

令和元年6月10日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07866

研究課題名(和文) マガキの健康に有用な血リンパマイクロバイーム：環境ストレスの影響とその回復

研究課題名(英文) Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to environmental stresses and recovery after stresses.

研究代表者

高橋 計介 (Takahashi, Keisuke)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80240662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ストレス負荷実験では、マガキ細菌叢の変動を捉えることができた。水温25℃で保持された場合、両試料とも培養可能な生菌数は開始24時間後に大きく増加し、72時間後には保持開始前の水準にまで減少するという傾向を示した。しかし、水温25℃でDOを2.1 mg/Lと低下させた区では、72時間後の生菌数は24時間後よりもさらに増加した。さらに、メタゲノム解析の結果から、低DOの区では細菌種の多様性が大きく減少していることが示された。これらのことから、マガキ血リンパの細菌叢に対する影響は、水温のみでは定常状態を損なうほどではないが、低DOが加わるにより著しい変化を示す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

マガキを人為的な環境ストレスに晒した際の細菌叢の変化を見るという面で先進的なものであった。結論として、ストレスの負荷がかかり衰弱した個体では、メタゲノム解析により多様性の減少が示された。単一の環境ストレスのみでは、その条件に適応した細菌グループが独占するが、変化した細菌叢は元の通常範囲内の細菌叢へ戻ろうとして、結果的にマガキの健康へは大きな影響はなかった。しかし複数のストレス負荷により、細菌叢は深刻な損傷を受け、元の細菌叢へ戻ることが不可能となり、宿主であるマガキに悪影響を与え、結果的に多くの死亡個体が現れたことを明らかにした。この結果は養殖現場で起こる斃死の原因解明に役立つ。

研究成果の概要(英文)：Microbiota provide various benefits to their hosts to enhance ability of host defense against external pathogens. Microbiota themselves, however, can act as opportunistic pathogens depending on environmental conditions. The Pacific oyster cultures worldwide for an important commercial species in fisheries. Therefore, a lot of studies have been performed about oyster physiology, however, no or little known for the interaction between oysters and host-associated microbial communities, especially affects of environmental stresses. To show the effects of environmental stresses on composition and diversity of the hemolymph microbiota of oysters, we conducted the experiments in which acclimated oysters were exposed to temperature stress and lower DO. We measured changes in microbiome composition by 16S rRNA gene amplicon pyrosequencing under stress conditions. We obtained results of changes in incidence and abundance of the microbiota, indicating loss stability of them by stresses examined.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：海産二枚貝 マガキ マイクロバイーム 血リンパ 細菌叢 環境ストレス 高水温 低溶存酸素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

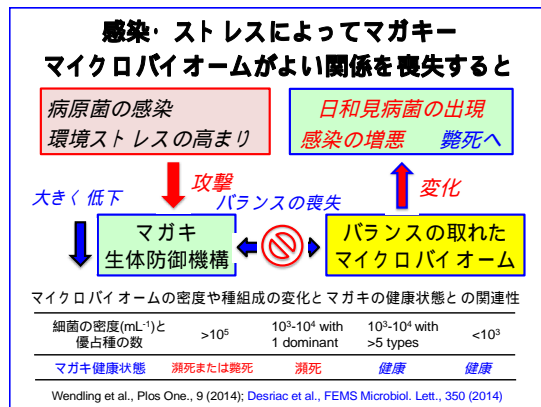
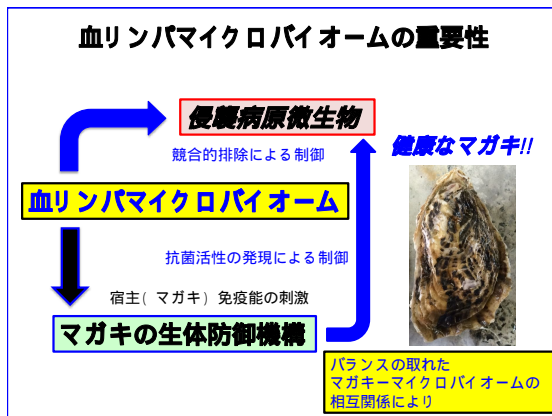
1. 研究開始当初の背景

