

令和元年6月24日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07825

研究課題名(和文) 海洋におけるカイアシ類とバクテリア類の相互作用に関する研究

研究課題名(英文) Studies on interactions between marine copepods and bacteria

研究代表者

大塚 攻 (Ohtsuka, Susumu)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：00176934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：中層に多産するカイアシ類Bradfordian familyは、発光バクテリアを介して甲殻類デトリタスを光感覚器官によって検出して、さらにバクテリアのキチン分解能を利用してキチンを栄養としている。付随するバクテリア相の比較によってデトリタス食性カイアシ類の資源分割も確認された。ウオジラミ類体表にキチン親和性を持ち、キチナーゼを持つバクテリアが常在している。浮遊性・寄生性カイアシ類は複数のキチナーゼ遺伝子を有し、浮遊性Cephalophanes属ではキチンの分解、合成に関わる遺伝子を有している。動物プランクトンとバクテリアのキチンを介しての種間関係は海洋生態系において重要であることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バクテリアの発光能とキチン分解能がそれぞれ浮遊性カイアシ類の栄養摂取、栄養物消化に利用されている実態を明らかにした。デトリタス食性カイアシ類の資源分割の実態を、付随するバクテリア相を比較することで明らかにできた。カイアシ類の体表がキチン親和性を持つ、キチナーゼを有するバクテリアの生息場所と利用されていることを明らかにした。海洋生態系におけるキチンの栄養的重要性がバクテリアとカイアシ類の種間関係に関する研究を通して再認識された。

研究成果の概要(英文)：Mesopelagic copepods such as Cephalophanes and Macandrewella belonging to Bradfordian families detect bioluminescent bacteria growing on crustacean detrital matters with the developed visual sensors, and are suggested to nutritionally utilize chitin by way of chitinolytic activity of bacteria. Food segregation was found in 4 mesopelagic detritivorous copepods based on a survey on their associated bacterial communities. Sea lice harbored epizootic bacteria which have an affinity for chitin and chitinolysis. Both planktonic and parasitic copepods have several isozymes of chitinase. In Cephalophanes, genes concerning chin-synthesis and chitinolysis were detected. Chin accumulated in the anterior caecum of the species may be a preserved food. The present study has revealed close interactions between copepods and bacteria via chitin.

研究分野：海洋プランクトン学、海洋共生生物学

キーワード：カイアシ類 バクテリア キチン キチナーゼ 発光 デトリタス ウオジラミ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海洋生態系で量的、機能的に最も重要なカイアシ類とバクテリアとの相互作用に関する知見は乏しいが、最近、その関係の多様性が徐々に明らかになってきた(例えば、Tang et al. 2010)。我々の研究で、甲殻類デトリタスに付着する発光バクテリアを検出する特殊な光感覚器を備え、キチンを栄養源として利用すると推測される浮遊性カイアシ類の存在が明らかになった(Nishida et al. 2002, Ohtsuka et al. 2002)。一方、トラフグ類の外部寄生虫フグウオジラミの体表からテトロドトキシン(TTX)産生能を持つバクテリアが発見された (Venmathi Maran et al. 2007)。本研究は浮遊性および寄生性カイアシ類とバクテリアの様々な種間関係を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

(1)光感覚器を持つ浮遊性カイアシ類とバクテリアの関係：甲殻類デトリタス食性カイアシ類 *Cephalophanes* 属は光感覚器として巨大なパラボラ状反射板を持って発光バクテリアを検出すると考えられているが、この消化管から(発光)バクテリアを検出すること、消化管前端部盲嚢の貯蔵物質(Nishida et al. (2002)では“anterior-caecum body (ACB)”と呼ぶ)の化学的特性を明らかにすることを目的とした。また、大陸棚近底層に生息する *Macandrewella* 属のレンズ状の光感覚器の微細構造および消化管内バクテリア相を明らかにすることも目的とした。

(2)外洋浮遊性カイアシ類の消化管内バクテリア相の比較：デトリタス食性カラヌス目カイアシ類 *Bradfordian family* と *non-Bradfordian family* の消化管内バクテリア相を比較し、検出されたバクテリア相とカイアシ類の摂餌生態の関係を推定した。

