

明神海丘シチヨウシンカイヒバリガイの 栄養摂取方法の検討

藤原 義弘*¹ 植松 勝之*² 土田 真二*¹ 山本 智子*³
橋本 惇*¹ 藤倉 克則*¹ 堀井 善弘*⁴ 湯浅 真人*⁵

明神海丘の熱水噴出域で採集したシチヨウシンカイヒバリガイ *Bathymodiolus septemdierum* の栄養摂取方法を明らかにするため、この二枚貝の鰓上皮細胞を電子顕微鏡観察し、無数の細菌を検出した。細菌の形態、細胞内分布様式、宿主動物の生息環境から、この細菌は硫黄細菌であり、他のシンカイヒバリガイ類と同様に共生関係を営んでいると推定した。また、このシンカイヒバリガイを硫化物無添加下で8ヶ月間飼育し、その鰓細胞を電子顕微鏡観察したところ、鰓上皮細胞から細菌が消失していた。シンカイヒバリガイ類は濾過摂食を行うとする知見を考え併せると、シチヨウシンカイヒバリガイも共生細菌由来の栄養摂取以外に濾過摂食を行う可能性が高い。シチヨウシンカイヒバリガイが他の細胞内共生細菌保有種よりも広く伊豆・小笠原弧火山フロントに分布しているのは、2通りの栄養摂取が可能であることに依存しているのかもしれない。

キーワード：シチヨウシンカイヒバリガイ、共生細菌、濾過摂食、明神海丘、熱水噴出孔

Nutritional biology of a deep-sea mussel from hydrothermal vents at the Myojin Knoll Caldera

Yoshihiro FUJIWARA*⁶ Katsuyuki UEMATSU*⁷
Shinji TSUCHIDA*⁶ Tomoko YAMAMOTO*⁸ Jun HASHIMOTO*⁶
Katsunori FUJIKURA*⁶ Yoshihiro HORII*⁹ Makoto YUASA*¹⁰

A deep-sea mussel *Bathymodiolus septemdierum* was collected from a hydrothermal vent site at the Myojin Knoll Caldera. We observed its gill filaments by transmission electron microscopy and found numerous bacteria in the epithelial cells. Morphology of the bacteria and the bacteriocytes, along with the environment of the mussel bed indicate that the symbionts are chemoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria and the mussel is nourished by them like other deep-sea mussels. We also examined a gill of one mussel which was maintained for 8 months without sulfide, and found

* 1 海洋科学技術センター海洋生態・環境研究部

* 2 マリンワークジャパン

* 3 海洋科学技術センター深海研究部（現：鹿児島大学水産学部）

* 4 東京都水産試験場八丈分場

* 5 地質調査所海洋地質部

* 6 Marine Ecosystems Research Department, Japan Marine Science and Technology Center

* 7 Marine Work Japan co.

* 8 Deep Sea Research Department, Japan Marine Science and Technology Center (present location; Faculty of Fisheries, Kagoshima University)

* 9 Hachijo Branch, Tokyo Metropolitan Fisheries Experiment Station

* 10 Marine Geology Department, Geological Survey of Japan

no symbionts in the epithelial cells. This supports the hypothesis that *B. septemdiarium* can also filter-feed and thus thrive over a wider area than other endosymbiont-harboring species along the volcanic front of the Izu-Ogasawara arc.

Keywords : *Bathymodiolus septemdiarium*, symbiotic bacteria, filter-feeding, Myojin Knoll Caldera, hydrothermal vent.