動物は、外界と接する器官に極めて多くの微生物を共存させている。代表的なものにヒト腸管の細菌叢(以下、マイクロバイオーーム)がある。マイクロバイオーームは一種の微生物生態系を構築し、そこに含まれる細菌やその遺伝子は、消化から免疫応答に至る宿主の基本的な生理機能を助ける重要な存在となっている。このことは、海産二枚貝でも同様であると思われる。ヒトなどの高等動物は閉鎖血管系のため、健康個体の血液にマイクロバイオーームはない。対照的に、開放血管系の海産二枚貝では、健康個体の血リンパに普通にマイクロバイオーームが形成されることが知られていた。近年では、従来の培養法では検出できる細菌種は限定されるため、マイクロバイオーームの全体像は明らかにできないことが指摘されている。そこで、次世代シーケンサーの利用によるメタゲノム解析法が開発され、2000年代後半から海産二枚貝でも適用されるようになり、消化管(消化盲嚢・中腸)のマイクロバイオーームを中心に研究されてきている。しかし、血リンパマイクロバイオーームの研究はまだとても少なく、知見の蓄積が大いに必要であった。

2. 研究の目的

マイクロバイオーームは一種の微生物生態系として、免疫応答など宿主の基本的な生理機能を助ける重要なものとして知られる。本研究は、これまでほとんど明らかにされていない、海産二枚貝マガキの血リンパに形成されるマイクロバイオーームについて、以下のことを目的とする。

- (1) 健康個体のマイクロバイオーームについて、その組成や菌数を季節ごとに明らかにする。
- (2) マイクロバイオーームと宿主との相互制御のしくみとして、生体防御能との関連を明らかにする。
- (3) 環境ストレスや病原菌の感染が、マイクロバイオーームの組成や菌数に与える影響を知る。
- (4) (3)でのマイクロバイオーームの変化が、宿主の生理機能に与える影響を評価する。

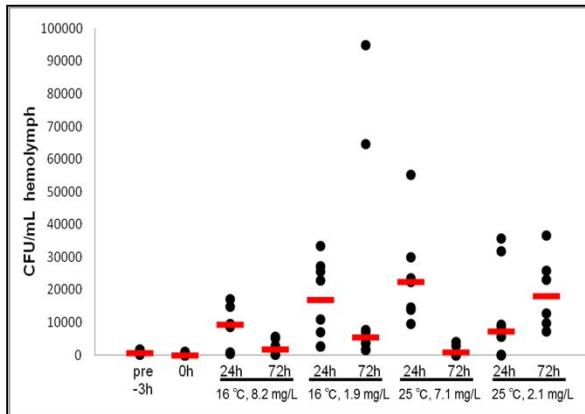


3. 研究の方法

- (1) メタゲノム解析と培養法の併用により、健康マガキにおける血リンパマイクロバイオーームの組成や生菌数の、各季節の状態や産卵期前後の動態を把握する。
- (2) 血リンパに存在する血球や体液性防御因子とマイクロバイオーームの機能連関を明らかにする。
- (3) 高水温や低酸素などの環境ストレスの負荷により、マイクロバイオーームがどう変化するのか、それは個体の生理活性の変化とどう関連するのかを明らかにする。
- (4) 病原菌の感染はマイクロバイオーームの組成や菌数に大きな影響を与えることが予想される。病原性ビブリオ菌の実験的な感染を行い、その時のマイクロバイオーームの動態を明らかにする。
- (5) 上述のストレスや感染を受けた個体は、その期間や程度によって回復できたり、斃死に至ったりすると考えられる。実験的なストレス負荷の後、清浄な養殖海域に戻して個体の回復(生理状態の改善)とマイクロバイオーームの変動がどうなっているかを調べる。

