

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06191

研究課題名(和文) 物質代謝から見た水産養殖におけるプロバイオティクス作用機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of probiotic modes of action in aquaculture from the viewpoint of metabolism

研究代表者

田岡 洋介 (Taoka, Yousuke)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：40437942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：養殖における疾病予防法としてプロバイオティクスが注目されているが、その作用機序については不明な点が多い。本研究では、我々が見出した新規プロバイオティクス乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* K-C2株の生菌体が養魚飼料成分に及ぼす影響を評価した。熱不活化K-C2株のヤマメへの経口投与が、成長、腸内フローラ並びに免疫関連遺伝子に及ぼす影響を評価した。その結果、生菌体K-C2株は配合飼料中の成分組成を改変した。更に生菌体と比較して、死菌体K-C2株はヤマメの成長を促進し、腸内フローラを改変、免疫関連遺伝子群を亢進することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多剤耐性菌などの問題から、薬剤に頼らない養殖技術としてプロバイオティクスへの期待が高まっている。一方でプロバイオティクスの作用機序については不明な点が多い。また通常生菌を飼料に添加し、経口投与する手法が一般的である。飼料メーカーや養殖現場では取扱いの難しい生菌ではなく、死菌の有用性を求めるニーズが高まっている。本研究では、生菌と比較して死菌がヤマメの成長を促進し、免疫応答を刺激することが分かった。死菌プロバイオティクスは飼料加工や流通の観点からも社会実装化しやすく、養殖分野への波及効果は大きい。

研究成果の概要(英文)：In aquaculture, probiotics has bee attracted as an alternative method for disease prevention. However, the mechanism about probiotic effect on aquacultured fish is not clear.

In this study, we evaluated the effect of probiotic lactic acid, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain K-C2 which is selected in our previous study on components in aquafeed. We orally administered heat-inactivated K-C2 to Masu salmon to evaluate the effect on growth, gut microflora and expression of immune-related genes. We confirmed that live cells of strain K-C2 altered components in aquafeeds. And also, heat-inactivated cells enhanced growth of Masu salmon, modified intestinal flora and increased the expression of immune-related genes.

研究分野：応用微生物学

キーワード：プロバイオティクス 物質代謝 養殖 腸内フローラ メタゲノム解析 ヤマメ 免疫関連遺伝子 熱不活化

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界的な人口増加に向けたタンパク源の供給法として養殖業は期待されており、FAO(国連食糧農業機関)もこれに言及している。実際に養殖業は成長産業であり、世界的な生産量は増加の一途を辿っているものの、依然として養殖現場では魚病が頻発している。疾病予防には抗生物質やワクチンが用いられているが、前者は薬剤耐性菌の問題、ワクチンは接種に際する手間の問題が指摘されてきた。これに対し、薬剤を用いない疾病予防法として注目されたのが、“プロバイオティクス”である。プロバイオティクスは宿主生物の健康に寄与する生きて微生物と定義されている(参考文献)。我々人間におけるプロバイオティクスとして汎用されているものが、ヨーグルトに代表される発酵食品中の乳酸菌である。人を含む哺乳動物では、プロバイオティクス投与に伴う腸内フローラの改善と腸内細菌群が産生する飼料由来の二次代謝物のプロファイルが、マイクロバイオームの観点から、蓄積されている。これは人の免疫系が腸内フローラを軸に制御されているという、学術的に新しいアプローチである。魚類も同じ脊椎動物であり、高度な生理・免疫機構を有している。水産増養殖におけるプロバイオティクス機構の解明には、このような腸内フローラと代謝学的な観点での研究を行わずには達成できない。これまで我々は養殖魚を対象としてプロバイオティクス候補菌の探索を行い、新規候補菌として乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* K-C2 株を選抜した。先行研究により、K-C2 株の生菌体をカンパチに経口投与すると、カンパチの腸内フローラが改変され、腸内容物のタウリンなどの遊離アミノ酸が増加することを見出している(引用文献)。

2. 研究の目的

持続的な養殖業を支えるプロバイオティクスの開発には、プロバイオティクス効果のメカニズムを理解し、新たな視点での学術研究、評価法の確立が不可欠である。本研究課題では、腸内細菌フローラの動態と試料由来の二次代謝物に着目し、プロバイオティクスの経口投与が養殖魚に与える影響を評価した。またこれまで生菌体ベースのプロバイオティクス研究が主流であったが、本技術の社会実装化を見据え、死菌体の有効性についても評価した。

3. 研究の方法

(1) 生菌体 K-C2 株が配合飼料成分とコイ及びカンパチの腸内フローラに与える影響

真骨魚の腸は哺乳類の腸内壁に存在するムチン層が見られず、代わりにキチン質のナノファイバーで覆われており、腸内細菌がムチン層に届かないようなバリア機能を有していることが報告されている(参考文献)。腸内にプロバイオティクスが定着しない場合、飼料を分解し腸内フローラを改変するには、給餌後、飼料が腸内を通過し、糞として排泄される短時間に、代謝活性を示す必要がある。これを評価するために、下記の *in vitro* 及び *in vivo* での評価試験を行った。

