローブによる FISH を行った結果、蛍光顕微鏡画像及び共焦点レーザー顕微鏡画像において、鰓糸の両側に並ぶ菌細胞群から、多数の蛍光シグナルが観察できた（図 16A, B, E, F）。DAPI 対比染色からも、宿主核の直上に多数の共生菌由来の蛍光シグナルが分布している様子が確認できた（図 16C, D）。HACH 水質計による計測から、環境中の硫化物濃度が 0.41 mg/L であることがわかった#822の個体には、厚さが 20 μm 以上、幅が 100 μm を超える菌細胞及び鰓糸の発達した個体が散見できた（図 16B）。一方、HACH 水質計で硫化物濃度が検出限界以下であった#819の個体には、#822ほど鰓糸が発達した個体は見受けられず（図 16A）、鰓糸の一部の共生場がモザイク状に抜け落ちている個体も存在した（図 16E）。

4-3-2. 野生下の *B. septemdierum* の共生菌群集の蛍光強度と蛍光面積率及び統計検定結果

共焦点レーザー顕微鏡で撮影した野生下の試料の FISH 画像から得られた鰓糸の蛍光強度と鰓糸内の蛍光面積（共生菌の存在する面積）率の各区の平均値及び標準誤差、更にこれらのデータを基に行った *t* 検定の結果を図 19 に示す。

野生下の#819と#822から得られた蛍光強度はそれぞれ 3001.5 ± 178.2 , 3526.6 ± 224.9 であった（図 19A）。蛍光面積率はそれぞれ、 $20.5 \pm 1.0\%$, $46.2 \pm 1.4\%$ であった（図 19B）。蛍光強度、蛍光面積率どちらの指標を用いても、2群の差は統計的に有意であった（図 19A, B）。従って、硫化物が豊富な環境と硫化物に乏しい環境に生息する個体では、共生菌の存在量に差があることが定量的に示された。

4-3-3. 水槽飼育後の *B. septemdierum* の共生菌群集

11 日間の水槽飼育により、通常海水区及び硫化ナトリウム添加区とも 4-3-1 で示した野生下のものとは明らかに異なる分布パターンとなった（図 17A, B, E, F）。通常海水区の試料では、野生下の試料では鰓糸両側に多数が並び、基底膜上から張り出すように発達していた菌細胞が収縮（野生下；約 10-20 μm , 通常海水区；約 5-10 μm ）し、その形状も、野生下では四角形であったものが、楕円形あるいは円形となっていた（図 17A, E）。また、互いに密に隣接し合っていた菌細胞同士が、収縮あるいは消失によって鰓上皮に分散して分布していた。DAPI 対比染色では宿主核の蛍光シグナル（図 17C）が目立つようになり、共生菌由来の蛍光シグナルと宿主核由来の蛍光シグナルの判別が難しくなっていた。硫化ナトリウム添加区の試料でも、通常海水区ほどではないものの、やはり共生菌の減少を示唆する蛍光シグナルの分布パターンが観察できた。野生下の試料ではほぼ正方形に近い形であった菌細胞が長方形となり、厚みが減少する傾向にあった（厚さ；約 2-3 μm , 長さ；約 4-5 μm ）（図 17B, E）。菌細胞同士は

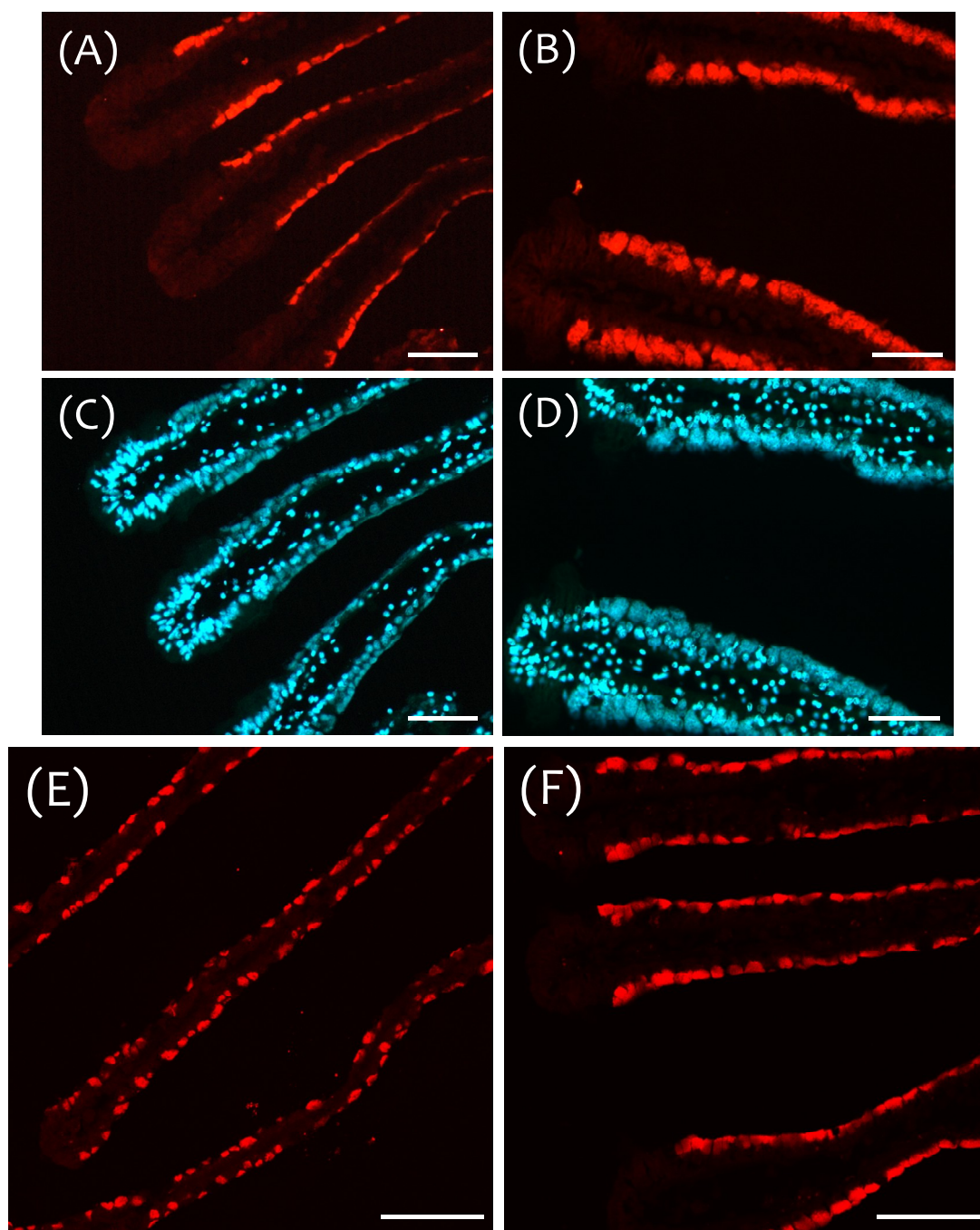


図16. 硫化物濃度の異なる#819“付着板サイト” (左縦列)と#822“たぎり直上” (右縦列)の*B. septemdierum*の鰓糸の各顕微鏡画像。

上・中段; 蛍光顕微鏡画像, 下段; 共焦点レーザー顕微鏡画像。HACH水質計による硫化物濃度は#819が検出不可, #822が0.41 mg/L。 (A)-(B), (E)-(F) Bsob692, (C)-(D) DAPI対比染色。スケールは100 μ m。

