

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22262

研究課題名(和文) マナマコの資源増産に向けたパイオニア微生物資源の獲得と利用

研究課題名(英文) Studies on echinoderm's microbiome

研究代表者

澤辺 智雄 (Sawabe, Tomoo)

北海道大学・水産科学研究院・教授

研究者番号：30241376

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)：宿主-微生物間相互作用の知見拡充に向け、海洋無脊椎動物の一つのモデルとしてナマコ類に着目し、その初期成長に関連する微生物の解析を進め、1)パイオニア微生物あるいは初期定着微生物群の推定、2)易培養性のパイオニアあるいは初期定着微生物のゲノム情報コレクションの取得、3)棘皮動物付随細菌のMALDI-TOF-MASSデータベースの整備を進め、多くの新知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海洋生物資源の保全是持続可能性社会の形成に欠かせない。それにもかかわらず、多くの海洋動物が人間活動の影響を受け絶滅が危惧されている。マナマコもこれに該当する海洋生物であるが、人工的な種苗生産技術が開発された恩恵により、絶滅を免れている。本研究では、マナマコの初期成長に影響する微生物群の存在を示唆し、今後、資源増産への活用を通じてSDGsへの貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：Using sea cucumber as a model of marine invertebrate, 1) pioneer and/or first colonizer candidates were mined, 2) these bacterial strains and genome data were collected, and 3) these MALDI-TOF-MASS data were accumulated.

研究分野：海洋微生物学

キーワード：水産科学 微生物 増養殖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトを含む様々な動物において、消化管微生物叢やその他の器官組織に付随する微生物群が予想以上に宿主の生理に影響を与え、緊密な関係を有することが次々に明らかにされている (Hooper, 2004; Wopereis et al., 2014; 澤辺・美野, 2016 など)。例えば、ヒトの消化管微生物叢とホストの関係は、“Human Microbiome Project”という巨大な学際的研究プロジェクトのもと、マイクロバイオームの個体差に関する膨大な情報が蓄積され、食餌の分解、肥満、免疫系、脳など、様々な観点からランドマークとなる成果が次々に得られている (Lozupone et al., 2012 など)。この新知見の背景には、永年培われてきた無菌動物実験系の成熟とヒト・ゲノムの解読に加え、近年ヒトと各部位に付随する微生物のゲノム情報を取得する迅速かつ強力な大規模シーケンス解析の発展がある。また、生物は絶えず環境中の微生物から接触を受け、その親和性の時間スケールの長さに応じて、共生や寄生といった強い宿主 - 微生物間相互作用にまで、その関係性は緊密化する。ホロビオンは動的な生命複合体であり、サンゴ共生系において白化などの宿主側の不健全な現象と微生物群との関連性を理解するために適応され、宿主と共生体のゲノム情報の全てを包含した「ホロゲノム (Hologenome)」にまで拡張されている (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2021)。棘皮動物は、個体再生能が高いという、ヒトでは倫理的にも検討することができない、重要な生物学的特徴をもつため、ヒトと進化的起源を分かちあう海洋動物のホロゲノム研究を推進させる意義は極めて大きく、これまでの学術の体系や方向を大きく変革、転換させる潜在性を有する。

棘皮動物は、ウニ類のように、発生生物学の高度なモデルとして活用されている種を含む。組織再生能が高い種も含まれ、組織・器官再生との関連性を検討する上でも格好の生物材料である。特に、消化管や体表の上皮といった環境と接し、複雑な微生物群との接触機会が高い場における栄養獲得や組織再生に与える微生物叢のインパクトは計り知れないものであるが、宿主動物の安定的な飼育の困難さや自然水域に生息する微生物マイクロバイオームの個体差を調べる方法論が欠如していたことが、体系的な成果を得るまでに至れなかった理由の一部である。近年、本研究代表者は、マナマコの消化管微生物叢の個体差を解析する方法論を世界に先駆けて示し、貯蔵性ポリマー合成遺伝子を有する細菌群が成長格差と関連する可能性を示した (Yamazaki et al., 2016)。その後も、天然水域に生息する個体を対象とした消化管微生物叢の形成過程の理解などを進めてきた。また、マナマコの室内飼育系の準備を進め、徐々に安定した成長が達成できるようになった。この技術進展により、マナマコのパイオニア微生物探査、収集そして利用に至る研究を着想し、実施できる準備が整ってきた。

2. 研究の目的

我々哺乳動物は、母体の中で無菌状態を維持して生まれた後、出生とともに複雑な微生物社会の中で、その一生を始める (Hooper, 2004)。新生児は“パイオニア微生物”と呼称される、生まれて初めて自身の上皮組織に定着する微生物と出会い、細胞あるいは分子のレベルで相互に刺激をしい成長や免疫系の成熟など、数年かけて個体の健全性の基盤を築く (Hooper, 2004; Wopereis et al. 2014 など)。消化管におけるパイオニア微生物と宿主との相互作用は、宿主の成長初期の栄養獲得や免疫系成熟に影響する極めて重要かつ動的な一連の過程を含み、最終的には宿主の一生の健全性を支えるホロビオンとして成熟する。次世代シーケンサーを活用したコホート研究により喘息やアトピー性疾患の発症が消化管に定着するパイオニア微生物群の差異によることが示唆されている (Wopereis et al., 2014)。従って、ヒトではこのパイオニア微生物群が個体の一生の健全性維持に重要な要因として注目され、消化管微生物叢の人工的置換や制御が次世代の治療法として期待されている。

