様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 29 年　6 月　9 日現在

機関番号：８２６２６
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2016
課題番号：１５Ｋ２１６６０

研究課題名（和文）メダカの腸内細菌叢解析：魚類腸内細菌叢の機能解明に向けたモデル研究

研究課題名（英文）Comparative analysis of gut microbiota in the domesticated and wild-caught medaka

研究代表者
伊藤　英臣（Itoh, Hideomi）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員

研究者番号：７０７４８４２５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：　本研究では魚類腸内細菌叢の機能解明モデル開発に向け、優れたモデル魚類のメダカに着目し、その腸内細菌叢に関する基礎情報を得ることを目的とした。室内飼育メダカと野生メダカの腸内細菌叢の群集構造を比較解析した結果、人工的な飼育環境下では本来の野外環境下とは大きく異なる腸内細菌叢が形成されることが示唆された。またメダカの、エラ、表皮粘膜、背ビレ、腸、腸内容物、そして卵の細菌叢を比較解析した結果、各組織にはそれぞれ特異的な細菌叢が形成されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：A number of animals harbor diverse microorganisms in their alimentary tract, where intimate interactions occur between the hosts and microbes. However, among these symbioses, diversity and function of gut microbiota of fish are not well-understood because of less studies using model organisms like mouse. Aim of this study is to obtain the fundamental information of gut microbiota of a model fish, medaka. Comparative analysis of community structure of gut microbiota in the domesticated and wild-caught medaka showed quite difference between the both microbiota. This result suggests that unnatural microbiota is developed by artificial domestication. Moreover, comprehensive analysis of whole body in medaka shows the specific microbiota is developed in each part, gill, skin, fin, gut, and egg in medaka, implying that medaka-associated microbiota is varied according to body parts.

研究分野：微生物生態学

キーワード：腸内細菌　メダカ　モデル生物

１．研究開始当初の背景

多くの動物の腸内には多種多様な細菌が生息していることが古くから知られている。近年の塩基配列解読技術の飛躍的進歩に伴い、哺乳類、鳥類、は虫類、両生類、魚類といった脊椎動物から、原索動物、軟体動物、節足動物といった無脊椎動物まで、その腸内にどういった分類群の細菌が生息しているのか詳細に調べられるようになってきている（Ley et al., 2008; Waite and Taylor, 2014; Keenan et al., 2013; Kohl et al., 2013; Llewellyn et al., 2014; Dishaw et al., 2014; Koch et al., 2014; Engel and Moran, 2013; Rungrassamee et al., 2014)。腸内細菌叢に関する研究が最も盛んな生物の１つのヒトにおいては、優占・稀少種合わせて約 300 種類の腸内細菌が 100 兆個以上定着しており、その総重量は成人で約 1 kg に達すると考えられている（Zoetendal et al., 2004; Human Microbiome Project, 2012)。

近年、これら腸内細菌がただ存在しているのではなく、宿主動物の生理機能に対して影響を及ぼしていることが明らかとなってきている。ヒトやマウスでは、腸内細菌がガン、肥満、アレルギー疾患のリスクに影響していることや、脳の発達や行動にまで影響をおよぼすことが報告されている（Yoshimoto et al., 2013; Turnbaugh et al., 2006; Stefka et al., 2014; Heijtz et al., 2011)。これらの腸内細菌が宿主動物に果たす驚くべき機能の発見によって、上記の様々な動物における腸内細菌叢の群集構造解析や、宿主動物と腸内細菌の相互作用（腸内共生）メカニズムの解明に迫る研究がよりいっそう注目を集めており、腸内細菌叢の制御を目標にした新たな健康増進技術や病気治療法の開発に大きな期待が寄せられている。言うまでもなく、腸内細菌叢の制御をねらった応用技術の開発には、宿主動物と腸内細菌の詳細な相互作用の遺伝的・分子基盤の解明といった基礎研究が必要不可欠である。この基礎研究を支えているのが、飼育管理が容易で、ゲノム情報や豊富な遺伝学的実験ツールを利用することができる哺乳類の代表的なモデル生物であるマウスに他ならない。