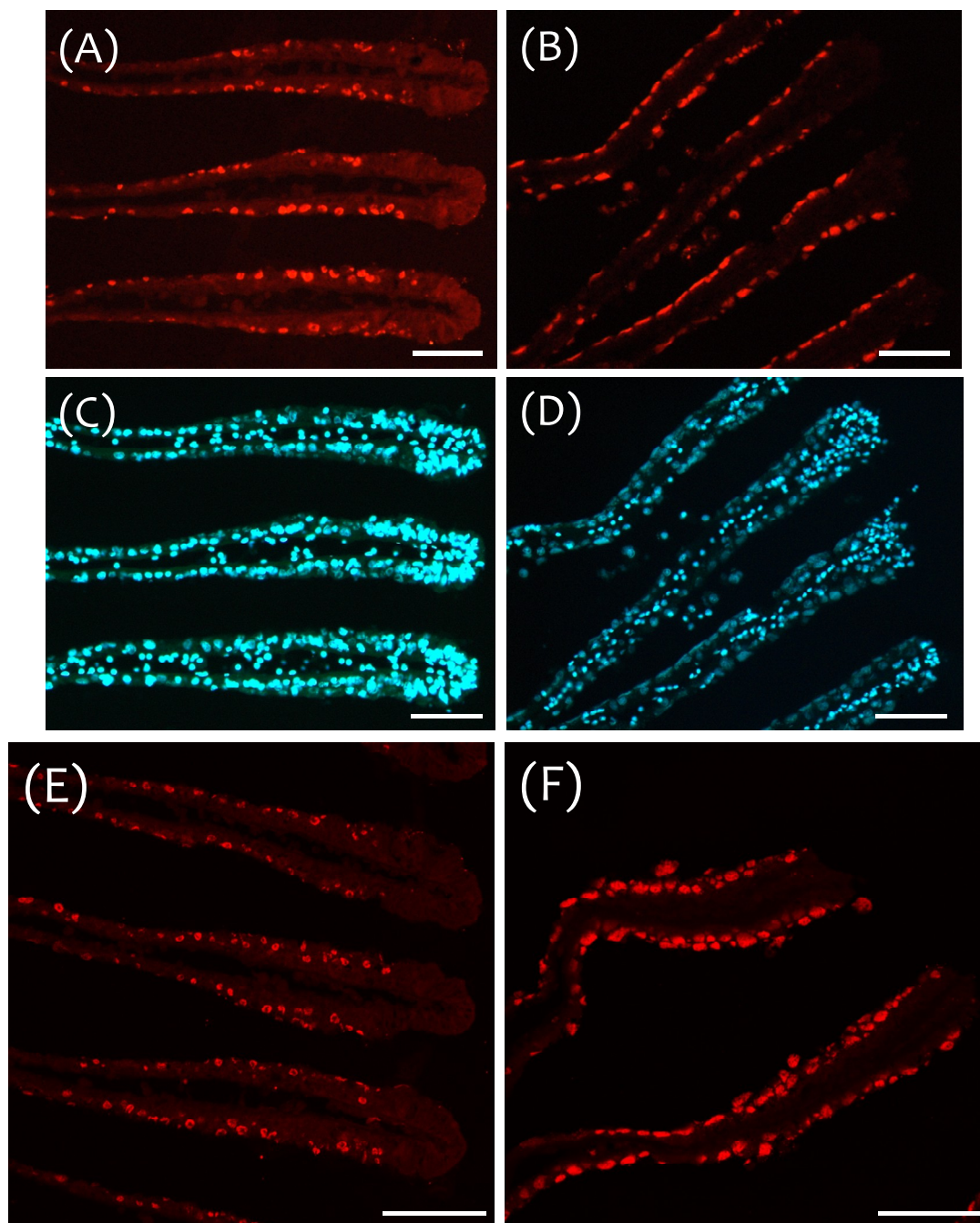


図17. 飼育11日が経過した海水飼育(左縦列)と Na_2S 飼育(右縦列)の*B. septemdierum*の鰓糸の各顕微鏡画像。
上・中段; 蛍光顕微鏡画像, 下段; 共焦点レーザー顕微鏡画像。 Na_2S 添加区の濃度は0.14 mg/L。(A)-(B),
(E)-(F) Bsob692, (C)-(D) DAPI対比染色。スケールは100 μm 。

