

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07912

研究課題名(和文)腸内細菌叢の代謝系がアワビの成長差に与える影響の解明

研究課題名(英文) Investigation on effect of microbial metabolism in the gut upon growth of host abalone.

研究代表者

井上 徹志 (INOUE, Tetsushi)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号：10624900

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)：アワビや魚類の種苗生産では、著しい成長差が生じることが知られている。本研究はクロアワビの成長差と腸内細菌叢の関係を明らかにし、成長差を与える腸内代謝系の解明を目的とした。培養法による解析では、アワビが珪藻食から褐藻食へ移行して2週間でアルギン酸分解菌の割合が急激に上昇した。また、アワビの成長が停滞する夏期にビブリオ属のアルギン酸分解菌の割合が低下した。一方、16S rRNA遺伝子に基づく解析では、大・小個体で優占する細菌種に明らかな違いが観察された。さらにトランスクリプトーム解析の結果、藻類由来の多糖分解酵素群の発現に違いは認められなかったが、大・小個体の発現遺伝子には明確な違いが認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種苗生産過程で観察される著しい成長差についての研究は種苗生産技術の開発とともに始まり、生物学的に興味深く、かつ水産業としても重要である。一般に腸内微生物は培養が困難であるが、アワビの腸内細菌叢の中でアルギン酸分解という主要な機能をもつ細菌群は培養可能である。アワビ腸内細菌叢は培養法と非培養法の2つの手法で解析が可能な機能研究のモデルになると期待される。さらに、腸内細菌種間の協調関係はメタゲノムなどの解析では解明できない課題であり、学術的に意義がある。種苗生産過程における著しい成長差は、その要因と対処法の糸口が見つかれば、種苗生産の生産性向上に直結し、水産業界に与える影響は計り知れない。

研究成果の概要(英文)：Juvenile abalones and fish larvae of similar age and under the same rearing conditions often diverge with regards to growth. The goal of this study was to investigate potential correlations between growth and microbiota composition in abalone gut and to investigate microbial metabolic pathways.

We found that the ratio of alginate-degrading bacterial isolates in the gut of abalone *Haliotis discus discus* rapidly increased in two weeks after dietary shift from diatoms to brown algae. In addition, we observed that the ratio of alginate-degrading bacteria belonging to the genus *Vibrio* and the growth rate of host abalones decreased simultaneously in summer. Based on 16S rRNA gene sequences in the metagenome, a distinct difference was observed in the gut microbiota of small and large abalones. Transcriptome analysis of gut extracts revealed distinct differences between small and large abalones, though there were no differences in expression of algal polysaccharide-digestive enzymes.

研究分野：微生物生態学

キーワード：腸内細菌 共生 クロアワビ アルギン酸分解 トランスクリプトーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) “トビ”と“ビリ”その要因

魚類やアワビの種苗生産過程では、著しい成長差が生じることが知られており、成長の優良な個体はトビ、逆に、成長の著しく劣る個体はビリと呼ばれている。この問題を扱った研究は種苗生産技術の開発とともに始まり、生物学的に興味深く、かつ水産業としても重要である。アワビにおいてもこの現象は広く認知されているが、その要因についての研究例はほとんどない。成長差の生じる理由の一つに遺伝的要因が考えられるが、エゾアワビのトビ個体を選抜して継代飼育した研究では、成長率は改善するものの、成長のばらつきは解消せず、成長差は遺伝的要因だけで説明できない。一方、タイセイヨウダラの成長差に関する論文では、腸内細菌叢との相関が示されている(引用文献①)。



図1. クロアワビの成長差

(2) アワビの腸内共生菌

エゾアワビ腸内からアルギン酸を分解する新種の細菌が発見され(引用文献②)、後に *Vibrio halioticoli* と命名された(引用文献③)。この種が嫌気状態でアルギン酸を分解して有機酸を生成することから相利的な消化共生菌の可能性が指摘された(引用文献④)。さらに *Vibrio halioticoli* に近縁な種が、アワビ類などから発見・記載され、このグループはハリオティコリクレードと呼ばれ、消化共生菌として認知された。エゾアワビ腸内から培養される細菌叢ではハリオティコリクレードの細菌が優占することも相利共生を支持したが、メガイアワビの腸内細菌叢を培養を基に長期的に観察した研究では、年間のほとんどの時期でハリオティコリクレードの細菌が優占していない結果となった(引用文献⑤)。

