

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14517

研究課題名(和文)メタゲノム解析による海産栽培魚種の腸内細菌が初期放流減耗に与える影響評価

研究課題名(英文)Evaluation of the effects for the intestinal bacteria of marine cultivated fish species on initial depletion.

研究代表者

本郷 悠貴 (Hongo, Yuki)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・中央水産研究所・研究員

研究者番号：20737316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、水産人工種苗の放流後減耗の一因が、腸内細菌叢の多様性に関係していると仮説を立て、マダイ人工種苗を用いた給餌飼育実験とトラフグ放流経験群、飼育群を用いて腸内細菌叢を調査した。結果、マダイの給餌飼育実験では腸内細菌の多様性に変化は無かった。しかし、トラフグの放流経験群と飼育群で多様性に有意な差が見られた。トラフグの場合、放流後に腸内細菌叢の多様性を高める必要があることから、多様性の低さが減耗の一因になる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水産資源の持続的な利用を維持するため、資源状態に基づいた種苗放流が必要であるが、放流後減耗によって効果的ではない。減耗の一因が腸内細菌叢つまり摂餌の違いによって起こっている可能性を指摘し、調査したところ、トラフグ人工種苗では放流経験群で腸内細菌の多様性が高かった。人工種苗生産時に天然に近い腸内細菌叢を構築することで、放流後の餌料環境に馴致しやすく減耗が低減できる可能性を示唆した。本研究が継続的に実施され、仮説が証明されることで、餌開発につながり水産資源の増加に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we hypothesized that one of the causes of post-release depletion of aquatic artificial seedlings was related to the diversity of intestinal bacterial flora. The intestinal flora was investigated using red sea bream and pufferfish. As a result, there was no change in the intestinal bacterial diversity in the feeding experiment of red sea bream. However, there was a significant difference in the diversity between the released- and the breeding-group of pufferfish. In the case of pufferfish, because it is necessary to increase the diversity of the intestinal flora after release, it was considered that the low diversity may contribute to the depletion.

研究分野：分子生物学

キーワード：腸内細菌叢 種苗放流 トラフグ 減耗 餌料環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水産資源を持続的に利用するためには、資源状態に基づいた実効性のある資源を実施するとともに、人工的に生産した種苗を天然資源へ添加する種苗放流等の取り組みが必要である。我が国では、天然海域への種苗放流は1960年代から行われており、種苗生産技術の向上により、現在では約70種の水産動物の種苗生産が可能となり、平成27年では魚類だけで4,929万尾の種苗が放流された。しかし、このような放流実績にも関わらず、放流した種苗の数に対して、その漁獲量は期待されるほど増加していないのが現状である。この理由は、種苗を天然海域に放流した初期段階で大量の減耗が起きているからである。このため、種苗の放流効果を向上させるためには、放流初期の減耗に至る原因を明らかにし、その対策を講じることが不可欠である。

人工生産された種苗が天然海域で生存するには、これまで与えられてきた人工飼料とは異なる天然飼料を摂食、消化・吸収し、成長する必要がある。放流後の種苗は、天然海域の環境の過酷さや馴致までにかかるストレスなどにより、天然飼料に対する摂食が悪いことが知られている。このような摂食・栄養障害の種苗は、外敵種からの被食を受けやすくなるため、大量減耗を引き起こす一因と考えられている(古田晋平ら,1997;清水大輔ら,2007)。その一方で、天然飼料を摂食しているにも拘わらず、種苗が痩せてしまうといった報告もある(古田晋平ら,1997;清水大輔ら,2007)。このことから、種苗と天然個体の間には消化・吸収機構に違いがあり、減耗の一因になる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

魚が摂食した餌料は、胃・幽門垂・腸を通り、消化・栄養吸収されていく。しかし、餌料の中には、魚自身が分解できないキチンやセルロースなどの高分子多糖類が含まれている。これら難分解性の有機物は、腸内細菌によって消化もしくは発酵することで、宿主が利用できる栄養素として形を変え、吸収されていく。腸内細菌の多様性とそのバランスは、魚の食べる食物によって変化する(Clements, K.D., *et al.* 2014)。そこで本研究では、配合飼料のみを与えた種苗とそれとは異なる餌を与えた種苗、放流個体の腸内細菌を、次世代シーケンサーを使ったメタゲノム解析によって、「腸内細菌の多様性」と「腸内細菌が持つ遺伝子構成」の違いについて、重要栽培魚種を用いて調査・解明し、放流直後の減耗に至る原因の一端を考察することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マダイ人工種苗を用いた餌の切替え実験