1. はじめに

シンカイヒバリガイ類は熱水噴出域や冷水湧出域に生息する化学合成生物群集の構成種であり、シロウリガイ類、ハオリムシ類と共に体内に共生細菌を持つことが知られている (Fisher, 1990)。

シンカイヒバリガイ類の栄養摂取方法は多様で、ガラバゴス沖や東太平洋海嶺の熱水噴出域に生息するガラバゴスシンカイヒバリガイ (新称) *Bathymodiolus thermophilus* は共生細菌として硫黄細菌を持つことが知られている (Fisher *et al.*, 1987; Fisher *et al.*, 1988)。一方、メキシコ湾に生息する未記載の "seep mytilid Ia" はメタン酸化細菌を共生させていることが知られており、同じくメキシコ湾に生息する未記載の "seep mytilid II" や大西洋中央海嶺に生息する未記載のイガイ科二枚貝は硫黄細菌とメタン酸化細菌の両方を共生細菌として持つことが報告されている (Cavanaugh *et al.*, 1987; Fisher *et al.*, 1987; Childless *et al.*, 1986; Brooks *et al.*, 1987; Fisher *et al.*, 1993; Distel *et al.*, 1995)。また、ガラバゴスシンカイヒバリガイと "seep Mytilid Ia" は共生細菌に依存した栄養摂取の他に、濾過摂食を行うことが明らかになっている (Page *et al.*, 1990; Page *et al.*, 1991)。更に、東太平洋海嶺より採集したシンカイヒバリガイ類は海水中に溶解している有機物を取り込む能力を有することが知られている (Fiala-Médioni *et al.*, 1986)。

シチヨウシンカイヒバリガイ *Bathymodiolus septemdiarium* は水曜海山熱水噴出域より記載されたイガイ科二枚貝であり、水曜海山にも生息することが知られている (Hashimoto and Okutani, 1994)。1996年には、同じ伊豆・小笠原弧上の明神海丘にも本種が分布することが潜水調査船「しんかい2000」潜航調査により明らかになった (飯笹ら, 1997)。

シチヨウシンカイヒバリガイは厚く、大きく、長い鰓を有し、消化管は退化的であること (Hashimoto and Okutani, 1994) や熱水噴出域に特異的に分布することから、他のシンカイヒバリガイ類と同様に体内に共生細菌を持つ可能性が高い。また、1997年に「しんかい2000」潜航調

査で明神海丘より採集したシチヨウシンカイヒバリガイは硫化物・メタン無添加下で半年以上の長期にわたり飼育可能であったことから、濾過摂食を行う可能性もある。

本研究では、主に電子顕微鏡による鰓上皮細胞の観察からシチヨウシンカイヒバリガイの自然状態での栄養摂取方法について考察する。また、硫化物無添加下で飼育したシチヨウシンカイヒバリガイについても同様に電子顕微鏡観察を行い、濾過摂食の可能性について論じる。

2. 材料・方法

2.1 試料採集

「しんかい2000」第954潜航 (1997年6月24日)、第1006潜航 (1998年5月4日)、第1007潜航 (1998年5月5日)、第1009潜航 (1998年5月7日) により明神海丘南東部カルデラ壁下部 (32°06.3'N, 139°52.0'E ~ 139°52.0'E 付近、水深1,230~1,300m) にてシチヨウシンカイヒバリガイを採集した。このうち、第954潜航で採集した1個体および第1006~1009潜航で採集した計9個体を常圧飼育した。また第1006~1009潜航で採集した計12個体については、採集直後より7℃海水中で数時間飼育した後に電顕用固定処理を実施した。

2.2 電子顕微鏡試料処理

採集したシチヨウシンカイヒバリガイを7℃で数時間飼育後、解剖して鰓を摘出し、適当な大きさに切り出した後、海水で希釈した0.2%グルタルアルデヒドに4℃で1時間浸漬した (予備固定)。その後、組織片を長さ2~3mm程度に細切し、0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.8) で十分に洗浄した (室温, 10分×10回)。更にpH6.8に調整した4%もしくは2%タンニン酸を含む2.5%グルタルアルデヒドにより室温で3時間追加固定した。追加固定後は0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.8) で十分に洗浄し (室温, 10分×10回)、10mM アジ化ナトリウムを添加した0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.8) 中にて4℃で約1週間保存した。以下常法に従って0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.8) にて洗浄、1%四酸化オスミムによる後固定 (4℃, 2時