宿主生物と腸内細菌叢の相互作用の解明は医学分野で注目されているが、水産学分野でも重要視されている。腸内細菌叢を制御して宿主魚類の病気予防や成長促進が実現できれば低コスト･低環境負荷な養殖技術につながるからである。そのためには相互作用の分子メカニズムの理解が必要不可欠であるが、そもそも魚類腸内細菌叢に関する基礎的知見は限られており、魚類腸内細菌叢を解析･評価するモデル研究例もなく、これらのことが魚類腸内細菌の具体的な機能や作用メカニズムの解明の妨げとなっている。

魚類にもモデル生物として優れた特徴を持つものが知られている。その代表例の一つが国内発祥のモデル生物であるメダカである。メダカは古くから遺伝学や発生学の実験に用いられ、ゲノム解読も完了しており、脊椎動物の重要なモデル生物として研究者に広く活用されている。さらに、ナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP Medaka, 核拠点は基礎生物学研究所）において突然変異系統、遺伝子導入系統、近交系統、国内外の野生系統が継代飼育されており、世界各国の研究機関がいつでもこれらのメダカを取得・利用できるよう整備されている。メダカと同様の小型魚類モデルとしてゼブラフィッシュが知られているが、メダカはさらに下記のような腸内共生の遺伝的・分子基盤の詳細な解析において極めて重要な特徴を有する。

●幅広い塩濃度（淡水でも海水でも生存可）および温度域（4℃~30℃）で生存であることから、より広範な飼育条件下での腸内細菌の挙動について調べることができる

●遺伝的に均一な近交系が確立されているこ

とから、再現性に優れた実験が可能
●ゲノムサイズがゼブラフィッシュの半分であり、分子生物学および遺伝学的解析においてもより利便性に優れる
●アジア圏の野生個体の系統分類についても詳細に解析され複数の近縁種が提唱されており、腸内共生の進化学的・生態学的解析にもアプライできる
●系統間の遺伝的差異が大きい（ゲノムレベルで 3%差異がある。これはヒトとチンパンジー間の差に相当する。）にも関わらず、生活様式は変わらず、さらに交配可能な系統もある。全く同じ飼育条件下で複数の異種系統を飼育することにより、腸内細菌叢を決定づける宿主側の遺伝的な要因を探索するといった、他のモデル生物では極めて困難な実験系を設定することも可能である

このように腸内細菌の機能解析における極めて有用なモデル魚類であるメダカの腸内細菌叢に関する知見が得られれば、現在哺乳動物で展開されているような宿主—腸内細菌叢の相互作用に関する研究の魚類への応用も可能となり、メダカを用いて当該研究分野を発展させることも期待できる。しかし、メダカの腸内細菌叢に関する研究例は皆無であり、利用できる知見はほとんどなく、「腸内にどのような細菌が定着しているのか」という最も基本的な情報すら分かっていないのが現状である。

２．研究の目的

本研究では、メダカの腸内細菌叢の多様性に関する基礎情報を得るために、国内の保存機関や研究機関にて継代飼育されている個体と、日本各地の河川に生息する野生個体の腸内細菌叢を比較解析して、そもそもメダカの腸内細菌叢はどんな分類群の細菌によって構成されているのか、そして生息環境の違いが腸内細菌叢に及ぼす影響の解明を試みた。さらに、腸内の細菌叢に加え、エラ、体表、ヒレ、卵表面に発達する細菌叢の群集構造を解析し、メダカ全身に発達する細菌叢の多様性の網羅的解明を試みた。

３．研究の方法

ナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）に基づいて基礎生物学研究所で飼育されている北日本集団（HNI）及び南日本集団（HdrR）の 2 種類の近交系統を、また新潟大学で飼育されている東韓集団（HSOK）の近交系統 1 種類および中国西韓集団（WS267）の保存系統を取得し解析に用いた。また、小売店で飼育・販売されていたメダカと、それを研究室内で継代飼育した系統のものも解析に用いた。これら 6 系統を「飼育メダカ(domasticated medaka)」とした。さらに、全国 10 地点の河川や池で捕獲した個体を「野生メダカ(wild-caught medaka)」として解析に用いた。

