

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2017～2019

課題番号：17KT0148

研究課題名(和文)藻食性魚類腸管内微生物の有効活用を目指した海洋生物資源利用に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Studies for useful bacteria and its genome in the gut of herbivorous fishes

研究代表者

秋吉 英雄 (Akiyoshi, Hideo)

島根大学・学術研究院農生命科学系・准教授

研究者番号：20150360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：藻食性魚類と記載の多くは雑食性，デトリタス食性で，藻食に特化した魚類はスズキ目ギンボ亜目イソギンボ科に多く認められ無胃魚であった．同科のヨダレカケとホシギンボ2種間での腸内細菌の種構成についてIllumina Miseqにより網羅的に配列を決定，両種の種構成差は少で，異なる系統の菌種の培養が可能であると推察した．腸内から単離した菌株の全ゲノムシーケンスではVibrio属の2本の環状染色体の再構築を確認，モズク単一食にて飼育後のホシギンボの単離株から得たVibrio属の細菌は，モズク由来フコイダン含有培地でフコイダン分解能力を有すると推察した．本研究の目的である有用遺伝子探索法はほぼ確立した．

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内微生物の研究は，プロバイオティクス機能を有する乳酸菌，機能性タンパク質，消化酵素等が先行し，ヒトの健康に関連した発癌・老化・免疫等の基礎的研究が増加している．一方，海藻を食性とする魚類の腸内微生物の研究は非常に少なく，これらの微生物を利用した研究は，新たな技術革新や応用的側面を内包していると考えられる．この微生物を利用した産業技術開発を行うと共に，「海藻」を食料とする持続可能な循環型社会形成に役立つ新たな資源として位置づけ，ヒトの疾病および健康維持に関連した微生物とその有用遺伝子の探索は，発酵産業の技術革新や健康に関する商品開発(機能性食品開発，疾病予防医薬食品等)へ発展する可能性を有する．

研究成果の概要(英文)：The fishes of having seaweed feeding habits were found in the Blenniidae. The alimentary canal of these fishes was characterized by its stomach less and long intestines. We tested species composition of the intestinal bacteria flora from the two herbivorous fish species by 16S rDNA amplicon sequencing, and found that the difference in species composition between the two fishes was small except several strains of bacteria, suggesting a common bacterial composition in herbivorous fish. Whole-genome sequencing of the two Vibrio strains isolated from the intestine of two herbivorous fishes succeeded to reconstruct two cyclic chromosomes. Vibrio spp isolated from the intestine of stellar rockskipper who had eaten solely Mozuku, a seaweed of the family Spermatochnaceae, appeared to be able to digest Mozuku derived fucoidan. The method for finding useful genes from the herbivorous fishes, that is the purpose of this study, was almost established.

研究分野：実験病理学

キーワード：藻食性魚類 腸内微生物 微生物培養 海藻多糖類 メタゲノミクス 次世代シーケンス 消化器系臓器

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

魚類の消化器系臓器は、食物を捕捉し咀嚼やろ過を行う摂食器官、食物を分解し消化吸収する食道、胃、幽門垂、腸、肛門までの管状構造を有する消化管、および代謝の中核臓器で胆汁を産生、腸内に分泌する肝臓等(消化管付属器官)の3器官からなる。消化管の中でも硬骨魚類の胃は、胃を有する有胃魚と胃の無い無胃魚に分類されるが、無胃による生理機能は、胃腺が無いことで胃酸の影響を受けず、摂食した食物に付着している分解微生物をそのまま腸内に取り込むことが可能である。長い腸はそれらの微生物との共生環境を可能とする特別な消化管で、食物を分解する微生物の培養器であり、分解に必要な十分な時間を提供する。腸内環境を適切に維持する上で、肝臓が産生する胆汁は微生物の繁殖に関与する重要な要素である。