間), エタノール上昇系列による脱水, エポキシ樹脂包埋, 超薄切片作製後, 酢酸ウラン及び佐藤の鉛による二重染色を行い, カーボン蒸着後, 透過型電子顕微鏡 (JEM-1210) により加速電圧 80kV にて観察した。

2.3 飼育

「しんかい2000」第954潜航 (1997年6月24日) で採集したシチヨウシンカイヒバリガイを1997年6月27日から1998年6月25日まで約1年間にわたり海洋科学技術センターにて7°Cで常圧飼育した。飼育開始より1997年10月20日までの間, このシンカイヒバリガイを硫化物添加下 (~6g 硫化ナトリウム/日) で飼育し, 10月20日より飼育終了までの期間, 硫化物無添加下で飼育した。また, 「しんかい2000」第1006~1009潜航で採集したシチヨウシンカイヒバリガイを1998年6月2日まで硫化物無添加下で飼育し, それより6月18日まで硫化物添加下で飼育した。

2.4 体長計測

「しんかい2000」第954潜航で採集したシチヨウシンカイヒバリガイの体長 (殻長, 殻高, 殻幅) を1997年12月25日, 1998年3月31日, 1998年6月25日の計3回計測した。

3. 結果

3.1 電顕観察

シチヨウシンカイヒバリガイの鰓上皮細胞液胞中から多数の細菌を検出した (写真1A)。細菌は長径0.60 μm (SD=0.20, n=40) で, 細胞壁は薄くグラム陰性菌様の桿菌であった (写真2A)。この細菌内から共生メタン酸化細菌で見られる stacked internal membrane 構造を観察することは出来なかった。この細菌のサイズ及び形態的特徴はガラバゴスシンカイヒバリガイの共生硫黄細菌と酷似していた。また, この細菌の分裂像や分解像を菌細胞内で観察した (写真2B, 2C)。細菌の分裂は主に菌細胞表層付近で行われており, 分解は主に菌細胞の基底膜側であった。多くの菌細胞では基底膜近傍に脂肪滴が分布していた (写真1A)。また液胞中からは上記細菌とは大きさおよび内部形態の異なる球状構造を多数観察した (写真2A)。

硫化物無添加下で8ヶ月間飼育した個体の鰓および鰓上皮細胞は採集直後の個体と比較して萎縮しており (写真1B, 3), 観察した全ての鰓上皮細胞中から細菌を検出出来なかった。

硫化物無添加下で約3週間飼育した個体の鰓および鰓上皮細胞も8ヶ月間飼育した個体と同様に萎縮していた

Date	SL (cm)	SH (cm)	SW (cm)
1997/12/25	78.55	40.65	34.90
1998/3/31	78.48	39.98	34.55
1998/6/25	78.48	40.58	35.01

表1 硫化物無添加下で飼育したシチヨウシンカイヒバリガイの体長変化。SLは殻長, SHは殻高, SWは殻幅を示す。

Table 1 Shell size changes of *Bathymodiolus septemdiarum* which was maintained without sulfide. SL, SH, and SW represent shell length, shell height, and shell width, respectively.

(写真1C)。しかし, 硫化物無添加下で8ヶ月間飼育した個体と異なり, ごくわずかではあるが, 鰓上皮細胞中から分解されている細菌を検出した (写真2D)。

3.2 体長計測

硫化物無添加下で飼育したシチヨウシンカイヒバリガイの体長を6ヶ月にわたり計測した結果を表1に示す。計測期間中, この個体の殻長, 殻高, 殻幅に大きな変化はなかった。

4. 考察

シチヨウシンカイヒバリガイについて, (1) 熱水噴出域に特異的に生息し, 噴出する熱水中には硫化水素が存在すること (最高2mmol/kg程度, 石橋私信), (2) 厚く, 大きく, 長い鰓を有し, 消化管は退化的であること, (3) 鰓上皮細胞中に共生細菌を有し, その形状, 存在様式がガラバゴスシンカイヒバリガイに酷似することから, 本種は硫黄細菌を細胞内共生者とし, 栄養をこの細菌に依存している可能性が極めて高い。