それぞれのサンプルから DNA を抽出し、細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR(Polymerase Chain Reaction)増幅した。増幅産物は Miseq シーケンサー(Illumina)を並列解読し、細菌叢の多様性を解析した。

また実験室内で継代飼育しているメダカ成魚 6 個体(オス 3 個 体、メス 3 個体)それぞれから、エラ、表皮粘膜、背ビレ、腸管、腸内容物、卵を採取した。それぞれのサンプルから DNA を調整し、上記と同様の方法で細菌叢の多様性を解析した。

４．研究成果

(1)飼育メダカと野生メダカの腸内細菌叢の比較解析

研究機関や小売店で室内飼育されているメダカと、日本各地の河川において採集した野生メダカの腸内細菌叢の群集構造を比較解析したところ、両者の間で群集構造が大きく異なっていた(Figure 1)。注目すべきこと

に、異なる場所で飼育・生息していたにも関わらず、飼育メダカ同士、野生メダカ同士の腸内細菌叢の群集構造は類似していた(Figure 2)。また、野生メダカと比べて飼育メダカの腸内細菌叢の多様性指数は低かった。

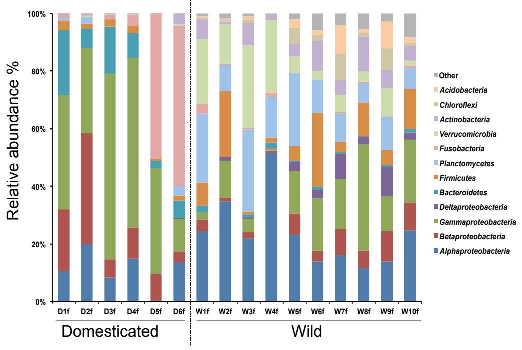

Figure 1. 飼育メダカ(Domesticated)と野生メダカ(wild)の腸内細菌叢の群集構造。データはそれぞれ4-10個体の平均値を示す。

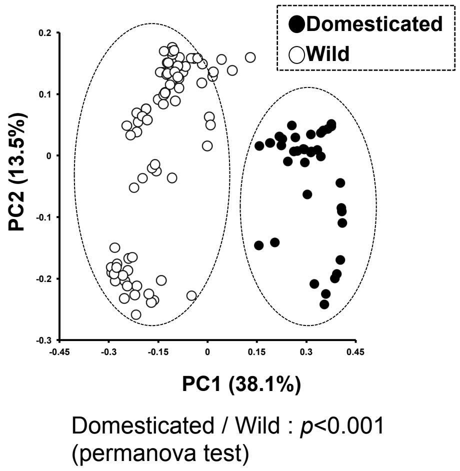

Figure 2. 飼育メダカ(Domesticated)と野生メダカ(wild)の腸内細菌叢の群集構造の主成分分析

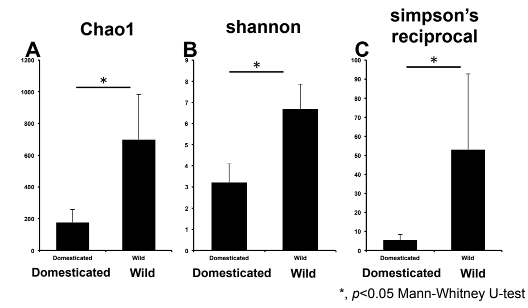

Figure 3. 飼育メダカ(Domesticated)と野生メダカ(wild)の腸内細菌叢の多様度の比較。average±std, (n=4〜10)。

さらに、飼育メダカ及び野生メダカの細菌叢の構成メンバーを詳細に解析したところ、飼育メダカは魚類の日和見病菌が含まれる*Aeromonas*属や*Flavobacterium*属細菌が優占していたのに対し、どの地域の野生メダカの腸内においてもそれらの細菌群はほとんど検出されなかった(Figure 4)。これらのことから、環境要因によって腸内細菌叢は変動しやすく、人工的な飼育環境下では本来の野生環境とは異なる腸内細菌叢が形成されることが示唆された。同一魚種で飼育環境下と野生環境下の腸内細菌叢を比較した研究は本研究が初めてであり、人工的な環境下で飼育した個体の腸内細菌叢は、その魚種が本来野生環境で獲得する腸内細菌叢ではないことを明確に示すものである。

