

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21447

研究課題名(和文)海洋性無脊椎動物の体液に優占するピロリ菌近縁微生物：移植実験で開拓する新生命現象

研究課題名(英文)H. pylori-related microorganisms dominantly found in the coelomic fluids of marine invertebrates: understanding of their functions through transplantation experiments.

研究代表者

中川 聡(Nakagawa, Satoshi)

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)：「動物の体液は無菌的」という常識に反し、研究代表者らは海洋性無脊椎動物の体液(体腔液)に、1万細胞/ml以上の細菌が普遍的・恒常的に生息し、それらが周辺海水や消化管等に存在しない特異微生物種であることを発見してきた。本研究はマヒトデの体液特異微生物を対象として、天然・細菌移植実験下における微生物群集構造・宿主の死亡率・行動(摂餌量)等・発現遺伝子・代謝物質の時系列解析を行った。特筆すべき成果として、マヒトデにおける環境ストレス耐性のいくつかは、体液中の特異微生物と関連するという、当初仮説が支持される結果を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトデは「海のギャング」と呼ばれ、その莫大な食害や駆除・廃棄コストは全国の水産業喫緊の課題である。ヒトデの環境ストレス耐性と体腔液に特異的に棲息する微生物の関係についての新知見を得た本研究は、ヒトデ類の画期的対策や生理活性物質の利活用法を創出し、水産業の持続的発展に益するものと位置づけられる。加えて、ヒトデの体腔液に優占する特異微生物がヒトの病原菌と近縁であることは、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り得るものである。

研究成果の概要(英文)：Contrary to the widespread belief that "animal's coelomic fluids are sterile," we have found that the coelomic fluids of marine invertebrates contain more than 10,000 cells/ml of prokaryotes. These are unique microbial species not present in the surrounding environments or digestive tract. In this study, we analyzed the microbial community structure, host mortality, behavior (food intake), transcriptomes, and metabolites in the starfish. Our bacterial transplantation experiments supported the hypothesis that some of the starfish's ability to tolerate environmental stress is related to specific microorganisms in their coelomic fluids.

研究分野：微生物生態学

キーワード：共生

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られるなど、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例えば、海綿、サンゴ、ダンゴイカ、化学合成生態系の固有生物のようなモデル共生生物においては、それらに共生する微生物の多様性や進化・生理機能等に関する研究が活発に行われ、共生微生物が宿主の栄養獲得を助けるのみでなく、行動を規定したり免疫機能の一部を担ったりすることもあるなど、宿主の生存や進化に極めて重要な役割を有することが明らかとなってきている。これらの研究は、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・微生物の生理生態や進化の理解につながるだけでなく、共生微生物が産生する二次代謝産物が医療・製薬に応用可能であることから注目されている。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や獲得手段も多様と考えられるが、これまでの研究は上述したような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状況にある。

過去の研究では、海洋性無脊椎動物のエラや消化管・発光器に棲息する微生物が研究対象となってきたが、研究代表者らは海洋性無脊椎動物の体液(体腔液、人でいう血液とリンパ液を合わせたものに相当する)に、1万細胞/ml以上の細菌が普遍的・恒常的に生息し、それらが周辺海水や消化管等に存在しない特異微生物種であることを発見してきた。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る。