マダイをモデル魚種として、餌の質的な違いを考慮した飼育実験を行った。栽培漁業公社からマダイの人工種苗を購入し、実験区として、天然餌料給餌群と配合飼料給餌群を設けた。マダイは、甲殻類、多毛類を摂食することから、天然餌料群にはアミ類やイソメを1日1回、飽食するまで与えた。飼育は1ヶ月行い、実験開始前と終了時に種苗の体長・体重を測定し、実験1ヶ月間の成長率を算出した。メタゲノム解析に用いた総サンプル数は、2群(天然餌料群 vs 配合飼料群) x 6個体数 = 12サンプル供試した。マダイから後腸を摘出し、ISOIL for beads beating kit(ニッポン・ジーン)でDNAを抽出した。このDNAを用いて、バクテリア16S rRNA遺伝子を対象としたアンプリコンシーケンスを行い「腸内細菌の多様性」を比較した。また、「腸内細菌が持つ遺伝子構成」を比較するため、同じDNAでショットガンメタゲノムシーケンス用のライブラリーをTruSeq DNA PCR-free Library Preparation Kit (Illumina inc.)を用いて構築し、NextSeq500のHigh-output 試薬(2 x 150pb)でシーケンスを実施した。

(2) トラフグ人工種苗の飼育個体群と放流個体群の比較

神奈川県では、トラフグの種苗生産と放流を実施している。神奈川県水産技術センターと水産研究・教育機構 増養殖研究所の協力のもと、トラフグの放流個体群と同ロットの飼育個体群を供試して頂いた。解析に用いたサンプルは、2016年4月に生産した個体群で、この年の6月に一部が放流され、約一ヶ月後(27, 35, 44日後)に再捕された個体群と、この間飼育された個体群(48日間)である。サンプル数は、4群(27, 35, 44日放流群 vs 飼育群) x 4個体数 = 16サンプルであった。これらの個体群は凍結保存されていたため、融解しないように後腸を摘出し、マダイ同様に、DNAを抽出した。得られたDNAは、バクテリア16S rRNA遺伝子を対象としたアンプリコンシーケンスに用いて「腸内細菌の多様性」を比較した。また、「腸内細菌が持つ遺伝子構成」を比較するためショットガンシーケンス用のライブラリーを作成する予定であったが、必要なDNA量が得られず、断念した。その代わりに、16S rRNA情報から遺伝子構成を推定する解析ソフト PICRUSt2(Douglas *et al.*, 2019)を用いて、遺伝子構成を推定し、比較した。

4. 研究成果

(1) マダイ腸内細菌の比較

マダイ人工種苗を約1ヶ月間、配合飼料と天然餌料の各群に分けて飼育し、バクテリア16S rRNA遺伝子を対象とした腸内細菌の多様性を比較した。解析はQiime2のdada2プラグインを使用して、amplicon sequence variants(ASVs)を構築した。全サンプルから得られた総ASV数は、122

多く、天然環境もしくは餌料環境が大きく腸内環境に影響を及ぼすことが考えられた。種苗放流後、こうした腸内細菌叢を獲得できたために、減耗を逃れて生き残った可能性も考えられるが、人工種苗生産時に天然と同等の腸内細菌叢を構築することで、放流後の腸内環境変化のストレスは除外でき、減耗の一端を抑制できる可能性が考えられた。

