

クルマエビ類と微生物叢の関係に関する基礎的研究

著者	今泉 健太郎
学位名	博士(海洋科学)
学位授与機関	東京海洋大学
学位授与年度	2021
学位授与番号	12614博甲第615号
URL	http://id.nii.ac.jp/1342/00002405/

博士学位論文内容要旨
Abstract

専攻 Major	応用生命科学	氏名 Name	今泉 健太郎
論文題目 Title	クルマエビ類と微生物叢の関係に関する基礎的研究		

クルマエビ類養殖は最も甚大な魚病被害を受けてきた養殖産業の一つであり、効果的な感染症防除法の開発が求められている。水中に棲むクルマエビ類は、環境中の微生物群に絶えず曝されており、宿主免疫系、病原微生物および養殖環境の包括的な理解を深める必要がある。そこで本研究は、クルマエビ類を取り巻く微生物群とエビの関係に関する基本的な知見を得ることを目的とした。

まず、バナメイエビ *Litopenaeus vannamei* の胃と中腸およびクルマエビ *Marsupenaeus japonicus* の胃内容物と中腸内容物（糞便）について次世代シーケンサー（NGS）を使用した網羅的な 16S rRNA 遺伝子（16S rDNA）解析を行った。16S rDNA の PCR 増幅産物をライブラリ化し、MiSeq を使用してシーケンシングを行った。得られた配列データは解析パイプラインの Qiime2 を使用して解析した。バナメイエビおよびクルマエビの胃ないし胃内容物の細菌組成は中腸あるいは糞便の細菌組成と比較して、顕著に多様性が高かった。クルマエビ類では、胃酸が存在しないことや後述の構造的な特徴などに起因して消化管の上流に当たる胃内の細菌組成の多様性が高くなっているものと考えられる。なお、本研究では *Bacillus amyloliquefaciens* TOA5001 株芽胞を添加した餌料を使用しており、解析結果から、プロバイオティクスの投与がクルマエビ類の腸管内のみでなく胃内の細菌叢に影響を及ぼすことが示唆された。

次に、タイ国南部スラターニーのバナメイエビ養殖場にてサンプルを採取し解析した。二つの養殖池の表層水を採取するとともに各池のバナメイエビの胃および中腸を採取した。バナメイエビ養殖池の細菌叢はサンプル採取期間（7 日間）を通して比較的安定していた。また、サンプル採取地点の影響はほとんどなく、表層水の細菌は一様に分布していると考えられた。これらについて主座標分析を行うと、池の水の細菌叢が池ごとに異なり、また、各池の細菌叢が連続的に変化していたことが明らかとなった。これとは対照的に、池の水の真核微生物叢は 1 日から 2 日程度の短期間で急速に変化していた。バナメイエビの胃および中腸の細菌叢は池ごとにその傾向が異なり、特に、一方の池のエビの胃で優占種となっている特徴的な細菌が見出された。バナメイエビの胃および中腸の細菌組成は水中の細菌組成と大きく異なり、クルマエビ類の消化管内に特有の細菌叢が形成されていることが示唆された。

昆虫類では、中腸で合成されたキチンをもとにして薄膜が形成され、これが腸管内容物をチューブ状に包み込んで排泄されることが知られている。この薄膜は囲食膜と呼ばれ、腸管における物理的なバリア機構であると考えられており、消化管内の細菌と宿主の関わりを知るうえで重要である。しかしながら、クルマエビ類の消化管におけるキチン合成と囲食膜についてはほとんど研究が行われていない。そこで、クルマエビの囲食膜の組織学的な観察とキチン合成酵素遺伝子の解析を行った。クルマエビの中腸切片を検鏡すると、腸管内容物は薄膜によって腸上皮から隔離されていることが確認された。続いて、クルマエビの中腸由来の転写産物からキチン合成酵素 cDNA の配列決定を行った。キチン合成酵素 mRNA はクルマエビの体サイズを問わず中腸および肝臓で恒常的に検出され、囲食膜形成に関与していることが示唆された。クルマエビの腸上皮と腸内容物は囲食膜によって物理的に隔てられており、腸管内に細菌が定着することは困難であると考えられた。したがって、いわゆるエビの腸内細菌として従来解析されてきたものは、摂食された餌料等とともに消化管内に侵入した細菌や胃などの消化管上流部位から流出した細菌が、消化物とともに腸管内腔を通過しているものであると

考えられた。

甲殻類を含む節足動物の粘膜器官においてその細菌叢がどのように制御されているかは未だ明らかでない。そこで、クルマエビの C 型レクチン MjGCTL に着目した解析を行った。MjGCTL の mRNA はクルマエビのエラ、胃および後腸といった粘膜器官で検出された。この MjGCTL に対して特異的な二本鎖 RNA を作製し、クルマエビに接種した。コントロールとして、PBS ないし GFP 遺伝子配列に特異的な二本鎖 RNA を接種する試験区を設置した。接種 3 日後にエビのエラおよび胃を採取し、RNA を抽出して定量 RT-PCR を行うとともに、同一のサンプルから DNA を抽出し前述と同様の細菌叢解析を行った。MjGCTL をノックダウンした試験区は、コントロールおよび接種前個体群とはエラ細菌叢が異なる傾向が認められた。しかしながら、胃細菌叢に顕著な変化は認められなかった。さらに、MjGCTL をノックダウンしたクルマエビは、コントロールと比較して、エラ黒病原菌 *Fusarium* sp. に対する感受性が増加した。

以上より、クルマエビ類では消化管内に特有の細菌叢が形成されており、特に胃内の細菌叢が多様であること、腸管に囲食膜を形成すること、自然免疫系による粘膜器官の細菌叢制御が行われている可能性が示された。既往研究の多くでは、クルマエビ類の腸管に存在する細菌が解析されている。しかしながら、本研究の結果をもとに、クルマエビ類の胃およびエラの細菌叢を解析することを提案する。これらの粘膜器官は、クルマエビ類に対する典型的な病原体である *Vibrio* 属細菌や *Fusarium* 属菌の感染部位であることから合理的である。さらに、中腸で形成される物理的なバリア機構は、クルマエビ類の消化管内細菌と生体防御機構を研究する上で重要な要素となる。これらの知見をもとに、常在細菌叢や物理的なバリア機構を利用したクルマエビ類の感染症防除技術の開発が期待される。