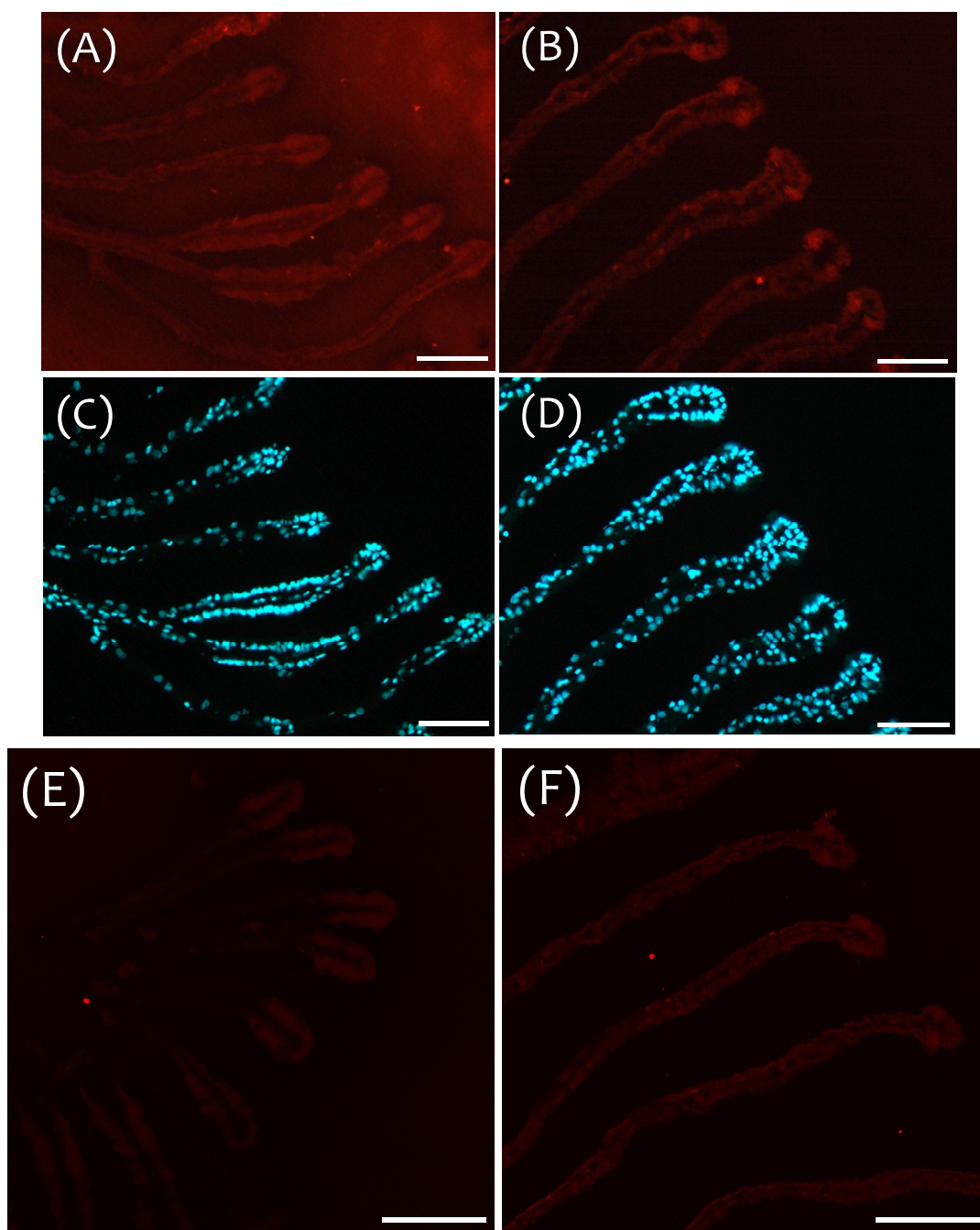


図18. 飼育90日が経過した海水飼育 (左縦列) と Na_2S 飼育 (右縦列) の *B. septemdierum* の鰓糸の各顕微鏡画像。
上・中段; 蛍光顕微鏡画像, 下段; 共焦点レーザー顕微鏡画像。 Na_2S 添加区の濃度は 0.06 mg/L 。 (A)-(B), (E)-(F) *Bsob692*, (C)-(D) DAPI対比染色。スケールは $100 \mu\text{m}$ 。

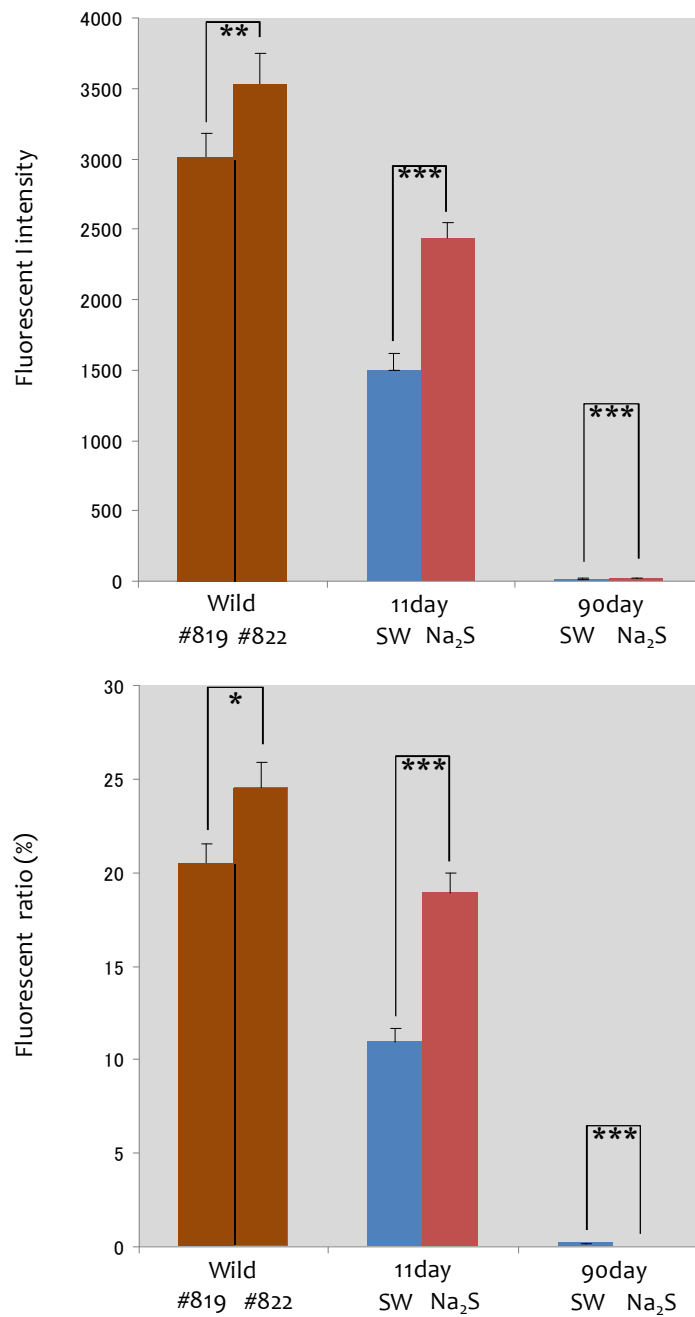


図19. 定量画像から得られた野生下と飼育11日目, 90日目の *B. septemdirum* の鰓系における蛍光強度及び蛍光面積率の平均値と標準誤差の比較, t検定の結果。

(A) 蛍光強度, (B) 蛍光面積率,
標本数はいずれも $n = 25$ ($N = 5$)。

はt検定で有意に差がみられたもの。 $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ を示す。

互いに隣接し合っている部分が多いが、通常海水区同様に菌細胞の収縮及び消失によって菌細胞がモザイク状に並んでいる部分も存在した。DAPI 対比染色では、飼育開始時の試料ほど明瞭ではないが、宿主核直上に共生菌の存在を示す蛍光シグナルが観察できた（図 17D）。

90 日間の長期飼育を行った試料では、蛍光顕微鏡画像及び共焦点レーザー顕微鏡画像において、通常海水区及び硫化ナトリウム添加区の両方で菌細胞群が完全に消失し、鰓糸の状態が野生下及び飼育 11 日目のものとは明らかに異なっていた（図 18A, B, E, F）。共生菌の存在を示唆する蛍光シグナルは、菌細胞が存在するはずの鰓上皮から観察されず、また鰓糸の幅も野生下の試料と比べると極端に細くなって（野生下；約 70-100 μm 以上, 90 日目；通常海水区, 硫化ナトリウム添加区ともに約 20-30 μm ）おり、鰓糸上下端部に存在する繊毛領域（画像には上端あるいは下端側のみ写っている）も含めた鰓糸全体が縮小する傾向にあった。DAPI 対比染色では、*Bsob692* を用いた場合と同様に、共生菌由来の蛍光シグナルは観察できず、宿主核由来の蛍光シグナルが観察できるのみであった（図 18C, D）。