採集直後の個体では, 菌細胞表層に分解されていない細菌や分裂中の細菌が存在し, 基底膜付近では分解されている細胞, 内部に分解残渣様構造を有する液胞, 内部構造の何もない液胞および脂肪滴が存在した。このことは「シンカイヒバリガイ類は共生細菌を細胞内で分解することにより栄養摂取する」とする報告と矛盾しない (Fisher and Childress, 1992; Nelson *et al.*, 1995; Streams *et al.*, 1997)。また, 長期飼育の結果, 菌細胞内の細菌が消失したが, これは硫化物を得られない細菌が増殖を停止し, 老化した細菌が消化された可能性が高い。実際, 硫化物無添加下で3週間飼育した個体の鰓上皮細胞内からは分解されている細菌のみを少数検出した。ほぼ全ての細菌の分解には3週を要するという事はシンカイヒバリガイ類の共生細菌の回転率 turnover rate は低いとする Streams らの結果と矛盾しない (Streams *et al.*, 1997)。

シンカイヒバリガイ類には濾過摂食を行うことが知られる種があるが (Page *et al.*, 1990; Page *et al.*, 1991), 本種も硫化物無添加下で8ヶ月間生存し, かつ, 鰓中の細菌が3週間程度ではほぼ消失していたところから, 少なくとも7ヶ月以上にわたり, 主に濾過摂食に依存した栄養摂取を行っていた可能性が非常に高い。伊豆・小笠原弧からは数多くの熱水噴出活動および化学合成生物群集が報告されており, 化学合成共生細菌を体内に持つ動物種はシチヨウシンカイヒバリガイに加えて, 日光海山のハオリムシ類および海形海山に生息する未記載のイガイ科二枚貝が知られている。シチヨウシンカイヒバリガイのみが複数の海域 (水曜海山, 木曜海山, 明神海丘) に生息するが, このことはこのヒバリガイの栄養摂取方法 (共生細菌由来の有機物摂取および濾過摂食) と関係しているのかもしれない。ガラバゴスリフトやローズガーデン熱水噴出域でもシンカイヒバリガイ類が他の共生細菌保有種より広範囲に生息していることが知られている (Fisher *et al.*, 1988; Hessler *et al.*, 1988)。

飼育したシチヨウシンカイヒバリガイの殻サイズは6ヶ月間変化がなかった。飼育個体の消化管内容物分析および海水懸濁成分分析を行っていないため, どの程度, 濾過摂食を行ったのかは不明であるが, 成長できなかったことは「非常に高密度の細菌 (10^6 /ml) 存在下で, シンカイヒバリガイ類は個体維持は可能であるが, 成長はできない」とするPageらの仮説を支持しているのかもしれない。

本研究の結果, シチヨウシンカイヒバリガイは熱水噴出域に生息するガラバゴスシンカイヒバリガイと同様に硫黄細菌を細胞内共生細菌として保持し, かつ, 濾過摂食を行う可能性が極めて高い。しかし, ある動物種中に共生細菌が存在することを確認するためには電子顕微鏡による共生細菌の形態観察, 化学合成や硫黄・メタン酸化に関わる酵素活性測定, 宿主動物の同位体比測定, 単体硫黄の検出, 宿主動物や組織の代謝活性測定, 宿主動物の解剖学的観察, 生育環境の調査などのデータを複数組み合わせる必要があるのである (Fisher, 1990)。従って, 今後は共生細菌の遺伝子配列解析などを行って, この細菌の特性を明らかにしていきたい。また, 濾過摂食が本種の栄養摂取にどの程度寄与しているのか, 一度失われた共生細菌を再び獲得出来るのかについても実験を行う予定である。