我々はこれまでの研究において、マヒトデの体腔液微生物を対象とするメタゲノム解析、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析といったマルチオミクス解析を実施し、マヒトデの体腔液に特徴的に生息する微生物の系統・量・ゲノム中に存在する遺伝子のレパートリー・発現遺伝子のプロファイル等に関する知見を得ることに成功してきた。加えて、それら微生物が宿主の環境ストレス耐性において重要な役割を担っていることが示唆されたため、抗生物質による共生微生物のクリアランスや微生物移植実験を通じて、その役割を多角的に解明する本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究は、マヒトデの体腔液とりに棲み着く特異な未知の微生物の生態・生理機能を解明することを目的とする(すなわち本研究は腸内細菌など既存の外部共生微生物や細胞内共生微生物の研究とは本質的に異なる)。具体的には、抗生物質によるクリアランスや体腔液微生物の濃縮等の技術を駆使し、天然・細菌移植実験下のマヒトデにおける3項目時系列網羅解析、即ち体腔液中の微生物群集構造、宿主と微生物の発現遺伝子、代謝物質の解析、を補完的に実施し目的を達成する。なお、対象がマヒトデの理由は、これまでの予備実験において(a)ヒトに蔓延する癌原因菌(ピロリ菌)の近縁種を体腔液中に大量に検出し、(b)当該微生物を欠く個体は高温耐性が低かった。かつ(c)飼育や捕獲が容易で、世界的に甚大な漁業被害の原因生物であるためである。

3. 研究の方法

北海道道東においてマヒトデを採取した(図1)。研究室に持ち帰った後、様々な条件下で飼育実験を行った。具体的には、抗生物質を用いた共生微生物のクリアランス・共生微生物の移植の有無や環境ストレスの有無を組み合わせた(なお環境ストレスとして、本研究では特に道東で顕著な温度ストレスに着目した)。水槽中で飼育している個々の個体を識別しながら、個体への負荷をできるだけ軽減するために注射針で体腔液を経時的に採取し、蛍光顕微鏡観察に



図1 北海道道東で採取したマヒトデ

よる微生物量の変化、宿主の死亡率・行動（摂餌量含む）等に基づいて代表試料を選抜した。選抜した試料における体腔液微生物の群集構造および多様性を解明するため、体腔液を複数回遠心分離することにより調製した微生物濃縮画分からゲノム 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を行った（常法に基づき、ユニバーサルプライマーで得られた PCR 産物を、イルミナ社の次世代シーケンサー MiSeq を用いてディープシーケンシングした）。

アンプリコン解析の結果に基づき、特徴的な体腔液微生物叢を示した代表試料を選抜し、それらにおいて発現している遺伝子の網羅的解析（トランスクリプトーム解析）を実施した。抽出したトータル RNA から rRNA を除去し、ポリ T カラムにより宿主と微生物の RNA を分画した後、次世代シーケンサーにより配列を決定した（受託分析）。なお、これらの研究を通じて体腔液の移植方法を複数評価し、簡便かつ宿主への負担の少ない（死亡率が低い）方法で体腔液微生物を移植する方法を確立している。

4. 研究成果

2020-2021 年度にかけて、北海道で採取したマヒトデについて、予定していたすべての条件で飼育実験を行うことに成功した。飼育期間中、注射針を用いて体腔液（我々ヒトの血液+リンパ液に相当）を経時的かつ個体毎に採取し、微生物の群集構造や量の変化、さらにはそれらの発現遺伝子、宿主の死亡率・行動（摂餌量）等に関する知見を得ることに成功している。しかしながら、

当該の飼育実験の一部において、マヒトデに形態異常が生じ（図 2）、それらの個体を中心として、過去の予備実験をはるかに上回る速度でマヒトデが死亡した。また、それらの個体から調製した体腔液のトランスクリプトーム解析を進める過程において、得られた塩基配列情報が宿主由来のものに大きく偏り、体腔液微生物の発現遺伝子に関する知見がほとんど得られていない試料があることが判明した（これらのことや、類似した飼育条件における形態異常の発生率や死亡率との比較を通じて、本実験の一部においてマヒトデに形態異常が生じ、死亡率や死亡速度が極めて高かったのは、温度ストレスや共生微生物を抗生物質処理によりクリアランスしたことが主要な原因ではなく、主に宿主や水槽・水質の状態に問題があった可能性が高いと判断した）。

これらのことから研究期間を 1 年延長し、飼育実験の一部を再度 2022 年度に実施することとした。このことにより、研究の開始時点で予定していた飼育実験のす

べてを問題なく完遂し、結果として計画を上回る確度で成果を得ることに成功した。具体的に得られた成果としては、北海道道東にて採取したマヒトデにおいて、体腔液中の微生物群集構造（多様性）や量の変化、さらには体腔液微生物および宿主の発現遺伝子、宿主の死亡率・行動（摂餌量）等に関する知見を得ることに成功した。中でも特筆すべき成果として、マヒトデにおける