生菌体 K-C2 株を配合飼料に添加、人工胃腸液に浸漬し、飼料タンパクの分解及び遊離アミノ酸の産生に対する影響を評価した。K-C2 株添加飼料をカンパチ及びコイに一回給餌し、24 時間後、試験魚の腸を摘出した。腸内容物より最近のゲノム DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子 v3-v4 領域を標的に、次世代シーケンサーを用いて腸内細菌フローラを解析することで、単発給餌が腸内フローラに与える影響を評価した。

(2) 生菌体 K-C2 株の経口投与がヤマメの腸内フローラ及び抗病性に及ぼす影響

近年、サーモン類をターゲットにした陸上養殖システム(RAS)を用いた養殖生産が注目されている。このような冷水性魚種でのプロバイオティクス効果を検証するため、宮崎県五ヶ瀬町で養殖が盛んなヤマメを用い、生菌体 K-C2 株の経口投与試験を実施した。30 日間 RAS でヤマメを飼育し、腸内フローラ解析を実施した。飼育後 *Aeromonas salmonicida* を用いた攻撃試験を行い、K-C2 株のヤマメの抗病性に及ぼす影響を評価した。

(3) 死菌体 K-C2 株の経口投与がヤマメの成長、腸内フローラ及び免疫関連遺伝子の発現に及ぼす影響

養殖における疾病予防技術としてプロバイオティクスへの期待が高まる中、生菌体含有飼料の取り扱いづらさが指摘されている。そのため死菌体の有効性に期待が高まっており、本試験では、生菌体及び死菌体 K-C2 株の経口投与効果を比較するために、下記のような試験を行った。

熱処理により不活化させた K-C2 株死菌体をヤマメに経口投与(細胞数: 10^9 /g-飼料)し、26 日間飼育し、生菌体及び K-C2 株未添加区と比較した。飼育後、ヤマメの成長評価を行い、腸内フローラの解析を行った。また鰓、脾臓、肝臓及び腎臓を摘出し、Total RNA 抽出後、cDNA を合成した。この cDNA を鋳型に、成長関連遺伝子(IGF-I)及び免疫関連遺伝子(IFN γ , TNF- α , IL-1 β)の発現量を、リアルタイム PCR を用いて $\Delta\Delta Ct$ 法により評価した。

4. 研究成果

(1) プロバイオティクスの単発給餌がコイ及びカンパチの腸内フローラに与える影響

K-C2 株を添加した飼料では未添加区と比較して、総遊離アミノ酸含量が有意に増加すること

が分かった。メタボローム解析並びに階層的クラスタリング解析により、K-C2 株の配合飼料の添加が、人工胃腸液中の代謝物のプロファイルが大きく変化させることが明らかとなった。特にアルギニンデヒドロゲナーゼ経路を介したシトルリンやオルニチンの増強が確認され、低級脂肪酸の一種であるオクタン酸や神経伝達物質として知られるドーパ、ドーパミンなどが著しく増加することが明らかとなった。

カンパチに於いては、K-C2 株未添加区、添加区共に *Lactococcus* 属の菌群が検出された。無添加区の *Lactococcus* 属はカンパチの病原菌として知られる *L. garvieae* の系統群が多くを占め、添加区では *L. garvieae* とは異なる系統群であった。以上の結果より、K-C2 株は腸管内を通過する数時間内で、配合飼料中の成分を大きく改変することが示唆された。また単発の給餌より、カンパチ腸内の *L. garvieae* の割合を減少させることが明らかとなった。

(2) 生菌体 K-C2 株の経口投与がヤマメの腸内フローラ及び抗病生に及ぼす影響

未添加区のヤマメ腸内フローラにおいて、Spirochaetes 及び Firmicutes が優占種として確認された。未添加区と比較して、K-C2 添加区では Spirochaetes の割合が著しく増加し 97%を示した。

(図1)。飼育試験後の *A. salmonicida* による攻撃試験において、28 日目のヤマメの生残率は未添加区で 40%、添加区で 70%の値を示し、K-C2 添加による疾病予防効果が確認された。