無脊椎動物は 6 億年以上の年月をかけ種分化し、既知種は 100 万種を超え、その多くが海洋種である。この群に、我々が見逃している多彩な宿主 - 微生物間の相互作用が埋没していることは容易に想像される。本研究課題で対象としたマナマコは、後口動物の分子系統樹上で、ヒトへと進化する道から深く分岐した棘皮動物に属し、その消化管や体表の微生物叢が宿主の生理に影響していると考えられている (澤辺・美野, 2016)。前述したように、研究代表者らはマナマコの消化管微生物叢の構造と機能を調べ、細菌の貯蔵性ポリマーとして知られるポリヒドロキシ酪酸の合成遺伝子を有する *Rhodobacteriales* 細菌群が、養殖環境で育成されたマナマコの成長格差の一因である可能性を示し (Yamazaki et al., 2016)、マナマコの消化管微生物が宿主の栄養生理へ寄与することを初めて示唆した。

マナマコの増養殖技術基盤は構築されている。しかし、宿主の健全なる成長には、パイオニア微

生物およびそれに続く微生物叢は欠かせない要因であるものの、どのような種類の微生物が、宿主の発達段階のどこで、どのような生理作用を及ぼしているのか、研究例も知見もないことから、本研究ではこれらを理解することを目的とした。ナマコ類は、ヒトと系統を分かちあう動物であり、宿主 - 微生物間相互作用の成立起源を理解する上でも重要である。また、北海道産マナマコは、その食感と外観の雄々しさから、輸出額を着実に伸ばしている次世代の水産物の旗手であり、次世代の水産物資源増産にむけ、マナマコとそれに付随する微生物叢の機能解明および初期成長期に宿主に影響するパイオニア微生物の探査と利用は、鎗矢となる研究課題といえる。

3. 研究の方法

1) マナマコ・パイオニア微生物の発掘

受精卵から人工的に飼育した健全なマナマコを材料とし、種々の発生段階（囊胚期幼生、初期・後期アウリクラリア幼生、ドリオラリア幼生、ペンタクチュラ幼生、着底稚ナマコ）毎に、付随する微生物の meta16S シーケンスを実施した。実施した2年間で、成長のばらつきや生存率に差が観察されたことから、マナマコの健全成長とマイクロバイオームとの関連性も検討した。また、健全成長マナマコ試料に関しては、metagenome シーケンスも実施した。

2) 易培養性パイオニア微生物とそのゲノム情報コレクションの整備

各成長段階の健全成長マナマコから易培養性の株コレクションを収集し、そのドラフトゲノム情報を蓄積した。海水栄養培地を用いて培養・分離を行い、ゲノム配列は Nanopore シーケンサーを用いて決定した。分離株は、超低温フリーザーで保管した。

4. 研究成果

1) マナマコ・パイオニア微生物の発掘

マイクロバイオームは成長段階で異なり、特にアウリクラリア幼生以降で変化が顕著であった。受精卵、アウリクラリアおよびペンタクチュラに特異的に見いだされる微生物群が観察され、これらはそれぞれ、マナマコのパイオニア微生物、アウリクラリア初期定着微生物およびペンタクチュラ初期定着微生物と考えられた(投稿準備中)。研究実施期間中、成長のばらつきと生残率の著しい低下が認められる水槽があり、ここでは数種の微生物群の存在比率が高まる傾向にあった。

2) 易培養性パイオニア微生物とそのゲノム情報コレクションの整備

易培養性パイオニアあるいは初期定着微生物の収集を進め約 250 株を単離し、保存した。これらは約 30 属 40 種以上から構成されていた。この中で、新種候補が 2 種存在しており、新種記載に向けた準備を進めている。さらに、ナマコ株の比較のため、ウニの培養株の取得も進め、MALDI-TOF-MASS データベースの整備も開始し、コレクション充実に向けた迅速同定に活用可能であることを示した(図1)。

