

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06216

研究課題名(和文) 光合成細菌がクルマエビの自然免疫を活性化するメカニズムの解明

研究課題名(英文) Studies on the mechanism of the activation of innate immunity of kuruma shrimp by photosynthetic bacteria

研究代表者

宮坂 均 (Miyasaka, Hitoshi)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：60451283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：光合成細菌のクルマエビ養殖でのプロバイオティクス(善玉菌)効果を検討した。その結果、熊本県上天草市の海岸から分離した海産性光合成細菌Rhodovulum sulfidophilum KKMI01をクルマエビに投与することでエビが病気に強くなり、成長も早くなることが確認できた。この成果は九州のクルマエビ養殖場で、安全安心で元気なエビを育てるために利用され始めている。

本技術が従来のプロバイオティクス菌に比べて優れている点は、極めて低濃度で効果があることである。従来の菌は培養原液の1000倍から1万倍希釈で効果が出るが、本技術の菌は100万倍希釈で効果を示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(学術的意義) 微生物(プロバイオティクス菌)によってエビの成長が促進されるという報告は過去40年間で約60報ある。本研究では海産性光合成細菌Rhodovulum sulfidophilum KKMI01投与によりエビの成長に直接関与するクチクラ合成、筋肉合成に関わる遺伝子発現が高まることを示した。これは、プロバイオティクス菌の効果を遺伝子発現レベルで証明した世界初の例である。

(社会的意義) 海産性光合成細菌Rhodovulum sulfidophilum KKMI01はすでにクルマエビ洋食の現場で利用されている。養殖業者には収益増、消費者には良質なクルマエビの提供で貢献している。

研究成果の概要(英文)：Rhodovulum sulfidophilum KKMI01, a marine PNSB is a marine PNSB isolated from the seawater collected in Kami-Amakusa, Kumamoto, Japan. It has a superior effect as probiotics for shrimp. R. sulfidophilum KKMI01 was the first strain of PNSB demonstrated, at the level of gene expression, that it stimulates the innate immunity of shrimp. Significant upregulations of the genes of proPO, SOD2, HPS70, Dph7 (diphthamide biosynthesis 7), and Serpin, a serine protease inhibitors, were observed in kuruma shrimp (*M. japonicus*) by the treatment of R. sulfidophilum KKMI01. This strain was the first probiotic microorganism proven to promote shrimp growth at the level of gene expression, and the effective dosage of this strain was much lower compared to other probiotic microorganisms.

研究分野：生物工学

キーワード：photosynthetic bacteria kuruma shrimp probiotics innate immunity

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

養殖エビの病害は、我国ではクルマエビ、東南アジア他の海外ではバナメイエビ、ブラックタイガー（ウシエビ）などのウイルス病、ピブリオ病が大きな問題となっている。この対策として化学物質に頼らず環境に配慮した技術である有用微生物の利用が有望である。

研究代表者が熊本県上天草市の海岸から分離した海産性光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* (ロドブラム サルフィドフィラム) KKMI01 は、クルマエビに与えると以下の効果がある。

- 1) 養殖池のエビの生残率(歩留り)が 10 ポイント程度向上する(約 60%から約 70%に上昇する。)
- 2) 病原性ピブリオを強制感染したエビの生残率が向上する。
- 3) エビの自然免疫系の遺伝子(活性酸素発生系、活性酸素消去系、抗菌ペプチド、自然免疫制御系、レクチン、等)の発現が顕著に活性化される。

このことから *R. sulfidophilum* KKMI01 は九州の一部のクルマエビ養殖現場で使われ始めているが、この菌がどのようなメカニズムでエビの自然免疫を活性化するかについては明らかではなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、この光合成細菌 *R. sulfidophilum* KKMI01 のエビ養殖での有効性についての科学的エビデンスを確立することを目的に、同菌が持つエビの自然免疫を活性化しエビを病気に強くするメカニズム(因子)の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

#### ・クルマエビの飼育

クルマエビは(株)海老の宮川(熊本県天草市)から入手し、天然海水(Naseem 800, blueLab 社)を用いて飼育した。

#### ・LPS の投与

*R. sulfidophilum* KKMI01 の lipopolysaccharide (LPS) は(自然免疫応用技研株式会社)に委託して分離生成したものをを用いた。