謝 辞

本研究の実施に際しては, 「しんかい2000」の指令ほか運航チーム及び「なつしま」船長ほか乗組員の方々には大変お世話になった。以上の方々には深く感謝する。

引用文献

- Cavanaugh, Colleen M., Piet R. Levering, James S. Maki, Ralph Mitchell, and Mary E. Lidstrom (1987): Symbiosis of methylotrophic bacteria and deep-sea mussels. *Nature*, 325, 346-348.
- Childress, James J., C. R. Fisher, J. M. Brooks, M. C. Kennicutt II, R. Bidigare, and A. E. Anderson (1986): A methanotrophic marine molluscan (*Bivalvia*, *Mytilidae*) symbiosis: mussels fueled by gas. *Science*, 233, 1306-1308.
- Distel, Daniel L., Henri K.-W. Lee, and Colleen M. Cavanaugh (1995): Intracellular coexistence of methano and thioautotrophic bacteria in a hydrothermal vent mussel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 9598-9602.
- Fiala-Médioni, A., A. M. Alayse, and G. Cahet (1986): Evidence of in situ uptake and incorporation of bicarbonate and amino acids by a hydrothermal vent mussel. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 96, 191-198.
- Fisher, C. R., J. J. Childress, R. S. Oremland, and R. R. Bidigare (1987): The importance of methane and thiosulfate in the metabolism of the bacterial symbionts of two deep-sea mussels. *Mar. Biol.*, 96, 59-71.
- Fisher, C. R., J. J. Childress, A. J. Arp, J. M. Brooks, D. Distel, J. A. Favuzzi, H. Felbeck, R. Hessler, K. S. Johnson, M. C. Kennicutt II, S. A. Macko, A. Newton, M. A. Powell, G. N. Somero, and T. Soto (1988): Microhabitat variation in the hydrothermal vent mussel, *Bathymodiolus thermophilus*, at the Rose Garden vent on the Galapagos Rift. *Deep-Sea Res.*, 35, 1769-1791.
- Fisher, Charles R. (1990): Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates. *Rev. Aquat. Sci.*, 2, 399-436.
- Fisher, C. R. and J. J. Childress (1992): Organic carbon transfer from methanotrophic symbionts to the host hydrocarbon-seep mussel. *Symbiosis*, 12, 221-235.
- Fisher, C. R., J. M. Brooks, J. S. Vodenichar, J. M. Zande, J. J. Childress, and R. A. Burke Jr. (1993): The co-occurrence of methanotrophic and chemoautotrophic sulfur-oxidizing bacterial symbionts in a deep-sea mussel. *P. S. Z. N. I. Mar. Ecol.*, 14, 277-289.

- Hashimoto, Jun and Takashi Okutani (1994): Four new mytilid mussels associated with deepsea chemo-synthetic communities around Japan. *VENUS*, 53, 61-83.
- Hessler, Robert R., William M. Smithey, Michel A. Boudrias, Clifford H. Keller, Richard A. Lutz, and James J. Childress (1988): Temporal change in megafauna at the Rose Garden hydrothermal vent (Galapagos Rift; eastern tropical Pacific). *Deep-Sea Res.*, 35, 1681-1709.
- Nelson, Douglas C. and Charles R. Fisher (1995): "Chemoautotrophic and methanotrophic endosymbiotic bacteria at deep-sea vents and seeps." p125-167. In: *The microbiology of deep-sea hydrothermal vents*. Edited by David M. Karl, CRC Press, Boca Raton.
- Page, H. M., C. R. Fisher, and J. J. Childress (1990): Role of filter-feeding in the nutritional biology of a deep-sea mussel with methanotrophic symbionts. *Mar. Biol.*, 104, 251-257.
- Page, H. M., A. Fiala-Medioni, C. R. Fisher, and J. J. Childress (1991): Experimental evidence for filter-feeding by the hydrothermal vent mussel, *Bathymodiolus thermophilus*. *Deep-Sea Res.*, 38, 1455-1461.
- Streams, M. E., C. R. Fisher, and A. Fiala-Médioni (1997): Methanotrophic symbiont location and fate of carbon incorporated from methane in a hydrocarbon seep mussel. *Mar. Biol.*, 129, 465-476.
- 飯笹幸吉, 仲二郎, 湯浅真人, リチャード・フィスケ (1997): 明神海丘カルデラにおける硫化物チムニーを伴う熱水活動. *JAMSTEC 深海研究*, 13, 443-456.