(3)カイアシ類のキチナーゼ：*Cephalophanes* 属およびフグウオジラミのキチナーゼの遺伝子を分離、同定を試みた。

(4)フグウオジラミ体表のバクテリア相：フグウオジラミ体表のバクテリア相、特にキチン親和性やキチン分解能を有するバクテリア相および TTX 産出能を有するバクテリアや病原性バクテリアの有無を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 光感覚器を持つ浮遊性カイアシ類とバクテリアの関係：2016年、2017年、黒潮流域中層から *Cephalophanes refulgens* を収集した。消化管内容物がある個体は無菌海水で洗浄し、消化管を摘出後、無菌海水中で粉碎、10倍に希釈したものをマリンアガー2216 (Difco)、キチン粉末を懸濁したマリンアガーなどの培地に塗布した。分離菌株について、キチン粉末入りマリンアガー上にてキチン分解能をプラークにて確認した。キチン分解性が認められた株は、16SrRNA 遺伝子プライマーを用いて 16SrRNA をコードする遺伝子の塩基配列(566bp)を増幅、シーケンサーを用いて解読し、DDBJ のデータベースに参照して種を同定した。消化管前端部の盲嚢内 ACB については Calcofluor White Stain 染色をしてキチンの存在を確かめ、GCMS 分析も行った。消化管内容物を持たない 5 個体を 99.5%エタノールで固定して冷凍保存後、ホモジナイズして DNA 抽出キット(Isoplant ; ニッポンジーン)を用いて DNA 抽出した。16SrRNA 遺伝子 V4 領域(310bp)を PCR 法により増幅し、電気泳動を行った。精製キット(NucleoSpin Gel and PCR Clean-up ; タカラバイオ)を用いて精製し、NanoDrop を用いて濃度測定、調整をした。サンプルは生物技研(株)のアンプリコンシーケンスサービスを利用してシーケンス解析され(Miseq ; Illumina 社)、バクテリア相を同定した。*Macandrewella* 属は 2016年、慶良間列島沖でそりネットによって採集した。*Cephalophanes* 属同様に消化管内バクテリア相を同定した。眼の微細構造はグルタルアルデヒド、オスミウム酸の二重固定後、超薄切片を作成して透過型電子顕微鏡で観

察を行なった。

(2) 外洋浮遊性カイアシ類の消化管内細菌相の比較： 2010年、相模湾にて MTD ネットを用いて浮遊性カイアシ類を採集し、速やかに-80°C で凍結した。解凍後、対象種として Bradfordian family に属する *Scottocalanus helenae*, *S. securifrons* とこれに属さない *Pleuromamma xiphias*, *Spinocalanus magnus* の消化管内容物を有する成体雌を選別した。選別個体を滅菌人工海水で洗浄後、消化管を摘出して3個体分を合わせて1試料とし、DNA抽出後、抽出DNAを鋳型として 515f/806r のプライマーペアを用いて 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅を行なった。MiSeq (Illumina)により生成された PCR 産物のシーケンシングを行い、解析プログラム mothur を用いてシーケンスデータを解析して細菌相を明らかにした。

(3) カイアシ類のキチナーゼ： *Cephalophanes refulgens* 3 個体、フグウオジラミ 1 個体から total mRNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析を行った。次世代シーケンサーの RNA-seq 解析で得られた配列をさらにパスウェイ解析に供した。

(4) フグウオジラミ体表の細菌相：フグウオジラミの消化管を除去したものを寒天上に塗布し、コロニーを形成した細菌を分離して、16S rRNA 遺伝子を用いた細菌の同定を行なった。また、体表のホモジネートからマリンアガー2216 (Difco)で細菌を分離し、さらに(1)同様にキチン分解能を有する株について、16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域について PCR を用いて増幅し、Illumina Miseq で 10000 シーケンス分の解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 光感受器を持つ浮遊性カイアシ類と細菌の関係：*Cephalophanes* の消化管内容物から検出された菌株は *Photobacterium angustum*, *Vibrio* spp.、*Pseudoalteromonas* sp., *Enterovibrio* sp.であった。*Photobacterium* 属は発光することが知られている。これら細菌の多くがキチン分解性を示したことから、細菌は基質となるデトリタス上でキチンを分解しながら増殖、発光し、その発光をカイアシ類が発達した眼で感知、摂取する可能性があることが再確認された。一方、消化管内容物に含まない個体のメタゲノム解析結果では、

