

論文内容の要旨

論文題目 深海性イガイ類の硫化水素無毒化機構における

タウリン輸送体の役割

(The role of taurine transporter in detoxification of hydrogen sulfide in deep-sea mussels)

氏名 小糸 智子

深海の熱水噴出域や冷水湧出域には、高濃度の硫化水素が存在することが知られている。硫化水素は生物にとって有害であるにも関わらず、これらの場所には高密度の生物群集が存在しており、化学合成生態系と呼ばれる生態系を構成している。この生態系では、硫黄酸化細菌やメタン酸化細菌などの化学合成細菌を一次生産者とし、大型の無脊椎動物はそれらを摂食する、あるいは体内に共生菌として取り込むことによって体内で有機物を合成させることが知られている。

近年、この生態系を構成している無脊椎動物の体内に、高濃度のチオタウリンやヒポタウリンが蓄積されていることが報告されてきた。これらは、構造内に硫黄原子を持つアミノ酸であり、無毒な物質である。また、チオタウリンはヒポタウリンと硫化物の反応により生成することが知られている。これらのことから、環境中の硫化水素を体内のヒポタウリンと反応させ、チオタウリンを合成することにより無毒化し、さらに体内に共生する硫黄酸化細菌へと供給している可能性が示唆されてきた。しかしながら、これらのアミノ酸がどこで作られているのかを含め、チオタウリンやヒポタウリンの機能の詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、タウリン輸送体(TAUT)というタンパク質に着目した。

TAUT はチオタウリンやヒポタウリン、タウリンを細胞外から細胞内へ取り込む際に、細胞膜上を通過させる機能を担う膜タンパク質である。本研究では、世界各地の熱水噴出域やメタン湧出域に広く生息する深海性イガイ類であるシンカイヒバリガイ類を用いて、まず(1)シンカイヒバリガイ類 TAUT の構造推定を行ない、得られた結果をもとに(2)硫化物に対する TAUT 遺伝子発現の応答性の解析を行ないその機能を明らかにした。また、(3)分

子進化に関する解析を行なうことにより、シンカイヒバリガイ類の TAUT がどのような進化を遂げたのかを明らかにした。さらにシンカイヒバリガイ類の TAUT と浅海の無脊椎動物の TAUT の機能上の相同性を明らかにするため、(4)環境浸透圧変化に対する TAUT の応答を調べた。これらを総合的に考察し、シンカイヒバリガイ類が熱水噴出域やメタン湧出域への進出の過程において TAUT の機能がどのように進化してきたのかを明らかにすることを試みた。

1.シンカイヒバリガイ類 TAUT の構造推定

シンカイヒバリガイ類 TAUT の構造については明らかにされた例がない。そこで本研究では、伊豆・小笠原海域明神海丘の熱水噴出域に生息するシチヨウシンカイヒバリガイと相模湾初島沖のメタン湧出域に生息するヘイトウシンカイヒバリガイを用いて、TAUTcDNA の単離を試みた。得られた cDNA の塩基配列の解読を行ない、アミノ酸配列を推定した。その結果、2 種の変異箇所は 4 箇所であり、相同性は 98% であった。得られたアミノ酸配列の膜貫通部位を推定したところ、両者に 12 箇所の膜貫通部位が認められた。TAUT が属するアミノ酸輸送体ファミリー(SLC6 ファミリー)が 12 回膜貫通型であること、既に配列が明らかにされている生物の TAUT との相同性より、得られた cDNA がコードするタンパク質はシンカイヒバリガイ類の TAUT であることが確認された。

2.硫化物に対する TAUT 遺伝子発現の応答性

シンカイヒバリガイ類 TAUT が硫化物に対してどのように応答するのかを明らかにするため、硫化物の有無に対する TAUT 遺伝子の発現の応答性を調べた。

得られたシンカイヒバリガイ類 TAUTcDNA の配列をもとに、TaqMan プローブおよびプライマーを設計し、リアルタイム PCR の定量法を確立した。

硫化物を添加・非添加条件でヘイトウシンカイヒバリガイ、シチヨウシンカイヒバリガイをそれぞれ飼育し、鰓の TAUTmRNA 量をリアルタイム PCR により定量したところ、前者は長期間硫化物に曝露すると TAUT mRNA が有意に増加することが明らかとなった。後者には、硫化物添加による応答が見られず、発現量はほぼ一定であった。さらに、両者の種間比較を行なったところ、天然の生息場所から採集したヘイトウシンカイヒバリガイの TAUT mRNA 量は、シチヨウシンカイヒバリガイの 50%程度であるが、長期間の硫化物曝露飼育により、その発現量がシチヨウシンカイヒバリガイとほぼ同程度まで増加することが明らかとなった。

長期間硫化物の供給を断つため、現場での移植実験を行なった。相模湾においてヘイトウシンカイヒバリガイを採集し、その一部をナイロン製のケージに入れ、硫化水素のない場所に設置し、約 10 カ月放置した。明神海丘においても同様に、シチヨウシンカイヒバリガイをケージに入れ、1 年間硫化水素の影響がない場所に設置し