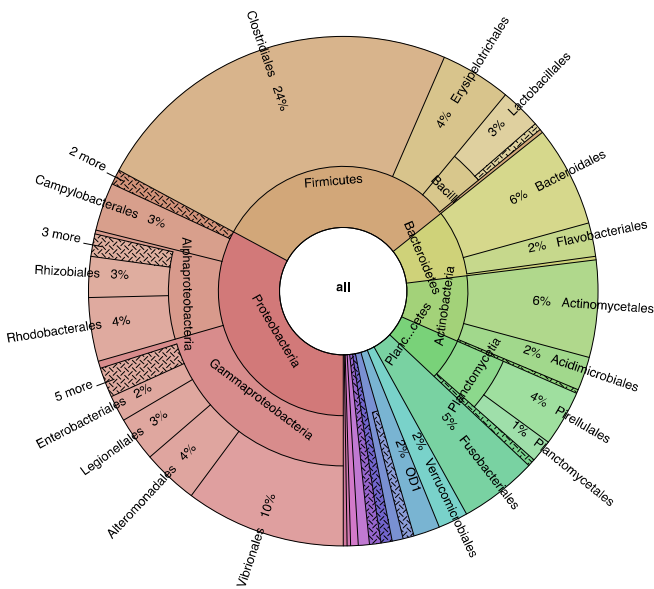


図 3. トラフグ腸内細菌の種組成

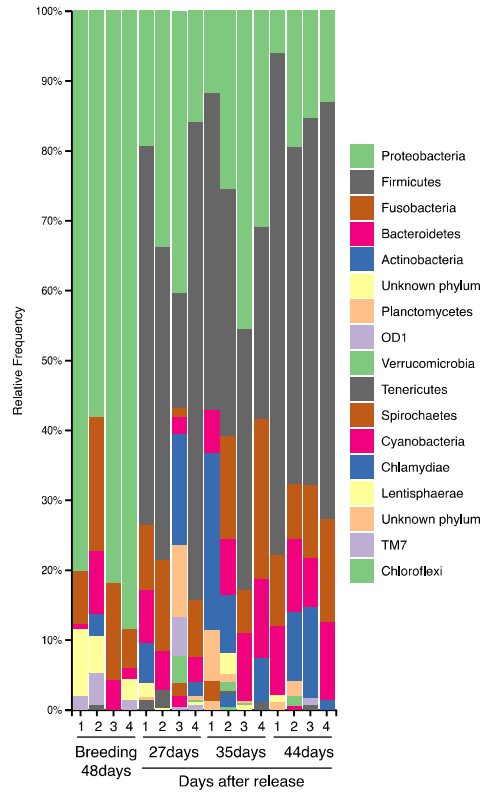


図 4. トラフグ腸内細菌のサンプル毎の種組成

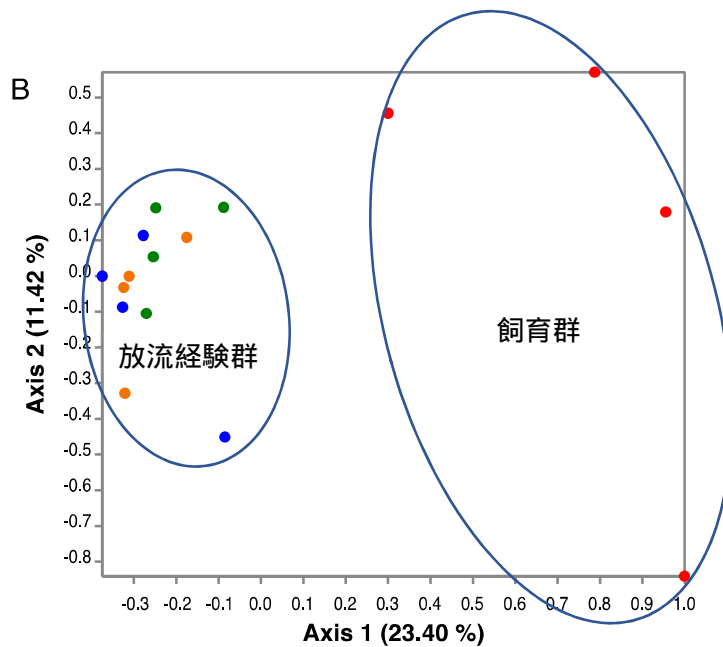


図 5. トラフグ腸内細菌のサンプル毎の種組成

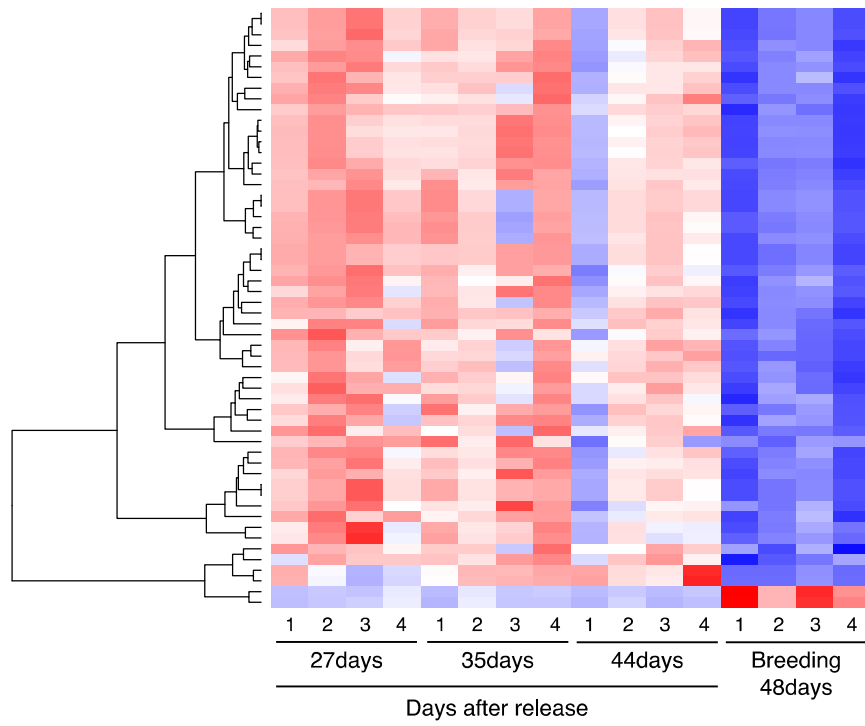


図 6. 放流経験群で高頻出された代謝経路
(赤:高頻出, 青:低頻出)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----