(3) アルギン酸分解酵素の多様性と細菌間の協調の可能性

アルギン酸は β -D-マンヌロン酸(M)と α -L-グルロン酸(G)から成る、褐藻類の主要多糖である。高分子にはマンヌロン酸ブロック(polyM)、グルロン酸ブロック(polyG)、MとGが交互または不規則につながったブロック(polyMG)が存在し、複雑な構造となっている。アルギン酸を分解するアルギン酸リアーゼもアルギン酸の構造の複雑さに対応して、多様な酵素群が報告されており、7つのファミリーに分類されている。アルギン酸リアーゼには、polyM、polyG、polyMGに特異的に反応するもの、また糖鎖を端から分解するエキソ型、糖鎖を中ほどからランダムに分解するエンド型が存在し、基質特異性の異なる酵素間には相乗効果が期待される。アルギン酸リアーゼの多様性と酵素間の相乗効果はアルギン酸分解菌の最適な組合せがあることを想起させ、さらに分解菌間の互惠関係が存在する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究はクロアワビの成長差と腸内細菌叢の関係を明らかにし、成長差に関係する腸内代謝系の解明を目的とした。宿主の成長などの健康状態と腸内細菌叢の相関がこれまで多数報告されているが、その因果関係を解明した例はほとんどない。我々はアワビの餌である褐藻類の主要多糖であるアルギン酸の分解系に注目し、培養法と非培養法でアワビ腸内細菌叢の解析を進めた。多様な分解菌による効率的なアルギン酸分解がアワビの成長に有利に働くという仮説の検証を目指した。

3. 研究の方法

(1) アワビの成長差の把握と培養法による腸内細菌叢の解析

長崎市水産センターにおけるクロアワビの種苗生産過程は、11月から12月に採卵・受精、その後付着珪藻を与えて海上で飼育、4月に稚貝を一旦回収し、餌を珪藻からワカメなどの褐藻類に変えて陸上の水槽での飼育となっている。4月に陸上飼育を始めた同一水槽のアワビ種苗を対象に、1ヶ月ごとに200個体の殻長・殻幅を翌年の1月まで測定し、着底後約1年間のアワビの成長を追跡した。着底から約1年間のアワビの殻長・殻幅測定並びにサンプリングは2017、2018、2019年度にそれぞれ行った。殻長の上位5%を成長優良個体(以下、大個体と呼ぶ)、下位5%を成長不良個体(以下、小個体と呼ぶ)とし、大個体、小個体の各3個体を腸内細菌叢の解析に用いた。一つの飼育槽には4月に3-5万個体のアワビが投入されるので、サンプリングによる影響は軽微であると考えている。腸内細菌叢の解析は、4月以降2ヶ月に1回を基本に行った。アワビ個体別に消化盲嚢を含む消化管を取り出し、消化管内容物懸濁液を作成し、適宜希釈後に平板寒天培地に植菌して生菌数、並びにアルギン酸分解菌数を計測した。同時に、ランダムに32コロニーを選抜し、純化、単離株作成を行った。得られた単離株について、各種糖質(アルギン酸、セルロース、寒天、デンプン)に対する分解能を判定した。アルギン酸分解能を示した単離株については、16S rRNA 遺伝子の部分配列による種同定を行った。

(2) 次世代シーケンシングによる解析

同齢でありながら飼育サイズの異なるアワビの大個体、小個体を採集し、解剖後に中腸腺組織を回収した。中腸腺組織は二分し、片方は中腸腺画分、他方はピンセットで内容物を押し出して消化盲嚢内容物画分とした。大個体、小個体の中腸腺画分、同じく大個体、小個体の消化盲嚢内容物画分それぞれより QIAGEN 社の RNeasy PowerBiofilm kit を用いて RNA を、QIAGEN 社の DNeasy PowerSoil kit を用いて DNA をそれぞれ回収した。RNA に関しては、CloneTech 社の SMARTer stranded total RNA-seq kit for Illumina を用いて total RNA-seq 用のシーケンスライブラリーを構築し、DNA に関しては定法により 16S リボゾーム RNA の多様性領域を PCR 増幅し、amplicon-seq 用シーケンスライブラリーを構築した。得られたライブラリーは Illumina 社の MiSeq を用いてシーケンス情報を得た。Amplicon-seq のシーケンスは、QIIME2 を用いて Naive Bayes 法による細菌叢解析を行った。Total RNA-seq のシーケンスに関しては、Trinity を用いてアセンブルを行った後、RNAmmer を用いてリボゾーム RNA 配列を分離した後、分離されたリボゾーム RNA については QIIME2 を用いた Naive Bayes 法による菌叢の classification を行った。リボゾーム以外の配列については、構造遺伝子候補として Blast による同定を行った。それぞれの配列はマッピング用のレファレンス配列として用い、シーケンサーから出力されたリードを、Bowtie2 を用いてマッピングすることで定量情報を得た。