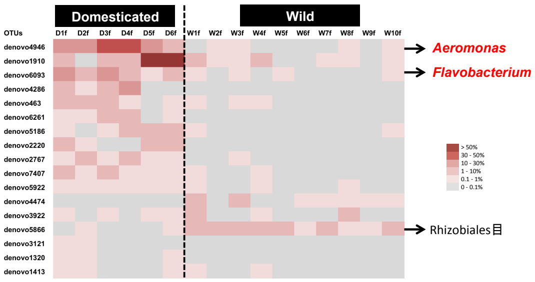

Figure 4. 飼育メダカ(Domesticated)の腸内細菌叢の優占群

Aeromonas 属細菌は上述の通り魚類の日和見病菌が含まれるグループであり、これまでの研究から様々な淡水魚の腸内において高頻度に検出されることから、淡水魚の腸内細菌叢におけるコアメンバーとして考えられてきた(Sullam et al., Mol. Ecol., 2012)。しかしながら、魚類腸内細菌叢に関する既往研究における*Aeromonas*属細菌の検出頻度を注意深くサーベイしたところ、野生個体や野池養殖個体よりもラボ飼育個体や水槽養殖個体の腸内から比較的高頻度に検出される傾向が見られた(Ye et al., 2013; Li et al., 2015; van Kessel et al., 2011; Wu et al.,

2012; Liewellyn et al., 2015; Roeselers et al., 2011; Scmidt et al., 2015; Sullam et al., 2013)。そして Flavobacterium 属細菌もまた養殖虹鱒においてとりわけ高頻度に検出されている(Wong et al., 2013)。この傾向は本研究結果と一致しており、メダカのみならず他の魚種でも人工的な飼育環境下では本来の野生環境とは異なる腸内細菌叢が形成される可能性を示唆する。野生環境とは全く異なる環境条件や食餌で飼育される養殖魚は、腸内に日和見菌がたまりやすく、常に日和見病の高いリスクに晒されているのかもしれない。

(2)メダカの全身に発達する細菌叢の比較解析

研究室で継代飼育しているメダカの、エラ、表皮粘膜、背ビレ、腸、腸内容物、そして卵の細菌叢を比較解析したところ、各組織それぞれに特徴的な腸内細菌叢が形成されることが明らかとなった(Figure 5)。また、どの部位においても *Aeromonas* 属および *Cetobacterium* 属細菌が検出されたが、これらの構成比は体内外において大きく異なっていた(Figure 6)。腸や腸内容物といった体内由来のサンプルにおいて、これら 2 属の細菌群が 34.2-34.3%, 41.9-44.2%と高い割合を占めていた。一方、表皮粘膜、背ビレといった体表面においては、これら 2 属の細菌群の割合は相対的に低く、代わりに体内ではほとんど検出されなかった *Acidovorax* 属細菌が 18.5-24.1%と優占していた。さらに卵表面においては、*Undibacterium*,属、*Rheinheimera* 属細菌といった水棲細菌が特異的に優占していた。これらのことから、メダカの各組織にはそれぞれ特異的な細菌叢が形成されることが示唆された。