その他比較に用いた LPS は以下のとおりである。

*Rhodobacter sphaeroides* (InvivoGen 社)

*Pantoea agglomerans* (自然免疫応用技研株式会社)

*Salmonella typhimurium* (富士フィルム和光純薬株式会社)

*Escherichia coli* 026 (富士フィルム和光純薬株式会社)

#### ・クルマエビからの RNA の分離精製

RNA の分離精製には以下の試薬を用いた。

Isogen (ニッポンジーン) RNeasy Kit (QIAGEN) RNase-free DNase (QIAGEN)

NA の分離精製は以下の手順で実験を行った。

・トータル RNA の粗抽出は、クルマエビの尻尾と頭を切り落として中腸線と肝臓を含む部分を分離し、これを 15 ml チューブ中で Isogen 8 ml ハンディーマイクロホモジナイザー ヒスコトロン(株式会社マイクロテック・ニチオン製)を用いてホモジナイズし、Isogen の標準プロトコルで RNA を回収した。Isogen で粗抽出した RNA の精製は RNeasy kit および RNase-free DNase を用いて行った。

#### ・qRT-PCR によるクルマエビの遺伝子発現解析

RT-PCR 装置は MyGo Mini Real Time PCR System (フナコシ) を用い、試薬は MyGo Green Mix を用いた。

### 4. 研究成果

クルマエビの自然免疫を活性化する光合成細菌の有効成分を細胞壁成分の LPS と予測してクルマエビへの投与実験と qRT-PCR による遺伝子発現解析を行った。

有効成分を LPS と予測した理由は以下のとおりである。

- ・光合成細菌は死菌でも効果がある。
- ・光合成細菌が活性酸素 ROS 発生系・消去系を活性化する。ROS 発生は典型的な LPS の効果である。
- ・*Pantoea agglomerans* の LPS によるクルマエビの病害抵抗性が向上する報告がある。  
Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide (LPS) Fish & Shellfish Immunology (2000) 10, 555-558 doi:10.1006/fsim.2000.0268

## LPS 投与によるクルマエビの自然免疫関連遺伝子の発現変動

### 1. LPS 投与濃度の設定

光合成細菌 LPS の飼育水への投与濃度を以下の計算から決定した。

光合成細菌培養液の菌濃度  $1 \times 10^9$  cfu/ml      5 mg/ml (菌乾燥重量)

養殖池での *Rhodovulum sulfidophilum* KKMI01 の効果的な投与量は  $1 \times 10^3$  cfu/ml である。

$1 \times 10^3$  cfu/ml      菌重量では  $5 \times 10^{-6}$  mg/ml (5ng/ml)

LPS の含有量は文献値では 5%~10% であるため、菌体 5 ng/ml は LPS では 0.25 ng (250 pg)/ml~0.5 ng (500 pg)/ml と計算された。

以上の計算から、飼育水への LPS 投与濃度は 100 pg/ml を中間値とし、その 1/100 と 100 倍の 1pg/ml と 10 ng/ml の 3 条件に設定した (無投与対照を加えて合計 4 条件)。

LPS は *Rhodovulum sulfidophilum* KKMI01 由来 LPS 投与実験を行った。

結果を Fig. 1 に示した。NADPH oxidase, Prophenoloxidase, Lysozyme-like, Caspase, Crustin-like, C-type lectin3, Serin proteinase inhibitor で対照区に比べて発現が上昇する傾向 (1 より高い値) がみられた。

LPS 濃度が発現レベルに及ぼす影響は、遺伝子によって異なったが、代表的な病害抵抗性タンパク質の Prophenoloxidase (ProPO) で最も高い発現促進効果がみられた 100 pg/ml を以降の実験の投与濃度に設定して、次に様々な菌由来 LPS の投与実験を行った。

