

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780176

研究課題名（和文）生態および代謝学的知見による水産プロバイオティクス菌の有効性の実証

研究課題名（英文）The proof of the validity of the fishery probiotics by ecology and metabolism

研究代表者

田中 礼士（TANAKA REIJI）

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号：80447862

研究成果の概要（和文）：

本研究では水産養殖として用いるプロバイオティクスについて、生態学および代謝学的観点から有効性を評価した。プロバイオティクスの検出系を作製し、宿主消化管内のどの部位にどれだけ付着するのか、またこれらの菌が作り出す各種短鎖脂肪酸を網羅的に解析し、どのような成分が宿主に供給されるのか検証した結果、プロバイオティクスは消化管内の組織壁に微小なコロニーを形成していることが確認された。また、アワビ消化管環境において多くの有機酸とアミノ酸を宿主であるアワビに供給していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated about the proof of probiotics for fisheries from a viewpoint of ecology and metabolism. We made a specific detection system of probiotics, and detected the probiotics where colonies in the host gut. Moreover we also determined what kinds of short chain fatty acid are supplied to a host abalone from probiotics. We observed that the probiotics form micro colony in the gut wall of abalone. Moreover, it was suggesting that the probiotics supply many organic acid and amino acid to the gut environment of host abalone.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：プロバイオティクス・アワビ・標識・生態・代謝

1. 研究開始当初の背景

水産養殖では、これまで魚病対策として主に抗生物質が使用されてきたが、これらの薬

剤には耐性菌の出現や魚体内残留性の観点から代替品が求められている。その代替品として、近年プロバイオティクスが浸透してきつつある。プロバイオティクスは、腸内プロ

ーラバランスを改善することにより宿主に有益な効果をもたらす生きた微生物を含む飼料添加剤と定義されている。現在、水産養殖におけるプロバイオティクスとして有効な微生物には、グラム陽性菌としては、乳酸菌のほか、*Bacillus* 属細菌が多く使用されている。また、グラム陰性菌としては、*Vibrio* 属細菌が多く使用されている。とくに乳酸菌はヒトや動物の消化管に常在しており、宿主の健康に重要な役割を演じていることが明らかにされてきた。実際にこれらのプロバイオティクス菌を飼料に添加することにより対象試験区に比べ、成長率が高くなる、もしくは病気の発生が統計学的に優位に抑えられたとする報告は多数掲載されている。

しかしながら、これらの統計学的調査に比べ、実際の消化管内にそれらのプロバイオティクス菌の付着部位を特定し、これらの菌がどのような有効成分を産生しているか調べた報告に関してはその数が圧倒的に少ないのが現状である。

2. 研究の目的

上記の背景をふまえ、本研究では水産養殖として用いるプロバイオティクスについて、これまでの耐病性や成長速度などの統計学的な評価から一歩先をみつめ、生態学および代謝学的観点から、その有効性を評価しようとする新しい試みである。DNA-DNA ハイブリダイゼーション法を用いた検出系を作製し、宿主消化管内のどの部位にどれだけ付着するのか、またこれらの菌が作り出す各種短鎖脂肪酸を網羅的に解析し、どのような成分が宿主に供給されるのか検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) プロバイオティクスの標識化

平成 21 年度は、プロバイオティクス菌の標識化を行った。標識を行うプロバイオティクス菌として、アワビ消化管から分離した

Vibrio haliotocoli 近縁種 BL7a 株を用いた。本菌を用いて DNA プローブの作製およびコロニーハイブリダイゼーションによる特異検出条件の設定を行った。特異検出法の確立および安定性をはかるために、4~11 月の 8 ヶ月間、毎月メガイアワビ消化管内生菌数および *V. haliotocoli* 生菌数の定量を行い、変動を調べた。さらに、生菌数計測で用いた平板培地からランダムに 30 コロニーを分離した後、16S rRNA 遺伝子系統解析を行い細菌叢の把握を行った。

また、宿主由来プロバイオティクス菌 Ab1 株のアワビ消化管内における特異検出のために Ab1 の近縁種である *Pediococcus pentosaceus* の 16S rRNA 遺伝子配列に特異的な Rpt プローブを用いた Fluorescence *in situ* hybridization 法による Ab1 株の特異的検出条件を検討した。

(2) プロバイオティクス菌の産生する物質の網羅解析

プロバイオティクス菌が作り出す各種短鎖脂肪酸を網羅的に解析し、どのような成分が宿主に供給されるのか検証するために擬似消化管培養を行い、プロバイオティクス菌の代謝解析を行った。アワビ消化管内の化学的條件 (pH、酸化還元電位など) を測定し、これと同じ条件での培養装置を作製した。プロバイオティクス候補菌として *Vibrio* 属細菌 BL7a 株を、作製した擬似消化管培養器を用いて培養し、このときの代謝産物 (短鎖脂肪酸) について高速液体クロマトグラフィーを用いて解析を行った。さらに微小な発酵代謝産物を特定するために質量分析計 (CE/TOFMS) を用いて物質の定量を行い、BL7a 株の代謝経路を推定した。

4. 研究成果

(1) プロバイオティクスの標識化

BL7a 株を用い作製した DNA プローブは、プローブ濃度 200 μ l/ml、反応温度 60°C、反応時間 12 時間でハイブリダイゼーションを行

うことで *V. haliotocoli* が特異的に検出できた。特異検出法を用いたモニタリングでは、*V. haliotocoli* が毎月検出され、*V. haliotocoli* 生菌数とプローブ検出数の相関性が伺えた。