腸内微生物は、細菌をはじめ真菌やウイルス(バクテリオファージ)、原虫、寄生虫が含まれるが、宿主との関係が重要なのは細菌である。これら微生物の研究は、プロバイオティクス機能を有する乳酸菌、機能性タンパク質(免疫タンパク質、抗菌タンパク質等)、消化酵素、高度不飽和脂肪酸等の研究が先行しており、最近では、ヒトの健康に関連した発癌・老化・栄養・免疫等の基礎的研究が増加している。

藻食性魚類は海藻や珪藻食性に特化した魚のグループであるが、海藻を食性とする魚類の腸内微生物の研究は非常に少なく、これらの微生物を利用した研究は、新たな技術革新や応用的側面を内包していると考えている。

我々は、先行研究において魚類の微生物探索を網羅的に行なった経緯があり、藻食性魚類の一部に特徴的な微生物の存在を確認している。珪藻食性魚類であるイソギンポ科のヨダレカケは、胃の形成が無く、長い渦巻き型の小腸を有している。腸内微生物の培養を行い、珪藻分解性細菌を含む *Pseudoalteromonas* 属の1種やアガロースゲル分解細菌である *Vibrio* 属の1種を単離した。菌体を単一化し、DNAを抽出、16S rDNAを決定、嫌気条件から単離された菌は既知のアガロースゲル分解細菌である *Vibrio alginolyticus* と98%の高い相同性を示した。(特異な草食性魚類の腸管内微生物の探索, 秋吉英雄・川向誠, 島根大学生物資源科学部研究報告 12: 67-68, 2007)。

2. 研究の目的

消化管内に藻類分解微生物を有し、特別な消化管と胆汁産生によって消化管内の環境を維持している藻食性魚類(海藻食・珪藻食)を探索し、消化管内の内容物から腸内に生息する微生物を分類・同定するとともに微生物の培養によって有用な海藻・珪藻分解性微生物を単離する。単離した微生物の生理学的・生化学的特性を明らかにするとともに、微生物に含まれる酵素遺伝子の解析、特に糖質の代謝に関連した有用遺伝子の探索、大腸菌による遺伝子発現、酵素機能の解析を行うことを目的とする。この「微生物」を利用した産業技術開発を行うと共に、「海藻」を食料とする持続可能な循環型社会形成に役立つ新たな資源として位置づける基礎的研究を行う。

副次的には、新規に単離した微生物による発酵産業の技術革新や微生物の腸内環境維持に関連する胆汁成分の解析は、ヒトの整腸作用や吸収機能の亢進等の応用的側面を有していると考えられ、健康に関する商品開発(機能性食品開発、疾病予防医薬食品等)等へ発展する可能性がある。このように、ヒトの疾病および健康維持に関連した微生物とその有用遺伝子の探索を最終目的とする。

本目的を達成するため課題として以下の点を解決する必要がある。

- 真の藻食性魚類の探索。藻食性(藻類食性)と呼ばれる魚類は、単に海藻類の表面に付着している生物やデトリタス(生物由来の死骸など)を食する種類が圧倒的に多く、腸管内微生物の研究においては、胃酸や胆汁による微生物の殺菌を行わない特別な消化管を有する魚類の探索が必須である(秋吉担当)。
- 微生物培養の検討。藻食性魚類の腸内細菌の単離、培地成分に依存した菌種の同定、モズクを食した時の菌叢の変化、16S rDNAの解析、ゲノム解析による酵素遺伝子の検討を行う(川向担当)。
- 未知の藻食性魚類腸内微生物に現行のメタゲノム解析を適用し、腸管内微生物から遺伝子解析までの一連の研究手法の開発が必要である。腸管内微生物の遺伝子配列を網羅的に解読し、系統的多様性と機能遺伝子の同定を行う(吉田担当)。

3. 研究の方法

1) 藻食性魚類の探索(網羅的探索)