4-3-4. 水槽飼育下の *B. septemdirum* の共生菌群集の蛍光強度と蛍光面積率及び統計検定結果

共焦点レーザー顕微鏡で撮影した 11 日目と 90 日目の水槽飼育下の FISH 画像から得られた鰓糸の蛍光強度と鰓糸内の蛍光面積率の各区の平均値及び標準誤差、更にそれらのデータを基に行った *t* 検定の結果を図 19 に示す。

11 日間の短期飼育では、通常海水区と硫化ナトリウム添加区における蛍光強度がそれぞれ、 1498.7 ± 117.2 , 2442.4 ± 107.4 であった（図 19A）。蛍光面積率がそれぞれ、 $10.9 \pm 0.8\%$, $18.9 \pm 1.1\%$ であった（図 19B）。蛍光強度、蛍光面積率ともに、両区の差は統計的に有意であった。野生下の 2 地点から採集された個体群それぞれでは、#822 と両区は蛍光強度、蛍光面積率ともに統計的に有意であったが、#819 と硫化ナトリウム添加区の蛍光面積率には有意差がなかった（図 19A, B）。また 90 日間の長期飼育後の通常海水区と硫化ナトリウム添加区の蛍光強度はそれぞれ、 9.0 ± 1.5 , 2.9 ± 0.4 であり（図 19A）、蛍光は痕跡程度であることがわかった。蛍光面積率はそれぞれ $0.2 \pm 0.0\%$, 0.0% であった（図 19B）。

4-3-5. 野生個体群と各水槽飼育系列の共生菌群集の変化

野生の個体群のうち、硫化物濃度が用いた個体の本来の生息環境に近いと考えられる #819 群と通常海水での 11 日, 90 日飼育後、同じく #819 群と硫化ナトリウム添加海水での 11 日, 90 日飼育後の蛍光強度および蛍光面積率を比較し、共生菌群集の経時的な存在量変化を検討した。その結果、#819 と通常海水系列（11day, 90day）の 3 群間には、蛍光強度、蛍光面積率双方において統計的に有意差があることがわかった（いずれも $p < 0.001$ ）。同様に、#819 と硫化ナトリウム添加飼育系列（11day, 90day）の 3 群間にも、蛍光強度、蛍光面積率

双方において有意差がみられた (いずれも $p < 0.001$)。従って野生下の試料と比較した場合、硫化物の有無に関わらず、水槽飼育の試料では鰓内の共生菌群集が経時的に減少していくことが蛍光強度、蛍光面積率どちらの指標からも定量的に示された。

4-4. 考察

本章では、本研究で確立した特異的 FISH プローブによる共生菌の検出、共焦点レーザー顕微鏡による撮影技術および画像解析手法を用いて、*B. septemdierum* 共生菌が、環境中の硫化物濃度に応じて、その存在量を大きく変化させることを定量的に示すことに成功した。

環境中の硫化物濃度が互いに異なる野生下の#819 と#822 の蛍光強度と蛍光面積の割合に、統計的な有意差がみられたことから、*B. septemdierum* 共生菌は環境中の硫化物濃度に応じて鰓上皮細胞内に占める存在量が変化するものと考えられ、この知見は共生型は異なるものの、野生下の *B. azoricus* における報告と一致する (Pond et al., 1998; Fiala-Médioni, 2002; Dupperon et al., 2006)。

飼育下の標本では、11 日間の短期飼育実験において、通常海水区の共生菌量は硫化ナトリウム添加区より有意に低いことが示され、やはり共生菌の存在量が環境中の硫化物濃度に応じてその存在量が変化することがわかった。しかし、蛍光強度及び蛍光面積率の値は、通常海水区、硫化ナトリウム添加区ともに、野生下の個体群のうち値の低い#819 群より有意に低い ($p < 0.001$) ことが示されたため、共生菌群集は硫化ナトリウム添加区の個体であっても野生群よりも減少していると推察される。更に、90 日目には通常海水区、硫化ナトリウム添加区とも共生菌の存在を示す蛍光強度、蛍光面積率ともにほぼ痕跡レベルまで減少した。従って、宿主二枚貝は水槽飼育下では本来の共生菌の存在量を維持することが困難であると考えられる。硫化ナトリウムを加えても共生菌が維持できない理由として、i) 共生菌が生息環境中で本来利用している硫黄源 (実際は硫化水素) が異なるため、宿主あるいは共生菌が効率良く硫化ナトリウムを供給 (利用) することができない、あるいは ii) 生息環境とは異なる圧力が宿主に何らかの負荷を与えている、加えて#822 のサイトの硫化物計測値が 0.41 mg/L であったことを考えると、iii) 共生菌群集を維持するには濃度が不足しているという 3 つの理由が考えられる。

第 5 章 総合考察

5-1. 共生化学合成細菌群集の定量化手法としての FISH

FISH は本来, i) 環境中の微生物群集を系統情報を伴った画像として視覚化すること (PCR の視覚化), ii) 得られた画像を基に, 環境中の微生物群集を定量化することを目的として考案された (Amann et al., 1990)。しかし, 宿主組織中に多量の細菌が複雑に重なり合って局在する共生系の微生物の研究では定量的な解析は困難であり, PCR-クローニング・シーケンスで得られた 16S rRNA ファイロタイプの局在を宿主組織中に確認するのみに留まっていた。本研究では, *Bathymodiolus* 属の共生菌に特異的プロンプを設計し, 共焦点レーザー顕微鏡画像と画像解析ソフトを用いて共生菌を定量する手法を確立し, 環境の異なる野生下の個体間, 及び各飼育区の個体間で *B. septemdierum* 共生菌群集の存在量に有意差があることを統計的に示すことができた。同様の試みは, Halary et al. (2008) によって, *B. azoricus* の共生菌群集の定量化について最近報告された。Halary et al. (2008) は特別仕様の解析ソフトを用いて 3 次元画像解析を行っている。一方, 本研究で確立した手法は, 平面画像を用いた解析手法であるが, 通常の共焦点レーザー顕微鏡画像データと一般的な画像解析ソフトで解析を行うことができるため, 今後様々な研究機関で汎用的に実施できると考えられる。