た。ケージ回収後、リアルタイム PCR で TAUT mRNA を定量したところ、ヘイトウシンカイヒバリガイの移植個体群では採集直後の個体群と発現量に差がなかった。一方、シチヨウシンカイヒバリガイの移植個体群は採集直後の個体群に比べ、有意に発現量が減少していた。

これらの結果より、ヘイトウシンカイヒバリガイは通常低いレベルで TAUT mRNA が発現しているが、高濃度の硫化物に長期曝露されると、発現量が増加することが明らかとなった。また、シチヨウシンカイヒバリガイは常に高いレベルで TAUT mRNA が発現しているが、長期間硫化物の供給がない環境では、その発現量が減少することが明らかとなった。すなわち、シンカイヒバリガイ類の TAUT 遺伝子の発現量は、環境の硫化物濃度に応答し、天然の生息環境における mRNA 量の差は、多量な硫化水素が含まれる熱水噴出域と低濃度の硫化水素が湧出するメタン湧出域という、生息環境の違いを反映しているものと考えられる。

なお、ヘイトウシンカイヒバリガイにはメタン酸化細菌が共生しており、硫黄を必要としないにも関わらず TAUT mRNA の発現誘導が生じたことから、チオタウリンの基本的な機能は、共生菌への硫化物の供給よりも、硫化物の無毒化であることが示唆された。

3. シンカイヒバリガイ類 TAUT の分子進化

シンカイヒバリガイ類 TAUT が、どのような進化を遂げてきたのか、また、TAUT が属する SLC6 ファミリーにおいてどこに位置づけられるのかを明らかにするため、分子系統解析を行なった。

ヒトで知られている全ての SLC6 ファミリー 20 種と、シンカイヒバリガイ類 TAUT と相同性の見られた生物の SLC6 ファミリーの配列を用いて、近隣結合法およびベイズ法による系統解析を行なった。その結果、シンカイヒバリガイ類 TAUT は浅海の二枚貝類と近縁であった。二枚貝類の TAUT と脊椎動物 TAUT とは異なるクレードを形成したが、共通の祖先に由来する TAUT であることが明らかとなった。

以上の結果より、シンカイヒバリガイ類 TAUT は、脊椎動物と共通の祖先型 TAUT から派生した二枚貝類 TAUT に由来するものであり、熱水噴出域やメタン湧出域への進出の過程で、特に大きな遺伝子の改変を行なっていないことが明らかとなった。

4. 環境浸透圧に対するシンカイヒバリガイ類 TAUT の応答

分子系統解析から、シンカイヒバリガイ類 TAUT が浅海の二枚貝類と同じ機能をもつ可能性が示唆された。浅海の無脊椎動物では、高浸透圧環境においてオスモライトとしてアミノ酸を細胞内へ取り込み、低浸透圧環境ではオスモライトを細胞外へ放出することによって細胞容積を保つことが知られている。タウリンも主要オスモライトであり、浅海の無脊椎動物では環境浸透圧変化に対して TAUT が応答すると

いう報告がなされている。そこで、シンカイヒバリガイ類 TAUT が環境浸透圧に応答するのかを調べた。

シチヨウシンカイヒバリガイを、高浸透圧(塩分 3.7%)、低浸透圧(塩分 2.2%)海水に浸漬し、6、12、24 時間で解剖を行なった。リアルタイム PCR によって TAUT mRNA を定量したところ、高浸透圧では経時的に TAUT mRNA が増加していた。このことから、浸透圧調節のために細胞内へタウリンを蓄積させていることが考えられる。低浸透圧では、TAUT mRNA の経時的な増減は見られなかった。オスモライトの排出は TAUT を介さないことが報告されていることから、TAUT が応答しなかったものと考えられる。

以上の結果より、シンカイヒバリガイ類 TAUT が、浅海の無脊椎動物と同様に環境浸透圧変化に対して TAUT を応答させることが明らかとなった。すなわち、機能の面でも浅海の二枚貝類の TAUT 遺伝子の性質をそのまま保持していることがわかった。

シンカイヒバリガイ類は浅海から深海の熱水噴出域やメタン湧出域に進出したと考えられている。本研究では、シンカイヒバリガイ類が、チオタウリンを用いることで環境中の硫化水素を無毒化し、そのために TAUT 遺伝子の発現を調節することを明らかにした。そしてその際用いる TAUT は、浅海に生息していたときから持っている TAUT を、その構造だけでなく機能も保持したまま用いていることが示唆された。したがって、シンカイヒバリガイ類は熱水噴出域やメタン湧出域において硫化水素を無毒化するために、新しいメカニズムを発達させるのではなく、浸透圧調節のために進化させてきたメカニズムを応用して適応できるようになったと考えられる。化学合成生態系を構成する生物は大半が甲殻類や多毛類などの無脊椎動物であり、浅海の近縁種はタウリンを多量に蓄積させていることが知られている。それらの生物は TAUT によってタウリンやヒポタウリンなどを細胞内へ蓄積させることができたために容易に深海へ進出できたのかもしれない。