(原稿受理: 1998年7月31日)

(注) 写真は次ページ以降に掲載

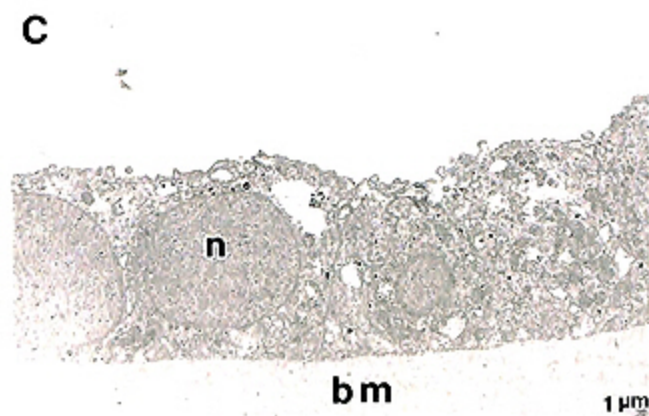
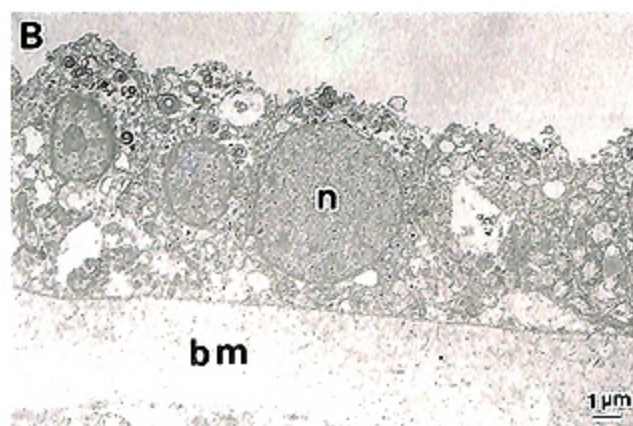
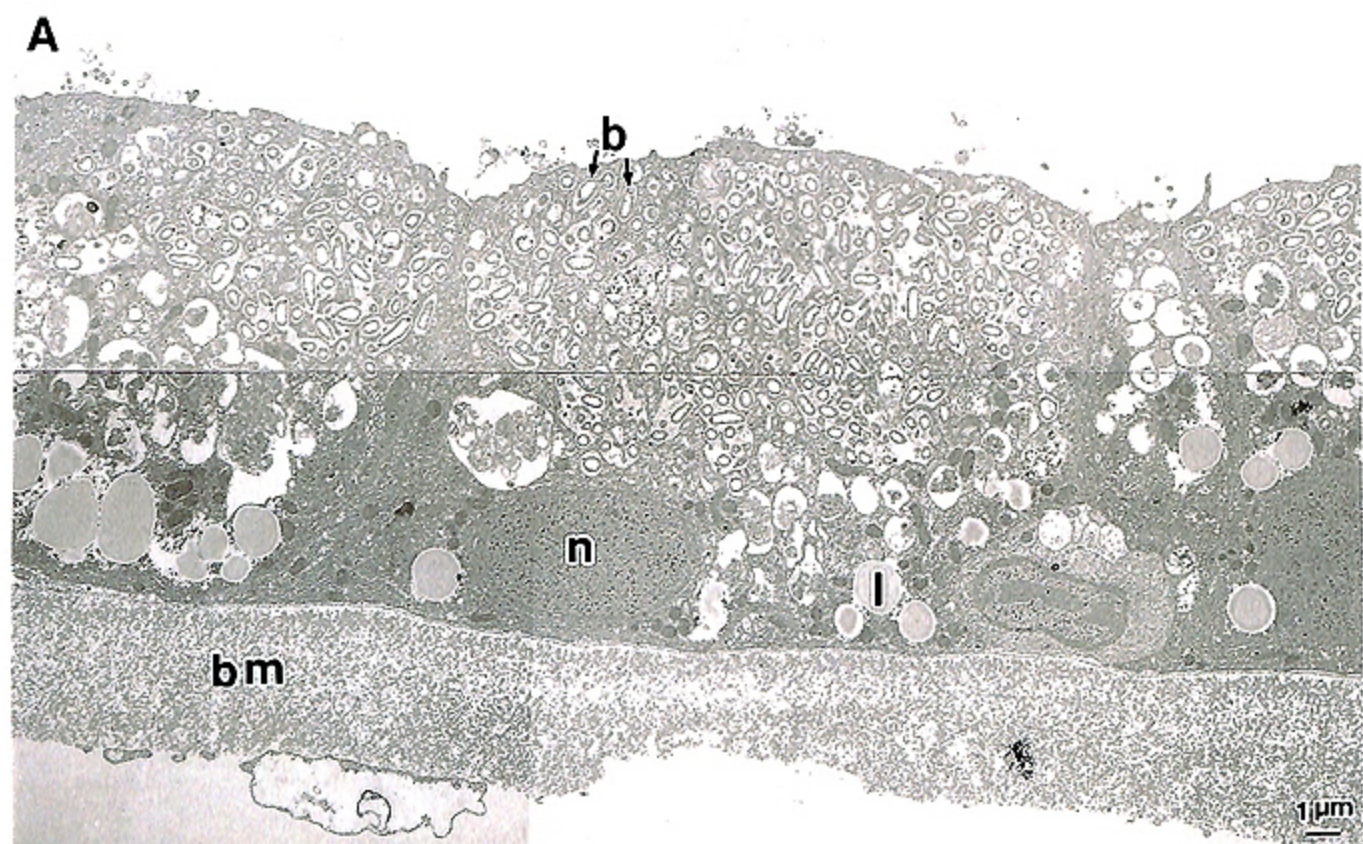