Ab1 株を添加した人工飼料をメガイアワビに投与し飼育実験を行い、FISH 法によりアワビ消化管ホモジナイズにおける Ab1 株の特異的検出の条件設定に成功した。消化管ホモジナイズにおける FISH 法の結果、Ab1 株添加区、非添加区ともに Ab1 株が検出されたが、Ab1 株添加区では非添加区の 10² 倍多く検出した。非添加区において、FISH 法と培養法とで Ab1 株検出に有意な差が生じた。これらの結果より、アワビ消化管には VBNC の *Pediococcus* 属の細菌群が普遍的に存在していることが示唆された。また、Ab1 株添加区、非添加区ともに組織画分と浮遊画分において Ab1 株検出量に有意な差がみられ、さらに組織画分ではコロニー形成が確認された。これらの結果より、*Pediococcus* sp. Ab1 株はアワビ消化管内に付着し、コロニー形成をしていることが示唆された (図 1)。

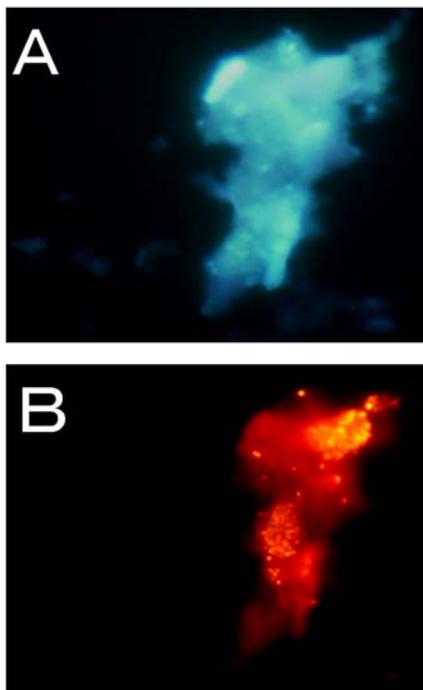


図 1 A.プロバイオティクスを投与したアワビの消化管。B.プロバイオティクスに特異的な蛍光プローブを用いた消化管。消化管内に付着する様子が確認された。

(2) プロバイオティクス菌の産生する物質の網羅解析

アワビの疑似消化管培養系ではアルギン酸を基にして、有機酸、アミノ酸を含む 43 種の代謝物質が検出された。また、検出された代謝物質の内 27 種の定量値を算出したところ、最も多く産生された物質は揮発性の短鎖脂肪酸であり、なかでもピルビン酸 (8.9 mM)、ギ酸 (3.2 mM)、酢酸 (2.1 mM)、乳酸 (1.5 mM)、コハク酸 (1.2 mM) などであった。ついでアミノ酸ではアラニン (0.7 mM) が最も多く産生されていた。定量は不可能であったが相当量産生されていると考えられる物質も検出された。それらはアミノ酪酸や、アラニンの 2 量体であった。

これらの結果からプロバイオティクス菌 BL7a 株は、アワビ消化管環境においてピルビン酸を中心とした代謝経路と TCA 回路を中心としたアミノ酸発酵による代謝を駆使し、多くの代謝物質を宿主であるアワビに供給していることが示唆された (図 2)。

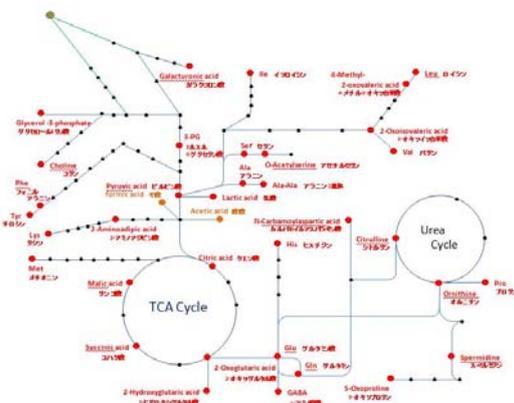


図 2.プロバイオティクスの代謝物質を網羅的に解析して得られた代謝経路。多くの有機酸、およびアミノ酸を菌体外に産生することが確認された。

この成果を利用し、新規な有効成分を含んだ餌料の開発や、餌料内に接種するプロバイオティクス量の指針化が見込めるなど、今後の養殖技術の向上に対して多大な恩恵をもたらすと確信するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 論文 Iehata S, Inagaki T, Okunishi S, Nakano M, Tanaka R, Maeda H. Improved gut environment of abalone *Haliotis gigantea* through *Pediococcus* sp. Ab1 treatment. *Aquaculture* (2010), 305 巻 59-65. 査読有
- ② 論文 Iehata S, Inagaki T, Okunishi S, Nakano M, Tanaka R, Maeda H. Colonization and probiotic effects of lactic acid bacteria in the gut of the abalone *Haliotis gigantea*. *Fisheries science* (2009), 75 巻 1285-1293. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 田中礼士 食藻動物 (アワビ) のプロバイオティクス 日本水産学会 2012 年 3 月 30 日東京海洋大学
- ② 田中礼士, 家島俊平, 前田広人 メガイアワビ消化管および飼育水中からの *Arcobacter* 属細菌の検出と遺伝的多様性 日本水産学会 2011 年 9 月 30 日 長崎大学
- ③ 田中礼士, 家島俊平, 前田広人 メガイアワビの消化管内細菌相の季節変動 日本水産学会 2010 年 9 月 23 日 京都大学農学部
- ④ 家島俊平, 田中礼士, 前田広人 *Pediococcus* sp. Ab1 株の飼料添加によるメガイアワビの消化管内環境改善 日本水産学会 2010 年 3 月 28 日 日本大学生物資源学部

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.mie-u.ac.jp/seimei/kaiyo/bisei/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 礼士 (TANAKA REIJI)

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号 : 80447862