消化管内菌である Enterobacteriaceae、Shewanella 属、Sphingomonas 属が一定の割合で検出された(図1)。消化管内容物の分離法による結果とは異なり、発光性 *Photobacterium* 属の割合は<0.1%であるため、発光細菌は糞として排出されるか、あるいは消化される可能性がある。*Sphingomonas* 属はキチン分解酵素を持つことが知られており、どの個体数からも一定割合で検出されていることから餌として取り込まれたデトリタスのキチン分解に関与している可能性がある。消化管前端部盲嚢に蓄積していた物質 ACB は GCMS 分析によってキチン(図2)と同定され、後方で消化されて低分子化して液状

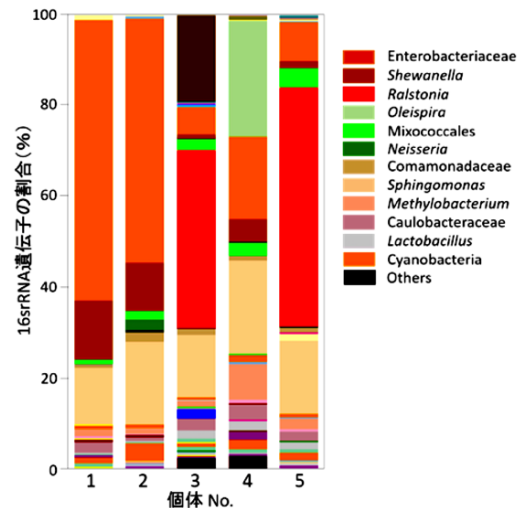


図1. *Cephalophanes* 5 個体の消化管内容物に含まない細菌相。

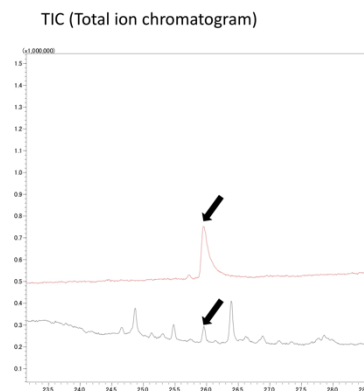


図2. ACB の GCMS 分析. 赤は標品グルコサミン. 保持時間は一致。

となったものが蠕動運動で前方に送られて、再度高分子化、固形化して貯蔵されたと推測される。*Macandrewella stygiana* の消化管内からはキチン分解菌で *Vibrio* 属、*Photobacterium* 属が検出された。これらの属の培養可能株が消化管内には少なくとも 10×10^5 細胞以上存在した。本種も *Cephalophanes* 属同様に発光バクテリアの付着したデトリタスを摂餌している可能性が示唆された。眼の構造としては、体表クチクラの肥厚による凸レンズ(おおよそ縦 $100 \mu\text{m}$ × 横 $70 \mu\text{m}$ 、厚さ $40 \mu\text{m}$)を有し、単眼には 15 個の桿体細胞があり、光軸は下からの光源を検出するような配置になっていた。

(2) 外洋浮遊性カイアシ類の消化管内バクテリア相の比較： 全種から Planctomycetes と Cyanobacteria の 2 門に近縁な遺伝子配列が検出された。これらのグループの高頻度は摂食したマリンスノーなどの凝集物に由来すると考えられる。発光性バクテリア *Photobacterium* 属、*Shewanella* 属、*Vibrio* 属の割合は、消化管に赤い色素を持つ *S. helenae*、*S. securifrons* において、半透明な消化管を持つ *P.*

xiphias、*S. magnus* より有意に高かった(図 3)。多くの海洋細菌の発光の波長ピークは約 490 nm であるが、赤い色素はこの波長を効果的に吸収する。

Scottocalanus の赤い消化管(図 4)は、デトリタスとともに摂食したバクテリアの発光を視覚捕食者から

隠蔽するためと推測された。

Ruegeria の割合は *S. magnus*

でのみ高かった。こ *Ruegeria* の仲間は植物プランクトンに共生することが知られ、*S. magnus* が phytodetritus を主要な餌としているためであろう。消化管内バクテリア相はデトリタス食性カイアシ類のニッチ分割の様相を反映していると考えられる。