先行研究により、ギンポ科、スズメダイ科、ベラ科の魚種が、微生物との共生環境を可能とする特別な消化器系臓器の特徴(無胃、長い消化管、肝臓機能)を有していることから、腸内細菌の培養に適した候補魚種の選別を解剖組織学的に精査した。具体的には光学顕微鏡による小腸の組織学的検討を中心に、微生物の生息状況を小腸前部、中間部および後部での走査型電子顕微鏡にて腸管内を観察することで微生物叢の特性を明らかにした。腸管内に分泌される胆汁酸組成の生化学的検討を行った。

実験的に腸内細菌の培養および次世代シーケンスによる腸内細菌叢解析に適する候補魚種を選定するとともに、候補魚種の飼育方法を確立し、海藻多糖類を多く含むモズクを食させる実験系を策定した。

2) 腸内細菌の培養・菌種の同定・遺伝子解析

藻食性魚類(ヨダレカケおよびホシギンポ)をクリーンベンチ内で無菌的に開腹、腸内容物を

細かく細切して海水希釈液に懸濁した。その一部を LB 寒天培地および Zobell 培地に塗布し、25 °C で 2~7 日程度培養、コロニーの出現を観察後、コロニーを形成した微生物の DNA を抽出、PCR 法で 16S rDNA 領域を増幅させ、その DNA 配列を決定した。

実験的にホシギンポを飼育し、海藻多糖類を多く含むモズクを食させ、その腸内細菌をフコイダン含有培地で培養した。生育した菌を単離し、DNA を抽出、PCR 法で 16Sr DNA 領域を増幅させ、その DNA 配列を決定した。

3) 次世代シーケンスによる腸内細菌叢解析(16S rDNA アンプリコン解析・全ゲノム解析)

藻食性魚類ヨダレカケと雑食性魚類ホシギンポの小腸内容物から DNA を抽出し、16S rDNA V4-V5 領域を増幅して Illumina Miseq により網羅的に配列を決定、魚類腸管内微生物の遺伝子配列を解読することで、その系統的多様性から腸管内細菌叢を明らかにした。さらに、ヨダレカケおよびホシギンポのそれぞれの小腸内容物から培養して単離した菌種から DNA を抽出して、Oxford Nanopore technologies の minION シーケンサーを用いて全ゲノムシーケンスを行い、一連のゲノムアセンブリ・エラーコレクションソフトウェア(Canu, MarginPolish, Medaka)によりそれぞれの全ゲノム配列を再構築し、DFAST で遺伝子領域のアノテーションを行うことで有用遺伝子探索を進めた。さらに、培養を経ずにメタゲノムから直接 PCR で海藻分解酵素の存在を確認する系を模索し、データベース上の既知の海藻分解酵素の配列と合わせて分子系統解析を行うことで、多糖分解活性をもつ海藻分解酵素を同定・アノテーションする実験系を策定した。

4. 研究成果

1) 藻食性魚類消化管の解剖学および組織学的特性

一般的に藻食性魚類と記載されている魚種を網羅的に調べ、そのほとんどが雑食性またはデトリタス食性で、藻食性に特化した魚類は非常に少数であることが明らかとなった。系統分類学的には、棘鱗上目スズキ目ギンポ亜目イソギンポ科に多く認められ、藻食性に特化または雑食性であるが藻食性が主体の魚のグループであった。

イソギンポ科ヨダレカケは、胃の形成が無く、オタマジャクシの腸のような長い渦巻き型の小腸を有していた (図 1)。解剖学的に口側にある消化管起始部は胃様に膨大しているが、同末端部では細く、非常に長く細い形態をもつ両生類オタマジャクシに見られるうずまき様の小腸へと連続していた。肛側の消化管末端部は、明らかに大腸として区分された。組織学的に、消化管起始部の膨大部では複合胞状腺状絨毛壁を認めた。絨毛は微絨毛を持つ単層円柱上皮、杯細胞および固有層からなる粘膜が観察され、通常の胃に見られる胃腺および発達した筋層は認めなかった。消化管中間部の小腸は絨毛の発達を認め、杯細胞および微絨毛を認め、微生物により消化された有機物質を吸収するのに適した消化管構造を構築していた。大腸では、微絨毛および発達した筋層を認めた (図 1)。走査電子顕微鏡の観察では、小腸の管腔内に球状形態の珪藻が充満して観察され、珪藻表面には微生物が付着している像が観察された。