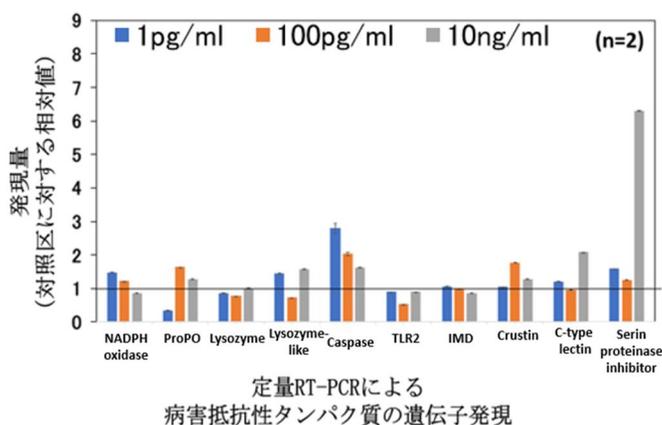


Fig. 1 定量 RT-PCR による病害抵抗性タンパク質の遺伝子発現

### 2. 様々な菌由来LPSのクルマエビへの投与実験

1 で決定した LPS 濃度 100 pg/ml で様々な菌株由来の LPS のクルマエビへの投与実験を行った。結果を Fig. 2 に示した。自然免疫制御系の IMD (Immune deficiency) および Toll-like receptor 1 (TLR1)、メラニン化に関する ProPO では LPS 投与により発現上昇の傾向が見られ、様々な菌の LPS の中では *R. sulfidophilum* KKMI01 の LPS で最も高い上昇傾向が見られた。また、ProPO で上昇が見られたのは、光合成細菌の *R. sulfidophilum* KKMI01 と *Rhodobacter sphaeroides*、および *Pantoea agglomerans* だけで、*Salmonella typhimurium* と *E. coli* では上昇が見られなかった。以上の結果から光合成細菌がエビの病害抵抗性遺伝子の発現を活性化する原因物質の一つが LPS であることが示された。

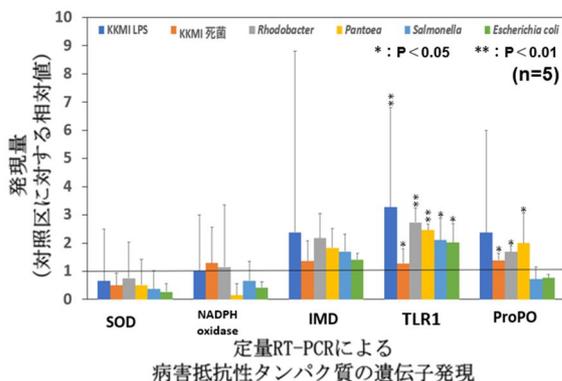


Fig. 2 様々な菌株由来 LPS を投与したクルマエビの病害抵抗性タンパク質の遺伝子発現変動 (定量 RT-PCR による測定)

### 3. *R. sulfidophilum* KKMI01由来LPS投与再確認実験

*R. sulfidophilum* KKMI01 の LPS の濃度範囲を広げて、2.5 pg/ml、25 pg/ml、250

pg/ml、2.5 ng/ml、25 ng/ml の条件で病害抵抗性タンパク質等の遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。また、

*R. sulfidophilum* KKMI01 の生菌  $1 \times 10^3$  colony forming unit (cfu)/ml

*R. sulfidophilum* KKMI01 の死菌  $1 \times 10^3$  cfu/ml

の2条件も比較のため検討した。

結果を Fig. 3 に示した。25 pg/ml の濃度ですべての遺伝子の発現上昇が確認され Serin proteinase inhibitor で最大 60 倍の遺伝子発現が確認された。代表的な病害抵抗性タンパク質の ProPO では 25 pg/ml 以外の濃度では上昇が確認できなかった。溶菌効果がある Lysozyme-like ではすべての濃度で上昇発現が確認された。その他の遺伝子については顕著な上昇は確認することができなかった。25 pg/ml は  $n = 6$  で測定しており、結果のばらつきも少なかったことから、少なくともこの実験では非常に狭い濃度範囲で LPS の顕著な効果が示されたと考えられた。