写真1 シチヨウシンカイヒバリガイ鰓糸横断面の透過型電子顕微鏡像。A：採集直後に固定したシチヨウシンカイヒバリガイ菌細胞。B：硫化物無添加下で8ヶ月間飼育したシチヨウシンカイヒバリガイ鰓上皮細胞。C：硫化物無添加下で3週間飼育したシチヨウシンカイヒバリガイ鰓上皮細胞。b：細菌，bm：基底膜，l：脂肪滴，n：核。

Photo 1 Transmission electron micrographs of transverse sections through gill filaments of *Bathymodiolus septemdiarium*. A, bacteriocytes of *B. septemdiarium* which was fixed immediately after collection. B, epithelial cells of *B. septemdiarium* which was maintained for 8 months without sulfide. C, epithelial cells of *B. septemdiarium* which was maintained for 3 weeks without sulfide. b, bacterium; bm, basal membrane; l, lipid droplet; n, nucleus.

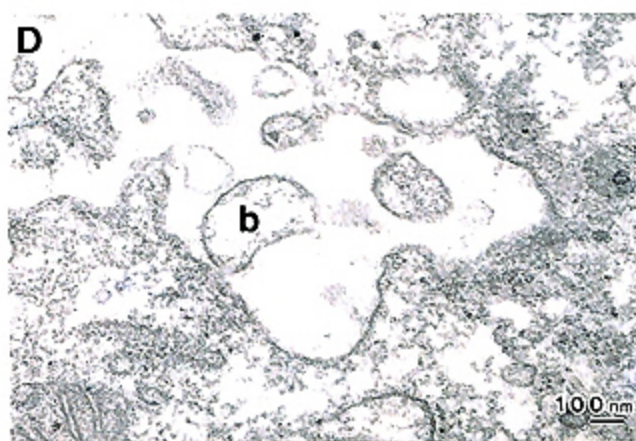
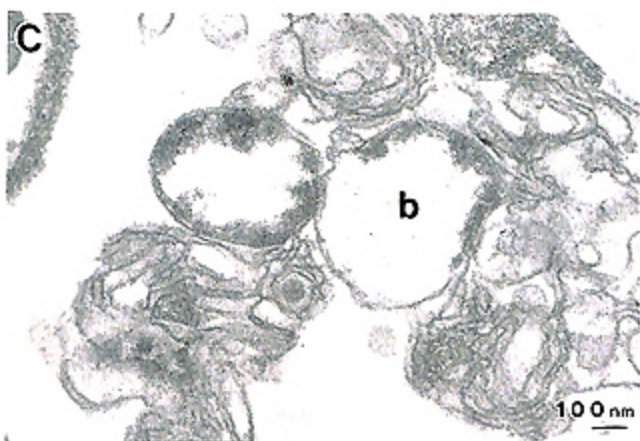
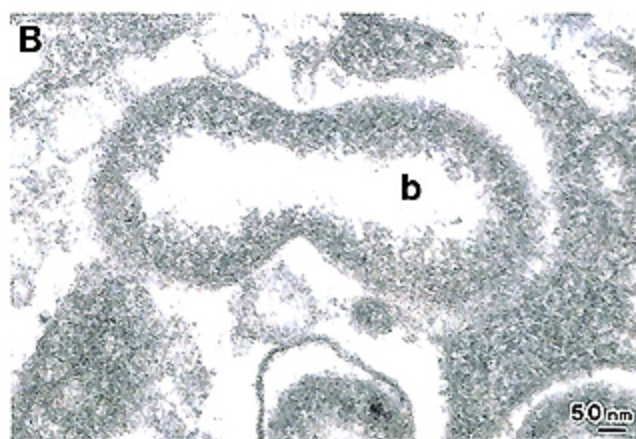
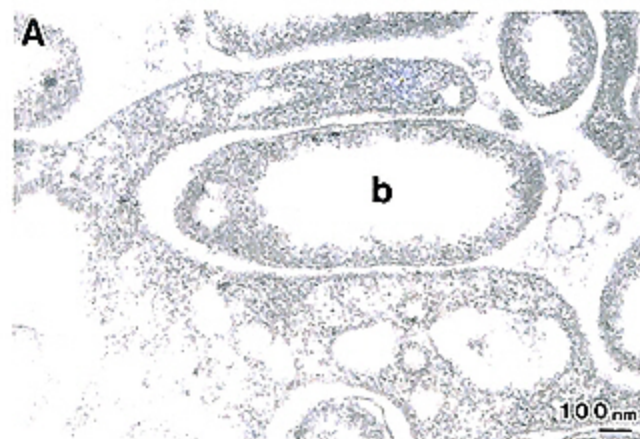