イソギンポ科の 2 魚種(ヨダレカケ・ホシギンポ)を腸内微生物の培養および次世代シーケンスによる腸内細菌叢解析に供した。ホシギンポはモズク単一食にて飼育後、腸内細菌を培養し、細菌の単離・同定を行った。肝臓から産生される胆汁の成分分析は本期間中には完了せず、今後の検討が必要である。

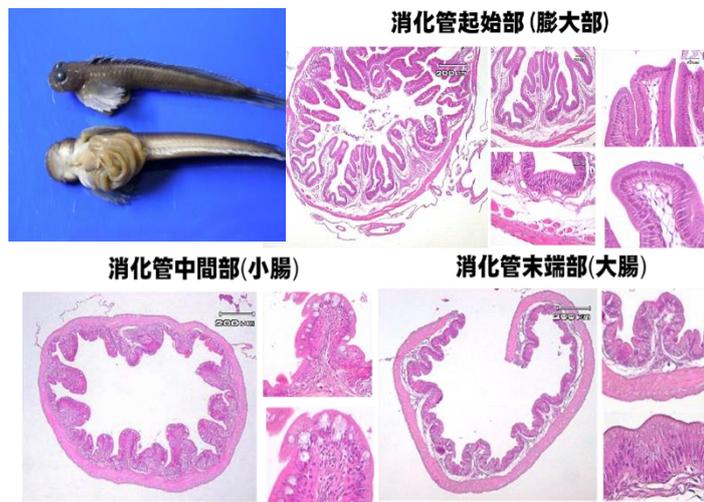


図 1: ヨダレカケは、胃の形成が無く、オタマジャクシの腸のような長い渦巻き型の小腸を有していた。組織学的に、消化管起始部の膨大部では複合胞状腺状絨毛壁を認めた。通常の胃に見られる胃腺および発達した筋層は認めなかった。消化管中間部の小腸は絨毛の発達を認め、杯細胞および微絨毛を認め、微生物により消化された有機物質を吸収するのに適した消化管構造を構築していた。消化管末端部(大腸)では、微絨毛および発達した筋層

2) 腸内細菌の培養・菌種の同定・遺伝子解析

ヨダレカケは、20 株の細菌を単離(LB 培地: 10 株, Zobell 培地: 10 株)した。それらは *Vibrio* 属, *Shewanella* 属, *Pseudoalteromonas* 属の 3 属に集中していた。一方、ホシギンポの単離で得られた株の多くは、*Vibrio* 属, *Shewanella* 属, *Bacillus* 属の 3 属に集中していた。この結果が培地、温度条件等によって偏ってしまったか、消化管内部の菌相をある程度反映しているかの判断は、

メタゲノム解析の結果と照らし合わせる必要がある。*Vibrio* 属については、幅広い種類が単離された。これらの種は他の海洋生物における共生生物としてしばしば単離されるものが多く確認された。

ヨダレカケ由来の菌を Zobell 培地において単離した 3 株(YZOS-01, YZOS-02, YZOS-03)は, Zobell 培地上でテリトリー形成する様子が観察された。ホシギンポの由来の菌を LB 培地で培養した時には, 3 株(HLBS01, HLBS-07, HLBS-08)にて, LB 培地にフコイダンを添加した時に, 異なる株同士間で明確なテリトリー形成が行われ, 境界線ができることを見出した(図 2)。この実験により単離した菌からは寒天分解菌やフコイダンを分解する菌は単離されなかった。

