

令和元年6月20日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19389

研究課題名(和文) 海洋性無脊椎動物の体液に宿る特異微生物の生理生態学的機能解明への挑戦

研究課題名(英文) Physiological and ecological characterization of coelomic fluid microbiota of marine invertebrates.

研究代表者

中川 聡 (Satoshi, Nakagawa)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：70435832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：海洋性無脊椎動物は様々な微生物と共生している。棘皮動物の体腔液にはユニークな微生物が優占しており注目を集めている。それらは、宿主動物の健康状態に大きな影響をおよぼす可能性があるが、その性状に関する知見は皆無である。本研究において、我々はマヒトデの体腔液微生物をマルチオミクス解析した。飼育前の個体では、Thiotrichales目の微生物やHelicobacter関連微生物が優占して見出されたが、特定の飼育実験個体において、Thiotrichales目微生物の急激な増殖が観察され、少なくともThiotrichales目の微生物については飼育実験を通じて、その性状を解明できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトデの体腔液に優占する特異微生物に関する新たな知見を得た本研究は、“海のギャング”と呼ばれるヒトデ類の画期的対策・利活用法を創出し、水産業の持続的発展に益するものである。ヒトデの莫大な廃棄コストや食害は全国の水産業喫緊の課題である。本研究を起点として、ヒトデの体腔液(微生物)を作用点とする制御法や関連する生理活性物質の利活用法を創出することが可能である。加えて、ヒトデの体腔液微生物がヒトの病原菌近縁種であることは、安全・安心な水産資源の持続的生産にむけた対策の必要性を示唆するが、本研究はその礎となると期待される。

研究成果の概要(英文)：Marine invertebrates associate with a diversity of microorganisms. We previously reported the dominance of phylogenetically unique microorganisms in coelomic fluid (CF) of echinoderms, namely, the fluid filling the main body cavity. The CF microbiota potentially impacts host health and disease, however, little is known about their physiological or ecological characteristics. In this study, we analysed the CF microbiota in a common coastal starfish species, *Asterias amurensis*. Before the rearing experiments, CF microbial communities in most starfish individuals were found to be dominated by the Thiotrichales or uncharacterized Helicobacter-related taxon. During rearing experiments, we found that members of the order Thiotrichales rapidly became the most dominant taxa in many starfish individuals, suggesting that CF specific Thiotrichales could be characterized in detail through rearing experiments.

研究分野：微生物生態学

キーワード：共生微生物 無脊椎動物 沿岸域

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海洋性無脊椎動物は、海洋に生息する全動物バイオマスの半分以上を占めると見積もられており、海洋生態系において極めて重要な役割を担っている。海洋性無脊椎動物の中でも、海綿、サンゴ、ダンゴイカ、化学合成生態系の固有生物を対象として、それらに共生する微生物の多様性や進化・生理機能に関する研究が活発に行われてきた。それらモデル無脊椎動物において、共生微生物は、宿主の栄養獲得を助けるのみでなく、行動を規定し免疫機能の一部を担うなど、宿主の生存に必要不可欠であることが明らかとなっている。加えて、海綿においては、共生微生物が産生する二次代謝産物の中から抗腫瘍活性が見出されるなど、共生微生物の特殊機能は医療・製薬等へ応用展開可能であると期待が高まっている。これらは、海洋性無脊椎動物と微生物の共生に関する知見を深めることが、宿主・微生物の生態理解につながるのみならず、人間生活に直接的な恩恵をもたらし得ることを示唆している。海洋には極めて多様な無脊椎動物が生息し、それらが有する共生器官や共生する微生物の種類も多様だが、これまでの研究は一部のモデル生物に集中しており、とりわけ棘皮動物において共生微生物に関する知見は大変少ない。

過去の研究において、海洋性無脊椎動物が共生微生物を宿す器官として、一般にエラや消化管が主に注目されてきたが、本研究では海洋性無脊椎動物の体内を満たす体腔液に注目している。無脊椎動物の体腔液は、人でいう血液とリンパ液を合わせたものに相当する。免疫活躍の場であり、様々な抗菌物質が見出される体腔液は、通常(重篤な敗血症でもなければ)誰しも無菌的と考えて疑わない。だが研究代表者らは、ヒトデ・ナマコ・ウニといった様々な海洋性無脊椎動物の体腔液中に、それらの消化管や体表・周辺環境に見られない特異な微生物群が普遍的・恒常的に存在することを発見した。体腔液微生物の種類は、宿主の種類、個体差や地域差の影響を強く受けるが、特に北海道のマヒトデ(北海道だけで年間1,700トン廃棄。ホタテや北寄貝を食い荒らす“海のギャング”)の体腔液は、ヒトの胃癌原因菌として知られるピロリ菌の近縁細菌が優占するなど、極めて特異な新奇微生物群を宿しており、その生理生態学的性状の解明は喫緊の課題であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒトデの体腔液に優占して生息する特異な新奇微生物群の生態・生理機能を解明することにある。これまでの研究において、対象微生物の分離培養には成功していないことから、具体的には、天然および飼育環境下のヒトデにおいて、体腔液中の微生物群集構造の解析と、宿主・共生微生物のゲノムや発現遺伝子を対象とするオミクス解析を組み合わせて実施することで目的を達成する。