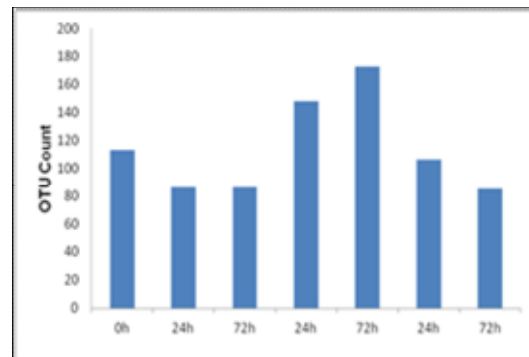
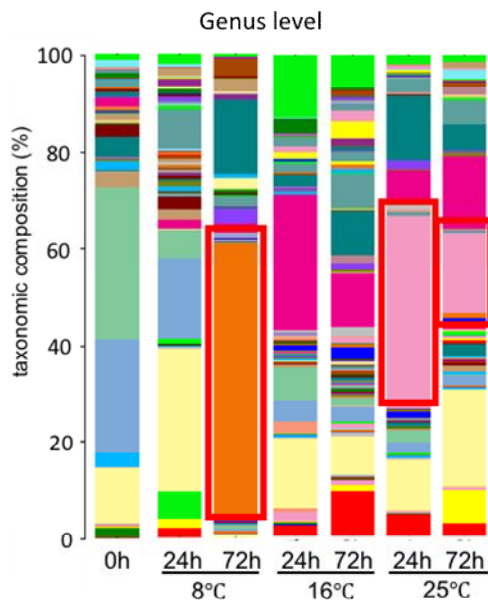
4. 研究成果

最初に、垂下養殖下で育成中のマガキ細菌叢を把握することができた。培養可能な細菌種の組成およびメタゲノム解析の結果、同日、同地点で採取したマガキでもある程度大きな個体差が認められた。培養可能な細菌については、コロニーの形状、色、大きさによる簡易な分類を行い、組成比や優占種を明らかにしたが、最終的に、Marine agar 2216E 培地上で観察されたコロニーについては、16S rRNA 配列に基づく属レベルでの同定を行った。



ストレス負荷実験では、マガキ細菌叢の変動を捉えることができた。水温 25 で保持された場合、両試料とも Marine agar 2216E で培養可能な生菌数は開始 24 時間後に大きく増加し、72 時間後には保持開始前の水準にまで減少するという傾向を示した。しかし、水温 25 で DO を 2.1 mg/L と低下させた区では、72 時間後の生菌数は 24 時間後よりもさらに増加した。同区の試料を用いて血球の生体防御能とストレスタンパク

(HSP90) 遺伝子の発現を調べた結果、防御能の低下と HSP90 遺伝子の発現上昇が認められ、大きなストレスを受けてマガキの活性が低下していると考えられた。さらに、メタゲノム解析の結果から、低 DO の区では細菌種の多様性が大きく減少していることが示された。これらのことから、マガキ血リンパの細菌叢に対する影響は、水温のみでは定常状態を損なうほどではないが、低 DO が加わることにより著しい変化を示すことが明らかとなった。



本研究はマガキを人為的な環境ストレスに晒した際の細菌叢の変化を見る、という面で先進的なものであると考えられる。結論として、ストレスの負荷がかかり衰弱した個体では、メタゲノム解析により多様性の減少が示され、また、培養法により生菌数の増加が示された一方で、

培養可能な菌に限定すると多様性の減少は認められないという結果となった。さらに今回、環境ストレスを 2 種類用いたことから判断すると、単一の環境ストレスのみでは、ストレスの負荷により細菌叢に変化が生じ、その条件下に適応した細菌グループが独占するようになるものの、変化した細菌叢は、元の通常範囲内の細菌叢へ戻ろうとする傾向が示され、結果的にマガキの健康へは大きな影響はなかったと考えられた。しかし複数のストレス負荷により、細菌叢は深刻な損傷を受け、元の通常範囲内の細菌叢へ戻ることが不可能になったことで、細菌叢および宿主であるマガキに悪影響を与え、結果的に多くの死亡個体が現れたと考えられた。世界的に見ても主要な水産二枚貝であるマガキについては、その生体防御機構であったり性成熟機構であったりと、様々な研究が進められている。その中でもやはり問題となるのが、期せずして起こる夏の大量へい死であり、日本をはじめ、フランスやアメリカなど、様々な地域で報告