モズクを食したホシギンポの腸内細菌を LB 及び Zobell 培地で培養し, 単離株の 16S rRNA 領域を増幅後, DNA 配列を決定した。それらは, *Vibrio* 属と *Photobacterium* 属の細菌と推定した。モズク由来のフコイタン含有培地における *Vibrio* 属菌培養では, 菌が拡散して増殖した。今回の実験では確認できなかったが, これらの菌株はフコイタン分解能力を有すると推察された。また同培地にて *Vibrio alginolyticus* と *Vibrio parahaemolyticus* と推定される株を隣接して培養すると, 上記と同様に, お互いの株のテリトリーを侵食しないような境界線が認められる現象を認めた。このように, 藻食性魚類の消化管内で *Vibrio* 属同士によるテリトリー争いがあることが推測された。

ヨダレカケ由来の菌株 *Vibrio alginolyticus* YZOS-03 とホシギンポ由来の菌株 *Vibrio alginolyticus* HLBS-07 株の全ゲノム配列を解析に供した。

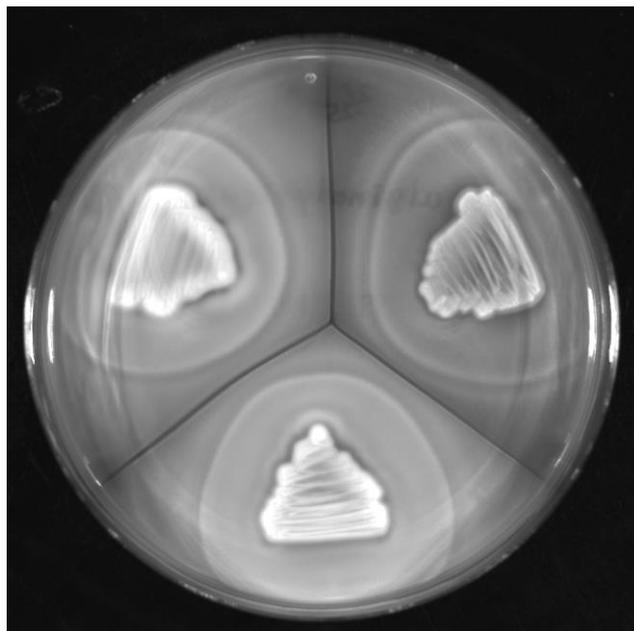


図 2 : *Vibrio alginolyticus* の 3 株を LB 寒天培地上で増殖させた。3 種の株がテリトリーを形成し, まるで人工的に線を書いたように境界線ができている様子を発見した。

左上 HLBS-08 株, 右上 HLBS-01 株, 下 HLBS-07 株

3) 次世代シーケンスによる腸内細菌叢解析(16Sr DNA アンプリコン解析・全ゲノム解析)

ゲノムインフォマティクス解析によって, 腸管内微生物の遺伝子配列を解読し, QIIME2 software にて菌叢の分類を行った。解析モジュールによる 749 本の代表的な細菌の配列と頻度を得, その系統的多様性から腸管内微生物叢(フロラ)を比較した。ヨダレカケおよびホシギンポは, 多数の微生物叢を構成しており, 全体的には 2 種間での共通性は高かった。ヨダレカケのフロラでは, Proteobacteria 門, Spirochaetes 門が優先し, さらに Bacteroidetes 門, Deferribacteres 門, および Verrucomicrobia 門が見出された。宿主の魚種 2 種間での種構成について有意性検定を行った結果, 門レベルでは Tenericutes がヨダレカケに有意に高かった。これは種レベルでは未同定なマイコプラズマ属が優先するためと推測している。さらに属レベルで, ホシギンポに Fusobacteria 門の *Propionigenium* 属, Planctomycetes 門の Pirellulaceae 科が優先すること, ヨダレカケには Spirochaetes 門の