5-2. 単一共生系と二重共生系における共生硫黄酸化細菌群集の環境応答性

硫黄酸化細菌及びメタン酸化細菌と二重共生関係を築く *B. azoricus* では, 硫化ナトリウム添加下で 7 日間飼育した場合, 鰓内の共生硫黄酸化細菌群集は, 菌細胞内の占有体積に換算して 28.5% が減少し (Halary et al., 2008), 同様に 30 日間飼育した場合, 菌細胞内から硫黄酸化細菌がほぼ完全に消失する (Kádár et al., 2005) という。また, 通常海水のみで飼育した *B. septemdierum* の鰓上皮内の共生菌は, TEM 観察の結果, 3 週間程度でほぼ完全に消失するという既報 (Fujiwara et al., 1999) も存在する。本研究では, 飼育 20 日・30 日が経過した試料の採取を行っていないため, どの程度の日数で鰓内の共生菌群集が消失するのか定かではないが, 通常海水で飼育した 11 日目の試料の蛍光強度と蛍光面積率が野生下のものと比べると半分ほどに減少していたことから, 通常海水区では既報と同様に, 20 日程度で消失していた可能性が高い。また野生下 (#819) のものと比較して 11 日飼育の硫化ナトリウム添加区では蛍光面積率の約 20% が減少したこと (図 18A) も併せて考えると, 飼育下の *Bathymodiolus* では, 単一共生種, 二重共生種ともに, 硫化ナトリウムを添加しても, 約 1-2 ヶ月で硫黄酸化細菌を完全に失うと考えられる。

Bathymodiolus の共生系は, 鰓内の共生菌群集の存在量を宿主自身が自在に調節できることから, 周囲の環境変化に即応性と柔軟性のある高度な共生系であると考えられている (Kádár et al., 2005; Duperron et al., 2006; Dubilier et al., 2008)。硫黄酸化細菌と単一共生をする本研究の対象種である *B. septemdierum* で得られた知見と, 既報の二重共生系を持つ *B.*

azoricus の知見を合わせて考えると, *Bathymodiolus* は保持する硫黄酸化細菌群集を環境中の化学成分に応じてその存在量を変化させ, 共生菌群集の減少に合わせて適宜濾過摂食に切り替えながら, 化学成分の供給が不安定で寿命が比較的短い (約数十年から 100 年程度; Van Dover, 2000) 熱水噴出域に適応したのだと考えられる。

5-3. *Bathymodiolus* 属共生系の普遍性

Bathymodiolus 属二枚貝は, 世代ごとに環境中から共生菌を取り込む水平伝播型の共生菌獲得様式を持つことが TEM による鰓組織観察, 共生菌と極めて近縁な自由生活型硫黄酸化細菌の存在, 共生菌のゲノム解析などから示唆されている (Won et al., 2003; Sunamura et al., 2004; DeChaine et al., 2006)。これは濾過食者としてもともと *Bathymodiolus* の祖先種が持っていた機能から派生したものであり, 多様な共生菌の獲得や, また環境中の化学成分に応じた鰓内の共生菌群集の調節に有利であると考えられている (Fiala-Médioni et al., 1986; 2002; Pond et al., 1998; Duperron et al., 2007)。他の生物においても, 共生微生物を水平伝播する種は多く知られている。例えば, 大型ハオリムシ類の一種である *Riftia pachyptila* では, 栄養体に保持する共生硫黄酸化細菌と非常に近縁な 16S rRNA ファイロタイプが環境中から発見されたことから (Nussbaumer et al., 2006), また, 深海のメタン湧出域に生息する *Thyasiridae* 科二枚貝 *Maorithyas hadalis*, 熱水性腹足類 *Alviniconcha* や *Ifremeria* などでは, 菌細胞上に, 共生菌を取り込む構造 (開渠様構造) が存在することから (Endow and Ohta, 1989; Windoffer and Giere, 1997; Fujiwara et al., 2001; Won et al., 2003; Kádár et al., 2005), それぞれ環境中から水平伝播によって共生菌を取り込むと考えられている。環境中から共生菌を取り込む宿主動物群は, 環境中の化学成分に同機して共生菌群集が大幅にその存在量を変える *Bathymodiolus* と類似した共生系を持っている可能性が高く, 特に硫黄酸化細菌に関して得られた *Bathymodiolus* 共生系の知見は, これら宿主動物群の共生系を考える上で, 重要な情報となるだろう。

対照的に, *Bathymodiolus* 属と並んで宿主-共生菌の共生関係について多くの研究報告が存在する化学合成生物群集の主要種である *Calyptogena* 属では, 共生菌の獲得形式は親から子へ, かつては共生体であったとされるミトコンドリアのように母系遺伝をし, 宿主と共進化していることが TEM 観察による組織学的検討及び共生菌のゲノム解析から知られており (Endow and Ohta, 1990; Hurtado et al., 2003), 更に日本近海産の *C. okutanii* が持つ共生硫黄酸化細菌は, 長期間宿主に保持され続けた結果, 宿主核へゲノムの転移を起こしていることが共生菌の全ゲノム解析から示唆されている (Kuwahara et al., 2007)。*Calyptogena* は常圧飼育が困難であるため, その共生系がどのような振る舞いをするか検討された例はないが, 環境中から共生菌を直接取り込まず, その結果として宿主-共生菌間の依存性が高くなっているこのような共生系は, 環境中の化学成分の応答に関しても *Bathymodiolus* の共生系とは大きく異なる可能性が高い。水平伝播式の *Bathymodiolus* の共生系と垂直伝播式の *Calyptogena* の共生系の環境応

答性を比較することで、硫化物が豊富な極限環境への適応戦略の多様性を検討できると考えられる。

5-4. 今後の展望

5-4-1. 共生系研究における FISH の可能性

大型動物の宿主組織中に局在する共生菌を対象とした研究では、一般的にパラフィンあるいはそれに類する包埋剤を用いて、作成したスライドガラス上の組織切片にプローブを滴下して FISH を行うのが一般的である。本研究でも多くの既報と同様に、パラフィン切片を用いた FISH を行った。しかし、*Bathymodiolus* をはじめとする共生二枚貝の組織切片は、i) 鰓糸断面を観察するため、宿主の鰓の中できく限られた部分の共生菌群集の様子しか検討できない、ii) 作成のための手技が煩雑で時間がかかり、熟練が必要とされる、などの点から、多数の標本の観察には向かない。そこで、より簡便に、より広い範囲を解析するための手段として、切片を作成せずに、組織全体を用いた FISH が可能かどうかを予備的に検討してみた。図 20 は *B. septemdiarium* の鰓糸 1 本を、FISH プローブで満たした PCR チューブに入れてハイブリダイズを行った FISH 画像である。宿主二枚貝の鰓表面から、菌細胞の輪郭を伴った共生菌由来の蛍光シグナルが多数観察でき (図 20A)、DAPI 対比染色では、共生菌由来の蛍光シグナルに加え、鰓糸表面に存在する突起状構造なども観察できた (図 20B)。i) 特に多くの菌細胞を顕微鏡視野に収められる情報量の多さ、ii) 切片作成を行わず FISH ができる手技の簡便さから、この全鰓糸を用いた FISH は定量解析の強力な手段となると考えられる。類似の手法による研究報告が皆無であることから、共生菌群集の定量解析において画期的な新しい研究手法として提案したい。共焦点レーザー顕微鏡を用いた平面画像からの定量は勿論 (図 20C)、3 次元画像を構築することによって、より正確な定量化が実現する可能性も秘めている。