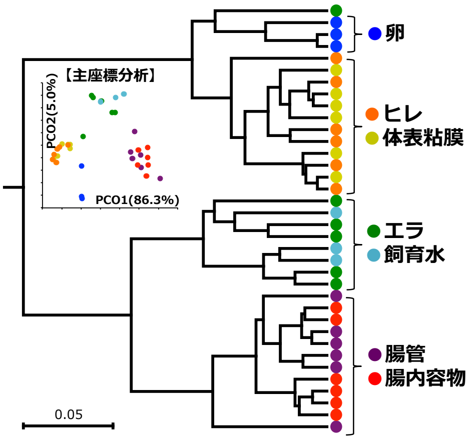

Figure 5. 各組織の細菌群集構造のクラスター解析

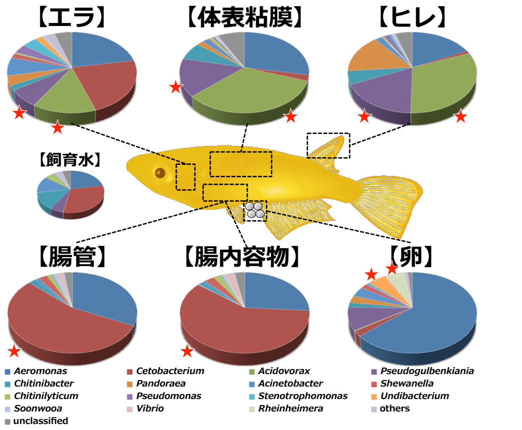

Figure 6. 各組織の細菌群集構造(属レベル)。エラ、体表粘膜、ヒレ、腸管、腸内容物は 6 個体の平均値、卵は 3 個体の平均値、飼育水は 500 mL x3 反復の平均値を示す。

体表面や卵表面で特異的に検出された *Acidovorax* 属と *Undibacterium* 属細菌は、両生類や淡水ヒドラの体表面においても検出されている。そして興味深いことに、両属細菌は宿主動物に深刻な病気を引き起こすツボカビやフザリウムに対して抗菌活性があり、宿主の体表面に定着することで宿主のこれら病病原菌に対する抵抗性を高めることが知られている(Harris et al., 2009; Fraune et al., 2015)。メダカのエラ、体表、そして卵においても、両属細菌が病原菌の侵入や繁茂の抑制に寄与しているのかもしれない。

５．主な発表論文等
〔雑誌論文〕（計　０件）

〔学会発表〕（計　７件）
①ポスター：佐野友紀、木原稔、堀友行、曾根輝雄、菊池義智、伊藤英臣.　メダカ卵表面に発達する細菌叢の動態と機能、環境微生物系合同大会 2017、2017 年 8 月（確定済)、東北大学川内キャンパス（宮城県仙台市）
②口頭：伊藤英臣.　環境微生物と動物の強制関係を紐解く-現象の理解と産業への活用を目指して-、2016 年度第 6 回 HiNT セミナー、2017 年 3 月、HiNT R&B パーク大通サテライト（北海道札幌市）
③口頭：伊藤英臣.　動物−微生物共生系の多様性と相互作用の解明、水産増養殖産業イノベーション抄出プラットフォームキックオフミーティング、2017 年 2 月、横浜ランドマークタワー（神奈川県横浜市）
④ポスター：伊藤英臣、菊池義智. 魚類腸内フローラの制御による新規養殖技術の開発、農林水産省主催「知」の集積と活用の場産学官連携協議会ポスターセッション、2016 年 6 月、農林水産省（東京都千代田区）
⑤ポスター：伊藤英臣、菊池義智. 魚類腸内フローラの制御による新規養殖技術の開発、農林水産省主催「知」の集積と活用の場産学官連携協議会ポスターセッション、2016 年 3 月、東京海洋大学越中島キャンパス（東京都江東区）
⑥ポスター：伊藤英臣、堀知行、菊池義智. メダカ常在細菌叢の多様性と分布：エラ、体表、ヒレ、腸、卵に発達する細菌叢の解明、平成 28 年度日本水産学会春季大会，2016 年 3 月、東京海洋大学品川キャンパス（東京都港区）
⑦ポスター：伊藤英臣、菊池義智. メダカの腸内細菌叢解析：魚類腸内細菌叢の機能解明に向けたモデル研究、第 21 回 Hindgut Club Japan シンポジウム，2015 年 12 月、専修大学神田キャンパス（東京都千代田区）

〔図書〕（計　０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　０件）
○取得状況（計　０件）

〔その他〕
なし

６．研究組織
(1)研究代表者
伊藤　英臣　（ITOH, Hideomi）
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員
研究者番号：70748425

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
菊池義智（KIKUCHI, Yoshitomo）
佐野友紀（SANO, Yuki）