されている。こうした問題への対策としては、マガキの衰弱の早期の発見が挙げられる。その点でも、本研究での結果をマガキの健康異常の指標として扱う意義は大いにある。しかし、異常の指標として見た場合、今回扱った水温と溶存酸素のみならず、実際に想定される様々な環境ストレスに対し、どのような特徴的な変化が細菌叢に起こるのかを定める必要があり、そうした意味でも、今後さらなる細菌叢の研究が意味を持つてくると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- 1) 高橋計介、網羅的遺伝子発現解析でみるマガキ顆粒球と無顆粒球との差異、かき研究所ニュース、Vol. 32、2018、21-26 (査読なし)
- 2) 高橋計介、マガキ体内の細菌叢、かき研究所ニュース、Vol. 32、2018、14-20 (査読なし)
- 3) Alavi, SMH., Nagasawa, K., Takahashi, KG, and Osada, M, Structure-Function of Serotonin in Bivalve Molluscs, Serotonin, Vol. 10, 2017, e69165 (査読あり)
DOI: 10.5772/Intechopen.69165
- 4) Alavi, SMH., Nagasawa, K., Takahashi, KG, and Osada, M, Pharmacology and Molecular Identity of Serotonin Receptor in Bivalve Mollusks, Serotonin, Vol. 10, 2017, e65223
DOI: 10.5772/Intechopen.65223 (査読あり)
- 5) Takahashi, KG, Izumi-Nakajima, N, and Mori, K, Unique phagocytic properties of hemocytes of Pacific oyster *Crassostrea gigas* against yeast and yeast cell-wall derivatives, Fish Shellfish Immunol., Vol. 70, 2017, 575-582 (査読あり)
DOI: 10.1016/j.fsi.2017.09.027
- 6) 長澤一衛, 高橋大介, 大内仁志, 伊藤直樹, 高橋計介, 尾定誠. 東日本大震災後の宮城県雄勝湾における垂下式養殖ホタテガイの水深による成育の違いと生産性の評価. 日本水産学会誌, Vol. 82(3), 2016, 321-329 (査読あり)
- 7) 高橋計介、カキの魅力 - 食物としての重要性、生物としての面白さ - 、アクアネット、19 (11)、2016、22-26 (査読なし)

〔学会発表〕(計 14 件)

- 1) 高橋計介、生物・食品としてのカキ、かきフォーラム in 石巻、2019
- 2) 高橋計介、二枚貝の生体防御機構、第 55 回東北大学農学カルチャー講座、2018
- 3) 高橋計介、生物・食品としてのカキ、かきフォーラム in 仙台、2018
- 4) Tsumuraya, Y, Nakamura-Matsumoto, A, Takahashi, KG, A C-type lectin was identified as a C1q-like protein 4 isoform X1 occurred in the hemolymph of Pacific oyster, 13th Korea-Japan Japan-Korea Joint Symposium of Aquaculture, 2018
- 5) 高橋計介・長谷川拓哉・石井啓文、マガキ血球亜集団のプロテオーム解析、平成 30 年度日本水産学会秋季大会、2018
- 6) 高橋計介・圓谷佑介・長谷川拓哉・石井啓文、マガキ血漿主要タンパク質 cavortin の特性、日本水産増殖学会 第 17 回大会、2018
- 7) 圓谷佑介・高橋計介、マガキ血リンパ C タイプレクチンの分子性状の解明、平成 29 年度日本水産学会春季大会、2018
- 8) 高橋計介・森 勝義、網羅的遺伝子発現解析でみるマガキ顆粒球と無顆粒球との差異、日本水産増殖学会 第 16 回大会、2017
- 9) Takahashi KG, Itoh, N, Quantitative proteomic analysis of Pacific oyster hemocytes in response to pathogen-associated molecular patterns, The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium, 2017
- 10) Takahashi KG, Itoh, N, Mori, K, iTraQ-based quantitative proteomic analysis of hemocytes of

Crassostrea gigas in response to synthetic double-stranded RNA, 7th International Oyster Symposium, 2017

11) Takahashi KG, Introduction of Symposium Session III, Tohoku Forum for Creativity: New Horizons in Food Science via Agricultural Immunology, 2017

12) Takahashi KG, Memory in innate immune system of aquatic invertebrates, The Lorentz Center Workshop "Innate Immunity of Crop, Livestock and Fish", 2016

13) 高橋計介・湯浅和寛、温度および低酸素ストレスによるマガキ血リンパ細菌叢の変化、平成 28 年度日本水産学会秋季大会、2016

14) Takahashi KG, Yuasa K, Analysis of hemolymph microbiome of cultured Pacific oyster in response to different temperatures and hypoxia stresses, 12th Korea-Japan Japan-Korea Joint Symposium of Aquaculture, 2016

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者 なし

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、研究者個人に帰属されます。