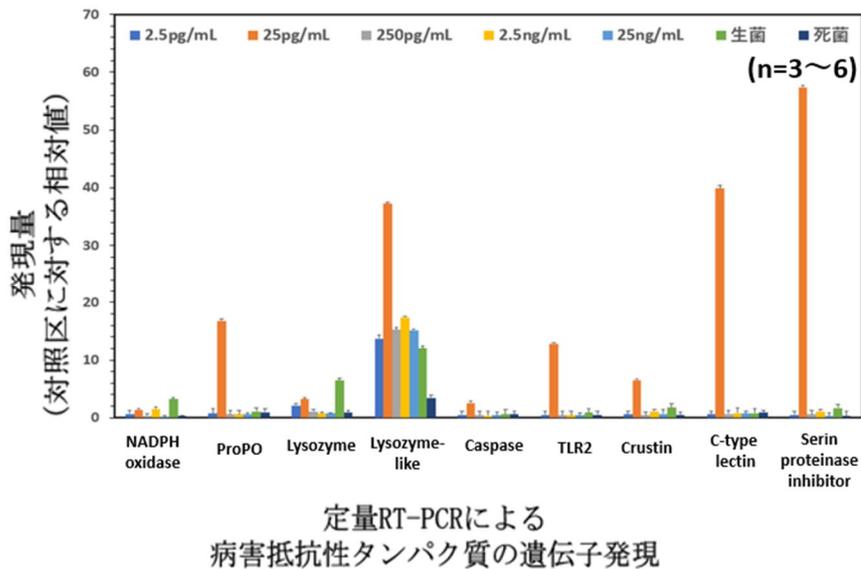


Fig. 3 *R. sulfidophilum* KKMI01 の LPS が病害抵抗性タンパク質の遺伝子発現に及ぼす影響

以上の検討結果から、光合成細菌 *R. sulfidophilum* KKMI01 が持つエビの自然免疫を活性化しエビを病気に強くするメカニズム（因子）の一つが LPS であることが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Aoi Koga, Yusaku Tani, Ken-ichi Ozaki, Takaaki Maki, Shuhei Hayashi, Shinjiro Yamamoto, Hitoshi Miyasaka  | 4. 巻<br>3             |
| 2. 論文標題<br>The effects of a marine photosynthetic bacteria <i>Rhodovulum sulfidophilum</i> on the growth and survival rate of <i>Marsupenaeus japonicus</i> (kuruma shrimp) | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Aquaculture, Fisheries & Fish Science  | 6. 最初と最後の頁<br>245-249 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.25177/JAFFS.3.2.RA.10713  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |
| 1. 著者名<br>Aoi Koga, Shinsuke Takiguchi, Yusaku Tani, Ken-Ichi Ozaki, Takaaki Maki, Hiroshi Okuhata, Satoshi Tanaka, Shuhei Hayashi, Shinjiro Yamamoto, Hitoshi Miyasaka     | 4. 巻<br>-             |
| 2. 論文標題<br>Comparison of the probiotic effects of freshwater and marine photosynthetic bacteria in kuruma shrimp ( <i>Marsupenaeus japonicus</i> ) culture                  | 5. 発行年<br>2022年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Applied Aquaculture  | 6. 最初と最後の頁<br>-       |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1080/10454438.2022.2044958 (2022)   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>Aoi Koga, Midori Goto, Shuhei Hayashi, Shinjiro Yamamoto and Hitoshi Miyasaka   | 4. 巻<br>10            |
| 2. 論文標題<br>Probiotic Effects of a Marine Purple Non-Sulfur Bacterium, <i>Rhodovulum sulfidophilum</i> KKMI01, on Kuruma Shrimp ( <i>Marsupenaeus japonicus</i> )            | 5. 発行年<br>2022年       |
| 3. 雑誌名<br>Microorganisms  | 6. 最初と最後の頁<br>244     |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/microorganisms10020244   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |
| 1. 著者名<br>Aoi Koga, Takumi Yamasaki, Shuhei Hayashi, Shinjiro Yamamoto, Hitoshi Miyasaka  | 4. 巻<br>86            |
| 2. 論文標題<br>Isolation of purple nonsulfur bacteria from the digestive tract of ayu ( <i>Plecoglossus altivelis</i> )   | 5. 発行年<br>2022年       |
| 3. 雑誌名<br>Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>407-412 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/bbb/zbac001  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Hitoshi Miyasaka, Aoi Koga, Takaaki Maki   | 4. 巻<br>39            |
| 2. 論文標題<br>Recent progress in the use of purple non-sulfur bacteria as probiotics in aquaculture | 5. 発行年<br>2023年       |
| 3. 雑誌名<br>World Journal of Microbiology and Biotechnology  | 6. 最初と最後の頁<br>145-160 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s11274-023-03592-6   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

〔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<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|