5-4-2. 検討すべき対象生物種

本研究により、共生硫黄酸化細菌との単一共生系の環境硫化物に対する応答が明らかとなり、既報では二重共生の動態が理解されつつある (Kádár et al., 2005; Riou et al., 2008; Halary et al., 2008)。しかし、もう一方の単一共生であるメタン酸化細菌が環境中の化学成分の有無に関して、どのようにその存在量を変化させるのか、メタン酸化細菌を単独で保持する種で検討した既報は存在しない。通常海水で 30 日飼育した *B. azoricus* では、硫黄酸化細菌と同様に 30 日後にはほぼ完全に鰓上皮内からメタン酸化細菌が消失する (Kádár et al., 2005) ことから、やはり硫黄酸化細菌共生系と類似した振る舞いをみせる可能性が高い。メタン酸化細菌を単一共生させる *B. platifrons* や *B. japonicus* などを対象として同様の実験を行うことにより、*Bathymodiolus* 属全体の環境適応、生理・生態、進化史に関する新たな知見が得られることが期待される。なお、ザイール海溝近傍のメタン湧水域に生息する二重共生系を持つ *Bathymodiolus* sp. Gabon Margin の鰓内の共生菌群集は、各採集サイトのメタン

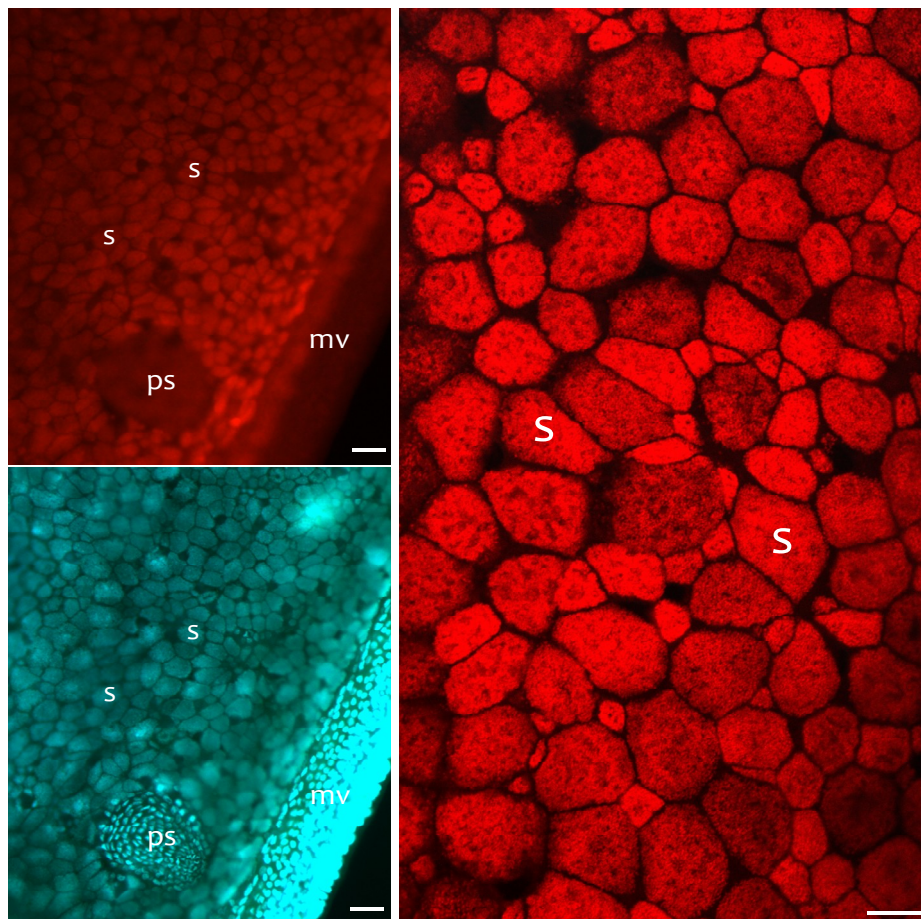


図20. *B. septemdirum*の1本の鰓糸全体を用いた
Bsob692によるFISHの各顕微鏡画像。

(A) Cy3標識Bsob692を用いた鰓糸の表面を捉えた蛍光顕微鏡画像。スケールは20 μm。
(B) DAPI対比染色。(C) 鰓糸の表面を共焦点レーザー顕微鏡を用いて高倍率で撮影したもの。
スケールは10 μm。s; 共生菌(共生菌が局在する菌細胞の輪郭), ps; 突起状構造, mv; 繊
毛領域。試料は野生下(#822)の個体。

と硫化物の
存在量に関
わらず、常
にその存在
量と鰓内で
の分布様式
が一定
(Duperron
et al.,
2005) とい
う報告もあ
ることから、
熱水域とメ
タン湧出域
の二重共生
系は、根本
的にその環
境応答性が
異なる可能
性もあり、メ
タン湧出域
の二重共生
種について

の検討も今後必要である。

また *Bathymodiolus* 以外では, *Idas* や *Adipicola* などの共生イガイ科二枚貝で得られる知見が, 熱水域及びメタン湧出域に特化した *Bathymodiolus* の進化史(適応史)に重要な示唆をもたらし, 更に *Bathymodiolus* とは全く異なる共生系を持つ先述の *Calyplogena* との対比は, 化学合成環境への適応戦略としての共生系の多様性を鑑みるための必須項目である。化学合成微生物との共生系の進化や, 熱水域やメタン湧水域への適応史を理解するためには, 汎世界的に分布し, 様々なタイプの共生系を持ち, かつ飼育実験の容易な *Bathymodiolus* 属は優れた研究モデルである *Bathymodiolus* 属を中心に得られた研究の知見を集積し, それらを基に化学合成共生系を持つ多くの無脊椎動物種(二枚貝類, チューブワーム類, 腹足類, 甲殻類など) 同士で比較研究を行うことは効果的な研究戦略であろう。様々な生物の共生系から得られた知見と, *Bathymodiolus* 共生系の知見を比較して, 各々の共通点や相違点を明らかにしていくことが, 化学合成生物群集の理解において今まで以上に重要となるだろう。