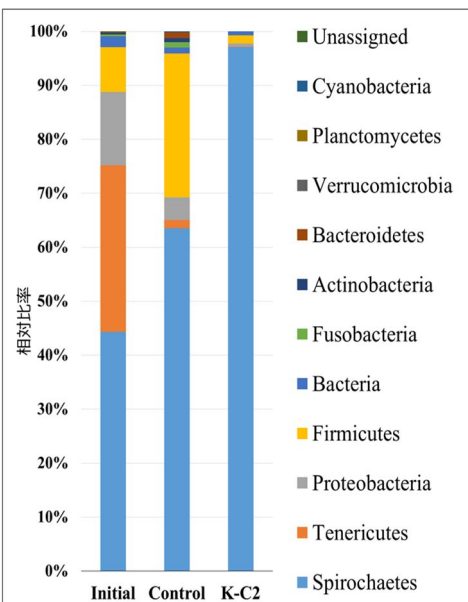


図1. QIIME2.0を用いたヤマメ腸内フローラの解析
Initial: 飼育0日目の試料
Control: K-C2未添加区
K-C2: K-C2添加区

3) 死菌体 K-C2 株の経口投与がヤマメの成長、腸内フローラ及び免疫関連遺伝子の発現に及ぼす影響

未添加区、K-C2 区と比較して、死菌体区に於いて有意にヤマメの成長が促進された。メタゲノム解析の結果、無添加区と比較して、生菌体及び死菌体添加区の腸内細菌フローラでは Tenericutes もしくは Proteobacteria の割合が高まった。多様性解析により、死菌体区は生菌体区と比較して腸内での微生物種が豊富になり、未投与区と比較して、特定の優占種の割合が増加することが明らかとなった(図2)。

リアルタイム PCR の解析結果より、死菌体区において肝臓及び腎臓中の IFN γ の発現が、未投与区と生菌体と比較して高まることが示された(図3)。以上の結果より、死菌体の経口投与は、ヤマメの成長を促進、腸内フローラを改変し免疫関連遺伝子の発現を亢進することが明らかとなった。

代謝活性を有さない死菌体区に於いて、成長が促進され、免疫関連遺伝子の発現が亢進されたことから、K-C2 株の細胞内成分の関与が想定される。今後は、細胞内成分の網羅的解析を行うとともに、成長促進及び免疫関連遺伝子に影響を及ぼす物質の探索を行う予定である。

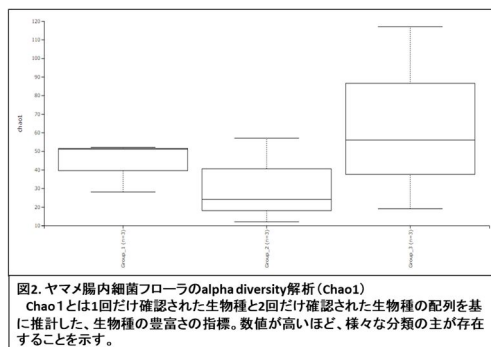


図2. ヤマメ腸内細菌フローラのalpha diversity解析(Chao1)
Chao1とは1回だけ確認された生物種と2回だけ確認された生物種の配列を基に推計した、生物種の豊富さの指標。数値が高いほど、様々な分類の主が存在することを示す。

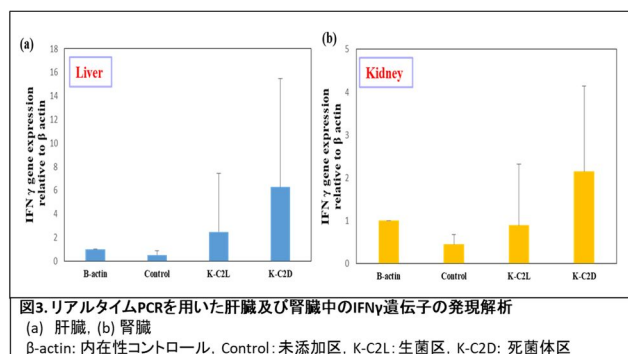


図3. リアルタイムPCRを用いた肝臓及び腎臓中のIFN γ 遺伝子の発現解析
(a) 肝臓、(b) 腎臓
 β -actin: 内性コントロール、Control: 未添加区、K-C2L: 生菌区、K-C2D: 死菌体区

< 引用文献 >

- Fuller R. (1989) Probiotics in Man and Animals. *Journal of Applied Bacteriology*, **66**, 365-378.
Linh et al. (2018) Effect of *Lactococcus lactis* K-C2 on the growth performance, amino acid content and gut microflora of amberjack *Seriola dumerili*. *Fisheries Science*, **84**, 1051-1062
Nakashima et al. (2018) Chitin-based barrier immunity and its loss predated mucus-colonization by indigenous gut microbiota. *Nature Communications*, **9**, 3402.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuki Hayami, Nguyen Thi hue Linh, Yousuke Taoka
2. 発表標題 Enrichment of Lactococcus lactis strain K-C2 on Artemia and inhibition against Vibrio alginolyticus, V. campbellii and V. harveyi by strain K-C2
3. 学会等名 マリンバイオテクノロジー学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yurie Yasaka, Phan Trong Binh, Ryusuke Tanaka, Katsuhisa Uchida
2. 発表標題 Identification and characterization of pathogenic bacteria isolated from dead masu salmon, Oncorhynchus masou masou and antibacterial activity of probiotic Lactococcus lactis strain K-C2 against isolated pathogens
3. 学会等名 マリンバイオテクノロジー学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 田岡洋介, Nguyen Thi Hue Linh	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 6
3. 書名 アグリバイオ	

1. 著者名 田岡洋介, Nguyen Thi Hue Linh	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 6
3. 書名 アグリバイオ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

現在、本研究における成果として、Fisheries Science誌及びAquaculture Science誌（水産増殖）に計2報論文投稿済である、現在査読を受け、校閲中である。また本成果を令和4年度日本水産学会大会秋季大会にて、発表予定である。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------