4. 研究成果

(1) 培養法による腸内微生物叢の解析

着底後約1年間のアワビの成長を追跡したところ、年度毎に平均値の違いはあるものの、8月から10月にかけて平均殻長がほとんど変わらず、夏期にアワビの成長が著しく停滞し、10月以降に成長が著しく改善することが毎年観察された(図2)。培養法による腸内細菌叢の解析では、予想に反して腸内細菌叢が月間で大きく変動することが明らかとなった。大個体と小個体の腸内細菌叢にも違いが見られたが、その違いは年間で大きく変動していた。特筆すべき点は、アワビの成長が停滞する夏期にビブリオ属のハリオティコリクレードに属するアルギン酸分解菌の割合が低下することが明らかとなったことである(図3)。これは宿主の成長と腸内細菌叢の相関を経時的に明らかにした点で重要な知見となった。

また、アワビの食性が珪藻食から褐藻食に変わる前後での腸内細菌叢を解析したところ、腸内からの単離株のうちアルギン酸分解菌の割合は、褐藻食開始2週間で急激に上昇していた。ビブリオ属のハリオティコリクレードに属するアルギン酸分解菌は食性が褐藻食に変わる前から少ないながらも存在し、その後種数、生菌数とも増加することがわかった。

培養法による腸内細菌叢の解析では、ビブリオ属のハリオティコリクレードに属するアルギン酸分解菌が宿主であるアワビの成長に正の効果を与える可能性が指摘された。

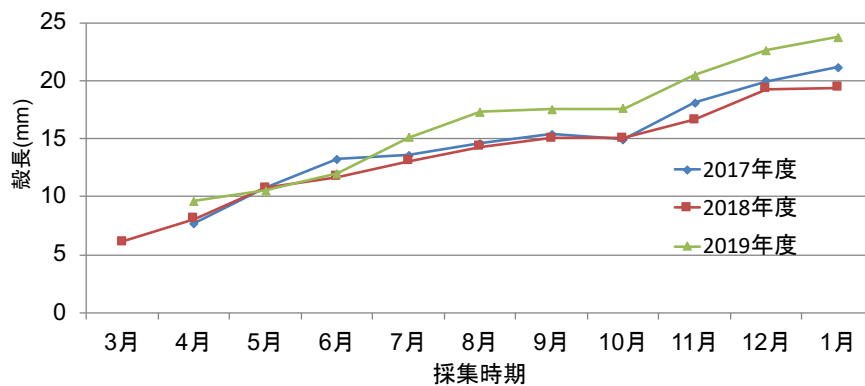


図2. クロアワビの平均殻長の推移 (各サンプリング n=200)

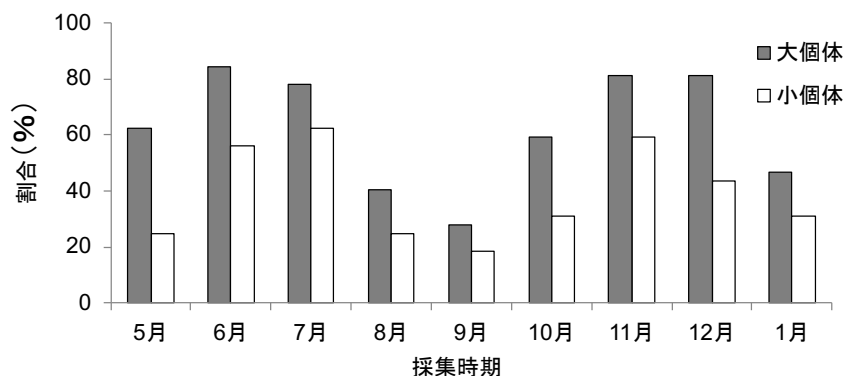


図3. ハリオティコリクレードに属する単離株の割合の推移

(2) 次世代シーケンシングによる微生物叢解析とトランスクリプトーム解析

Total RNA-seqの結果は、大個体に特異的な細菌として Terasakiellaceae 科細菌の未培養細菌に近縁の細菌が存在することが示された。一方、アワビの食餌に多く含まれるアルギン酸を分解する種が含まれる Vibrionaceae 科の細菌は、予想された大個体ではなく小個体の方に多く見出された。ほぼ同じ傾向は amplicon-seq の中腸腺画分を用いた結果でも示されたが、Terasakiellaceae 科細菌の未培養細菌は検出されず、その上位分類である α プロテオバクテリア門に属する細菌が大個体に多く見出されるという結果が得られた(図4)。大個体と小個体で腸内細菌叢に違いがあるという結果は、培養法での結果と一致するが、培養法で指摘された、ビブリオ属のハリオティコリクレードに属するアルギン酸分解菌の大・小個体での違いは検出できなかった。