謝辞

本研究は多くの人々の協力のもと、修士論文にまとめることができた。

指導教員である東京大学海洋研究所・海洋科学国際共同研究センターの井上広滋准教授には、研究全体の進捗や方向性、修士論文作成に際して、始終貴重な助言と示唆を頂いた。また、海洋生態系動態部門・底生生物分野の小島茂明教授には、副査として貴重なご助言を多く頂くとともに、居室スペースを提供して頂いた。東京大学海洋研究所・海洋科学国際共同研究センターの博士課程2年・小糸智子氏には、シンカイヒバリガイ試料の固定、PCR・クローニング・シーケンスなど、試料、実験技術ともに本研究の基礎となる多くの部分を提供して頂いた。深く感謝致します。

東京大学海洋研究所・海洋生命科学部門・生理学分野の兵藤晋准教授、博士課程1年の山口陽子氏には、共焦点レーザー顕微鏡の使用を快く承諾して下さると同時に、撮影や画像定量の手法に関して、多くの助言を頂いた。海洋生態系動態部門・微生物分野の木暮一啓教授には、顕微鏡の使用を許可頂き、同博士課程3年・多田雄哉氏には、FISHの実験手技を教授して頂くとともに画像解析ソフトを用いた定量解析に関して、貴重な示唆に富んだ多くの助言を頂いた。先端海洋システム研究センター・海洋システム解析分野の窪川かおる教授はハイブリオープン等の器具の使用を快く承諾して下さり、博士課程2年・丹藤由希子氏、修士課程2年・稲葉真由美氏には、パラフィンを用いた組織切片作成をご教授頂いた。惜しみない協力を頂いた以上の方々に、謝意を表します。

新江ノ島水族館の根本卓氏、北田貢氏には二枚貝の水槽飼育にご協力頂き、また試料を提供して頂いた。東京家政学院大学家政学部の沼波秀樹助教授にはキヌタレガイ試料を提供して頂いた。この文面を借りて、改めて謝意を表します。

海洋研究開発機構（JAMSTEC）の藤原義弘博士、河戸勝博士、産業技術総合研究所の鈴木庸平博士には、共生系研究に適したFISHプロトコルに関し、文献提供など貴重な示唆を頂いた。特に藤原義弘博士には、未公表データの掲載に関して多くの便宜を図って頂くと同時に、化学合成共生系研究の最前線、貴重な研究成果、研究の魅力について様々な示唆・助言を頂いた。また、海洋研究開発機構の桑原宏和博士、渡部裕美博士には、未公表の研究成果の一部を引用する許可を頂いた。本来は外部の人間である私に、惜しみない協力をして頂いた化学合成共生系研究の最前線に身を置く以上の方々に、厚く御礼申し上げます。

また以上の方々に加え、東京大学海洋研究所の様々な方々に、2年間を通して様々な形で御指導、御鞭撻を頂いた。深く感謝致します。

最後に、研究で関わった以上の方々、2年間を支えて下さった友人・知人、家族、そして東京大学海洋研究所という素晴らしい研究活動の場に、深甚の謝意を表します。

引用文献

- Amann, R., I., Binder, B., J., Olson, R., J., Chisholm, S., W., Devereux, R. and Stahl, D., A. (1990): Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1919-1925.
- Blazejak, A., Erseus, C., Amann, R. and Dubilier, N. (2005): Coexistence of bacterial sulfide oxidizers, sulfate reducers, and spirochetes in a gutless worm (Oligochaeta) from the Peru margin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 1553-1561.
- Borowski, C., Giere, O., Krieger, J., Amann, R. and Dubilier, N. (2002): New aspects of the symbiosis in the provannid snail *Ifremeria nautilei* from the North Fiji Back Arc Basin. *Cah. Biol. Mar.*, 43: 321-324.
- Conway, N., M., Howes B., L., Capuzzo, J., E., M., Turner, R., D. and Cavanaugh, C., M. (1992): Characterization and site description of *Solemya borealis* (Bivalvia: Solemyidae), another bivalve-bacteria symbiosis. *Marine Biology*, 112: 601-613.
- DeChaine, E., G., Bates, A., E., Shank, T., M. and Cavanaugh, C., M. (2006): Off-axis symbiosis found: characterization and biogeography of bacterial symbionts of *Bathymodiolus* mussels from Lost City hydrothermal vents. *Environ. Microbiol.*, 8: 1902-1912.
- Distel, D., L., Felbeck, H. and Cavanaugh, C., M. (1994): Evidence for phylogenetic congruence among sulfur-oxidizing chemoautotrophic bacterial endosymbionts and their bivalve hosts. *J. Mol. Evol.*, 38: 533-542.
- Dubilier, N., Bergin, C. and Lott, C. (2008): Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nature Reviews*, 6: 725-740.
- Duperron, S., Nadalig, T., Caprais, J., C., Sibuet, M., Fiala-Médioni, A., Amann, R., and Dubilier, N. (2005): Dual symbiosis in a *Bathymodiolus* mussel from a methane seep on the Gabon continental margin (South East Atlantic): 16S rRNA phylogeny and distribution of the symbionts in the gills. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 1694-1700.
- Duperron, S., Bergin, C., Zielinski, F., Blazejak, A., Pernthaler, A., McKiness, Z., P., DeChaine, E., Cavanaugh C., M. and Dubilier, N. (2006): A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia: Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environ. Microbiol.*, 8: 1441-1447.
- Duperron, S., Sibuet, M., MacGregor, J., B., Kuypers, M., M., M., Fisher, R., C. and

- Dubilier, N. (2007): Diversity, relative abundance and metabolic potential of bacterial endosymbionts in three *Bathymodiolus* mussel species from cold seeps in the Gulf of Mexico. *Environ. Microbiol.*, 9: 1423-1438.
- Duperron, S., Halary, S., Lorion, J., Sibuet, M. and Gaill, F. (2008): Unexpected co-occurrence of six bacterial symbionts in the gills of the cold seep mussel *Idas* sp. (Bivalvia: Mytilidae). *Environ. Microbiol.*, 10: 433-445.
- Endow, K. and Ohta, S. (1989): The symbiotic relationship between bacteria and a mesogastropod snail, *Alviniconcha hessleri*, collected from the hydrothermal vents of the Mariana Back-Arc Basin. *Nihon Biseibutsu Seitai Gakkaiho*, 3: 73-82.
- Endow, K. and Ohta, S. (1990): Occurrence of bacteria in the primary oocytes of vesicomid clam *Calyptogena soyoe*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 64: 309-311.
- Fiala-Médioni, A., Métivier C., Herry, A. and Le Pennec, M. (1986): Ultrastructure of the gill of the hydrothermal-vent mytilid *Bathymodiolus* sp. *Marine Biology*, 92: 65-72.
- Fiala-Médioni, A., McKiness, Z., P., Dando, P., Boulegue, J., Mariotti, A., Alayse-Danet A., M., Robinson, J., J. and Cavanaugh, C., M. (2002): Ultrastructural, biochemical, and immunological characterization of two populations of the mytilid mussel *Bathymodiolus azoricus* from the Mid-Atlantic Ridge: evidence for a dual symbiosis. *Marine Biology*, 141: 1035-1043.
- 藤倉克則・奥谷喬司・丸山正 (2008): 潜水調査船が観た深海生物 深海生物研究の現在. 東海大学出版, 神奈川, 487pp.
- Fujiwara, Y., Uematsu, K., Tsuchida, S., Yamamoto, T., Hashimoto, J., Fujikura, K., Horii, Y. and Yuasa, M. (1999): Nutritional biology of a deep-sea mussel from hydrothermal vents at the Myojin Knoll Caldera. *JAMSTEC J.*, 14: 237-244.
- Fujiwara, Y., Takai, K., Uematsu, K., Tsuchida, S., Hunt, J., C., and Hashimoto, J. (2000): Phylogenetic characterization of endosymbionts in three hydrothermal vent mussels: influence on host distribution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 208: 147-155.
- Fujiwara, Y., Kato, C., Masui, N., Fujikura, K. and Kojima, S. (2001): Dual symbiosis in the cold-seep thyasirid clam *Maorithyas hadalis* from the hadal zone in the Japan Trench, western Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 214: 151-159.
- Halary, S., Riou, V., Gaill, F., Boudier, T. and Duperron, S. (2008): 3D FISH for the quantification of methane- and sulphur-oxidizing endosymbionts in bacteriocytes of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *ISME J.*, 2: 284-292.
- Heinz, E., Kolarov, I., Kästner, C., Toenshoff, E., R., Wagner, M. and Horn, M. (2007): An *Acanthamoeba* sp. containing two phylogenetically different bacterial