(3) カイアシ類のキチナーゼ： *C. refulgens* から検出された 3 遺伝子は、シオダマリミジンコの *chi2*、6 および 10 と、フグウオジラミ由来の 4 遺伝子はサケウオジラミ由来の AJD87505.1、AIE45496.1、AIE45495.1 およびシオダマリミジンコ *chi6* と最も高い相同性を示し、個体内で複数のキチナーゼ・アイソザイムが発現すると示唆された。次世代シーケンサーの RNA-seq 解析で得られた配列をパスウェイ解析に供したところ、chitin

の分解および合成経路に関与する数種酵素が確認された。キチンは chitinase (EC. 3. 2. 1. 14) により chitobiose に分解し、さらに hexosaminidase (EC. 3. 2. 1. 52) により GlcNAc まで分解する。一方、GlcNAcN-acetylglucosamine kinase (EC 2.7.1.59) によって GlcNAc-6P に変換後、phosphoacetylglucosamine mutase (EC 5.4.2.3) により GlcNAc-1P に変換される。さらに UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase (EC. 2. 7. 7. 23)により UDP-GlcNAc(Uridine diphosphate N-acetylglucosamine) に変換され、最終的に chitin synthase (EC. 2. 4. 1. 16) により chitin が合成される。*C. refulgens* では、キチンの分解および合成に関与する数種酵素が発現していることが示唆された。

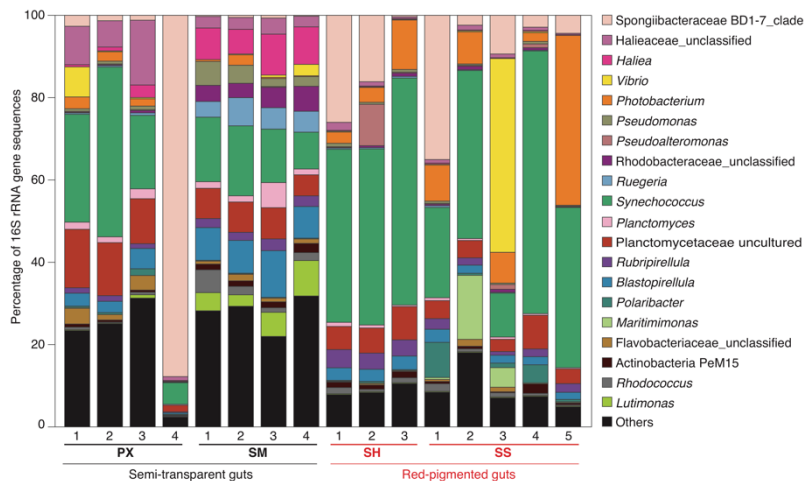


図 3. 中層性カイアシ類に付随するバクテリア相. PX: *P. xiphias*; SM: *S. magnus*; SH: *S. helenae*; SS: *S. securifrons*.

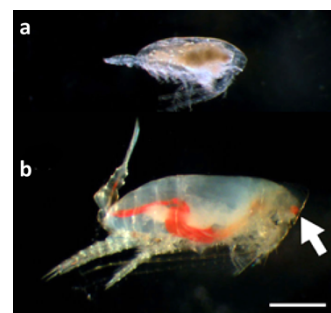


図 4. a: *S. magnus*; b. *S. securifrons*. 発達した単眼を持つ(矢印). Scale = 1 mm.

(4) フグウオジラミ体表の細菌相：フグウオジラミ全体からは約 100 株の細菌を分離し、16S rRNA を用いた同定した結果、相動性が 96% の *Roseobacter* sp. が存在したものの、TTX 能を持ち、既報の配列を持つ本属種の発見には至らなかった。消化管を除去し、キチン親和性、キチナーゼを持つ株を分離、同定した結果、*Enterovibrio calviensis*、*E. norvegicus*、*Pantoea* sp. *Aquimarina pacifica* などの株が同定された。前二種は魚類の腸内菌として知られる。しかし、TTX 産出能のある細菌や病原性細菌の出現が確認されなかった。この理由としては、季節的な要因、宿主の健康状態、宿主の毒性の相違などが考えられ、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件) (全論文査読有)