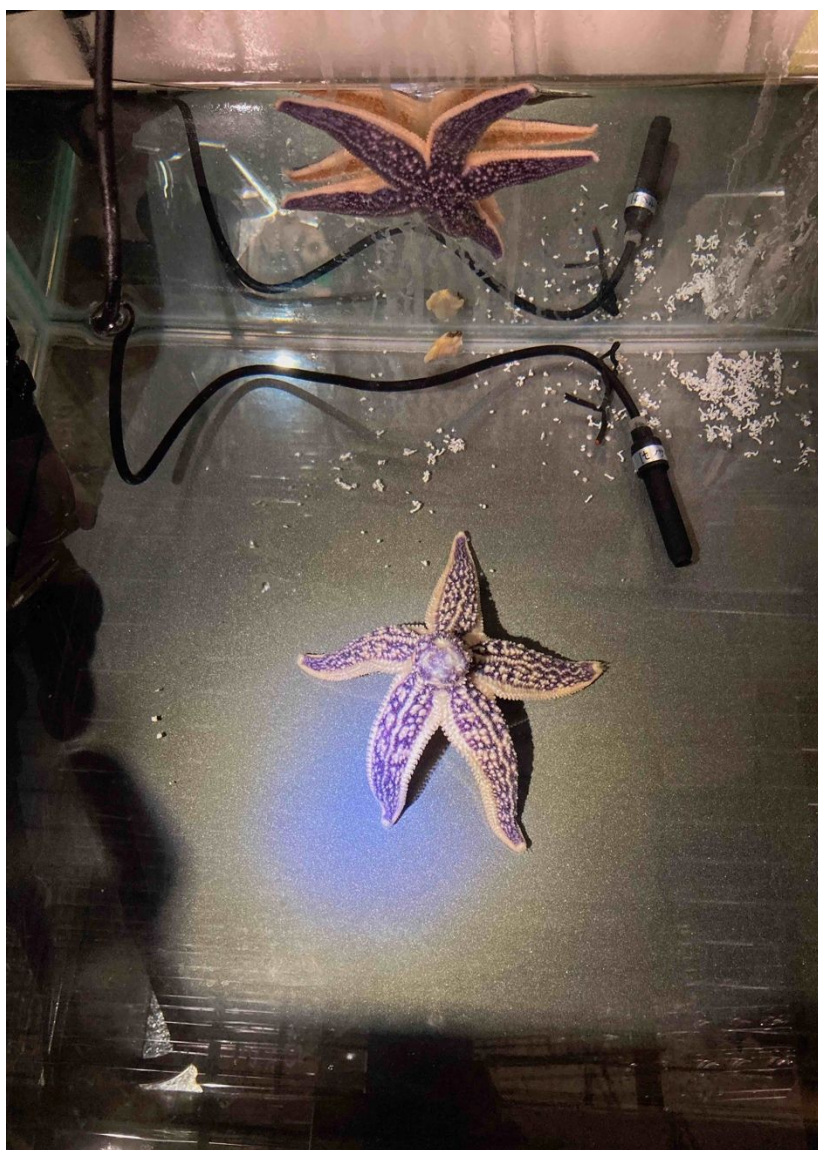


図 2 飼育実験中のマヒトデ。下部の個体において、盤が隆起し、腕が硬直したような形態異常が見られる（水槽を上から撮影）

環境ストレス耐性のいくつかは、体液中の特異微生物の有無と関連するという、実験計画当初の仮説が支持される結果を得ることに成功している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 河野圭丞 |
| 2. 発表標題 浅海性クモヒトデの体内に宿る特異微生物の多様性及び局在性の解明 |
| 3. 学会等名 第35回日本微生物生態学会大会 |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|