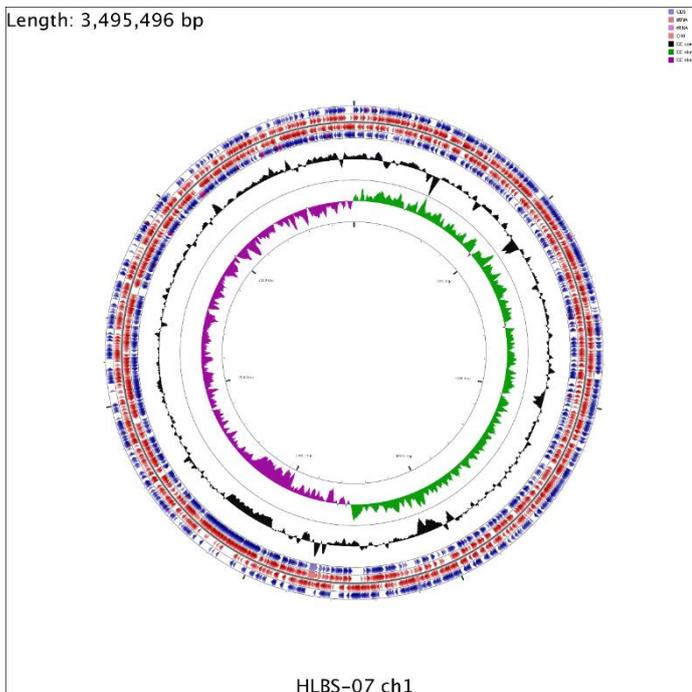


図 3 : *Vibrio alginolyticus* HLBS-07 株の 2 本の環状染色体のうち染色体 1 番の概略。CGview server を用いて図示した。外側より, DFAST による推定遺伝子(+鎖), 推定遺伝子(-鎖), GC 含量, GCskew(+鎖), および GCskew(-鎖)を示す。

Treponema 属が優先種として見出された。これらは難培養性であることから、易培養性の *Proteobacteria* 門の内部では両種では種構成差は少であり、それぞれから異なる系統の菌種の培養が可能であると推察した。最終的に、ヨダレカケおよびホシギンポ小腸内容物から培養、単離した *Vibrio* 属の2菌種の全ゲノム DNA を得ることができ、全ゲノムシーケンスを行った。このデータに基づいた全ゲノム配列を再構築し、一般的な *Vibrio* 属のもつ2本の環状染色体の再構築が確認できた (図 3)。この手法による有用遺伝子探索法はほぼ確立したと言える。培養を経ない網羅的遺伝子探索は本期間中には適用できず、今後の検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 秋吉英雄, 吉田真明, 川向誠	4. 巻 3
2. 論文標題 藻食性魚類に生息する腸管内微生物の産業利用を目指して	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 44-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akiyoshi, H., Lu, Y., Yoshida, M., Kawamukai, M.
2. 発表標題 Microanatomical Visualization of the Alimentary Canals in Small Fishes: Scanning Electron Microscopic Study by De-Wax Technique
3. 学会等名 7th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋吉英雄, 路亜偉, 田部卓磨, 吉田真明, 川向 誠
2. 発表標題 海藻食性魚類におけるプロバイオティクス機能を有する腸管内微生物の探索
3. 学会等名 超異分野学会益田フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋吉英雄, 路亜偉, 田部卓磨, 吉田真明, 川向誠
2. 発表標題 藻食性魚類の腸管内微生物叢に関する研究
3. 学会等名 日本動物学会第89回札幌大会9月
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiyoshi Hideo, Lu Yawei, Yoshida Masa-aki, Kawamukai Makoto
2. 発表標題 Microanatomical visualization of the alimentary canals in small fishes: Scanning electron microscopic study by de-wax technique
3. 学会等名 7th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 秋吉英雄	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版株式会社	5. 総ページ数 800
3. 書名 魚類学の百科事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

DDBJ データベース, タイトル: Vibrio inhabiting the intestinal tract of herbivorous fishes 現在未公開でholdしてある状態です (論文を書くまでに使われないよう) . いずれ論文とともに公開予定
--

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	吉田 真明 (Yoshida Masaaki) (50555498)	島根大学・学術研究院農生命科学系・准教授 (15201)	

6. 研究組織（つづき）

	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	川向 誠 (kawamukai Makoto) (70186138)	島根大学・学術研究院農生命科学系・教授 (15201)	