- endosymbionts. *Environ. Microbiol.*, 9: 1604-1609.
- Hurtado, L., A., Mateos, M., Lutz, R., A. and Vrijenhoek, R., C. (2003): Coupling of bacterial endosymbiont and host mitochondrial genomes in the hydrothermal vent clam *Calymene magnifica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 2058-2064.
- Kádár, E., Bettencourt, R., Costa, V., Santos, R., S., Lobo-da-Cunha, A. and Dando P. (2005): Experimentally induced endosymbiont loss and re-acquirement in the hydrothermal vent bivalve *Bathymodiolus azoricus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 318: 99-110.
- Kádár, E., Davis, S., A. and Lobo-da-Cunha, A. (2007): Cytoenzymatic investigation of intracellular digestion in the symbiont-bearing hydrothermal bivalve *Bathymodiolus azoricus*. *Marine Biology*, 153: 995-1004.
- Kuwahara, H., Yoshida, T., Takaki, Y., Shimamura, S., Nishi, S., Harada, M., Matsuyama, K., Uematsu, K., Fujiwara, Y., Sato, T., Kato, C., Kitagawa, M., Kato, I. and Maruyama, T. (2007): Reduced Genome of the Thioautotrophic Intracellular Symbiont in a Deep-Sea Clam, *Calymene Okutanii*. *Current Biology*, 17: 881-886.
- Lane, D., J. (1991): 16S/23S sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Chichester: 115-175.
- Macalady, J., L., Lyon, E., H., Koffman, B., Albertson, L., K., Meyer, K., Galdenzi, S. and Mariani, S. (2006): Dominant Microbial Populations in Limestone-Corroding Stream Biofilms, Frasassi Cave System, Italy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 5596-5609.
- Manz, W., R. Amann, W., Ludwig, M., Wagner and K.-H., Schleifer. (1992): Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.*, 15: 593-600.
- Nussbaumer, A., D., Fisher, C., R. and Bright, M. (2006): Horizontal endosymbiont transmission in hydrothermal vent tubeworms. *Nature*, 441: 345-348.
- Pond, D., W., Bell, M., V., Dixon, D., R., Fallick, A., E., Segonzac, M. and Sargent J., R. (1998): Stable-carbon-isotope composition of fatty acids in hydrothermal vent mussels containing methanotrophic and thiotrophic bacterial endosymbionts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 370-375.
- Riou, V., Halary, S., Duperron, S., Bouillon, S., Elskens, M., Bettencourt, R., Santos, R., S., DeHairs, F. and Colaco, A. (2008): Influence of chemosynthetic substrates availability on symbiont densities, carbon assimilation and transfer in the dual symbiotic vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Biogeosci. Discuss*, 5: 2279-2304.

- Sunamura, M., Higashi, Y., Miyako, C., Ishibashi, J. and Maruyama, A. (2004): Two *Bacteria* phylotypes are predominant in the Suiyo Seamount hydrothermal plume. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 1190-1198.
- Suzuki, Y., Sasaki, T., Suzuki, M., Nogi, Y., Miwa, T., Takai, K., Nealson K., H. and Horikoshi, K. (2005): Novel chemoautotrophic endosymbiosis between a member of the *Epsilonproteobacteria* and the hydrothermal-vent gastropod *Alviniconcha* aff. *hessleri* (Gastropoda: Provannidae) from the Indian Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 5440-5450.
- Suzuki, Y., S., Kojima, H., Watanabe, M., Suzuki, S., Tsuchida, T., Nunoura, H., Hirayama, K., Takai, K., H., Nealson and K., Horikoshi (2006): Single host and symbiont lineages of hydrothermal-vent gastropods *Ifremeria nautilei* (Provannidae): biogeography and evolution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 315: 167-175.
- Siyambalapitiya, N. and Blackall, L., L. (2004): Discrepancies in the widely applied GAM42a fluorescence in situ hybridisation probe for *Gammaproteobacteria*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 242: 367-373.
- 高橋泰生 (2000): StatMate III 統計リファレンス. アトムス, 東京, 255pp.
- Tokuda, G., Yamada, A., Nakano, K., Arita, N., O. and Yamasaki, H. (2008): Colonization of *Sulfurovum* sp. on the gill surfaces of *Alvinocaris longirostris*, a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Marine Ecology*, 29: 1-9.
- von Dohlen, C., D., Kohler, S., Alsop, S., T. and McManus, W., R. (2001): Mealybug β -proteobacterial endosymbionts contain γ -proteobacterial symbionts. *Nature*, 412: 433-435.
- Van Dover, C. L. (2000): The Ecology of Deep-Sea Hydrothermal Vents. Princeton Univ. Press, New Jersey.
- Windoffer, R. and Giere, O. (1997): Symbiosis of the hydrothermal vent gastropod *Ifremeria nautilei* (Provaninidae) with endobacteria-structural analyses and ecological considerations. *Biol., Bull. (Woods Hole)*, 193: 381-392.
- Won, Y.-J., Hallam, J., S., O'Mullan, D., G., Pan, L., I., Buck, R., K. and Vrijenhoek, C., R. (2003): Environmental acquisition of thiotrophic endosymbionts by deep-sea mussels of the genus *Bathymodiolus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 6785-6792.
- 柳井久江 (1998): 4 Steps エクセル統計 Statcel2. オーエムエス出版, 東京, 270pp.