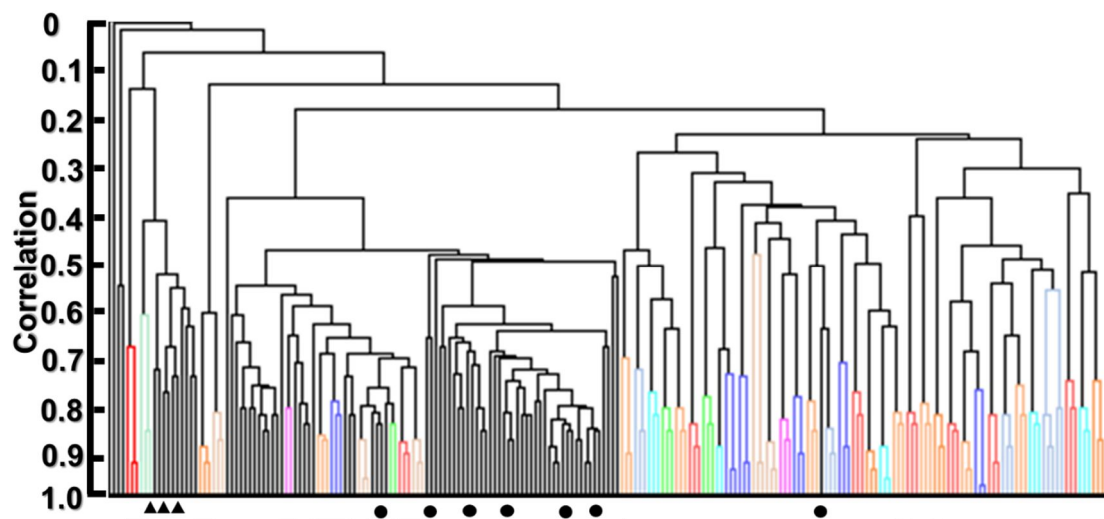


図1. MALDI-TOF-MASS を用いた棘皮動物マイクロバイオーム迅速同定スキームの開発。

3) 消化管再生個体の消化管マイクロバイオーム

天然環境およびラボ飼育したマナマコ個体を用いて、消化管再生時の消化管マイクロバイオーム

ムの変遷と培養分離を進めた。天然個体を用いた実験では 4 か月以内に消化管マイクロバイオーームが消化管摘出前のそれと比較してほぼ再生されていることが示唆された。消化管摘出後、より短期間における消化管マイクロバイオーームの変化を、個体ごとに調べることに成功し、消化管マイクロバイオーームの再形成に至る変化には個体差が存在することも見いだした (Yamazaki et al. 2020)。天然の消化管再生個体由来の菌株の収集も進め、凍結保存を行った。

参考文献

Hooper, L. V. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trend. Microbiol.* doi:10.1016/j.tim.2004.01.001.

Lozupone, C. A. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489:220–230, doi:10.1038/nature11550.

澤辺智雄・美野さやか. 2016. 海洋無脊椎動物と微生物の共生. 共生微生物 (大野博司編). 117-124. 化学同人.

Wopereis, H. The first thousand days – intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. *Pediatr. Allergy Immunol.* doi:10.1111/pai.12232.

Yamazaki et al. 2016. Individual *Apostichopus japonicus* fecal microbiome reveals a link with polyhydroxybutyrate producers in host growth gaps. *Sci. Rep.* 6:21631, doi: 10.1038/srep21631.

Yamazaki, Y. et al. 2020. Tracking the dynamics of individual gut microbiome of sea cucumber *Apostichopus japonicus* during gut regeneration. *PeerJ* 8:e10260 <https://doi.org/10.7717/peerj.10260>.

Zilber-Rosenberg, I, and E. Rosenberg. Microbial driven genetic variation in holobionts. *FEMS Microbiol. Rev.* doi: 10.1093/femsre/fuab022.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yamazaki Yohei, Sakai Yuichi, Yu Juanwen, Mino Sayaka, Sawabe Tomoo	4. 巻 8
2. 論文標題 Tracking the dynamics of individual gut microbiome of sea cucumber <i>Apostichopus japonicus</i> during gut regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e10260 ~ e10260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7717/peerj.10260	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 Juanwen, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, M., Jiang, C., Mino, S., Sakai, Y.
2. 発表標題 Baseline analyses of gut microbiome changes in gut regenerated Japanese sea cucumber <i>Apostichopus japonicus</i> , and culturing the gut microbiome
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yonezawa, M., Yamazaki, Y., Mino, S., Sakai, Y., Sawabe, T.
2. 発表標題 Comprehensive study on gut microbiome of sea urchin
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yohei Yamazaki, Juanwen Yu, Sayaka Mino, Tomoo Sawabe
2. 発表標題 Tracking the dynamics of individual gut microbiome of sea cucumber <i>Apostichopus japonicus</i> during gut regeneration
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会 北海道支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 YU Juanwen, YONEZAWA Masanori, YAMANO Ryota, MINO Sayaka, SAWABE Tomoo
2. 発表標題 Characterization of pioneer microbiomes associated with the Japanese sea cucumber <i>Apostichopus japonicus</i>
3. 学会等名 2020年度 日本農芸化学会北海道支部 / 第50回 日本栄養・食糧学会北海道支部 合同学術講演会
4. 発表年 2020年

〔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	美野 さやか	北海道大学・水産科学研究院・助教	
	(Mino Sayaka)		
	(00755663)	(10101)	

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