3. 研究の方法

微生物の群集構造解析(微生物の種類・多様性)

これまで予備実験を進めてきた北海道の道東を中心にマヒトデを採取し、温度や塩分濃度を変えた様々な飼育条件下で飼育する。飼育しながら体腔液を経時的に調整し、上記の新奇微生物をターゲットとする蛍光プローブを用いた顕微鏡観察(FISH)により、微生物相や量の変化が顕著な試料を選抜する。選抜した体腔液試料における微生物群集構造を解明するため、試料から直接DNAを抽出し微生物の分類マーカー遺伝子である16S rRNA遺伝子のアンプリコン解析(ユニバーサルプライマーで得られたPCR産物を、次世代シーケンサーを用いてディープシーケンシング)を行う。アンプリコン解析において特定の飼育条件下で急激に増殖するといった、特徴的な挙動を示す微生物については、qPCR法を用いて、その量をより正確に定量する。体腔液には宿主細胞と微生物細胞が混在するが、複数回の遠心分離により両細胞を高純度に分取する手法を既に確立している。

時系列発現遺伝子解析(トランスクリプトーム)

上記アンプリコン解析に基づき、特に飼育実験において微生物群集構造の変化が特徴的な試料を選抜し、宿主および微生物細胞の画分からトータルRNAを抽出する。可能な限り高純度なmRNAを得るための工夫として、複数回の遠心分画に加え、ポリTカラム等を用いて宿主と微生物のRNAを分画するとともに、rRNAについては磁気ビーズに結合させ除去する。ランダムヘキサマーを用いてcDNAライブラリを合成し、次世代シーケンサーにより配列を決定するこれらにより、宿主と微生物間の相互作用や協調的な環境応答を担う遺伝子群を網羅的に同定することが可能となる。

4. 研究成果

平成29年度は上記の解析項目のうち、主に体腔液中の微生物群集構造と、宿主と微生物の発現遺伝子について研究をすすめた。これまでの研究において予備実験を進めてきた北海道東部においてマヒトデを採取し、研究室に持ち帰った計50個体を6種類の飼育条件(温度や塩分濃度が異なる)下において一定期間飼育した。フィールドで調整した体腔液および飼育個体から経時的にサンプリングした体腔液を用いて、様々な培養条件を用いた培養・顕微鏡観察(特にヘリコバクター近縁細菌やThiotrichales目細菌といった、過去にマヒトデ体腔液に特異的かつ優占して検出された性状未知の新奇微生物群を対象としたFISH)に加え、計34試料については直接抽出したDNAを用いて16S rRNA遺伝子のアンプリコン解析を実施した。加えて、選抜した

一部の試料からトータル RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析(宿主および微生物における発現遺伝子の解析)を実施し、宿主微生物間相互作用や協調的な環境応答を担う遺伝子群の同定を進めた。

次に平成 30 年度は、前年度に開始したマヒトデの飼育実験・解析を継続し、上記解析項目を実施した。加えて、本年度も前年度と同サイトにおいてマヒトデを採取し、約 40 個体について様々な条件下で一定期間の飼育実験を行うことに成功した(再現性および実験系自体の評価のため)。前年度と同様に、フィールドで調整した体腔液および飼育個体から経時的にサンプリングした体腔液を用いて、顕微鏡観察・16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析・トランスクリプトーム解析を実施した。これらの解析の結果、解析したマヒトデ体腔液における微生物群集構造は、採取時期によって大きく異なること、特定の飼育条件において未知の Thiotrichales 目細菌の活動が急激に高まることを突き止めた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nakagawa Satoshi, Saito Hikari, Tame Akihiro, Hirai Miho, Yamaguchi Hideyuki, Sunata Takashi, Aida Masanori, Muto Hisashi, Sawayama Shigeki, Takaki Yoshihiro, Microbiota in the coelomic fluid of two common coastal starfish species and characterization of an abundant *Helicobacter*-related taxon, Scientific Reports, 査読有、2017、8764
<https://www.nature.com/articles/s41598-017-09355-2> / DOI: 10.1038/s41598-017-09355-2

〔学会発表〕(計 4 件)

Satoshi Nakagawa, Deep-sea vent bacteria: who's there, what are they doing, and what's new?, Symposium of Integrative Biology: Biodiversity in Asia(招待講演)(国際学会)、2019

中川 聡、海洋の極限環境に生息する微生物の生理生態学的研究、2018 年度海洋若手研究集会(招待講演)、2018

中川 聡、しんかい 6500 の覚悟で臨む海洋(微)生物研究、京都大学 生態学研究センター シリーズ公開講演会 第 9 回(招待講演)、2018

中川 聡、海洋の極限環境に生息する難培養微生物の生理生態的研究、環境微生物系学会 合同大会 2017(招待講演)、2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kanbi.marine.kais.kyoto-u.ac.jp/Site/Satoshi_Nakagawa.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。