写真2 採集直後に固定したシチヨウシンカイヒバリガイ (A, B, C) および硫化物無添加下で3週間飼育したシチヨウシンカイヒバリガイ (D)。鰓糸横断面の透過型電子顕微鏡像。A：菌細胞液胞中のstacked internal membranesを持たない細菌，B：菌細胞液胞中で分裂中の細菌，C：菌細胞液胞中で分解されている細菌，D：上皮細胞中で分解されている細菌。b：細菌。

Photo 2 *Bathymodiolus septemdierum* which was fixed immediately after collection (A, B, C) and *B. septemdierum* which was maintained for 3 weeks without sulfide (D). Transmission electron micrographs of transverse sections through gill filaments. A, bacteria without stacked internal membranes in a vacuole of a bacteriocyte. B, dividing bacterium in a vacuole of a bacteriocyte. C, degraded bacteria in a vacuole of a bacteriocyte. D, degraded bacterium in a vacuole of an epithelial cell. b, bacterium.



写真3 解剖中のシチヨウシンカイヒバリガイ。A：採集直後の個体，B：硫化物無添加下で8週間飼育した個体。g：鰓。

Photo 3 *Bathymodiolus septemdiarium* dissected. A, a specimen immediately after collection. B, a specimen which was maintained for 8 months without sulfide. g, gill.