- 1) 大塚攻・平野勝士・宮川千裕・近藤裕介・菅谷恵美・中井敏博・高田健太郎・福島英登・大場裕一・三本木至宏・浅川学・西川淳. 印刷中. 海洋動物プランクトンと細菌の関係(総説). 日本プランクトン学会報.
- 2) 大塚攻・宮川千裕・平野勝士・近藤裕介. 2018. 魚類の寄生性カイアシ類の表在生物：ユニークな付着基盤. タクサ 45; 48-60
- 3) Ohtsuka S. Madinabeitia I, Yamashita H, Venmathi Maran BA, Suarez-Morales E, Ho J-s. 2018. Planktonic phases in symbiotic copepods: a review. Bull Southern California Acad Sci 117; 104-119.
- 4) Ohtsuka S., Nishikawa J, Boxshall GA. 2018. A new species of *Peniculus* (Copepoda: Siphonostomatoida) parasitizing mesopelagic myctophid fish; first discovery of colonization of the genus in deep water. Parasite 25, 58. DOI: 10.1051/parasite/2018057
- 5) Ohtsuka S. Shimono T, Hanyuda T, Shang X, Huang C, Soh HY, Kimmerer W, Kawai H, Itoh H, Ishimaru T, Tomikawa K. 2018. Possible origins of planktonic copepods, *Pseudodiaptomus marinus* (Crustacea: Copepoda: Calanoida), introduced from East Asia to the San Francisco estuary based on a molecular analysis. Aqu Inv 13: 221-230. DOI: 10.3391/ai.2018.13.2.04
- 6) Venmathi Maran BA, Suarez-Morales E, Ohtsuka S., Soh HY, Hwang UW. 2016. On the occurrence of caligids (Copepoda: Siphonostomatoida) in the marine plankton: a review and checklist. Zootaxa 4174: 437-447. DOI: 10.11646/zootaxa.4174.1.27
- 7) Venmathi Maran BA, Cruz-Lacierda ER, Ohtsuka S., Nagasawa K. 2016. New record of Caligidae (Copepoda, Siphonostomatoida) from the Philippines. Zootaxa 4174: 237-248. DOI: 10.11646/zootaxa.4174.1.16

〔学会発表〕(計 15 件)

- 1) 大塚攻. プランクトン群集における寄生・共生の機能. 2019 年度日本プランクトン学会春季シンポジウム, 東京都, 2019 年 3 月.
- 2) 大塚攻・宮川千裕・大川内浩子・平野勝士・近藤裕介. 寄生性カイアシ類の表在生物群集—ユニークな付着基盤—. 日本動物分類学会第 54 回大会, 鹿児島市, 2018 年 6 月.
- 3) Hirano K, Takada K., Fukushima H., Nakai T., Sambongi T, Ohtsuka S. Can a deep-sea copepod trophically utilize bacterial bioluminescence and chitinolysis? PICES-2018, Yokoyama, October–November 2018.
- 4) Ohtsuka S. Planktonic phases of symbiotic copepods, with a special reference to Caligidae, International Conference on Agriculture, Animal Sciences and Food Technology, Terengganu, October 2018 (invited)..

- 5)Fuji T, Ohtsuka S, Kondo Y, Kaji T, Tasumi S. Functional morphology of the cephalothoracic sucker of *Caligus*. 3th International Conference on Copepoda, Los Angeles, July 2017.
- 6)Hirono K, Ohtsuka S, Takada K, Fukushima H, Nakai T. Trophic interactions between bacteria and Bradfordian families. 3th International Conference on Copepoda, Los Angeles, July 2017.
- 7)Ohtsuka S. Planktonic phases of symbiotic copepods. 13th International Conference on Copepoda, Los Angeles, July 2017 (invited).

〔図書〕（計 1 件）

- 1)Ohtsuka S, Nishida S. 2016 Copepod diversity in Japan: recent advances in Japanese copepodology. In: Motokawa M, Kajihara H (eds), Species Diversity of Animals in Japan, Springer, Japan, pp.565-602.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：浅川学

ローマ字氏名：(ASAKAWA, manabu)

所属研究機関名：広島大学

部局名：生物圏科学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：60243606

研究分担者氏名：中井敏博（平成 28(2016)年度～平成 29（2017）年度）

ローマ字氏名：(NAKAI, toshihiro)

所属研究機関名：広島大学

部局名：生物圏科学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：60164117

研究分担者氏名：高田健太郎

ローマ字氏名：(TAKADA, kentaro)

所属研究機関名：北里大学

部局名：海洋生命科学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：90455353

研究分担者氏名：福島英登（平成 29(2017)年度～平成 30(2018)年度）

ローマ字氏名：(FUKUSHIMA, eito)

所属研究機関名：日本大学

部局名：生物資源科学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60466307