一方、Total RNA-seq による構造遺伝子の発現パターンの解析においては、予想されていたアルギン酸分解酵素およびそれが属する polysaccharide lyase に属する遺伝子はこれまでの解析で検出されなかった。ただし、ムチン様タンパク質と複数の未知タンパク質の発現量が小個体と大個体の間で有意に異なっていることが見出された。なお、細菌叢解析の解像度と未知タンパク質の同定に関しては解析条件の検討による改善が現在進行中である。

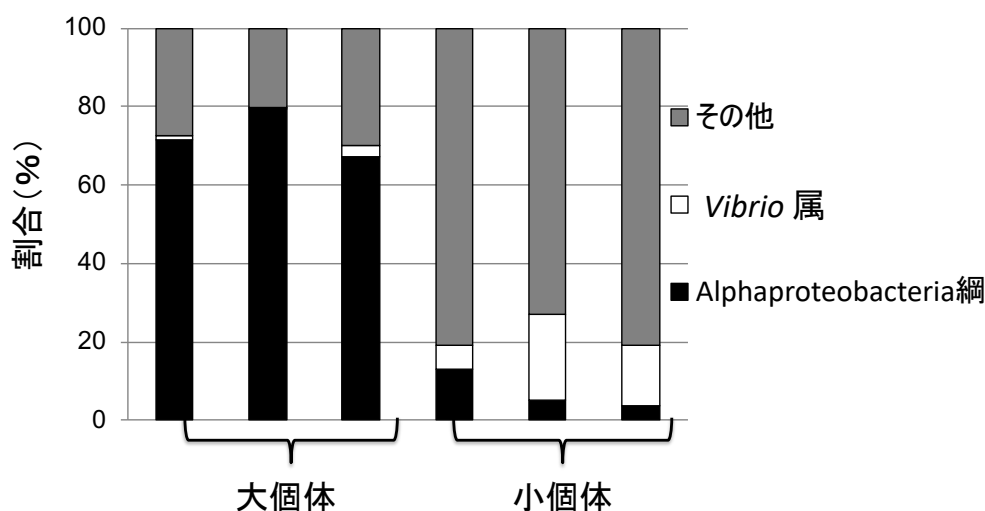


図4. 16S rRNA遺伝子に基づく腸内細菌叢の構成

<引用文献>

- ①Forberg, T., Sjulstad, E. B., Bakke, I., Olsen, Y., Hagiwara, A., Sakakura, Y. and Vadstein, O.: Correlation between microbiota and growth in Mangrove Killifish (*Kryptolebias marmoratus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Sci Rep*, 6, 21192 (2016).
- ②Sawabe, T., Oda, Y., Shiomi, Y. and Ezura, Y.: Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of sea urchins and abalones. *Microbial Ecology*, 30, 193-202 (1995).
- ③Sawabe, T., Sugimura, I., Ohtsuka, M., Nakano, K., Tajima, K., Ezura, Y. and Christen, R.: *Vibrio halioticoli* sp. nov., a non-motile alginolytic marine bacterium isolated from the gut of the abalone *Haliotis discus hannai*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 573-580 (1998).
- ④Sawabe, T., Setoguchi, N., Inoue, S., Tanaka, R., Ootsubo, M., Yoshimizu, M. and Ezura, Y.: Acetic acid production of *Vibrio halioticoli* from alginate: a possible role for establishment of abalone-*V. halioticoli* association. *Aquaculture*, 219, 671-679 (2003).
- ⑤Tanaka, R., Shibata, T., Miyake, H., Mori, T., Tamaru, Y., Ueda, M. and Bossier, P.: Temporal fluctuation in the abundance of alginate-degrading bacteria in the gut of abalone *Haliotis gigantea* over 1 year. *Aquaculture Research*, 47, 2899-2908 (2016).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	守屋 繁春 (MORIYA Shigeharu) (00321828)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・専任研究員 (82401)	
研究協力者	植田 篤 (UEDA Atsushi)		
研究協力者	平田 佑 (HIRATA Yu)		